

artus[®] Enterovirus LC RT-PCR Kit

Handbuch



24 (Katalog Nr. 4510003)



96 (Katalog Nr. 4510005)

Nur für Forschungszwecke

Zur Verwendung mit dem *LightCycler*[®] Instrument

Juni 2007 – Version 1



4510003, 4510005



1046927DE



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R1

MAT

1046927DE



artus Enterovirus LC RT-PCR Kit

Marken und Disclaimer

QIAGEN®, QIAamp®, *artus*® (QIAGEN Gruppe); *LightCycler*® (Roche Diagnostics).

Registrierte Namen, Warenzeichen, usw. in diesem Dokument können nicht, auch bei fehlender Kennzeichnung als solche, als gesetzlich ungeschützt betrachtet werden.

Der *artus* Enterovirus LC RT-PCR Kit wird nur für Forschungszwecke verkauft. Das Produkt ist nicht dafür vorgesehen, Informationen zu der Diagnose, Vorsorge oder Behandlung einer Krankheit zu liefern.

Die QIAamp Kits sind für den allgemeinen Laborgebrauch. Die Produktangaben oder Produktdarstellungen sind nicht dazu vorgesehen, Informationen für die Diagnose, Prävention oder Behandlung einer Erkrankung zu liefern.

Der Erwerb der *artus* PCR Kits beinhaltet eine limitierte Lizenz für ihre Verwendung zur Durchführung des Polymerasekettenreaktion-Verfahrens (PCR) in der humanen und veterinären In-vitro-Diagnostik in Verbindung mit einem Thermocycler, dessen Einsatz bei der automatisierten Durchführung der PCR durch die up-front Lizenzgebühr abgedeckt ist, die entweder an Applied Biosystems abgeführt wird oder durch den Erwerb eines autorisierten Thermocyclers entrichtet wird. Das PCR Verfahren ist geschützt durch entsprechende nationale Schutzrechte der U.S. Patente der Nummern 5.219.727 und 5.322.770 und 5.210.015 und 5.176.995 und 6.040.166 und 6.197.563 und 5.994.056 und 6.171.785 und 5.487.972 und 5.804.375 und 5.407.800 und 5.310.652 und 5.994.056; Eigentum der F. Hoffmann-La Roche Ltd.

© 2007 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

Inhaltsverzeichnis

1. Inhalt	4
2. Lagerung	4
3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte	5
4. Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	5
5. Erreger-Informationen	6
6. Prinzip der Real-Time PCR	6
7. Produktbeschreibung	6
8. Protokoll	7
8.1 RNA-Isolierung	7
8.2 Interne Kontrolle	8
8.3 Quantifizierung	10
8.4 Vorbereitung der PCR.....	11
8.5 Programmierung des <i>LightCycler</i> [®] Instruments	15
9. Auswertung	17
10. Troubleshooting	20
11. Spezifikationen	22
11.1 Analytische Sensitivität.....	22
11.2 Spezifität.....	23
12. Besondere Hinweise zum Produkt-Gebrauch	23
13. Sicherheitsinformationen	23
14. Qualitätskontrolle	24
15. Literatur	24
16. Erklärung der Symbole	25

artus[®] Enterovirus LC RT-PCR Kit

Für die Verwendung mit dem *LightCycler[®]* Instrument.

Nur für Forschungszwecke. Das Produkt ist nicht dafür vorgesehen, Informationen zu der Diagnose, Vorsorge oder Behandlung einer Krankheit zu liefern.

1. Inhalt

	Beschriftung und Inhalt	Art. Nr. 4510003 24 Reaktionen	Art. Nr. 4510005 96 Reaktionen
Blau	<i>Enterovirus LC Master</i>	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
Rot	<i>Enterovirus LC QS 1st</i> <i>6 x 10⁴ cop/µl</i>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rot	<i>Enterovirus LC QS 2nd</i> <i>6 x 10³ cop/µl</i>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rot	<i>Enterovirus LC QS 3rd</i> <i>6 x 10² cop/µl</i>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rot	<i>Enterovirus LC QS 4th</i> <i>6 x 10¹ cop/µl</i>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Grün	<i>Enterovirus LC ICst</i>	1 x 1.000 µl	2 x 1.000 µl
Weiß	<i>Water (PCR grade)</i>	1 x 1.000 µl	1 x 1.000 µl

st QS = *Quantifizierungsstandard*
IC = *Interne Kontrolle*

2. Lagerung

Die Komponenten des *artus* Enterovirus LC RT-PCR Kits werden bei -20°C gelagert und sind bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Datum haltbar. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren (> 2 x) sollte vermieden werden, da dadurch die Sensitivität verringert wird. Bei unregelmäßigem Gebrauch sollten deshalb die Reagenzien aliquotiert werden. Sollte die Notwendigkeit bestehen, die Komponenten bei +4°C zu lagern, darf ein Zeitraum von fünf Stunden nicht überschritten werden.

3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- Puderfreie Laborhandschuhe
- RNA-Isolierungskit (siehe **8.1 RNA-Isolierung**)
- Pipetten (einstellbar)
- Sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Vortex-Mixer
- Tischzentrifuge mit Rotor für 2 ml-Reaktionsgefäße
- *Color Compensation Set* (Roche Diagnostics, Kat.-Nr. 2 158 850) zur Erstellung einer *Crosstalk Color Compensation*-Datei
- *LightCycler*[®] Kapillaren (20 µl)
- *LightCycler*[®] Cooling Block
- *LightCycler*[®] Instrument
- *LightCycler*[®] Capping Tool

4. Allgemeine 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.
- Zügig auf Eis oder im *LightCycler*[®] Cooling Block arbeiten.

5. Erreger-Informationen

Enteroviren gehören zur Familie der *Picornaviridae*, die mehr als 70 verschiedene Serotypen umfasst (Coxsackieviren A und B, Echoviren, Polioviren und Enteroviren 68 - 71). Enteroviren können zahlreiche Säugetier-Arten infizieren und sind für ein breites Spektrum an Krankheiten verantwortlich. Innerhalb des Genus *Enterovirus* existieren 68 humanpathogene Viren. Enteroviren werden vor allem auf dem fäkal-oralen Weg übertragen. Allerdings können sich einige der Coxsackieviren auch über den Respirationstrakt verbreiten und eine Erkrankung der oberen Atemwege verursachen. Nicht-Polio-Enteroviren verursachen meistens Hautausschläge, Infektionen der oberen Atemwege (URTI) und Sommergrippen. Außerdem müssen nach einer Enterovirus-Infektion vor allem im Sommer und Herbst eine beträchtliche Anzahl an Patienten mit aseptischer Meningitis und Enzephalitis hospitalisiert werden.

6. Prinzip der Real-Time PCR

Bei dem Nachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden spezifische Bereiche aus dem Erregergenom amplifiziert. Die Detektion findet bei der Real-Time PCR mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen statt. Diese sind in der Regel an Oligonukleotid-Sonden gekoppelt, die spezifisch an das PCR-Amplifikat binden. Die Detektion der Fluoreszenzintensitäten im Verlauf der Real-Time PCR ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung der Produkte, ohne die Probenröhrchen nach der PCR wieder öffnen zu müssen (Mackay, 2004).

7. Produktbeschreibung

Der *artus* Enterovirus LC RT-PCR Kit ist ein gebrauchsfertiges System für den Nachweis von Enterovirus-RNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) im *LightCycler*[®] Instrument. Der *Enterovirus LC Master* beinhaltet Reagenzien und Enzyme für die reverse Transkription und spezifische Amplifikation eines 114 bp langen Abschnitts des Enterovirus-Genoms sowie für die unmittelbare

Detektion des Amplifikats im Fluorimeter-Kanal F1 des *LightCycler*[®] Instruments. Daneben enthält der *artus* Enterovirus LC RT-PCR Kit zum Nachweis einer möglichen PCR-Inhibition ein zweites heterologes Amplifikationssystem. Dieses wird als *Interne Kontrolle (IC)* im Fluorimeter-Kanal F3 detektiert. Dabei wird die Nachweisgrenze der analytischen Enterovirus RT-PCR (siehe **11.1 Analytische Sensitivität**) nicht herabgesetzt. Es werden externe Positivkontrollen (*Enterovirus LC QS 1 - 4*) mitgeliefert, mit deren Hilfe eine Bestimmung der Erregerlast vorgenommen werden kann. Dazu lesen Sie bitte den Absatz **8.3 Quantifizierung**.

8. Protokoll

8.1 RNA-Isolierung

RNA-Isolierungskits werden von verschiedenen Herstellern angeboten. In Abhängigkeit vom Protokoll des gewählten Herstellers setzen Sie die angegebene Probenmenge in die Aufreinigung ein und führen die RNA-Isolierung entsprechend der Vorschrift durch. Folgender Isolierungskit wird empfohlen:

Probenmaterial	Aufreinigungskit	Katalognummer	Hersteller	Carrier-RNA
Liquor	QIAamp Viral RNA Mini Kit (50)	52 904	QIAGEN	enthalten

- Der Einsatz von **Carrier-RNA** ist für die Effizienz der Aufreinigung und damit für die DNA-/RNA-Ausbeute von entscheidender Bedeutung. Um eine höhere Stabilität der im QIAamp Viral RNA Mini Kit mitgelieferten Carrier-RNA zu erzielen, empfehlen wir folgendes von den Angaben im Handbuch des Isolierungskits abweichendes Vorgehen:
 - a. Resuspendieren Sie die lyophilisierte Carrier-RNA vor Erstbenutzung des Isolierungskits in 310 µl des im Kit enthaltenen Elutionspuffers (Endkonzentration 1 µg/µl, keinen Lysispuffer verwenden) und portionieren Sie diese Carrier-RNA-Lösung auf eine Ihren Anforderungen entsprechende Anzahl von Aliquots, die bei -20°C

gelagert werden müssen. Vermeiden Sie das wiederholte Auftauen (> 2 x) eines Carrier-RNA-Aliquots.

- b. Vor Beginn jeder Aufreinigung muss ein Gemisch aus Lysispuffer und Carrier-RNA (und ggf. *Interner Kontrolle*, siehe **8.2 Interne Kontrolle**) gemäß folgendem Pipettierschema frisch hergestellt werden.

Anzahl der Proben	1	12
Lysispuffer AVL	560 µl	6.720 µl
Carrier-RNA (1 µg/µl)	5,6 µl	67,2 µl
Gesamtvolumen	565,6 µl	6.787,2 µl
Volumen für die Aufreinigung	560 µl	je 560 µl

- c. Setzen Sie das frisch hergestellte Gemisch aus Lysispuffer und Carrier-RNA sofort für die Aufreinigung ein. Eine Lagerung des Gemisches ist nicht möglich.
- Bei Aufreinigungen, die **Ethanol**-haltige Waschpuffer benutzen, stellen Sie unbedingt sicher, dass vor der Elution ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt (drei Minuten, 13.000 Upm) zur Beseitigung von Ethanol-Rückständen durchgeführt wird. Dies verhindert mögliche PCR-Inhibitionen.
 - Der *artus* Enterovirus LC RT-PCR Kit ist nicht geeignet für Aufreinigungsverfahren, die auf der Grundlage von **Phenol** arbeiten.

Wichtig: Die *Interne Kontrolle* des *artus* Enterovirus LC RT-PCR Kits kann direkt in die Aufreinigung eingesetzt werden (siehe **8.2 Interne Kontrolle**).

8.2 Interne Kontrolle

Es wird eine *Interne Kontrolle (Enterovirus LC IC)* mitgeliefert. Mit dieser haben Sie die Möglichkeit, **sowohl die Aufreinigung der RNA als auch eine mögliche Inhibition der PCR** zu kontrollieren (siehe Abb. 1). Für diese Anwendung geben Sie die *Interne Kontrolle* in einem Verhältnis von 0,1 µl pro 1 µl Elutionsvolumen zur Aufreinigung hinzu. Verwenden Sie beispielsweise den QIAmp Viral RNA Mini Kit und eluieren die RNA in 60 µl AVE-Puffer, dann setzen Sie bitte 6 µl der *Internen Kontrolle* ein. Wenn Sie z. B. in 50 µl

eluieren, so setzen Sie entsprechend 5 µl ein. Die Menge der eingesetzten *Internen Kontrolle* ist **nur** abhängig vom Elutionsvolumen. Die *Interne Kontrolle* und Carrier-RNA (siehe **8.1 RNA-Isolierung**) dürfen nur zugesetzt werden zum

- Gemisch aus Lysispuffer und Probenmaterial oder
- direkt zum Lysispuffer.

Die *Interne Kontrolle* darf nicht direkt zum Probenmaterial gegeben werden. Bei Zugabe zum Lysispuffer ist zu beachten, dass das Gemisch aus *Interner Kontrolle* und Lysispuffer/Carrier-RNA frisch angesetzt werden muss und sofort einzusetzen ist (Lagerung des Gemischs bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank kann bereits nach wenigen Stunden zum Ausfall der *Internen Kontrolle* und zu einer Verminderung der Aufreinigungseffizienz führen). Pipettieren Sie die *Interne Kontrolle* und die Carrier-RNA **nicht** direkt zum Probenmaterial.

Optional kann die *Interne Kontrolle* **ausschließlich zur Kontrolle einer möglichen PCR-Inhibition** verwendet werden (siehe Abb. 2). Hierfür geben Sie pro Ansatz 0,5 µl der *Internen Kontrolle* direkt zu 15 µl *Enterovirus LC Master* hinzu. Verwenden Sie für jede PCR-Reaktion 15 µl des so hergestellten Master Mixes* und fügen Sie anschließend 5 µl der aufgereinigten Probe hinzu. Sollten Sie einen Lauf für mehrere Proben ansetzen, so erhöhen Sie die benötigten Mengen des *Enterovirus LC Masters* und der *Internen Kontrolle* entsprechend der Probenzahl (siehe **8.4 Vorbereitung der PCR**).

* Die durch die Zugabe der *Internen Kontrolle* bedingte Volumenerhöhung wird beim Ansetzen der PCR-Reaktion vernachlässigt. Die Sensitivität des Nachweissystems wird nicht beeinträchtigt.

8.3 Quantifizierung

Die mitgelieferten *Quantifizierungsstandards* (*Enterovirus LC QS 1 - 4*) werden wie eine bereits aufgereinigte Probe behandelt und im gleichen Volumen eingesetzt (5 µl). Um im *LightCycler*[®] Instrument eine Standardkurve zu erstellen, setzen Sie bitte alle vier mitgelieferten *Quantifizierungsstandards* ein, definieren Sie diese in dem *Sample Loading Screen* als Standards und geben Sie die angegebenen Konzentrationen ein (siehe *LightCycler Operator's Manual*, Version 3.5, Chapter B, 2.4. Sample Data Entry). Auch für nachfolgende Quantifizierungen kann diese Standardkurve verwendet werden, wenn mindestens ein Standard **einer** definierten Konzentration während des aktuellen Laufs mitgeführt wird. Dafür ist es erforderlich, die zuvor erstellte Standardkurve zu importieren (siehe *LightCycler Operator's Manual*, Version 3.5, Chapter B, 4.2.5. Quantification with an External Standard Curve). Bei dieser Form der Quantifizierung muss jedoch berücksichtigt werden, dass es infolge der Variabilität zwischen den PCR-Läufen zu Abweichungen im Ergebnis kommen kann.

Beachte: Die *Quantifizierungsstandards* sind definiert als Kopien/µl. Zur Umrechnung der anhand der Standardkurve ermittelten Werte in Kopien/ml Probenmaterial ist folgende Formel anzuwenden:

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

Bitte beachten Sie, dass grundsätzlich das ursprüngliche Probenvolumen in die o. g. Formel einzusetzen ist. Das ist zu berücksichtigen, wenn das Probenvolumen vor der Nukleinsäure-Aufreinigung verändert worden ist (z. B. Einengung durch Zentrifugation oder Erhöhung durch Auffüllen auf das für die Aufreinigung geforderte Volumen).

Wichtig: Zur Vereinfachung der quantitativen Auswertung von *artus*-Systemen am *LightCycler*[®] Instrument gibt es unter www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX einen Leitfaden (**Technical Note zur Quantifizierung am *LightCycler*[®] 1.1/1.2/1.5 bzw. *LightCycler*[®] 2.0 Instrument**).

8.4 Vorbereitung der PCR

Stellen Sie sicher, dass der Cooling Block mit den darin enthaltenen Adaptern (Zubehör des *LightCycler*[®] Instruments) auf etwa +4 °C vorgekühlt ist. Setzen Sie die für die geplanten Reaktionen erforderliche Anzahl *LightCycler*[®] Kapillaren in die Adapter des Cooling Blocks. Beachten Sie dabei, dass pro PCR-Lauf mindestens ein *Quantifizierungsstandard* sowie eine Negativkontrolle (*Water, PCR grade*) mitgeführt werden. Zur Erstellung einer Standardkurve nutzen Sie pro PCR-Lauf bitte alle mitgelieferten *Quantifizierungsstandards* (*Enterovirus LC QS 1 - 4*). Alle Reagenzien sollten vor Testbeginn vollständig bei Raumtemperatur aufgetaut, gut durchmischt (mehrfaches Auf- und Abpipettieren oder mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes) und anschließend anzentrifugiert werden.

Wollen Sie mit der *Internen Kontrolle* **sowohl die Aufreinigung der RNA als auch eine mögliche Inhibition der PCR** kontrollieren, so muss zuvor die *Interne Kontrolle* zur Aufreinigung zugegeben werden (siehe **8.2 Interne Kontrolle**). Verwenden Sie in diesem Fall folgendes Pipettierschema (siehe auch schematische Übersicht in Abb. 1):

	Anzahl der Proben	1	12
1. Ansetzen des Master Mixes	<i>Enterovirus LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>Enterovirus LC IC</i>	0 µl	0 µl
	Gesamtvolumen	15 µl	180 µl
2. Ansetzen der PCR-Reaktion	Master Mix	15 µl	je 15 µl
	Probe	5 µl	je 5 µl
	Gesamtvolumen	20 µl	je 20 µl

Wollen Sie die *Interne Kontrolle* **ausschließlich zur Kontrolle einer PCR-Inhibition** einsetzen, so muss sie direkt zum *Enterovirus LC Master* zugesetzt werden. In diesem Fall verwenden sie folgendes Pipettierschema (siehe auch schematische Übersicht in Abb. 2):

	Anzahl der Proben	1	12
1. Ansetzen des Master Mixes	<i>Enterovirus LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>Enterovirus LC IC</i>	0,5 µl	6 µl
	Gesamtvolumen	15,5 µl*	186 µl*
2. Ansetzen der PCR-Reaktion	Master Mix	15 µl*	je 15 µl*
	Probe	5 µl	je 5 µl
	Gesamtvolumen	20 µl	je 20 µl

Pipettieren Sie in das Plastikreservoir jeder Kapillare 15 µl des Master Mixes. Anschließend geben Sie 5 µl des Eluats aus der RNA-Isolierung hinzu. Entsprechend müssen als Positivkontrolle 5 µl von mindestens einem der *Quantifizierungsstandards (Enterovirus LC QS 1 - 4)* und als Negativkontrolle 5 µl Wasser (*Water, PCR grade*) eingesetzt werden. Verschließen Sie die Kapillaren. Um den Ansatz aus dem Plastikreservoir in die Kapillare zu überführen, zentrifugieren Sie die Adapter mit den darin enthaltenen Kapillaren in einer Tischzentrifuge für zehn Sekunden bei maximal 400 x g (2.000 Upm).

* Die durch die Zugabe der *Internen Kontrolle* bedingte Volumenerhöhung wird beim Ansetzen der PCR-Reaktion vernachlässigt. Die Sensitivität des Nachweissystems wird nicht beeinträchtigt.

Zugabe der *Internen Kontrolle* zur Aufreinigung

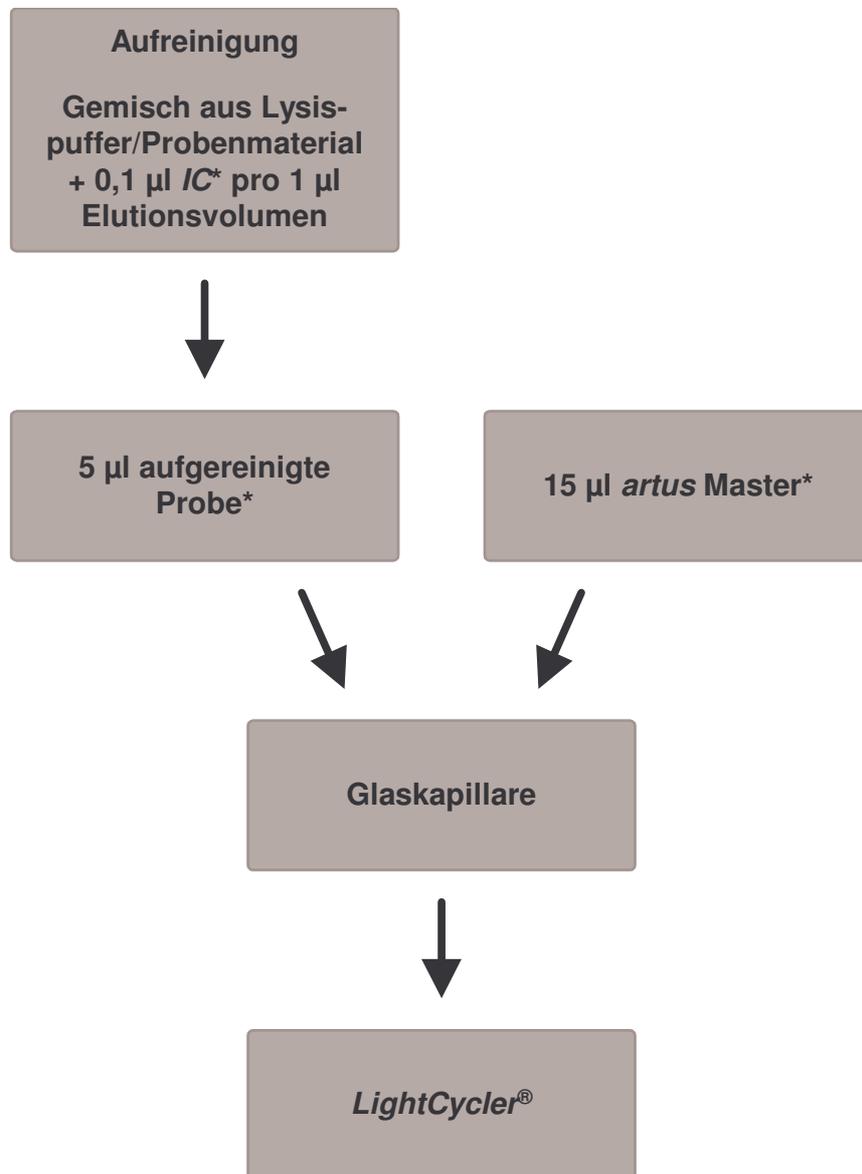


Abb. 1: Schematischer Arbeitsablauf zur Kontrolle von Aufreinigung und PCR-Inhibition.

* Bei jedem Pipettierschritt ist unbedingt darauf zu achten, dass die zu verwendenden Lösungen vollständig aufgetaut, gut durchmischt und kurz zentrifugiert sind.

Zugabe der *Internen Kontrolle* zum *artus Master*

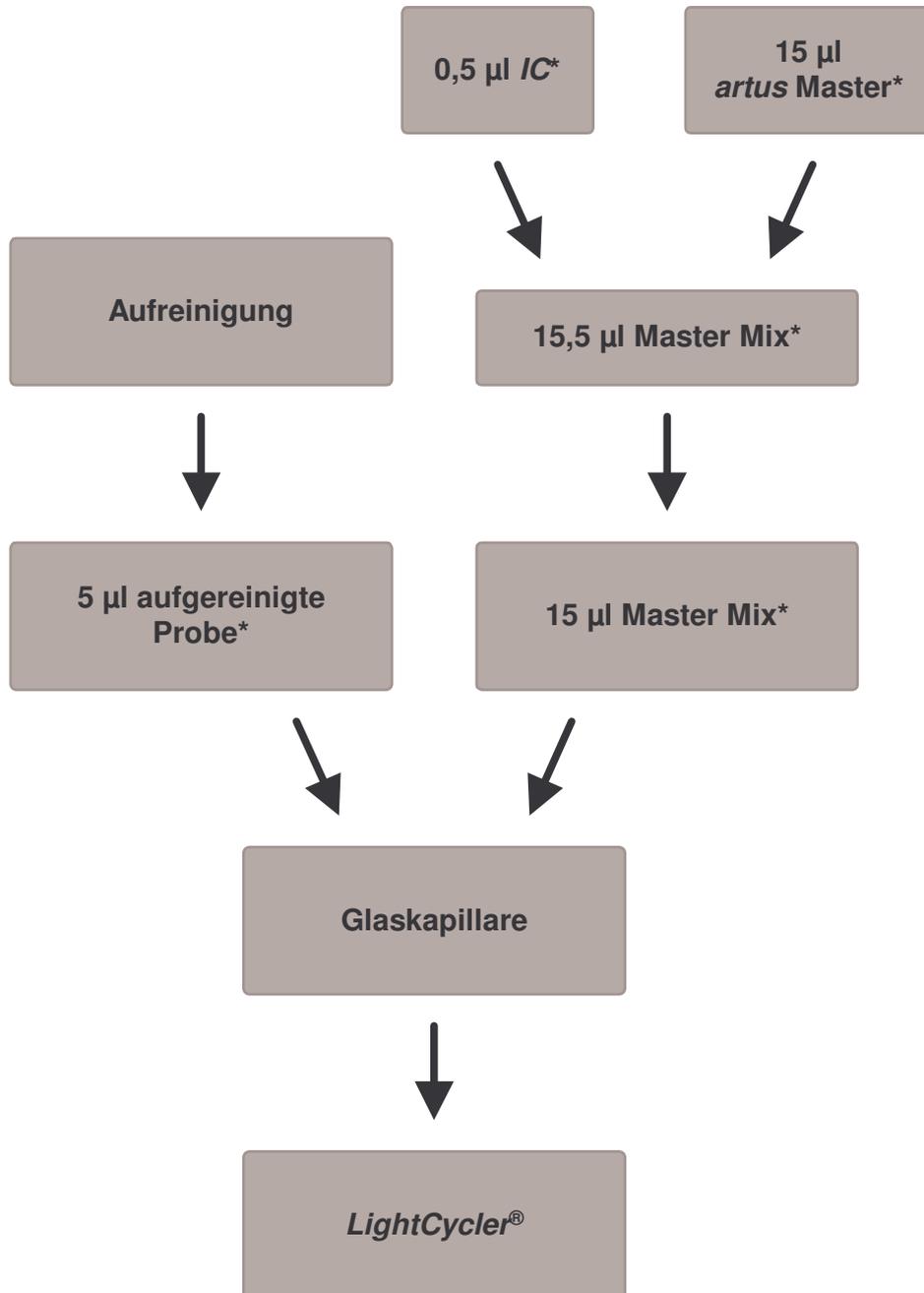


Abb. 2: Schematischer Arbeitsablauf zur Kontrolle der PCR-Inhibition.

* Bei jedem Pipettierschritt ist unbedingt darauf zu achten, dass die zu verwendenden Lösungen vollständig aufgetaut, gut durchmischt und kurz zentrifugiert sind.

8.5 Programmierung des *LightCycler*[®] Instruments

Zur Detektion der Enterovirus-RNA erstellen Sie auf Ihrem *LightCycler*[®] Instrument ein Temperaturprofil gemäß den folgenden vier Arbeitsschritten (siehe Abb. 3 - 6).

- | | | |
|----|---|--------|
| A. | Reverse Transkription der RNA | Abb. 3 |
| B. | Initiale Aktivierung des Hot Start-Enzyms | Abb. 4 |
| C. | Amplifikation der cDNA | Abb. 5 |
| D. | Kühlung | Abb. 6 |

Beachten Sie insbesondere die Einstellungen für *Analysis Mode*, *Cycle Program Data* und *Temperature Targets*. In den Abbildungen sind diese Einstellungen durch schwarze Rahmen hervorgehoben. Hinweise zur Programmierung des *LightCycler*[®] Instruments finden Sie im *LightCycler Operator's Manual*.

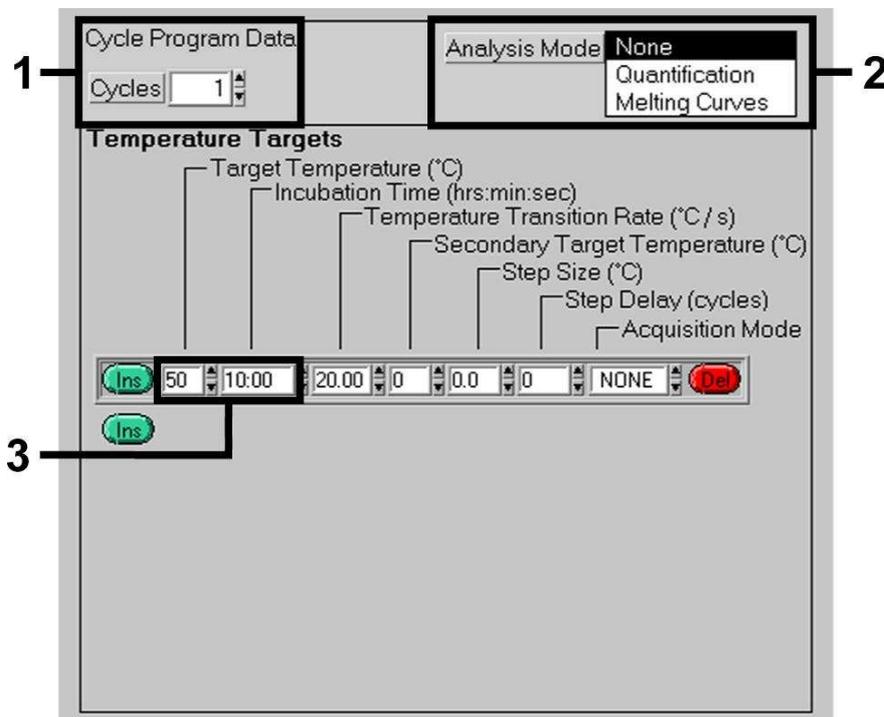


Abb. 3: Reverse Transkription der RNA.

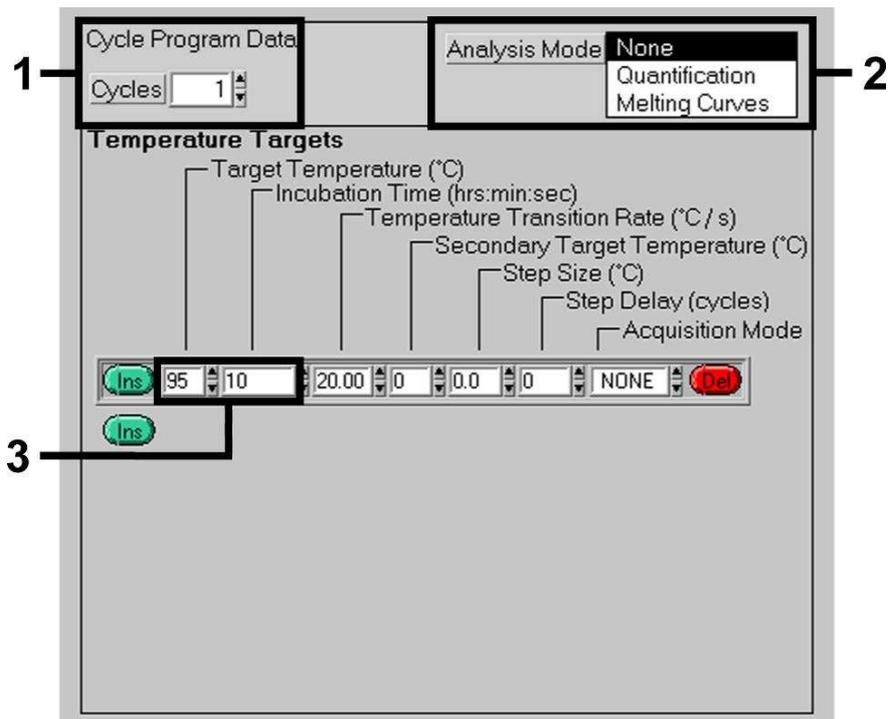


Abb. 4: Initiale Aktivierung des Hot Start-Enzyms.

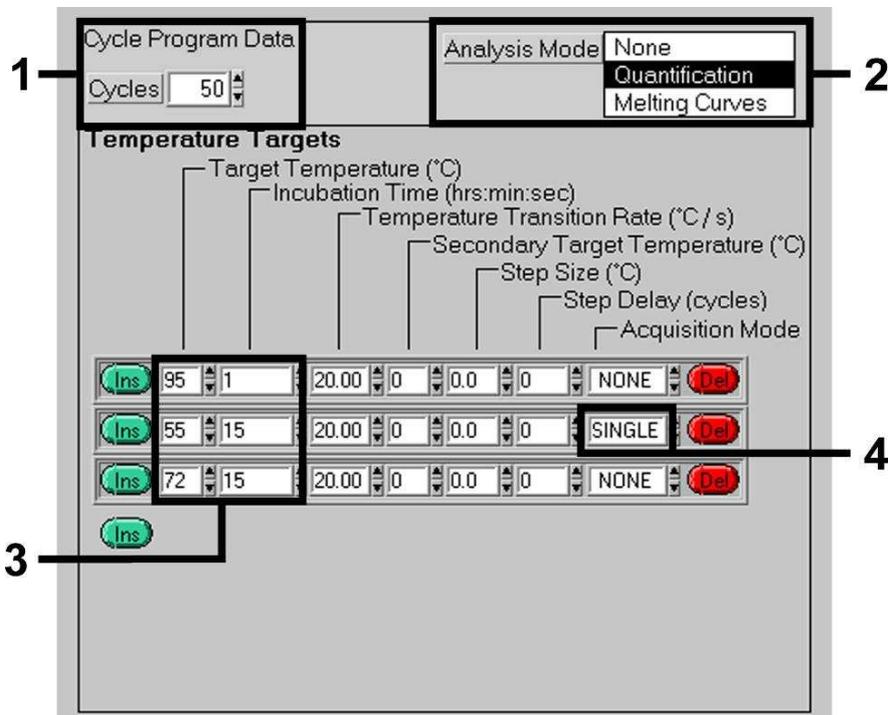


Abb. 5: Amplifikation der cDNA.

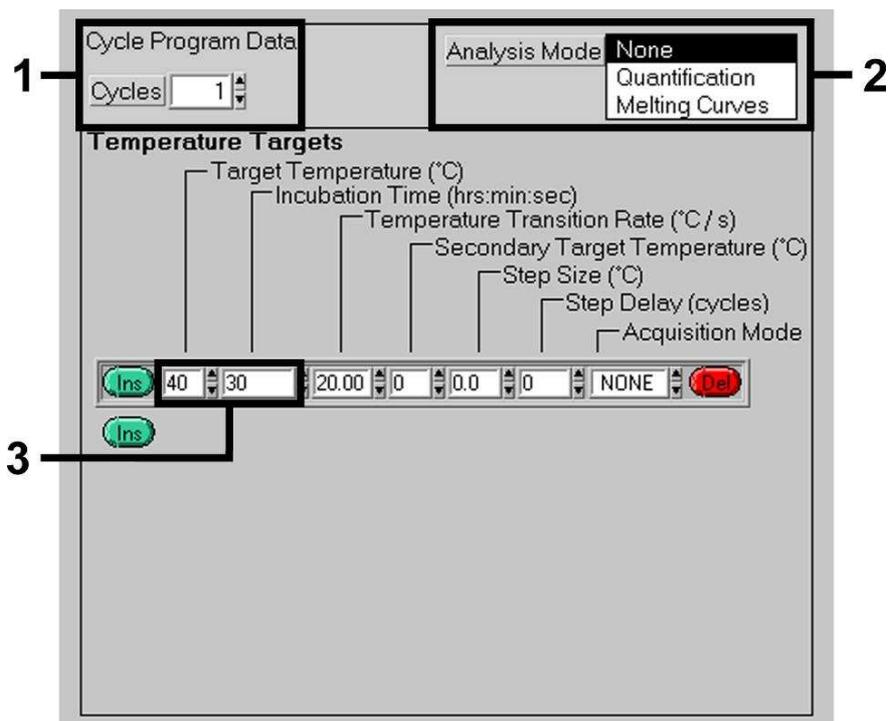


Abb. 6: Kühlung.

9. Auswertung

Bei Multicolor-Analysen treten Interferenzen zwischen den Fluorimeter-Kanälen auf. Die Software des *LightCycler*[®] Instruments enthält eine als *Color Compensation File* bezeichnete Datei, welche diese Einstrahlungen kompensiert. Diese Datei öffnen Sie vor, während oder im Anschluss des PCR-Laufs durch Aktivierung der Schaltfläche *Choose CCC File* bzw. *Select CC Data*. Sollte kein *Color Compensation File* installiert sein, erstellen Sie die Datei bitte unter Beachtung der Anleitung im *LightCycler Operator's Manual*. Nach Aktivierung des *Color Compensation File* erscheinen in den Fluorimeter-Kanälen F1, F2 und F3 getrennte Signale. Zur Analyse der PCR-Ergebnisse, die mit dem *artus* Enterovirus LC RT-PCR Kit gewonnen werden, wählen Sie bitte die Ansichtsfunktionen F1 für die analytische Enterovirus RT-PCR bzw. F3/Back-F1 für die RT-PCR der *Internen Kontrolle*. Für die Analyse quantitativer Läufe beachten Sie bitte unbedingt den Abschnitt **8.3 Quantifizierung** sowie die **Technical Note zur Quantifizierung am**

LightCycler® 1.1/1.2/1.5 bzw. LightCycler® 2.0 Instrument unter www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

Folgende Ergebnisse können auftreten:

1. Im Fluorimeter-Kanal F1 wird ein Signal detektiert.

Das Ergebnis der Analyse ist positiv: Die Probe enthält Enterovirus-RNA.

In diesem Fall ist die Detektion eines Signals im Kanal F3/Back-F1 unwesentlich, da hohe Ausgangskonzentrationen an Enterovirus-RNA (positives Signal im Kanal F1) zu einem reduzierten bis ausbleibenden Fluoreszenz-Signal der *Internen Kontrolle* im Kanal F3/Back-F1 führen können (Kompetition).

2. Im Fluorimeter-Kanal F1 wird kein Signal detektiert, sondern nur im Kanal F3/Back-F1 (Signal der *Internen Kontrolle*).

In der Probe ist keine Enterovirus-RNA nachweisbar. Sie kann daher als negativ angesehen werden.

Bei negativer Enterovirus RT-PCR schließt das detektierte Signal der *Internen Kontrolle* die Möglichkeit einer RT-PCR-Inhibition aus.

3. Weder im Kanal F1 noch im Kanal F3/Back-F1 wird ein Signal detektiert.

Eine Aussage ist nicht möglich.

Hinweise zu Fehlerquellen und deren Beseitigung sind unter **10. Troubleshooting** aufgeführt.

Beispiele für positive und negative PCR-Reaktionen sind in Abb. 7 und Abb. 8 wiedergegeben.

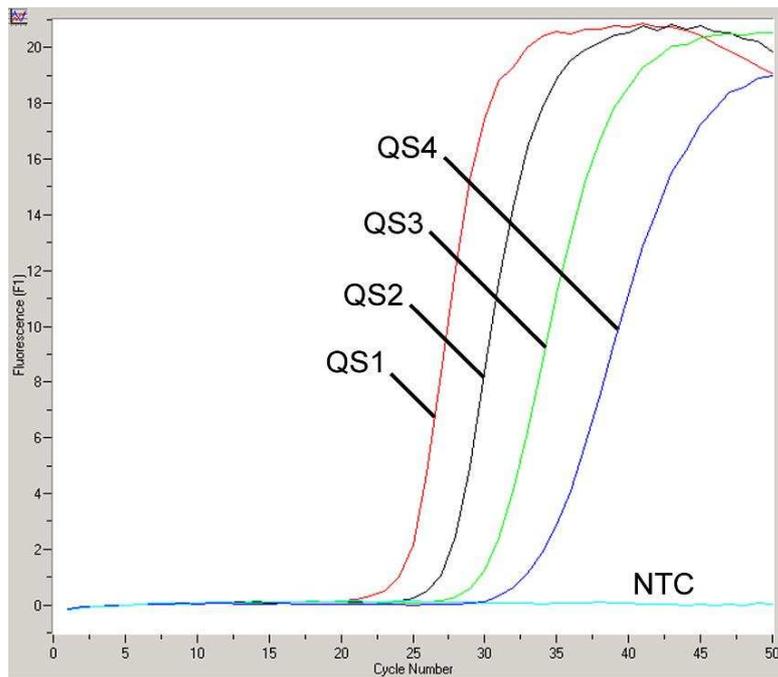


Abb. 7: Nachweis der *Quantifizierungsstandards* (*Enterovirus LC QS 1 - 4*) im Fluorimeter-Kanal F1. NTC: non-template control (Negativkontrolle).

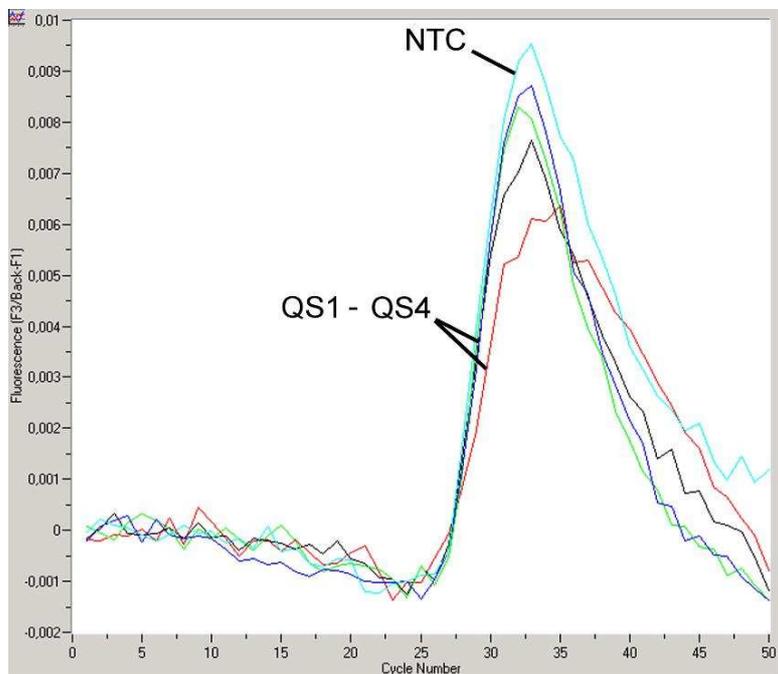


Abb. 8: Nachweis der *Internen Kontrolle (IC)* im Fluorimeter-Kanal F3/Back-F1 bei gleichzeitiger Amplifikation der *Quantifizierungsstandards* (*Enterovirus LC QS 1 - 4*). NTC: non-template control (Negativkontrolle).

10. Troubleshooting

Kein Signal bei den Positivkontrollen (*Enterovirus LC QS 1 - 4*) im Fluorimeter-Kanal F1:

- Die Wahl des Fluorimeter-Kanals bei der PCR-Datenanalyse entspricht nicht den Protokollangaben.
 - Wählen Sie für die Datenanalyse den Fluorimeter-Kanal F1 für die analytische Enterovirus RT-PCR und den Fluorimeter-Kanal F3/Back-F1 für die RT-PCR der *Internen Kontrolle*.
- Die Programmierung des Temperaturprofils des *LightCycler*[®] Instruments ist fehlerhaft.
 - Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit den Protokollangaben (siehe **8.5 Programmierung des *LightCycler*[®] Instruments**).
- Fehlerhaftes Zusammenstellen der PCR-Reaktion.
 - Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte mit Hilfe des Pipettierschemas (siehe **8.4 Vorbereitung der PCR**) und wiederholen Sie ggf. die PCR.
- Die Lagerungsbedingungen für eine oder mehrere Kit-Komponenten entsprachen nicht den in **2. Lagerung** angeführten Vorschriften oder das Haltbarkeitsdatum des *artus* Enterovirus LC RT-PCR Kits wurde überschritten.
 - Bitte überprüfen Sie sowohl Lagerungsbedingungen als auch Haltbarkeitsdatum (siehe Kit-Etikett) der Reagenzien und verwenden Sie ggf. einen neuen Kit.

Schwaches oder ausbleibendes Signal der *Internen Kontrolle* im Fluorimeter-Kanal F3/Back-F1 bei gleichzeitiger Abwesenheit eines Signals im Kanal F1:

- Die PCR-Bedingungen entsprechen nicht dem Protokoll.
 - Überprüfen Sie die PCR-Bedingungen (siehe oben) und wiederholen Sie ggf. die PCR mit korrigierten Einstellungen.
- Die PCR wurde inhibiert.
 - Stellen Sie sicher, dass Sie ein von uns empfohlenes Aufreinigerungsverfahren benutzen (siehe **8.1 RNA-Isolierung**) und halten Sie sich exakt an die Herstellervorschrift.

- Vergewissern Sie sich, dass bei der RNA-Aufreinigung der zusätzliche empfohlene Zentrifugationsschritt zur vollständigen Entfernung von Ethanol-Resten vor der Elution durchgeführt wurde (siehe **8.1 RNA-Isolierung**).
- Es liegen aufreinigungsbedingte RNA-Verluste vor.
 - Sollte die *Interne Kontrolle* zur Aufreinigung zugegeben worden sein, kann ein Ausbleiben des Signals der *Internen Kontrolle* bedeuten, dass aufreinigungsbedingte RNA-Verluste vorliegen. Stellen Sie sicher, dass Sie ein von uns empfohlenes Aufreinigungsverfahren anwenden (siehe **8.1 RNA-Isolierung**) und halten Sie sich an die Herstellervorschrift.
- Die Lagerungsbedingungen für eine oder mehrere Kit-Komponenten entsprechen nicht den in **2. Lagerung** angeführten Vorschriften oder das Haltbarkeitsdatum des *artus* Enterovirus L RT-PCR Kits wurde überschritten.
 - Bitte überprüfen Sie sowohl Lagerungsbedingungen als auch Haltbarkeitsdatum (siehe Kit-Etikett) der Reagenzien und verwenden Sie ggf. einen neuen Kit.

Signale bei den Negativkontrollen im Fluorimeter-Kanal F1 der analytischen RT-PCR.

- Es liegt eine Kontamination während der Vorbereitung der PCR vor.
 - Wiederholen Sie die PCR mit noch unbenutzten Reagenzien in Replikaten.
 - Verschließen Sie die einzelnen PCR-Gefäße nach Möglichkeit jeweils unmittelbar nach Zugabe der zu untersuchenden Probe.
 - Pipettieren Sie die Positivkontrollen grundsätzlich zuletzt.
 - Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig dekontaminiert werden.
- Es liegt eine aufreinigungsbedingte Kontamination vor.
 - Wiederholen Sie die Aufreinigung und PCR der zu untersuchenden Proben unter Verwendung noch unbenutzter Reagenzien.
 - Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig dekontaminiert werden.

Sollten weitere Fragen oder Probleme auftreten, Sollten weitere Fragen oder Probleme auftreten, kontaktieren Sie bitte unseren Technischen Service.

11. Spezifikationen

11.1 Analytische Sensitivität

Zur Bestimmung der analytischen Sensitivität des *artus* Enterovirus LC RT-PCR Kits wurde eine Standard-Verdünnungsreihe von 60 bis nominal 0,02 *in vitro* transkribierten RNA-Kopien pro μl des Enterovirus-Amplikons erstellt und mit dem *artus* Enterovirus LC RT-PCR Kit analysiert. Die Untersuchungen wurden an drei verschiedenen Tagen in Form von Achtfach-Bestimmungen durchgeführt. Das Ergebnis ist mit Hilfe einer Probit-Analyse ermittelt worden. Deren graphische Auswertung ist in Abb. 9 dargestellt. Die analytische Nachweisgrenze des *artus* Enterovirus LC RT-PCR Kits liegt demzufolge bei 3,2 Kopien/ μl ($p = 0,05$). Dies bedeutet, dass 3,2 Kopien/ μl mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % detektiert werden können.

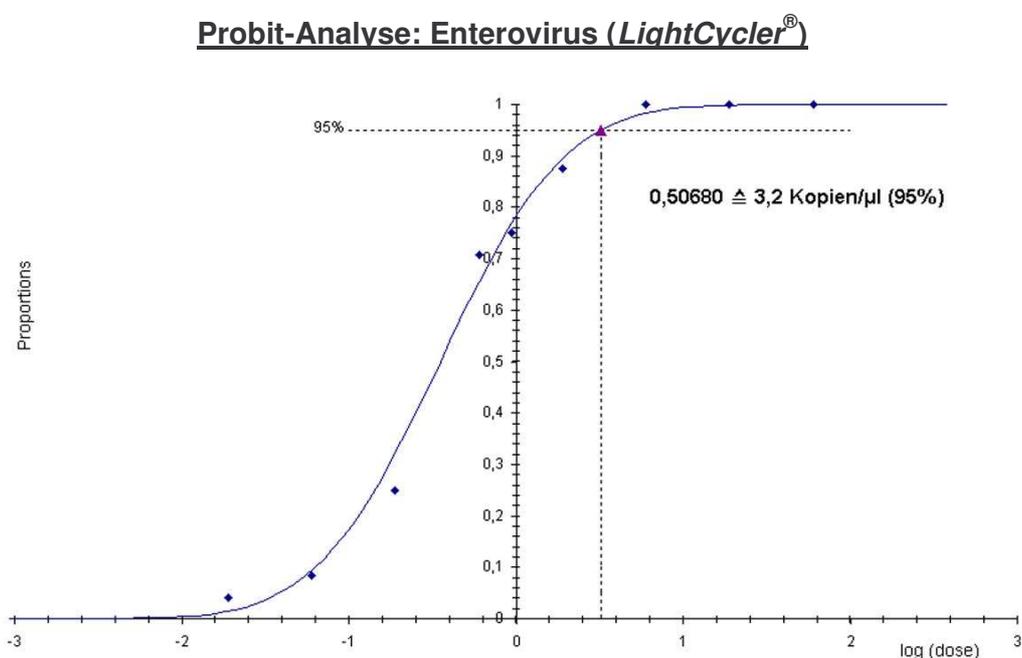


Abb. 9: Analytische Sensitivität des *artus* Enterovirus LC RT-PCR Kits.

11.2 Spezifität

Die Spezifität des *artus* Enterovirus LC RT-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 Sequenzvergleichs-Analyse auf eventuelle Homologien zu allen in Genbanken publizierten Sequenzen überprüft worden. Auf diese Weise wurde auch die Detektierbarkeit aller relevanten Enteroviren sichergestellt. Die Validierung der Spezifität erfolgte zudem an 100 verschiedenen Enterovirus-negativen Proben.

Sollte anderes Probenmaterial als Liquor für die Testung verwendet werden, können Kreuzreaktionen mit Rhinovirus 1b auftreten.

12. Besondere Hinweise zum Produkt-Gebrauch

- Der *artus* Enterovirus LC RT-PCR Kit wird nur für Forschungszwecke verkauft.
- Der Kit darf nicht für die spezifische klinische Anwendung (Diagnostik, Prognosen oder Therapie) genutzt werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, den *artus* Enterovirus LC RT-PCR Kit für besondere Nutzen zu validieren.
- Die genaue Einhaltung des Protokolls ist unbedingt erforderlich, um optimale PCR-Ergebnisse zu erreichen.
- Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten sind zu beachten. Abgelaufene Reagenzien sind nicht zu benutzen.

13. Sicherheitsinformationen

Sicherheitsinformationen zum *artus* Enterovirus LC RT-PCR Kit können Sie dem entsprechenden Material Sicherheits-Datenblatt entnehmen (material safety data sheet, MSDS). Dieses finden Sie als kompakte und anwenderfreundliche PDF-Datei unter

www.qiagen.com/support/msds.aspx.

14. Qualitätskontrolle

In Übereinstimmung mit dem ISO 9001 und ISO 13485-zertifizierten Qualitäts-Management-System von QIAGEN wurde jede Charge des *artus* Enterovirus LC RT-PCR Kits gegen vorgegebene Spezifikationen getestet, um eine einheitliche Produktqualität zu gewährleisten.

15. Literatur

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 - 212.

16. Erklärung der Symbole



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung



Hersteller



Bestellnummer



Materialnummer



Handbuch



Inhalt reicht für <N> Tests



Zulässiger Temperaturbereich

QS

Quantifizierungsstandard

IC

Interne Kontrolle

Austria ■ **QIAGEN Vertriebs GmbH** ■ Löwengasse 47/6 ■ 1030 Wien
Orders 0800/28-10-10 ■ Fax 0800/28-10-19 ■ Technical 0800/28-10-11

Canada ■ **QIAGEN Inc.** ■ 2800 Argentia Road ■ Unit 7 ■ Mississauga ■ Ontario ■ L5N 8L2
Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

France ■ **QIAGEN S.A.** ■ 3 avenue du Canada ■ LP 809 ■ 91974 COURTABOEUF CEDEX
Orders 01-60-920-920 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930

Germany ■ **QIAGEN GmbH** ■ QIAGEN Strasse 1 ■ 40724 Hilden
Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

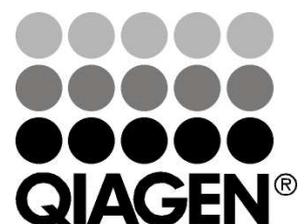
Italy ■ **QIAGEN S.p.A.** ■ Via Grosio, 10/10 ■ 20151 Milano
Orders 02-33430-411 ■ Fax 02-33430-426 ■ Technical 800-787980

Japan ■ **QIAGEN K.K.** ■ Forefront Tower II ■ 13-1, Kachidoki 3 Chome ■ Chuo-ku, Tokyo 104-0054
Telephone 03-5547-0811 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-5547-0811

Switzerland ■ **QIAGEN AG** ■ Garstligweg 8 ■ 8634 Hombrechtikon
Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

USA ■ **QIAGEN Inc.** ■ 27220 Turnberry Lane ■ Valencia ■ CA 91355
Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

1046927DE



Sample & Assay Technologies