



SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!
See the following pages for more information!



Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

mail@szabo-scandic.com

www.szabo-scandic.com

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 

RIDA® GENE Monkeypox Virus RUO

REF PG4915RUO



Deutsch	3
English.....	17

Deutsch

RIDA®GENE Monkeypox Virus RUO

REF PG4915

1. Zweckbestimmung

Nur für Forschungszwecke. Nicht für diagnostische Verfahren geeignet.

2. Testprinzip

Der RIDA®GENE Monkeypox Virus RUO Test ist eine multiplex real-time PCR zum Nachweis von Monkeypox Viren (MPXV) DNA.

Nach der DNA-Isolierung wird (falls vorhanden) das spezifische Genfragment für das Monkeypox Virus (A29L) amplifiziert.

Die zu amplifizierende Zielsequenz wird mit einer Hydrolyse-Sonde, die an einem Ende mit dem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert ist, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die **Taq-Polymerase** den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Der RIDA®GENE Monkeypox Virus RUO multiplex real-time PCR Test enthält eine **Internal Control DNA** (ICD), um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR-Inhibition kontrollieren zu können.

3. Packungsinhalt

Tab. 1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 100 Bestimmungen)

Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	gelb
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rot
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	weiß
P	Positive Control	1x	200 µl	blau

4. Reagenzien und ihre Lagerung

- Bitte folgen Sie den Handhabungsvorgaben in Tabelle 2 und lagern Sie das Kit unmittelbar nach Verwendung gemäß den aufgeführten Angaben.
- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -16 bis -28 °C gelagert werden und können ungeöffnet bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 – 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 5 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaft nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 – 8 °C).

Tab. 2: Lagerungsbedingungen und -hinweise

	Lagertemperatur	Maximale Lagerzeit
ungeöffnet	-16 bis -28 °C	Bis zum aufgedrucktem Verfallsdatum verwendungsfähig
geöffnet	-16 bis -28 °C	5 Tau-/Frier-Zyklen

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1 Laborzubehör

Folgendes Zubehör wird für die Durchführung des RIDA®GENE Monkeypox Virus RUO Tests benötigt:

Zubehör
Extraktionsplattform: <ul style="list-style-type: none">• RTP® Pathogen Kit (Invitak Molecular)• Maxwell® RSC (Promega)• MagNA Pure 96 Instrument (Roche)
Real-time PCR Gerät: <ul style="list-style-type: none">• RIDA®CYCLER (R-Biopharm AG)• LightCycler® 480 II (Roche)• ABI 7500 Fast Dx (Applied Biosystems)• CFX96™ Dx (Bio-Rad)• Rotor-Gene Q (QIAGEN) <p>Hinweis: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden.</p>
RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm)*
Real-time PCR-Verbrauchsmaterialien (Platten (low profile, white wells, clear frame), Reaktionsgefäße, Folien)
Zentrifuge mit Rotor für Platten
Vortexer
Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
Pipettenspitzen mit Filtern
Puderfreie Einmalhandschuhe

* Notwendig für Anwendungen mit dem LightCycler® 480 II (Roche)

Das RIDA®GENE Monkeypox Virus RUO Kit kann in Verbindung mit kompatiblen Workflows verwendet werden. Alternative Nukleinsäure-Extraktionsverfahren und real-time PCR-Geräte müssen durch den Anwender verifiziert/validiert werden. Kontaktieren Sie bitte die R-Biopharm AG zur Überprüfung der Kompatibilität unter pcr@r-biopharm.de

6. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für Forschungszwecke.

Dieser Test ist nur von qualifiziertem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten.

Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.

In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken. Eine räumliche Trennung, gesonderte Kleidung und Instrumente für Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten um eine Querkontamination oder falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Vermeiden Sie eine Kontamination der Proben und der Komponenten des Kits mit Mikroben und Nukleasen (DNase / RNase).

Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, entsprechend entsorgt werden.

Das Austauschen und Vermischen der Komponenten (Reaction Mix, Taq-Polymerase, Internal Control DNA, Positive Control, No Template Control) einer Kit-Charge mit den Komponenten einer anderen Charge ist untersagt.

Das Testkit darf nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

7. Sammlung und Lagerung der Proben

7.1 DNA-Präparation aus humanen Abstrich-Proben

Für die DNA-Präparation aus humanen Abstrich-Proben wird ein kommerziell erhältliches Nukleinsäure-Extraktionskit (z.B. RTP® Pathogen Kit (Invitek Molecular)) oder Nukleinsäure-Extraktionssystem (z.B. Maxwell® RSC (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Der RIDA®GENE Monkeypox Virus RUO Test enthält eine **Internal Control DNA**, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die **Internal Control DNA** kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Prozesskontrolle (Extraktions- und Inhibitionskontrolle) eingesetzt werden.

Wird die **Internal Control DNA** nur als Inhibitionskontrolle für die Amplifikation verwendet, muss 1 µl der **Internal Control DNA** dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle für die Amplifikation verwendet, müssen 20 µl der **Internal Control DNA** während der Extraktion eingesetzt werden.

Die **Internal Control DNA** soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Es wird empfohlen je 1 µl pro Reaktion der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

8. Testdurchführung

8.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf muss eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 3). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, die **Taq-Polymerase**, die **Positive Control** und die **No Template Control** auftauen, durchmischen (ausgenommen Taq-Polymerase) und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 – 8 °C).

Tab. 3: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Gesamt	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

Tab. 4: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD nur als Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	Gesamt	21,0 µl	231,0 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

8.2 Herstellung des PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (Gefäße/Platten) pipettieren.

Negativkontrolle: 5 µl No Template Control zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Es wird empfohlen bei Verwendung der Internal Control DNA als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der Internal Control DNA zum PCR-Mix der Negativkontrolle zu pipettieren.

Proben: 5 µl Eluat zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Positivkontrolle: 5 µl Positive Control zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Es wird empfohlen bei Verwendung der Internal Control DNA als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der Internal Control DNA zum PCR-Mix der Positivkontrolle zu pipettieren.

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz zentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7).

8.3 Geräteeinstellungen

8.3.1 Universal real-time PCR Profil

Zur Harmonisierung der RIDA®GENE Assays wurde der RIDA®GENE Monkeypox Virus RUO Assay im Universalprofil verifiziert. Das bietet die Möglichkeit DNA und RNA Assays miteinander zu kombinieren.

Tab. 5: Universal real-time PCR Profil für LightCycler® Serie und RIDA®CYCLER

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 6: Universal real-time PCR Profil für ABI 7500 Fast Dx, Rotor-Gene Q und CFX96™ Dx

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Hinweis: Das Universal real-time PCR Profil kann auch für RNA-Tests verwendet werden, wenn RIDA®GENE DNA und RIDA®GENE RNA real-time PCR-Tests in einem Lauf kombiniert werden.

8.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 7: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR-Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
R-Biopharm AG RIDA®CYCLER	MPXV	Green	-
	ICD	Yellow	
Roche LightCycler® 480 II	MPXV	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICD	533/580	
Applied Biosystems ABI 7500 Fast Dx	MPXV	FAM	-
	ICD	VIC	
Bio-Rad CFX96™ Dx	MPXV	FAM	-
	ICD	VIC	
QIAGEN Rotor-Gene Q	MPXV	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein
	ICD	Yellow	

9. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativkontrolle und Positivkontrolle müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 8).

Die Positive Control liegt in einer Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von 5×10^3 Kopien in jedem PCR-Lauf eingesetzt.

Tab. 8: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

Probe	Ergebnis	ICD Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA *1	Siehe Certificate of Analysis
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	0

**1 Ein Ct-Wert für die ICD ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten*

Wenn die Positivkontrolle nicht in dem angegebenen Ct-Bereich liegt, die Negativkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung Folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung

10. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 9.

Tab. 9: Interpretation der Ergebnisse*

Nachweis von		
MXPV	ICD	Ergebnis
+	+/-	Monkeypox Virus nachweisbar**1
-	+	Zielgen nicht nachweisbar
-	-	ungültig

* + = positiv
- = negativ

*1 siehe Grenzen der Methoden Punkt 2

Eine Probe wird positiv bewertet, wenn die Proben-DNA und die **Internal Control DNA** eine Amplifikation im Nachweissystem zeigen.

Eine Probe wird ebenfalls positiv bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation zeigt, für die **Internal Control DNA** jedoch keine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Der Nachweis der **Internal Control DNA** ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der **Internal Control DNA** führen können.

Eine Probe wird negativ bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation zeigt, für die **Internal Control DNA** jedoch eine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der **Internal Control DNA** ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-DNA und die **Internal Control DNA** keine Amplifikation im Nachweissystem zeigen. In der Probe sind PCR-Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf.

11. Grenzen der Methode

1. Dieser Test dient dem Nachweis von Monkeypox Virus DNA.
2. Das verwendete Primer- und Sondensystem kann Kreuzreaktivitäten zu anderen Orthopoxviren wie variola virus, vaccinia virus, cowpox virus, camelpox virus, ectromelia, taterapox, Uasin Gishu disease viruses, raccoon poxvirus, volepox virus und skunkpox virus aufweisen.
3. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
5. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit dem RIDA®GENE Monkeypox Virus RUO Test zu falsch negativen Ergebnissen führen.
6. Wie bei allen auf PCR basierenden Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
7. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass das Zielgen (A29L) vorhanden ist.
8. Dieser Assay sollte gemäß der GLP-Verordnung (Gute Laborpraxis) durchgeführt werden. Der Anwender muss bei der Durchführung des Tests die Anweisungen des Herstellers genau befolgen.

12. Leistungsmerkmale










Nicht zutreffend.

13. Versionsübersicht

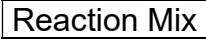
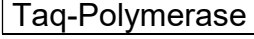

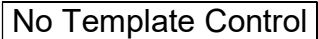
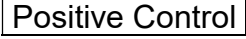
Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2022-05-25	Freigabeversion

14. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	Für Forschungszwecke
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Hersteldatum
	Hersteller

Testspezifische Symbole

	Reaktions-Mix
	Taq-Polymerase
	Extraktions- / Inhibitionskontrolle
	Negativkontrolle
	Positivkontrolle

English

RIDA®GENE Monkeypox Virus RUO

REF PG4915

1. Intended use

For research use only. Not intended for diagnostic procedures.

2. Test principle

The RIDA®GENE Monkeypox Virus RUO test is a multiplex real-time PCR for the detection of monkeypox virus (MPXV) DNA.

After DNA isolation, the specific gene fragment (if present) for the monkeypox virus (*A29L*) is amplified.

The target sequence to be amplified is detected using a hydrolysis probe that is labeled with a quencher at one end and a fluorescent reporter dye (fluorophore) at the other. The probes hybridize to the amplicon in the presence of a target sequence. During extension, **Taq-Polymerase** separates the reporter from the quencher. The reporter emits a fluorescent signal that is detected by the optical unit of a real-time PCR instrument. The fluorescent signal increases with the quantity of formed amplicons. The RIDA®GENE Monkeypox Virus RUO multiplex real-time PCR test contains an **Internal Control DNA** (ICD) to be able to control sample preparation and/or potential PCR inhibition.

3. Reagents provided

Tab. 1: Reagents provided (The reagents provided in the kit are sufficient for 100 determinations.)

Kit code	Reagent	Amount		Lid color
1	Reaction Mix	2 ×	1050 µL	yellow
2	Taq-Polymerase	1 ×	80 µL	red
D	Internal Control DNA	2 ×	1700 µL	orange
N	No Template Control	1 ×	450 µL	white
P	Positive Control	1 ×	200 µL	blue

4. Storage instructions

- Please follow the handling guidelines in Table 2 and store the kit directly after use according to the information specified.
- All reagents must be stored away from light at -16 °C to -28 °C and, if unopened, can be used until the expiration date printed on the label. The quality guarantee is no longer valid after the expiration date.
- All reagents should be carefully thawed prior to use (e.g., in a refrigerator at 2 °C - 8 °C).
- Repeated freezing/thawing of up to 5 times does not have an impact on the test property (if necessary, create aliquots after the first thaw and refreeze reagents immediately).
- Cool all reagents appropriately during PCR preparation (2 °C - 8 °C).

Tab. 2: Storage conditions and information

	Storage temperature	Maximum storage time
unopened	-16 °C to -28 °C	Can be used until the printed expiration date
opened	-16 °C to -28 °C	5 freeze-thaw cycles

5. Reagents required but not provided

5.1 Laboratory equipment

The following equipment is needed for performing the RIDA®GENE Monkeypox Virus RUO test:

Equipment
Extraction platform: <ul style="list-style-type: none">• RTP® Pathogen Kit (Invitex Molecular)• Maxwell® RSC (Promega)• MagNA Pure 96 instrument (Roche)
Real-time PCR instrument: <ul style="list-style-type: none">• RIDA®CYCLER (R-Biopharm AG)• LightCycler® 480 II (Roche)• ABI 7500 Fast Dx (Applied Biosystems)• CFX96™ Dx (Bio-Rad)• Rotor-Gene Q (QIAGEN) <p>Note: When using Rotor-Gene Q (QIAGEN), use only 0.1-mL reaction vials.</p>
RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm)*
Real-time PCR consumables (plates (low profile, white wells, clear frame), reaction vials, foils)
Centrifuge with rotor for plates
Vortexer
Pipettes (0.5 - 20 µL, 20 - 200 µL, 100 - 1000 µL)
Pipette tips with filters
Powder-free disposable gloves

* Necessary for applications using LightCycler® 480 II (Roche)

The RIDA®GENE Monkeypox Virus RUO kit can be used in conjunction with compatible workflows. Alternative nucleic acid extraction procedures and real-time PCR instruments must be verified/validated by the user. Please contact R-Biopharm AG at pcr@r-biopharm.de to check the compatibility.

6. Warnings and precautions for the users

For research use only.

This test must be carried out only by qualified laboratory personnel. The guidelines for working in medical laboratories must be observed.

Always adhere strictly to the operating manual when carrying out this test.

Do not pipette samples or reagents using your mouth. Avoid contact with broken skin and mucous membranes.

Wear personal protective equipment (appropriate gloves, lab coat, safety glasses) when handling reagents and samples, and wash hands after completing the test.

Do not smoke, eat, or drink in areas where samples are handled.

Separate rooms, special clothing, and instruments for extraction, PCR preparation, and PCR must be used to prevent cross-contamination and false-positive results.

Avoid contaminating the samples and components of the kit with microbes and nucleases (DNase/RNase).

Clinical samples must be viewed as potentially infectious and must be disposed of appropriately, like all reagents and materials that come into contact with potentially infectious samples.

Do not exchange or mix the components (Reaction Mix, Taq-Polymerase, Internal Control DNA, Positive Control, No Template Control) of one lot with the components of another lot.

Do not use the test kit after the expiration date. Users are responsible for the proper disposal of all reagents and materials after use. For disposal, please adhere to national regulations.

7. Collection and storage of samples

7.1 DNA preparation from human swab samples

A commercially available nucleic acid extraction kit (e.g., RTP[®] Pathogen Kit, Invitek Molecular) or nucleic acid extraction system (e.g., Maxwell[®] RSC, Promega) is recommended for DNA preparation from human swab samples. The manufacturer's instructions must be observed.

The RIDA[®]GENE Monkeypox Virus RUO test contains an **Internal Control DNA** that indicates potential PCR inhibition, checks the integrity of the reagents, and confirms successful nucleic acid extraction. The **Internal Control DNA** can be used either solely as an inhibition control or as a process control (extraction and inhibition control).

When the **Internal Control DNA** is used only as an inhibition control for amplification, 1 µL of the **Internal Control DNA** must be added to the Master Mix (see Tab. 4).

When the **Internal Control DNA** is used as an extraction control for sample preparation **and** as an inhibition control for amplification, then 20 µL of the **Internal Control DNA** must be used during extraction.

The **Internal Control DNA** should be added to the sample lysis buffer mix and should **not** be added directly to the sample material. It is recommended to pipette 1 µL of the **Internal Control DNA** per reaction into the PCR mix of the negative control and of the positive control.

8. Test procedure

8.1 Preparation of the Master Mix

The total number of the reactions needed for PCR (samples and control reactions) must be calculated. One positive control and one negative control must be included in each test run.

Adding an additional 10 % volume to the Master Mix is recommended in order to compensate for any pipetting loss (see Tab. 3). Prior to use, thaw the **Reaction Mix**, the **Taq-Polymerase**, the **Positive Control**, and the **No Template Control**, vortex (except for Taq-Polymerase), and briefly centrifuge. Always cool reagents appropriately during work steps (2 °C - 8 °C).

Tab. 3: Example of the calculation and production of the Master Mix for 10 reactions

Kit code	Components of the Master Mix	Quantity per reaction	10 reactions (plus 10 %)
1	Reaction Mix	19.3 µL	212.3 µL
2	Taq-Polymerase	0.7 µL	7.7 µL
	Total	20 µL	220 µL

Mix the Master Mix and then centrifuge for short time.

Tab. 4: Example of the calculation and production of the Master Mix for 10 reactions (ICD only as inhibition control)

Kit code	Components of the Master Mix	Quantity per reaction	10 reactions (plus 10 %)
1	Reaction Mix	19.3 µL	212.3 µL
2	Taq-Polymerase	0.7 µL	7.7 µL
D	Internal Control DNA	1.0 µL	11 µL
	Total	21.0 µL	231.0 µL

Mix the Master Mix and then centrifuge for short time.

8.2 Preparation of the PCR mix

Pipette 20 µL of the Master Mix into each reaction vial (vials/plates).

Negative control: Pipette 5 µL of the **No Template Control** into the pre-pipetted Master Mix.

Note: When the **Internal Control DNA** is used as an extraction control for sample preparation and as an inhibition control, it is recommended to add 1 µL of the **Internal Control DNA** to each PCR mix of the negative control.

Samples: Add 5 µL eluate to the pre-pipetted Master Mix.

Positive control: Add 5 µL of the **Positive Control** to the pre-pipetted Master Mix.

Note: When the **Internal Control DNA** is used as an extraction control for sample preparation and as an inhibition control, it is recommended to add 1 µL of the **Internal Control DNA** to each PCR mix of the positive control.

Seal the reaction vials or plates, briefly centrifuge at slow speed, and transfer into the real-time PCR instrument. Start PCR according to PCR instrument setup (see Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7).

8.3 Device settings

8.3.1 Universal real-time PCR profile

To harmonize the RIDA®GENE assays, the RIDA®GENE Monkeypox Virus RUO assay was verified in the universal profile. This makes it possible to combine DNA and RNA assays with each other.

Tab. 5: Universal real-time PCR profile for LightCycler® series and RIDA®CYCLER

<u>Reverse transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing/extension	15 sec, 60 °C
Temperature transition rate/ ramp rate	Maximum

Note: **Annealing and extension take place in the same step.**

Tab. 6: Universal real-time PCR profile for ABI 7500 Fast Dx, Rotor-Gene Q, and CFX96™ Dx

<u>Reverse transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Denaturation	15 sec, 95 °C
Annealing/extension	30 sec, 60 °C
Temperature transition rate/ ramp rate	Maximum

Note: **Annealing and extension take place in the same step.**

Note: **The universal real-time PCR profile can also be used for RNA tests if RIDA®GENE DNA and RIDA®GENE RNA real-time PCR tests are combined in one run.**

8.4 Detection channel setting

Tab. 7: Selection of appropriate detection channels

Real-time PCR instrument	Detection	Detection channel	Note
R-Biopharm AG RIDA®CYCLER	MPXV	Green	-
	ICD	Yellow	
Roche LightCycler® 480 II	MPXV	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required.
	ICD	533/580	
Applied Biosystems ABI 7500 Fast Dx	MPXV	FAM	-
	ICD	VIC	
Bio-Rad CFX96™ Dx	MPXV	FAM	-
	ICD	VIC	
QIAGEN Rotor-Gene Q	MPXV	Green	The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels.
	ICD	Yellow	

9. Quality control

Samples are evaluated using the analysis software of the respective real-time PCR instrument according to the manufacturer's instructions. Negative and positive controls must show the correct results (see Tab. 8).

The **Positive Control** is present in a concentration of 10^3 copies/ μ L. It is used in a total quantity of 5×10^3 copies in every PCR run.

Tab. 8: A valid PCR run must meet the following conditions:

Sample	Result	ICD Ct	Target gene Ct
Positive control	Positive	N/A *1	See Certificate of Analysis
Negative control	Negative	Ct > 20	0

*1 A Ct value for the ICD is not needed to obtain a positive result of the positive control.

If the positive control is not within the specified Ct range but the negative control is valid, all reactions need to be reanalyzed, including the controls.

If the negative control is not negative, but the positive control is valid, all reactions need to be reanalyzed, including the controls.

If the specified values are not met, check the following items before repeating the test:

- Expiration date of the reagents used
- Functionality of the equipment being used
- Correct test procedure

10. Result interpretation

The sample results are interpreted according to Table 9.

Tab. 9: Result interpretation*

Detection of		
MPXV	ICD	Result
+	+/-	Monkeypox virus detectable* ¹
-	+	Target gene not detectable
-	-	Invalid

* + = positive
- = negative

*¹ see Limitations of the method, No. 2

A sample is positive if the sample DNA and the **Internal Control DNA** show an amplification signal in the detection system.

A sample is also positive if the sample DNA shows an amplification signal, but no amplification signal can be seen for the **Internal Control DNA** in the detection system. Detecting the **Internal Control DNA** is not necessary in this case because high amplicon concentrations can result in a weak or absent signal of the **Internal Control DNA**.

A sample is negative if the sample DNA does not show an amplification signal, but an amplification signal is visible for the **Internal Control DNA** in the detection system. Inhibition of the PCR reaction can be ruled out by the detection of the **Internal Control DNA**.

A sample is invalid if the sample DNA and the **Internal Control DNA** do not show an amplification signal in the detection system. PCR inhibitors are present in the sample or an error occurred during the extraction process.

11. Limitations of the method

1. This test is used to detect monkeypox virus DNA.
2. The primer and probe system used can have cross-reactivities with other orthopoxviruses, such as variola virus, vaccinia virus, cowpox virus, camelpox virus, ectromelia virus, taterapox virus, Uasin Gishu disease viruses, raccoonpox virus, volepox virus, and skunkpox virus.
3. Improper specimen sampling, transport, storage, and handling or a pathogen load below the test's analytical sensitivity can lead to false-negative results.
4. The presence of PCR inhibitors can lead to non-evaluable results.
5. Mutations or polymorphisms in the primer or probe binding sites can interfere with the detection of new or unknown variants and can lead to false-negative results using the RIDA[®]GENE Monkeypox Virus RUO test.
6. As with all PCR-based tests, extremely low concentrations of the target sequences under the limit of detection (LoD) can be detected. The results obtained are not always reproducible.
7. A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. A positive result indicates that the target gene (*A29L*) is present.
8. This assay should be performed in compliance with the regulation on good laboratory practice (GLP). Users must precisely follow the manufacturer's instructions when performing the test.

12. Performance characteristics










Not applicable

13. Version history

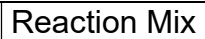
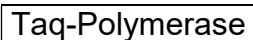
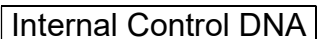
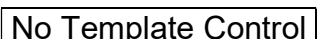
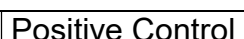
Version number	Section and designation
2022-05-25	Release version

14. Explanation of symbols

General symbols

	For research use only
	Follow instructions for use
	Batch number
	Use before
	Storage temperature
	Item number
	Number of tests
	Date of manufacture
	Manufacturer

Test-specific symbols

	Reaction Mix
	Taq Polymerase
	Extraction/inhibition control
	Negative control
	Positive control