

# *artus*<sup>®</sup> Influenza/H5 LC RT-PCR Kit

## Handbuch



24 (Katalog Nr. 4522003)

Nur für Forschungszwecke

Zur Verwendung mit dem *LightCycler*<sup>®</sup> Instrument

November 2007 – Version 1



4522003



1051101DE



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R3

**MAT**

1051101DE



*artus* Influenza/H5 LC RT-PCR Kit

Marken und Disclaimer

QIAGEN<sup>®</sup>, QIAamp<sup>®</sup>, *artus*<sup>®</sup> (QIAGEN Gruppe); *LightCycler*<sup>®</sup> (Roche Diagnostics).

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

Der *artus* Influenza/H5 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

<b>1. Inhalt</b> .....	<b>5</b>
<b>2. Lagerung</b> .....	<b>5</b>
<b>3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte</b> .....	<b>6</b>
<b>4. Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen</b> .....	<b>6</b>
<b>5. Erreger-Informationen</b> .....	<b>7</b>
<b>6. Prinzip der Real-Time PCR</b> .....	<b>8</b>
<b>7. Produktbeschreibung</b> .....	<b>8</b>
<b>8. Protokoll</b> .....	<b>9</b>
8.1 RNA-Isolierung .....	9
8.2 Interne Kontrolle .....	10
8.3 Vorbereitung der PCR .....	12
8.3.1 Vorbereitung der Influenza PCR .....	12
8.3.2 Vorbereitung der Influenza/H5 PCR .....	16
8.4 Programmierung des <i>LightCycler</i> <sup>®</sup> Instruments .....	18
8.4.1 Programmierung der Influenza PCR .....	18
8.4.2 Programmierung der Influenza/H5 PCR .....	20
<b>9. Auswertung</b> .....	<b>23</b>
9.1 Auswertung für Influenza.....	23
9.2 Auswertung für Influenza/H5 .....	26
<b>10. Troubleshooting</b> .....	<b>27</b>
10.1 Troubleshooting für Influenza RT-PCR .....	27
10.2 Troubleshooting für Influenza/H5 RT-PCR.....	29
<b>11. Spezifikationen</b> .....	<b>31</b>
11.1 Analytische Sensitivität.....	31

11.2	Spezifität.....	31
11.3	Subtypen .....	31
<b>12.</b>	<b>Besondere Hinweise zum Produkt-Gebrauch .....</b>	<b>31</b>
<b>13.</b>	<b>Sicherheitsinformationen.....</b>	<b>32</b>
<b>14.</b>	<b>Qualitätskontrolle .....</b>	<b>32</b>
<b>15.</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>32</b>
<b>16.</b>	<b>Erklärung der Symbole .....</b>	<b>33</b>

# artus<sup>®</sup> Influenza/H5 LC RT-PCR Kit

Für die Verwendung mit dem *LightCycler<sup>®</sup>* 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. 4522003 24 Reaktionen
<b>Blau</b>	<i>Influenza LC Master 1</i>	2 x 12 rxns
<b>Schwarz</b>	<i>Influenza LC Master 2</i>	2 x 12 rxns
<b>Violett</b>	<i>Influenza/H5 LC Master</i>	2 x 12 rxns
<b>Gelb</b>	<i>Influenza LC Mg-Sol<sup>a</sup></i>	1 x 800 µl
<b>Rot</b>	<i>Influenza LC Control</i>	1 x 200 µl
<b>Braun</b>	<i>Influenza/H5 LC Control</i>	1 x 200 µl
<b>Grün</b>	<i>Influenza LC IC<sup>a</sup></i>	1 x 1.000 µl
<b>Weiß</b>	<i>Water (PCR grade)</i>	1 x 1.000 µl

<sup>a</sup> IC = Interne Kontrolle  
Mg-Sol = Magnesium-Lösung

## 2. Lagerung

Die Komponenten des *artus* Influenza/H5 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*<sup>®</sup> Kapillaren (20 µl)
- *LightCycler*<sup>®</sup> Cooling Block
- *LightCycler*<sup>®</sup> Instrument
- *LightCycler*<sup>®</sup> 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 lagern, aufreinigen 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*<sup>®</sup> Cooling Block arbeiten.

## 5. Erreger-Informationen

Die Influenza (Grippe) zählt immer noch zu den schwersten gesundheitlichen Bedrohungen weltweit. Die Bevölkerung ist regelmäßig von Influenza-Pandemien betroffen, die tausende Todesfälle zur Folge hat. Influenzaviren werden durch Aerosole übertragen. Infektionen mit Influenza-A- und Influenza-B-Viren führen zu schweren Erkrankungen der Atemwege mit oft tödlichem Ausgang. Dagegen zeichnet sich eine Infektion mit Influenza-C-Viren durch einen deutlich milderen Krankheitsverlauf aus.

Die Persistenz des Influenzavirus in der humanen Population ist auf das genetische Material und die antigenen Eigenschaften zurückzuführen. Die wichtigsten Hüllproteine sind Hämagglutinin (H) und Neuraminidase (N). Die Hüllproteine dieser Viren verändern sich kontinuierlich (Antigen Drift).

Der *artus* Influenza/H5 LC RT-PCR Kit enthält zusätzlich das Influenza/H5-spezifische Detektionsreagenz. Dieses Reagenz enthält Primer und Sonden für den spezifischen Nachweis von Hämagglutinin 5 (H5)-Sequenzen in Probenmaterial, das bereits mit dem Influenza-LC-Detektionssystem positiv getestet wurde. Die Primer und Sonden wurden so entwickelt, dass sie alle bisher bekannten Influenza/H5-Sequenzen nachweisen können. Bei Tieren (Vögeln) sollten auch andere Kombinationen von H5Nx-Subtypen berücksichtigt werden.

Da Influenzaviren schnell mutieren und sich insbesondere der H5N1-Stamm derzeit dem menschlichen Wirt anpasst, besteht ein erhöhtes Risiko des Auftretens weiterer Mutationen, die von den Amplifikationsreagenzien eventuell nicht nachgewiesen werden könnten.

Zu beachten ist, dass der molekulare Nachweis von Influenza-RNA der Proben ein starker Indikator für eine akute Infektion ist, aber dass ein negatives Influenza RT-PCR-Ergebnis eine Virusreplikation nicht ausschließt.

## 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* Influenza/H5 LC RT-PCR Kit besteht aus zwei gebrauchsfertigen Systemen für den Nachweis von Influenza-Virus-RNA und Influenza-Virus-H5-RNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) im *LightCycler*<sup>®</sup> Instrument. Der ***Influenza LC Master 1*** und ***2*** beinhaltet Reagenzien und Enzyme für die reverse Transkription und spezifische Amplifikation eines 143 bp langen Abschnitts des Influenzavirus (A/B)-Genoms sowie für die unmittelbare Detektion des Amplifikats im Fluorimeter-Kanal F1 des *LightCycler*<sup>®</sup> Instruments. Daneben enthält der *artus* Influenza/H5 LC RT-PCR Kit zum Nachweis einer möglichen PCR-Inhibition ein zweites heterologes Amplifikationssystem. Dieses wird als *Interne Kontrolle (IC)* im Fluorimeter-Kanal F3/Back-F1 detektiert. Dabei wird die Nachweisgrenze der analytischen Influenza RT-PCR nicht herabgesetzt. Der ***Influenza/H5 LC Master*** enthält Reagenzien und Enzyme für die reverse Transkription und spezifische Amplifikation eines 121 bp langen Abschnitts des Influenza-Virus-H5-Genoms sowie für die unmittelbare Detektion des Amplifikats im Fluorimeter-Kanal F2/Back-F1 im *LightCycler*<sup>®</sup> Instrument.

Zwei externe Positivkontrollen (*Influenza LC Control* & *Influenza/H5 LC Control*)<sup>\*</sup> werden mitgeliefert.

---

<sup>\*</sup> Enthält in-vitro transkribierte Subtyp-A-RNA.



**Wichtig:** Die Influenza/H5-Detektionsreagenzien beinhalten keine *Interne Kontrolle*. Der Influenza/H5 Master Mix wird erst nach dem Influenza RT-PCR Lauf eingesetzt.

## 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
Sputum; Rachenabstrich und Nasenabstrich in viralem Transportmedium	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
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>565,6 µl</b>	<b>6.787,2 µl</b>
<b>Volumen für die Aufreinigung</b>	<b>560 µl</b>	<b>je 560 µl</b>

- 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* Influenza/H5 LC RT-PCR Kit ist nicht geeignet für Aufreinigungsverfahren, die auf der Grundlage von **Phenol** arbeiten.

**Wichtig:** Die *Interne Kontrolle* des *artus* Influenza/H5 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 (Influenza 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 QIAamp 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* und 3 µl *Influenza LC Mg-Sol* direkt zu 12 µl *Influenza LC Master 1/2* 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 *Influenza LC Masters 1/2*, der *Influenza LC Mg-Sol* und der *Internen Kontrolle* entsprechend der Probenzahl (siehe **8.3 Vorbereitung der PCR**).

**Wichtig:** Die Influenza/H5-Detektionsreagenzien beinhalten keine *Interne Kontrolle*. Der Influenza/H5 Master Mix wird erst nach dem Influenza RT-PCR Lauf eingesetzt.

---

\* 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 Vorbereitung der PCR

### 8.3.1 Vorbereitung der Influenza PCR

Stellen Sie sicher, dass der Cooling Block mit den darin enthaltenen Adaptern (Zubehör des *LightCycler*<sup>®</sup> Instruments) auf +4°C vorgekühlt ist. Setzen Sie die für die geplanten Reaktionen erforderliche Anzahl *LightCycler*<sup>®</sup> Kapillaren in die Adapter des Cooling Blocks. Beachten Sie dabei, dass pro PCR-Lauf eine Positiv- sowie eine Negativkontrolle (*Water, PCR grade*) mitgeführt werden. 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
<b>1. Ansetzen des Master Mixes</b>	<i>Influenza LC Master 1</i>	2 µl	24 µl
	<i>Influenza LC Master 2</i>	10 µl	120 µl
	<i>Influenza LC Mg-Sol</i>	3 µl	36 µl
	<i>Influenza LC IC</i>	0 µl	0 µl
	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>15 µl</b>	<b>180 µl</b>
<b>2. Ansetzen der PCR-Reaktion</b>	Master Mix	15 µl	je 15 µl
	Probe	5 µl	je 5 µl
	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>	<b>je 20 µl</b>

Wollen Sie die *Interne Kontrolle* **ausschließlich zur Kontrolle einer PCR-Inhibition** einsetzen, so muss sie direkt zum *Influenza LC Master 1/2* zugesetzt werden. In diesem Fall verwenden sie folgendes Pipettierschema (siehe auch schematische Übersicht in Abb. 2):

	Anzahl der Proben	1	12
<b>1. Ansetzen des Master Mixes</b>	<i>Influenza LC Master 1</i>	2 µl	24 µl
	<i>Influenza LC Master 2</i>	10 µl	120 µl
	<i>Influenza LC Mg-Sol</i>	3 µl	36 µl
	<i>Influenza LC IC</i>	0,5 µl	6 µl
	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>15,5 µl*</b>	<b>186 µl*</b>
<b>2. Ansetzen der PCR-Reaktion</b>	Master Mix	15 µl*	je 15 µl*
	Probe	5 µl	je 5 µl
	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>	<b>je 20 µl</b>

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 der *Influenza LC Control* 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.

## Influenza PCR: Zugabe der *Internen Kontrolle* zur Aufreinigung

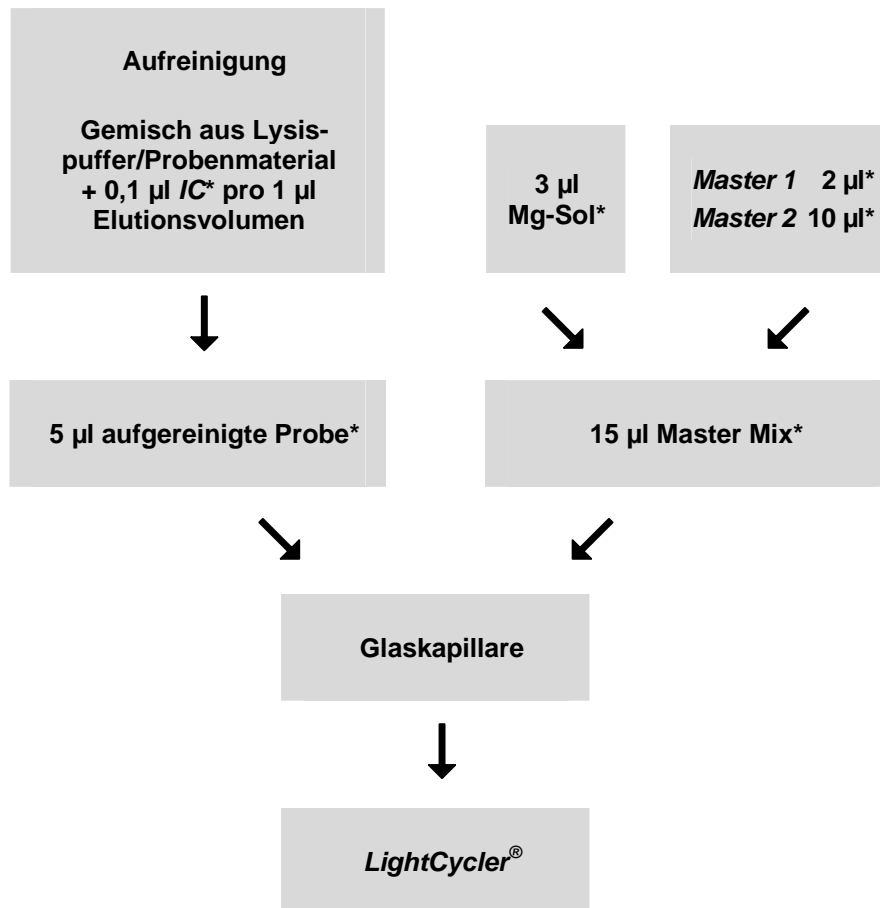


Abb. 1: Schematischer Arbeitsablauf zur Kontrolle von Aufreinigung und PCR-Inhibition.

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

**Influenza PCR:  
Zugabe der *Internen Kontrolle* zum *artus* Master**

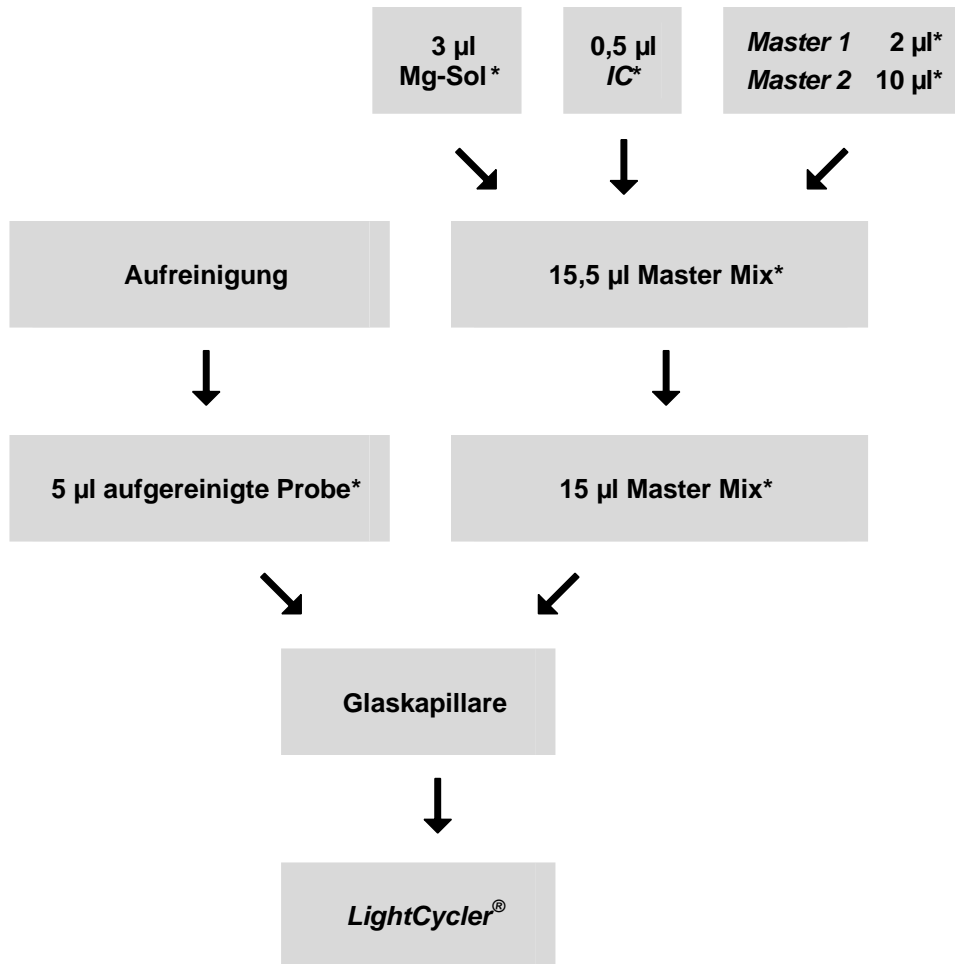


Abb. 2: Schematischer Arbeitsablauf zur Kontrolle der PCR-Inhibition.

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

### 8.3.2 Vorbereitung der Influenza/H5 PCR

Stellen Sie sicher, dass der Cooling Block mit den darin enthaltenen Adaptern (Zubehör des *LightCycler*<sup>®</sup> Instruments) auf +4°C vorgekühlt ist. Setzen Sie die für die geplanten Reaktionen erforderliche Anzahl *LightCycler*<sup>®</sup> Kapillaren in die Adapter des Cooling Blocks. Beachten Sie dabei, dass pro PCR-Lauf mindestens eine Positiv- sowie eine Negativkontrolle (*Water, PCR grade*) mitgeführt werden. Alle Reagenzien sollten vor Testbeginn vollständig bei Raumtemperatur aufgetaut, gut durchmischt (mehrfaches Auf- und Abpipettieren oder Invertieren des Reaktionsgefäßes) und anschließend anzentrifugiert werden. Zum Ansetzen der PCR-Reaktionen verwenden Sie bitte das folgende Pipettierschema (siehe auch schematische Übersicht in Abb. 3):

	Anzahl der Proben	1	12
1. Ansetzen des Master Mixes	<i>Influenza/H5 LC Master</i>	12 µl	144 µl
	<i>Influenza LC Mg-Sol</i>	3 µl	36 µl
	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>15 µl</b>	<b>180 µl</b>
2. Ansetzen der PCR-Reaktion	Master Mix	15 µl	je 15 µl
	Probe	5 µl	je 5 µl
	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>	<b>je 20 µl</b>

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 5 µl *Influenza/H5-LC-Control* als Positivkontrolle und 5 µl *Water, PCR grade* als Negativkontrolle 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 10 Sekunden bei maximal 400 x g (2.000 Upm).

**Wichtig:** Die Influenza/H5 Detektionsreagenzien enthalten keine *Interne Kontrolle*. Der Influenza/H5-Master Mix kann erst nach dem Influenza RT-PCR Lauf eingesetzt werden.



### Vorbereitung der Influenza/H5 PCR

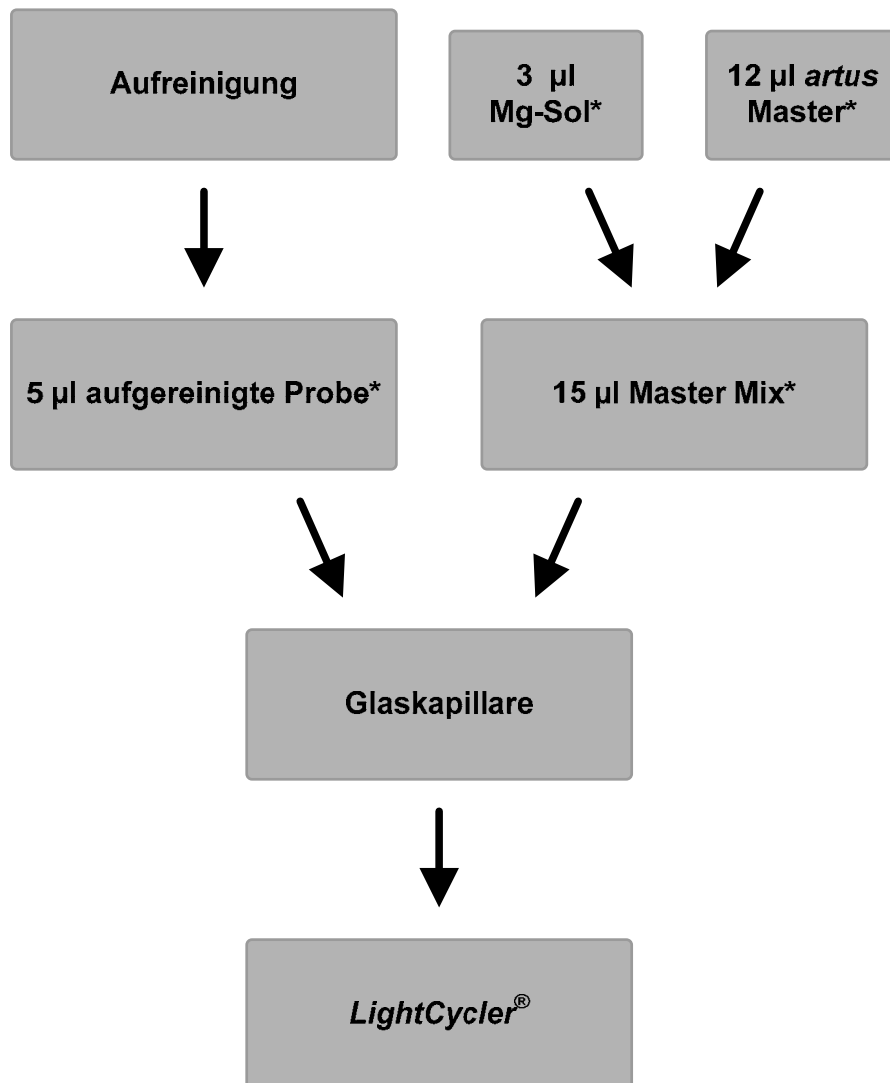


Abb. 3: Schematischer Ablauf.

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

## 8.4 Programmierung des *LightCycler*<sup>®</sup> Instruments

### 8.4.1 Programmierung der Influenza PCR

Zur Detektion der Influenza-Virus-RNA erstellen Sie auf Ihrem *LightCycler*<sup>®</sup> Instrument ein Temperaturprofil gemäß den folgenden vier Arbeitsschritten (siehe Abb. 4 - 6).

- |    |   |        |
|----|---|--------|
| A. | Reverse Transkription der RNA             | Abb. 4 |
| B. | Initiale Aktivierung des Hot Start-Enzyms | Abb. 5 |
| C. | Amplifikation der cDNA                    | Abb. 6 |
| D. | Kühlung                                   | Abb. 7 |

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*<sup>®</sup> Instruments finden Sie im *LightCycler Operator's Manual*.

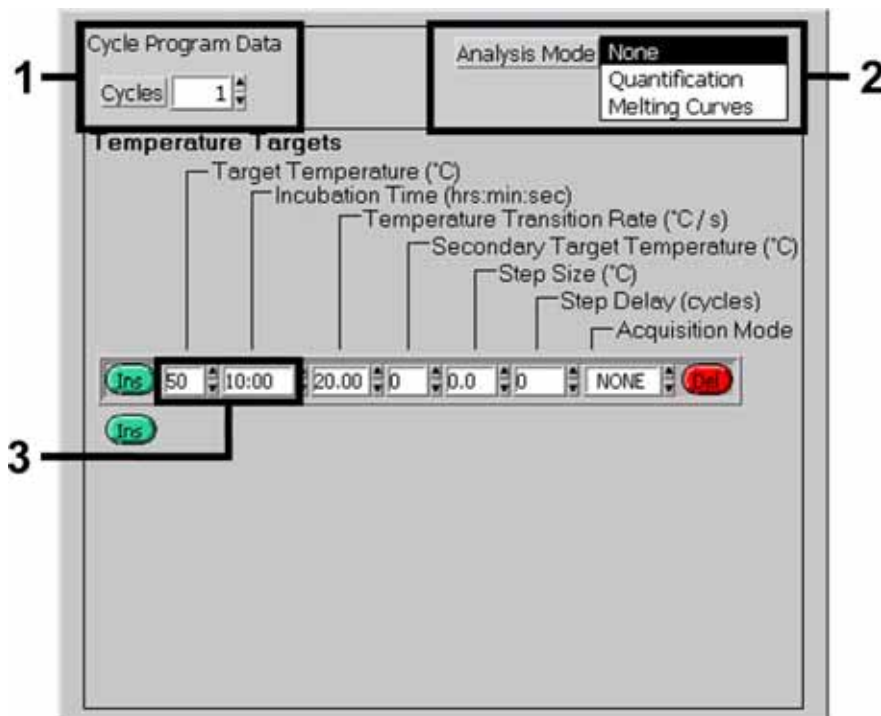


Abb. 4: Reverse Transkription der RNA.

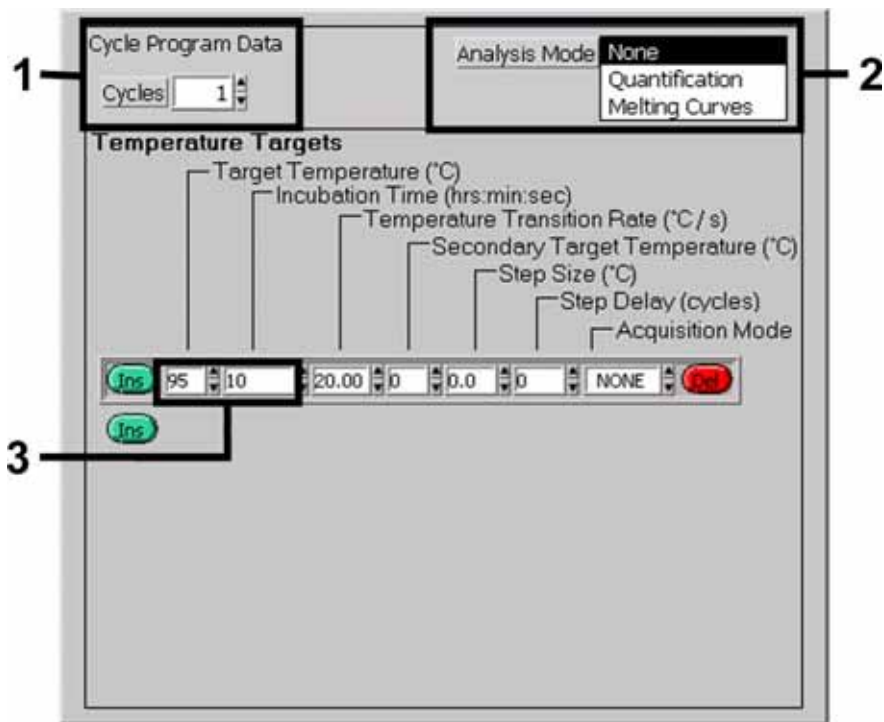


Abb. 5: Initiale Aktivierung des Hot Start-Enzyms.

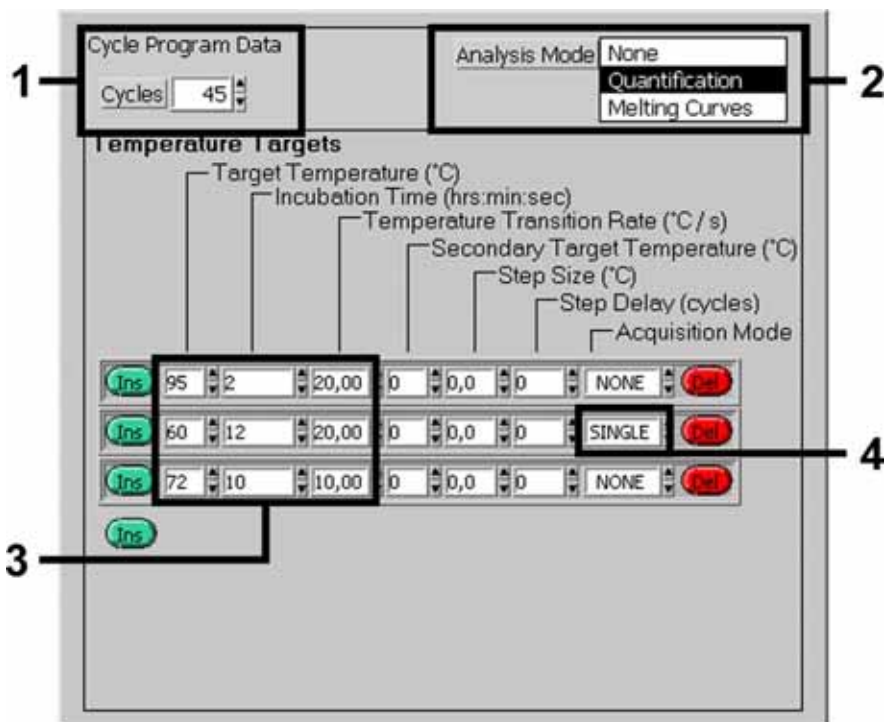


Abb. 6: Amplifikation der cDNA.

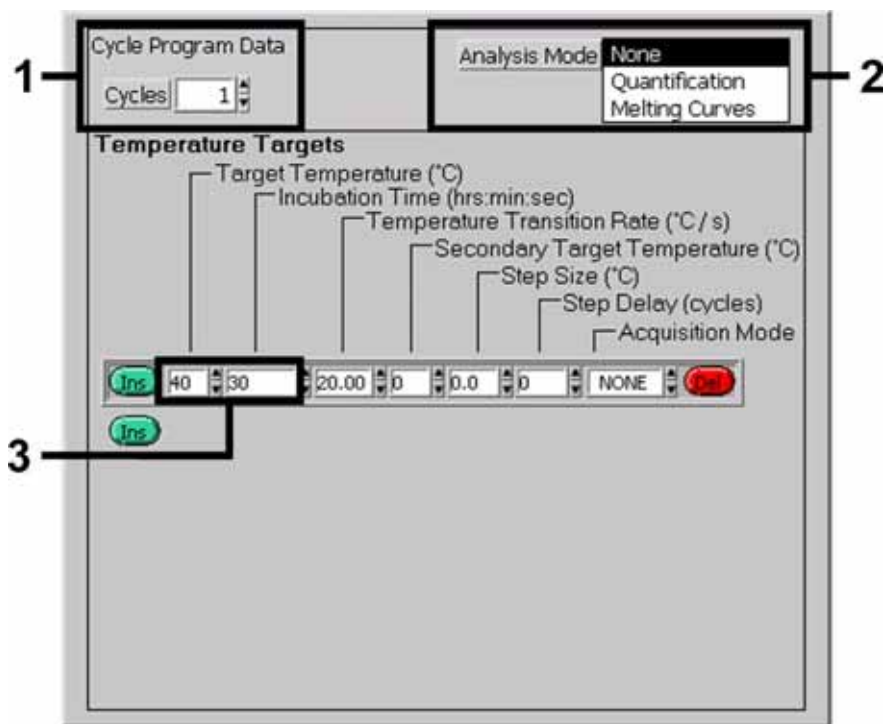


Abb. 7: Kühlung.

#### 8.4.2 Programmierung der Influenza/H5 PCR

Zur Detektion der Influenza/H5-Virus RNA erstellen Sie auf Ihrem *LightCycler*<sup>®</sup> Instrument ein Temperaturprofil gemäß den folgenden vier Arbeitsschritten (siehe Abb. 8 - 11).

- |    |   |         |
|----|---|---------|
| A. | Reverse Transkription der RNA             | Abb. 8  |
| B. | Initiale Aktivierung des Hot Start-Enzyms | Abb. 9  |
| C. | Amplifikation der cDNA                    | Abb. 10 |
| D. | Kühlung                                   | Abb. 11 |

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*<sup>®</sup> Instruments finden Sie im *LightCycler Operator's Manual*.

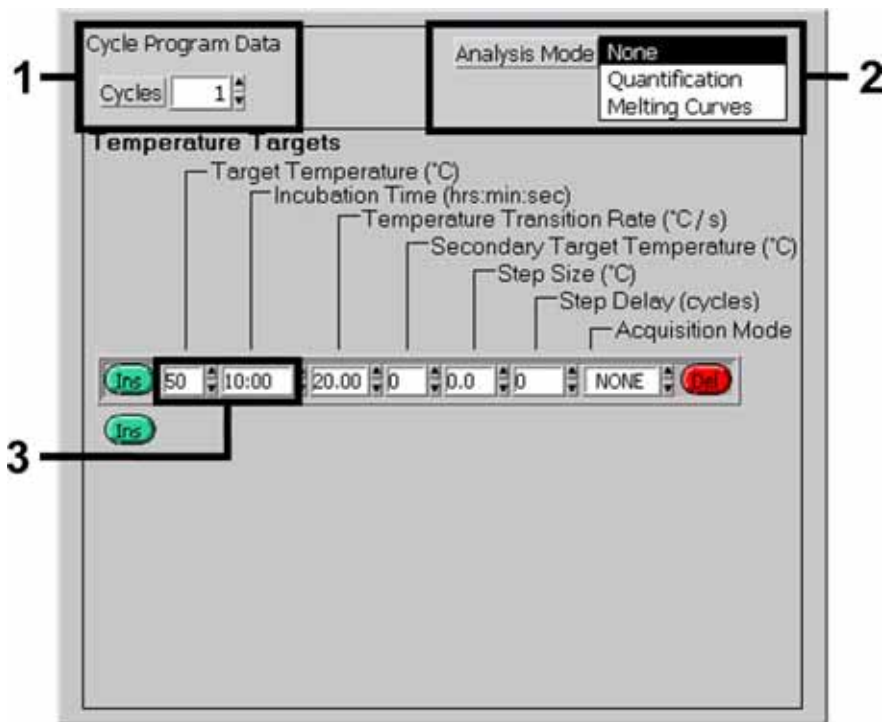


Abb. 8: Reverse Transkription der RNA.

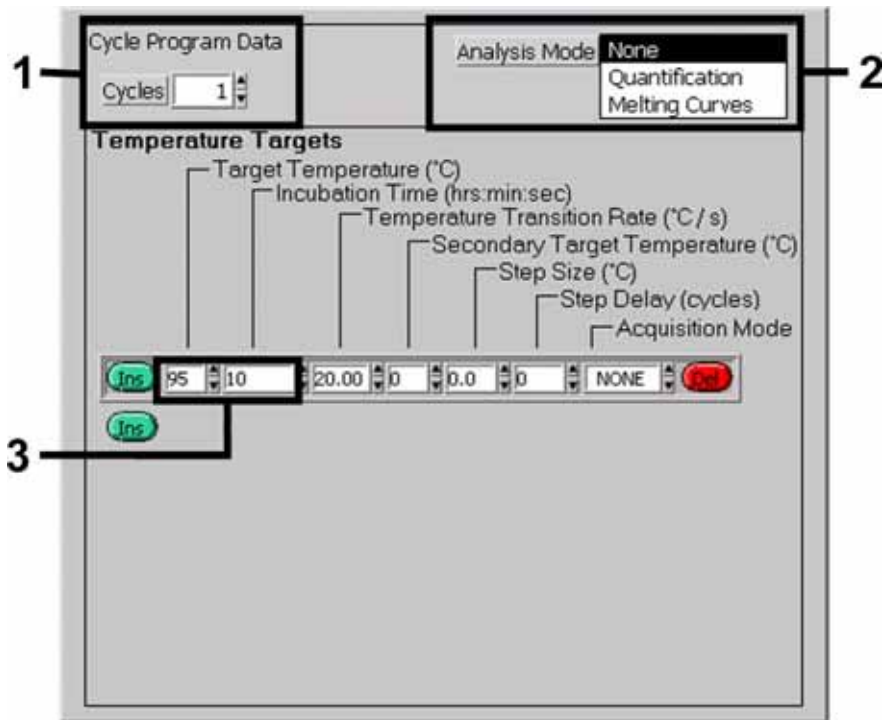


Abb. 9: Initiale Aktivierung des Hot Start-Enzyms.

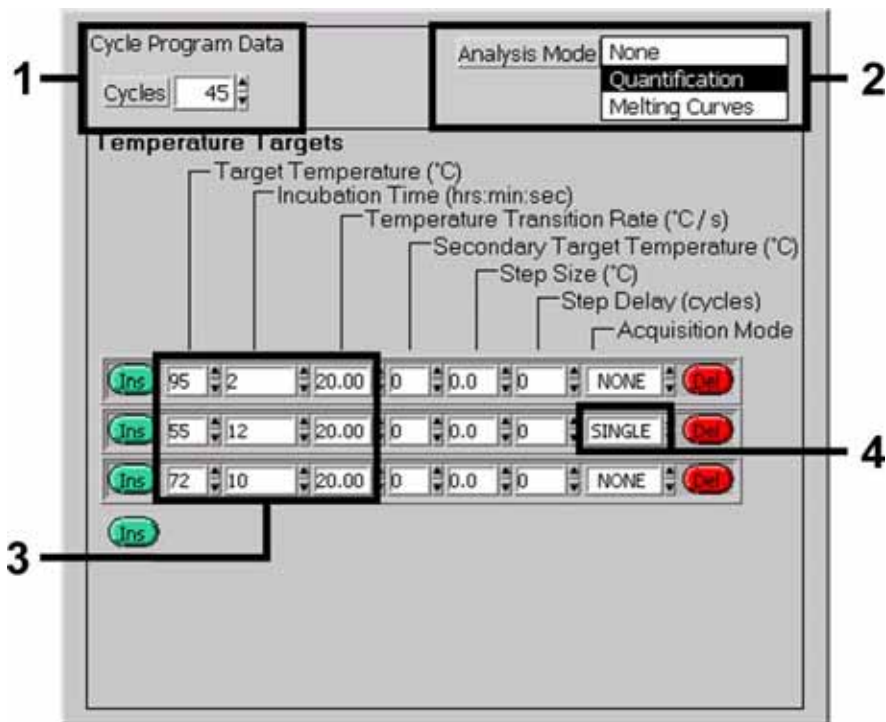


Abb. 10: Amplifikation der cDNA.

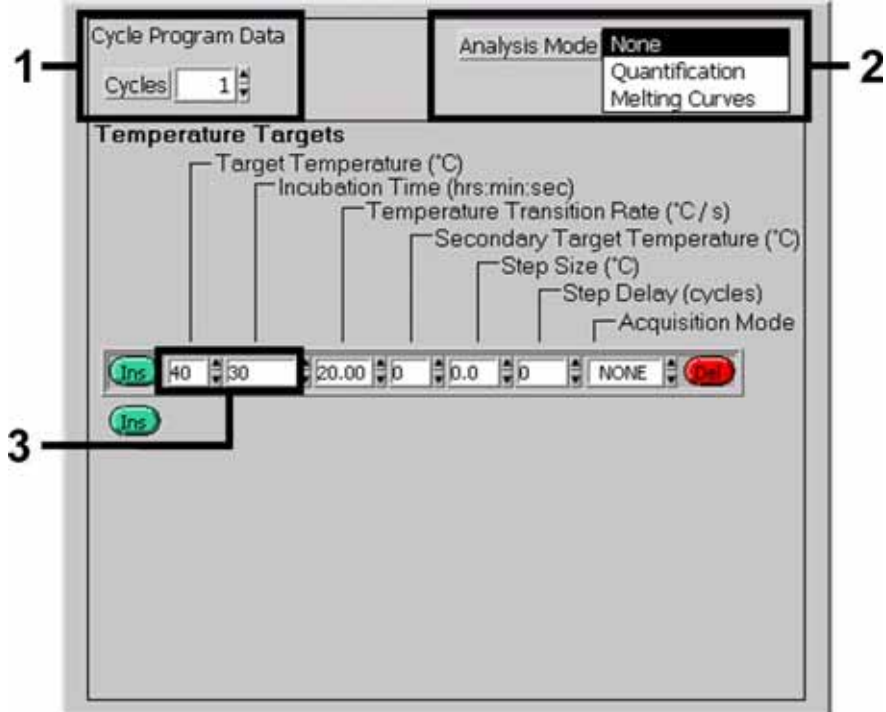


Abb. 11: Kühlung.

## 9. Auswertung

### 9.1 Auswertung für Influenza

Bei Multicolor-Analysen treten Interferenzen zwischen den Fluorimeter-Kanälen auf. Die Software des *LightCycler*<sup>®</sup> 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* Influenza/H5 LC RT-PCR Kit gewonnen werden, wählen Sie bitte die Ansichtsfunktionen F1 für die analytische Influenza RT-PCR bzw. F3/Back-F1 für die RT-PCR der *Internen Kontrolle*.

Folgende Ergebnisse können auftreten:

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

**Das Ergebnis der Analyse ist positiv: Die Probe enthält Influenza-Virus-RNA.**

In diesem Fall ist die Detektion eines Signals im Kanal F3/Back-F1 unwesentlich, da hohe Ausgangskonzentrationen an Influenza-Virus-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 Influenza-Virus-RNA nachweisbar. Sie kann daher als negativ angesehen werden.**

Bei negativer Influenza 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.

Ein Beispiel für positive und negative PCR-Reaktionen ist in Abb. 12 und Abb. 13 wiedergegeben.



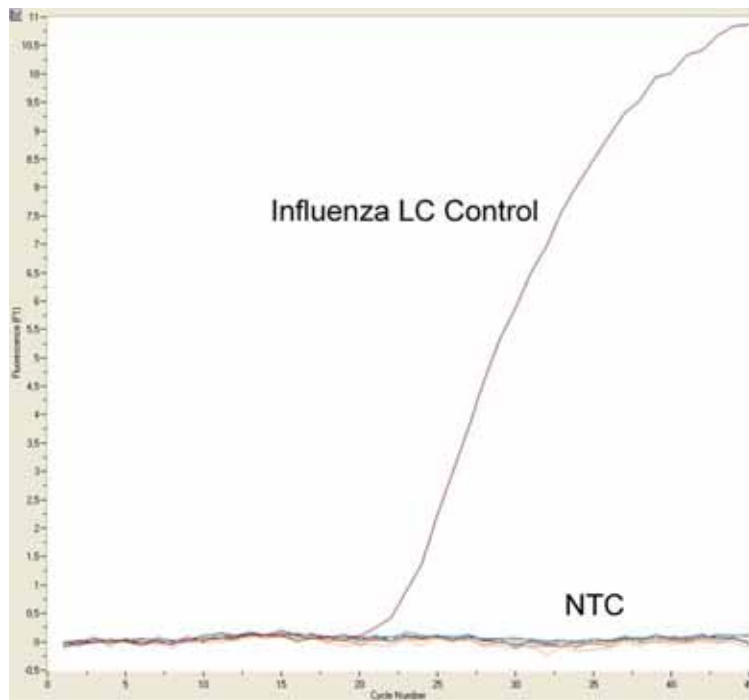


Abb. 12: Nachweis der Positivkontrolle (*Influenza LC Control*) im Fluorimeter-Kanal F1. NTC: non-template control (Negativkontrolle).

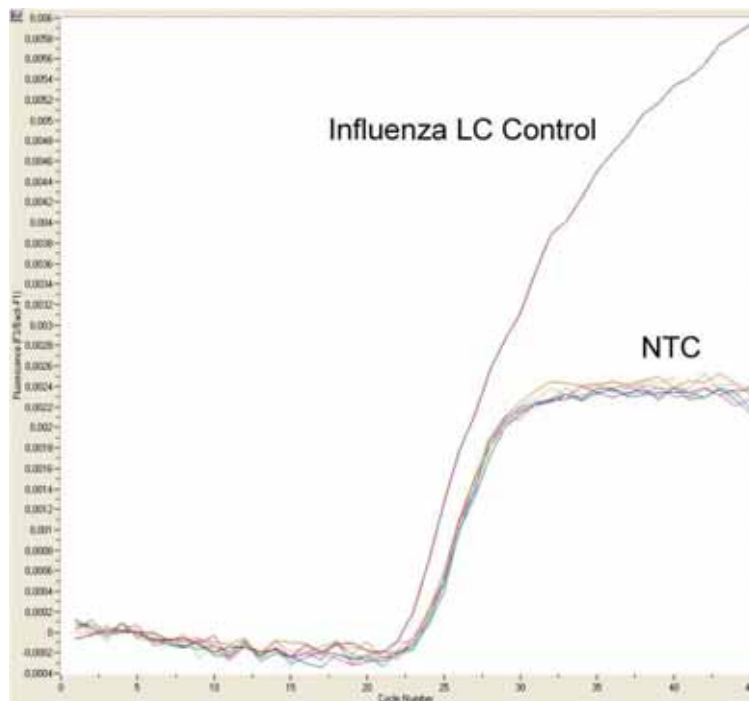


Abb. 13: Nachweis der *Internen Kontrolle (IC)* im Fluorimeter-Kanal F3/Back-F1 bei gleichzeitiger Amplifikation der Positivkontrolle (*Influenza LC Control*). NTC: non-template control (Negativkontrolle).

## 9.2 Auswertung für Influenza/H5

Bei Multicolor-Analysen treten Interferenzen zwischen den Fluorimeter-Kanälen auf. Die Software des *LightCycler*<sup>®</sup> 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* Influenza/H5 LC RT-PCR Kit gewonnen werden, wählen Sie bitte die Ansichtsfunktionen F2/Back-F1 für die analytische Influenza/H5 RT-PCR.

Folgende Ergebnisse können auftreten:

1. Im Fluorimeter-Kanal F2/Back-F1 wird ein Signal detektiert.

**Das Ergebnis der Analyse ist positiv: Die Probe enthält Influenza/H5-Virus-RNA.**

2. Im Fluorimeter-Kanal F2/Back-F1 wird kein Signal detektiert.

**In der Probe ist keine Influenza/H5-Virus-RNA nachweisbar. Sie kann daher als negativ für Influenza/H5 angesehen werden. Es ist jedoch zu beachten, dass eine negative Influenza/H5-Probe dennoch einen Nicht-H5-Virusstamm enthalten kann.**

Bei negativer Influenza/H5 RT-PCR schließt das detektierte Signal der *Internen Kontrolle* der vorherigen Influenza RT-PCR die Möglichkeit einer RT-PCR-Inhibition aus.

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

Beispiele für positive und negative PCR-Reaktionen sind in Abb. 14 wiedergegeben.

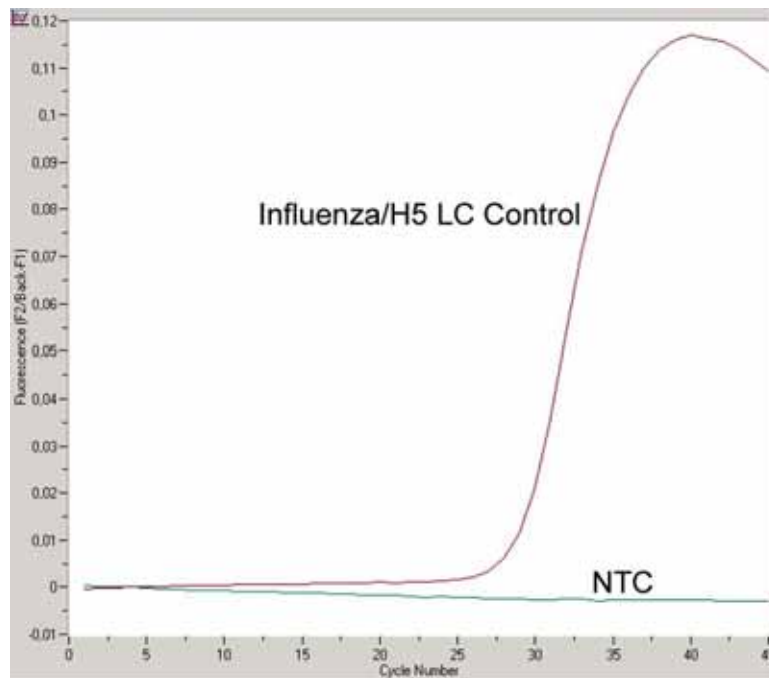


Abb. 14: Nachweis der Positivkontrolle (*Influenza/H5 LC Control*) im Fluorimeter Kanal F2/Back-F1. NTC: non-template control (Negativkontrolle).

## 10. Troubleshooting

### 10.1 Troubleshooting für Influenza RT-PCR

#### Kein Signal bei der Positivkontrolle (*Influenza LC Control*) 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 Influenza RT-PCR und den Fluorimeter-Kanal F3/Back-F1 für die RT-PCR der *Internen Kontrolle*.
- Die Programmierung des Temperaturprofils des *LightCycler*<sup>®</sup> Instruments ist fehlerhaft.
  - Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit den Protokollangaben (siehe **8.4.1 Programmierung des *LightCycler*<sup>®</sup> Instruments**).
- Fehlerhaftes Zusammenstellen der PCR-Reaktion.
  - Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte mit Hilfe des Pipettierschemas (siehe **8.3 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 Influenza/H5 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 Aufreinigungsverfahren 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 entsprachen nicht den in **2. Lagerung** angeführten Vorschriften oder das Haltbarkeitsdatum des artus Influenza/H5 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.

### **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.

## **10.2 Troubleshooting für Influenza/H5 RT-PCR**

### **Kein Signal bei der Positivkontrolle (*Influenza/H5 LC Control*) im Fluorimeter-Kanal F2/Back-F1:**

- Die Wahl des Fluorimeter-Kanals bei der PCR-Datenanalyse entspricht nicht den Protokollangaben.
  - Wählen Sie für die Datenanalyse den Fluorimeter-Kanal F2/Back-F1 für die analytische Influenza/H5 RT-PCR.
- Die Programmierung des Temperaturprofils des *LightCycler*<sup>®</sup> Instruments ist fehlerhaft.
  - Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit den Protokollangaben (siehe **8.4.2 Programmierung des *LightCycler*<sup>®</sup> Instruments**).
- Fehlerhaftes Zusammenstellen der PCR-Reaktion.
  - Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte mit Hilfe des Pipettierschemas (siehe **8.3 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* Influenza/H5 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.

### **Signale bei den Negativkontrollen im Fluorimeter-Kanal F2/Back-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, kontaktieren Sie bitte unseren Technischen Service.

## 11. Spezifikationen

### 11.1 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität des *artus* Influenza/H5 LC RT-PCR Kits wird derzeit in Validierungsstudien bestimmt.

### 11.2 Spezifität

Die Spezifität des *artus* Influenza/H5 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 Sub-/Genotypen kontrolliert.

### 11.3 Subtypen

Das Assay-Design ist auf die Detektion aller Influenza A-Subtypen (H1 - H15 und N1 - N9) ausgelegt. Weiterhin werden alle Influenza B-Varianten erkannt. Bei Schwierigkeiten im Zusammenhang mit der Subtypen-Detektion, kontaktieren Sie bitte unseren Technischen Service.

## 12. Besondere Hinweise zum Produkt-Gebrauch

- Der *artus* Influenza/H5 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* Influenza/H5 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* Influenza/H5 LC RT-PCR Kit können Sie den entsprechenden Material Sicherheits-Datenblättern entnehmen (material safety data sheets, MSDS). Diese finden Sie als kompakte und anwenderfreundliche PDF-Datei unter [www.qiagen.com/support/msds.aspx](http://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* Influenza/H5 LC RT-PCR Kits gegen vorgegebene Spezifikationen getestet, um eine einheitliche Produktqualität zu gewährleisten.

## **15. Literatur**

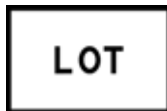
Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 - 212.



## 16. Erklärung der Symbole



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung



Hersteller



Bestellnummer



Materialnummer



Handbuch



<N>

Inhalt reicht für <N> Tests



Zulässiger Temperaturbereich

**IC**

*Interne Kontrolle*

**Mg-Sol**

*Magnesium-Lösung*





**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)

1051101DE

