

Oktober 2015

# artus<sup>®</sup> M. tuberculosis RG PCR Kit Handbuch



Version 1

Quantitative In-vitro-Diagnostik

Zur Verwendung mit den Rotor-Gene<sup>®</sup> Q  
Thermocyclern

IVD

CE

REF



R5 MAT

4555263 (24 Reaktionen)  
4555265 (96 Reaktionen)

QIAGEN GmbH  
QIAGEN-Straße 1  
40724 Hilden  
DEUTSCHLAND

1046960DE

# Inhaltsverzeichnis

Vorgesehener Verwendungszweck .....	4
Zusammenfassung und Erläuterung .....	4
Verfahrensprinzip .....	4
Mitgelieferte Materialien .....	6
<b>Kit-Inhalt</b> .....	6
Erforderliche, nicht mitgelieferte Materialien .....	7
Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen .....	8
<b>Warnungen</b> .....	8
Lagerung und Handhabung der Reagenzien .....	8
Durchführung .....	9
<b>Wichtige Hinweise vor Beginn</b> .....	9
DNA-Isolierung .....	10
Interne Kontrolle .....	12
Quantifizierung .....	12
PCR auf Rotor-Gene Q Thermocyclern .....	13
Interpretation der Ergebnisse .....	20
<b>Hilfe zur Fehlersuche</b> .....	22
Qualitätskontrolle .....	24
Anwendungseinschränkungen .....	24
Leistungsmerkmale .....	26
Analytische Sensitivität .....	26
Spezifität .....	27
Präzision .....	29
Robustheit .....	31
Reproduzierbarkeit .....	32
Literatur .....	33
Symbole .....	33
Bestellinformationen .....	35



## Vorgesehener Verwendungszweck

Der *artus M. tuberculosis* RG PCR Kit ist ein In-vitro-Nukleinsäure-Amplifikationstest für den Nachweis aller Mitglieder des *M. tuberculosis*-Komplexes (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. pinnipedii*) in menschlichem Sputum, bronchoalveolärer Lavage (BAL), Bronchialsekreten, Liquor, Magenflüssigkeit oder Peritonealpunktionsproben. Dieser diagnostische Testkit verwendet die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und wurde für die Verwendung mit den Rotor-Gene Q Thermocyclern konfiguriert.

## Zusammenfassung und Erläuterung

Tuberkulose (TB) ist weltweit nach wie vor eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten. Etwa zwei Milliarden Menschen, ein Drittel der Weltbevölkerung, sind mit dem Erreger der Tuberkulose *Mycobacterium tuberculosis* infiziert. Die Inzidenz von TB beträgt weltweit rund 8 Millionen, und etwa 3 Millionen Menschen sterben jedes Jahr daran. TB ist in den Industrieländern wieder auf dem Vormarsch, insbesondere wegen der Migration infizierter Menschen und der Entwicklung arzneimittelresistenter TB. Obdachlose, Drogenkonsumenten und immungeschwächte Personen sind davon überproportional betroffen.

TB ist eine chronisch-zyklisch verlaufende Erkrankung, die sich vor allem auf die Lunge und die zugehörigen Lymphknoten auswirkt. Je nach dem Immunstatus des Patienten können die *M. tuberculosis*-Bakterien jedoch auch andere Organe besiedeln. TB wird in erster Linie über Aerosole von Mensch zu Mensch übertragen. Ansteckend sind nur Menschen mit aktiver Erkrankung. Insbesondere bei immunsupprimierten Menschen können *M. tuberculosis*-Bakterien auch Jahre nach der ersten Infektion reaktiviert werden (rezidivieren).

## Verfahrensprinzip

Bei der Diagnose von Pathogenen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden spezifische Bereiche aus dem Genom des Pathogens amplifiziert. Bei der Real-Time-PCR wird das entstandene Amplifikat mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen detektiert. Diese sind in der Regel an Oligonukleotid-Sonden gekoppelt, die spezifisch an das Amplifikat binden. Die Beobachtung der Fluoreszenzintensitäten während des PCR-Laufs (d. h. in Echtzeit, daher „Real-Time-PCR“) ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung des sich anreichernden Produkts, ohne die Reaktionsgefäße nach dem PCR-Lauf wieder öffnen zu müssen (1).

Das *artus M. tuberculosis* RG PCR Kit ist ein gebrauchsfertiges System für den Nachweis aller Mitglieder des *M. tuberculosis*-Komplexes (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. pinnipediti*). Hierzu wird an Rotor-Gene Q Thermocyclern die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt. Der *M. tuberculosis* RG Master enthält die Reagenzien und Enzyme zur spezifischen Amplifikation eines 159 bp langen Abschnitts des Mykobakteriengenoms sowie für den direkten Nachweis dieses Amplifikats im Fluoreszenzkanal **Cycling Green** des Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q oder Rotor-Gene 6000 oder im **Cycling A.FAM** des Rotor-Gene 3000.

Zusätzlich enthält der *artus M. tuberculosis* RG PCR Kit ein zweites, heterologes Amplifikationssystem zum Nachweis einer möglichen PCR-Inhibition. Diese wird als interne Kontrolle (IC) im Fluoreszenzkanal **Cycling Yellow** des Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q oder Rotor-Gene 6000 oder im **Cycling A.JOE** des Rotor-Gene 3000 nachgewiesen. Die Amplifikation und Detektion dieser internen Kontrolle (IC) reduziert nicht die Nachweisgrenze der analytischen PCR des *M. tuberculosis*-Komplexes (siehe „Analytische Sensitivität“ auf Seite 26). Externe Positivkontrollen (*M. tuberculosis* RG/TM QS 1–4) werden mitgeliefert, mit denen die Erregerlast bestimmt werden kann. Weitere Informationen hierzu finden Sie im Abschnitt „Quantifizierung“ auf Seite 12.

# Mitgelieferte Materialien

## Kit-Inhalt

<b>artus M. tuberculosis RG PCR Kit</b>				
<b>Katalognummer</b>		<b>4555263</b>	<b>4555265</b>	
<b>Anzahl der Reaktionen</b>		<b>24</b>	<b>96</b>	
<b>Kappenfarbe</b>	<b>Reagenzname</b>	<b>Symbol</b>	<b>Menge</b>	<b>Menge</b>
Blau	M. tuberculosis RG Master		2 x 12 Reaktionen	8 x 12 Reaktionen
Gelb	M. tuberculosis RG Mg-Sol*	<b>Mg-Sol</b>	1 x 400 µl	1 x 400 µl
Rot	M. tuberculosis RG/TM QS <sup>†</sup> 1 (3 x 10 <sup>4</sup> Kopien/µl)	<b>QS</b>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rot	M. tuberculosis RG/TM QS 2 (3 x 10 <sup>3</sup> Kopien/µl)	<b>QS</b>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rot	M. tuberculosis RG/TM QS 3 (3 x 10 <sup>2</sup> Kopien/µl)	<b>QS</b>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rot	M. tuberculosis RG/TM QS 4 (3 x 10 <sup>1</sup> Kopien/µl)	<b>QS</b>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Grün	M. tuberculosis RG IC <sup>‡</sup>	<b>IC</b>	1 x 1000 µl	2 x 1000 µl
Weiß	Wasser (PCR-Qualität)		1 x 1000 µl	1 x 1000 µl

\* Mg-Sol: Magnesiumlösung

† QS: Quantifizierungsstandard

‡ IC: Interne Kontrolle

## Erforderliche, nicht mitgelieferte Materialien

**Wichtig:** Stellen Sie sicher, dass die für diese Verfahren verwendeten Geräte gemäß den Herstellerempfehlungen geprüft und kalibriert wurden.

- Puderfreie Einmal-Laborhandschuhe
- QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, Katalognr. 51304)
- Lysozym-Mix (siehe Seite 10)
- Pipetten (verstellbar)
- Sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Vortex-Mischer
- Heizblock oder Thermomixer, der von 37 °C bis 95 °C temperiert werden kann
- Tischzentrifuge mit Rotor für 2-ml-Reaktionsgefäße
- Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q oder Rotor-Gene Thermocycler mit Fluoreszenzkanälen für **Cycling Green** und **Cycling Yellow** oder mit Fluoreszenzkanälen für **Cycling A.FAM** und **Cycling A.JOE**
- Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q Software-Version ab 1.7.94 (Rotor-Gene 6000 Software-Version 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94; Rotor-Gene 3000 Software-Version 6.0.23)
- Strip-Röhrchen und Deckel, 0,1 ml, zur Verwendung mit 72-well-Rotor (Kat.-Nr. 981103 oder 981106)
- Ersatzweise: PCR-Röhrchen, 0,2 ml, zur Verwendung mit 36-Well-Rotor (Katalognr. 981005 oder 981008)
- Kühlblock (Ladeblock 72 x 0,1-ml-Röhrchen, Kat.-Nr. 9018901, oder Ladeblock 96 x 0,2-ml-Röhrchen, Kat.-Nr. 9018905)

---

# Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

Folgendes sollte vom Anwender immer beachtet werden:

- Sterile Pipettenspitzen mit Filter verwenden.
- Positivmaterial (Proben, Kontrollen, Amplifikate) räumlich getrennt von den übrigen Reagenzien aufreinigen, lagern und zur Reaktion zusetzen.
- Alle Komponenten vor Testbeginn vollständig bei Raumtemperatur auftauen.
- Anschließend die Komponenten gründlich durchmischen und kurz zentrifugieren.
- Arbeiten Sie zügig und halten Sie die Komponenten auf Eis oder im Kühlblock (72/96-Well-Ladeblock).

## Warnungen

Sicherheitsinformationen zum *artus M. tuberculosis* RG PCR Kit entnehmen Sie bitte den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (SDB). Die SDB stehen online im praktischen, kompakten PDF-Format unter [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) zur Verfügung.

## Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Die Komponenten des *artus M. tuberculosis* RG PCR Kits sollten bei -15 bis -30°C gelagert werden – unter diesen Lagerbedingungen sind sie bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren (mehr als 2 mal) sollte vermieden werden, da dadurch die Sensitivität verringert wird. Bei unregelmäßigem Gebrauch sollten deshalb die Reagenzien aliquotiert werden. Die Reagenzien sollten nicht länger als 5 Stunden bei 2–8 °C gelagert werden.

# Durchführung

## Wichtige Hinweise vor Beginn

- Der Einsatz von Carrier-RNA ist für die Effizienz der Aufreinigung und damit für die DNA-/RNA-Ausbeute von entscheidender Bedeutung. Für die Aufreinigung von Nukleinsäuren aus zellfreien Körperflüssigkeiten und Material mit geringem DNA- und RNA-Gehalt (z. B. Liquor) wird die Zugabe von Carrier (RNA-Homopolymer Poly[rA], im QIAamp DNA Blood Mini Kit oder QIAamp DNA Mini Kit nicht enthalten) dringend empfohlen.
- Resuspendieren Sie lyophilisierte Carrier-RNA (RNA-Homopolymer Poly[rA], im QIAamp DNA Mini Kit nicht enthalten) mit dem Elutionspuffer (verwenden Sie nicht Lysepuffer) des Aufreinigungskits (Puffer AE des QIAamp DNA Mini Kits), und setzen Sie eine Verdünnung an mit einer Konzentration von 1 µg/µl. Aliquotieren Sie die Carrier-RNA-Lösung nach Bedarf und lagern Sie diese bei -15 bis -30 °C. Vermeiden Sie wiederholtes Auftauen (d. h. mehr als 2 mal) der aliquotierten Carrier-RNA.
- Verwenden Sie 1 µg Carrier-RNA auf 100 µl Lysepuffer. Wenn das Aufreinigungsprotokoll beispielsweise 200 µl Lysepuffer vorsieht, geben Sie 2 µl Carrier-RNA (1 µg/µl) unmittelbar zum Lysepuffer hinzu (Puffer AL des QIAamp DNA Mini Kits). Vor jeder Aufreinigung sollte eine Mischung aus Lysepuffer, Carrier-RNA und interner Kontrolle (siehe „Interne Kontrolle“ auf Seite 12) nach dem folgenden Pipettierschema frisch hergestellt werden:

Reagenz	Anzahl Proben	
	1	12
Puffer AL (Lysepuffer)	z. B. 200 µl	z. B. 2400 µl
Carrier-RNA (1 µg/µl)	2 µl	24 µl
Interne Kontrolle	10 µl	120 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>212 µl</b>	<b>2544 µl</b>
<b>Volumen pro Aufreinigung</b>	<b>200 µl</b>	<b>jeweils 200 µl</b>

- Verwenden Sie die zur Aufreinigung frisch angesetzte Mischung aus Lysepuffer, interner Kontrolle und Carrier-RNA **sofort**. Eine Lagerung der Mischung ist **nicht** möglich.
- Der *artus M. tuberculosis* RG PCR Kit sollte nicht mit auf Phenol basierenden Aufreinigungsverfahren verwendet werden.
- **Wichtig:** Die interne Kontrolle des *artus M. tuberculosis* RG PCR Kits kann bei der Aufreinigung direkt verwendet werden (siehe „Interne Kontrolle“ auf Seite 12).

## DNA-Isolierung

Vor der DNA-Isolierung müssen große Probenvolumina oder stark saure Proben zunächst konzentriert bzw. neutralisiert werden. Für die Analyse von Sputum empfehlen wir eine Dekontamination mit NALC-NaOH; Magenflüssigkeit sollte mit Phosphatpuffer neutralisiert werden. Nach einer abschließenden Zentrifugation kann das Bakterienpellet für die nachfolgende DNA-Isolierung verwendet werden.

Das QIAamp DNA Mini Kit (Katalognr. 51304) ist validiert für die Aufreinigung mykobakterieller DNA aus menschlichem Sputum, bronchoalveolärer Lavage (BAL), Bronchialsekreten, Liquor, Magenflüssigkeit oder Peritonealpunktion mit dem *artus M. tuberculosis* RG PCR Kit.

Um eine effektive und kontaminationsfreie Lyse der Mykobakterien zu gewährleisten, führen Sie Aufreinigung von DNA in den folgenden Schritten durch, die sich von den Protokollen im *QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook* unterscheiden.

**Wichtig:** Alle Pipettierschritte vor der Inkubation bei 95 °C müssen in einer Sicherheitswerkbank der Klasse II durchgeführt werden, da die Proben potenziell infektiös sind.

1. Überführen Sie zwischen 250 µl und 500 µl der mit NALC-NaOH dekontaminierten Probe in ein 1,5-ml-Schraubkappenröhrchen.
  - Die Verwendung von Schraubkappenröhrchen ist unbedingt erforderlich.
  - Die Röhrchen müssen stets mit der Schraubkappe fest verschlossen werden.
2. Zentrifugieren Sie 10 Minuten lang bei 17.000 x g (13.000 U/min) in einer Tischzentrifuge.
3. Verwerfen Sie vorsichtig den Überstand durch Pipettieren.
  - Berühren Sie nicht die Innenseite des Röhrchendeckels. Wenn dies doch geschieht, wechseln Sie sofort den möglicherweise kontaminierten Handschuh.
4. Fügen Sie 180 µl Lysozym-Mix (20 mg/ml Lysozym; 20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 2 mM EDTA; 1,2 % Triton™) hinzu und resuspendieren Sie das Pellet durch Auf- und Abpipettieren.
5. Mindestens 1 Stunde lang bei 37 °C in einem Heizblock oder Thermomixer inkubieren.
  - Es wird nicht empfohlen, ein Wasserbad zu verwenden.
6. Kurz zentrifugieren, um Tropfen von der Deckelinnenseite zu entfernen.
  - Zentrifugieren Sie nach jedem Inkubationsschritt die Röhrchen kurz, um Tropfen von der Deckelinnenseite zu entfernen.

7. Fügen Sie 20 µl Proteinase K und 200 µl AL Puffer mit Carrier-RNA und IC hinzu (siehe oben und unter „Interne Kontrolle“ auf Seite 12).
  - Berühren Sie nicht die Innenseite des Röhrchendeckels. Wenn dies doch geschieht, wechseln Sie sofort den möglicherweise kontaminierten Handschuh.
8. Auf einem Vortex-Mischer gut mischen.
9. 30 Minuten lang bei 56 °C in einem Heizblock oder Thermomixer inkubieren.
  - Es wird nicht empfohlen, ein Wasserbad zu verwenden.
10. Kurz zentrifugieren, um Tropfen von der Deckelinnenseite zu entfernen.
  - Zentrifugieren Sie nach jedem Inkubationsschritt die Röhrchen kurz, um Tropfen von der Deckelinnenseite zu entfernen.
11. 15 Minuten lang bei 95 °C inkubieren.

**Wichtig:** Die Inkubationszeit sollte nicht überschritten werden, da dies zu einem Abbau der DNA führen kann.
12. **Hinweis:** Erst nach Abschluss der Inkubation bei 95 °C sind die Proben nicht mehr infektiös. Lassen Sie die Probe auf Raumtemperatur abkühlen.
  - Stellen Sie sicher, dass die Proben nach dem Erhitzungsschritt bei 95 °C auf Raumtemperatur abkühlen, da sonst nach dem Öffnen des Röhrchens die Gefahr einer durch Aerosol vermittelten Kontamination äußerst hoch ist.
13. Kurz zentrifugieren, um Tropfen von der Deckelinnenseite zu entfernen.

Folgen Sie dem Protokoll „DNA Purification from Tissues“ (Aufreinigung von DNA aus Geweben) im *QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook* (Dritte Ausgabe, Juni 2012). Beginnen Sie dazu bei Schritt 6 mit der Zugabe von Ethanol und führen Sie die abschließenden DNA-Elution mit 100 µl Puffer AE durch.

- Achten Sie darauf, nicht den Rand einer QIAamp Spin Column zu benetzen.
- Berühren Sie nicht die Innenseite des Deckels einer QIAamp Spin Column. Wenn doch, wechseln Sie sofort den möglicherweise kontaminierten Handschuh.
- Verwenden Sie nicht dieselbe Pipettenspitze für verschiedene Proben, auch nicht um die Waschpuffer AW1 und AW2 oder den Elutionspuffer AE zu applizieren. Dadurch wird eine Kreuzkontamination zwischen den Proben und die Kontamination eines Puffers vermieden.
- Verwenden Sie jedes 2-ml-Sammelröhrchen nur einmal. Wenn Ihnen die Sammelröhrchen ausgehen, können Sie auch 2-ml-Mikrozentrifugenröhrchen verwenden, deren Deckel Sie vor der Verwendung entfernen müssen.

- Zur vollständigen Entfernung von Ethanol-Resten wird dringend empfohlen, die Zentrifugation in Schritt 10 des Protokolls durchzuführen. Ferner wird empfohlen, die Dauer dieser Zentrifugation auf 3 Minuten zu erhöhen.

## Interne Kontrolle

Eine interne Kontrolle (M. tuberculosis RG IC) wird mitgeliefert. Mit ihr kann sowohl das DNA-Isolierungsverfahren kontrolliert als auch die PCR auf mögliche Inhibition überprüft werden. Für diese Anwendung geben Sie die interne Kontrolle in einem Verhältnis von 0,1 µl pro 1 µl Elutionsvolumen zur Aufreinigung hinzu. Beispielsweise wird die DNA bei Verwendung des QIAamp DNA Mini Kits in 100 µl Puffer AE eluiert. Es sollten daher anfänglich 10 µl der internen Kontrolle zugesetzt werden. Das Volumen der internen Kontrolle ist abhängig vom Elutionsvolumen. Die Verwendung von 10 µl **gilt nur** für ein Elutionsvolumen von 100 µl (0,1 µl pro 1 µl Elutionsvolumen).

**Hinweis:** Die interne Kontrolle und Carrier-RNA (siehe „DNA-Isolierung“ auf Seite 10) dürfen nur zu der Mischung aus Lysepuffer und Probenmaterial oder direkt zum Lysepuffer zugesetzt werden.

Die interne Kontrolle darf nicht direkt zum Probenmaterial zugesetzt werden. Bei Zugabe zum Lysepuffer ist zu beachten, dass die Mischung aus interner Kontrolle und Lysepuffer/Carrier-RNA frisch hergestellt und sofort verwendet werden muss. Wird die Mischung bei Raumtemperatur oder bei 4 °C für nur wenige Stunden aufbewahrt, kann dies zu einem Versagen der internen Kontrolle und reduzierter Effizienz der Aufreinigung führen.

**Hinweis:** Geben Sie die interne Kontrolle und die Carrier-RNA nicht direkt zum Probenmaterial hinzu.

## Quantifizierung

Um eine Standardkurve auf Rotor-Gene Q Thermocyclern zu erstellen, setzen Sie bitte alle 4 Quantifizierungsstandards ein und definieren Sie diese im Dialogfeld „**Edit Samples**“ (Proben bearbeiten) als Standards mit den angegebenen Konzentrationen (siehe jeweiliges Gerätehandbuch).

Die wie oben beschrieben erstellte Standardkurve kann auch für nachfolgende Läufe verwendet werden, wenn mindestens ein Standard **einer** gegebenen Konzentration beim aktuellen Lauf verwendet wird. Dazu muss die zuvor erstellte Standardkurve importiert werden (siehe jeweiliges Gerätehandbuch). Dieses Quantifizierungsverfahren kann jedoch zu Ergebnisabweichungen aufgrund der Variabilität zwischen verschiedenen PCR-Läufen führen.

Um eine präzise Quantifizierung zu gewährleisten, wird dringend empfohlen, zu *M. tuberculosis* RG Master und *M. tuberculosis* RG Mg-Sol, die für die Quantifizierungsstandards verwendet werden, die interne Kontrolle hinzuzufügen. Für diese Anwendung geben Sie die interne Kontrolle direkt zu *M. tuberculosis* RG Master und *M. tuberculosis* RG Mg-Sol hinzu, wie in Arbeitsschritt 2b des Protokolls beschrieben (Seite 13), und verwenden Sie diese Master-Mix für jeden Quantifizierungsstandard (*M. tuberculosis* RG/TM QS 1–4).

Die Quantifizierungsstandards sind in Kopien/ $\mu$ l definiert. Zur Umrechnung der anhand der Standardkurve ermittelten Werte in Kopien/ml Probenmaterial muss die folgende Gleichung angewendet werden:

$$\text{Ergebnis (Kopien/ml)} = \frac{\text{Ergebnis (Kopien/\mu l)} \times \text{Elutionsvolumen (\mu l)}}{\text{Probenvolumen (ml)}}$$

Es sollte grundsätzlich das anfängliche Probenvolumen in die obige Gleichung eingesetzt werden. Das ist zu berücksichtigen, wenn das Probenvolumen vor der Nukleinsäure-Aufreinigung verändert worden ist (z. B. Einengung durch Zentrifugieren oder Erhöhung durch Auffüllen auf das für die Aufreinigung geforderte Volumen).

## PCR auf Rotor-Gene Q Thermocyclern

- Machen Sie sich vor Beginn des Protokolls mit dem Rotor-Gene Q Thermocycler vertraut. Konsultieren Sie hierzu das entsprechende Gerätehandbuch.
  - Achten Sie darauf, dass in jedem PCR-Lauf mindestens ein Quantifizierungsstandard und eine Negativkontrolle (Wasser, PCR-Qualität) mitgeführt werden. Zur Erstellung einer Standardkurve verwenden Sie bei jedem PCR-Lauf alle 4 mitgelieferten Quantifizierungsstandards (*M. tuberculosis* RG/TM QS 1-4).
  - Achten Sie darauf, dass der Kühlblock (Zubehör zum Rotor-Gene Q Thermocycler) auf 2 bis 8 °C vorgekühlt ist.
  - Alle Reagenzien sollten vor Testbeginn vollständig bei Raumtemperatur aufgetaut, gut durchmischt (mehrfaches Auf- und Abpipettieren oder kurzes Vortex-Mischen) und anschließend anzentrifugiert werden.
1. Setzen Sie die gewünschte Anzahl PCR-Röhrchen in die Adapter des Kühlblocks ein.
  2. Bereiten Sie einen Master-Mix gemäß der folgenden Tabelle vor:

	Anzahl Proben	
	1	12
M. tuberculosis RG Master	13 µl	156 µl
M. tuberculosis RG Mg-Sol	2 µl	24 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>15 µl</b>	<b>180 µl</b>

3. Pipettieren Sie 15 µl der Master-Mischung in jedes PCR-Röhrchen. Geben Sie dann 10 µl eluierte Proben-DNA hinzu (siehe Tabelle weiter unten).

Dementsprechend müssen 10 µl mindestens eines der Quantifizierungsstandards (M. tuberculosis RG QS 1-4) als eine Positivkontrolle und 10 µl Wasser (Wasser, PCR-Qualität) als eine Negativkontrolle verwendet werden.

	Anzahl Proben	
	1	12
Master Mix (Master-Mischung)	15 µl	je 15 µl
Probe	10 µl	je 10 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25 µl</b>	<b>je 25 µl</b>

4. Verschließen Sie die PCR-Röhrchen.
5. Setzen Sie unbedingt den Schließring (Locking Ring, Zubehör des Rotor-Gene Thermocyclers) auf den Rotor, um ein unbeabsichtigtes Öffnen der Reaktionsgefäße während des Laufs zu verhindern.
6. Erstellen Sie zum Nachweis aller Mitglieder des *M. tuberculosis*-Komplex ein Temperaturprofil gemäß den folgenden Arbeitsschritten.

<b>Einstellen allgemeiner Assay-Parameter</b>	<b>Abbildungen 1, 2 und 3</b>
<b>Initiale Aktivierung des Hot-Start-Enzyms</b>	<b>Abbildung 4</b>
<b>Amplifikation der DNA</b>	<b>Abbildung 5</b>
<b>Einstellen der Sensitivität der Fluoreszenzkanäle</b>	<b>Abbildung 6</b>
<b>Starten des Laufs</b>	<b>Abbildung 7</b>

Alle Angaben beziehen sich auf die Rotor-Gene Q MDx/ Rotor-Gene Q Software-Version 1.7.94, Rotor-Gene 6000 Software-Versionen 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94 und Rotor-Gene 3000 Software-Version 6.0.23. Einzelheiten zur Programmierung des Rotor-Gene Thermocyclers entnehmen Sie bitte dem jeweiligen Anwenderhandbuch.

Die jeweiligen Einstellungen sind in den Abbildungen durch schwarze Rahmen hervorgehoben. Es sind Abbildungen auch zu Rotor-Gene Q Thermocyclern enthalten. Wo für den Rotor-Gene 3000 abweichende Werte erforderlich sind, ist dies im Text beschrieben.

7. Öffnen Sie zunächst das Dialogfeld **New Run Wizard** (Assistent für neuen Lauf) (Abb. 1). Markieren Sie das Kontrollkästchen **Locking Ring Attached** (Schließring angebracht) und klicken Sie dann auf **Next** (Weiter).

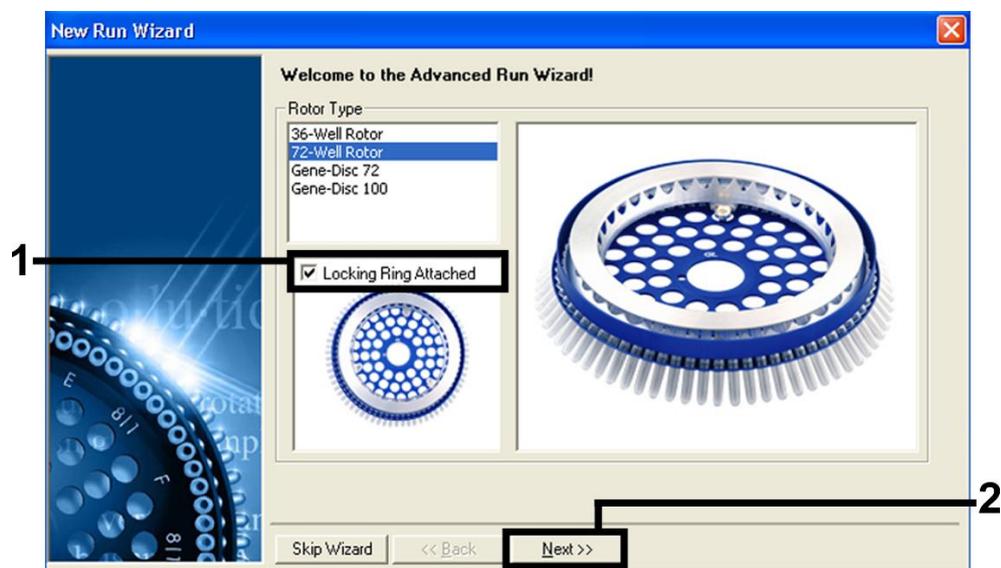


Abbildung 1. Das Dialogfeld „New Run Wizard“ (Assistent für neuen Lauf).

8. Wählen Sie als Volumen der PCR-Reaktion **25** und klicken Sie auf **Next** (Abb. 2).

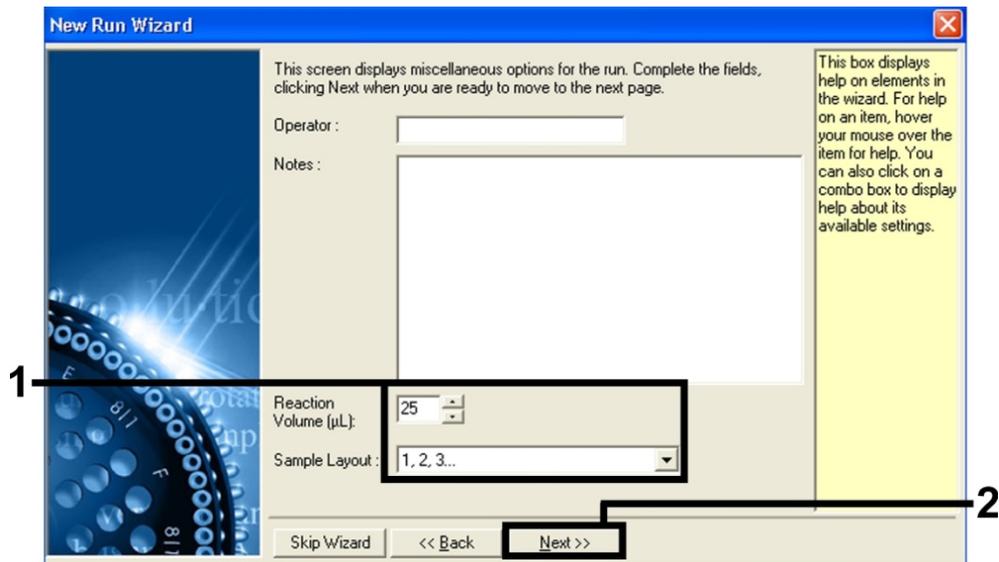


Abbildung 2. Einstellen allgemeiner Assay-Parameter.

9. Klicken Sie im nächsten Dialogfeld **New Run Wizard** (Abb. 3) auf die Schaltfläche **Edit Profile** (Profil bearbeiten) und programmieren Sie das Temperaturprofil wie in Abb. 4 und 5 gezeigt.

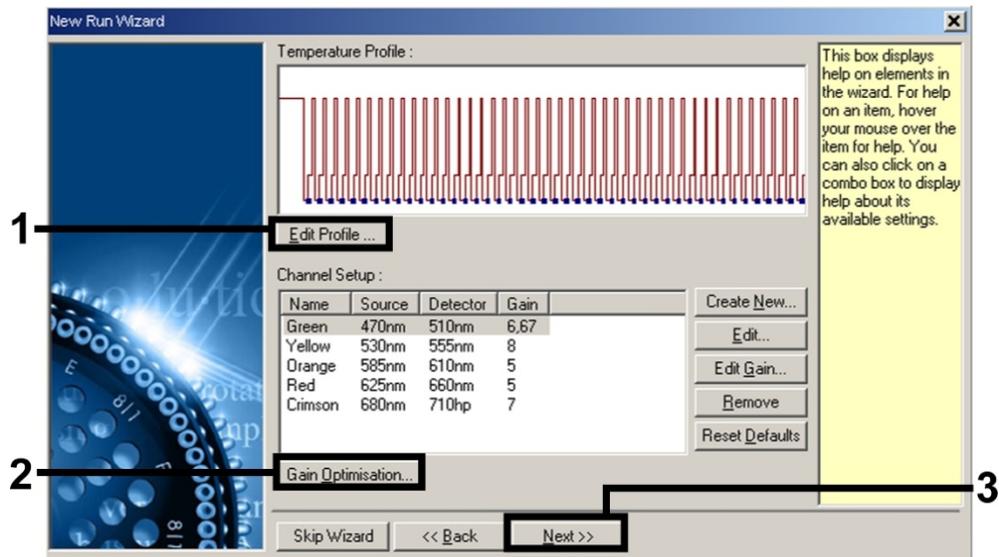


Abbildung 3. Bearbeiten des Profils.

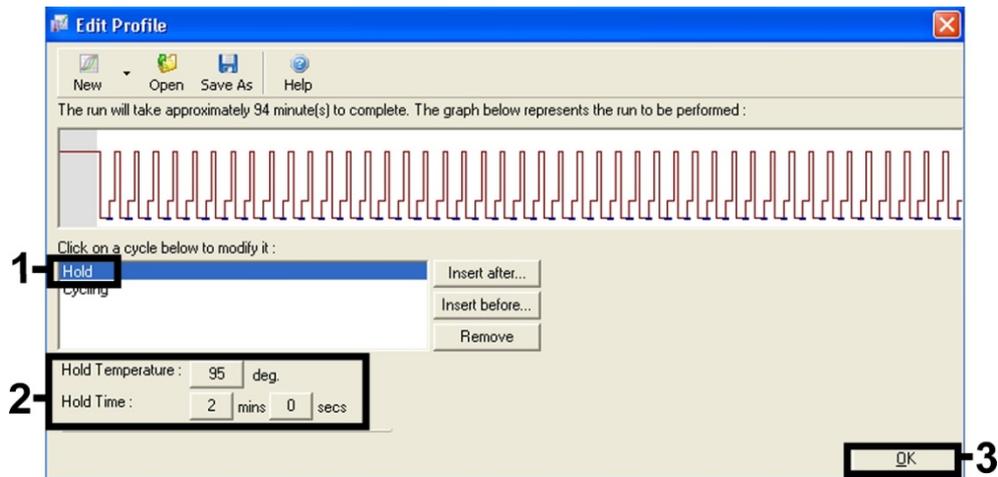


Abbildung 4. Initiale Aktivierung des Hot-Start-Enzyms.

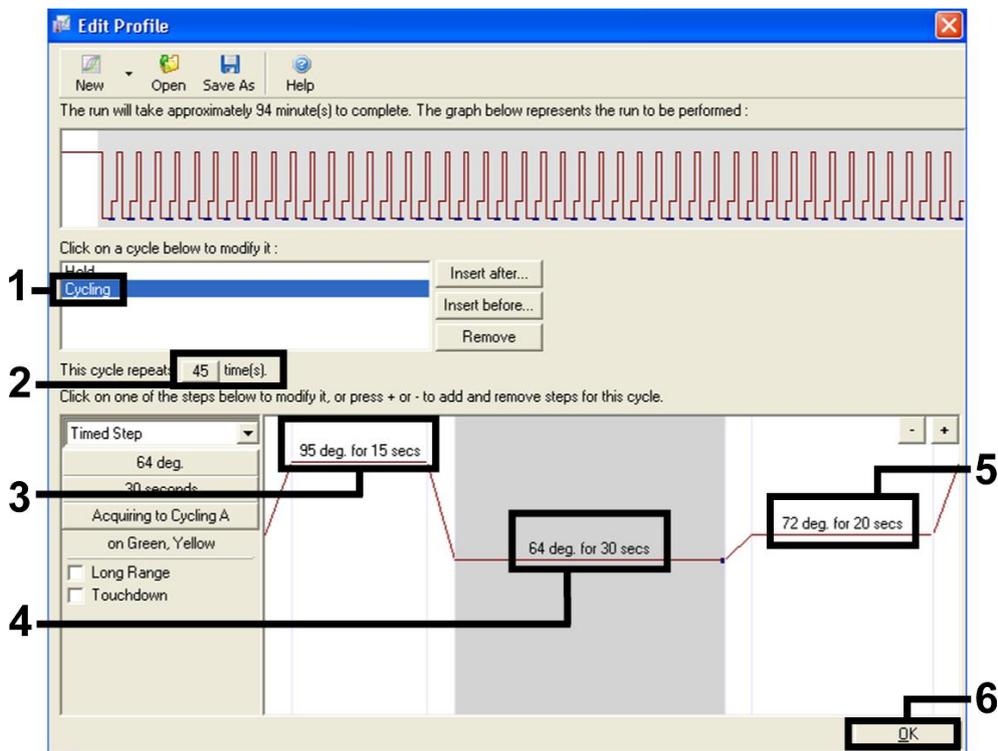


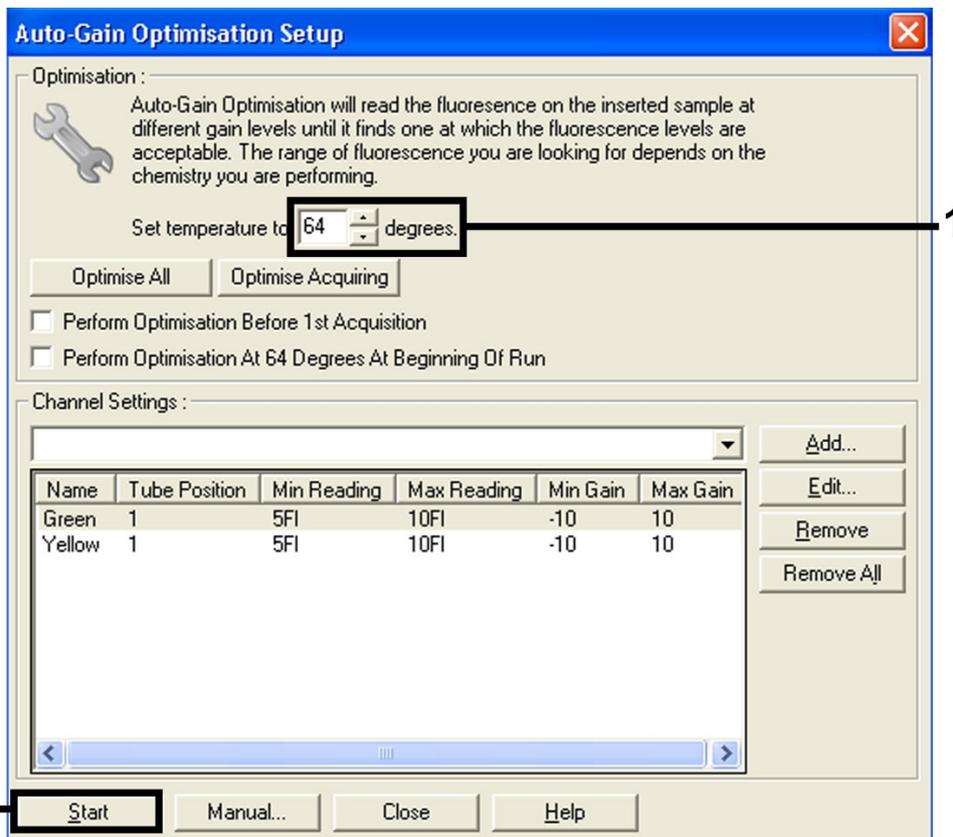
Abbildung 5. Amplifikation der DNA.

**Hinweis:** Die Software auf dem Rotor-Gene 3000 Thermocycler definiert die Fluoreszenzfarbstoffe als **FAM/Sybr®**, **JOE**.

10. Der Messbereich der Fluoreszenzkanäle muss auf die Fluoreszenzintensitäten in den PCR-Röhrchen abgestimmt werden. Klicken Sie im Dialogfeld **New Run Wizard** (siehe Abb. 3) auf

**Gain Optimisation** (Optimierung der Verstärkung), um das Dialogfeld **Auto-Gain Optimisation Setup** (Einrichten der Optimierung der automatischen Verstärkung) zu öffnen.

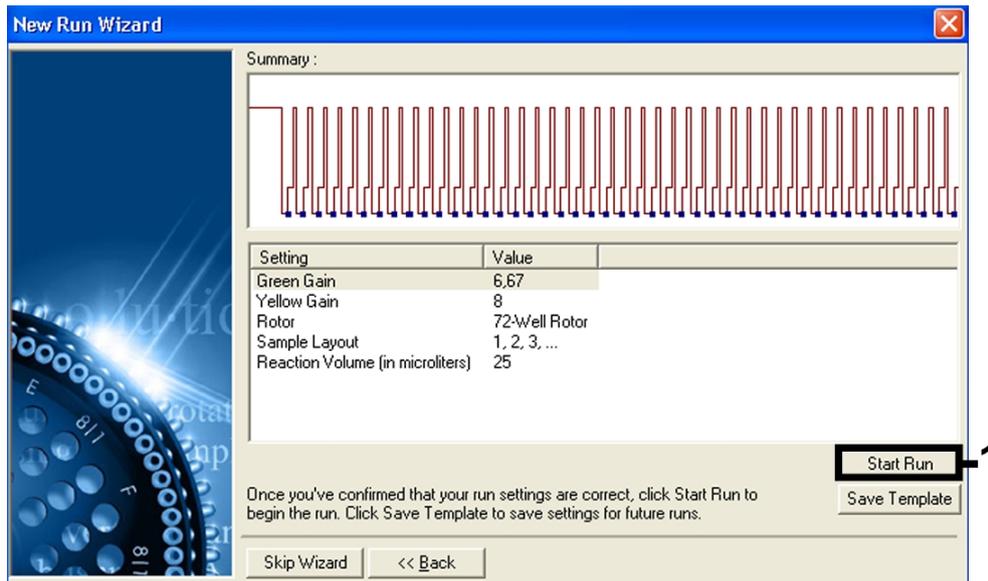
11. Stellen Sie die Kalibriertemperatur auf **64**, damit sie der Annealing-Temperatur des Amplifikationsprogramms entspricht (Abb. 6).



**Abbildung 6. Einstellen der Sensitivität der Fluoreszenzkanäle.**

**Hinweis:** Die Software auf dem Rotor-Gene 3000 Thermocycler definiert die Fluoreszenzfarbstoffe als **FAM/Sybr** und **JOE**.

12. Die bei der Kalibrierung der Kanäle ermittelten Verstärkungswerte werden automatisch gespeichert und im letzten Menüfenster des Programmierverfahrens aufgeführt (Abb. 7). Klicken Sie auf **Start Run** (Lauf starten).



**Abbildung 7. Starten des Laufs.**

**Hinweis:** Die Software auf dem Rotor-Gene 3000 Thermocycler definiert die Fluoreszenzfarbstoffe als **FAM/Sybr** und **JOE**.

13. Werten Sie nach Abschluss des Laufs die Daten entsprechend „Interpretation der Ergebnisse“ auf Seite 20 aus.

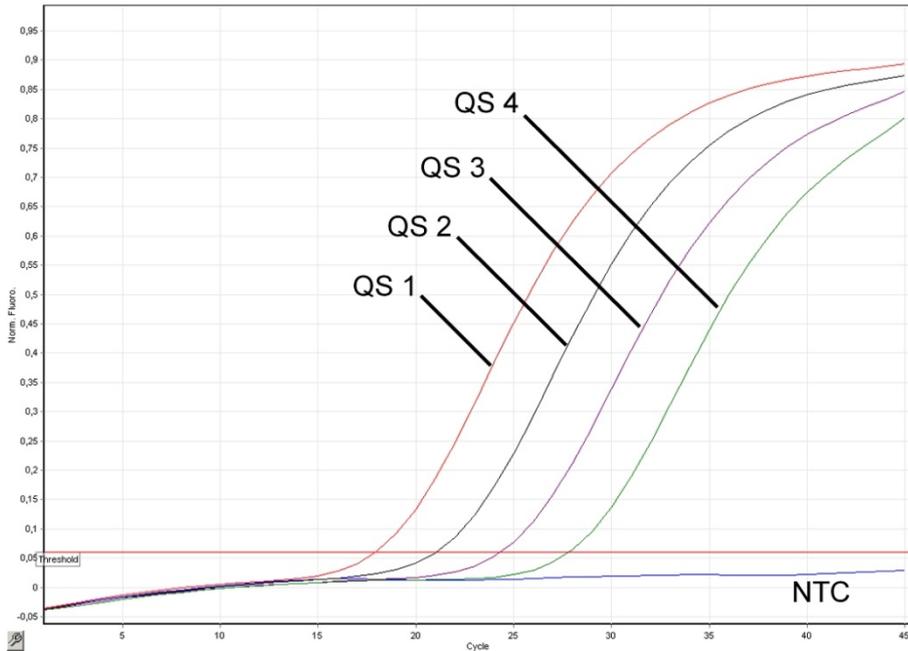
# Interpretation der Ergebnisse

Beispiele für PCR-Reaktionen mit positiven und negativen Ergebnissen sind in Abbildung 8 und Abbildung 9 gezeigt.

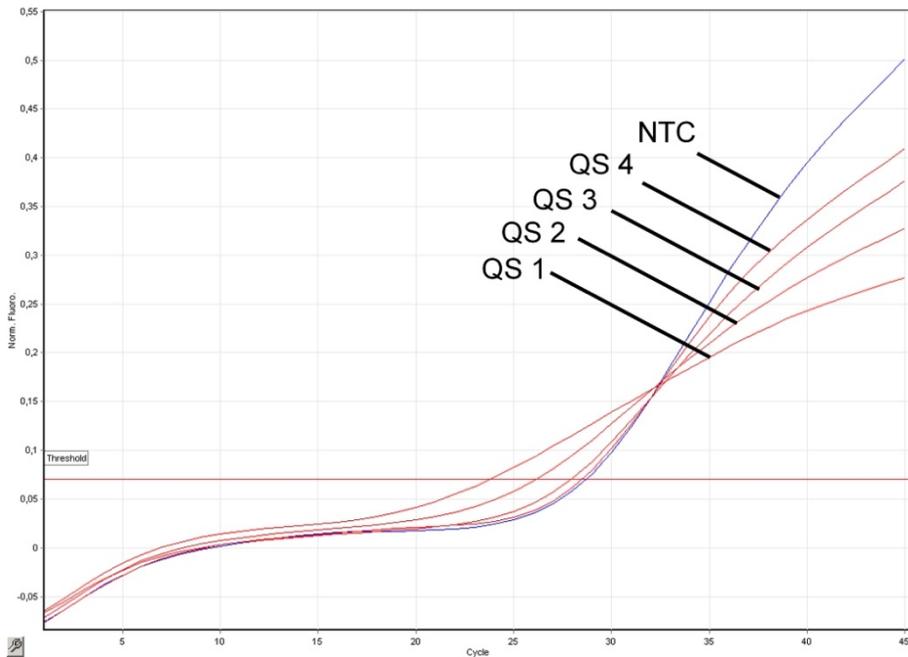
Folgende Ergebnisse sind möglich:

- Im Fluoreszenzkanal **Cycling Green** wird ein Signal detektiert.  
Das Ergebnis der Auswertung ist positiv. Die Probe enthält DNA eines oder mehrere Mitglieder des *M. tuberculosis*-Komplexes.  
In diesem Fall ist die Detektion eines Signals im Kanal **Cycling Yellow** unmaßgeblich, da eine hohe Ausgangskonzentration des *M. tuberculosis*-Komplexes (positives Signal im Kanal **Cycling Green**) zu einem abgeschwächten oder ausbleibenden Fluoreszenzsignal der internen Kontrolle im Kanal **Cycling Yellow** führen kann (Kompetition).  
**Hinweis:** Auf dem Rotor-Gene 3000 Thermocycler sind die relevanten Kanäle **Cycling A.FAM** für das positive Signal und **Cycling A.JOE** für die interne Kontrolle.
- Im Fluoreszenzkanal **Cycling Green** wird kein Signal detektiert. Gleichzeitig erscheint ein Signal von der internen Kontrolle im Kanal **Cycling Yellow**.  
In der Probe ist keine DNA von Mitgliedern des *M. tuberculosis*-Komplexes nachweisbar. Sie kann daher als negativ angesehen werden.  
Bei negativer PCR des *M. tuberculosis*-Komplexes schließt das detektierte Signal der internen Kontrolle die Möglichkeit aus, dass die PCR inhibiert wurde.  
**Hinweis:** Auf dem Rotor-Gene 3000 Thermocycler sind die relevanten Kanäle **Cycling A.JOE** für die interne Kontrolle und **Cycling A.FAM** für das Fehlen eines Signals.
- Weder im Kanal **Cycling Green** noch im Kanal **Cycling Yellow** wird ein Signal detektiert.  
Eine Aussage zum Ergebnis ist nicht möglich.  
**Hinweis:** Auf dem Rotor-Gene 3000 Thermocycler sind die relevanten Kanäle **Cycling A.FAM** und **Cycling A.JOE**.

Informationen zu Fehlerquellen und deren Beseitigung finden Sie unter „Hilfe zur Fehlersuche“ auf Seite 22.



**Abbildung 8. Nachweis der Quantifizierungsstandards (*M. tuberculosis* RG/TM QS 1-4) im Fluoreszenzkanal Cycling Green.** NTC: Non-Template Control (Negativkontrolle).



**Abbildung 9. Detektion der internen Kontrolle im Fluoreszenzkanal Cycling Yellow bei gleichzeitiger Amplifikation der Quantifizierungsstandards (*M. tuberculosis* RG/TM QS 1-4).** NTC: Non-Template Control (Negativkontrolle).

## Hilfe zur Fehlersuche

In diesem Kapitel finden Sie nützliche Hinweise, die Ihnen bei der Lösung eventuell auftretender Probleme helfen können.

### Kommentare und Vorschläge

---

#### **Kein Signal bei den Positivkontrollen (*M. tuberculosis* RG/TM QS 1-4) im Fluoreszenzkanal Cycling Green oder Cycling A.FAM**

- |   |  |
|---|--|
| a) Der gewählte Fluoreszenzkanal für die PCR-Datenanalyse entspricht nicht dem Protokoll            | Wählen Sie bei der Datenanalyse den Fluoreszenzkanal <b>Cycling Green</b> oder <b>Cycling A.FAM</b> für die analytische PCR des <i>M. tuberculosis</i> -Komplexes und den Fluoreszenzkanal <b>Cycling Yellow</b> oder <b>Cycling A.JOE</b> für die PCR der internen Kontrolle aus. |
| b) Programmierung des Temperaturprofils für den Rotor-Gene ist nicht korrekt                        | Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit dem Protokoll (siehe „PCR auf Rotor-Gene Q Thermocyclern“ auf Seite 13).  |
| c) Fehlerhaftes Zusammenstellen der PCR-Reaktion  | Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte mit Hilfe des Pipettierschemas (siehe „PCR auf Rotor-Gene Q Thermocyclern“, Seite 13) und wiederholen Sie ggf. die PCR.  |
| d) Die Lagerbedingungen einer oder mehrerer Komponenten des Kits entsprachen nicht den Anweisungen. | Überprüfen Sie sowohl die Lagerbedingungen (siehe „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ auf Seite 8) als auch das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Etikett des Kits) und verwenden Sie gegebenenfalls einen neuen Kit.   |
| e) Das Verfallsdatum des <i>artus M. tuberculosis</i> RG PCR Kits ist abgelaufen.                   | Überprüfen Sie sowohl die Lagerbedingungen (siehe „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ auf Seite 8) als auch das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Etikett des Kits) und verwenden Sie gegebenenfalls einen neuen Kit.   |

#### **Schwaches oder ausbleibendes Signal der internen Kontrolle im Fluoreszenzkanal Cycling Yellow oder Cycling A.JOE bei gleichzeitiger Abwesenheit eines Signals im Kanal Cycling Green oder Cycling A.FAM für die spezifische PCR des *M. tuberculosis*-Komplexes**

### Kommentare und Vorschläge

- |   |  |
|---|--|
| a) Die PCR-Bedingungen entsprechen nicht dem Protokoll  | Überprüfen Sie die Bedingungen der PCR (siehe „Kein Signal bei den Positivkontrollen [M. tuberculosis RG/TM QS 1-4] im Fluoreszenzkanal Cycling Green oder Cycling A.FAM“ weiter oben) und wiederholen Sie gegebenenfalls die PCR mit korrigierten Einstellungen.  |
| b) Die PCR-Reaktion wurde inhibiert   | Verwenden Sie unbedingt ein empfohlenes Aufreinigungsverfahren (siehe „DNA-Isolierung“ auf Seite 10) und halten Sie sich exakt an die Anweisungen des Herstellers.<br><br>Vergewissern Sie sich, dass bei der DNA-Aufreinigung der zusätzliche empfohlene Zentrifugationsschritt zur vollständigen Entfernung von Ethanol-Resten vor der Elution durchgeführt wurde (siehe „DNA-Isolierung“ auf Seite 10). |
| c) DNA ging bei der Aufreinigung verloren   | Sollte die Interne Kontrolle zur Aufreinigung zugegeben worden sein, kann ein Ausbleiben des Signals der Internen Kontrolle den Verlust der DNA bei der Aufreinigung bedeuten. Verwenden Sie unbedingt ein empfohlenes Aufreinigungsverfahren (siehe „DNA-Isolierung“ auf Seite 10) und halten Sie sich exakt an die Anweisungen des Herstellers.  |
| d) Die Lagerbedingungen einer oder mehrerer Komponenten des Kits entsprachen nicht den Anweisungen. | Überprüfen Sie sowohl die Lagerbedingungen (siehe „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ auf Seite 8) als auch das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Etikett des Kits) und verwenden Sie gegebenenfalls einen neuen Kit.   |
| e) Das Verfallsdatum des <i>artus</i> M. tuberculosis RG PCR Kits ist abgelaufen                    | Überprüfen Sie sowohl die Lagerbedingungen (siehe „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ auf Seite 8) als auch das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Etikett des Kits) und verwenden Sie gegebenenfalls einen neuen Kit.   |

## Kommentare und Vorschläge

---

### Signale bei den Negativkontrollen im Fluoreszenzkanal Cycling Green oder Cycling A.FAM der analytischen PCR

a) Kontamination bei Vorbereitung der PCR      Wiederholen Sie die PCR mit Replikaten mit noch unbenutzten Reagenzien.

Verschließen Sie die einzelnen PCR-Gefäße nach Möglichkeit jeweils direkt nach Zugabe der zu untersuchenden Probe.

Pipettieren Sie die Positivkontrollen grundsätzlich zuletzt.

Achten Sie darauf, dass Arbeitsflächen und Geräte regelmäßig dekontaminiert werden.

b) Bei der Aufreinigung trat Kontamination auf.      Wiederholen Sie Aufreinigung und PCR der zu untersuchenden Proben unter Verwendung noch unbenutzter Reagenzien.

Achten Sie darauf, dass Arbeitsflächen und Geräte regelmäßig dekontaminiert werden.

Sollten weitere Fragen oder Probleme auftreten, kontaktieren Sie den Technischen Service bei QIAGEN.

## Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagementsystem von QIAGEN wird jede Charge des *artus M. tuberculosis* RG PCR Kits nach festgelegten Prüfkriterien getestet, um eine einheitliche Produktqualität sicherzustellen.

## Anwendungseinschränkungen

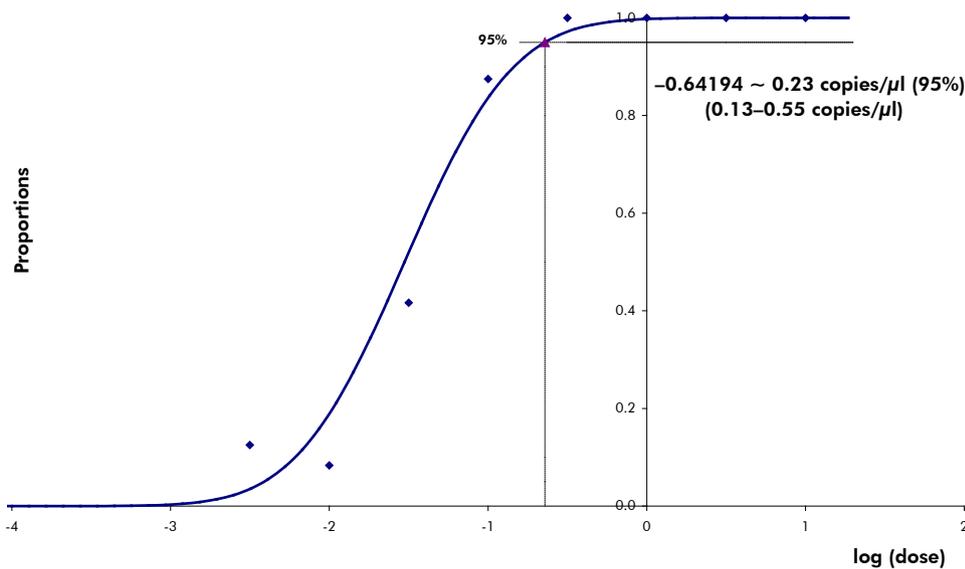
- Alle Reagenzien dürfen ausschließlich zur In-vitro-Diagnostik verwendet werden.
- Die Anwendung sollte durch Personal erfolgen, das speziell in In-vitro-Diagnostika-Verfahren unterrichtet und ausgebildet wurde.

- 
- Die genaue Einhaltung der Anweisungen des Benutzerhandbuchs ist erforderlich, um optimale PCR-Ergebnisse zu erhalten.
  - Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten sind zu beachten. Abgelaufene Reagenzien dürfen nicht benutzt werden.
  - Selten auftretende Mutationen innerhalb der von den Primern und/oder der Sonde des Kits abgedeckten hochkonservierten Bereichen des Bakteriengenoms können, wenn sie vorliegen, zu einer Unterbestimmung führen oder dazu, dass die Anwesenheit von Bakterien nicht detektiert wird. Validität und Leistung des Tests werden regelmäßig evaluiert, um bei Bedarf Veränderungen vornehmen zu können.

# Leistungsmerkmale

## Analytische Sensitivität

Zum Bestimmen der analytischen Sensitivität des *artus M. tuberculosis* RG PCR Kits wurde eine Verdünnungsreihe von 10 bis nominal 0,003 und von 10 bis nominal 0,05 *M. tuberculosis*-Genomäquivalenten/ $\mu\text{l}$  angesetzt und mit dem *artus M. tuberculosis* RG PCR Kit auf dem Rotor-Gene 6000 bzw. dem Rotor-Gene 3000 Thermocycler analysiert. Die Untersuchungen wurden an drei verschiedenen Tagen in Form von Achtfach-Bestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mittels Probit-Analyse bestimmt. Abbildung 10 zeigt eine grafische Darstellung der Probit-Analyse auf dem Rotor-Gene 6000 Thermocycler. Die analytische Nachweisgrenze des *artus M. tuberculosis* RG PCR Kits in Kombination mit dem RotorGene Q MDx/Q/6000 und dem Rotor-Gene 3000 Thermocycler beträgt 0,23 Kopien/ $\mu\text{l}$  ( $p = 0,05$ ) bzw. 0,9 Kopien/ $\mu\text{l}$  ( $p = 0,05$ ). Dies bedeutet, dass 0,23 Kopien/ $\mu\text{l}$  oder 0,9 Kopien/ $\mu\text{l}$  mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % nachgewiesen werden können.



**Abbildung 10. Probit-Analyse: *M. tuberculosis* (Rotor-Gene 6000).** Analytische Sensitivität des *artus M. tuberculosis* RG PCR Kits auf dem Rotor-Gene 6000 Thermocycler.

## Spezifität

Die Spezifität des *artus M. tuberculosis* RG PCR Kits wird in erster Linie durch die Auswahl der Primer und Sonden sowie die Wahl stringenter Reaktionsbedingungen gewährleistet. Die Primer und Sonden sind anhand einer Sequenzvergleichsanalyse auf eventuelle Homologien zu allen in Genbanken publizierten Sequenzen überprüft worden. So wurde die Nachweisbarkeit aller Mitglieder des *M. tuberculosis*-Komplex gesichert.

Die Validierung der Spezifität erfolgte zudem an 90 verschiedenen *M. tuberculosis*-Komplex-negativen Proben (jeweils 30 Sputum-, 30 BAL- und 30 Bronchialsekretproben). Bei diesen wurde mit den *M. tuberculosis*-Komplex-spezifischen Primern und Sonden, die im *M. tuberculosis* RG Master enthalten sind, kein Signal erzeugt.

Zur Bestimmung der Spezifität des *artus M. tuberculosis* RG PCR Kits wurde die in Tabelle 1 aufgeführte Kontrollgruppe auf eine Kreuzreaktivität untersucht. Bei keinem der getesteten Erreger trat eine Reaktion auf.

**Tabelle 1. Spezifitätstest des Kits mit potenziell kreuzreaktiven Pathogenen**

<b>Kontrollgruppe</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> (Cycling Green oder Cycling A.FAM)</b>	<b>Interne Kontrolle (Cycling Yellow oder Cycling A. JOE)</b>
<i>Actinomyces israelii</i>	–	+
<i>Aeromonas hydrophila</i>	–	+
<i>Bordetella pertussis</i>	–	+
<i>Candida albicans</i>	–	+
<i>Chlamydia trachomatis</i>	–	+
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	–	+
<i>Citrobacter freundii</i>	–	+
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	–	+
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	–	+
<i>Cryptococcus neoformans</i>	–	+
<i>Eikenella corrodens</i>	–	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	–	+

<b>Kontrollgruppe</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> (Cycling Green oder Cycling A.FAM)</b>	<b>Interne Kontrolle (Cycling Yellow oder Cycling A. JOE)</b>
<i>Enterobacter cloacae</i>	–	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	–	+
<i>Enterococcus faecium</i>	–	+
<i>Escherichia coli</i>	–	+
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp. <i>polymorphum</i>	–	+
<i>Haemophilus influenzae</i>	–	+
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	–	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	–	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	–	+
<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>avium</i>	–	+
<i>Mycobacterium celatum</i>	–	+
<i>Mycobacterium chelonae</i>	–	+
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	–	+
<i>Mycobacterium goodii</i>	–	+
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	–	+
<i>Mycobacterium kansasii</i>	–	+
<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	–	+
<i>Mycobacterium malmoense</i>	–	+
<i>Mycobacterium marinum</i>	–	+
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	–	+
<i>Mycobacterium szulgai</i>	–	+
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	–	+
<i>Mycobacterium xenopi</i>	–	+
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	–	+
<i>Neisseria meningitidis</i>	–	+

<b>Kontrollgruppe</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> (Cycling Green oder Cycling A.FAM)</b>	<b>Interne Kontrolle (Cycling Yellow oder Cycling A. JOE)</b>
<i>Nocardia asteroides</i>	–	+
<i>Nocardia brasiliensis</i>	–	+
<i>Nocardia farcinia</i>	–	+
<i>Nocardia oitidiscaviarum</i>	–	+
<i>Peptostreptococcus productus</i>	–	+
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	–	+
<i>Prevotella denticola</i>	–	+
<i>Propionibacterium acnes</i>	–	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	+
<i>Salmonella enteritidis</i>	–	+
<i>Salmonella typhi</i>	–	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	–	+
<i>Streptococcus agalactiae</i>	–	+
<i>Streptococcus pyogenes</i>	–	+
<i>Streptococcus mutans</i>	–	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	–	+
<i>Streptomyces venezuelae</i>	–	+
<i>Veillonella parvula</i>	–	+
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	–	+

## Präzision

Die Präzisionsdaten des *artus M. tuberculosis* RG PCR Kits wurden mit Rotor-Gene Thermocyclern erhoben und ermöglichen die Bestimmung der Totalvarianz (Gesamtstreuung) des Testsystems.

Diese Totalvarianz setzt sich zusammen aus der Intra-Assay-Variabilität (Streuung von Proben derselben Konzentration innerhalb eines Versuchsansatzes), der Inter-Assay-Variabilität (Streuung bei Anwendung durch verschiedene Personen innerhalb eines Labors unter Benutzung verschiedener Geräte gleichen Typs) und der Chargenvariabilität (Streuung bei Verwendung unterschiedlicher Chargen). Aus den erhaltenen Daten wurden jeweils die Standardabweichung, die Varianz und der Variationskoeffizient sowohl für die erregerspezifische PCR als auch für die PCR der internen Kontrolle berechnet.

Präzisionsdaten des *artus M. tuberculosis* RG PCR Kits wurden anhand des Quantifizierungsstandards mit der geringsten Konzentration (QS 4; 30 Kopien/ $\mu$ l) ermittelt. Die Tests wurden in Form von Achtfach-Bestimmungen durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse wurde anhand der  $C_T$ -Werte der Amplifikationskurven ( $C_T$ : Threshold Cycle, siehe Tabelle 2) vorgenommen. Zusätzlich wurden auch die Präzisionsdaten der quantitativen Werte in Kopien/ $\mu$ l mittels der entsprechenden  $C_T$ -Werte ermittelt (siehe Tabelle 3). Demnach beträgt die Gesamtstreuung einer beliebigen Probe der genannten Konzentration 1,26 % ( $C_T$ ) oder 14,64 % (Kopien/ $\mu$ l) und für den Nachweis der internen Kontrolle 1,57 % ( $C_T$ ). Diese Werte basieren auf der Gesamtheit aller Einzelwerte der ermittelten Variabilitäten.

**Tabelle 2. Präzision auf Grundlage der  $C_T$ -Werte**

	Standardabweichung	Varianz	Variationskoeffizient (%)
Intra-Assay-Variabilität: M. tuberculosis RG/TM QS 4	0,10	0,01	0,32
Intra-Assay-Variabilität: Interne Kontrolle	0,13	0,02	0,45
Inter-Assay-Variabilität: M. tuberculosis RG/TM QS 4	0,24	0,06	0,78
Inter-Assay-Variabilität: Interne Kontrolle	0,29	0,08	0,95
Chargenvariabilität: M. tuberculosis RG/TM QS 4	0,39	0,15	1,28
Chargenvariabilität: Interne Kontrolle	0,66	0,43	2,16
Totalvarianz: M. tuberculosis RG/TM QS 4	0,38	0,15	1,26

	Standardabweichung	Varianz	Variationskoeffizient (%)
Totalvarianz:			
Interne Kontrolle	0,48	0,23	1,57

**Tabelle 3. Präzisionsdaten auf Grundlage der quantitativen Werte (in Kopien/µl)**

	Standardabweichung	Varianz	Variationskoeffizient (%)
Intra-Assay-Variabilität:			
M. tuberculosis RG/TM QS 4	1,97	3,90	6,56
Inter-Assay-Variabilität:			
M. tuberculosis RG/TM QS 4	3,93	15,43	13,00
Chargenvariabilität:			
M. tuberculosis RG/TM QS 4	5,51	30,41	18,09
Totalvarianz:			
M. tuberculosis RG/TM QS 4	4,44	19,69	14,64

## Robustheit

Die Überprüfung der Robustheit dient der Ermittlung der Gesamtausfallrate des *artus* M. tuberculosis RG PCR Kits. Hierzu wurden insgesamt 30 *M. tuberculosis*-Komplex-negative Sputum-, BAL- und Bronchialsekretproben mit je 3 Kopien/µl Elutionsvolumen an *M. tuberculosis*-Kontroll-DNA (ca. dreifache Konzentration der analytischen Sensitivitätsgrenze) dotiert. Nach der Aufreinigung mit dem QIAamp DNA Mini Kit (siehe „DNA-Isolierung“ auf Seite 10) wurden diese Proben mit dem *artus* M. tuberculosis RG PCR Kit analysiert. Die Ausfallrate bei allen *M. tuberculosis*-Proben betrug 0 %. Die Robustheit der internen Kontrolle wurde zusätzlich durch die Aufreinigung und Analyse von *M. tuberculosis*-Komplex-negativen Sputum-, BAL- und Bronchialsekretproben überprüft (jeweils 30). Die Gesamtausfallrate betrug 0%. Eine Inhibition wurde nicht festgestellt. Die Robustheit des *artus* M. tuberculosis RG PCR Kits liegt also bei  $\geq 99$  %.

---

## Reproduzierbarkeit

Die Daten zur Reproduzierbarkeit erlauben eine regelmäßige Leistungsbewertung des *artus M. tuberculosis* RG PCR Kits sowie einen Effizienzvergleich mit anderen Produkten. Diese Daten werden durch die Teilnahme an etablierten Ringversuchsprogrammen erhoben.

## Literatur

1. Mackay I.M. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. **10**, 190.

## Symbole

Symbol	Symboldefinition
	Verfallsdatum
	Chargennummer
	Hersteller
	Katalognummer
	Materialnummer
	CE-Kennzeichen für europäische Konformität
	In-vitro-Diagnostikum
	Inhalt ausreichend für <N> Assays

Symbol	Symboldefinition
<b>COMP</b>	Komponenten
<b>CONT</b>	Enthält
<b>NUM</b>	Anzahl
<b>GTIN</b>	Internationale Artikelnummer
	Zulässiger Temperaturbereich
<b>QS</b>	Quantifizierungsstandard
<b>IC</b>	Interne Kontrolle
<b>Mg-Sol</b>	Magnesiumlösung

## Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Katalognr.
artus M. tuberculosis RG PCR Kit (24)	Für 24 Reaktionen: Master, Magnesiumlösung, 4 Quantifizierungsstandards, interne Kontrolle, Wasser (PCR-Qualität)	4555263
artus M. tuberculosis RG PCR Kit (96)	Für 96 Reaktionen: Master, Magnesiumlösung, 4 Quantifizierungsstandards, interne Kontrolle, Wasser (PCR-Qualität)	4555265
<b>QIAamp DNA Mini Kit – zur Aufreinigung genomischer, mitochondrialer, bakterieller, parasitärer und viraler DNA</b>		
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Für 50 DNA-Präparationen: 50 QIAamp Mini Spin Columns, QIAGEN Proteinase K, Reagenzien, Puffer, Sammelröhrchen (2 ml)	51304
<b>Rotor-Gene Q MDx und Zubehör</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Echtzeit-PCR-Cycler mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), Laptop-Computer, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, ohne Installation und Schulung	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Echtzeit-PCR-Cycler mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), Laptop-Computer, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation und Schulung	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Echtzeit-PCR-Cycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, ohne Installation und Schulung	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Echtzeit-PCR-Cycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation und Schulung	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Echtzeit-PCR-Thermocycler mit 6 Kanälen (blau, grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), umfasst Laptop-Computer, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, ohne Installation und Schulung	9002042

Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Echtzeit-PCR-Thermocycler mit 6 Kanälen (blau, grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), umfasst Laptop-Computer, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation und Schulung	9002043
Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform	Echtzeit-PCR-Cycler mit 2 Kanälen (grün, gelb), Laptop-Computer, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, ohne Installation und Schulung	9002002
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	Echtzeit-PCR-Cycler mit 2 Kanälen (grün, gelb), Laptop-Computer, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation und Schulung	9002003
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform	Echtzeit-PCR-Cycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 2 Kanälen (grün, gelb) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, ohne Installation und Schulung	9002012
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	Echtzeit-PCR-Cycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 2 Kanälen (grün, gelb) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation und Schulung	9002013
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminium-Block für manuelles Ansetzen der Reaktion mit einer Einkanal-Pipette in 72 x 0,1-ml-Röhrchen	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Aluminium-Block für manuelles Ansetzen der Reaktion in einem 8 x 12 Standard-Array mit 96 x 0,2-ml-Röhrchen	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 Streifen mit je 4 Röhrchen und Deckeln, für 1000 Reaktionen	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 Streifen mit je 4 Röhrchen und Deckeln, für 10.000 Reaktionen	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1.000 dünnwandige Röhrchen für 1.000 Reaktionen	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1.000 dünnwandige Röhrchen für 1000 Reaktionen	981008

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische rechtliche Hinweise finden Sie im Handbuch des jeweiligen QIAGEN-Kits. Handbücher und Gebrauchsanweisungen zu QIAGEN-Kits finden Sie im Internet unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) abrufbar oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder bei Ihrem örtlichen Distributor angefordert werden.



Marken: QIAGEN®, QIAamp®, artus®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); FAM™, JOE™, SYBR® (Life Technologies); Triton™ (The Dow Chemical Company).

Eingetragene Marken, Warenzeichen usw., die in diesem Dokument verwendet werden, auch wenn sie nicht ausdrücklich als solche gekennzeichnet sind, gelten als gesetzlich geschützt.

Der artus M. tuberculosis RG PCR Kit ist ein Diagnostik-Kit mit CE-Kennzeichnung entsprechend der europäischen Richtlinie 98/79/EG über In-vitro-Diagnostika. Nicht in allen Ländern erhältlich.

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische rechtliche Hinweise finden Sie im Handbuch des jeweiligen QIAGEN-Kits. Handbücher und Gebrauchsanweisungen zu QIAGEN-Kits sind unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) abrufbar oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder bei Ihrem örtlichen Distributor angefordert werden.

Der Kauf dieses Produkts berechtigt den Käufer zu dessen Nutzung in der humanen In-vitro-Diagnostik. Eine allgemeine Patent- oder sonstige Lizenz, welche über vorgenanntes Nutzungsrecht des Käufers dieses Produkts hinausgeht, wird nicht gewährt.

#### **Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung für den artus M. tuberculosis RG PCR Kit**

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Nutzer des Produkts die folgenden Bedingungen an:

1. Das Produkt darf nur gemäß den Angaben in den Protokollen und in diesem Handbuch zu diesem Produkt und ausschließlich mit den Komponenten, die im Kit geliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen Ihrer Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zum Kit gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zum Kit gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der in den Protokollen, die mit dem Produkt bereitgestellt werden, in diesem Handbuch und in zusätzlichen, im Internet unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) verfügbaren Protokollen beschriebenen Anwendungen. Einige dieser Zusatzprotokolle wurden von QIAGEN-Nutzern für QIAGEN-Nutzer bereitgestellt. Diese Protokolle sind nicht durch QIAGEN gründlich getestet oder optimiert. Weder garantiert QIAGEN für sie noch garantiert QIAGEN, dass sie keine Rechte Dritter verletzen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieser Kit und/oder die mit ihm durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzt.
3. Dieser Kit und seine Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Nutzer des Kits stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen könnten oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines Ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder dessen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen können im Internet unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) nachgelesen werden.

HB-0058-007 151031225 10/2015 © 2007–2015 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

