

# MutaPLEX® Tropica 1 real time RT-PCR kit

*Test für den qualitativen in-vitro-Nachweis der RNA von  
Zikavirus, Chikungunyavirus, Denguevirus 1–4 und  
Gelbfiebertypus in klinischen Proben*

*Test for the qualitative in-vitro detection of RNA from  
zika virus, chikungunya virus, dengue viruses 1–4 and  
yellow fever virus in clinical specimens*

Gültig ab / Valid from 2018-02-14

REF **KG199032**

$\Sigma$  32

REF **KG199096**

$\Sigma$  96



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)



# Inhalt

<b>1</b>	<b>VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>TESTPRINZIP</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>4</b>
<b>5</b>	<b>ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>4</b>
<b>6</b>	<b>TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT</b>	<b>5</b>
<b>7</b>	<b>WICHTIGE HINWEISE</b>	<b>5</b>
<b>8</b>	<b>ALLGEMEINE HINWEISE</b>	<b>5</b>
<b>9</b>	<b>PROBENMATERIAL</b>	<b>6</b>
<b>10</b>	<b>PROBENVORBEREITUNG</b>	<b>6</b>
<b>11</b>	<b>KONTROLL-RNA</b>	<b>6</b>
	<i>RNA-Isolation aus klinischen Proben</i>	<i>7</i>
<b>12</b>	<b>REAL-TIME-PCR</b>	<b>7</b>
	<i>12.1 Wichtige Hinweise vor Beginn</i>	<i>7</i>
	<i>12.2 Durchführung</i>	<i>7</i>
	<i>12.3 Geräteeinstellungen</i>	<i>9</i>
<b>13</b>	<b>INTERPRETATION DER ERGEBNISSE</b>	<b>10</b>
<b>14</b>	<b>VALIDIERUNGSDATEN</b>	<b>13</b>
<b>15</b>	<b>EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>14</b>
<b>16</b>	<b>PROBLEMBEHANDLUNG</b>	<b>14</b>
<b>17</b>	<b>LEISTUNGSDATEN</b>	<b>16</b>
	<i>17.1 Analytische Sensitivität</i>	<i>16</i>
	<i>17.2 Analytische Spezifität</i>	<i>16</i>
<b>17.3</b>	<b>REFERENZMATERIAL UND VERGLEICHSMESSUNGEN</b>	<b>18</b>
<b>18</b>	<b>ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE</b>	<b>19</b>
<b>19.</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>20</b>

## 1 VERWENDUNGSZWECK

Der MutaPLEX® Tropica 1 Real-time-RT-PCR-Kit dient dem Nachweis der RNA des Zika-virus, Chikungunyavirus, Dengue-Virus 1–4 und Gelbfiebervirus, die aus klinischen Proben (z. B. Blutproben, Serumproben, Urinproben) extrahiert wurde, mittels Real-time-PCR in offenen Real-time-PCR-Systemen.

## 2 EINLEITUNG

Eine Zikavirusinfektion wird von einem Virus verursacht, das vorwiegend in tropischen Regionen durch Stechmücken der Gattung *Aedes* übertragen wird. Es kann jedoch auch durch Geschlechtsverkehr übertragen werden. Die Inkubationszeit der Zikavirusinfektion ist noch unbekannt, beträgt jedoch vermutlich wenige Tage. Die auftretenden Symptome ähneln denen anderer Arbovireninfektionen, beispielsweise des Denguevirus oder des West-Nil-Virus, und umfassen Fieber, Hautausschläge, Konjunktivitis, Muskel- und Gelenkschmerzen, Unwohlsein und Kopfschmerzen. Die Symptome sind üblicherweise mild, erfordern keine spezifische Behandlung und klingen nach zwei bis sieben Tagen ab. Mögliche Spätfolgen einer Zikavirusinfektion sind das Guillan-Barré-Syndrom sowie Mikroenzephalie bei Kindern, deren Mütter während der Schwangerschaft infiziert waren. Verbindungen zu weiteren eurologischen Komplikationen werden noch untersucht. Ein Impfstoff gegen das Zikavirus ist gegenwärtig noch nicht verfügbar.

Auch Chikungunyafieber ist eine Viruserkrankung, die durch infizierte Stechmücken übertragen wird. Die Erkrankung tritt vorwiegend in Afrika, Asien und dem indischen Subkontinent auf.; ein großer Ausbruch im Jahr 2015 fand in einigen Ländern in Nord- und Südamerika statt. Nach dem Stich einer infizierten Stechmücke beträgt die Inkubationszeit zwei bis zwölf Tage, liegt aber für gewöhnlich zwischen vier und acht Tagen. Chikungunyafieber und Denguefieber haben viele ähnliche Symptome, so dass es in den Verbreitungsgebieten beider Erkrankungen zu Fehldiagnosen kommen kann. Die Symptome des Chikungunyafiebers beinhalten Fieber und starke Gelenkschmerzen. Weitere Symptome sind beispielsweise Muskelschmerzen, Kopfschmerzen, Übelkeit, Ermüdungserscheinungen und Hautauschlag. Die meisten Patienten erholen sich vollständig, in einigen Fällen können die Gelenkschmerzen jedoch über Monate, manchmal sogar Jahre, bestehen. Es gibt Berichte von gelegentlichen Augen-, Herz-, neurologischen und gastrointestinalen Komplikationen. Ernsthafte Komplikationen sind unüblich, doch bei älteren Patienten kann die Erkrankung dazu beitragen, dass der Patient verstirbt. Die Behandlung des Chikungunyafiebers konzentriert sich auf die Linderung der Symptome.

Denguefieber ist eine von Stechmücken übertragene Virusinfektion, die von vier verschiedenen, nah verwandten Serotypen des Denguevirus verursacht wird. Das Hauptverbreitungsgebiet der Dengueviren liegt in tropischen und subtropischen

Klimazonen weltweit, meist in urbanen und semiurbanen Gegenden. Das globale Auftreten des Denguefiebers ist in den letzten Jahrzehnten dramatisch angestiegen. Die Infektion verursacht eine grippeähnliche Erkrankung und entwickelt gelegentlich potentiell tödliche Komplikationen, die als hämorrhagisches Denguefieber oder folgend Dengue-Schock-Syndrom bekannt sind. Eine Dengue-Infektion liegt vermutlich vor, wenn hohes Fieber von zwei der folgenden Symptome begleitet wird: starke Kopfschmerzen, Schmerzen hinter den Augen, Muskel- und Gelenkschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, geschwollene Lymphknoten oder Ausschlag. Die Inkubationszeit der Infektion liegt zwischen vier und zehn Tagen, die Symptome verklingen üblicherweise nach zwei bis sieben Tagen. Hämorrhagisches Denguefieber ist eine potentiell tödliche Komplikation aufgrund innerer Blutungen, Ödemen, Atembeschwerden und Organfunktionsstörungen. Es existiert keine spezifische Therapie zur Behandlung von Denguefieber bzw. hämorrhagisches Denguefieber, ein Impfstoff wurde jedoch registriert und ist in einigen Ländern erhältlich.

Gelbfieber ist ein akutes hämorrhagisches Fieber, das von infizierten Stechmücken übertragen wird. Der Gelbfiebertivirus ist in den tropischen Gebieten Afrikas sowie Zentral- und Südamerikas endemisch. Nach der Infektion folgt eine Inkubationszeit von drei bis sechs Tagen. Viele Infizierte zeigen keinerlei Symptome, wenn diese jedoch auftreten, beinhalten sie meist Fieber, Muskelschmerzen mit starken Rückenschmerzen, Kopfschmerzen, Appetitverlust, Übelkeit und Erbrechen. In den meisten Fällen klingen die Symptome nach drei bis vier Tagen ab. Ein kleiner Prozentsatz von Patienten tritt innerhalb von 24 Stunden nach Abklingen der ersten Symptome in eine zweite, gefährlichere Phase der Erkrankung ein. Hohes Fieber kehrt zurück, verschiedene Organsysteme werden beeinträchtigt, in der Regel Leber und Nieren. In dieser Phase entwickeln die Patienten meist Gelbsucht und haben dunklen Urin sowie Bauchschmerzen mit Erbrechen. Blutungen aus Mund, Nase, Augen oder dem Magen sind möglich. Die Hälfte der Patienten, die diese zweite Krankheitsphase erreichen, sterben innerhalb von sieben bis zehn Tagen. Gelbfieber kann mit einer Impfung vorgebeugt werden.

### 3 TESTPRINZIP

Der MutaPLEX® Tropica 1 Real-time-RT-PCR-Kit enthält spezifische Primer und fluoreszenzfarbstoffmarkierte Sonden für die Amplifikation der RNA von Zikaviren, Chikungunyaviren, Dengueviren 1–4 und Gelbfiebertviren, die aus klinischen Proben (z. B. Blutproben, Serumproben, Urinproben) extrahiert wurden.

Die reverse Transkription (RT) der viralen RNA zu cDNA und die anschließende Amplifikation der virusspezifischen Fragmente werden in einer nur einen Schritt umfassenden RT-PCR durchgeführt. Die Detektion der Amplifikation erfolgt in Echtzeit durch die Hybridisierung und anschließende Hydrolyse der erregerspezifischen Flu-

oreszenzsonden. Die pathogenspezifische Detektion erfolgt im FAM-Kanal (Gelbfiebertivirus und Chikungunyavirus), ROX-Kanal (Denguevirus 1–4) und Cy5-Kanal (Zikavirus).

Zusätzlich verfügt der MutaPLEX® Tropica 1 Real-time-RT-PCR-Kit über eine Kontroll-RNA, die während der Extraktion zugefügt und in einem zweiten Amplifikationssystem nachgewiesen wird. Dies ermöglicht zum Einen das Aufdecken von Fehlern bei der RNA-Extraktion, zum Anderen kann eine mögliche Inhibition der RT-PCR identifiziert werden. Dadurch wird das Risiko von falsch negativen Ergebnissen reduziert. Die Detektion der RNA-Extraktionskontrolle erfolgt im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal.

## 4 INHALT DER TESTPACKUNG

Die mitgelieferten Komponenten sind ausreichend für den Ansatz von 96 (KG199096) bzw. 32 (KG199032) Nachweisreaktionen.

Tabelle 1: Inhalt des MutaPLEX® Tropica 1 Real-time-RT-PCR-Kits

Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt	
		32	96
Reaction Mix 1 (Zikavirus, Gelbfiebertivirus)	gelb	1 x 474 µl	2 x 711 µl
Reaction Mix 2 (Chikungunya virus, Denguevirus 1–4)	orange	1 x 474 µl	2 x 711 µl
Enzyme	blau	1 x 12.8 µl	2 x 19.2 µl
Positive Control 1 (Zikavirus, Gelbfiebertivirus)	rot	1 x 75 µl	1 x 220 µl
Positive Control 2 (Chikungunya virus, Denguevirus 1–4)	rot	1 x 75 µl	1 x 220 µl
Negative Control	grün	1 x 150 µl	1 x 440 µl
Control RNA	transparent	1 x 320 µl	2 x 480 µl

## 5 ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- RNA-Extraktionskit (z.B. MutaCLEAN® Universal RNA/DNA, KG1038, oder das magnetpartikelbasierte System MutaCLEAN® Complete Mag RNA/DNA, KG1020)
- Steriles Wasser, geeignet für PCR-Anwendung

- Sterile Reaktionsgefäße
- Pipetten (variable Volumina)
- sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Tischzentrifuge
- Vortex-Wirbelmischer
- Real-time-PCR-Gerät
- optische PCR-Gefäße mit Deckel
- optional: Colour compensation kit
- optional: Pipettiergeräte zur Automation
- optional: VLP-RNA (virusähnliche Partikel, KG7015, siehe Kapitel 11)

## 6 TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT

Der Transport des MutaPLEX® Tropica 1 Real-time-RT-PCR-Kit erfolgt gefroren auf Trockeneis. Alle Komponenten sind direkt nach Erhalt lichtgeschützt bei maximal -20 °C zu lagern. Nach Ablauf des auf der Packung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden.

Nach Anbruch der Reagenzien sind diese für maximal sechs Monate bei 2–8 °C haltbar. Bis zu 20 Frier-Tau-Zyklen sind möglich.

Schützen Sie den Test während der gesamten Testlaufzeit vor direkter Sonneneinstrahlung.

## 7 WICHTIGE HINWEISE

- Die MutaPLEX® Tropica 1 Real-time-RT-PCR muss in für diesen Zweck geeigneten Laboratorien und von speziell geschultem Personal durchgeführt werden.
- Die Richtlinien der *Good Laboratory Practice* (GLP) sind einzuhalten.
- Alle Proben müssen als potentiell infektiös betrachtet werden und alle mit den Proben in Berührung kommenden Gegenstände müssen als potentiell kontaminiert erachtet werden.

## 8 ALLGEMEINE HINWEISE

- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Areale für die Probenvorbereitung und den Ansatz des PCR-Master-Mix sollten strikt getrennt sein.

- Pipetten, Röhrchen und andere Arbeitsmaterialien dürfen nicht von einem Bereich in den anderen zirkulieren.
- Immer Pipettenspitzen mit Filtern verwenden.
- Pipetten und Arbeitsflächen regelmäßig mit geeigneter Dekontaminationslösung reinigen (keine ethanolhaltigen Mittel).
- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.

## 9 PROBENMATERIAL

Das Ausgangsmaterial für die Nachweisreaktion ist RNA, die aus klinischen Proben (z. B. Blut-, Serum-, Urinproben) isoliert wurde.

## 10 PROBENVORBEREITUNG

Die MutaPLEX® Tropica 1 Real-time-RT-PCR ist geeignet für den Nachweis von RNA, die zuvor aus mit Hilfe geeigneter Methoden aus Proben isoliert wurde. Kommerziell erhältliche Extraktionskits können zur RNA-Isolierung verwendet werden. Immundiagnostik empfiehlt MutaCLEAN® Universal RNA/DNA (KG1038) oder das magnetpartikelbasierte System MutaCLEAN® Complete Mag RNA/DNA (KG1020).

**Wichtig:** Unabhängig vom verwendeten Probenmaterial sollte zusätzlich zu den Proben eine Wasserkontrolle (Reinstwasser) extrahiert werden, anhand derer sich eventuell auftretende Inhibitionen und Kontaminationen ablesen lassen. Diese Wasserkontrolle muss analog einer Probe behandelt werden.

### **Beachten Sie bitte auch Kapitel 11 (Kontroll-RNA).**

Falls die Real-time-PCR nicht sofort durchgeführt wird, müssen die RNA-Extrakte entsprechend den Angaben des RNA-Extraktionskitherstellers aufbewahrt werden.

## 11 KONTROLL-RNA

Der MutaPLEX® Tropica 1 Real-time-RT-PCR enthält eine Kontroll-RNA, die zum einen als RNA-Extraktionskontrolle dient, zum anderen als interne Kontrolle mögliche Inhibitionen der Real-time-PCR aufzeigt.

Die virusähnlichen Partikel (*virus-like particles*, VLP, KG7015) sind nicht im Kit enthalten. Sollten sie verwendet werden, müssen sie den klinischen Proben direkt zugesetzt werden. VLP-RNA kann sowohl als probenähnliche Extraktionskontrolle verwendet werden als auch in Extraktionsautomaten, bei denen die Kontroll-RNA



aufgrund von Gerätespezifikationen nicht zum ersten Puffer (z.B. Bindepuffer) des verwendeten Extraktionskits zugesetzt werden kann.

### *RNA-Isolation aus klinischen Proben*

#### **a) Kontroll-RNA oder VLP-RNA als Extraktionskontrolle**

MutaPLEX® Tropica 1 Kontroll-RNA oder VLP-RNA zur RNA-Extraktion geben.

5 µl Kontroll-RNA oder VLP-RNA zu jeder Extraktion zugeben (5 µl x (N+1)), gut mischen. Führen Sie die RNA-Isolation gemäß der Anleitung des Herstellers durch. Setzen Sie anschließend die Real-time-PCR nach Protokoll A an.

**Die Kontroll-RNA muss dem Lysepuffer des Extraktionskits zugesetzt werden.**

#### **b) Kontroll-RNA als interne Kontrolle der Real-time-PCR**

Sollte keine Kontrolle der RNA-Extraktion gewünscht sein, wohl aber eine Kontrolle der PCR, so kann die Kontroll-RNA erst beim Ansetzen der PCR zugegeben werden. In diesem Fall ist die Real-time-PCR nach Protokoll B anzusetzen.

## **12 REAL-RT-TIME-PCR**

### *12.1 Wichtige Hinweise vor Beginn*

- Bitte beachten Sie Kapitel 7 („Wichtige Hinweise“).
- Bevor Sie die PCR ansetzen, machen Sie sich mit dem Real-time-PCR-Gerät vertraut.
- Die Programmierung des Temperaturprofils sollte abgeschlossen sein, bevor die PCR angesetzt wird.
- Beachten Sie, dass in jedem PCR-Lauf mindestens eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle enthalten sein sollte.
- Alle Reagenzien müssen komplett aufgetaut, gemischt und kurz an zentrifugiert werden.
- Wir empfehlen, die Reagenzien stets in einem Kühlblock (+2 bis +8 °C) oder auf Eis zu kühlen.

### *12.2 Durchführung*

Falls die Kontroll-RNA oder VLP-RNA als echte Extraktionskontrolle verwendet wird, bitte Protokoll A folgen. Wird die Kontroll-RNA lediglich zur Kontrolle einer möglichen Inhibition der Real-time-PCR verwendet, bitte Protokoll B befolgen.

## Protokoll A

**Die Kontroll-RNA oder VLP-RNA wurde bereits zur RNA-Extraktion zugegeben** (siehe Kapitel 11 „Kontroll-RNA“). In diesem Fall wird der Master-Mix gemäß Tabelle 2 angesetzt.

Der Master-Mix enthält alle benötigten Komponenten außer der Probe. Setzen Sie für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze mindestens einen Ansatz mehr als benötigt an.

Tabelle 2: Herstellung des Master-Mixes 1 oder 2 (Kontroll-RNA wurde während der RNA-Extraktion zugefügt)

Reaktionsvolumen	Master-Mix-Volumen
14,8 µl Reaction Mix 1 oder 2	14,8 µl x (N+1)
0,2 µl Enzyme	0,2 µl x (N+1)

## Protokoll B

Die Kontroll-RNA wird ausschließlich zur Kontrolle der Real-time-PCR verwendet (siehe Kapitel 11 „Kontroll-RNA“). In diesem Fall wird der Master-Mix gemäß Tabelle 3 angesetzt.

Der Master-Mix enthält alle benötigten Komponenten außer der Probe. Setzen Sie für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze mindestens einen Ansatz mehr als benötigt an.

**Wichtig:** Verdünnen Sie die **Kontroll-RNA 1:10** in sterilem Wasser (z. B. 1 µl Control RNA + 9 µl steriles Wasser) vor Zugabe zum jeweiligen Master-Mix.

Tabelle 3: Herstellung des Master-Mixes 1 oder 2 (die Kontroll-RNA wird dem Master-Mix beigemischt)

Reaktionsvolumen	Master-Mix-Volumen
14,8 µl Reaction Mix 1 oder 2	14,8 µl x (N+1)
0,2 µl Enzyme	0,2 µl x (N+1)
0,2 µl Control RNA* <b>1:10 verdünnt</b>	0,2 µl x (N+1)*

\* Die durch Zugabe der Kontroll-RNA verursachte Volumenerhöhung kann vernachlässigt werden. Die Sensitivität des Nachweissystems ist dadurch nicht beeinträchtigt.

## Protokoll A und B: Ansetzen der Real-time-RT-PCR

- Benötigte Anzahl optischer PCR-Reaktionsgefäße in den Kühlblock des Real-time-PCR-Geräts stellen.
- 15 µl des Master-Mix in jedes Gefäß pipettieren.

- 10 µl der RNA-Eluate (inklusive des Eluats der Wasserkontrolle), die Positivkontrolle und die Negativkontrolle in die entsprechenden Gefäße pipettieren (Tabelle 4).
- Die Reaktionsgefäße sofort nachdem die Probe zugefügt wurde verschließen, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren.

Tabelle 4: Ansetzen der Real-time-RT-PCR

Komponente	Volumen
Master-Mix	15,0 µl
Probe	10,0 µl
Gesamtvolumen	25,0 µl

### 12.3 Geräteeinstellungen

Für die Real-time-RT-PCR ist das in Tabelle 5 beschriebene Temperaturprofil zu benutzen.

Tabelle 5: Real-time-RT-PCR-Temperaturprofil

Beschreibung	Dauer	Temperatur	Zyklusanzahl
Reverse Transkription	8 min	50 °C	1
Initiale Denaturierung	3 min	95 °C	1
cDNA-Amplifikation			45
Denaturierung	10 s	95 °C	
Annealing und Verlängerung	45 s Messung am Ende dieses Schrittes	60 °C	

Abhängig vom verwendeten Real-time-Gerät müssen noch weitere, in Tabelle 6 aufgelistete Einstellungen vorgenommen werden.

Tabelle 6: Überblick über die für die MutaPLEX® Tropica 1 Real-time-RT-PCR benötigten Geräteeinstellungen

Real-time-PCR-Gerät	Parameter	Detektionskanal	Bemerkungen		
LightCycler 480II	Chikungunyavirus, Gelbfiebervirus Denguevirus 1–4 Kontroll-RNA Zikavirus	465–510 533–610 533–580 618–660	Colour compensation kit Multiplex 1 benötigt		
			<b>Melt factor</b>	<b>Quant factor</b>	<b>Max integration time (s)</b>
			1	10	1
			1	10	2
			1	10	2
Stratagene Mx3000P/ Mx3005P	Chikungunyavirus, Gelbfiebervirus Denguevirus 1–4 Kontroll-RNA Zikavirus	FAM ROX HEX Cy5	Gain 8	Reference dye: none	
			Gain 1		
			Gain 1		
			Gain 4		
ABI 7500	Chikungunyavirus, Gelbfiebervirus Denguevirus 1–4 Kontroll-RNA Zikavirus	FAM ROX JOE Cy5	Option reference dye ROX: NO		
Rotor-Gene Q/3000/ 6000	Chikungunyavirus, Gelbfiebervirus Denguevirus 1–4 Kontroll-RNA Zikavirus	Grün Orange Gelb Rot	Gain 5		
			Gain 5		
			Gain 5		
			Gain 5		

### 13 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die virusspezifischen Amplifikationen werden im FAM-, ROX- und Cy5-Kanal detektiert. Die Amplifikation der Kontroll-RNA wird im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal gemessen. Die Positivkontrolle enthält in-vitro-Transkripte der jeweiligen Nukleinsäuresequenzen des Zikavirus, Chikungunyavirus, Denguevirus 1–4 und Gelbfiebervirus.

Für die Positivkontrolle sind Signale im FAM-, ROX- und Cy5-Kanal erforderlich. Die Interpretation der Testergebnisse ist in den Tabellen 7 und 8 beschrieben.

Tabelle 7: Interpretation Reaction Mix 1

<b>C<sub>t</sub>-Werte</b>			<b>Interpretation</b>
<b>FAM-Kanal</b> Gelbfiebervirus	<b>Cy5-Kanal</b> Zikavirus	<b>HEX-Kanal</b> Kontroll-RNA	
positiv	positiv	positiv oder negativ*	Positives Ergebnis, die Probe enthält Gelbfieber- und Zikavirus-RNA. Das Ergebnis der Kontroll-RNA ist irrelevant.
positiv	negativ	positiv oder negativ*	Positives Ergebnis, die Probe enthält Gelbfiebervirus-RNA. Das Ergebnis der Kontroll-RNA ist irrelevant.
negativ	positiv	positiv oder negativ*	Positives Ergebnis, die Probe enthält Zikavirus-RNA. Das Ergebnis der Kontroll-RNA ist irrelevant.
negativ	negativ	≤ 34**	Negatives Ergebnis, die Probe enthält weder Gelbfieber- noch Zikavirus-RNA.
negativ	negativ	negativ oder > 34**	Es kann keine diagnostische Aussage getroffen werden. Die Real-time-PCR ist entweder inhibiert oder es traten Fehler während der RNA-Extraktion auf.

Tabelle 8: Interpretation Reaction Mix 2

<b>C<sub>t</sub>-Werte</b>			<b>Interpretation</b>
<b>FAM-Kanal</b> Chikungunya-virus	<b>ROX-Kanal</b> Denguevirus 1–4	<b>HEX-Kanal</b> Kontroll-RNA	
positiv	positiv	positiv oder negativ*	Positives Ergebnis, die Probe enthält Chikungunya- und Denguevirus-RNA. Das Ergebnis der Kontroll-RNA ist irrelevant.

<b>C<sub>t</sub>-Werte</b>			<b>Interpretation</b>
<b>FAM-Kanal</b> Chikungunya- virus	<b>ROX-Kanal</b> Denguevirus 1–4	<b>HEX-Kanal</b> Kontroll-RNA	
positiv	negativ	positiv oder negativ*	Positives Ergebnis, die Probe enthält Chikungunyavirus-RNA. Das Ergebnis der Kontroll-RNA ist irrelevant.
negativ	positiv	positiv oder negativ*	Positives Ergebnis, die Probe enthält Denguevirus-RNA. Das Ergebnis der Kontroll-RNA ist irrelevant.
negativ	negativ	≤ 34**	Negatives Ergebnis, die Probe enthält weder Chikungunya- noch Denguevirus-RNA.
negativ	negativ	negativ oder > 34**	Es kann keine diagnostische Aussage getroffen werden. Die Real-time-PCR ist entweder inhibiert oder es traten Fehler während der RNA-Extraktion auf.

\* Ein starkes positives Signal im FAM-, Cy5- und/oder ROX-Kanal kann die interne Kontrolle inhibieren. In solchen Fällen kann das Ergebnis der Kontroll-RNA vernachlässigt werden.

\*\* Die C<sub>t</sub>-Werte verschieben sich ggf. je nach verwendetem PCR-Gerät und/oder der verwendeten Extraktionsmethode. Die Wasserkontrolle kann als Referenz verwendet werden. Falls der C<sub>t</sub>-Wert im HEX-Kanal stark von dem der Wasserkontrolle abweicht, liegt eine teilweise Inhibition vor, die im Falle schwach positiver Proben zu einem falsch negativen Ergebnis führt.

Abbildung 1 und Abbildung 2 zeigen Beispiele für positive und negative Real-time-PCR-Ergebnisse.

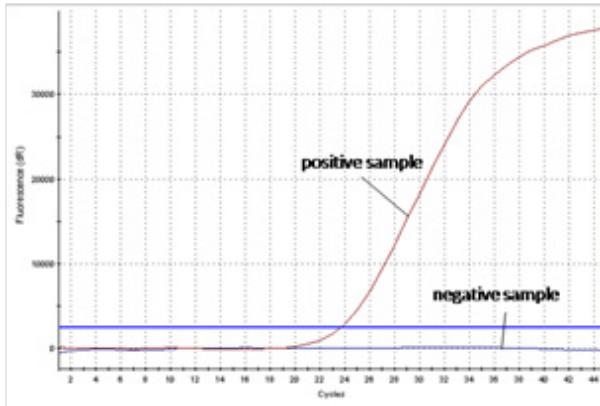


Abb. 1: Die positive Probe zeigt eine starke pathogenspezifische Amplifikation, während bei der negativen Probe kein Fluoreszenzsignal detektiert wird.

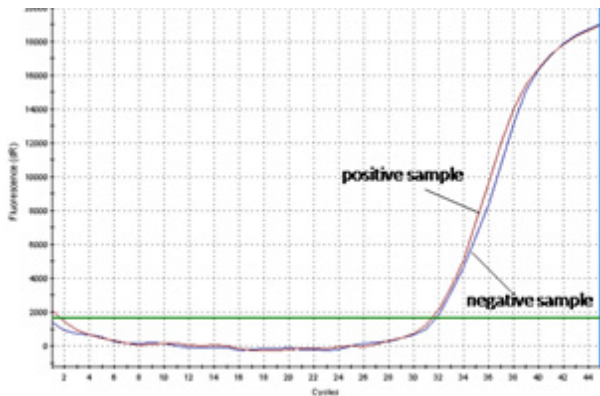


Abb. 2: Im Kontroll-RNA-spezifischen VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal zeigen sowohl die positive als auch die negative Probe ein Signal. In diesem Fall liegt keine Inhibition der Real-time-PCR vor, auch verlief die RNA-Extraktion erfolgreich. Die negative Probe ist somit als tatsächlich negativ zu werten.

## 14 VALIDIERUNGSDATEN

Stellen Sie die Grenzwerte des Real-time-Geräts wie im Folgenden beschrieben ein.

### **Negativkontrollen**

Alle Negativkontrollen sollten unter dem Grenzwert liegen. Im Falle einer möglichen Kontamination (Auftreten einer Kurve in der Negativkontrolle oder einer Anhäufung von Kurven in Proben mit hohem  $C_t$ , beispielsweise über 36) sind die erhaltenen Ergebnisse nicht interpretierbar und der gesamte Lauf (inklusive der Extraktion) muss wiederholt werden.

### **Positivkontrollen**

Alle Positivkontrollen müssen eine positive, d.h. exponentielle Amplifikationskurve aufweisen. Die Positivkontrollen müssen unter einen  $C_t$ -Wert von 30 fallen.

### **Interne Kontrollen**

Alle internen Kontrollen müssen eine positive, d.h. exponentielle Amplifikationskurve aufweisen. Der  $C_t$ -Wert der internen Kontrolle muss unter 33 liegen. Falls der  $C_t$ -Wert der internen Kontrolle über 34 liegt, deutet dies auf ein RNA-Aufreinigungsproblem oder eine stark positive Probe hin, welche die interne Kontrolle inhibieren kann. In letzterem Fall ist das Testergebnis valide. Falls eine Wasserkontrolle durchgeführt wurde, muss der  $C_t$ -Wert der internen Kontrolle unter 33 liegen.

## **15 EINSCHRÄNKUNGEN**

Die Ergebnisse müssen stets im Kontext der klinischen Symptome betrachtet werden. Therapeutische Entscheidungen sollten unter Berücksichtigung klinischer Daten getroffen werden.

Ein negatives Testergebnis schließt eine Infektion mit den jeweiligen Viren nicht aus.

## **16 PROBLEMBEHANDLUNG**

Die folgenden Problembeschreibungen sollen bei eventuell auftretenden Problemen mit der Real-time-PCR behilflich sein. Sollten Sie weitere Fragen, haben wenden Sie sich bitte direkt an Immundiagnostik.

### **Kein Fluoreszenzsignal im FAM-, ROX- oder Cy5-Kanal der Positivkontrolle**

#### ***Der gewählte entspricht nicht dem im Protokoll angegebenen Kanal***

Wählen Sie den FAM-Kanal für die Analyse der Amplifikation der Gelbfiebervirus- oder Chikungunyavirus-RNA, den ROX-Kanal für die Amplifikation der RNA der Dengue-Viren 1–4, den Cy5-Kanal für die Amplifikation der Zikavirus-RNA und den VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal für die Amplifikation der Kontroll-RNA.



Aufgrund der Amplifikation in den spezifischen Kanälen kann es zur Inhibition der internen Kontrolle in der Positivkontrolle kommen.

### ***Fehlerhaftes Ansetzen der Real-time-RT-PCR***

Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte und vergleichen Sie diese mit den im Kapitel „Durchführung“ beschriebenen Schritten.

### ***Fehlerhaftes Real-time-PCR-Temperaturprofil***

Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit dem Protokoll (Tabelle 5).

### ***Falsche Lagerbedingungen des Kits oder abgelaufenes Haltbarkeitsdatum***

Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Haltbarkeitsdatum auf dem Kitetikett. Falls nötig, benutzen Sie einen neuen Kit und lagern Sie alle Komponenten wie im Kapitel „Transport, Lagerung und Stabilität“ beschrieben.

## **Schwaches oder kein Signal der Kontroll-RNA und gleichzeitiges Ausbleiben eines Signals im virusspezifischen FAM-, ROX- oder Cy5-Kanal**

### ***Die Real-time-RT-PCR-Bedingungen stimmen nicht mit den im Protokoll beschriebenen überein***

Überprüfen Sie die Real-time-PCR-Bedingungen (Kapitel 12).

### ***Real-time-RT-PCR-Inhibition***

Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode benutzen (siehe Kapitel „Probenvorbereitung“). Beachten Sie die Herstellerangaben. Stellen Sie sicher, dass ethanolhaltige Waschpuffer vollständig entfernt wurden (ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt bei hoher Geschwindigkeit vor der RNA-Elution wird empfohlen).

### ***Verlust der RNA während des Aufarbeitungsprozesses***

Falls die Kontroll-RNA vor der Extraktion zugefügt wurde, kann das Ausbleiben des Signals auf eine fehlerhafte RNA-Extraktion hinweisen. Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode verwenden und beachten Sie die Herstellerangaben.

### ***Falsche Lagerbedingungen des Kits oder abgelaufenes Haltbarkeitsdatum***

Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Haltbarkeitsdatum auf dem Kitetikett. Falls nötig, benutzen Sie einen neuen Kit und lagern Sie alle Komponenten wie im Kapitel „Transport, Lagerung und Stabilität“ beschrieben.

## Detektion eines Signals im FAM-, ROX- oder Cy5-Kanal der Negativkontrolle

### ***Kontamination des Real-time-RT-PCR-Ansatzes***

Wiederholen Sie die Real-time-PCR in Replikaten. Falls das Ergebnis der Wiederholungen negativ sein sollte, so ereignete sich die Kontamination während der Befüllung der Reaktionsgefäße. Stellen Sie sicher, dass Sie die Positivkontrolle zuletzt pipettieren und verschließen Sie die Reaktionsgefäße sofort nachdem Sie die jeweilige Probe zugegeben haben. Falls die Negativkontrolle in der Wiederholung wieder ein Signal ergibt, deutet dies darauf hin, dass eine oder mehrere Kitkomponenten kontaminiert sind. Stellen Sie sicher, dass die Arbeitsbereiche und die Geräte regelmäßig dekontaminiert werden. Wiederholen Sie die Real-time-PCR mit einem neuen Kit.

## Detektion eines schwachen Fluoreszenzsignals im FAM-Kanal einer Probe mit starkem Fluoreszenzsignal im Cy5-Kanal

### ***Cross-Talk***

Abhängig vom verwendeten Real-time-PCR-Gerät kann ein starkes Fluoreszenzsignal in einem Detektionskanal aufgrund des sogenannten Cross-Talks zu einem schwachen Signal (um  $C_t$  40) in einem anderen Kanal führen.

## 17 LEISTUNGSDATEN

### 17.1 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität (*limit of detection*, LoD) des MutaPLEX® Tropica 1 Real-time-RT-PCR-Kits wurde anhand serieller Verdünnungsstufen von *in-vitro*-Transkripten in einem Stratagene Mx3000 Real-time-PCR-Gerät bestimmt.

Die LoD des MutaPLEX® Tropica 1 Real-time-RT-PCR-Kits beträgt  $\geq 10$  Kopien pro Reaktion für Chikungunya-, Gelbfieber- und Denguevirus 1–4. Für Zikavirus beträgt die LoD  $\geq 5$  Kopien pro Reaktion.

### 17.2 Analytische Spezifität

Die Spezifität des MutaPLEX® Tropica 1 Real-time-RT-PCR-Kits wurde durch *in-silico*-Analysen und die Amplifikation der RNA und DNA anderer in klinischen Proben vorkommender relevanter Viren und Bakterien bestimmt.

Der MutaPLEX® Tropica 1 Real-time-RT-PCR-Kit ergab positive Ergebnisse für die Proben, die Zikavirus, Chikungunyavirus, Denguevirus 1–4 und Gelfiebertivirus enthielten, wohingegen Proben mit anderen Pathogenen zuverlässig als negativ bewertet wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Für die Bestimmung der analytischen Spezifität des MutaPLEX® Tropica 1 Real-time-RT-PCR-Kits verwendete bakterielle und virale Pathogene

<b>Spezies</b>	<b>erwartetes Ergebnis</b>	<b>Ergebnis</b>
West-Nil-Virus	negativ	negativ
FSME-Virus	negativ	negativ
Rifttalfiebertvirus	negativ	negativ
Usutuvirus	negativ	negativ
Hantaviren	negativ	negativ
Japanische B-Enzephalitis-Virus	negativ	negativ
Krim-Kongo-Fieber-Virus	negativ	negativ
Sindbis-Virus	negativ	negativ
Mayaro-Fieber-Virus	negativ	negativ
Cytomegalovirus	negativ	negativ
HIV	negativ	negativ
HBV	negativ	negativ
HCV	negativ	negativ
Influenzavirus A	negativ	negativ
Enterovirus	negativ	negativ
Respiratory-Syncytial-Virus	negativ	negativ
<i>Plasmodium</i>	negativ	negativ
<i>Staphylococcus ssp.</i>	negativ	negativ
<i>Streptococcus ssp.</i>	negativ	negativ
<i>Klebsiella ssp.</i>	negativ	negativ
<i>Borrelia burgdorferi</i>	negativ	negativ
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	negativ	negativ
<i>Ehrlichia spec.</i>	negativ	negativ
<i>Babesia microti</i>	negativ	negativ
<i>Babesia divergens</i>	negativ	negativ
<i>Babesia sp.</i> EU1 ( <i>Babesia venatorum</i> )	negativ	negativ
<i>Coxiella burnetii</i>	negativ	negativ
Zikavirus	positiv	positiv
Chikungunyavirus	positiv	positiv

Spezies	erwartetes Ergebnis	Ergebnis
Gelbfieberevirus	positiv	positiv
Denguevirus 1	positiv	positiv
Denguevirus 2	positiv	positiv
Denguevirus 3	positiv	positiv
Denguevirus 4	positiv	positiv

### 17.3 REFERENZMATERIAL UND VERGLEICHSMESSUNGEN

Zikavirus-Referenzproben (extrahierte RNA) wurden vom Robert-Koch-Institut (RKI) Berlin bezogen. Des Weiteren wurden Referenzproben von Zikavirus, Denguevirus 1–4, Chikungunyavirus und Gelbfieberevirus von einem Universitätslabor in Deutschland bezogen. Außerdem wurden Proben von INSTAND e. V. gemessen.

Tabelle 10: Referenzmaterialtests mit dem MutaPLEX® Tropica 1 Real-time-RT-PCR-Kit

Pathogen	erwartetes Ergebnis	Ergebnis
Zikavirus (RKI-Standard)	positiv	positiv
Zikavirus	positiv	positiv
Chikungunyavirus	positiv	positiv
Gelbfieberevirus	positiv	positiv
Ampli Run yellow fever virus (Vircell)	positiv	positiv
Denguevirus 1	positiv	positiv
Denguevirus 2	positiv	positiv
Denguevirus 3	positiv	positiv
Denguevirus 4	positiv	positiv






Table 11: Vergleichsmessungen, durchgeführt mit dem MutaPLEX® Tropica 1 real time RT-PCR-Kit

Probe	Erwartetes Ergebnis – Verdünnung	Ergebnis
403001	positiv für Zikavirus (afrikanische Gruppe) – 1:250	positiv
403002	positiv für Zikavirus (afrikanische Gruppe) – 1:25	positiv
403003	negativ für Zikavirus	negativ
403004	positiv für Zikavirus (afrikanische Gruppe) – 1:2500	positiv
403013	positiv für Zikavirus (asiatische Gruppe) – 1:500	positiv
403014	positiv für Zikavirus (asiatische Gruppe) – 1:50	positiv

Probe	Erwartetes Ergebnis – Verdünnung	Ergebnis
403015	negativ für Zikavirus	negativ
403016	positiv für Zikavirus (afrikanische Gruppe) – 1:400	positiv
369021	positiv für Denguevirus (DENV-2) – 1:400	positiv
369022	positiv für Denguevirus (DENV-4) – 1:7,5	positiv
369023	positiv für Denguevirus (DENV-1) – 1:70	positiv
369024	positiv für Denguevirus (DENV-2) – 1:4	positiv
369029	negativ für Denguevirus	negativ
369030	positiv für Denguevirus (DENV-2) – 1:40	positiv
369031	positiv für Denguevirus (DENV-1) – 1:140	positiv
369032	positiv für Denguevirus (DENV-2) – 1:400	positiv
392021	positiv für Chikungunya – 1:4500	positiv
392022	positiv für Chikungunya – 1:13500	positiv
392023	positiv für Chikungunya – 1:1500	positiv
392024	negativ für Chikungunya	negativ
392005	positiv für Chikungunya – 1:10000	positiv
392006	positiv für Chikungunya – 1:1000	positiv
392007	positiv für Chikungunya – 1:10000	positiv
392008	positiv für Chikungunya – 1:10000	positiv
12 Kopien pro µl	AmpliRun yellow fever virus	positiv
1,2 Kopien pro µl	AmpliRun yellow fever virus	positiv
0,12 Kopien pro µl	AmpliRun yellow fever virus	positiv

## 18 ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

cDNA	komplementäre Desoxyribo- nukleinsäure	<b>REF</b>	Katalognummer
RNA	Ribonukleinsäure	<b>→REF</b>	Zu verwenden mit

PCR	Polymerase-Kettenreaktion		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
RT	Reverse Transkription		Obere Temperaturgrenze
<b>REACTION MIX</b>   1	Reaktionsmix 1		Hersteller
<b>REACTION MIX</b>   2	Reaktionsmix 2		Verwendbar bis
<b>ENZYME</b>	Enzym	<b>LOT</b>	Chargennummer
<b>CONTROL 1</b>   +	Positivkontrolle 1	<b>CONTENT</b>	Inhalt
<b>CONTROL 2</b>   +	Positivkontrolle 2		Arbeitsanleitung beachten
<b>CONTROL</b>   -	Negativkontrolle	<b>IVD</b>	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum
<b>CONTROL RNA</b>   IC	Kontroll-RNA		

## 19. LITERATUR

1. Zika virus. WHO updated fact sheet 06 September 2016.
2. Chikungunya. WHO fact sheet, updated April 2017.
3. Dengue and Severe Dengue. WHO fact sheet, updated April 2017.
4. Yellow Fever, WHO fact sheet, updated May 2016

# MutaPLEX® Tropica 1 real time RT-PCR kit

*Test for the qualitative in-vitro detection of RNA from  
zika virus, chikungunya virus, dengue viruses 1–4 and  
yellow fever virus in clinical specimens*

Valid from 2018-02-14

REF **KG199032**

$\Sigma$  32

REF **KG199096**

$\Sigma$  96



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Table of Contents

<b>1</b>	<b>INTENDED USE</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>PATHOGEN INFORMATION</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>PRINCIPLE OF THE TEST</b>	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>PACKAGE CONTENTS</b>	<b>24</b>
<b>5</b>	<b>EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER</b>	<b>25</b>
<b>6</b>	<b>TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY</b>	<b>25</b>
<b>7</b>	<b>IMPORTANT NOTES</b>	<b>26</b>
<b>8</b>	<b>GENERAL PRECAUTIONS</b>	<b>26</b>
<b>9</b>	<b>SAMPLE MATERIAL</b>	<b>26</b>
<b>10</b>	<b>SAMPLE PREPARATION</b>	<b>26</b>
<b>11</b>	<b>CONTROL RNA</b>	<b>27</b>
	<i>RNA isolation from clinical samples</i>	27
<b>12</b>	<b>REAL TIME PCR</b>	<b>28</b>
	12.1 <i>Important points before starting</i>	28
	12.2 <i>Procedure</i>	28
	12.3 <i>Instrument settings</i>	30
<b>13</b>	<b>DATA ANALYSIS</b>	<b>31</b>
<b>14</b>	<b>ASSAY VALIDATION</b>	<b>34</b>
<b>15</b>	<b>LIMITATIONS OF THE METHOD</b>	<b>35</b>
<b>16</b>	<b>TROUBLESHOOTING</b>	<b>35</b>
<b>17</b>	<b>KIT PERFORMANCE</b>	<b>36</b>
	17.1 <i>Analytical sensitivity</i>	36
	17.2 <i>Analytical specificity</i>	37
	17.3 <i>Reference material and proficiency testing</i>	38
<b>18</b>	<b>ABBREVIATIONS AND SYMBOLS</b>	<b>40</b>
<b>19.</b>	<b>LITERATURE</b>	<b>40</b>



## 1 INTENDED USE

The MutaPLEX® Tropica 1 real time RT-PCR is an assay for the detection of the RNA from Zika virus, chikungunya virus, dengue viruses 1–4 and yellow fever virus extracted from clinical specimens (e.g. blood samples, serum samples, urine samples) using real time PCR microplate systems.

## 2 PATHOGEN INFORMATION

Zika virus disease is caused by a virus transmitted primarily by *Aedes* mosquitoes in tropical regions. But it can also be transmitted through sexual intercourse. The incubation period of Zika virus disease is not clear, but is likely to be a few days. The symptoms are similar to other arbovirus infections such as dengue viruses, West Nile virus and others and include fever, skin rashes, conjunctivitis, muscle and joint pain, malaise, and headache. These symptoms are usually mild, require no specific treatment and last for 2 to 7 days. Currently no vaccine against the Zika virus is available. There is scientific consensus that Zika virus is a cause of microcephaly in the unborn child and Guillain-Barré syndrome. Links to other neurological complications are also being investigated.

Chikungunya is a viral disease transmitted to humans by infected mosquitoes. The disease mostly occurs in Africa, Asia and the Indian subcontinent. However, a major outbreak in 2015 affected several countries of the region of the Americas. After the bite of an infected mosquito, onset of illness occurs usually between 4 and 8 days but can range from 2 to 12 days. The disease shares some clinical signs with dengue and Zika, and can be misdiagnosed in areas where they are common. It causes fever and severe joint pain. Other symptoms include muscle pain, headache, nausea, fatigue and rash. Most patients recover fully, but in some cases joint pain may persist for several months, or even years. Occasional cases of eye, neurological and heart complications have been reported, as well as gastrointestinal complaints. Serious complications are not common, but in older people, the disease can contribute to the cause of death. Treatment is focused on relieving the symptoms.

Dengue fever is a mosquito-borne viral infection that can be caused by four distinct, but closely related, serotypes of the virus. Dengue fever is found in tropical and sub-tropical climates worldwide, mostly in urban and semi-urban areas. The global incidence of dengue fever has grown dramatically in recent decades. The infection causes flu-like illness, and occasionally develops into a potentially lethal complication called severe dengue (also known as dengue haemorrhagic fever). Dengue fever should be suspected when a high fever is accompanied by 2 of the following symptoms: severe headache, pain behind the eyes, muscle and joint pains, nausea, vomiting, swollen glands or rash. Symptoms usually last for 2 to 7 days, after an incubation period of 4 to 10 days. Dengue haemorrhagic fever is a potentially deadly

complication due to plasma leaking, fluid accumulation, respiratory distress, severe bleeding, or organ impairment. There is no specific treatment for dengue/dengue haemorrhagic fever, but a vaccine is registered and available in several countries.

Yellow fever is an acute viral haemorrhagic disease transmitted by infected mosquitoes. The virus is endemic in tropical areas of Africa and Central and South America. Once contracted, the yellow fever virus incubates in the body for 3 to 6 days. Many people do not experience symptoms, but when these do occur, the most common are fever, muscle pain with prominent backache, headache, loss of appetite, and nausea or vomiting. In most cases, symptoms disappear after 3 to 4 days. A small percentage of patients, however, enter a second, more toxic phase within 24 hours of recovering from initial symptoms. High fever returns and several body systems are affected, usually the liver and the kidneys. In this phase people are likely to develop jaundice, dark urine and abdominal pain with vomiting. Bleeding can occur from the mouth, nose, eyes or stomach. Half of the patients who enter the toxic phase die within 7 to 10 days. Yellow fever can be prevented by vaccination.

### **3 PRINCIPLE OF THE TEST**

The MutaPLEX® Tropica 1 real time RT-PCR contains specific primers and hydrolysis probes for the detection of the nucleic acids of Zika virus, chikungunya virus, dengue viruses 1–4 and yellow fever virus extracted from clinical specimens (e.g. blood samples, serum samples, urine samples) using real time RT-PCR microplate systems. The reverse transcription (RT) of viral RNA to cDNA and the subsequent amplification of virus specific fragments are performed in a one-step RT-PCR. The amplification can be detected when specific probes are hydrolysed by the polymerase. The emitted fluorescence is measured in the FAM (yellow fever virus and chikungunya virus), ROX (dengue viruses 1–4) and Cy5 (Zika virus) channel.

Furthermore, the MutaPLEX® Tropica 1 real time RT-PCR contains a control RNA, which is detected in a second amplification system. Added during RNA extraction, the control RNA allows not only for the detection of RT-PCR inhibition but also detects possible mistakes during RNA extraction. This greatly reduces the risk of false-negative results. The control RNA can also be used solely as internal control by adding it directly to the mastermix. The fluorescence of the control RNA is measured in the VIC®/HEX/JOE/TET channel.

### **4 PACKAGE CONTENTS**

The reagents supplied are sufficient for 32 (KG199032) or 96 (KG199096) reactions, respectively.

Table 1: Components of the MutaPLEX® Tropica 1 real time RT-PCR kit .

Label	Lid Colour	Content	
		32	96
Reaction Mix 1 (Zika virus, yellow fever virus)	yellow	1 x 474 µl	2 x 711 µl
Reaction Mix 2 (chikungunya virus, dengue viruses 1–4)	orange	1 x 474 µl	2 x 711 µl
Enzyme	blue	1 x 12.8 µl	2 x 19.2 µl
Positive Control 1 (Zika virus, yellow fever virus)	red	1 x 75 µl	1 x 220 µl
Positive Control 2 (chikungunya virus, dengue viruses 1–4)	red	1 x 75 µl	1 x 220 µl
Negative Control	green	1 x 150 µl	1 x 440 µl
Control RNA	colourless	1 x 320 µl	2 x 480 µl

## 5 EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER

- RNA isolation kit (e.g. MutaCLEAN® Universal RNA/DNA, KG1038, or the magnet particle based system MutaCLEAN® Complete Mag RNA/DNA, KG1020)
- PCR grade water
- Sterile microtubes
- Pipets (adjustable volume)
- Sterile pipet tips with filter
- Table centrifuge
- Vortex mixer
- Real time PCR instrument
- Optical PCR reaction tubes with lid
- Optional: Colour compensation kit
- Optional: Liquid handling system for automation
- Optional: VLP-RNA (virus-like particles, KG7015, see chapter 11)

## 6 TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY

The MutaPLEX® Tropica 1 real time RT-PCR kit is shipped on dry ice. All components must be stored at maximum -20°C in the dark immediately after receipt. Do not use reagents after the date of expiry printed on the package.

Up to 20 freeze and thaw cycles are possible.

For convenience, opened reagents can be stored at 2–8°C for up to 6 months.

Protect kit components from direct sunlight during the complete test run.

## **7 IMPORTANT NOTES**

- The MutaPLEX® Tropica 1 real time RT-PCR must be performed by qualified personnel only.
- Good Laboratory Practice (GLP) has to be applied.
- Clinical samples must always be regarded as potentially infectious material and all equipment used has to be treated as potentially contaminated.

## **8 GENERAL PRECAUTIONS**

- Stick to the protocol described in the instructions for use.
- Set up different laboratory areas for the preparation of samples and for the set up of the PCR in order to avoid contaminations.
- Pipettes, tubes and other materials must not circulate between those different laboratory areas.
- Always use filter tips.
- Regularly decontaminate equipment and benches with ethanol-free decontaminant.
- Do not combine MutaPLEX® Tropica 1 real time RT-PCR kit components of different lot numbers.

## **9 SAMPLE MATERIAL**

Starting material for the MutaPLEX® Tropica 1 real time RT-PCR is nucleic acid isolated or released from clinical specimens (e.g. blood samples, serum samples, urine samples).

## 10 SAMPLE PREPARATION

The MutaPLEX® Tropica 1 real time RT-PCR is suitable for the detection of the RNA from Zika virus, chikungunya virus, dengue viruses 1–4 and yellow fever virus in clinical specimens (e. g. blood samples, serum samples, urine samples) isolated with suitable isolation methods.

Commercial kits for RNA isolation such as MutaCLEAN® Universal RNA/DNA (KG1038) or the magnet particle based system MutaCLEAN® Complete Mag RNA/DNA (KG1020) are recommended.

**Important:** In addition to the samples, always run a water control in your extraction. Treat this water control analogous to a sample.

Comparing the amplification of the control RNA in the samples to the amplification of the internal control in the water control will give insights on possible inhibitions of the real time RT-PCR. Furthermore, possible contaminations during RNA extraction will be detectable.

### **Please note chapter 11 “Control RNA”.**

If the real time RT-PCR is not performed immediately, store extracted RNA according to the instructions given by the RNA extraction kit's manufacturer.

## 11 CONTROL RNA

A control RNA is supplied and can be used as extraction control or only as inhibition control. This allows the user to control the RNA isolation procedure and to check for possible real time RT-PCR inhibition.

The virus-like particles (VLP-RNA, KG7015) are not supplied. If they are used, they must be added to the clinical samples directly. VLP-RNA can be used as sample-like extraction control and in automated extraction systems, when pipetting of the control RNA to the first buffer (e. g. binding buffer) of the respective extraction kit is not possible due to extraction instrument specifications.

### *RNA isolation from clinical samples*

(e. g. blood samples, serum samples, urine samples)

#### **a) Control RNA or VLP-RNA used as extraction control**

MutaPLEX® Tropica 1 control RNA or VLP-RNA is added to the RNA extraction.

Add 5 µl control RNA or VLP-RNA per extraction (5 µl x (N+1)). Mix well. Perform the RNA isolation according to the manufacturer's instructions. Please follow protocol A.

**The control RNA must be added to the lysis buffer of the extraction kit.**

**b) Control RNA used as internal control of the real time RT-PCR**

If only inhibition will be checked, please follow protocol B.

**12 REAL TIME RT-PCR****12.1 Important points before starting**

- Please pay attention to chapter 7 “Important Notes”.
- Before setting up the real time RT-PCR, familiarise yourself with the real time PCR instrument and read the user manual supplied with the instrument.
- The programming of the thermal profile should take place before the PCR set up.
- In every PCR run, one positive control and one negative control should be included.
- Before each use, all reagents except the enzyme should be thawed completely at room temperature, thoroughly mixed, and centrifuged very briefly.
- We recommend to keep reagents and samples at 2–8°C (e.g. on ice or a cooling block) at all times.

**12.2 Procedure**

If the control RNA or VLP-RNA is used to control both, the real time RT-PCR and the RNA isolation procedure, please follow protocol A. If the control RNA is solely used to detect possible inhibition of the real time RT-PCR, please follow protocol B.

**Protocol A**

**The control RNA or VLP-RNA was added during RNA extraction (see chapter 11 “Control RNA”). In this case, prepare the master mixes 1 and 2 according to table 2.**

The master mixes contain all of the components needed for PCR except the sample. Prepare a volume of master mix for at least one sample more than required, in order to compensate for pipetting inaccuracy.

Table 2: Preparation of the master mix 1 or 2 (control RNA was added during RNA extraction)

Volume per reaction	Volume master mix
14.8 µl Reaction Mix 1 or 2	14.8 µl x (N+1)
0.2 µl Enzyme	0.2 µl x (N+1)

## Protocol B

The control RNA is used for the control of the real time RT-PCR only (see chapter 11 “Control RNA”). In this case, prepare the master mixes according to table 3.

The master mixes contain all of the components needed for real PCR except the sample. Prepare a volume of master mix for at least one sample more than required, in order to compensate for pipetting inaccuracy.

**Important:** Dilute the **control RNA 1:10** in PCR grade water (e.g. 1 µl control RNA + 9 µl PCR grade water) before adding it to the respective master mix.

Table 3: Preparation of the master mix 1 or 2 (control RNA is added directly to the master mix)

Volume per reaction	Volume master mix
14.8 µl Reaction Mix 1 or 2	14.8 µl x (N+1)
0.2 µl Enzyme	0.2 µl x (N+1)
0.2 µl Control RNA* <b>diluted 1:10</b>	0.2 µl x (N+1)*

\* The increase in volume caused by adding the control RNA is not taken into account when preparing the PCR assay. The sensitivity of the detection system is not impaired.

## Protocol A and B: real time RT-PCR set up

- Place the number of optical PCR reaction tubes needed into the respective tray of the real time PCR instrument.
- Pipet 15 µl of each master mix (1 and 2) into two separate optical PCR reaction tubes.
- Add 10 µl of the eluates from the RNA isolation (including the eluate of the water control), the respective positive control and the respective negative control to the corresponding optical PCR reaction tubes (table 4).
- Close the optical PCR reaction tubes immediately after filling in order to reduce the risk of contamination.

Table 4: Preparation of the real time RT-PCR

Component	Volume
Master mix	15.0 µl
Sample	10.0 µl
Total volume	25.0 µl

### 12.3 Instrument settings

For the real time RT-PCR, use the thermal profile shown in table 5.

Table 5: real time RT-PCR thermal profile

Description	Time	Temperature	No of cycles
Reverse transcription	8 min	50 °C	1
Initial denaturation	3 min	95 °C	1
Amplification of cDNA			45
Denaturation	10 s	95 °C	
Annealing and extension	45 s	60 °C	
	Aquisition at the end of this step		

Dependent on the real time instrument used, further instrument settings have to be adjusted according to table 6.

Table 6: Overview of the instrument settings required for the MutaPLEX® Tropica 1 real time RT-PCR.

Real time PCR Instrument	Parameter	Detection Channel	Notes		
LightCycler 480II	chikungunya virus, yellow fever virus dengue viruses 1–4 Control RNA Zika virus	465-510 533-610 533-580 618-660	Colour compensation kit Multi-plex 1 required		
			<b>Melt factor</b>	<b>Quant factor</b>	<b>Max integration time (s)</b>
			1	10	1
			1	10	2
			1	10	2
Stratagene Mx3000P/ Mx3005P	chikungunya virus, yellow fever virus dengue viruses 1–4 Control RNA Zika virus	FAM ROX HEX Cy5	Gain 8	Reference dye: none	
			Gain 1		
			Gain 1		
			Gain 4		



Real time PCR Instrument	Parameter	Detection Channel	Notes	
ABI 7500	chikungunya virus, yellow fever virus dengue viruses 1–4 Control RNA Zika virus	FAM ROX JOE Cy5	Option reference dye ROX: NO	
Rotor-Gene Q/3000/6000	chikungunya virus, yellow fever virus dengue viruses 1–4 Control RNA Zika virus	Green Orange Yellow Red	Gain 5 Gain 5 Gain 5 Gain 5	

### 13 DATA ANALYSIS

The virus specific amplifications are measured in the FAM, ROX, and Cy5 channels. The amplification of the control RNA is measured in the VIC®/HEX/JOE/TET channel. The positive control contains in vitro transcripts of the respective nucleic acid sequences of Zika virus, chikungunya virus, dengue viruses 1–4 and yellow fever virus. For the positive control, signals in the FAM, ROX, and Cy5 channels must be detected. The interpretation of the test results is described in table 7 and table 8.

Table 7: Interpretation Reaction Mix 1

C <sub>t</sub> values			Interpretation
FAM channel	Cy5 channel	HEX channel	
yellow fever virus	Zika virus	Control RNA	
positive	positive	positive or negative*	Positive result, the sample contains yellow fever virus-RNA and Zika virus-RNA.
positive	negative	positive or negative*	Positive result, the sample contains yellow fever virus-RNA.

<b>C<sub>t</sub> values</b>			<b>Interpretation</b>
<b>FAM channel</b> yellow fever virus	<b>Cy5 channel</b> Zika virus	<b>HEX channel</b> Control RNA	
negative	positive	positive or negative*	Positive result, the sample contains Zika virus-RNA.
negative	negative	≤ 34**	Negative result, the sample contains no yellow fever virus-RNA and Zika virus-RNA.
negative	negative	negative or > 34**	No diagnostic statement can be made. The real time RT-PCR is either inhibited or errors occurred while RNA extraction.

Table 8: Interpretation Reaction Mix 2

<b>C<sub>t</sub> values</b>			<b>Interpretation</b>
<b>FAM channel</b> chikungunya virus	<b>ROX channel</b> dengue viruses 1–4	<b>HEX channel</b> Control RNA	
positive	positive	positive or negative*	Positive result, the sample contains chikungunya virus-RNA and dengue viruses 1–4-RNA.
positive	negative	positive or negative*	Positive result, the sample contains chikungunya virus-RNA.
negative	positive	positive or negative*	Positive result, the sample contains dengue viruses 1–4-RNA.
negative	negative	≤ 34**	Negative result, the sample contains no chikungunya virus-RNA and dengue viruses 1–4-RNA.

C <sub>t</sub> values			Interpretation
FAM channel chikungunya virus	ROX channel dengue viruses 1-4	HEX channel Control RNA	
negative	negative	negative or > 34**	No diagnostic statement can be made. The real time RT-PCR is either inhibited or errors occurred while RNA extraction.

\* A strong positive signal in the FAM, Cy5 and/or ROX can inhibit the IC. In such cases the result for the control RNA can be neglected.

\*\*Depending on the PCR instrument and/or the chosen extraction method, the C<sub>t</sub> values might be shifted. The water control can be used as reference. If the HEX C<sub>t</sub> value of a sample differs a lot from the water control, partial inhibition has occurred, leading to false negative results in case of weak positive samples.

Figure 1 and figure 2 show examples for positive and negative real time RT-PCR results.

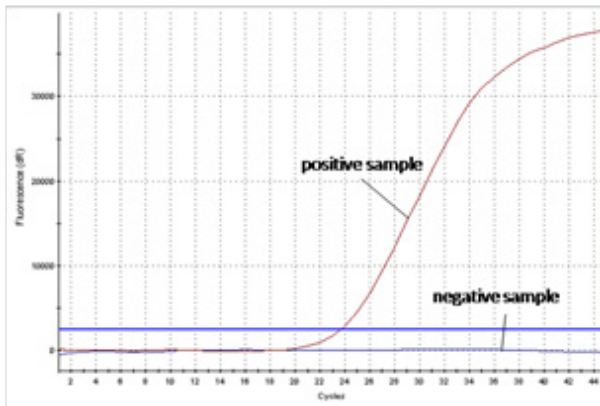


Figure 1: The positive sample shows virus-specific amplification, whereas no fluorescence signal is detected in the negative sample.

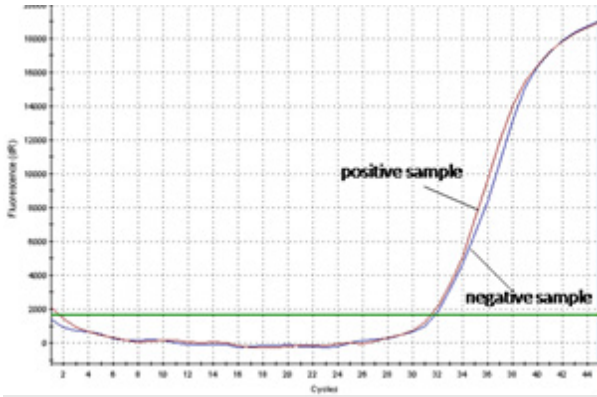


Figure 2: The positive sample as well as the negative sample show a signal in the control RNA specific VIC®/HEX/JOE/TET channel. The amplification signal of the control RNA in the negative sample shows, that the missing signal in the virus-specific channel is not due to RT-PCR inhibition or failure of RNA isolation, but that the sample is a true negative.

## 14 ASSAY VALIDATION

Set a threshold as follows:

### Negative controls

All negative controls should be below the threshold. If there is a potential contamination (appearance of a curve in the negative control or a cluster of curves in specimens at high  $C_T$  – for example above 36), results obtained are not interpretable and the whole run (including extraction) has to be repeated.

### Positive controls

All the positive controls must show a positive (i. e. exponential) amplification curve. The positive controls must fall below a  $C_T$  of 30.

### Internal controls

All internal controls must show a positive (i. e. exponential) amplification curve. The internal control must fall below a  $C_T$  of 33. If the internal control is above  $C_T$  34, this points to a purification problem or a strong positive sample that can inhibit the internal control. In the latter case, the assay is valid. If a water control run is performed, the IC must fall below a  $C_T$  of 33.

## 15 LIMITATIONS OF THE METHOD

The results must always be considered in relation to the clinical symptoms. Therapeutical consequences should be made in consideration of clinical data.

A negative test result does not exclude an infection with the respective viruses .

## 16 TROUBLESHOOTING

The following troubleshooting guide is included to help you with possible problems that may arise when performing a real time RT-PCR.

### No fluorescence signal in the FAM, ROX, or Cy5 channel of the positive control

#### ***The selected channel for analysis does not comply with the protocol***

Select the FAM channel for analysis of the yellow fever virus or chikungunya virus specific amplification, the ROX channel for analysis of the dengue viruses 1–4 specific amplification and the Cy5 channel for analysis of the Zika virus specific amplification. Select the VIC®/HEX/JOE/TET channel for the amplification of the control RNA. Due to amplification in the specific channels, amplification of the internal control can be inhibited in the Positive Control.

#### ***Incorrect configuration of the real time RT-PCR***

Check your work steps and compare with chapter “Procedure”.

#### ***The programming of the thermal profile is incorrect***

Compare the thermal profile with the protocol (table 5).

#### ***Incorrect storage conditions for one or more kit components or kit expired***

Check the storage conditions and the date of expiry printed on the kit label. If necessary, use a new kit and make sure kit components are stored as described in chapter “Transport, Storage and Stability”.

### Weak or no signal of the control RNA and simultaneous absence of a signal in the the virus-specific FAM, ROX, or Cy5 channel

#### ***real time RT-PCR conditions do not comply with the protocol***

Check the real time RT-PCR conditions (chapter 12).

#### ***real time RT-PCR inhibited***

Make sure that you use an appropriate isolation method (see “Sample preparation”) and follow the manufacturer’s instructions. Make sure that the ethanol-containing washing buffer of the isolation kit has been completely removed. An

additional centrifugation step at high speed is recommended before elution of the RNA.

### ***RNA loss during isolation process***

In case the control RNA was added before extraction, the lack of an amplification signal can indicate that the RNA isolation was not successful. Make sure that you use an appropriate isolation method (commercial kits are recommended) and stick to the manufacturer's protocol.

### ***Incorrect storage conditions for one or more components or kit expired***

Check the storage conditions and the date of expiry printed on the kit label. If necessary, use a new kit and make sure kit components are stored as described in chapter "Transport, Storage and Stability".

## **Detection of a fluorescence signal in the FAM, ROX, or Cy5 channel of the negative control**

### ***Contamination during preparation of the PCR***

Repeat the real time RT-PCR in replicates. If the result is negative in the repetition, the contamination occurred when the samples were pipetted into the optical PCR reaction tubes. Make sure to pipet the positive control last and close the optical PCR reaction tube immediately after adding the sample. If the same result occurs, one or more of the kit components might be contaminated. Make sure that work space and instruments are decontaminated regularly. Use a new kit and repeat the real time RT-PCR.

## **Detection of a weak fluorescence signal in the FAM channel of a sample with a strong fluorescence signal in the Cy5 channel**

### ***Cross-talk***

Depending on the real time RT-PCR instrument used, a strong fluorescence signal in one detection channel can lead to a weak signal (around  $C_T$  40) in another channel due to so-called cross-talk between channels.

## **17 KIT PERFORMANCE**

### ***17.1 Analytical sensitivity***

The limit of detection (LoD) of MutaPLEX® Tropica 1 real time RT-PCR was determined using serial dilutions of in vitro transcripts in nucleic acid stabilization buffer analysed on a Stratagene Mx3000 real time RT-PCR instrument.

The LoD of MutaPLEX® Tropica 1 real time RT-PCR for chikungunya virus, yellow fever virus, and dengue viruses 1–4 is  $\geq 10$  copies per reaction each. The LoD of MutaPLEX® Tropica 1 real time RT-PCR for Zika virus is  $\geq 5$  copies per reaction.

## 17.2 Analytical specificity

The specificity of MutaPLEX® Tropica 1 real time RT-PCR was evaluated by in silico analysis and by amplification of RNA and DNA of other relevant viruses and bacteria found in clinical samples.

The MutaPLEX® Tropica 1 real time RT-PCR showed positive results for the samples containing Zika virus, chikungunya virus, dengue viruses 1–4 and yellow fever virus, whereas samples containing other pathogens were reliably tested negative. The results are shown in table 9.

Table 9: Bacterial and viral pathogens tested for the determination of the analytical specificity of MutaPLEX® Tropica 1 real time RT-PCR.

Strain	Expected result	Result
West Nile virus	negative	negative
TBE virus	negative	negative
Rift valley fever virus	negative	negative
Usutu virus	negative	negative
Hanta viruses	negative	negative
Japanese B encephalitis virus	negative	negative
Crimean–Congo hemorrhagic fever virus	negative	negative
Sindbis virus	negative	negative
Mayaro virus	negative	negative
Cytomegalovirus	negative	negative
HIV	negative	negative
HBV	negative	negative
HCV	negative	negative
Influenzavirus A	negative	negative
Enterovirus	negative	negative
Respiratory Syncytial Virus	negative	negative
Plasmodium	negative	negative
Staphylococcus ssp.	negative	negative
Streptococcus ssp.	negative	negative

Strain	Expected result	Result
Klebsiella ssp.	negative	negative
Borrelia burgdorferi	negative	negative
Anaplasma phagocytophilum	negative	negative
Ehrlichia spec.	negative	negative
Babesia microti	negative	negative
Babesia divergens	negative	negative
Babesia sp. EU1 (Babesia venatorum)	negative	negative
Coxiella burnetii	negative	negative
Zika virus	positive	positive
chikungunya virus	positive	positive
yellow fever virus	positive	positive
dengue virus 1	positive	positive
dengue virus 2	positive	positive
dengue virus 3	positive	positive
dengue virus 4	positive	positive

### 17.3 Reference material and proficiency testing

Reference samples (extracted RNA) for Zika virus were obtained from the Robert-Koch-Institute (RKI), Berlin. Reference samples (extracted RNA) for Zika virus, dengue viruses 1–4, chikungunya virus, and yellow fever virus were additionally obtained from a university lab in Germany. Samples of INSTAND e.V. were tested additionally.

Table 10: Reference Material Testing using MutaPLEX® Tropica 1 real time RT-PCR.

Pathogen	Expected Result	Result
Zika virus (RKI Standard)	positive	positive
Zika virus	positive	positive
chikungunya virus	positive	positive
yellow fever virus	positive	positive
Ampli Run yellow fever virus (Vircell)	positive	positive
dengue virus 1	positive	positive
dengue virus 2	positive	positive











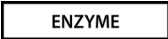

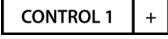





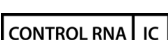
Pathogen	Expected Result	Result
dengue virus 3	positive	positive
dengue virus 4	positive	positive

Table 11: Proficiency Testing using MutaPLEX® Tropica 1 real time RT-PCR.

Sample	Expected Result - Dilution	Result
403001	Zika virus positive – African Lineage 1:250	positive
403002	Zika virus positive – African Lineage 1:25	positive
403003	Zika virus negative	negative
403004	Zika virus positive – African Lineage 1:2500	positive
403013	Zika virus positive – Asian Lineage 1:500	positive
403014	Zika virus positive – Asian Lineage 1:50	positive
403015	Zika virus negative	negative
403016	Zika virus positive – African Lineage 1:400	positive
369021	dengue virus positive – DENV-2 1:400	positive
369022	dengue virus positive – DENV-4 1:7,5	positive
369023	dengue virus positive – DENV-1 1:70	positive
369024	dengue virus positive – DENV-2 1:4	positive
369029	dengue virus negative	negative
369030	dengue virus positive – DENV-2 1:40	positive
369031	dengue virus positive – DENV-1 1:140	positive
369032	dengue virus positive – DENV-2 1:400	positive
392021	chikungunya virus positive – 1:4500	positive
392022	chikungunya virus positive – 1:13500	positive
392023	chikungunya virus positive – 1:1500	positive
392024	chikungunya virus negative	negative
392005	chikungunya virus positive – 1:10000	positive
392006	chikungunya virus positive – 1:1000	positive
392007	chikungunya virus positive – 1:10000	positive
392008	chikungunya virus positive – 1:10000	positive
12 copies per µl	AmpliRun yellow fever virus	positive
1.2 copies per µl	AmpliRun yellow fever virus	positive

Sample	Expected Result - Dilution	Result
0.12 copies per µl	AmpliRun yellow fever virus	positive

## 18 ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

cDNA	complementary Deoxyribonucleid Acid		Catalog number
RNA	Ribonucleid Acid		To be used with
PCR	Polymerase Chain Reaction		Contains sufficient for <n> tests
RT	Reverse Transcription		Upper limit of temperature
	Reaction Mix 1		Manufacturer
	Reaction Mix 2		Use by YYYY-MM-DD
	Enzyme		Batch code
	Positive Control 1		Content
	Positive Control 2		Consult Instructions for use
	Negative Control		<i>In vitro</i> diagnostic medical device
	Control RNA		

## 19. LITERATURE

1. Zika virus. WHO updated fact sheet 06 September 2016.
2. Chikungunya. WHO fact sheet, updated April 2017.
3. Dengue and Severe Dengue. WHO fact sheet, updated April 2017.
4. Yellow Fever, WHO fact sheet, updated May 2016

## **Immundiagnostik AG**

Stubenwald-Allee 8a  
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

[info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

