



# VIROTYPE<sup>®</sup> Influenza A

## Gebrauchsinformation

Real-time RT-PCR Testkit zum Nachweis des Influenza A-Virus

*in vitro*-Diagnostikum für Vögel und Schweine

Die deutsche Gebrauchsinformation ist nach § 17c TierSG zugelassen.

Zulassungs-Nr.: FLI-B 538

VIROTYPE <sup>®</sup> Influenza A	25 Reaktionen	Artikelnummer	05-301/25
VIROTYPE <sup>®</sup> Influenza A	96 Reaktionen	Artikelnummer	05-301/96
VIROTYPE <sup>®</sup> Influenza A	480 Reaktionen	Artikelnummer	05-301/480

### Verwendungszweck

Die Produktgruppe VIROTYPE<sup>®</sup> umfasst Testsysteme zum Nachweis von pathogenen Viren mittels real-time PCR.

VIROTYPE<sup>®</sup> Influenza A ermöglicht den Nachweis des Influenza A-Virus mittels real-time RT-PCR in Oropharyngeal-, Tracheal- und Kloakaltupferproben (Einzel- oder Poolproben), Kotproben und Gewebeproben von Vögeln; Nasentupferproben (Einzel- oder Poolproben), bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) und Gewebeproben von Schweinen und in Zellkulturüberstand.

### Herstellung & Support:

LDL - Labor Diagnostik GmbH Leipzig  
 Deutscher Platz 5b | 04103 Leipzig | Germany  
 Phone +49 (0)341/12454 0 | Fax +49 (0)341/12454 60  
 info@lab-leipzig.de | www.lab-leipzig.de



## Allgemeine Informationen

Viren der Gattung *Influenzavirus A* gehören zur Familie *Orthomyxoviridae*. Sie kommen in hoher genetischer Vielfalt und einem breiten Virulenzspektrum vor. Influenza A-Viren können in niedrig- und hochpathogene Stämme eingeteilt werden.

Natürliches Reservoir von niedrigpathogenen Influenza A-Viren (LPAIV) sind aquatisch lebende Wildvögel. Hochpathogene, aviäre Influenzaviren (HPAIV) der Subtypen H5 oder H7 rufen bei Wirtschaftsgeflügel die Klassische Geflügelpest hervor, die zu hohen wirtschaftlichen Verlusten führen kann. Influenza A-Viren der Subtypen H1N1, H1N2 und H3N2 können beim Schwein zu Atemwegserkrankungen führen.

Durch seine hohe Sensitivität ermöglicht VIROTYPE® Influenza A den sicheren und frühzeitigen Nachweis des Erregers in Proben von Vögeln und Schweinen. Außerdem wird das neu aufgetretene A/H1N1 (2009) Influenza A-Virus nachgewiesen.

## Beschreibung des Testprinzips

VIROTYPE® Influenza A enthält alle Reagenzien zum Nachweis von Influenza A Virus-RNA sowie eine Positiv- und eine Negativkontrolle.

Die Reverse Transkription (RT) der RNA und die anschließende Amplifikation der cDNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgen in einem Ansatz, so dass die Gefahr von Kontaminationen minimiert ist. Die Reporter der Sonden emittieren Fluoreszenz proportional zur Menge des gebildeten Amplifikats, dadurch kann die Reaktion in Echtzeit verfolgt werden (real-time PCR).

VIROTYPE® Influenza A verwendet jeweils eine Primer-Sonden-Kombination spezifisch für die Virus-RNA (FAM-Fluoreszenz) sowie für die Kontroll-RNA (interne Kontrolle, HEX-Fluoreszenz). Als interne Kontrolle des Tests wird mRNA des  $\beta$ -Actin Housekeeping Gens amplifiziert, die in jeder Blut- und Gewebeprobe enthalten ist. Damit ist eine Kontrolle sowohl der Extraktion als auch der Amplifikation gewährleistet.

Inhalt		25 Reaktionen	96 Reaktionen	480 Reaktionen
1	<b>Influenza A-Mix</b> (orange Verschlusskappe) inkl. Primer, Sonden und Enzyme	520 $\mu$ l	2 x 980 $\mu$ l	6 x 1,625 ml
2	<b>Positivkontrolle</b> (rote Verschlusskappe)	25 $\mu$ l	70 $\mu$ l	2 x 50 $\mu$ l
3	<b>Negativkontrolle</b> (blaue Verschlusskappe)	25 $\mu$ l	70 $\mu$ l	2 x 50 $\mu$ l

## Lagerung und Haltbarkeit

Die Reagenzien sind nach Erhalt sofort bei -20 °C lichtgeschützt zu lagern. Bei vorschriftsmäßiger Lagerung ist der Testkit bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Verpackungsetikett) haltbar. Abgelaufene Testkits dürfen nicht mehr benutzt werden.

**Influenza A-Mix und Positivkontrolle sollten nicht häufiger als dreimal aufgetaut und eingefroren werden und vor noch häufigerem Gebrauch aliquotiert werden.**

## Zusätzlich benötigte Materialien

- RNA-Extraktionskit
- Pipetten (0,5 µl – 1000 µl)
- Sterile, Aerosol-resistente Filterspitzen
- Sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Tischzentrifuge
- PCR-Gefäße: Reaktionsplatte, 96 Kavitäten bzw. Reaktionsgefäße
- Optische Abdeckfolie oder entsprechende Deckel
- Real-time PCR Gerät: z. B. Mx3000P, Mx3005P (Stratagene/ Agilent), ABI 7500 (Applied Biosystems), CFX96 System (BioRad), Rotor-Gene (QIAGEN) oder vergleichbare Geräte

## Warenzeichen und Patente

VIROTYPE® ist ein eingetragenes Warenzeichen.

Die PCR ist patentrechtlich geschützt. Der Kauf dieses Produktes berechtigt den Käufer zur Verwendung dieses Produkts zur Durchführung von veterinärmedizinischen *in vitro* Tests unter bestimmten Roche-Patenten. Eine allgemeine Patent- oder sonstige Lizenz, welche über vorgenanntes Nutzungsrecht des Käufers dieses Produkts hinausgeht, wird nicht gewährt.

## Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

Den Test sollten nur für Labortätigkeit qualifizierte und speziell geschulte Personen ausführen. Die Bestandteile des Testkits dürfen nicht verunreinigt und nicht mit Bestandteilen aus anderen Chargen vermischt werden. Probenvorbereitung und Amplifikation sollten in getrennten Räumlichkeiten stattfinden.

Beachten Sie die Sicherheitsbestimmungen für das Arbeiten in Laboratorien und halten Sie die Regeln der Good Laboratory Practice (GLP) ein. Bitte tragen Sie Handschuhe. Alle Reste von Proben und mit Proben in Berührung gekommene Gegenstände sind als potenziell infektiöse Materialien zu dekontaminieren bzw. zu entsorgen.

**Die Einhaltung des vorgeschriebenen Protokolls (s. Seite 5) ist unbedingt erforderlich.  
Nur für den tierärztlichen Gebrauch!**

## Probenmaterial

VIROTYPE® Influenza A ist geeignet zum Nachweis von Influenza A Virus-RNA aus Oropharyngeal-, Tracheal- und Kloakaltupferproben, Kotproben und Gewebeproben von Vögeln; Nasentupferproben, bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) und Gewebeproben von Schweinen und in Zellkulturüberstand.

Auf Grund der hohen Sensitivität des Tests können Poolproben von bis zu 10 Tupferproben getestet werden.

## RNA-Extraktion

Für die Extraktion der RNA können u. a. folgende Kitsysteme verwendet werden:

QIAamp® Viral RNA Mini (QIAGEN)	Tupferproben, Kotproben
NucleoSpin® RNA Virus (Machery & Nagel)	Tupferproben, Kotproben
Invisorb Spin Virus RNA Mini Kit (Invitex)	Tupferproben, Kotproben
MagMAX Viral RNA Isolation Kit (Applied Biosystems)	Tupferproben
RNeasy® Kit (QIAGEN)	Gewebeproben
RNeasy® Fibrous Tissue Kit (QIAGEN)	Gewebeproben
NucleoSpin® RNA II (Machery & Nagel)	Gewebeproben
oder vergleichbare, validierte Systeme	

**Falls die real-time RT-PCR nicht sofort im Anschluss an die RNA-Extraktion durchgeführt wird, sind die RNA-Isolate bei -20 °C oder besser bei -70 °C zu lagern.**

## Influenza A real-time RT-PCR Protokoll

Bitte lesen Sie das gesamte Protokoll, bevor Sie mit der Testdurchführung beginnen. Da RNA-Moleküle sehr instabil sind, wird eine zügige Arbeitsweise empfohlen.

Alle Reagenzien vor der Verwendung bei Raumtemperatur (18-25 °C) lichtgeschützt auftauen lassen, mischen und kurz anzentrifugieren; Pipettierschritte auf Eis ausführen.

Planen Sie die Anzahl der durchzuführenden Reaktionen (Anzahl der Proben + Kontrollen) zzgl. einer Reserve. In jedem Lauf sollte eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

1. Den Influenza A-Mix (orange Verschlusskappe) mischen, kurz anzentrifugieren, die benötigte Gesamtmenge entnehmen und in ein steriles Reaktionsgefäß überführen.

**Den nicht benötigten Influenza A-Mix sofort wieder bei -20 °C im Dunkeln lagern.**

2. Pro Ansatz 20 µl Influenza A-Mix in ein PCR-Gefäß pipettieren
3. 5 µl der RNA-Probe bzw. der Kontrollen (rote bzw. blaue Verschlusskappe) zupipettieren und mischen.  
Das Gesamtvolumen eines Ansatzes beträgt somit 25 µl.
4. Verschließen der PCR-Gefäße mit optischer Abdeckfolie oder Deckel, ggf. anzentrifugieren.

In der Geräte-Software bitte folgende Filter-Einstellungen für Reporter und Quencher verwenden:

	Reporter	Quencher
<b>Influenza A</b>	<b>FAM</b>	TAMRA
<b>Interne Kontrolle</b>	<b>HEX/JOE<sup>1</sup></b>	TAMRA
Passive Referenz <sup>2</sup>	ROX	

1 abhängig von der möglichen Einstellung am jeweiligen Gerät

2 interne Referenz bei Verwendung von ABI PRISM® Sequence Detection Systems

## Influenza A Real-time RT-PCR-Programm:

45 °C	10 min	
95 °C	10 min	
95 °C	15 sec	40 Zyklen
60 °C	60 sec	Messung am Ende dieses Schrittes

(Gesamtdauer mit Stratagene Mx3005P: 1 h 41 min)

Alternativ können bei Verwendung des **VIROTYPE®-Programms** gleichzeitig Testungen weiterer VIROTYPE® Produkte (VIROTYPE® BTV Plus, VIROTYPE® BVDV und VIROTYPE® CSFV) in einem Gerät durchgeführt werden:

## VIROTYPE® Real-time RT-PCR-Programm:

50 °C	20 min	
95 °C	15 min	
95 °C	30 sec	40 Zyklen
57 °C	45 sec	Messung am Ende dieses Schrittes
68 °C	45 sec	

(Gesamtdauer mit Stratagene Mx3000P: 2 h 29 min)

## Testvalidierung

Für eine gültige Messung sollen das FAM- und das HEX-Fluoreszenzsignal der Positivkontrolle einen Ct-Wert kleiner als 35 (Ct < 35) ergeben. Die Negativkontrolle weist kein Fluoreszenzsignal auf.

## Interpretation der Ergebnisse

### A Ein FAM-Fluoreszenzsignal wird detektiert:

→ Das Ergebnis ist positiv. Die Probe enthält Influenza A Virus-RNA.

Die Detektion eines HEX-Fluoreszenzsignales (interne Kontrolle) ist in diesem Falle nicht zwingend notwendig, da sehr hohe Ausgangskonzentrationen an Virus-RNA durch Konkurrenz zu einem reduzierten bzw. ausbleibenden Fluoreszenzsignal für die interne Kontrolle führen können.

### B Nur ein HEX-Fluoreszenzsignal (interne Kontrolle) wird detektiert:

→ Das Ergebnis ist negativ. Die Probe enthält keine Influenza A Virus-RNA.

Die Detektion des HEX-Fluoreszenzsignales für die interne Kontrolle schließt die Möglichkeit einer vollständigen PCR-Inhibition oder fehlerhaften Extraktion aus.

### C Es wird kein Fluoreszenzsignal detektiert:

→ Der Test ist ungültig. Eine diagnostische Aussage ist nicht möglich.

Es erfolgte eine PCR-Inhibition oder fehlerhafte Extraktion. Es wird empfohlen, die jeweiligen Einzelproben verdünnt (z. B. 1:5) in Nuklease-freiem Wasser nachzutesten oder die RNA-Extraktion aus der Probe zu wiederholen bzw. den Test mit einer neuen, frisch extrahierten Probe zu wiederholen.

Bei Untersuchung von Zellkulturüberstand gilt:

→ Das Ergebnis ist negativ. Die Probe enthält keine Influenza A Virus-RNA.

Jedoch kann bei der Testung von Zellkulturmaterial keine Aussage über PCR-Inhibition oder fehlerhafte Extraktion getroffen werden.

Notizen.....



# VIROTYPE<sup>®</sup> Influenza A

## Instructions for Use

Real-time RT-PCR Test Kit for Detection of Influenza A Virus

### *In vitro* Diagnostic Kit for Birds and Swine

Registered in Accordance with §17c of the German Law on Animal Diseases

Registration No.: FLI-B 538

VIROTYPE <sup>®</sup> Influenza A	25 reactions	Cat. No. 05-301/25
VIROTYPE <sup>®</sup> Influenza A	96 reactions	Cat. No. 05-301/96
VIROTYPE <sup>®</sup> Influenza A	480 reactions	Cat. No. 05-301/480

## Applications

The product group VIROTYPE<sup>®</sup> comprises test systems for the identification of viral pathogens by real-time PCR.

VIROTYPE<sup>®</sup> Influenza A is a real-time RT-PCR test kit for the detection of Influenza A virus. Sample materials are oropharyngeal, tracheal and cloacal swabs (individual or pooled), fecal samples or tissue samples from birds, nasal swabs (individual or pooled), bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and tissue samples from swine and supernatant of cell culture.

### *Production & Support:*

LDL - Labor Diagnostik GmbH Leipzig  
 Deutscher Platz 5b | 04103 Leipzig | Germany  
 Phone +49 (0)341/12454 0 | Fax +49 (0)341/12454 60  
 info@lab-leipzig.de | www.lab-leipzig.de



## General Information

Viruses of the genus *Influenzavirus A* belong to the family *Orthomyxoviridae*. They occur in high genetic diversity and a wide range of virulence.

Influenza A viruses are grouped into low and highly pathogenic strains. Waterfowl are the natural reservoir of low-pathogenic avian influenza viruses (LPAIV). Highly pathogenic avian influenza viruses (HPAIV) belong to subtypes H5 or H7 and may cause fowl plaque in domestic poultry with high economic losses. The subtypes H1N1, H1N2 and H3N2 of Influenza A virus can also cause infections of the respiratory tract in swine.

The high sensitivity of VIROTYPE® Influenza A allows the early detection of the pathogen in samples of birds and swine. In addition the novel A/H1N1 (2009) Influenza A virus is detected.

## Description of the Test Principle

VIROTYPE® Influenza A includes all reagents for the detection of Influenza A virus RNA as well as a positive and a negative control.

Reverse transcription (RT) of the viral RNA and subsequent amplification of the cDNA by Polymerase Chain Reaction (PCR) are performed in one tube; this reduces the risk of contaminations to a minimum. The reporters of the probes will emit fluorescence in proportion to the amount of amplicate produced. Thus, the reaction can be monitored in real-time (real-time PCR).

VIROTYPE® Influenza A uses two specific combinations of primer with probe, one for Influenza A virus RNA giving FAM fluorescence and one for the control RNA (internal control) giving HEX fluorescence. As assay internal control mRNA of  $\beta$ -actin housekeeping gene is amplified. This guarantees the control of extraction as well as amplification.

Content		25 reactions	96 reactions	480 reactions
1	<b>Influenza A-Mix</b> (orange cap) includes primers, probes and enzymes	520 $\mu$ l	2 x 980 $\mu$ l	6 x 1.625 ml
2	<b>Positive Control</b> (red cap)	25 $\mu$ l	70 $\mu$ l	2 x 50 $\mu$ l
3	<b>Negative Control</b> (blue cap)	25 $\mu$ l	70 $\mu$ l	2 x 50 $\mu$ l

## Storage and Shelf Life

Immediately upon receiving store the test kit at -20 °C, protected from light. Under these conditions the test kit is stable until the indicated expiration date. Do not use the reagents past expiration date.

**Influenza A-Mix and Positive Control should not be thawed and frozen more than 3 times. In case of frequent use of the test kit aliquoting is recommended.**

## Additional Material and Equipment Required

- RNA extraction kit
- Pipettes (0.5 µl – 1000 µl)
- Sterile filter tips (aerosol resistant)
- Sterile 1.5 ml reaction tubes
- Bench-top centrifuge
- PCR tubes: 96-well reaction plate or reaction tubes
- Optical sealing film or covers
- Real-time PCR thermal cycler: e.g. Mx3000P, Mx3005P (Stratagene/ Agilent), ABI 7500 (Applied Biosystems), CFX96 System (BioRad), Rotor-Gene (QIAGEN) or similar

## Trademarks and Patents

VIROTYPE® is a registered trademark. Patent rights protect PCR. THE PURCHASE OF THIS PRODUCT GRANTS THE PURCHASER RIGHTS UNDER CERTAIN ROCHE PATENTS TO USE IT FOR PROVIDING VETERINARY IN VITRO DIAGNOSTIC TESTING. NO GENERAL PATENT OR OTHER LICENSE OF ANY KIND OTHER THAN THIS SPECIFIC RIGHT OF USE FROM PURCHASE IS GRANTED HEREBY.

## Precautions and Warnings

The test should only be performed by persons qualified for laboratory work. The components of the test kit may not be contaminated or mixed with components from other batches. Sample preparation and amplification should be carried out in separate rooms. Take appropriate safety measures for working in laboratories and stick to GLP rules. Wear gloves all the time.

All sample residues and objects which have come into contact with samples must be decontaminated or disposed of as potentially infective material.

**Please stick rigorously to this protocol (page 5)!**  
**For veterinary use only.**

## Sample Material

VIROTYPE® Influenza A can be used for the detection of Influenza A virus RNA from oropharyngeal, tracheal and cloacal swabs, fecal samples or tissue samples from birds, nasal swabs, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and tissue samples from swine and supernatant of cell culture. Due to the high sensitivity of the test, pools of up to 10 individual swab samples can be analysed.

## RNA Extraction

For the isolation of Influenza A virus RNA following extraction kits can be used:

QIAamp® Viral RNA Mini (QIAGEN)	swab samples, fecal samples
NucleoSpin® RNA Virus (Macherey & Nagel)	swab samples, fecal samples
Invisorb Spin Virus RNA Mini Kit (Invitex)	swab samples, fecal samples
MagMAX Viral RNA Isolation Kit (Applied Biosystems)	swab samples
RNeasy® Kit (QIAGEN)	tissue samples
RNeasy® Fibrous Tissue Kit (QIAGEN)	tissue samples
NucleoSpin® RNA II (Macherey & Nagel)	tissue samples
or comparable, validated systems	

**Store the isolated RNA at -70 °C (-20 °C or below) in case the real-time RT-PCR is not performed immediately after RNA extraction.**

## Influenza A real-time RT-PCR Protocol

Please read the entire protocol before starting the test procedure. RNA is unstable, please perform this protocol uninterrupted.

Before use, thaw the reagents at room temperature (18-25 °C) protected from light, mix and spin shortly. Perform all pipetting steps on ice.

Calculate the number of reactions to be performed (samples + controls) plus a reserve. Perform at least one Positive and one Negative Control for each run.

1. Mix the Influenza A-Mix (orange cap) and spin shortly, take the volume needed and pipette it into a sterile reaction tube.

**Immediately return not required Influenza A-Mix at -20 °C in the dark.**

2. Add 20 µl of Influenza A-Mix into each PCR tube.
3. Add 5 µl of the isolated RNA or of controls (red and blue cap) and mix. Thus, the final volume of a test is 25 µl.
4. Immediately cover the PCR tubes with optical sealing film, or close caps, respectively. Spin shortly if necessary.

Use the following filter settings for reporter and quencher in the software of your thermal cycler:

	Reporter	Quencher
<b>Influenza A</b>	<b>FAM</b>	TAMRA
<b>Internal control</b>	<b>HEX/JOE<sup>1</sup></b>	TAMRA
Passive reference <sup>2</sup>	ROX	

1 use option available in your thermal cycler

2 internal reference using the ABI PRISM® Sequence Detection Systems

## Influenza A Real-time RT-PCR-Program:

45 °C	10 min	
95 °C	10 min	
95 °C	15 sec	40 cycles
60 °C	60 sec	Measure at the end of this step

(Total time with Stratagene Mx3000P: 1 h 41 min)

Alternatively the standard **VIROTYPE®-Program** can be used if the assay is performed in parallel with other VIROTYPE® products (VIROTYPE® BTV Plus, VIROTYPE® BVDV and VIROTYPE® CSFV) in the same thermocycler:

## VIROTYPE® Real-time RT-PCR-Programm:

50 °C	20 min	
95 °C	15 min	
95 °C	30 sec	40 cycles
57 °C	45 sec	Measure at the end of this step
68 °C	45 sec	

(Total time with Stratagene Mx3000P: 2 h 29 min)

## Test Validation

For the assay to be valid the FAM and HEX fluorescence signals of the Positive Control should give a Ct-value less than 35 (Ct < 35).

The Negative Control does not have a fluorescence signal.

## Interpretation of the Results

### 1 A FAM fluorescence signal is measured:

→ **Positive result, the sample contains Influenza A virus RNA.**

In this case, a HEX fluorescence signal may be dispensable, because very high concentrations of Virus-RNA may compete with the internal control giving a reduced HEX signal or no HEX signal at all.

### 2 Only a HEX fluorescence signal (internal control) is measured:

→ **Negative result, the sample does not contain Influenza A virus RNA.**

The internal control is measured through HEX fluorescence, complete PCR inhibition and incorrect extraction is thereby excluded.

### 3 No fluorescence signal is detected:

→ **The test is not valid, no diagnosis possible.**

The PCR was inhibited or the sample extraction was incorrect. It is recommended to retest the respective individual samples in nuclease free water (e.g. diluted 1:5), to repeat the RNA extraction or repeat the whole test procedure starting with new sample material.

Analysis of supernatant of cell culture:

→ **Negative result, the sample does not contain Influenza A virus RNA.**

However, no information about PCR inhibition or incorrect extraction is given.

Notes .....