

# artus<sup>®</sup> WNV TM RT-PCR Kit

## Handbuch



24 (Katalog Nr. 4509103)



96 (Katalog Nr. 4509105)

Nur für Forschungszwecke

Zur Verwendung mit den

*ABI PRISM<sup>®</sup> 7000, 7700 und 7900HT Sequence Detection Systems*

Juni 2007 – Version 1



4509103, 4509105



1046925DE



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R1

**MAT**

1046925DE



*artus* WNV TM RT-PCR Kit

Marken und Disclaimer

QIAGEN®, QIAamp®, *artus*® (QIAGEN Gruppe); *ABI PRISM*® (Applied Biosystems); MicroAmp®, *GeneAmp*® (Applied Biosystems).

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

Der *artus* WNV TM 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>6</b>
<b>3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte.....</b>	<b>6</b>
<b>4. Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen .....</b>	<b>7</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 Quantifizierung .....	11
8.4 Vorbereitung der PCR .....	13
8.5 Programmierung der <i>ABI PRISM</i> <sup>®</sup> <i>SDS</i> .....	18
8.5.1 Programmierung des <i>ABI PRISM</i> <sup>®</sup> <i>7000 SDS</i> .....	18
8.5.1.1 Voreinstellungen bei der Erstellung eines neuen PCR-Laufs .....	18
8.5.1.2 Erstellung/Auswahl der Detektoren .....	19
8.5.1.3 Zuordnung der notwendigen Informationen zu den Plattenpositionen .....	21
8.5.1.4 Erstellung des Temperaturprofils .....	22
8.5.1.5 Speichern des PCR-Laufs .....	23
8.5.1.6 Starten des PCR-Laufs .....	23
8.5.2 Programmierung des <i>ABI PRISM</i> <sup>®</sup> <i>7700 SDS</i> .....	24
8.5.2.1 Voreinstellungen bei der Erstellung eines neuen PCR-Laufs .....	24
8.5.2.2 Auswahl der Fluoreszenzfarbstoffe und Zuordnung des Probenotyps .....	25
8.5.2.3 Zuordnung der notwendigen Informationen zu den Plattenpositionen .....	26
8.5.2.4 Erstellung des Temperaturprofils .....	27

8.5.2.5	Wichtige Zusatzeinstellungen .....	28
8.5.2.6	Speichern des PCR-Laufs .....	30
8.5.2.7	Starten des PCR-Laufs.....	30
8.5.3	Programmierung des <i>ABI PRISM® 7900HT SDS</i> .....	31
8.5.3.1	Voreinstellungen bei der Erstellung eines neuen PCR-Laufs .....	31
8.5.3.2	Erstellung/Auswahl der Detektoren .....	32
8.5.3.3	Zuordnung der notwendigen Informationen zu den Platten- positionen .....	33
8.5.3.4	Erstellung des Temperaturprofils.....	34
8.5.3.5	Speichern des PCR-Laufs .....	36
8.5.3.6	Starten des PCR-Laufs.....	36
<b>9.</b>	<b>Auswertung.....</b>	<b>37</b>
<b>10.</b>	<b>Troubleshooting .....</b>	<b>42</b>
<b>11.</b>	<b>Spezifikationen .....</b>	<b>44</b>
11.1	Analytische Sensitivität.....	44
11.2	Spezifität.....	45
11.3	Präzision.....	46
11.4	Robustheit .....	48
11.5	Reproduzierbarkeit .....	48
11.6	Diagnostische Evaluierung.....	48
<b>12.</b>	<b>Besondere Hinweise zum Produkt-Gebrauch .....</b>	<b>49</b>
<b>13.</b>	<b>Sicherheitsinformationen.....</b>	<b>49</b>
<b>14.</b>	<b>Qualitätskontrolle .....</b>	<b>49</b>
<b>15.</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>49</b>
<b>16.</b>	<b>Erklärung der Symbole .....</b>	<b>50</b>

## artus<sup>®</sup> WNV TM RT-PCR Kit

Für die Verwendung mit den *ABI PRISM<sup>®</sup> 7000, 7700 und 7900HT Sequence Detection Systems*.

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

**Beachte:** Der *artus WNV TM RT-PCR Kit* kann weder in Verbindung mit dem *GeneAmp<sup>®</sup> 5700 SDS* noch mit dem 384er Plattenformat des *ABI PRISM<sup>®</sup> 7900HT SDS* verwendet werden.

### 1. Inhalt

	Beschriftung und Inhalt	Art.-Nr. 4509103 24 Reaktionen	Art.-Nr. 4509105 96 Reaktionen
Blau	WNV TM Master	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
Gelb	WNV TM Mg-Sol <sup>a</sup>	1 x 1.400 µl	1 x 1.400 µl
Rot	WNV LC/TM QS 1 <sup>a</sup> 4 x 10 <sup>4</sup> cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rot	WNV LC/TM QS 2 <sup>a</sup> 4 x 10 <sup>3</sup> cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rot	WNV LC/TM QS 3 <sup>a</sup> 4 x 10 <sup>2</sup> cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rot	WNV LC/TM QS 4 <sup>a</sup> 4 x 10 <sup>1</sup> cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Grün	WNV TM IC <sup>a</sup>	1 x 1.000 µl	2 x 1.000 µl
Weiß	Water (PCR grade)	1 x 1.000 µl	1 x 1.000 µl

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

## 2. Lagerung

Die Komponenten des *artus* WNV TM 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
- Zentrifuge mit Rotor für Mikrotiterplatten (optional)
- 96-well Reaktionsplatte/Reaktionsgefäße für optische Messungen mit entsprechenden optischen Verschlussmaterialien\* (siehe **8.4 Vorbereitung der PCR**)
- 96-well zweiteiliger Halterahmen zur Verwendung von optischen Reaktionsgefäßen (*96-Well Tray/Retainer Set*, Kat.-Nr. 403 081, Applied Biosystems), siehe **8.4 Vorbereitung der PCR**
- Kompressionsmatte zur Verwendung mit optischen Klebefolien (*Optical Cover Compression Pads*, Kat.-Nr. 4 312 639, Applied Biosystems), siehe **8.4 Vorbereitung der PCR**

---

\* Die Benutzung von Reaktionsgefäßen für optische Messungen mit gewölbten Deckeln ist nur für den *ABI PRISM® 7700 SDS* zulässig und erfordert eine Umstellung der Belichtungszeit (siehe **8.5.2 Programmierung des ABI PRISM® 7700 SDS**, 8.5.2.5 Wichtige Zusatzeinstellungen).

- Applikator zum Verschließen der Reaktionsplatten unter Verwendung von optischen Klebefolien (*Adhesive Seal Applicator Kit*, Kat.-Nr. 4 333 183, Applied Biosystems)
- *ABI PRISM® 7000, 7700 oder 7900HT SDS*

**Beachte:** Eine vorliegende gültige Kalibrierung der Farbstoffe (*Pure Spectra Component File*) und des Hintergrundes (*Background Component File*) ist bei Inbetriebnahme der Geräte unbedingt erforderlich.

## 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 Kühlblock arbeiten.

## 5. Erreger-Informationen

Das West-Nil-Virus (WNV) gehört zu der Familie der *Flaviviridae* (Gattung *Flavivirus*). Wildlebende Vögel stellen das Erregerreservoir für die Viren dar, die durch Stechmücken übertragen werden. Das WNV kann aber auch Menschen und andere Säugetiere infizieren. Bei 80 % aller infizierten Menschen verläuft die Krankheit inapparent. Bei älteren Menschen, bei Kindern und bei immunsupprimierten Patienten kann die Infektion mit dem West-Nil-Virus allerdings in seltenen Fällen zu einer Enzephalitis sowie einer Myokarditis führen, die tödlich verlaufen können.

## 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* WNV TM RT-PCR Kit ist ein gebrauchsfertiges System für den Nachweis von WNV-RNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) im *ABI PRISM® 7000, 7700 und 7900HT Sequence Detection System*. Der *WNV TM Master* beinhaltet Reagenzien und Enzyme für die reverse Transkription und spezifische Amplifikation eines 72 bp langen Abschnitts des WNV-Genoms. Die Detektion des Amplifikats erfolgt durch die Messung der FAM-Fluoreszenz im *ABI PRISM® SDS*. Daneben enthält der *artus* WNV TM RT-PCR Kit zum Nachweis einer möglichen PCR-Inhibition ein zweites heterologes Amplifikationssystem. Dieses wird als *Interne Kontrolle (IC)* durch die Messung der JOE-Fluoreszenz nachgewiesen. Dabei wird die Nachweisgrenze der analytischen WNV RT-PCR (siehe **11.1 Analytische Sensitivität**) nicht herabgesetzt. Es werden externe Positivkontrollen (*WNV LC/TM 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:

Proben-material	Aufreinigungskit	Katalog-nummer	Hersteller	Carrier-RNA
Plasma, 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
<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* WNV TM RT-PCR Kit ist nicht geeignet für Aufreinigungsverfahren, die auf der Grundlage von **Phenol** arbeiten.

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

## 8.2 Interne Kontrolle

Es wird eine *Interne Kontrolle* (*WNV TM 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 2 µl der *Internen Kontrolle* und 12 µl *WNV TM Mg-Sol* direkt zu 18 µl *WNV TM Master* hinzu. Verwenden Sie für jede PCR-Reaktion 30 µl des so hergestellten Master Mixes\* und fügen Sie anschließend 20 µl der aufgereinigten Probe hinzu. Sollten Sie einen Lauf für mehrere Proben ansetzen, so erhöhen Sie die benötigten Mengen des *WNV TM Masters*, der *WNV TM Mg-Sol* und der *Internen Kontrolle* entsprechend der Probenzahl (siehe **8.4 Vorbereitung der PCR**).

### 8.3 Quantifizierung

Die mitgelieferten *Quantifizierungsstandards* (*WNV LC/TM QS 1 - 4*) werden wie eine bereits aufgereinigte Probe behandelt und im gleichen Volumen eingesetzt (20 µl). Um in einem *ABI PRISM® Sequence Detection System* eine Standardkurve zu erstellen, setzen Sie bitte alle vier mitgelieferten *Quantifizierungsstandards* ein und definieren Sie diese als Standards unter Angabe der entsprechenden Konzentrationen (siehe **8.5 Programmierung der ABI PRISM® SDS**). Der Import von Standardkurven aus vorangegangenen Läufen ist mit der *ABI PRISM® 7000, 7700 und 7900HT SDS* Software nicht möglich.

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

---

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

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

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 *ABI PRISM® 7000 SDS* gibt es unter [www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX](http://www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX) einen Leitfaden (**Technical Note zur Quantifizierung am *ABI PRISM® 7000 SDS***).

## 8.4 Vorbereitung der PCR

Stellen Sie die für die geplanten Reaktionen erforderliche Anzahl an Reaktionsgefäßen bzw. eine 96-well Reaktionsplatte bereit. In der nachfolgenden Tabelle sind empfohlene Materialien aufgeführt:

Artikel	Bezeichnung	Katalog-nummer	Hersteller	Halte-rahmen*	Kompressions-matte
96-well optische Reaktionsplatte	96-Well Optical Reaction Plate	4 306 737	Applied Biosystems	nein	-
Optische Klebefolien	Optical Adhesive Covers	4 311 971	Applied Biosystems	-	ja
Optische Reaktionsgefäße	<i>ABI PRISM</i> <sup>®</sup> Optical Tubes, 8 Tubes/Strip	4 316 567	Applied Biosystems	ja	-
Optische Reaktionsgefäße	MicroAmp <sup>®</sup> Optical Tubes	N8010933	Applied Biosystems	ja	-
Optische Deckel (flach)	<i>ABI PRISM</i> <sup>®</sup> Optical Caps, 8 Caps/Strip	4 323 032	Applied Biosystems	-	nein

**Beachte:** Die Benutzung von Reaktionsgefäßen für optische Messungen mit gewölbten Deckeln ist nur für das *ABI PRISM*<sup>®</sup> 7700 SDS Instrument zulässig und erfordert eine Umstellung der Belichtungszeit (siehe **8.5.2 Programmierung des *ABI PRISM*<sup>®</sup> 7700 SDS**, 8.5.2.5 Wichtige Zusatzeinstellungen).

Beachten Sie beim Ansetzen der PCR, 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* (*WNV LC/TM QS 1 - 4*). Alle Reagenzien sollten vor Testbeginn vollständig bei Raumtemperatur aufgetaut, gut durchmischt (mehrfaches Auf- und

---

\* Bei der Benutzung des zweiteiligen Halterahmens ist es notwendig, die Reaktionsgefäße beim Einsetzen und beim Herausnehmen zu öffnen. Zur Vermeidung von dadurch bedingten Kontaminationen benutzen Sie bitte ausschließlich den unteren Teil des Halterahmens.

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>WNV TM Master</i>	18 µl	216 µl
	<i>WNV TM Mg-Sol</i>	12 µl	144 µl
	<i>WNV TM IC</i>	0 µl	0 µl
	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>30 µl</b>	<b>360 µl</b>
<b>2. Ansetzen der PCR-Reaktion</b>	Master Mix	30 µl	je 30 µl
	Probe	20 µl	je 20 µl
	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50 µl</b>	<b>je 50 µl</b>

Wollen Sie die *Interne Kontrolle* **ausschließlich zur Kontrolle einer PCR-Inhibition** einsetzen, so muss sie direkt zum *WNV TM Master* 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>WNV TM Master</i>	18 µl	216 µl
	<i>WNV TM Mg-Sol</i>	12 µl	144 µl
	<i>WNV TM IC</i>	2 µl	24 µl
	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>32 µl*</b>	<b>384 µl*</b>
<b>2. Ansetzen der PCR-Reaktion</b>	Master Mix	30 µl*	je 30 µl*
	Probe	20 µl	je 20 µl
	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50 µl</b>	<b>je 50 µl</b>

---

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

Pipettieren Sie in jedes Reaktionsgefäß bzw. in jede benötigte Vertiefung der 96-well Reaktionsplatte 30 µl des Master Mixes. Anschließend geben Sie 20 µl des Eluats aus der RNA-Isolierung hinzu. Achten Sie darauf, dass die beiden Lösungen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gut durchmischt werden. Verschließen Sie die Reaktionsgefäße mit den dazugehörigen Deckeln bzw. bei Benutzung einer 96-well Reaktionsplatte alternativ mit Hilfe optischer Klebefolien (*Optical Adhesive Covers*). Um das Ansatzvolumen im Röhrchen- bzw. Plattenboden zu sammeln, zentrifugieren Sie die Reaktionsgefäße (in einem für PCR-Röhrchen vorgesehenen Aufbewahrungsrack) bzw. die 96-well Reaktionsplatte in einer Zentrifuge mit Mikrotiterplattenrotor für 30 Sekunden bei 1.780 x g (4.000 Upm). Sollten Sie nicht über eine solche Zentrifuge verfügen, so achten Sie beim Ansetzen der PCR-Reaktionen bitte darauf, sowohl den Master Mix als auch das Probenvolumen auf den Boden der Reaktionsgefäße bzw. der Reaktionseinheiten (well) zu pipettieren. Lagern Sie die Reaktionsansätze bei +4 °C, bis das *ABI PRISM® SDS* Instrument programmiert ist (siehe **8.5 Programmierung der *ABI PRISM® SDS***) und überführen Sie diese anschließend in das Gerät.

**Beachte:**

- Setzen Sie bei Nutzung von optischen Reaktionsgefäßen in Kombination mit optischen Deckeln bitte stets einen Halterahmen (*96-Well Tray/Retainer Set*) in das Instrument (*ABI PRISM® 7000, 7700 und 7900HT SDS*) ein. Bei der Benutzung des zweiteiligen Halterahmens ist es notwendig, die Reaktionsgefäße beim Einsetzen und beim Herausnehmen zu öffnen. Zur Vermeidung von dadurch bedingten Kontaminationen benutzen Sie bitte ausschließlich den unteren Teil des Halterahmens.
- Die Benutzung von 96-well optischen Reaktionsplatten in Kombination mit optischen Klebefolien erfordert das Auflegen einer Kompressionsmatte (*Optical Cover Compression Pads*).

## Zugabe der *Internen Kontrolle* zur Aufreinigung

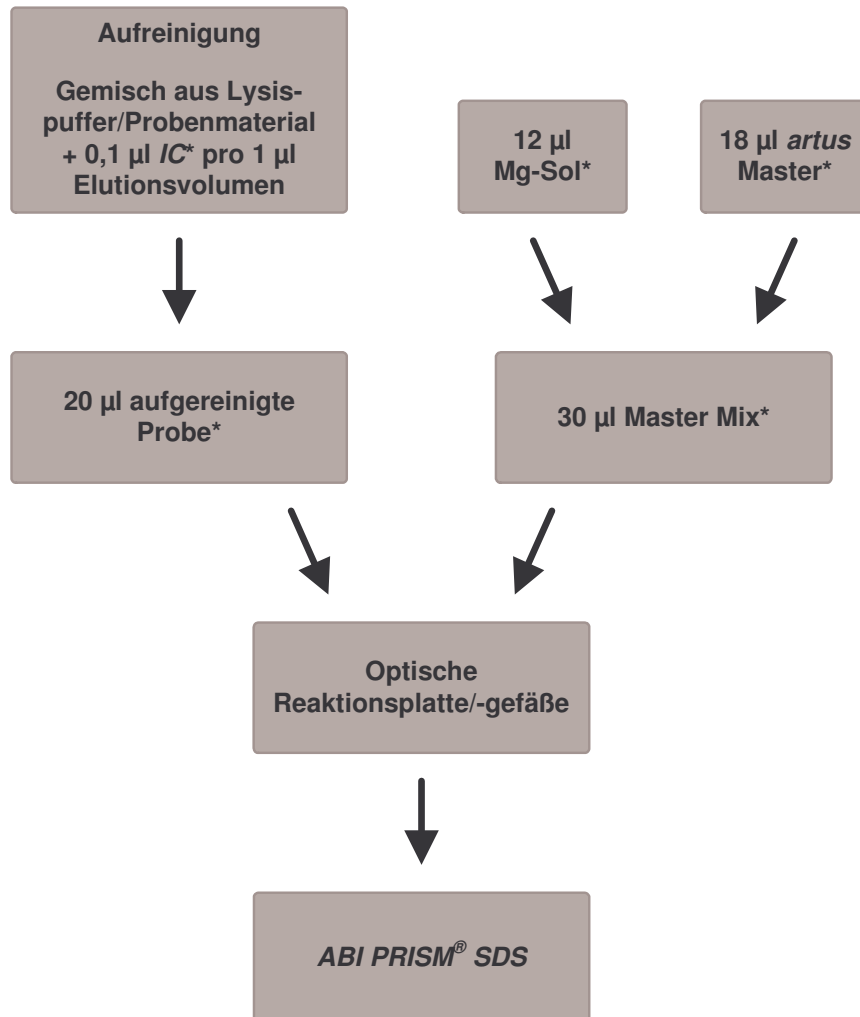


Abb. 1: Schematischer Arbeitsablauf zur Kontrolle von Aufreinigung und PCR-Inhibition.

\* 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

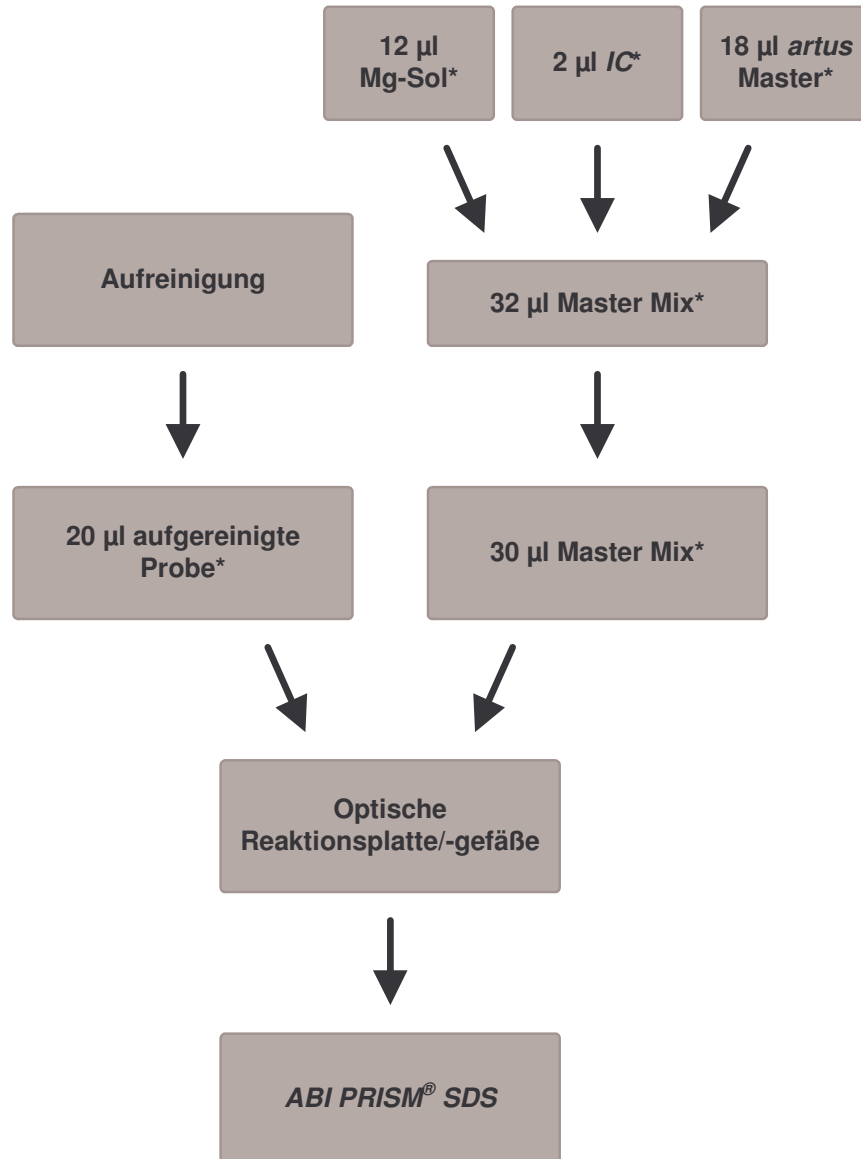


Abb. 2: Schematischer Arbeitsablauf zur Kontrolle der PCR-Inhibition.

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

## 8.5 Programmierung der *ABI PRISM*<sup>®</sup> *SDS*

Die Software der *ABI PRISM*<sup>®</sup> 7000, 7700 und 7900HT *Sequence Detection Systems* (*SDS*) benötigt vor dem Starten des PCR-Laufs einige Zusatzinformationen. Die Vorgehensweise bei der Programmierung der Geräte weicht allerdings erheblich voneinander ab, weshalb diese im Folgenden in getrennten Kapiteln behandelt werden.

### 8.5.1 Programmierung des *ABI PRISM*<sup>®</sup> 7000 *SDS*

Zur Detektion von WNV-RNA erstellen Sie auf Ihrem *ABI PRISM*<sup>®</sup> 7000 *SDS* ein Profil gemäß den folgenden sechs Arbeitsschritten (8.5.1.1 - 8.5.1.6). Alle Angaben beziehen sich auf die *ABI PRISM*<sup>®</sup> 7000 *SDS* Software-Version 1.0.1. Einzelheiten zur Programmierung des *ABI PRISM*<sup>®</sup> 7000 *SDS* entnehmen Sie bitte dem *ABI PRISM*<sup>®</sup> 7000 *SDS* *User Guide*. Zur besseren Übersicht sind die Einstellungen in den Abbildungen durch schwarze Rahmen hervorgehoben.

#### 8.5.1.1 Voreinstellungen bei der Erstellung eines neuen PCR-Laufs

Wählen Sie auf dem *ABI PRISM*<sup>®</sup> 7000 *SDS* den unter *File* befindlichen Menüpunkt *New* an und stellen Sie für das neue Dokument die folgenden Grundeinstellungen ein (siehe Abb. 3). Ein zuvor abgespeichertes Template (*SDS Template* [*\*.sdf*]) steht Ihnen in der *Template*-Liste oder durch Auswahl mittels *Browse*-Funktion zur Verfügung (siehe **8.5.1.5 Speichern des PCR-Laufs**). Bestätigen Sie Ihre Eingaben (*OK*).

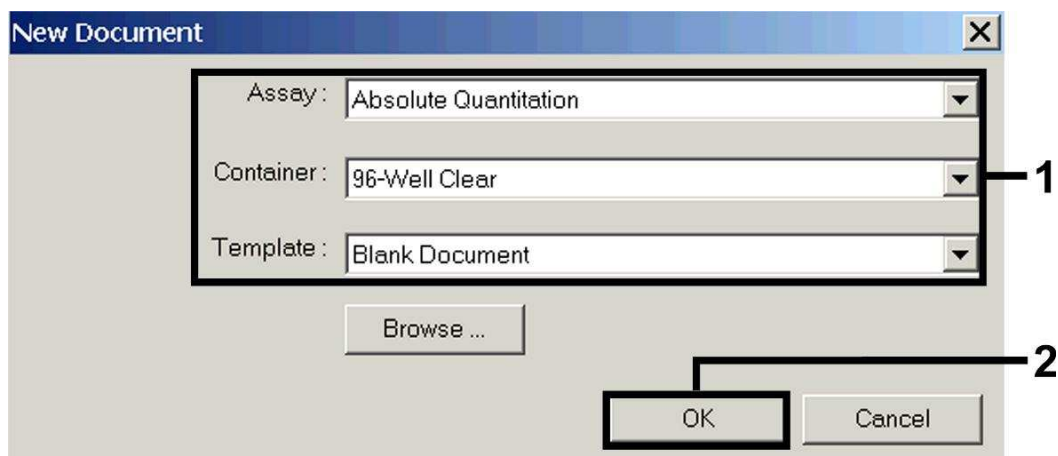


Abb. 3: Voreinstellungen bei der Erstellung eines neuen PCR-Laufs (*New Document*).

#### 8.5.1.2 Erstellung/Auswahl der Detektoren

Mit Hilfe des unter *Tools* befindlichen Untermenüs *Detector Manager* ordnen Sie dem Dokument die entsprechenden Detektorfarbstoffe zu. Zum Nachweis von WNV-RNA sowie der *Internen Kontrolle* mit Hilfe des *artus WNV TM RT-PCR Kits* sind die in der folgenden Tabelle angegebenen Reporter/Quencher zu definieren:

Nachweis	Reporter	Quencher
WNV-RNA	FAM	none
<i>Interne Kontrolle (WNV TM IC)</i>	JOE	none

Zur Erstellung dieser Detektoren wählen Sie die im *Detector Manager* links unten lokalisierte Option *File* und anschließend die Option *New* an.

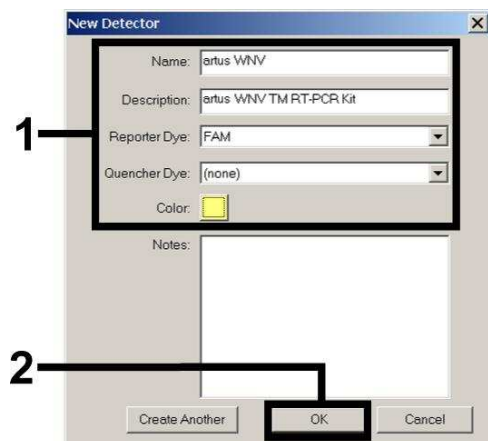


Abb. 4: Erstellung des WNV-spezifischen Detektors (*Detector Manager*).

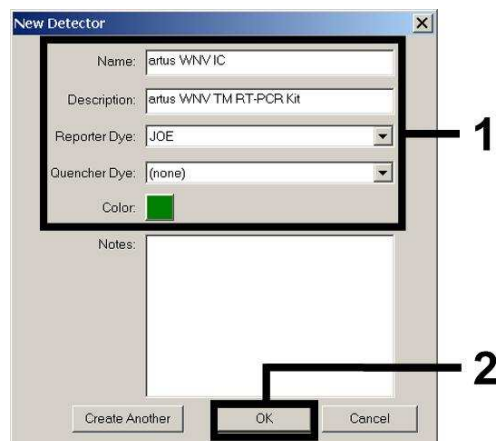


Abb. 5: Erstellung des IC-spezifischen Detektors (*Detector Manager*).

In dem nun erscheinenden Fenster definieren Sie (entsprechend Abb. 4 und Abb. 5) zum Nachweis von WNV-RNA die Reporter/Quencher-Kombination **FAM/none**, zum Nachweis der *Internen Kontrolle* wählen Sie die Kombination **JOE/none** aus. Durch die Bestätigung der Eingaben (OK) kehren Sie zurück zum *Detector Manager*. Markieren Sie die soeben erstellten Detektoren und transferieren Sie jede Auswahl durch Anklicken der Option *Add to Plate Document* zum *Well Inspector* (siehe Abb. 6). Schließen Sie das Fenster (*Done*).

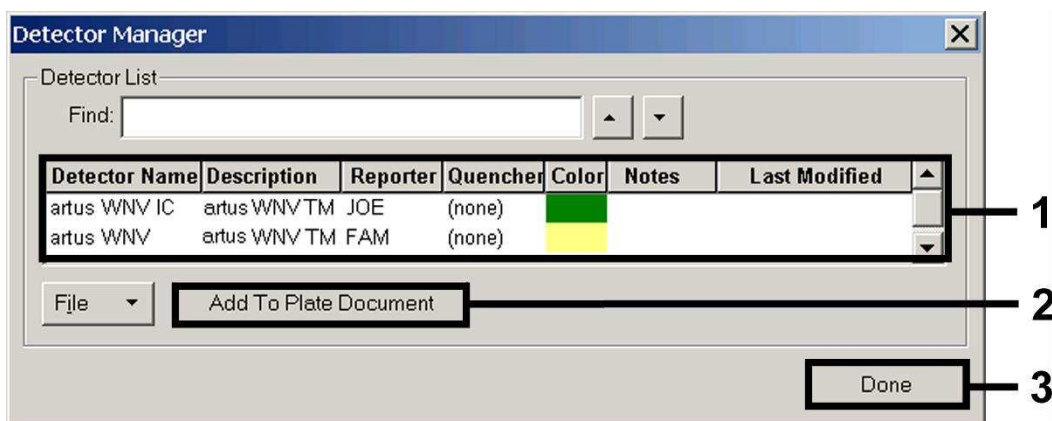


Abb. 6: Auswahl der Detektoren (*Detector Manager*).

### 8.5.1.3 Zuordnung der notwendigen Informationen zu den Plattenpositionen

Öffnen Sie nun die unter *View* befindliche Option *Well Inspector*, so finden Sie dort die von Ihnen unter 8.5.1.2 ausgewählten Detektoren wieder (siehe Abb. 7).



Abb. 7: Zuordnung der notwendigen Informationen zu den Plattenpositionen (*Well Inspector*).

Markieren Sie die für den Nachweis von WNV-RNA belegten Positionen der Platte. Ordnen Sie diesen Positionen die ausgewählten Detektoren zu, indem Sie die *Use*-Option beider Detektoren aktivieren. Es erscheint dort ein Häkchen. Zur Benennung der einzelnen Reaktionsansätze wählen Sie die entsprechende Position auf der Platte an und tragen Sie den Namen unter *Sample Name* ein. Bedenken Sie dabei, dass Ansätze mit identischem *Sample Name* und identischer Detektorzuweisung von der Software als Replikat identifiziert und hinsichtlich ihrer quantifizierten Erregerlast gemittelt werden. Wählen Sie dann für jeden Probentyp die entsprechende Funktion (*Task*) gemäß der folgenden Tabelle aus:

Probentyp	Funktion ( <i>Task</i> )	Konzentration ( <i>Quantity</i> )	Reporter	Quencher
Probe	Unknown	-	FAM	none
Negativkontrolle	NTC	-	FAM	none
Standard	Standard	siehe 1. Inhalt	FAM	none

Zur Erstellung einer Standardkurve nutzen Sie pro PCR-Lauf alle mitgelieferten *Quantifizierungsstandards* (WNV LC/TM QS 1 - 4) und geben die zugehörigen Konzentrationen (siehe **1. Inhalt**) für jeden einzelnen Standard ein (*Quantity*). Achten Sie darauf, dass für einen PCR-Lauf mit dem *artus WNV TM RT-PCR Kit ROX* als Passive Referenz (*Passive Reference*) eingestellt sein muss. Die gleichmäßige Verteilung des ROX-Farbstoffs auf alle PCR-Ansätze einer Lot mittels Durchmischung des *WNV TM Masters* gewährleistet das Erkennen und Verrechnen von *tube-to-tube* Variationen (Fluoreszenzunterschiede zwischen verschiedenen PCR-Ansätzen) durch die *Sequence Detection Software* (Normalisierung).

#### 8.5.1.4 Erstellung des Temperaturprofils

Zur Eingabe des Temperaturprofils wechseln Sie in der Software bitte von der *Setup*-Ebene auf die *Instrument*-Ebene. Geben Sie entsprechend Abb. 8 das für die Detektion von WNV-RNA gültige Temperaturprofil ein. Kontrollieren Sie, dass das Reaktionsvolumen auf 50 µl eingestellt ist. Die Option *9600 Emulation* sollte aktiviert sein, die Voreinstellungen des *Auto Increments* unverändert bleiben (*Auto Increment*: 0.0°C, 0.0 Seconds).

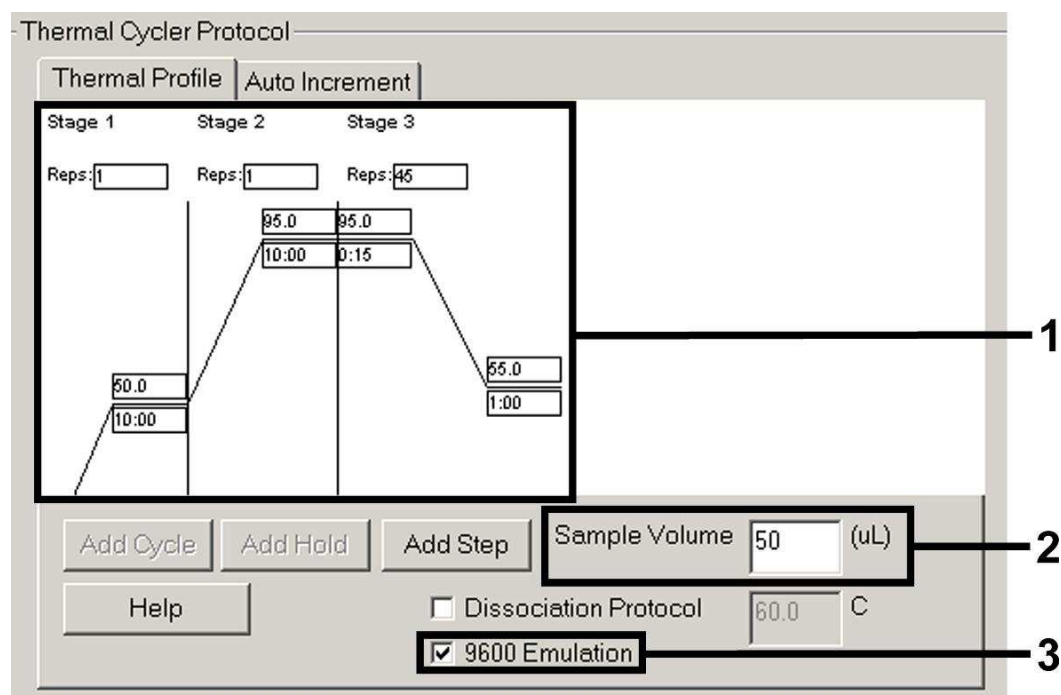


Abb. 8: Erstellung des Temperaturprofils.

#### **8.5.1.5 Speichern des PCR-Laufs**

An dieser Stelle können Sie die eingegebenen Einstellungen (*Setup*) als Maske abspeichern, um sie für spätere Anwendungen in veränderter oder unveränderter Form erneut zu nutzen. Durch das Abspeichern der Einstellungen als *SDS Template (\*.sdt)* in dem Ordner *Template Directory* (Lokales Laufwerk [C:] \Program Files\ABI PRISM 7000\Templates, angelegt von Applied Biosystems) ist diese Datei aus der *Template* Drop-down-Liste in dem *New Document*-Fenster direkt anwählbar. In anderen Ordnern gesicherte Vorlagen müssen über *Browse* geöffnet werden. Vor dem Starten des PCR-Laufs achten Sie bitte darauf, diesen erneut als *SDS Document (\*.sds)* abzuspeichern. Damit stellen Sie die Speicherung der sich im Verlauf der PCR ansammelnden Daten sicher.

#### **8.5.1.6 Starten des PCR-Laufs**

Starten Sie den PCR-Lauf durch Anwählen der Option *Start* unter dem Menüpunkt *Instrument* oder des Feldes *Start* auf der *Instrument*-Ebene.

## 8.5.2 Programmierung des *ABI PRISM® 7700 SDS*

Zur Detektion von WNV-RNA erstellen Sie auf Ihrem *ABI PRISM® 7700 SDS* ein Profil gemäß den folgenden sieben Arbeitsschritten (8.5.2.1 - 8.5.2.7). Alle Angaben beziehen sich auf die *ABI PRISM® 7700 SDS* Software-Version 1.9.1. Einzelheiten zur Programmierung des *ABI PRISM® 7700 SDS* entnehmen Sie bitte dem *ABI PRISM® 7700 SDS User's Manual*. Zur besseren Übersicht sind die vorzunehmenden Einstellungen in den Abbildungen durch schwarze Rahmen hervorgehoben.

### 8.5.2.1 Voreinstellungen bei der Erstellung eines neuen PCR-Laufs

Wählen Sie auf dem *ABI PRISM® 7700 SDS* den unter *File* befindlichen Menüpunkt *New Plate* an und stellen Sie für das neue Dokument die folgenden Grundeinstellungen ein (siehe Abb. 9). Bestätigen Sie Ihre Eingaben (OK).

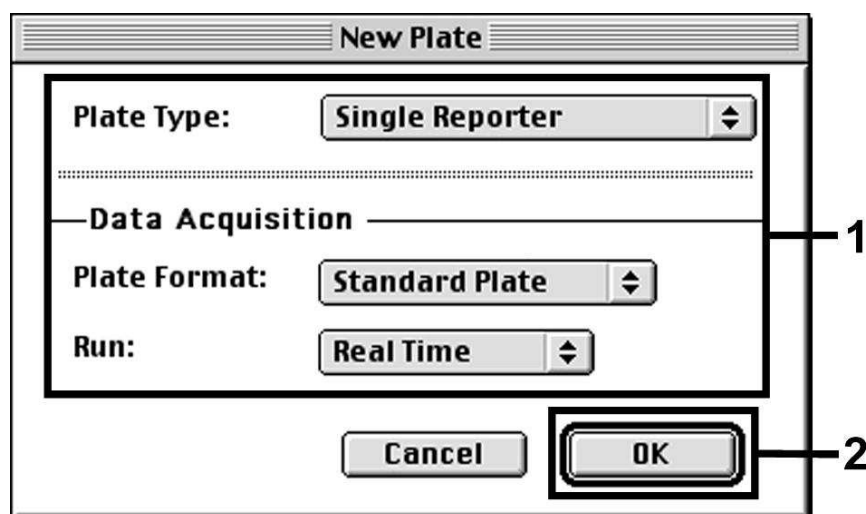


Abb. 9: Voreinstellungen bei der Erstellung eines neuen PCR-Laufs (*New Plate*).



### 8.5.2.2 Auswahl der Fluoreszenzfarbstoffe und Zuordnung des Probentyps

Mit Hilfe des *Sample Type Setup* (Setup-Ebene: *Sample Type/Sample Type Setup*) ordnen Sie dem Dokument die entsprechenden Detektorfarbstoffe und den entsprechenden Probentyp zu. Zum Nachweis von WNV-RNA sowie der *Internen Kontrolle* mit Hilfe des *artus WNV TM RT-PCR Kits* sind die in der folgenden Tabelle angegebenen Reporter/Quencher zu definieren:

Nachweis	Reporter	Quencher
WNV-RNA	FAM	none
<i>Interne Kontrolle (WNV TM IC)</i>	JOE	none

Für die Messung von WNV-RNA mit Hilfe des *artus WNV TM RT-PCR Kits* wählen Sie analog zur Tabelle den Reporterfarbstoff **FAM** an. Dies gilt sowohl für Standards (STND), Proben (UNKN) als auch für Negativkontrollen (UNKN). Für die Messung der *Internen Kontrolle* (IPC+) definieren Sie als Reporter **JOE**. Stellen Sie als Quencher **none** ein. Die Zuordnung der Farbstoffe und Probentypen im Fenster *Sample Type Setup* ist in Abb. 10 dargestellt.

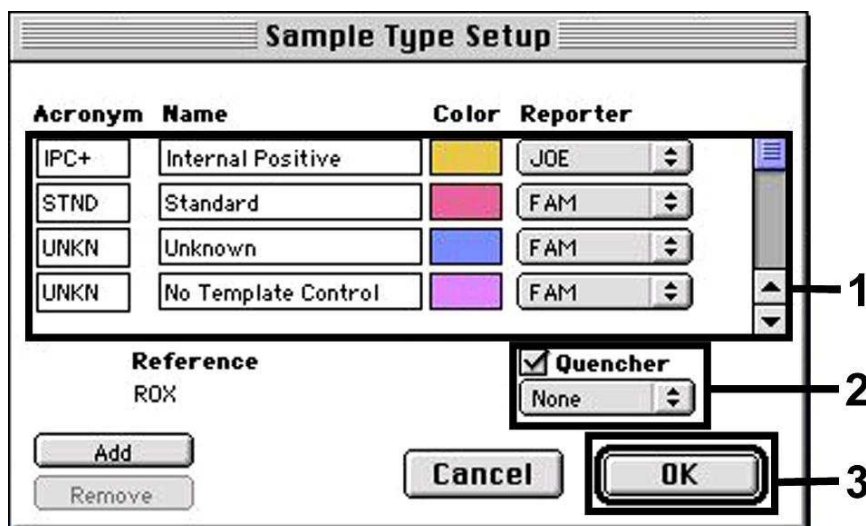


Abb. 10: Auswahl der Fluoreszenzfarbstoffe und Zuordnung des Probentyps (*Sample Type Setup*).

Die Zuordnung des Probentyps zu einer entsprechenden Funktion (*Acronym*) erfolgt nach der folgenden Tabelle:

Probentyp	Funktion (Acronym)	Konzentration (Quantity)	Reporter	Quencher
Probe	UNKN	-	FAM	none
Negativkontrolle	UNKN	-	FAM	none
Standard	STND	siehe <b>1. Inhalt</b>	FAM	none

### 8.5.2.3 Zuordnung der notwendigen Informationen zu den Plattenpositionen

Für die Zuordnung der Detektoren und Probentypen zu den einzelnen Plattenpositionen wählen Sie die entsprechenden Felder an. Öffnen Sie dann auf der *Setup*-Ebene das Dialogfenster *Dye Layer* und ordnen Sie den zugehörigen Reporter zu. Aktivieren Sie nun das Pop-up Menü *Sample Type*, so finden Sie in der erscheinenden Liste die dem Reporter im *Sample Type Setup* zugeordneten Probentypen wieder (siehe Abb. 11). Wählen Sie den passenden Probentyp aus (siehe Tabelle unter 8.5.2.2) und bestimmen Sie nun mit Hilfe des *Dye Layers* und des *Sample Type*-Menüs die Zuordnung zu den restlichen Plattenpositionen. In dem Feld *Sample Name* kann jeder Probe ein Name zugeordnet werden. Als *Replicate* definierte Felder (Eingabe des Namens der Bezugsprobe in die Spalte *Replicate*) werden von der Software hinsichtlich ihrer quantifizierten Erregerlast gemittelt und ihre Standardabweichung berechnet.

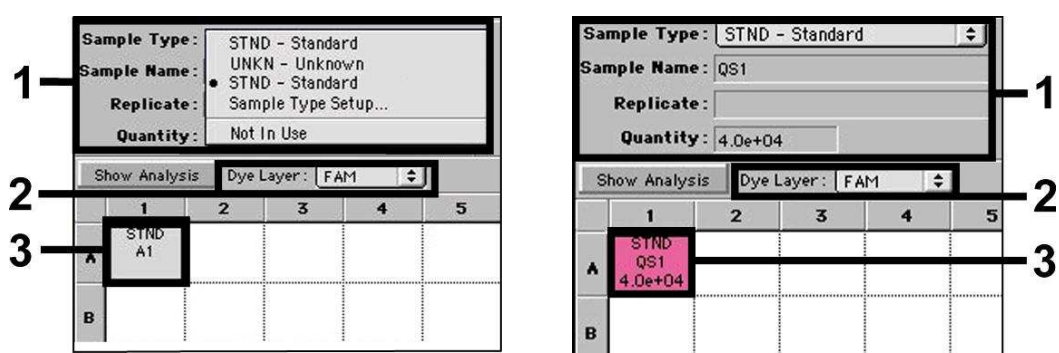


Abb. 11/12: Zuordnung der notwendigen Informationen zu den Plattenpositionen.

Zur Erstellung einer Standardkurve nutzen Sie pro PCR-Lauf alle mitgelieferten *Quantifizierungsstandards* (WNV LC/TM QS 1 - 4) und geben die zugehörigen Konzentrationen (siehe **1. Inhalt**) für jeden einzelnen

Standard ein (*Quantity*, siehe Abb. 12). Dies ist jedoch nur möglich, wenn die mit Standards belegten Positionen zuvor mit Hilfe des Menüs *Sample Type* als solche definiert wurden.

#### 8.5.2.4 Erstellung des Temperaturprofils

Zur Eingabe des Temperaturprofils wechseln Sie bitte zum *Thermal Cycler Conditions*-Menü auf der *Setup*-Oberfläche. Geben Sie entsprechend Abb. 13 das für die Detektion von WNV-RNA gültige Temperaturprofil ein. Kontrollieren Sie, dass das Reaktionsvolumen auf 50 µl eingestellt ist. Die Voreinstellungen der *Ramp*-Zeiten und des *Auto Increments* bleiben unverändert (*Ramp Time*: 0:00, *Auto Increment*: 0.0 °C, 0.0 Seconds).

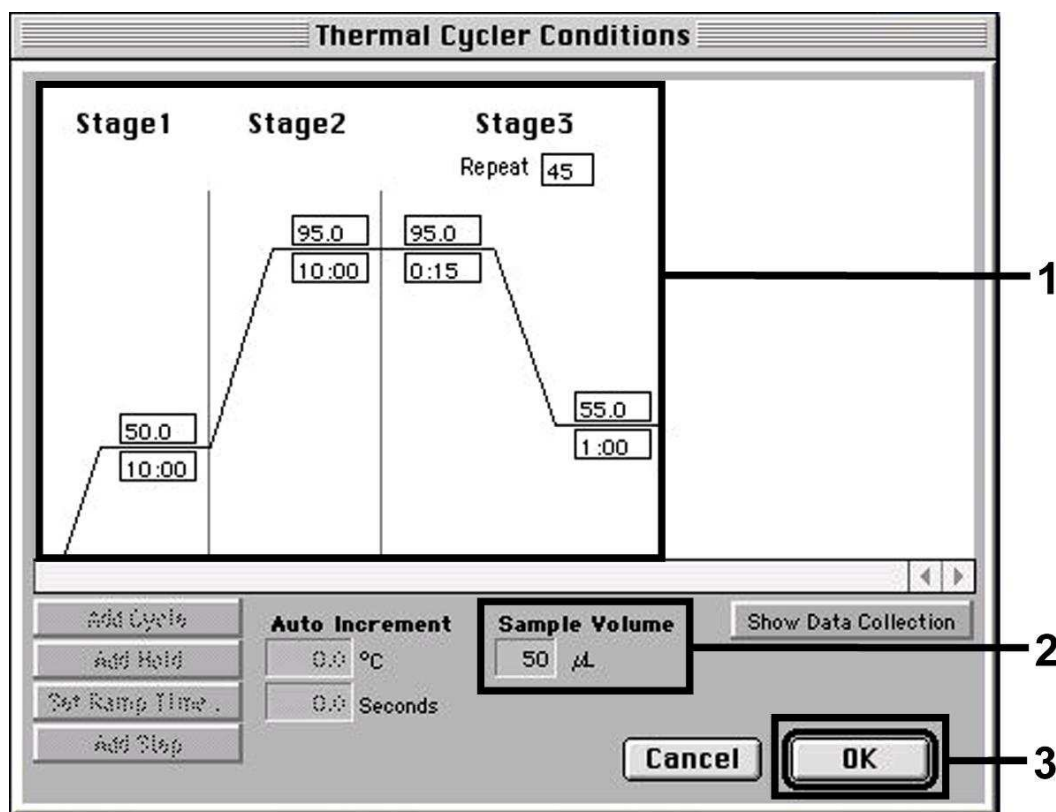


Abb. 13: Erstellung des Temperaturprofils.

Des Weiteren befindet sich in dem *Thermal Cycler Conditions*-Menü die Option *Show Data Collection*. Durch Anwählen dieser Option gelangen Sie in das in Abb. 14 dargestellte Fenster. Jede *Ramp*- und jede *Plateau*-Temperatur ist mit einem Symbol der Datenaufnahme versehen (*Data*

*Collection Icon*), das die Aufnahme der Daten zu diesem Zeitpunkt des Laufs veranschaulicht. Entfernen Sie durch Anklicken alle Symbole bis auf das zum Zeitpunkt des *Annealing-Extension*-Schrittes (*Stage3/Step2*), um unnötige Fluoreszenz-Messungen auszusparen. Damit werden Gesamtlaufzeit und Datenmenge so gering wie möglich gehalten.

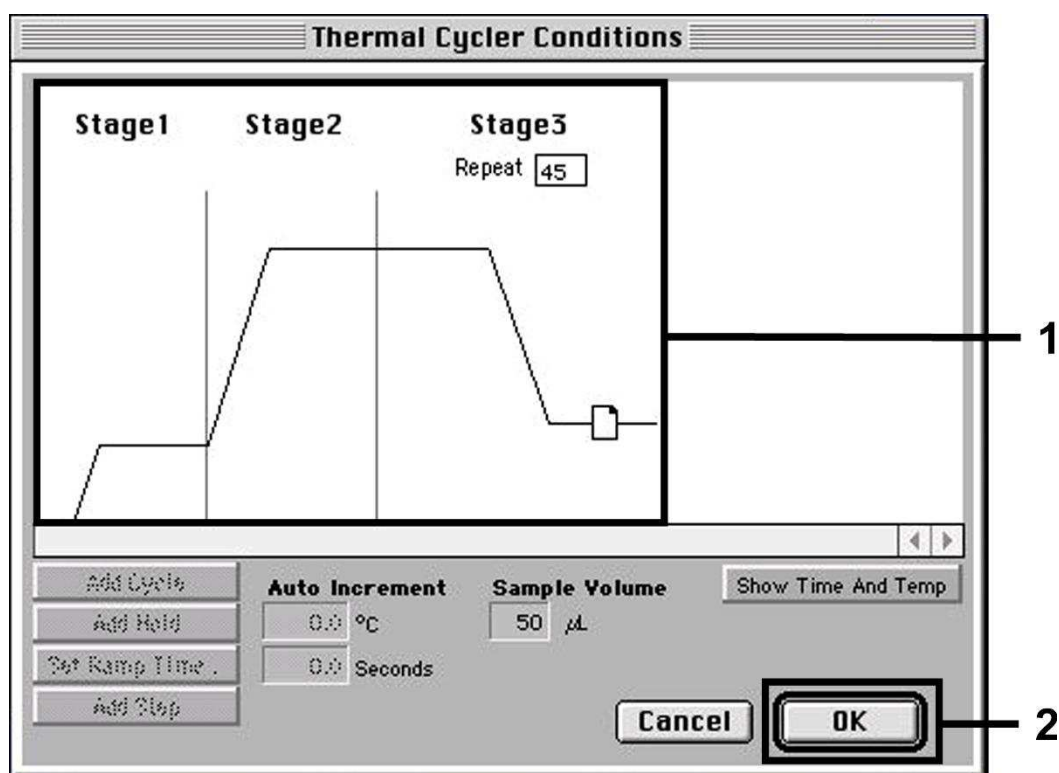


Abb. 14: Datenaufnahme (*Data Collection*).

#### 8.5.2.5 Wichtige Zusatzeinstellungen

Zur Einstellung der Belichtungszeit (Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe), sowie zur Auswahl der *Pure Spectra/Background*-Dateien wechseln Sie bitte von der *Setup*-Ebene zur *Analysis*-Ebene. Wählen Sie den nun aktivierten, im Menü *Instrument* unter *Diagnostics* befindlichen Unterpunkt *Advanced Options* an. Nehmen Sie die Einstellungen gemäß Abb. 15 vor. Durch das Inaktivieren der Wahlfunktion *Spectra Components (Analysis)* werden bei der erneuten Auswertung bereits analysierter Läufe automatisch die zum Zeitpunkt der Generierung der Daten im *Spectra Components*-Ordner abgelegten aktuellen Kalibrierungsdateien genutzt. Für eine Analyse alter Läufe unter Verwendung neu eingelesener *Spectra Components* aktivieren

Sie bitte diese beiden Felder. Achten Sie darauf, dass für einen PCR-Lauf mit dem *artus* WNV TM RT-PCR Kit **ROX** als Passive Referenz (*Reference*) eingestellt sein muss. Die gleichmäßige Verteilung des ROX-Farbstoffs auf alle PCR-Ansätze einer Lot mittels Durchmischung des *WNV TM Masters* gewährleistet das Erkennen und Verrechnen von *tube-to-tube* Variationen (Fluoreszenzunterschiede zwischen verschiedenen PCR-Ansätzen) durch die *Sequence Detection Software* (Normalisierung).

**Beachte:** Die Belichtungszeit (*Exposure Time*) bei Nutzung von 96-well Reaktionsplatten für optische Messungen in Verbindung mit optischen Klebefolien (*Optical Adhesive Covers*) oder optischen Reaktionsgefäßen mit flachen Deckeln beträgt zehn Millisekunden. Sollten Sie **optische Reaktionsgefäße mit gewölbten Deckeln** verwenden, so stellen Sie diese Zeitangabe bitte auf **25 Millisekunden** um.

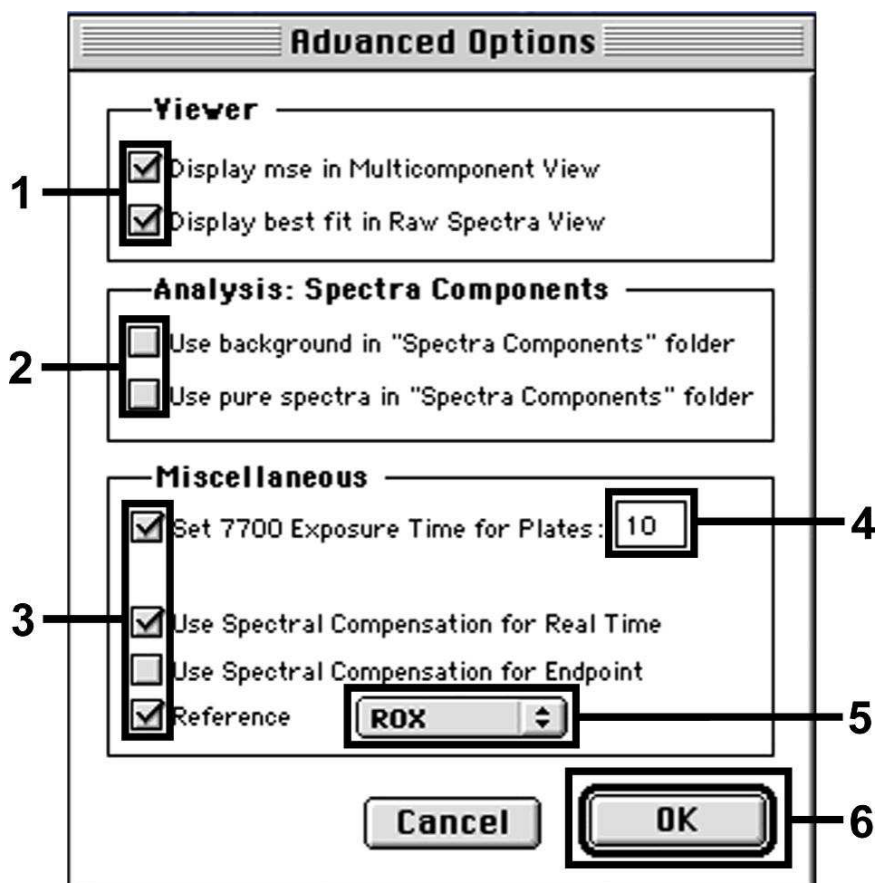


Abb. 15: Wichtige Zusatzeinstellungen (*Advanced Options*).

#### **8.5.2.6 Speichern des PCR-Laufs**

An dieser Stelle können Sie die eingegebenen Einstellungen (*Setup*) als Maske abspeichern, um sie für spätere Anwendungen in veränderter oder unveränderter Form erneut zu nutzen. Dafür speichern Sie diese Datei im *Stationary File Format* ab. Vor dem Starten des aktuell programmierten PCR-Laufs achten Sie bitte darauf, diesen erneut im *Normal File Format* abzuspeichern. Damit stellen Sie die Speicherung der sich im Verlauf der PCR ansammelnden Daten sicher.

#### **8.5.2.7 Starten des PCR-Laufs**

Starten Sie den PCR-Lauf durch Anwählen der Option *Run* unter dem Menüpunkt *Instrument* oder des Feldes *Run* auf der *Analysis*-Ebene.

### 8.5.3 Programmierung des *ABI PRISM® 7900HT SDS*

Zur Detektion von WNV-RNA erstellen Sie auf Ihrem *ABI PRISM® 7900HT SDS* ein Profil gemäß den folgenden sechs Arbeitsschritten (8.5.3.1 - 8.5.3.6). Alle Angaben beziehen sich auf die *ABI PRISM® 7900HT SDS* Software-Version 2.1. Einzelheiten zur Programmierung des *ABI PRISM® 7900HT SDS* entnehmen Sie bitte dem *ABI PRISM® 7900HT SDS User Guide*. Zur besseren Übersicht sind die vorzunehmenden Einstellungen in den Abbildungen durch schwarze Rahmen hervorgehoben.

#### 8.5.3.1 Voreinstellungen bei der Erstellung eines neuen PCR-Laufs

Wählen Sie auf dem *ABI PRISM® 7900HT SDS* den unter *File* befindlichen Menüpunkt *New* an und stellen Sie für das neue Dokument die folgenden Grundeinstellungen ein (siehe Abb. 16). Ein zuvor abgespeichertes Template (*ABI PRISM® SDS Template Document [\*.sdt]*) steht Ihnen in der *Template*-Liste oder durch Auswahl mittels *Browse*-Funktion zur Verfügung (siehe **8.5.3.5 Speichern des PCR-Laufs**). Bestätigen Sie Ihre Eingaben (*OK*).

**Beachte:** Der *artus* WNV TM RT-PCR Kit kann nicht in Verbindung mit dem 384er Plattenformat des *ABI PRISM® 7900HT SDS* angewendet werden.

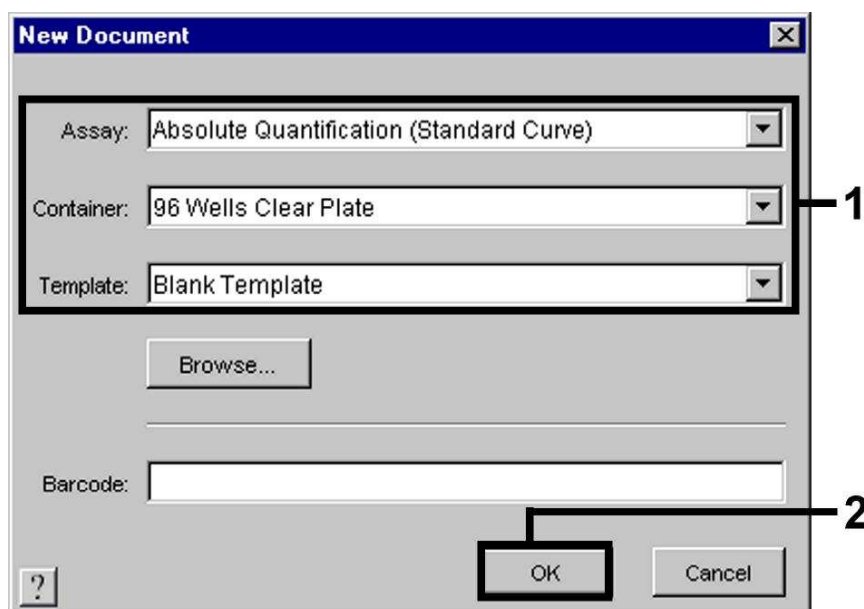


Abb. 16: Voreinstellungen bei der Erstellung eines neuen PCR-Laufs (*New Document*).

### 8.5.3.2 Erstellung/Auswahl der Detektoren

Mit Hilfe des unter *Tools* befindlichen Untermenüs *Detector Manager* (alternativ: *Setup-Ebene/Add Detector*-Funktion anwählen) ordnen Sie dem Dokument die entsprechenden Detektorfarbstoffe zu. Zum Nachweis von WNV-RNA sowie der *Internen Kontrolle* mit Hilfe des *artus WNV TM RT-PCR Kits* sind die in der folgenden Tabelle angegebenen Reporter/Quencher zu definieren:

Nachweis	Reporter	Quencher
WNV-RNA	FAM	TAMRA
<i>Interne Kontrolle (WNV TM IC)</i>	JOE	Non Fluorescent

Zur Erstellung dieser Detektoren wählen Sie die im *Detector Manager* links unten lokalisierte Option *New* an.

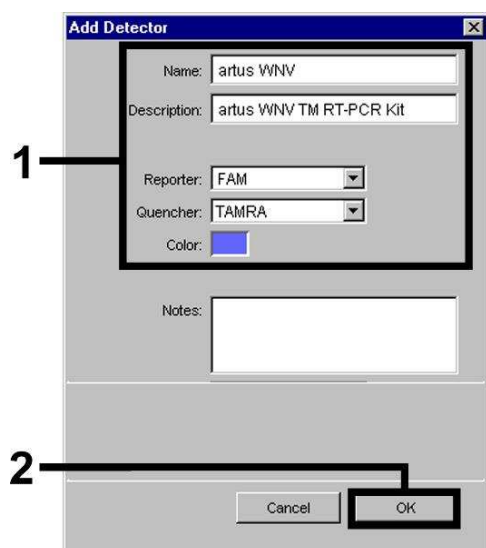


Abb. 17: Erstellung des WNV-spezifischen Detektors (*Detector Manager*).

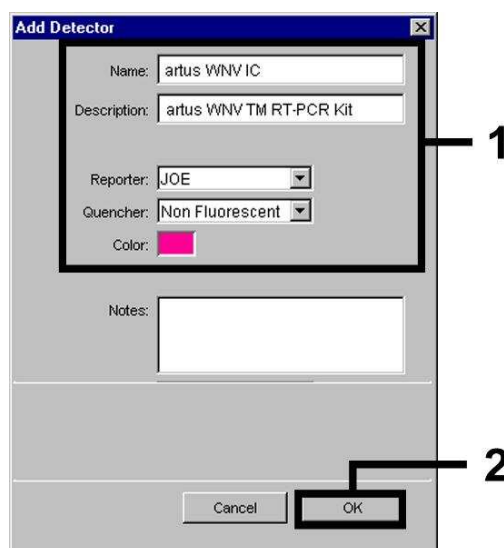


Abb. 18: Erstellung des IC-spezifischen Detektors (*Detector Manager*).

In dem nun erscheinenden Fenster definieren Sie (entsprechend Abb. 17 und Abb. 18) zum Nachweis von WNV-RNA die Reporter/Quencher-Kombination **FAM/TAMRA**, zum Nachweis der *Internen Kontrolle* wählen Sie die Kombination **JOE/Non Fluorescent** aus\*. Durch die Bestätigung der

\* **Achtung:** Die Reporter/Quencher-Kombination **FAM/TAMRA** sollte nur für den *ABI PRISM® 7900HT SDS* eingesetzt werden.



Eingaben (*OK*) kehren Sie zurück zum *Detector Manager*. Markieren Sie die soeben erstellten Detektoren und transferieren Sie jede Auswahl durch Anklicken der Option *Copy to Plate Document* zur *Setup*-Ebene (siehe Abb. 19). Schließen Sie das Fenster (*Done*).

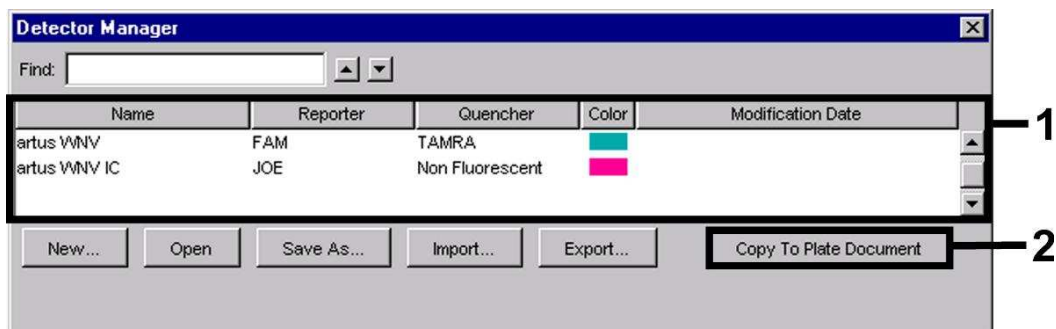


Abb. 19: Auswahl der Detektoren (*Detector Manager*).

### 8.5.3.3 Zuordnung der notwendigen Informationen zu den Plattenpositionen

Nach dem Schließen des *Detector Managers* (*Done*) finden Sie die von Ihnen unter 8.5.3.2 ausgewählten Detektoren auf der *Setup*-Ebene (*Well Inspector*) tabellarisch gelistet wieder (siehe Abb. 20).

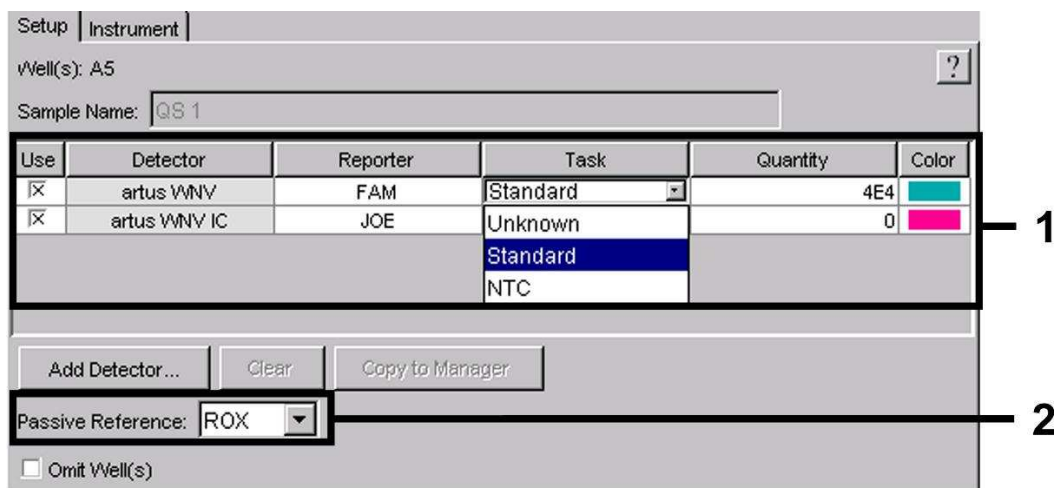


Abb. 20: Zuordnung der notwendigen Informationen zu den Plattenpositionen.

Markieren Sie die für den Nachweis von WNV-RNA belegten Positionen der Platte. Ordnen Sie diesen Positionen die ausgewählten Detektoren zu, indem Sie die *Use*-Option beider Detektoren durch Anklicken aktivieren. Es erscheint

dort ein Kreuz. Zur Benennung der einzelnen Reaktionsansätze wählen Sie die entsprechende Position auf der Platte an und tragen Sie den Namen unter *Sample Name* ein. Bedenken Sie dabei, dass Ansätze mit identischem *Sample Name* und identischer Detektorzuweisung von der Software als Replikat identifiziert und hinsichtlich ihrer quantifizierten Erregerlast gemittelt werden. Wählen Sie dann für jeden Probenotyp die entsprechende Funktion (*Task*) gemäß der folgenden Tabelle aus:

Probenotyp	Funktion ( <i>Task</i> )	Konzentration ( <i>Quantity</i> )	Reporter	Quencher
Probe	Unknown	-	FAM	TAMRA
Negativkontrolle	NTC	-	FAM	TAMRA
Standard	Standard	siehe <b>1. Inhalt</b>	FAM	TAMRA

Zur Erstellung einer Standardkurve nutzen Sie pro PCR-Lauf alle mitgelieferten *Quantifizierungsstandards* (*WNV LC/TM QS 1 - 4*) und geben die zugehörigen Konzentrationen (siehe **1. Inhalt**) für jeden einzelnen Standard ein (*Quantity*). Achten Sie darauf, dass für einen PCR-Lauf mit dem *artus WNV TM RT-PCR Kit ROX* als Passive Referenz (*Passive Reference*) eingestellt sein muss. Die gleichmäßige Verteilung des ROX-Farbstoffes auf alle PCR-Ansätze einer Lot mittels Durchmischung des *WNV TM Masters* gewährleistet das Erkennen und Verrechnen von *tube-to-tube* Variationen (Fluoreszenzunterschiede zwischen verschiedenen PCR-Ansätzen) durch die *Sequence Detection Software* (Normalisierung).

#### 8.5.3.4 Erstellung des Temperaturprofils

Zur Eingabe des Temperaturprofils wechseln Sie in der Software bitte von der *Setup*-Ebene auf die *Instrument*-Ebene. Geben Sie entsprechend der Abb. 21 das für die Detektion von WNV-RNA gültige Temperaturprofil ein. Kontrollieren Sie, dass das Reaktionsvolumen auf 50 µl eingestellt ist. Die Option *9600 Emulation* sollte aktiviert sein, die Voreinstellungen der *Ramp*-Zeit und des *Auto Increments* unverändert bleiben (*Ramp Time*: 0:00, *Auto Increment*: 0.0°C, 0.0 Seconds).

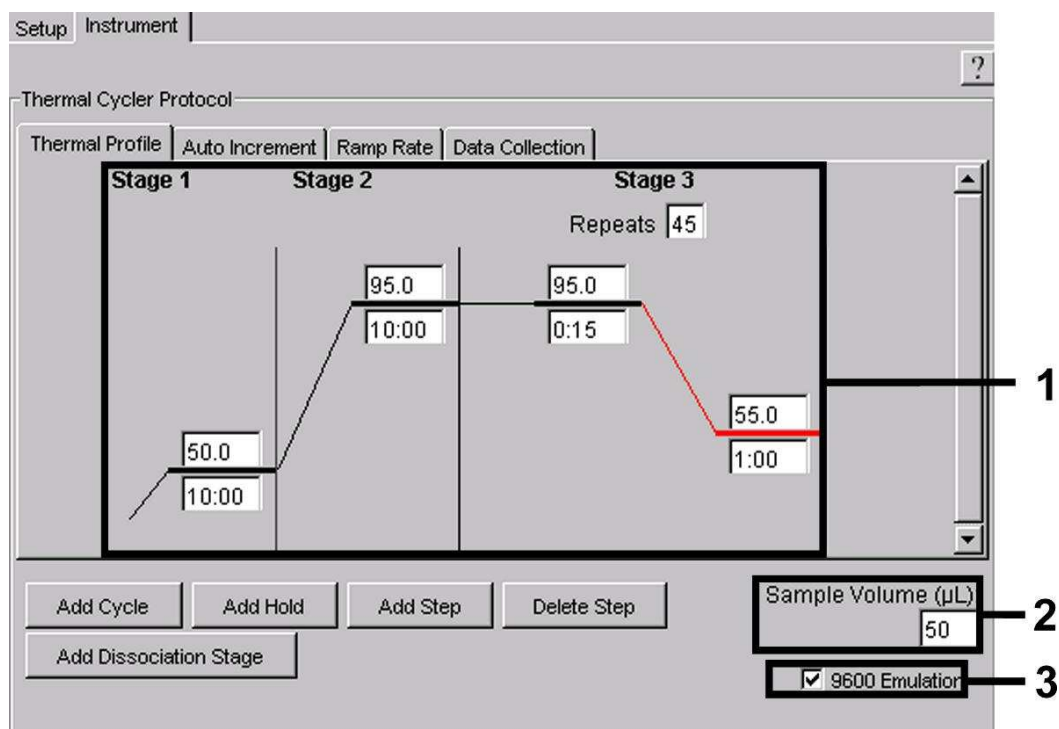


Abb. 21: Erstellung des Temperaturprofils.

Des Weiteren befindet sich auf der *Instrument*-Ebene die Option *Data Collection*. Durch Anwählen dieser Option gelangen Sie in das in Abb. 22 dargestellte Fenster. Jede *Ramp*- und jede *Plateau*-Temperatur ist mit einem Symbol der Datenaufnahme versehen (*Data Collection Icon*), das die Aufnahme der Daten zu diesem Zeitpunkt des Laufes veranschaulicht. Entfernen Sie alle Symbole bis auf das zum Zeitpunkt des *Annealing-Extension*-Schrittes (*Stage3/Step2*), um unnötige Fluoreszenz-Messungen auszusparen. Damit werden Gesamtlaufzeit und Datenmenge so gering wie möglich gehalten.

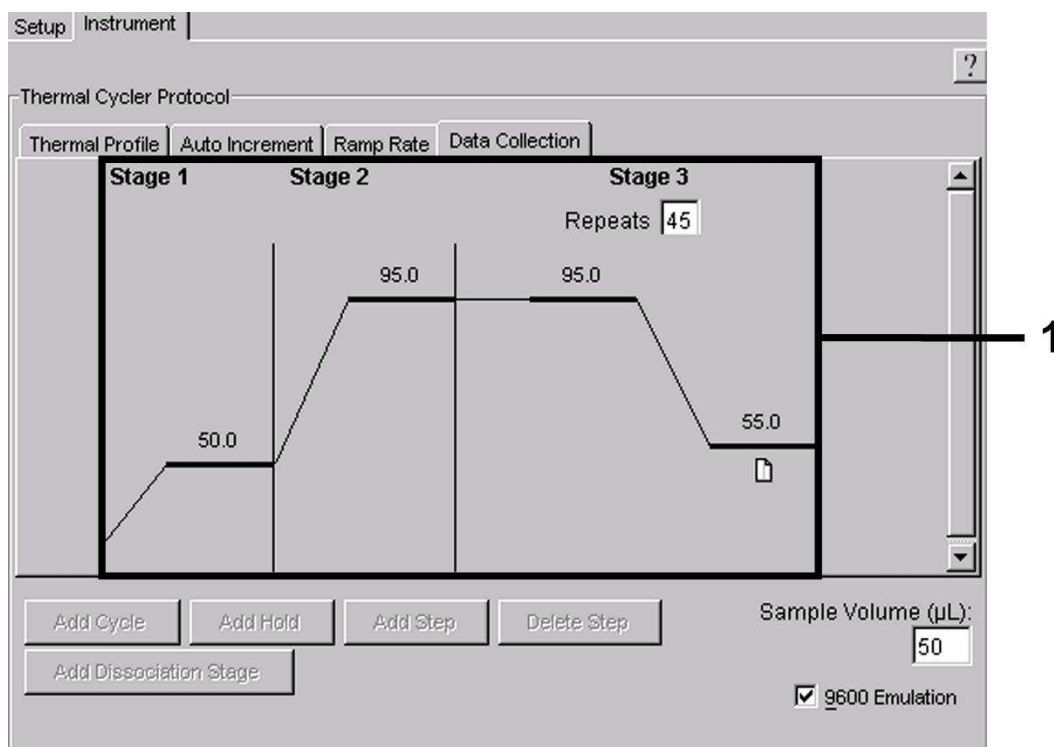


Abb. 22: Datenaufnahme (*Data Collection*).

#### 8.5.3.5 Speichern des PCR-Laufs

An dieser Stelle können Sie die eingegebenen Einstellungen (*Setup*) als Maske abspeichern, um sie für spätere Anwendungen in veränderter oder unveränderter Form erneut zu nutzen. Durch das Abspeichern der Einstellungen als *ABI PRISM® SDS Template Document (\*.sdt)* in dem Ordner *Template Directory* ([D:]\\Program Files\\Applied Biosystems\\SDS 2.1\\Templates, angelegt von Applied Biosystems) ist diese Datei aus der *Template*-Liste in dem *New Document*-Fenster direkt anwählbar. In anderen Ordnern gesicherte Vorlagen müssen über *Browse* geöffnet werden. Vor dem Starten des aktuellen PCR-Laufs achten Sie bitte darauf, diesen erneut als *ABI PRISM® SDS Document (\*.sds)* abzuspeichern. Damit stellen Sie die Speicherung der sich im Verlauf der PCR ansammelnden Daten sicher.

#### 8.5.3.6 Starten des PCR-Laufs

Starten Sie den PCR-Lauf durch Anwählen der Option *Start* unter dem Menüpunkt *Instrument*.

## 9. Auswertung

Eine vorliegende, gültige Kalibrierung der Farbstoffe (***Pure Spectra Component File***) und des Hintergrundes (***Background Component File***) ist bei Inbetriebnahme der Geräte unbedingt erforderlich. Diese Kalibrierungsdateien werden wie folgt zur exakten Berechnung der Ergebnisse benötigt:

Sämtliche die Messung beeinflussenden gerätebedingten Störsignale werden von der *Sequence Detection Software* der **ABI PRISM® Sequence Detection Systems** mit Hilfe des *Background Component Files* eliminiert.

Zudem treten bei Multicolor-Analysen Interferenzen zwischen den Emissionsspektren der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe auf. Die Software der **ABI PRISM® SDS** kompensiert diese Interferenzen durch Verrechnung mit den im *Pure Spectra Component File* gespeicherten Spektraldaten der einzelnen Farbstoffe. Die Zuordnung der im Verlauf der PCR über das gesamte messbare Spektrum gesammelten Fluoreszenzdaten zu den programmierten Detektoren nimmt die Software ebenfalls mit Hilfe der *Pure Spectra Components* vor. Anschließend werden die ermittelten Fluoreszenzdaten der einzelnen Farbstoffe zur Verrechnung von *tube-to-tube* Variationen (Fluoreszenzunterschiede zwischen verschiedenen PCR-Ansätzen) durch das Signal der passiven Referenz (ROX) geteilt. Die auf diese Weise normalisierten Signale können mit Hilfe des *Amplification Plots* ausgewertet werden.

Die bei der Auswertung eines PCR-Laufs genutzten Kalibrierungsdateien werden beim Abspeichern automatisch mitgesichert. Sollten keine **Kalibrierungsdateien** installiert sein, erstellen Sie diese Dateien bitte unter Beachtung der Anleitung im **ABI PRISM® SDS User Guide/Manual**.

Sollten Sie mehr als ein *artus*™ PCR-System in Ihren PCR-Lauf integriert haben (**Temperaturprofil beachten**), so analysieren Sie diese Testsysteme bitte getrennt voneinander. Proben mit identischer Bezeichnung (*Sample Name*) und Detektorzuweisung werden von der **ABI PRISM® 7000 und 7900HT SDS Software** automatisch als Replikat identifiziert und hinsichtlich ihrer quantifizierten Erregerlast gemittelt.

Folgende Ergebnisse können auftreten:

1. Ein FAM-Fluoreszenzsignal wird detektiert.

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

In diesem Fall ist die Detektion eines JOE-Fluoreszenzsignals (*Interne Kontrolle*) unwesentlich, da hohe Ausgangskonzentrationen an WNV-RNA (positives FAM-Fluoreszenzsignal) zu einem reduzierten bis ausbleibenden Fluoreszenz-Signal der *Internen Kontrolle* führen können (Kompetition).

2. Kein FAM-Fluoreszenzsignal wird detektiert, sondern nur ein JOE-Fluoreszenzsignal (Signal der *Internen Kontrolle*).

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

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

3. Weder ein FAM-Fluoreszenzsignal noch ein JOE-Fluoreszenzsignal wird 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 den Abbildungen 23 / 24 (**ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 SDS**), 25 / 26 (**ABI PRISM<sup>®</sup> 7700 SDS**) und 27 / 28 (**ABI PRISM<sup>®</sup> 7900HT SDS**) wiedergegeben.

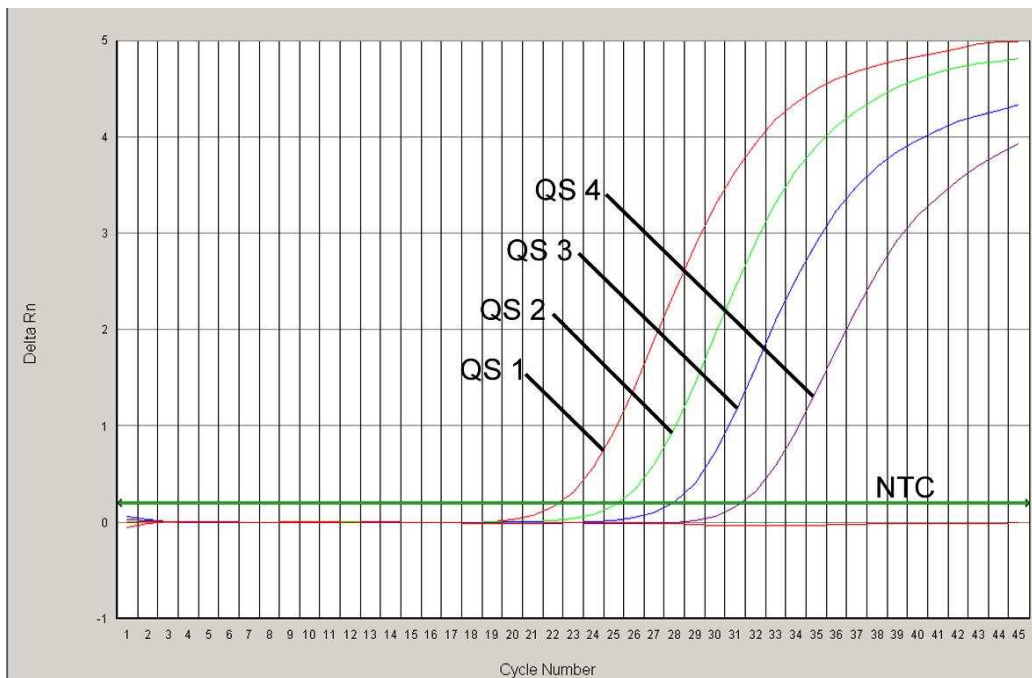


Abb. 23: Nachweis der *Quantifizierungsstandards* (WNV LC/TM QS 1 - 4) durch die Detektion eines FAM-Fluoreszenzsignals (**ABI PRISM® 7000 SDS**). NTC: non-template control (Negativkontrolle).

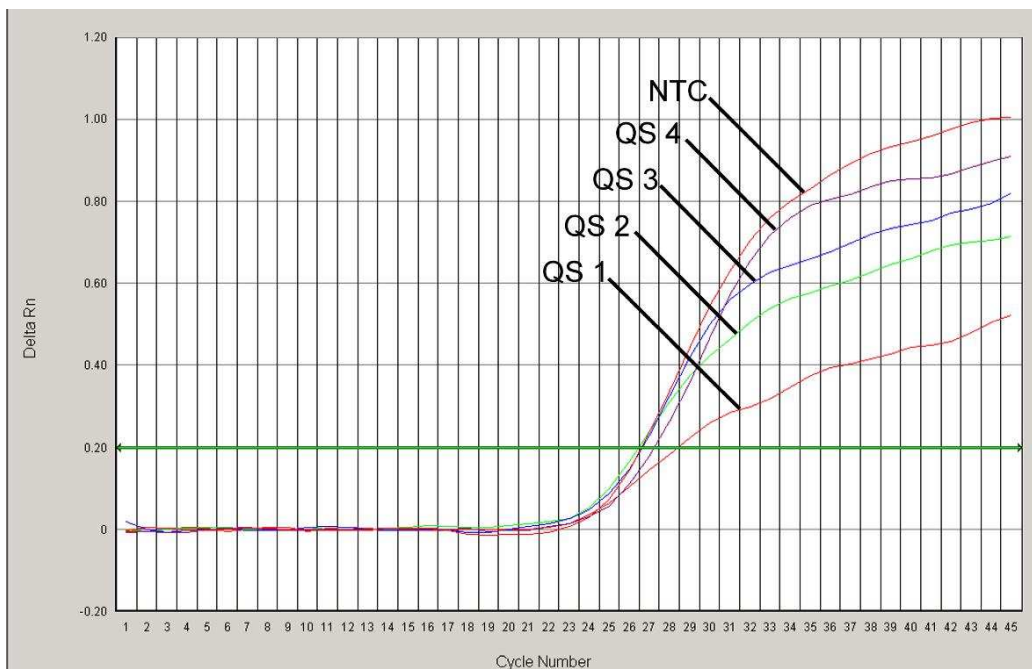


Abb. 24: Nachweis der *Internen Kontrolle* (IC) durch die Detektion eines JOE-Fluoreszenzsignals (**ABI PRISM® 7000 SDS**) bei gleichzeitiger Amplifikation der *Quantifizierungsstandards* (WNV LC/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (Negativkontrolle).



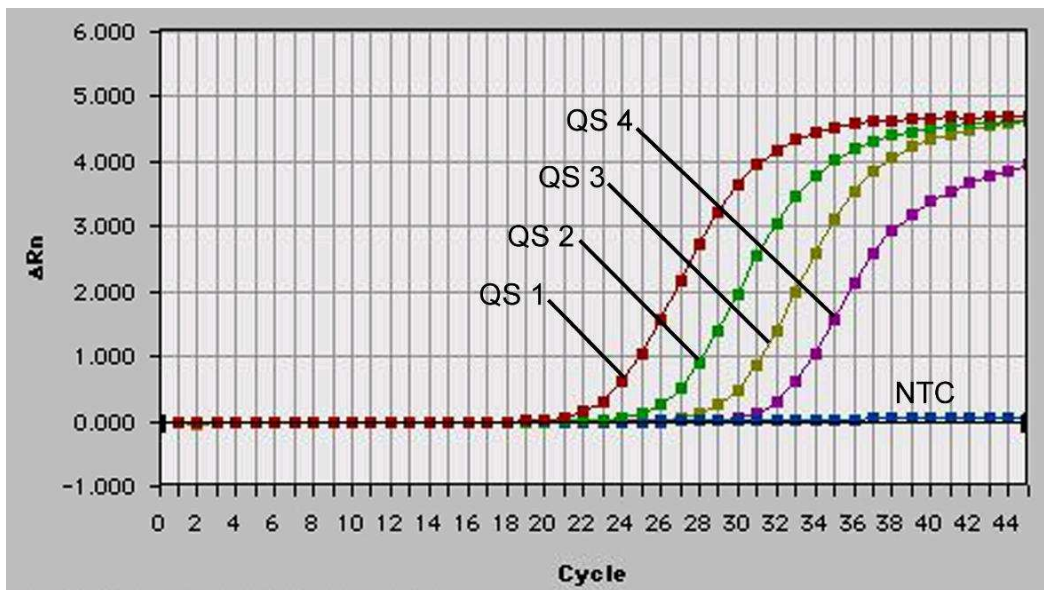


Abb. 25: Nachweis der *Quantifizierungsstandards* (WNV LC/TM QS 1 - 4) durch die Detektion eines FAM-Fluoreszenzsignals (**ABI PRISM® 7700 SDS**). NTC: non-template control (Negativkontrolle).

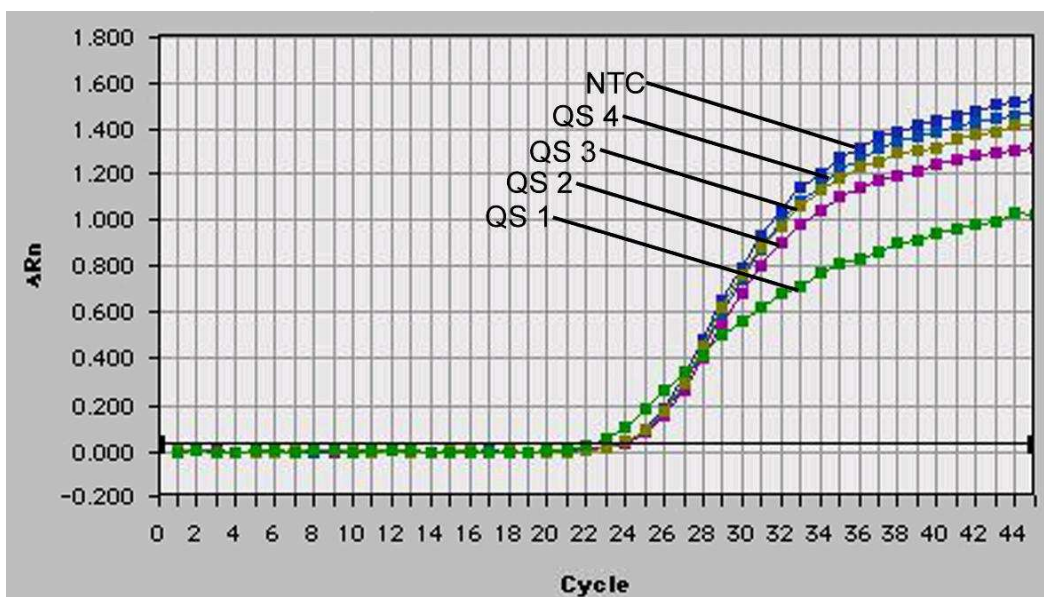


Abb. 26: Nachweis der *Internen Kontrolle* (IC) durch die Detektion eines JOE-Fluoreszenzsignals (**ABI PRISM® 7700 SDS**) bei gleichzeitiger Amplifikation der *Quantifizierungsstandards* (WNV LC/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (Negativkontrolle).



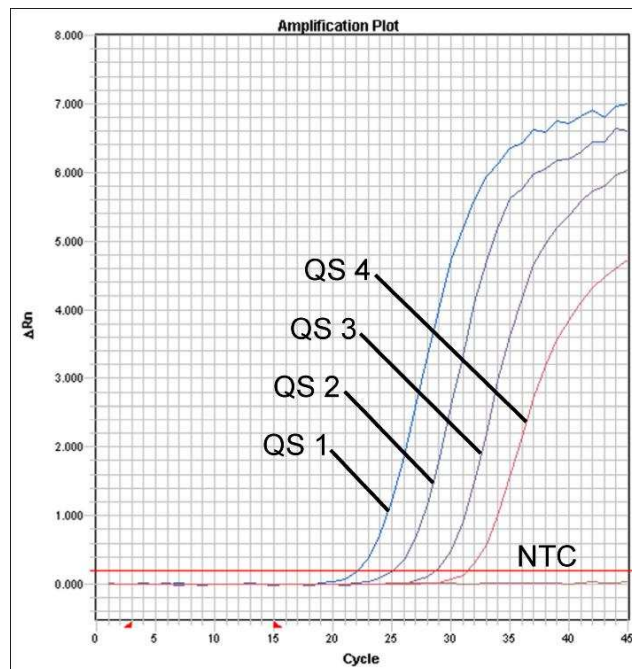


Abb. 27: Nachweis der *Quantifizierungsstandards* (WNV LC/TM QS 1 - 4) durch die Detektion eines FAM-Fluoreszenzsignals (**ABI PRISM® 7900HT SDS**). NTC: non-template control (Negativkontrolle).

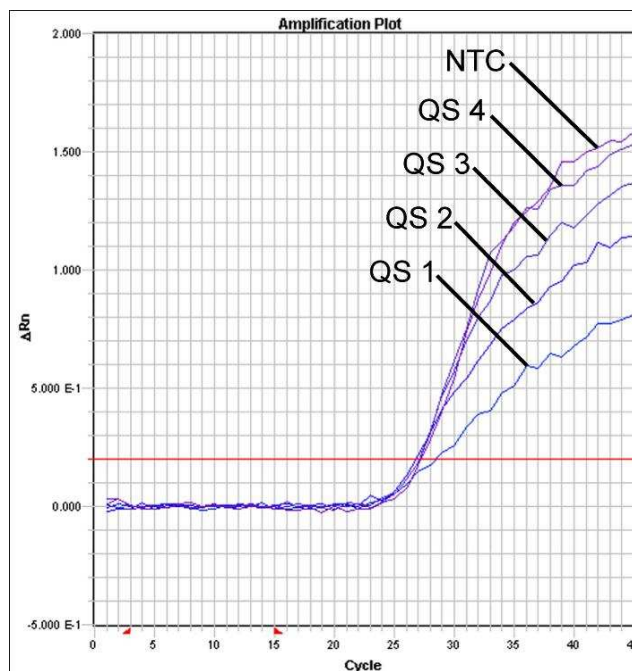


Abb. 28: Nachweis der *Internen Kontrolle* (IC) durch die Detektion eines JOE-Fluoreszenzsignals (**ABI PRISM® 7900HT SDS**) bei gleichzeitiger Amplifikation der *Quantifizierungsstandards* (WNV LC/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (Negativkontrolle).

## 10. Troubleshooting

### Kein FAM-Fluoreszenzsignal bei den Positivkontrollen (WNV LC/TM QS 1 - 4):

- Die Wahl des Detektorfarbstoffes bei der PCR-Datenanalyse entspricht nicht den Protokollangaben.
  - Wählen Sie für die Datenanalyse den Detektorfarbstoff FAM für die analytische WNV RT-PCR und den Detektorfarbstoff JOE für die RT-PCR der *Internen Kontrolle*.
- Die unter *Options* befindliche Einstellung der zur Auswertung herangezogenen Daten (*Extension Phase Data Extraction*) stimmt nicht mit den Einstellungen der *Data Collection* (siehe **8.5.2.4 Erstellung des Temperaturprofils**) überein (*ABI PRISM<sup>®</sup> 7700 SDS*).
  - Analysieren Sie den PCR-Lauf mit korrigierten Einstellungen und wiederholen Sie die Auswertung (*Analysis*).
- Die Programmierung des Temperaturprofils des *ABI PRISM<sup>®</sup> Sequence Detection Systems* ist fehlerhaft.
  - Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit den Protokollangaben (siehe **8.5 Programmierung der ABI PRISM<sup>®</sup> SDS**).
- 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 WNV TM 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* (JOE-Fluoreszenzsignal) bei gleichzeitiger Abwesenheit eines FAM-Fluoreszenzsignals der spezifischen WNV-RT-PCR:

- 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* WNV TM 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.

#### **Ein FAM-Fluoreszenzsignal der analytischen RT-PCR bei den Negativkontrollen:**

- 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

Zur Bestimmung der analytischen Sensitivität des *artus* WNV TM RT-PCR Kits wurde eine Verdünnungsreihe aus extrahierter und vorquantifizierter WNV RNA von 40 bis nominal 0,004 Kopien pro  $\mu\text{l}$  erstellt. Diese wurde anschließend unter Benutzung des *artus* WNV TM RT-PCR Kits mit den *ABI PRISM*<sup>®</sup> 7000, 7700 und 7900HT *Sequence Detection Systems* analysiert. Die Untersuchungen wurden für jedes Gerät an drei verschiedenen Tagen in Form von Achtfach-Bestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind mit Hilfe einer Probit-Analyse ermittelt worden. Deren graphische Auswertung (*ABI PRISM*<sup>®</sup> 7900HT SDS) ist in Abb. 29 dargestellt.

Nachweisgrenze (p = 0,05)	
<i>ABI PRISM</i> <sup>®</sup> 7000 SDS	0,3 Kopien/ $\mu\text{l}$
<i>ABI PRISM</i> <sup>®</sup> 7700 SDS	0,3 Kopien/ $\mu\text{l}$
<i>ABI PRISM</i> <sup>®</sup> 7900HT SDS	0,6 Kopien/ $\mu\text{l}$

Dies bedeutet, dass 0,3 Kopien/ $\mu\text{l}$  (*ABI PRISM*<sup>®</sup> 7000 SDS), 0,3 Kopien/ $\mu\text{l}$  (*ABI PRISM*<sup>®</sup> 7700 SDS) bzw. 0,6 Kopien/ $\mu\text{l}$  (*ABI PRISM*<sup>®</sup> 7900HT SDS) mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % detektiert werden können.

### Probit-Analyse: West-Nil-Virus (ABI PRISM® 7900HT SDS)

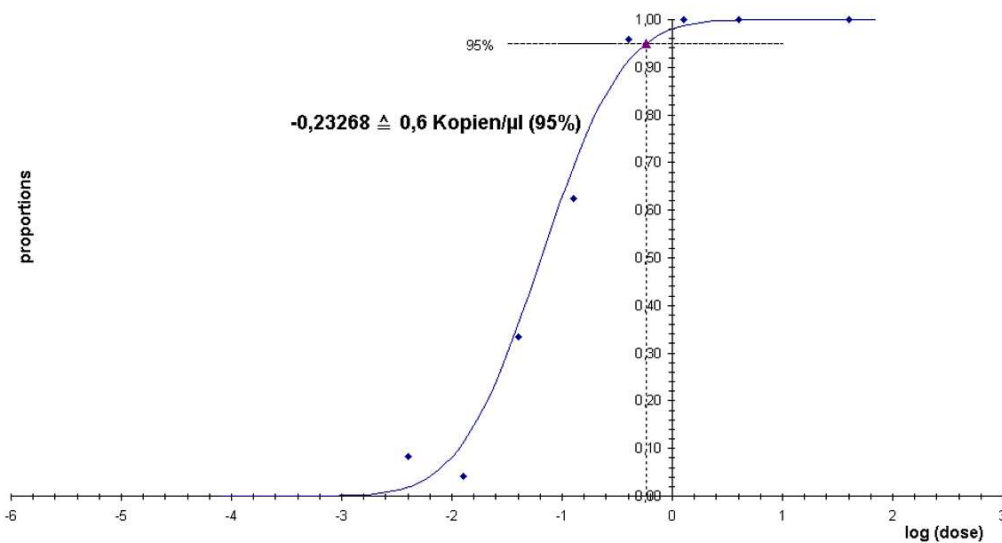


Abb. 29: Analytische Sensitivität des *artus* WNV TM RT-PCR Kits (ABI PRISM® 7900HT SDS).

## 11.2 Spezifität

Die Spezifität des *artus* WNV TM 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 WNV-Stämme kontrolliert.

Die Validierung der Spezifität erfolgte zudem an 30 verschiedenen WNV negativen Plasma- und Liquorproben, die mit den im *WNV TM Master* enthaltenen WNV spezifischen Primern und Sonden kein Signal generierten.

Für die Bestimmung der Spezifität des *artus* WNV TM RT-PCR Kits wurde die in Tabelle 1 aufgeführte Kontrollgruppe auf ihre Kreuzreaktivität untersucht. Keiner der getesteten Erreger war reaktiv.

Tabelle 1: Spezifitätstestung des Kits mit potentiell kreuzreaktiven Erregern.

Kontrollgruppe	WNV (FAM)	Interne Kontrolle (JOE)
Dengue-Virus 1 - 4	-	+
Japanisches Enzephalitis-Virus	-	+
Gelbfieber-Virus	-	+
Montana Myotis Leucoenzephalitis-Virus	-	+
Modoc-Virus	-	+
Humanes Immundefizienz-Virus 1	-	+
Coxsackievirus B3	-	+
Humanes Echovirus 30	-	+
Humanes Herpesvirus 1/2 (Herpes-simplex-Virus 1/2)	-	+
Humanes Herpesvirus 3 (Varizella-Zoster-Virus)	-	+
Humanes Herpesvirus 5 (Zytomegalievirus)	-	+
Enterovirus 71	-	+
Hepatitis A Virus	-	+
Hepatitis B Virus	-	+
Hepatitis C Virus	-	+
Parvovirus B19	-	+
<i>Listeria welshmerii</i>	-	+
<i>Listeria ivanovii</i>	-	+
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-	+
<i>Plasmodium falciparum</i>	-	+

### 11.3 Präzision

Die Präzisionsdaten für den *artus* WNV TM RT-PCR Kit erlauben die Ermittlung 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 aufgrund der Anwendung durch verschiedene Personen innerhalb eines Labors und unter Benutzung verschiedener Geräte gleichen Typs) und der **Inter-Chargen Variabilität** (Streuung unter Verwendung unterschiedlicher Chargen). Dabei werden jeweils die Standardabweichung, die Varianz und der Variationskoeffizient

sowohl für die Erreger-spezifische als auch für die PCR der *Internen Kontrolle* berechnet.

Diese Daten wurden für den *artus WNV TM RT-PCR Kit* anhand extrahierter und vorquantifizierter WNV RNA mit der Konzentration des niedrigsten *Quantifizierungsstandards* (QS 4; 40 Kopien/μl) ermittelt. Die Untersuchungen wurden in Form von Achtfach-Bestimmungen durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse wurde anhand der Ct-Werte der Amplifikationskurven (Ct: *threshold cycle*, siehe Tabelle 2) und der daraus ermittelten quantitativen Werte in Kopien/μl (siehe Tabelle 3) vorgenommen. Demnach beträgt die Gesamtstreuung einer beliebigen Probe der genannten Konzentration 1,53 % (Ct) bzw. 17,18 % (Konz.), für den Nachweis der *Internen Kontrolle* 2,77 % (Ct). Diese Werte basieren auf der Gesamtheit aller Einzelwerte der ermittelten Variabilitäten.

Tabelle 2: Präzisionsdaten auf Grundlage der Ct-Werte.

	Standard- abweichung	Varianz	Variations- koeffizient [%]
Intra-Assay Variabilität: <i>WNV RNA 1 x 10<sup>4</sup> Kopien/μl</i>	0,16	0.03	0,52
Intra-Assay Variabilität: <i>Interne Kontrolle</i>	0,15	0,02	0,56
Inter-Assay Variabilität: <i>WNV RNA 1 x 10<sup>4</sup> Kopien/μl</i>	0,14	0,02	0,46
Inter-Assay Variabilität: <i>Interne Kontrolle</i>	0,27	0.07	1,05
Inter-Chargen Variabilität: <i>WNV RNA 1 x 10<sup>4</sup> Kopien/μl</i>	0,29	0,08	0,96
Inter-Chargen Variabilität: <i>Interne Kontrolle</i>	0,54	0,32	2,18
Totalvarianz: <i>WNV RNA 1 x 10<sup>4</sup> Kopien/μl</i>	0,46	0,21	1,53
Totalvarianz: <i>Interne Kontrolle</i>	0,70	0,49	2,77

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

	Standard- abweichung	Varianz	Variations- koeffizient [%]
Intra-Assay Variabilität: <i>WNV RNA 1 x 10<sup>4</sup> Kopien/μl</i>	4,18	17,44	10,39
Inter-Assay Variabilität: <i>WNV RNA 1 x 10<sup>4</sup> Kopien/μl</i>	4,16	17,33	10,57
Inter-Chargen Variabilität: <i>WNV RNA 1 x 10<sup>4</sup> Kopien/μl</i>	9,17	84,13	23,89
Totalvarianz: <i>WNV RNA 1 x 10<sup>4</sup> Kopien/μl</i>	6,71	45,07	17,18

## 11.4 Robustheit

Die Überprüfung der Robustheit dient der Ermittlung der Gesamtausfallrate des *artus WNV TM RT-PCR Kits*. Hierzu wurden jeweils 30 WNV negative Liquor- und Plasmaproben mit je 1 Kopie/μl Elutionsvolumen WNV-RNA (ca. dreifache Konzentration der analytischen Sensitivitätsgrenze) versetzt, mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit aufgereinigt (siehe **8.1 RNA-Isolierung**) und mit dem *artus WNV TM RT-PCR Kit* analysiert. Die Ausfallrate für WNV betrug für die Gesamtheit der Proben 0 %. Die Robustheit der *Internen Kontrolle* wurde zusätzlich durch die Aufreinigung und Analyse von je 30 WNV negativen Liquor- und Plasmaproben überprüft. Die Gesamtausfallrate betrug 0 %. Inhibitionen wurden nicht beobachtet. Damit beträgt die Robustheit des *artus WNV TM RT-PCR Kits*  $\geq 99$  %.

## 11.5 Reproduzierbarkeit

Die Daten der Reproduzierbarkeit werden zum Zweck der regelmäßigen Leistungsbewertung des *artus WNV TM RT-PCR Kits* sowie des Leistungsvergleichs mit anderen Produkten durch die Teilnahme an Ringversuchen erhoben.

## 11.6 Diagnostische Evaluierung

Der *artus WNV TM RT-PCR Kit* wird derzeit noch in mehreren Studien evaluiert.



## 12. Besondere Hinweise zum Produkt-Gebrauch

- Der *artus* WNV TM 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* WNV TM 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* WNV TM RT-PCR Kit können Sie den entsprechenden Materialsicherheits-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* WNV TM 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*

**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)

1046925DE



**Sample & Assay Technologies**