

Juni 2015

RespiFast RG Panel Gebrauchsanweisung



Version 1



Qualitative In-vitro-Diagnostik

Zur Verwendung mit Geräten der Reihe Rotor-Gene® Q



4693163



PathoFinder B.V., Randwycksingel 45, 6229 EG
Maastricht, NIEDERLANDE

Vertrieben durch QIAGEN GmbH, QIAGEN-Straße 1,
40724 Hilden, DEUTSCHLAND



1090425DE



Inhalt

Verwendungszweck	4
Zusammenfassung und Erläuterung	5
Prinzipien des Verfahrens	5
Zielgene	7
Im Lieferumfang enthaltene Materialien	10
Kit-Inhalt	10
Vom Anwender bereitzustellende Materialien	10
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	12
Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	12
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	14
Lagerung und Handhabung der Proben	14
Durchführung	14
Extraktion und Vorbereitung der Nukleinsäuren	14
Verwenden einer Negativkontrolle	16
Verwenden von interner Kontrolle und Carrier-RNA	16
Verwenden der Amplifikationskontrolle	18
Verwenden der Positivkontrolle	19
Protokoll: PCR-Amplifikation und Schmelzkurvenanalyse	20
Interpretation der Ergebnisse	44
Normalisierung	44
Analyse	44
Schwellenwert	45

Hilfe zur Fehlerbehebung.....	50
Qualitätskontrolle.....	51
Grenzen des Verfahrens.....	51
Leistungsmerkmale.....	52
Symbole.....	53
Kontaktinformationen.....	54
Bestellinformationen.....	55

Verwendungszweck

Das RespiFast RG Panel ist ein qualitativer Multiplex-PCR-Test zum Nachweis und zur Differenzierung von 16 RNA-Viren,* 2 DNA-Viren und 4 Bakterien, welche Atemwegsinfektionen beim Menschen auslösen können. Es handelt sich um folgende Erreger: Adenovirus, Bocavirus, Coronavirus OC43, Coronavirus 229E, Coronavirus NL63/HKU1, humanes Metapneumovirus (hMPV), Influenza-A-Virus, Influenza-B-Virus, Influenza-A-Virus Subtyp H1N1pdm09, Parainfluenzavirus Typ 1, Parainfluenzavirus Typ 2, Parainfluenzavirus Typ 3, Parainfluenzavirus Typ 4, Rhinovirus/Enterovirus, respiratorisches Synzytial-Virus Typ A (RSVA), respiratorisches Synzytial-Virus Typ B (RSVB), *Bordetella pertussis*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* und *Mycoplasma pneumoniae*.

In Verbindung mit anderen klinischen Befunden und Laborergebnissen unterstützt das RespiFast RG Panel die Diagnose von Atemwegsinfektionen. Ein negatives Ergebnis bedeutet nicht unbedingt die Abwesenheit einer viralen oder bakteriellen Atemwegsinfektion; ein negatives Ergebnis sollte nicht als alleinige Grundlage für eine Diagnose, Behandlung oder andere Therapieentscheidungen verwendet werden. Ein positives Ergebnis schließt eine Koinfektion mit weiteren Pathogenen nicht aus. Das/die nachgewiesene/n Pathogen/e ist/sind unter Umständen nicht der eigentliche Krankheitsauslöser.

In die endgültige Diagnose müssen andere Labortests und die Beurteilung des klinischen Bildes einfließen. Das Produkt ist nur zur Verwendung durch entsprechend ausgebildetes Laborpersonal bestimmt.

* Das RespiFast RG Panel weist 16 RNA-Viren nach, differenziert dabei aber nicht zwischen Rhinovirus und Enterovirus und nicht zwischen Coronavirus HKU1 und Coronavirus NL63.

Zusammenfassung und Erläuterung

Akute Atemwegsinfektionen sind die häufigste akute Infektion bei Erwachsenen und Kindern. Bei Patienten mit beeinträchtigtem Immunsystem stellen sie ein erhebliches Gesundheitsproblem dar. Atemwegsinfektionen werden häufig in Infektionen der unteren Atemwege und Infektionen der oberen Atemwege unterteilt. Beispiele für Infektionen der oberen Atemwege sind Rhinorrhö, Konjunktivitis, Pharyngitis, Otitis media und Sinusitis. Beispiele für Infektionen der unteren Atemwege sind Pneumonie, Bronchiolitis und Bronchitis. Akute Atemwegsinfektionen können sowohl durch Viren als auch durch Bakterien hervorgerufen werden und die möglichen Erreger sind ebenso zahlreich wie divers – eine große Herausforderung für die Diagnostik.

Nukleinsäureamplifikationstests haben sich als schnelle, sensitive und spezifische Alternative erwiesen, sowohl als Einzeltests als auch im Multiplex-Format. Im Multiplex-Format kann mehr als eine Zielsequenz gleichzeitig amplifiziert werden. Dies erlaubt Einblicke in die Bedeutung von Mischinfektionen und in die Prognose und Rekrudescenz der Atemwegserkrankung.

Prinzipien des Verfahrens

Das RespiFast RG Panel basiert auf der SmartFinder®-Technologie, die eine hochkomplexe Analyse von bis zu 14 Zielsequenzen in einer einzigen Real-Time-PCR-Reaktion erlaubt. Das RespiFast RG Panel enthält 23 verschiedene RespiFast-Primersätze zusammen mit 15 fluoreszenzmarkierten SMART-Sonden (SMART: engl. *single-tube multiplex amplification in real time*, deutsch etwa Einzelröhrchen-Multiplex-Amplifikation in Echtzeit), was den Nachweis von 22 verschiedenen Pathogenen sowie einer internen Kontrolle und 2 Amplifikationskontrollen ermöglicht. Die Reaktion beginnt mit einer Präamplifikation, bei der eine reverse Transkription mit einer PCR zur Amplifikation der Ziel-DNA oder -cDNA kombiniert wird. Anschließend wird ein Teil des Präamplifikationsansatzes in zwei PCR-

Röhrchen überführt. In Schritt 2 werden zwei separate Reaktionen durchgeführt. Der Nachweis erfolgt über eine Schmelzkurvenanalyse. In **Abbildung 1** ist eine schematische Darstellung des Ablaufs des Tests gezeigt.

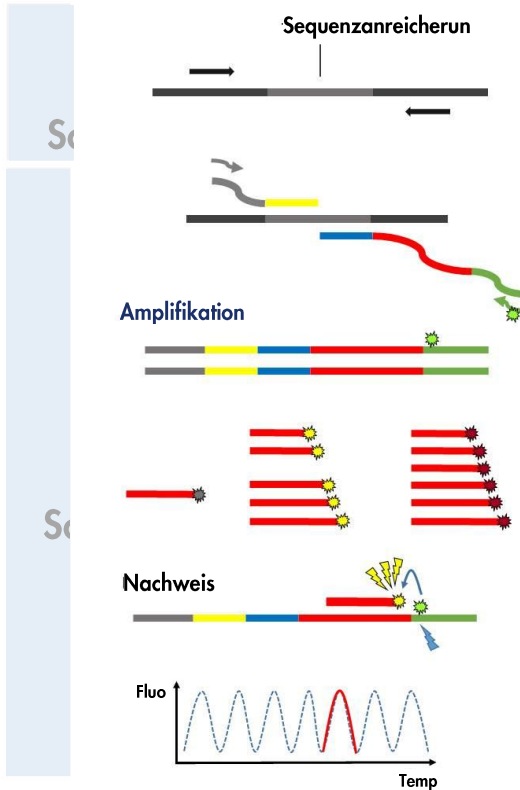


Abbildung 1. Überblick über den Ablauf des RespiFast RG Panels.

Das RespiFast RG Panel arbeitet zum Nachweis der Pathogen-Nukleinsäuren mit dem Gerät Rotor-Gene Q MDx oder Rotor-Gene Q.

Der Test enthält eine interne Kontrolle (IC) zur Unterscheidung von echt-negativen und durch Abbau von Nukleinsäuren, PCR-Inhibition oder Fehlschlagen des Tests verursachten falsch-negativen Probenergebnissen. Das RespiFast RG Panel enthält zusätzlich 2 Amplifikationskontrollen (AC), durch die gegebenenfalls zwischen einer erfolglosen Extraktion und einer erfolglosen Amplifikation im Test unterschieden werden kann.

Als Ausgangsprobe dienen Gesamtnukleinsäuren, die aus Nasopharyngealabstrichen extrahiert und aufgereinigt wurden. Die Probenvorbereitung ist ein separates Verfahren, das nicht Bestandteil des Panels ist. Verwenden Sie geeignete Verfahren und Produkte zur Handhabung der Proben und zur Extraktion und Aufreinigung der Nukleinsäuren (siehe „Lagerung und Handhabung der Proben“, Seite 14, und „Extraktion und Vorbereitung der Nukleinsäuren“, Seite 14).

Zielgene

Die für das Design der Sonden und Primer verwendeten Zielgene sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1. Zielgene des RespiFast RG Panels

Analyt	Gen	Abk. des Pathogens
Kontrollen		
Interne Kontrolle	Lyseprotein-Gen des Phagen MS2	IC
Amplifikationskontrolle 1	einzigartige künstliche Sequenz	AC1
Amplifikationskontrolle 2	einzigartige künstliche Sequenz	AC2
Viren		
Adenovirus	Hexon(H)-Gen	Adeno
Bocavirus	Nichtkapsid(NP1)-Gen	Boca
Coronavirus 229E	Nukleokapsidprotein(NP)-Gen	229E
Coronavirus HKU1	Nukleokapsidphosphoprotein(N)-Gen	HKU1
Coronavirus NL63	Nukleokapsidprotein(NP)-Gen	NL63
Coronavirus OC43	Nukleokapsidprotein(NP)-Gen	OC43
Humanes Metapneumovirus	Nukleokapsidprotein(NP)-Gen	hMPV
Influenza-A-Virus	Matrixprotein(M1)-Gen	InfA
Influenza-B-Virus	Matrixprotein(M1)-Gen	InfB
Influenza-A-Virus Subtyp H1N1 pdm09	Neuraminidase-Gen	H1N1
Parainfluenzavirus Typ 1	Hämagglutinin-Neuraminidase(HN)-Gen	PIV1
Parainfluenzavirus Typ 2	Hämagglutinin-Neuraminidase(HN)-Gen	PIV2
Parainfluenzavirus Typ 3	Hämagglutinin-Neuraminidase(HN)-Gen	PIV3
Parainfluenzavirus Typ 4	Hauptnukleokapsidprotein(N)-Gen	PIV4
Rhinovirus/Enterovirus	5'-untranslatierter Bereich des Polyprotein(PP)-Gens	Rhino/Entero
Respiratorisches Synzytial-Virus Typ A	Nicht-Strukturprotein-Gen	RSVA
Respiratorisches Synzytial-Virus Typ B	Nukleoprotein-Gen	RSVB
Bakterien		
<i>Bordetella pertussis</i>	Insertionssequenz 481 (IS481)	B. pert
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	Major-Outer-Membrane-Protein(OmpA)-Gen	C. pneu
<i>Legionella pneumophila</i>	Macrophage-Inhibitor-Potentiator(Mip)-Gen	L. pneu
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Cytadhesin-Protein(P1)-Gen	M. pneu

Mit jeder Probe werden eine Präamplifikation (Schritt 1) und zwei Schritt-2-Reaktionen durchgeführt. Die Pathogene, die Markierungsmoleküle und der angegebene T_m -Wert der jeweiligen SMART-Hybridisierungssonden der 2 RespiFast-Reaktionen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2. Zielanalyte und zugehörige T_m -Werte der SMART-Sonden

Markierung	SMART-Sonde	T_m (°C) Akzeptanzbereich	Abkürzung des Pathogens (Gemisch 1)	Abkürzung des Pathogens (Gemisch 2)
Cy5 [®] 5	Cy5-Sonde 1	50,5–53,5*	L. pneu	OC43
	Cy5-Sonde 2a	55–58	B. pert	–
	Cy5-Sonde 2b	52,5–55,5	–	HKU1/NL63
	Cy5-Sonde 3	60,5–63,5	Rhino/Entero	
		58,5–61,5		229E
	Cy5-Sonde 4	66,5–69,5	C. pneu	–
	Cy5-Sonde 5	70,5–73,5	M. pneu	–
Cy5-Sonde 6	76–79	–	H1N1	
ROX [™]	ROX-Sonde 1	53,5–56,5	RSVA	PIV1
	ROX-Sonde 2	58–61	Adeno	PIV2
	ROX-Sonde 3	62,5–65,5	hMPV	PIV3
	ROX-Sonde 4	66,5–69,5	RSVB	PIV4
	ROX-Sonde 5	72,5–75,5	InfA	Boca
	ROX-Sonde 6	76,5–79,5	InfB	–
BHQ [®] 1	BHQ1-Sonde 1	70,5–73,5	IC	IC
	BHQ1-Sonde AC1	61–64	AC1	–
	BHQ1-Sonde AC2	55,5–58,5	–	AC2

* Bei der Cy5-Sonde 1 erscheint mitunter ein Doppelpeak. Der T_m -Wert des zweiten Peaks ist der korrekte.

Im Lieferumfang enthaltene Materialien

Kit-Inhalt

RespiFast RG Panel		(25)
Katalog-Nr.		4693163
Anzahl der Reaktionen		25
Inhalt	Farbe des Deckels	Volumen
Pre-amplification master mix (Präamplifikations-Master-Mix)	Lila	> 160 µl
Pre-amplification primer mix (Präamplifikations-Primer-Mix)	Weiß	> 220 µl
RespiFast buffer 1 (contains AC1) [RespiFastPuffer 1 (enthält AC1)]	Rot	> 500 µl
RespiFast buffer 2 (contains AC2) [RespiFastPuffer 2 (enthält AC2)]	Blau	> 500 µl
RespiFast enzyme (RespiFast-Enzym)	Orange	> 55 µl
Internal Control (IC) [Interne Kontrolle (IC)]	Schwarz	> 450 µl
Positive Control (PC) [Positivkontrolle (PC)]	Grün	> 50 µl
Dilution buffer (Verdünnungspuffer)	Transparent	> 1500 µl
<i>RespiFast RG Panel Handbook</i> (English) [RespiFast RG Panel Gebrauchsanweisung, englisch]		1x

Vom Anwender bereitzustellende Materialien

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (*safety data sheets*, SDS) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

Reagenzien

- RNA/DNA-Extraktionskit (siehe „Extraktion und Vorbereitung der Nukleinsäuren“, Seite 14)
- RNase/DNase-freies Wasser

Verbrauchsmaterialien

- Einweg-Pipettenspitzen mit hydrophoben Filtern
- Einweg-„Low-Retention“-Pipettenspitzen mit hydrophoben Filtern
- RNase/DNase-freie 1,5-ml-Reaktionsgefäße
- RNase/DNase-freie 0,2-ml-PCR-Röhrchen (Einzelröhrchen mit Deckel oder PCR-Streifen mit einzelnen Deckeln)
- PCR-Streifen und Deckel, 0,1 ml, zur Verwendung mit Geräten der Reihe Rotor-Gene Q (Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, QIAGEN-Kat.-Nr. 981103 oder 981106)

Geräte/Ausrüstung

- Verstellbare Pipetten: * 0,1–2 µl, 2–20 µl, 20–200 µl
- Vortex-Mischer*
- Tischzentrifuge* mit Rotor für 2-ml-Reaktionsgefäße
- Zentrifuge* für 0,2-ml-Röhrchen
- Kühlblock oder Eis
- Thermocycler* für 0,2-ml-PCR-Röhrchen mit beheiztem Deckel und Temperiergeschwindigkeit von 1–5 °C/Sekunde (für Präamplifikation; z. B. Blockthermocycler GeneAmp® PCR System 9700)
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM* oder Rotor-Gene Q 5plex HRM* mit Zubehör

* Stellen Sie sicher, dass die Geräte gemäß den Herstellerempfehlungen geprüft und kalibriert wurden.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern entnehmen (*safety data sheets*, SDS). In unserer Online-Sammlung der Sicherheitsdatenblätter unter www.qiagen.com/safety finden Sie zu jedem QIAGEN-Kit und zu jeder Kit-Komponente das jeweilige SDS als PDF-Datei, die Sie einsehen und ausdrucken können.

Sicherheitsinformationen zum verwendeten Extraktionskit finden Sie im jeweiligen zugehörigen Handbuch. Sicherheitsinformationen zu den Geräten finden Sie in den jeweiligen Benutzerhandbüchern der Geräte.

Entsorgen Sie Proben und Ansätze gemäß Ihren örtlichen Sicherheitsvorschriften.

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Folgendes sollte vom Anwender immer beachtet werden:

- Dieser molekularbiologische Test darf nur von qualifiziertem Laborpersonal durchgeführt werden.
- Positivmaterial (Proben und Positivkontrollen) separat von allen anderen Reagenzien lagern und verarbeiten und in einem räumlich getrennten Bereich zum Reaktionsgemisch hinzufügen.
- Bei der Durchführung des Tests Einmal-Handschuhe tragen.
- Einwegspitzen mit hydrophoben Filtern verwenden, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

- Zum Pipettieren des Präamplifikations-Master-Mix und des RespiFast-Enzyms Einweg-„Low-Retention“-Pipettenspitzen mit hydrophoben Filtern verwenden.
- RNase/DNase-freie PCR-Röhrchen verwenden.
- RNA/DNA-Proben immer auf Eis auftauen und auf Eis oder in einem Kühlblock halten.
- Enzyme immer auf Eis oder in einem Kühlblock halten, solange sie außerhalb des Gefrierschranks sind. Enzyme sorgfältig behandeln und sehr vorsichtig mischen.
- Nach dem Auftauen die Reagenzien für 5 Sekunden in einer Zentrifuge anzentrifugieren und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mischen.
- Die Programmierung des Rotor-Gene Q mit den jeweiligen Programmen sollte vor Beginn des Tests durchgeführt werden.
- PCR-Röhrchen und -Platten immer kurz anzentrifugieren und vorsichtig öffnen, um Aerosole zu vermeiden.

Hinweis: Wir empfehlen zur Vermeidung von Kontaminationen, die Arbeitsschritte in PCR-Werkbänken in 3 abgetrennten Bereichen durchzuführen:

Bereich 1: Vorbereitung der Master-Mixe für Präamplifikation und Schritt 2/Schmelzkurvenanalyse

Bereich 2: Zugabe der RNA/DNA-Proben zum Reaktionsgemisch

Bereich 3: Durchführung von Präamplifikation, Schritt 2 und Schmelzkurvenanalyse in 2 Schritten:

- Durchführung der Präamplifikation
- Hinzufügen der Präamplifikationsprodukte zum Schritt-2-Gemisch (vorzugsweise in einer PCR-Werkbank) und Durchführung von Schritt 2 und Schmelzkurvenanalyse

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Die Komponenten des RespiFast RG Panels sind dunkel bei -30 bis -15 °C zu lagern – unter diesen Lagerbedingungen sind sie mindestens bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren (> 5 x) sollte vermieden werden, da dadurch die Leistungsfähigkeit des Assays verringert werden kann.

Lagerung und Handhabung der Proben

Der korrekte Nachweis von respiratorischen Pathogenen ist abhängig von einer guten Probenqualität, dem schnellen Transport der Proben ins Labor und der korrekten Lagerung vor Durchführung der Labortests. Zum Nachweis von viralen und/oder bakteriellen Infektionen der Atemwege sind Nasopharyngealabstriche geeignet.

Die klinischen Proben sollten so rasch wie möglich zum Labor transportiert, aliquotiert und verarbeitet werden. Die Proben sollten auf 4 °C gehalten werden. Wenn die Proben nicht innerhalb von 48 Stunden verarbeitet werden können, sollten sie bei oder unter -20 °C, vorzugsweise bei -70 °C, gelagert werden.

Durchführung

Extraktion und Vorbereitung der Nukleinsäuren

Der QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit und der QIAasymphony® DSP Virus/Pathogen Mini Kit von QIAGEN, aufgeführt in Tabelle 3, sind validiert für die Aufreinigung von DNA und RNA aus dem angegebenen humanen Probenotyp zur Verwendung mit dem RespiFast RG Panel. Führen Sie die Nukleinsäureaufreinigung gemäß den Anweisungen im Handbuch des Kits durch.

Tabelle 3. Zur Verwendung mit dem RespiFast RG Panel validierte Aufreinigungskits

Probentyp	Nukleinsäure-Isolierungskit	Katalognummer (QIAGEN)
Nasopharyngealabstriche	QIAamp MinElute Virus Spin Kit (50)	57704
	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit mit „Complex 200“-Protokoll	937036

Verwenden Sie 200 µl Probenmaterial und eluieren Sie in 60 µl Elutionspuffer. Wir raten dringend von dem Versuch ab, die Nukleinsäuren aufzukonzentrieren, da dies die Gefahr einer Inhibition der RT-PCR-Enzyme erhöhen könnte. Zur lysierten Probe wird eine interne Kontrolle zugegeben (siehe „Verwenden von interner Kontrolle und Carrier-RNA“, Seite 16).

Wir empfehlen bei Verwendung des QIAamp MinElute Virus Spin Kits, die Zugabe des Lysepuffers zur Probe in einer Sicherheitswerkbank mit laminarer Luftströmung durchzuführen. Nach Lyse der Probe kann das Extraktionsverfahren auf dem normalen Labortisch fortgeführt werden. Es empfiehlt sich, die Sicherheitswerkbank nach der Verwendung mit einer Dekontaminationslösung (z. B. 1000 ppm Chlorbleiche)* zu dekontaminieren und für 30 Minuten das UV-Licht anzustellen.

Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Wiederauftauen der extrahierten DNA/RNA soweit wie möglich. Falls die Nukleinsäureextrakte innerhalb eines Tages weiterverarbeitet werden, sollten sie bei 4 °C gelagert werden. Für längere Zeiträume ist die extrahierte RNA/DNA bei -20 °C oder -70 °C zu lagern.

* Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (*safety data sheets*, SDS) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

Verwenden einer Negativkontrolle



In jedem Lauf sollte eine Negativkontrolle mitgeführt werden. Eine Negativkontrolle besteht aus 200 µl Wasser in PCR-Qualität plus interne Kontrolle. Diese Negativkontrolle wird wie eine normale Probe behandelt, inklusive Nukleinsäureextraktionsverfahren. In der Endauswertung dient die Negativkontrolle als Referenzwert für das Hintergrundsignal des FAM/ROX- und des FAM/Cy5-Kanals und für die positiven IC- und AC-Signale im grünen Kanal.

Verwenden von interner Kontrolle und Carrier-RNA

Bei der Verwendung des QIAamp MinElute Virus Spin Kits oder des QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kits zusammen mit dem RespiFast RG Panel muss die interne Kontrolle (IC) im Aufreinigungsverfahren mitgeführt werden, um die Überwachung der Effizienz der Probenvorbereitung und des nachfolgenden Tests zu ermöglichen. Zudem muss sowohl bei Verwendung des QIAamp MinElute Virus Spin Kits als auch bei Verwendung des QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kits Carrier-DNA angesetzt werden.

Als IC fungiert der Phage MS2. Die IC dient der Kontrolle von Lyse, RNA/DNA-Extraktion, der Testleistung des RespiFast RG Panels und der Überprüfung auf mögliche PCR-Inhibition. Die IC wird zusammen mit der Carrier-RNA dem Lysepuffer vor Zugabe zur Probe zugesetzt. Die Menge der zugesetzten IC ist unabhängig vom ursprünglichen Volumen der Probe.

Die Menge der zugesetzten IC ist abhängig vom Elutionsvolumen. Bei Verwendung des QIAamp MinElute Virus Spin Kits wird die extrahierte RNA/DNA in einem Volumen von 60 µl eluiert. Das dem Puffer AL zuzufügende Volumen an IC beträgt 5,5 µl pro Probe (siehe Tabelle 4).

Bei Vorliegen einer starken Infektion oder mehrerer Infektionen ist der Schmelzpeak der IC unter Umständen in der Endauswertung nicht erkennbar. Dies lässt sich durch hohe Mengen

an Pathogen-Nukleinsäuren erklären, welche den Großteil der Reagenzien des Tests verbrauchen. Daher ist der Test auch gültig, wenn das IC-Signal fehlt, sofern ein oder mehrere spezifische Schmelzpeaks, welche eine Infektion anzeigen, vorhanden sind.

Tabelle 4. Erforderliche Volumina von Puffer AL, Carrier-RNA-Puffer-AVE-Gemisch und IC bei Extraktion mit dem QIAamp MinElute Virus Spin Kit

Anzahl Proben	Volumen Puffer AL (ml)	Volumen Carrier-RNA-AVE (µl)	Volumen interne Kontrolle (µl)
1	0,22	6,2	5,5
2	0,44	12,3	11
3	0,66	18,5	16,5
4	0,88	24,6	22
5	1,1	30,8	27,5
6	1,32	36,9	33
7	1,54	43,1	38,5
8	1,76	49,2	44
9	1,98	55,4	49,5
10	2,2	61,5	55
11	2,42	67,7	60,5
12	2,64	73,8	66

Bei der Verwendung des QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kits zusammen mit dem RespiFast RG Panel muss die interne Kontrolle im Aufreinigungsverfahren mitgeführt werden, um die Überwachung der Effizienz der Probenvorbereitung und des nachfolgenden Tests zu ermöglichen.

Für die Berechnung der internen Kontrolle (IC) sollte der „IC Calculator“ der QIASymphony Management Console (QMC) benutzt werden.

Für ein garantiertes Elutionsvolumen von 60 µl ist es erforderlich, dass das Gerät ein tatsächliches Volumen von 90 µl zur Probe gibt. Die Menge an zugesetzter IC beträgt 7,5 µl

pro Probe. Stellen Sie daher im „IC Calculator“ der QIASymphony Management Console (QMC) einen Wert von 7,5 im Feld „Internal Control/Sample“ ein.

Tabelle 5 zeigt die Zugabe der internen Kontrolle in einem Verhältnis von 7,5 µl pro Probe. Es ist empfehlenswert, unmittelbar vor jedem Lauf frische Mischungen herzustellen.

Tabelle 5. Ansetzen von Carrier-RNA und interner Kontrolle

Komponente	n = Anzahl der Proben und Kontrollen	
	n ≤ 13	n ≥ 13
	Volumen (µl) (Sarstedt-Röhrchen)*	Volumen (µl) (Corning-Röhrchen)†
Carrier-RNA-Vorratslösung (CARRIER)	(n + 3) x 3	(n + 5) x 3
Interne Kontrolle	(n + 3) x 7,5	(n + 5) x 7,5
Puffer AVE	(n + 3) x 109,5	(n + 5) x 109,5
Endvolumen pro Probe (ohne Totvolumen)	120	120
Gesamtvolumen für n Proben	(n + 3) x 120	(n + 5) x 120

* 2-ml-Reaktionsgefäße Typ H und Typ I (Sarstedt, Kat.-Nr. 72.693 bzw. 72.694). Wenn Sie die interne Kontrolle als Vorratslösung in einem größeren Röhrchen ansetzen, müssen Sie das Gesamtvolumen jeder Komponente mit der Anzahl der verwendeten IC-Röhrchen multiplizieren. Es wird ein der Menge von 3 zusätzlichen Proben entsprechendes zusätzliches Volumen an IC-Gemisch (d. h. 360 µl) benötigt. Befüllen Sie die Röhrchen nicht mit mehr als 1,92 ml Gesamtvolumen (entsprechend einer Höchstzahl von 13 Proben).

Falls Lösung für mehr als 13 Reaktionen in 2,0-ml-Reaktionsgefäßen verwendet werden soll, setzen Sie die Reaktionen in einem größeren Röhrchen an und verteilen Sie sie dann auf mehrere Röhrchen. Achten Sie darauf, dass in jedem Röhrchen ein der Menge von 3 zusätzlichen Proben entsprechendes Zusatzvolumen enthalten ist.

† 14-ml-Rundboden-Röhrchen aus Polystyrol, 17 x 100 mm (Fa. Corning, früher Becton Dickinson, Kat.-Nr. 352051). Vom Gemisch der internen Kontrolle wird ein Volumen benötigt, das 5 zusätzlichen Proben (d. h. 600 µl) entspricht. Befüllen Sie das Röhrchen nicht mit mehr als 13,92 ml Gesamtvolumen.

Verwenden der Amplifikationskontrolle

Die RespiFast-Puffer 1 und 2 enthalten beide eine für den jeweiligen Puffer spezifische Amplifikationskontrolle (AC). Mit der AC wird der zweite Teil des RespiFast-Protokolls kontrolliert: die korrekte Zugabe der Reagenzien und die Anwendung der korrekten PCR- und Schmelzkurvenanalyseprotokolle. AC 1 und AC 2 werden über eine BHQ1-markierte

Nachweissonde detektiert und zeigen unterschiedliche T_m -Werte, so dass ein Vertauschen der Reaktionen von Gemisch 1 und Gemisch 2 detektiert werden kann.

Die AC-Reaktion kann in der Gesamtreaktion durch Konkurrenz gehemmt werden, wenn eine starke Infektion detektiert wird. Falls kein Pathogen in der Reaktion nachgewiesen wird, muss die AC einen Schmelzpeak zeigen, um die Abwesenheit von Pathogenreaktionen in dieser Reaktion zu validieren.

Wenn eine starke Infektion in einem der RespiFast-Gemische einer Probe nachgewiesen wird, kann die IC möglicherweise in diesem RespiFast-Gemisch und auch dem zugehörigen anderen RespiFast-Gemisch nicht detektiert werden, weil sie während der Präamplifikation durch Konkurrenz des Pathogens nicht ausreichend amplifiziert wurde. In diesem Fall lässt sich durch Anwesenheit der AC im anderen RespiFast-Gemisch zeigen, dass die Amplifikation in beiden RespiFast-Gemischen korrekt ablief.

Verwenden der Positivkontrolle

Das RespiFast RG Panel enthält als Positivkontrolle ein DNA-Plasmid, das die Zielsequenzen von 4 Pathogenen enthält, die mit dem Test nachgewiesen werden können. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die Zusammensetzung der Positivkontrolle. Die Positivkontrolle muss keiner Extraktion unterzogen werden und wird weiter als normale Probe im RespiFast-RG-Protokoll behandelt. Die Verwendung der Positivkontrolle in einem RespiFast RG Panel wird empfohlen, ist aber nicht verpflichtend.

Tabelle 6. Positivkontrolle

Analyt	Detektionsgemisch	Detektionskanal	Durchschnittliche T_m
Influenza A	Gemisch 1	FAM/ROX	74 °C
<i>Bordetella pertussis</i>	Gemisch 1	FAM/Cy5	56,5 °C
Parainfluenzavirus Typ 2	Gemisch 2	FAM/ROX	59,5 °C
Coronavirus 229E	Gemisch 2	FAM/Cy5	60 °C

Protokoll: PCR-Amplifikation und Schmelzkurvenanalyse

Vorbereitungen

- Alle Reagenzien und die Template-RNA/DNA auftauen lassen (sofern gefroren) und die Röhren auf Eis halten.
- Setzen Sie von den verschiedenen Gemischen jeweils etwas größere Volumina als erforderlich an, um Pipettierverluste auszugleichen.

Durchführung

Präamplifikation

1. Schwenken Sie den Präamplifikations-Master-Mix mehrmals über Kopf, um sicherzustellen, dass er vollständig aufgetaut und homogen gemischt ist. Zentrifugieren Sie das Röhren kurz an. Setzen Sie das Präamplifikations-Reaktionsgemisch gemäß Tabelle 7 an und halten Sie es auf Eis.

Das Reaktionsgemisch enthält in der Regel alle Komponenten, die für die PCR benötigt werden, mit Ausnahme der Probe.

Hinweis: Die Gemische für Schritt 2 können zusammen mit dem Präamplifikationsgemisch hergestellt werden und sollten dann bis zur Verwendung dunkel bei 4 °C aufbewahrt werden. Die Gemische können nur gleichzeitig hergestellt werden, wenn das gesamte Verfahren ohne Verzögerung durchgeführt wird; zwischen den zwei Schritten sind dann keine Pausen zulässig. Bei längerer Lagerung (z. B. über Nacht) ist die Stabilität der Gemische nicht gewährleistet.

Tabelle 7. Ansetzen des Präamplifikations-Reaktionsgemisches

Anzahl Proben (Farbe des Röhrchendeckels)	1	12
Präamplifikations-Master-Mix (lila)	6,25 µl	75 µl
Präamplifikations-Primer-Mix (weiß)	8,75 µl	105 µl
Gesamtvolumen	15 µl	180 µl

- Mischen Sie das Präamplifikations-Reaktionsgemisch vorsichtig, aber gründlich, und pipettieren Sie 15 µl des Gemischs in jedes 0,2-ml-PCR-Röhrchen. Geben Sie dann 10 µl der eluierten Proben-DNA/RNA bzw. der Negativkontrolle oder Positivkontrolle hinzu (siehe Tabelle 8).
- Schließen Sie die PCR-Röhrchen und mischen Sie den Inhalt gut. Zentrifugieren Sie die Röhrchen kurz an und geben Sie die Röhrchen zurück auf Eis oder in einen Kühlblock.

Tabelle 8. Ansetzen der Präamplifikationsreaktionen

Anzahl Proben	1	12
Präamplifikations-Reaktionsgemisch	15 µl	je 15 µl
Probe, Negativkontrolle oder Positivkontrolle	10 µl	je 10 µl
Gesamtvolumen	25 µl	je 25 µl

- Programmieren Sie den Blockthermocycler gemäß Tabelle 9.

Tabelle 9. Programm des Thermocyclers für die Präamplifikation

Reverse Transkription:	10 Minuten	50 °C
Anfänglicher Aktivierungsschritt:	2 Minuten	95 °C
3-Schritt-Zyklus:		
Denaturierung	20 Sekunden	94 °C
Annealing	20 Sekunden	55 °C
Verlängerung	35 Sekunden	72 °C
Anzahl der Zyklen	40	
Halten:	–	20 °C

5. Starten Sie das Präamplifikationsprogramm, während die PCR-Röhrchen noch auf Eis sind. Warten Sie, bis der Thermocycler 50 °C erreicht hat. Setzen Sie dann die Röhrchen in den Thermocycler und schließen Sie den beheizten Deckel.

RespiFast RG Panel Schritt 2

6. Erstellen Sie anhand der folgenden Schritte ein Temperaturprofil für den Rotor-Gene Q. Eine Übersicht des Thermocyclerprogramms finden Sie in Tabelle 10.

Einstellen allgemeiner Parameter	Abbildung 2, Abbildung 3
Erstellen neuer Kanäle	Abbildung 4 bis Abbildung 7
Einstellen der Verstärkungswerte	Abbildung 8, Abbildung 9
Programmieren des Temperaturprofils	Abbildung 10 bis Abbildung 15
Programmieren des Schmelzprogramms	Abbildung 16, Abbildung 17
Zusammenfassung und Speichern der Vorlage	Abbildung 18, Abbildung 19
Start des Laufs	Abbildung 20

Alle Angaben beziehen sich auf die Softwareversion 2.3 des Rotor-Gene Q. Einzelheiten zur Programmierung des Rotor-Gene Q entnehmen Sie bitte dem Benutzerhandbuch des Geräts. Die jeweiligen Einstellungen sind in den Abbildungen durch schwarze Rahmen hervorgehoben. Die Abbildungen zeigen die Einstellungen für Geräte der Reihe Rotor-Gene Q.

Tabelle 10. Überblick über das Thermocyclerprogramm für Schritt 2

			Anmerkungen
Anfänglicher Denaturierungsschritt:	2 Minuten	95 °C	
PCR 1: 3-Schritt-Zyklus:			Hochspezifische PCR
Denaturierung	15 Sekunden	94 °C	
Annealing	15 Sekunden	55 °C	
Verlängerung	15 Sekunden	72 °C	
Anzahl der Zyklen	10		
PCR 2: 3-Schritt-Zyklus:			
Denaturierung	15 Sekunden	94 °C	
Annealing	15 Sekunden	50 °C	Datenerfassung*
Denaturierung	15 Sekunden	72 °C	
Anzahl der Zyklen	23		
Denaturierung:	2 Minuten	95 °C	
Schmelzprogramm:	–	40–90 °C	Datenerfassung†

* Kanäle für die Datenerfassung: Grün, Verstärkung 4; Rot, Verstärkung 1; FAM™/ROX, Verstärkung 8; FAM/Cy5, Verstärkung 10.

† Kanäle für die Datenerfassung: Grün, Rot, FAM/ROX und FAM/Cy5. Verwenden Sie die Einstellung „Optimize gain before melt on all tubes“ (Verstärkung bei allen Röhren vor Schmelzen optimieren). „The gain giving the highest fluorescence less than 95 will be selected.“ (Die Verstärkung, die den höchsten Fluoreszenzwert unter 95 ergibt, wird ausgewählt.)

7. Öffnen Sie zunächst das Dialogfeld „New Run Wizard“ (Assistent für neuen Lauf) (**Abbildung 2**). Markieren Sie das Kontrollkästchen „Locking Ring Attached“ (Schließring angebracht) und klicken Sie dann auf „Next“ (Weiter).

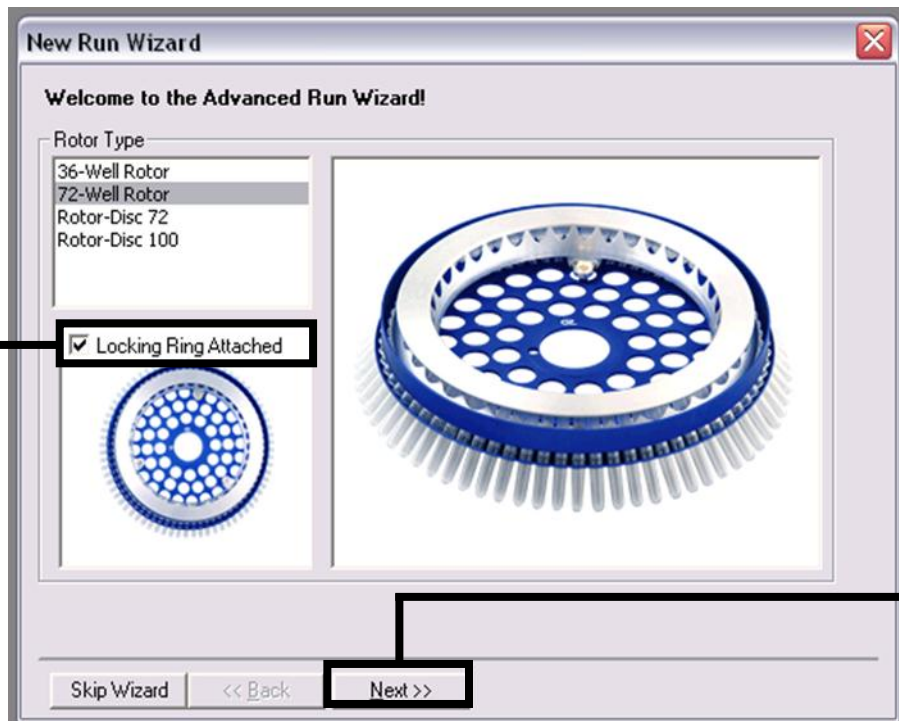


Abbildung 2. Das Dialogfeld „New Run Wizard“.

8. Wählen Sie als Volumen der Reaktion „25“ und klicken Sie auf „Next“ (Abbildung 3).

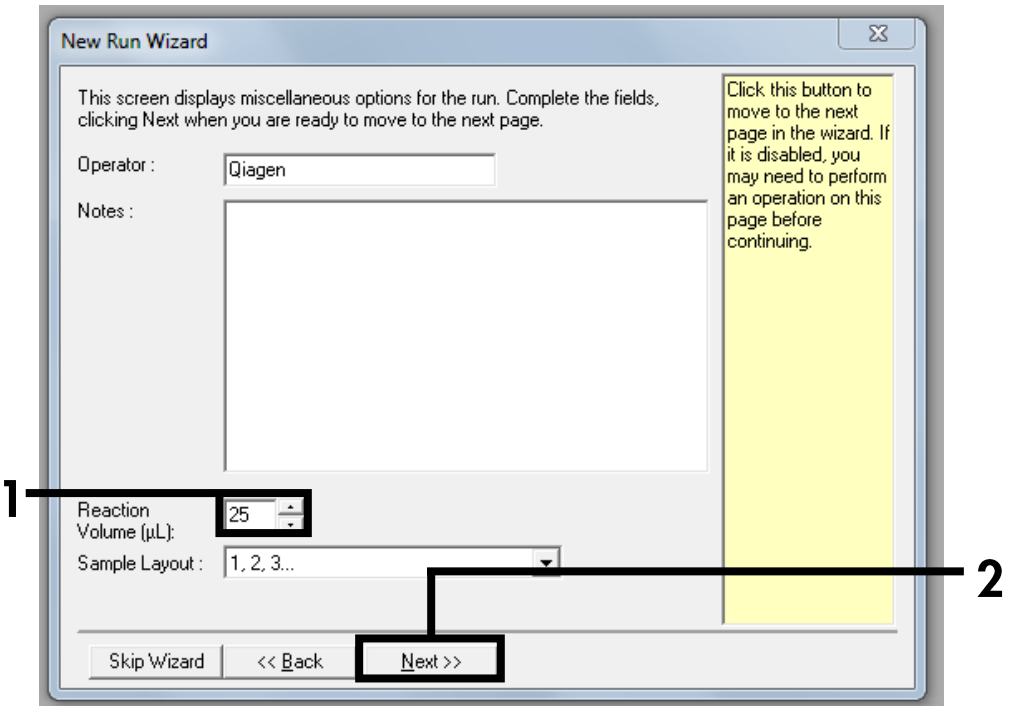


Abbildung 3. Einstellen allgemeiner Parameter.

9. Klicken Sie im nächsten „New Run Wizard“-Dialogfeld (**Abbildung 4**) auf die Schaltfläche „Create New“ (Neuerstellung) und programmieren Sie 2 zusätzliche Kanäle wie in **Abbildung 5** bis **Abbildung 7** gezeigt.

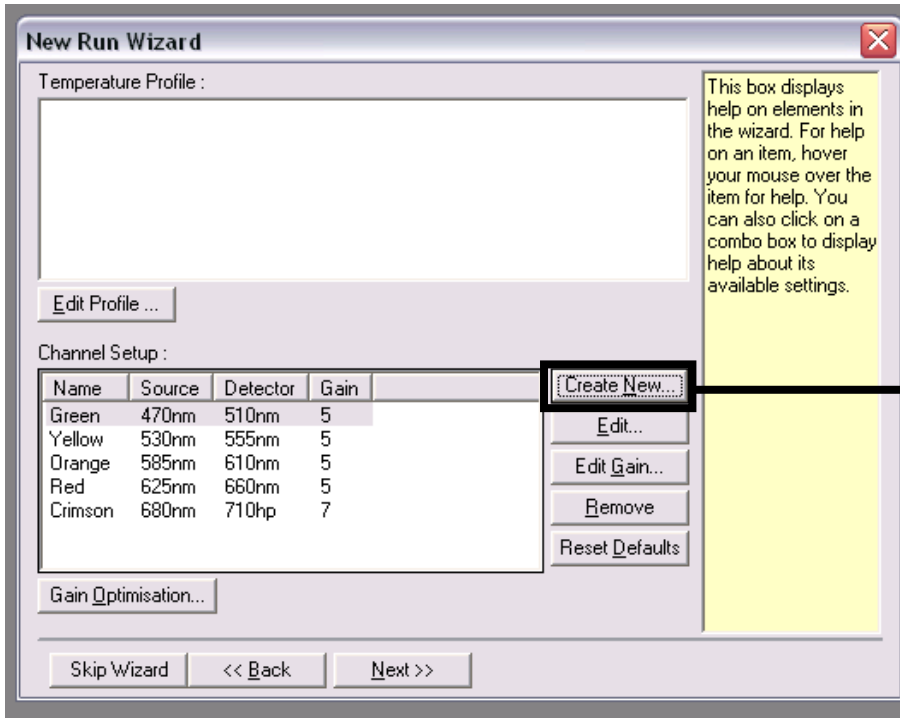


Abbildung 4. Erstellen neuer Kanäle.

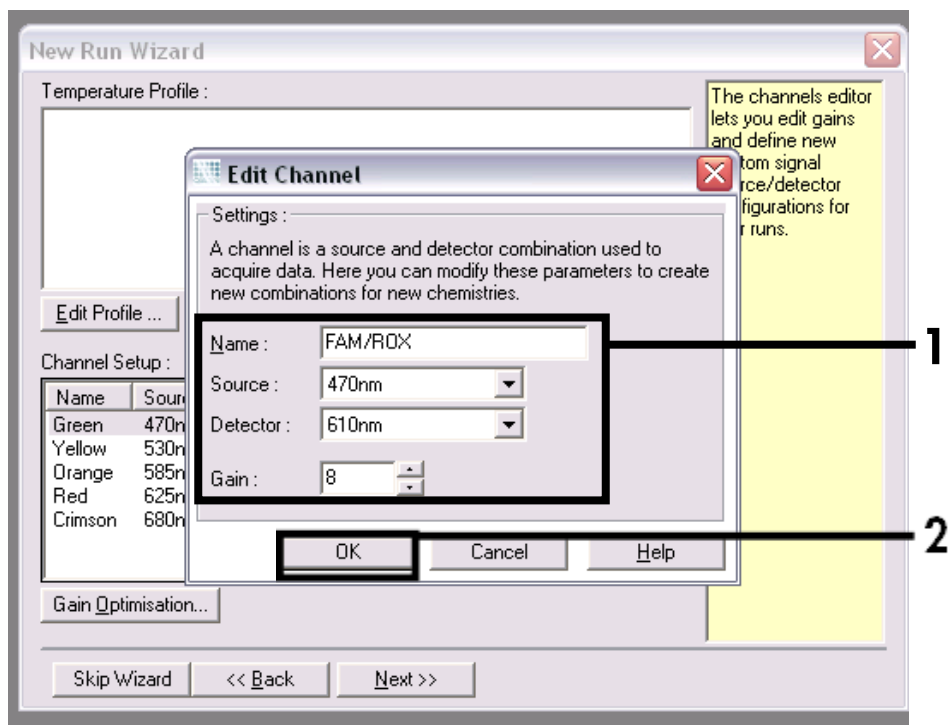


Abbildung 5. Erstellen des neuen Kanals „FAM/ROX“.

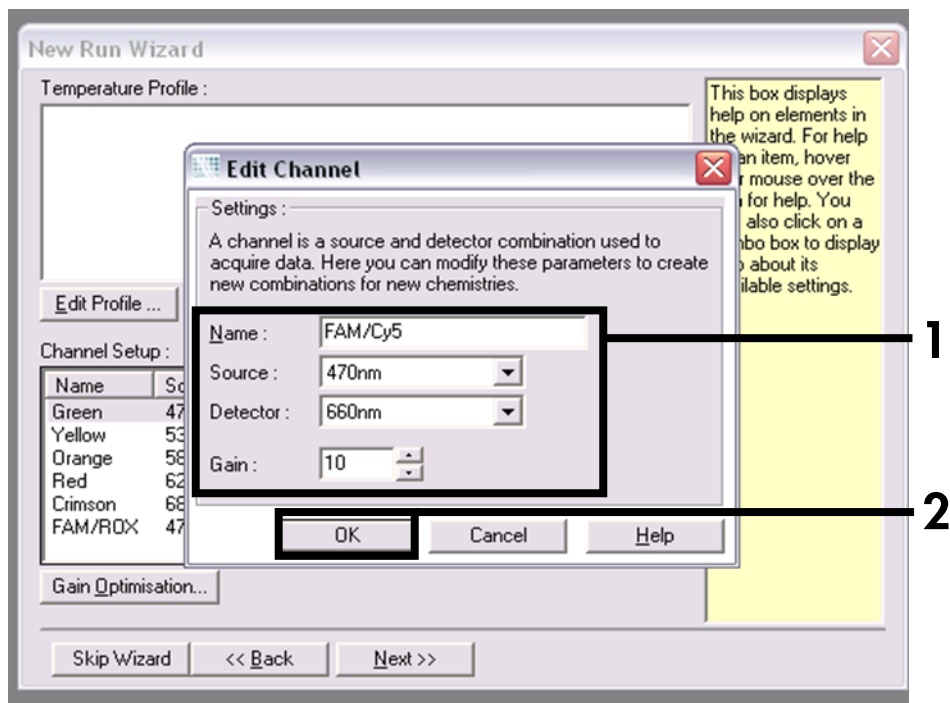


Abbildung 6. Erstellen des neuen Kanals „FAM/Cy5“.

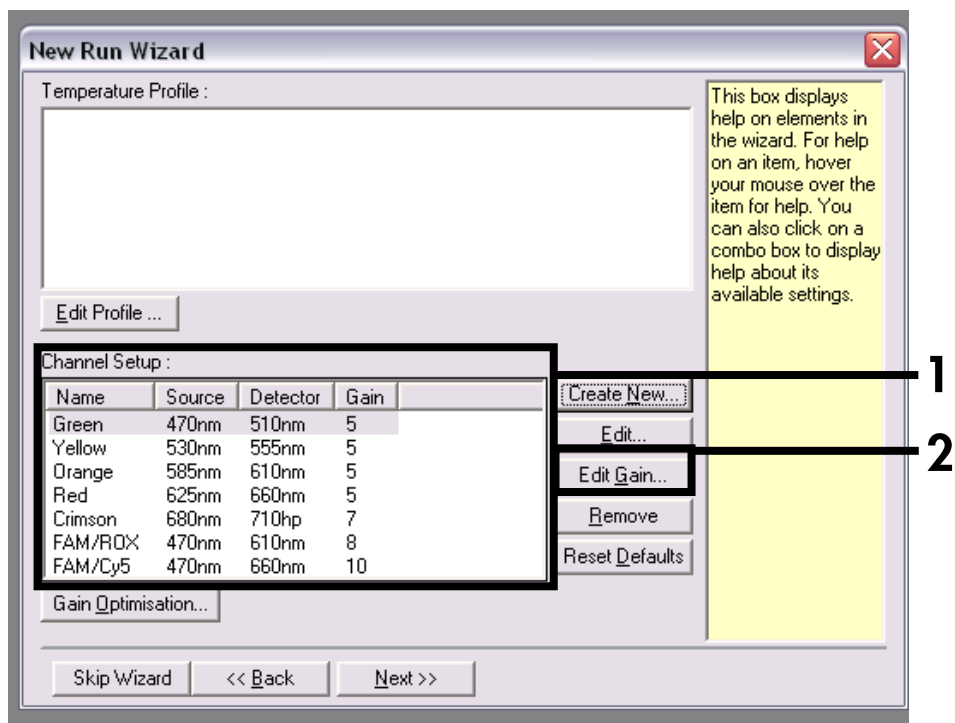


Abbildung 7. Neue Kanäle hinzugefügt.

10. Bearbeiten Sie die Verstärkungswerte („Gain“) der einzelnen Kanäle wie in **Abbildung 8** gezeigt. Die einzustellenden Verstärkungswerte der einzelnen Kanäle sind in **Abbildung 9** gezeigt.

Die Verstärkungswerte für den Rotor-Gene Q wurden so ausgewählt, dass eine Sättigung der Detektionskanäle vermieden wird. Falls dennoch die Sättigung eines oder mehrerer Detektionskanäle beobachtet wird, ist der Verstärkungswert des betreffenden Kanals anzupassen und eine neue Schmelzkurvenanalyse durchzuführen.

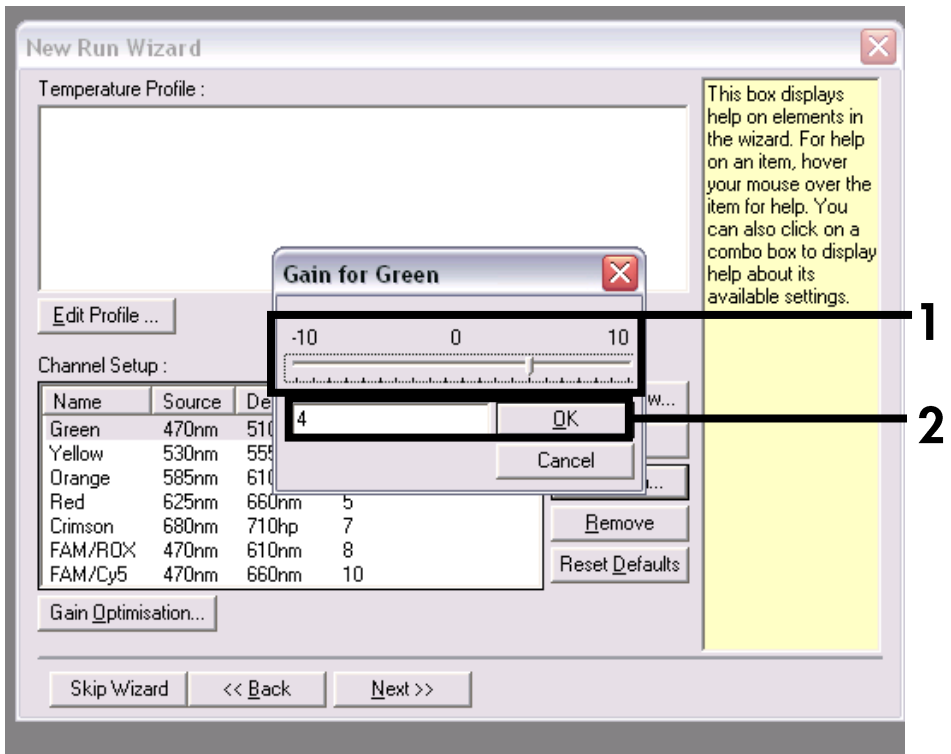


Abbildung 8. Einstellen der Verstärkungswerte. In der Abbildung ist beispielhaft die Einstellung der Verstärkung des Kanals Cycling Green auf 4 gezeigt.

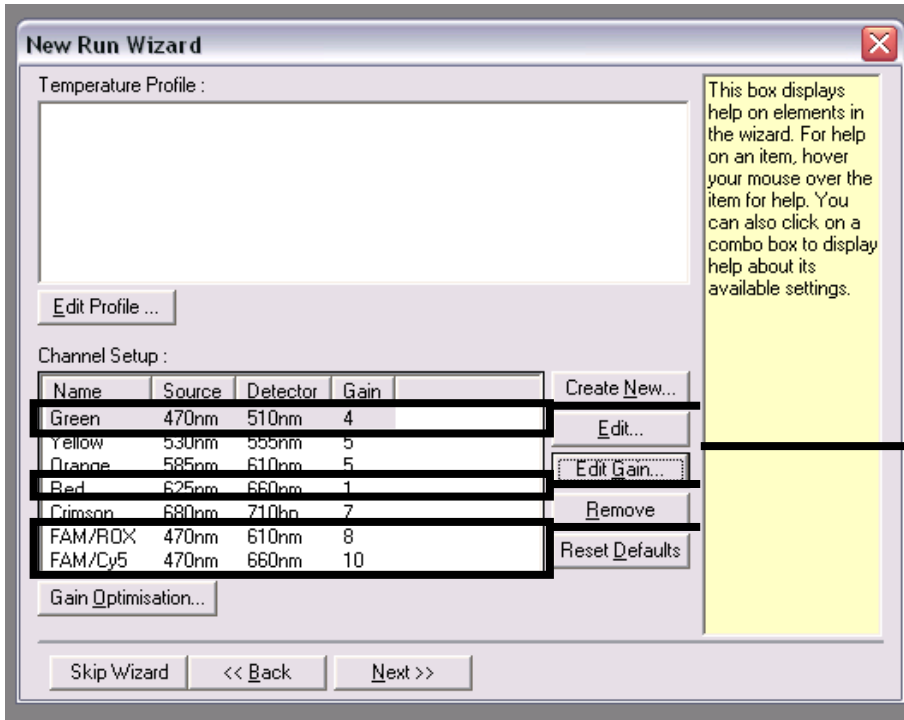


Abbildung 9. Einstellende Verstärkungswerte für alle Kanäle. Die folgenden Kanäle werden benötigt: Grün, Verstärkung 4; Rot, Verstärkung 1; FAM/ROX, Verstärkung 8; FAM/Cy5, Verstärkung 10.

11. Klicken Sie im nächsten „New Run Wizard“-Dialogfeld (**Abbildung 10**) auf die Schaltfläche „Edit Profile“ (Profil bearbeiten) und programmieren Sie das Temperaturprofil wie in **Abbildung 11** bis **Abbildung 16** gezeigt.

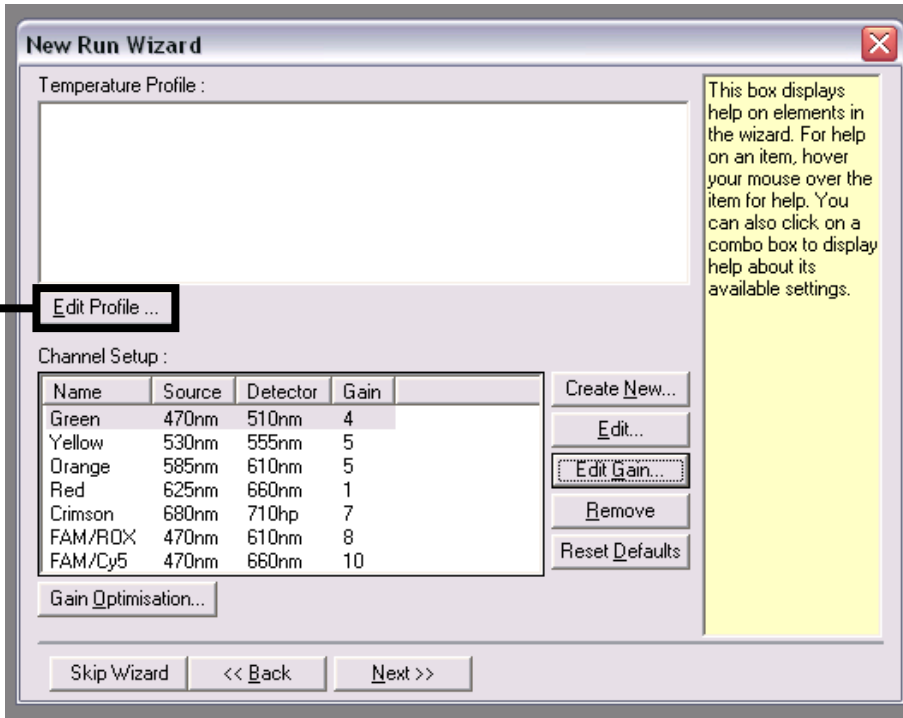


Abbildung 10. Bearbeiten des Profils.

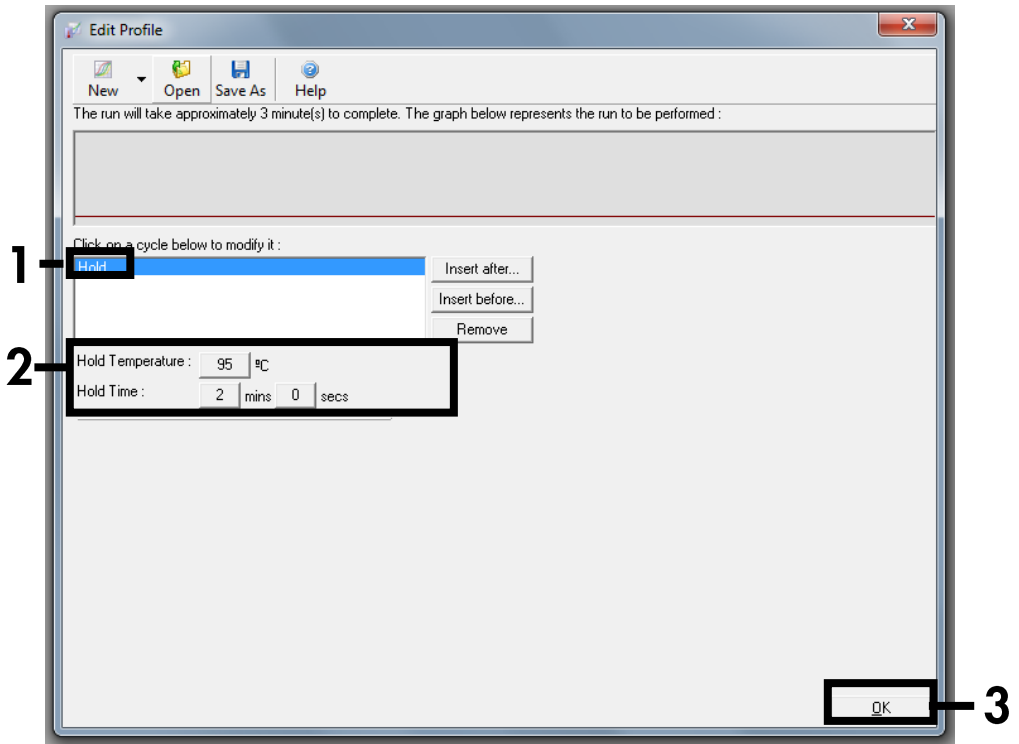


Abbildung 11. Anfänglicher Denaturierungsschritt.

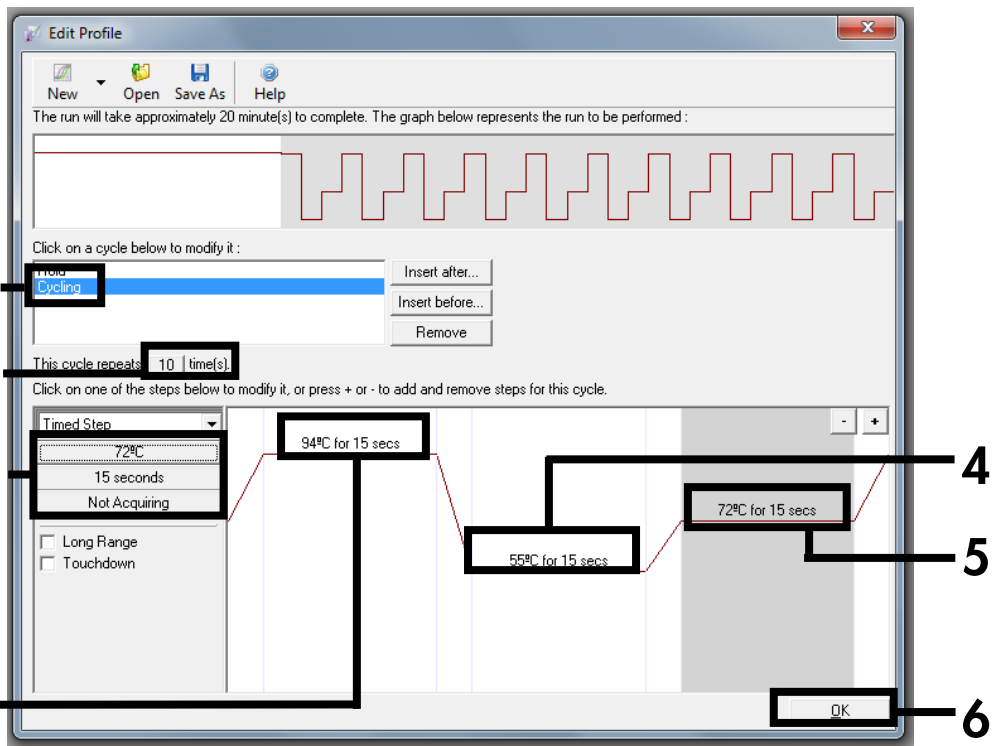


Abbildung 12. PCR 1.

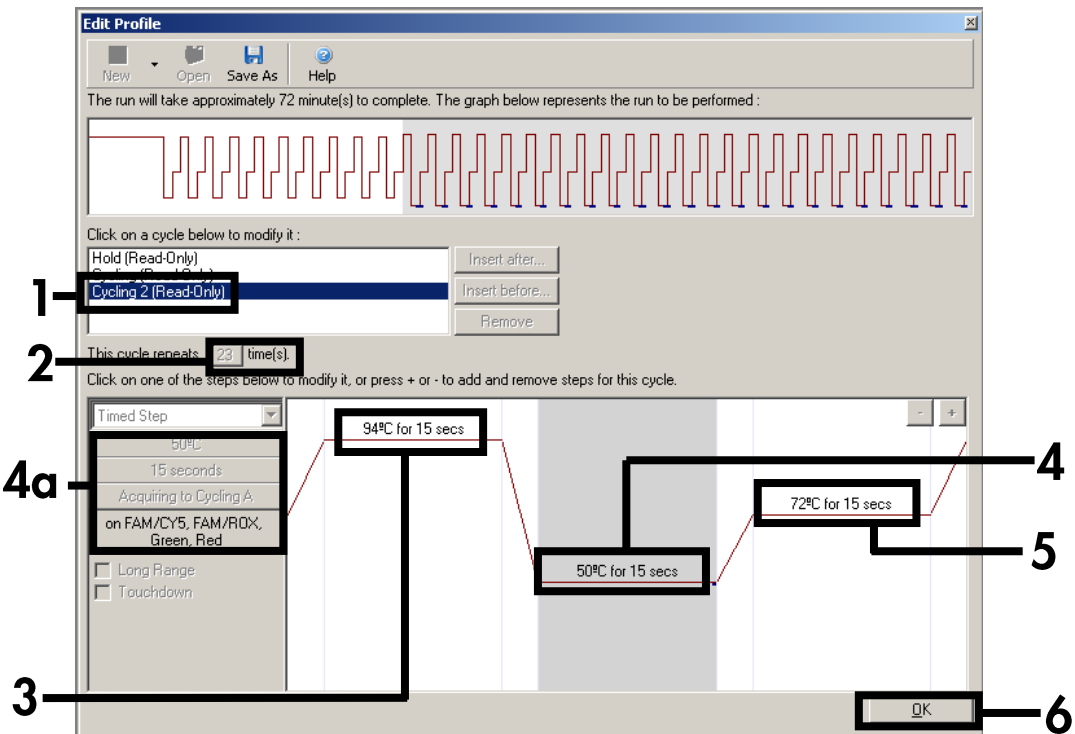


Abbildung 13. PCR 2 einschließlich Signalerfassung bei 50 °C. Die für die Datenerfassung benötigten Kanäle sind in Abbildung 14 gezeigt.

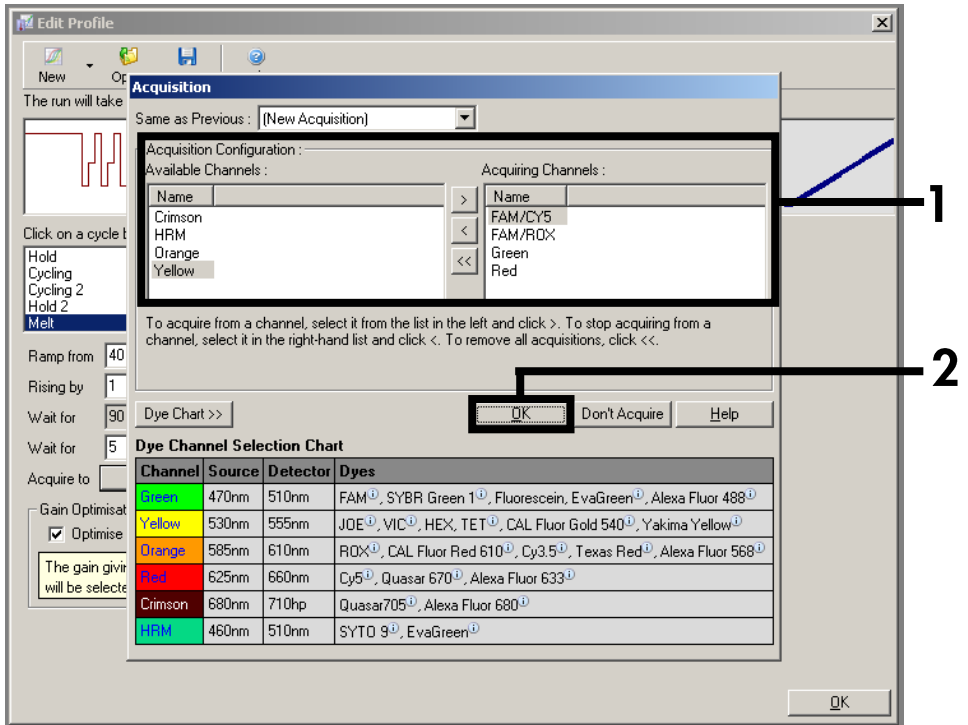


Abbildung 14. Auswahl aller für die Datenerfassung benötigten Kanäle.

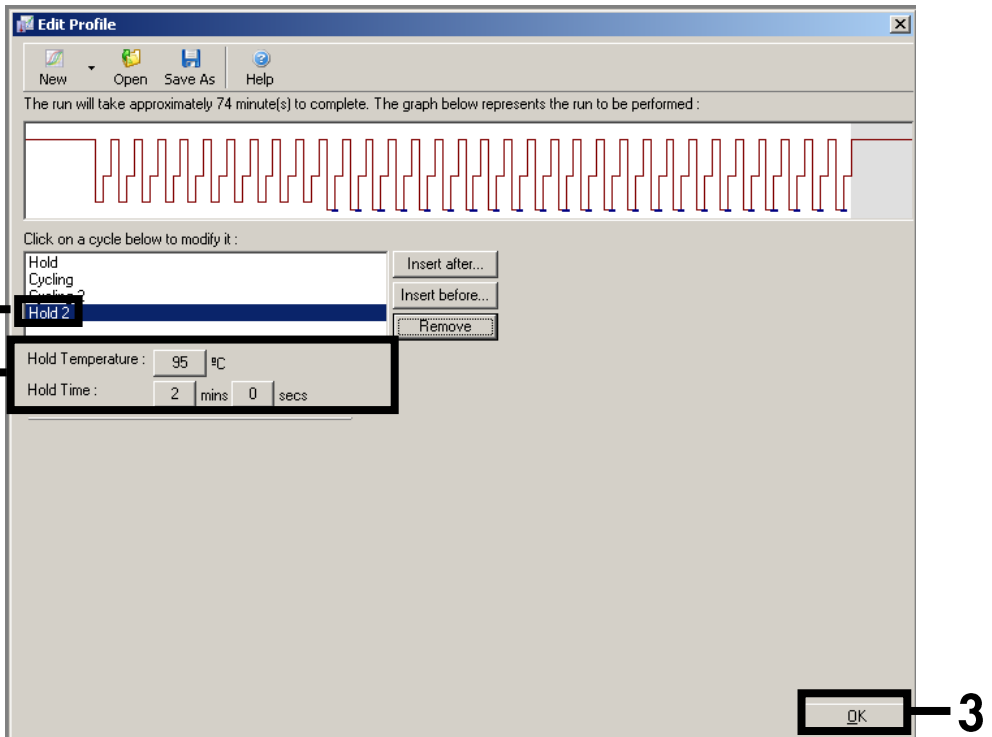


Abbildung 15. Denaturierung der PCR-Produkte.

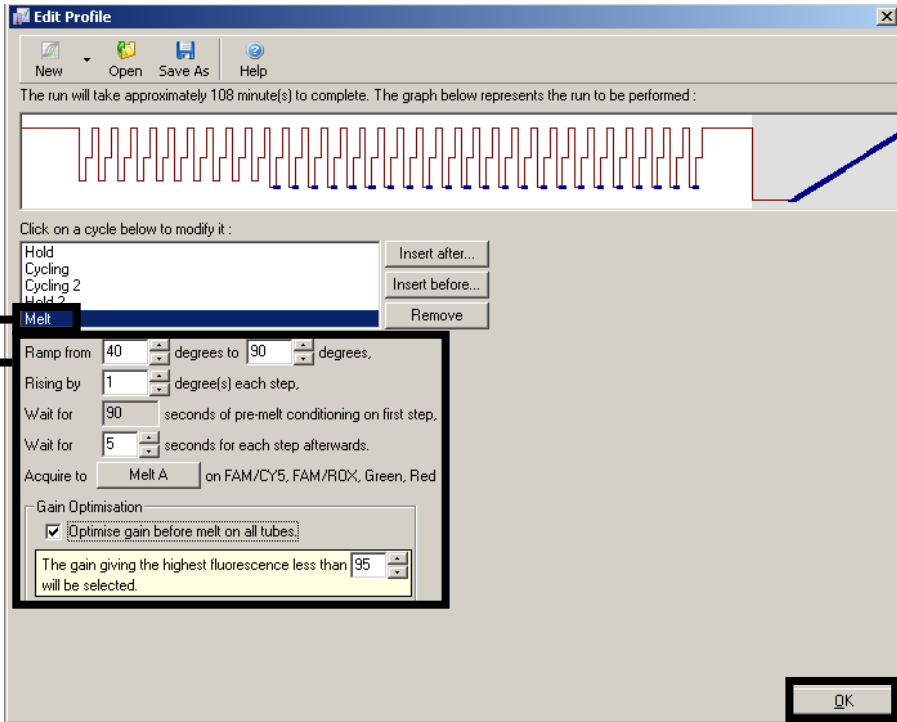


Abbildung 16. Schmelzprogramm.

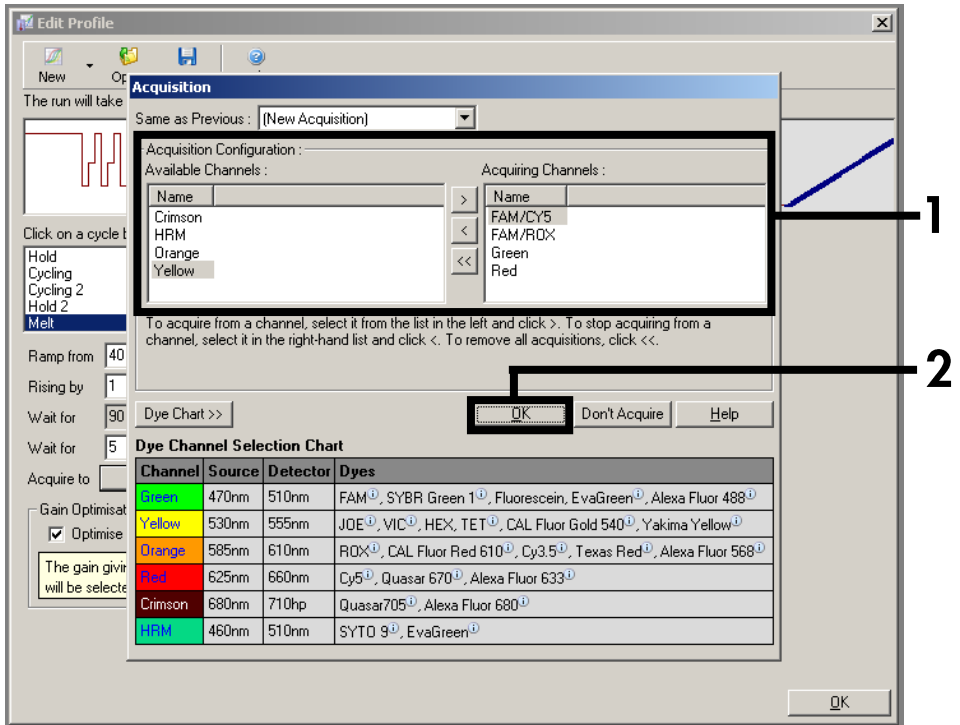


Abbildung 17. Datenerfassung während des Schmelzprogramms.

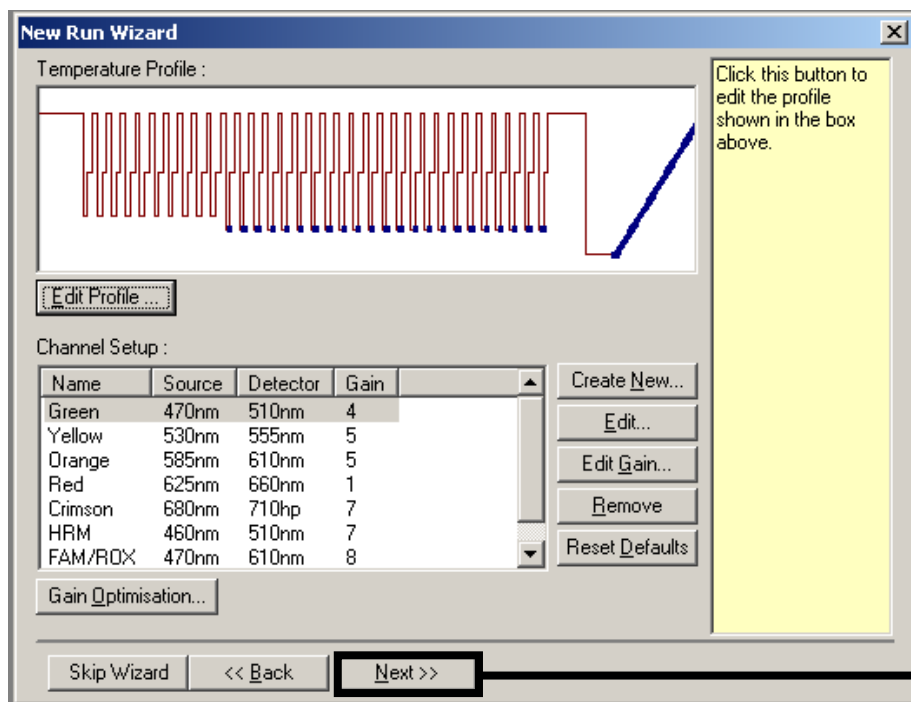


Abbildung 18. Zusammenfassung des Temperaturprofils.

12. Speichern Sie die Vorlage für später ab („Save Template“, **Abbildung 19**).

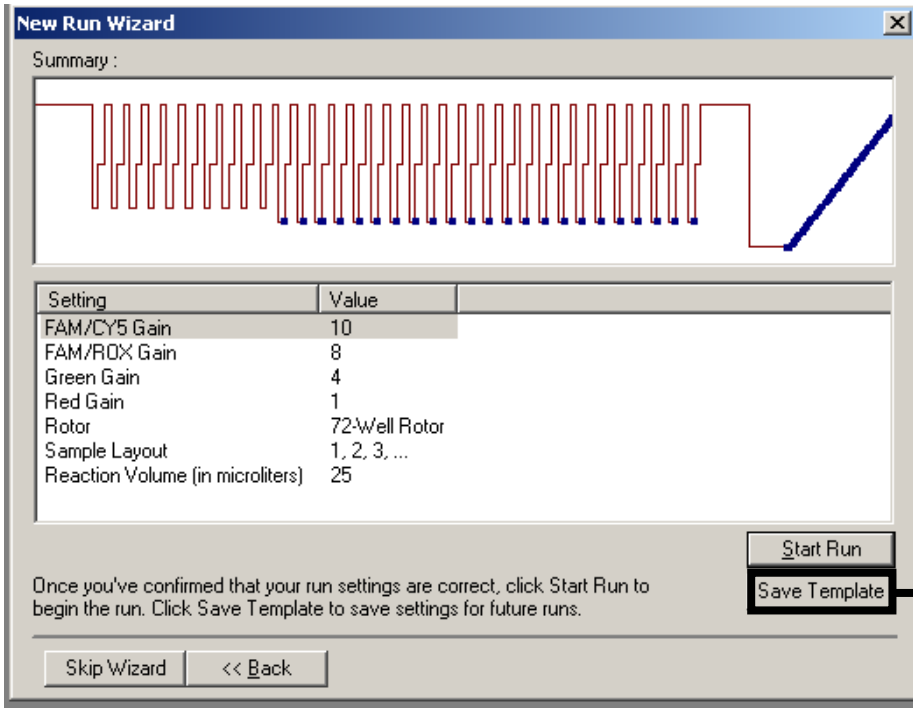


Abbildung 19. Speichern der Vorlage zum späteren Gebrauch.

13. Setzen Sie das Schritt-2-Gemisch 1 gemäß Tabelle 11 und das Schritt-2-Gemisch 2 gemäß Tabelle 12 an und mischen Sie die Ansätze vorsichtig, aber gründlich.

Falls die Schritt-2-Gemische bereits in Schritt 1 angesetzt wurden, warten Sie, bis das Präamplifikationsprogramm beendet ist, und fahren Sie dann mit Schritt 14 fort.

Tabelle 11. Ansetzen des Schritt-2-Gemisches 1

Anzahl Proben (Farbe des Röhrchendeckels)	1	12
RespiFastPuffer 1 (rot)	19 µl	228 µl
RespiFastEnzym (orange)	1 µl	12 µl
Gesamtvolumen des Schritt-2-Gemisches 1	20 µl	240 µl

Tabelle 12. Ansetzen des Schritt-2-Gemisches 2

Anzahl Proben (Farbe des Röhrchendeckels)	1	12
RespiFastPuffer 2 (blau)	19 µl	228 µl
RespiFastEnzym (orange)	1 µl	12 µl
Gesamtvolumen des Schritt-2-Gemisches 2	20 µl	240 µl

14. Pipettieren Sie für jede Probe 20 µl Schritt-2-Gemisch 1 in ein Röhrchen eines PCR-Streifens für den Rotor-Gene und 20 µl Schritt-2-Gemisch 2 in ein weiteres Röhrchen eines PCR-Streifens für den Rotor-Gene.

15. Nehmen Sie nach Beendigung des Präamplifikationsprogramms (Schritt 5) die PCR-Röhrchen aus dem Thermocycler und zentrifugieren Sie sie kurz an. Pipettieren Sie von jeder Präamplifikationsreaktion je 5 µl in die zwei vorbereiteten Röhrchen des PCR-Streifens mit Schritt-2-Gemisch 1 bzw. Schritt-2-Gemisch 2 (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13. Ansetzen der Schritt-2-Reaktionen

Anzahl Proben	1	12
Schritt-2-Gemisch 1	20 µl	je 20 µl
Präamplifikationsreaktion	5 µl	je 5 µl
Gesamtvolumen	25 µl	je 25 µl
Schritt-2-Gemisch 2	20 µl	je 20 µl
Präamplifikationsreaktion	5 µl	je 5 µl
Gesamtvolumen	25 µl	je 25 µl

16. Schließen Sie die PCR-Streifen mit den passenden Deckeln und setzen Sie sie in den Rotor des Rotor-Gene Q.

17. Setzen Sie den Rotor in den Rotor-Gene Q ein. Setzen Sie unbedingt den Schließring (*locking ring*, Zubehör des Rotor-Gene Q) auf den Rotor, um ein unbeabsichtigtes Öffnen der Reaktionsgefäße während des Laufs zu verhindern.

18. Starten Sie den Lauf (**Abbildung 20**) mit der gespeicherten Vorlage (Schritt 12).

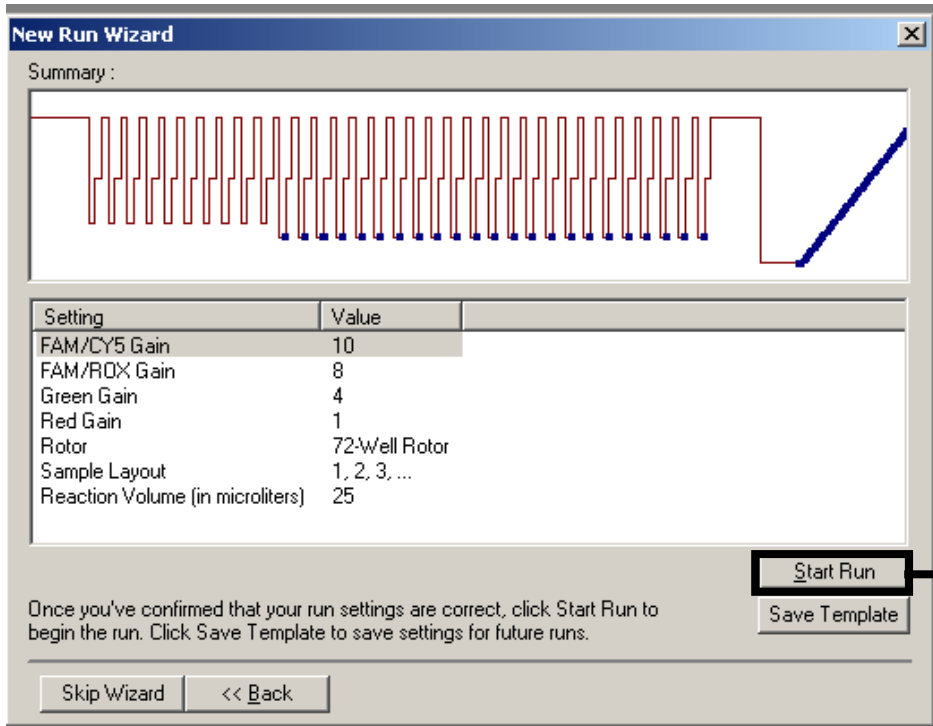


Abbildung 20. Starten des Laufs.

Interpretation der Ergebnisse

Normalisierung

Auf den Geräten der Reihe Rotor-Gene Q müssen die Rohdaten des Kanals FAM/Cy5 zunächst normalisiert werden, um die Überlappung der verschiedenen Kanäle auszugleichen.

Öffnen Sie zur Normalisierung des Cy5-Signals den Rohdatenkanal „Melt A.FAM/Cy5“ (Schmelzkurve A.FAM/Cy5, Filtereinstellung 470–660 nm). Klicken Sie auf die Schaltfläche „Option“ und wählen Sie die Option „Normalise to Melt A.FAM/ROX“ (Normalisieren auf Schmelzkurve A.FAM/ROX) aus. Die neu erstellte Rohdatendatei **Melt A.FAM/Cy5/Melt A.FAM/ROX** muss noch zusätzlich auf den roten Kanal normalisiert werden (Filtereinstellung 625/660 nm). Dies wird erreicht durch Öffnen der neuen Rohdatendatei **Melt A.FAM/Cy5/Melt A.FAM/ROX**, Klicken auf die Schaltfläche „Option“ und Auswählen der Option „Normalise to Melt A.Red“ (Normalisieren auf Schmelzkurve A.Red). Mit dieser Normalisierung wird die temperaturabhängige Fluoreszenz von Cy5 korrigiert, so dass symmetrischere Schmelzpeaks entstehen.

Analyse

Öffnen Sie zur Analyse der Rohdatendatei das Fenster „Analysis“ (Analyse) und wählen Sie auf dem Reiter „Melt“ (Schmelzkurven) die jeweilige normalisierte Rohdatendatei für FAM/Cy5 aus. Die Signale der Kanäle Grün (IC, Filtereinstellung 470–510 nm) und FAM/ROX (Filtereinstellung 470–610 nm) müssen nicht normalisiert werden; die entsprechenden Rohdatendateien der Kanäle FAM/ROX und Grün werden ebenfalls ausgewählt. Die jeweiligen Schmelztemperaturen der SMART-Sonden sind in Tabelle 14, Seite 47, aufgeführt.

Schwellenwert

Bei Verwendung der in Tabelle 10 (Seite 23) und **Abbildung 16** (Seite 38) aufgeführten Verstärkungswerte der Software des Rotor-Gene Q im Schmelzprogramm der Schritt-2-Reaktion des RespiFast RG Panels sollten die folgenden Schwellenwerte für die Schmelzkurven zur Analyse der Probenergebnisse festgelegt werden.

- FAM/ROX-Kanal: Schwellenwert = 1
- FAM/Cy5-Kanal (normalisiert): Schwellenwert = 0
- Grüner Kanal (IC): Kehren Sie das Vorzeichen von dF/dT um und wählen Sie alle Proben aus, die in den Kanälen FAM/ROX und FAM/Cy5 mit beiden Gemischen keinen positiven Schmelzpeak zeigten. Setzen Sie den Schwellenwert manuell auf den höchsten Fluoreszenzwert, der zwischen 40 und 45 °C mit diesen negativen Proben erhalten wurde. Proben, die bei beiden Gemischen Schmelzpeaks im T_m -Akzeptanzbereich der internen Kontrolle und der Amplifikationskontrollen zeigten, können jetzt als echt-negative Proben angesehen werden (siehe Beispiel in **Abbildung 21**). Proben, bei denen kein oder nur ein positives Ergebnis der internen Kontrolle oder kein oder nur ein positives Ergebnis der Amplifikationskontrollen detektiert wird, müssen als ungültig angesehen werden. Ungültige Proben müssen erneut getestet werden.

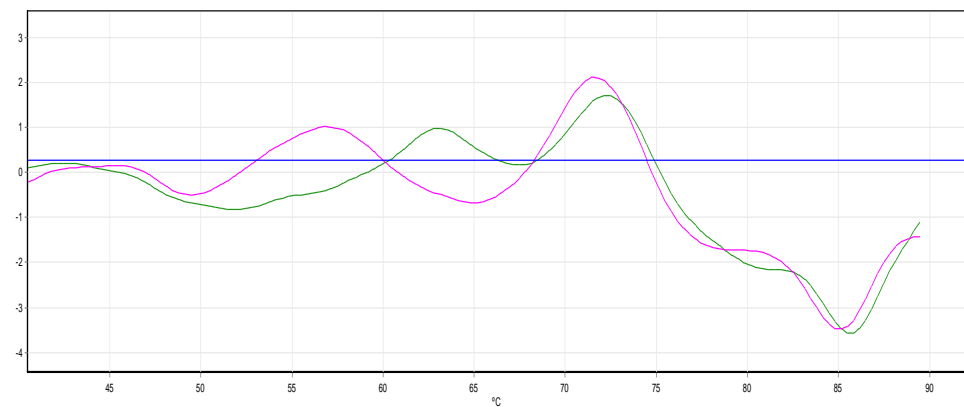


Abbildung 21. Beispiel einer im grünen Kanal detektierten negativen Probe: Gemisch-1-Reaktion in Grün, Gemisch-2-Reaktion in Pink. Schwellenwert ist eingestellt auf den höchsten Fluoreszenzwert zwischen 40 und 45 °C.

Tabelle 14. Zielanalyte und zugehörige T_m -Werte der SMART-Sonden

Markierung	SMART-Sonde	T_m (°C) Akzeptanzbereich	Abkürzung des Pathogens (Gemisch 1)	Abkürzung des Pathogens (Gemisch 2)
Cy5	Cy5-Sonde 1	50,5–53,5*	L. pneu	OC43
	Cy5-Sonde 2a	55-58	B. pert	–
	Cy5-Sonde 2b	52,5-55,	–	HKU1/NL63
	Cy5-Sonde 3	60,5–63,5	Rhino/Entero	
		58,5–61,5		229E
	Cy5-Sonde 4	66,5–69,5	C. pneu	–
	Cy5-Sonde 5	70,5–73,5	M. pneu	–
Cy5-Sonde 6	76–79	–	H1N1	
ROX	ROX-Sonde 1	53,5–56,5	RSVA	PIV1
	ROX-Sonde 2	58-61	Adeno	PIV2
	ROX-Sonde 3	62,5–65,5	hMPV	PIV3
	ROX-Sonde 4	66,5–69,5	RSVB	PIV4
	ROX-Sonde 5	72,5–75,5	InfA	Boca
	ROX-Sonde 6	76,5–79,5	InfB	–
BHQ1	BHQ1-Sonde 1	70,5–73,5	IC	IC
	BHQ1-Sonde AC1	61-64	AC1	–
	BHQ1-Sonde AC	55,5–58,5	–	AC2

* Bei der Cy5-Sonde 1 erscheint manchmal ein Doppelpeak. Der T_m -Wert des zweiten Peaks ist der korrekte.

Einen Überblick über die Schmelzkurveergebnisse finden Sie in Tabelle 15.

Tabelle 15. Schmelzkurveergebnisse des RespiFast RG Panels

Probenreaktion RespiFast								Ergebnis der Probe
Gemisch 1				Gemisch 2				
FAM				FAM				
ROX	Cy5	IC	AC1	ROX	Cy5	IC	AC2	
+	-	+/-	+/-	-	-	+/-	+	Positiv für ROX-1-Analyt*
-	+	+/-	+/-	-	-	+/-	+	Positiv für Cy5-1-Analyt*
-	-	+/-	+	+	-	+/-	+/-	Positiv für ROX-2-Analyt*
-	-	+/-	+	-	+	+/-	+/-	Positiv für Cy5-2-Analyt*
-	-	+	+	-	-	+	+	Negativ
+	+	+/-	+/-	-	-	+/-	+	Positiv für ROX-1- und Cy5-1-Analyt*
-	-	+/-	+	+	+	+/-	+/-	Positiv für ROX-2- und Cy5-2-Analyt*
+	-	+/-	+/-	+	-	+/-	+/-	Positiv für ROX-1- und ROX-2-Analyt*†
-	+	+/-	+/-	-	+	+/-	+/-	Positiv für Cy5-1- und Cy5-2-Analyt*†
+	-	+/-	+/-	-	+	+/-	+/-	Positiv für ROX-1- und Cy5-2-Analyt*†
-	+	+/-	+/-	+	-	+/-	+/-	Positiv für Cy5-1- und ROX-2-Analyt*†
+	-	+/-	+/-	-	-	-	-	Ungültig, da keine Reaktion in Gemisch 2
-	+	+/-	+/-	-	-	-	-	Ungültig, da keine Reaktion in Gemisch 2
-	-	-	-	+	-	+/-	+/-	Ungültig, da keine Reaktion in Gemisch 1
-	-	-	-	-	+	+/-	+/-	Ungültig, da keine Reaktion in Gemisch 1
-	-	-	-	-	-	-	-	Ungültig
-	-	-	+	-	-	-	+	Ungültig, Fehler bei Extraktion/keine Probe in 2SMART-Reaktion hinzugefügt

* Die jeweiligen Pathogene sind in Tabelle 14 zu finden.

† Jede Kombination dieser Ergebnisse ist möglich, was zu positiven Ergebnissen für mehrere Analyte, die mit Gemisch 1 oder Gemisch 2 im ROX- oder im Cy5-Detektionskanal detektiert werden, führen kann.

Hinweis: Eine Reaktion des RespiFast RG Panels wird als gültig angesehen bei Anwesenheit eines der folgenden Merkmale:

- Positiver Pathogen-Schmelzpeak
- Positiver AC-Schmelzpeak und ein positiver IC-Peak
- Positiver AC-Schmelzpeak (IC wird nicht detektiert aufgrund von Konkurrenz durch starke Infektion, die mit dem zugehörigen anderen RespiFast-Schritt-2-Gemisch detektiert wurde).

Ungültige Reaktionen müssen erneut getestet werden. Wenn nur eine der zwei RespiFast-Schritt-2-Reaktionen einer Probe ein ungültiges Ergebnis zeigt, muss die ungültige RespiFast-RG-Panel-Reaktion wiederholt werden, beginnend mit der Präamplifikationsreaktion (mit zur Verfügung stehendem Nukleinsäureextrakt).

Wenn eine Probe ein ungültiges Ergebnis aufgrund der Abwesenheit von Pathogen, IC und AC oder aufgrund der Abwesenheit von Pathogen und IC zeigt, muss die RespiFast-RG-Panel-Reaktion wiederholt werden, beginnend bei der Nukleinsäureextraktion aus der ursprünglichen Probe.

Hilfe zur Fehlerbehebung

In diesem Abschnitt finden Sie nützliche Hinweise, die Ihnen bei der Lösung eventuell auftretender Probleme helfen können. Weitere Informationen finden Sie auch im Internet auf der „Frequently Asked Questions“-Seite unseres Support-Centers unter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Die Wissenschaftler des Technischen Service bei QIAGEN beantworten gerne Ihre Fragen zu den Angaben und Protokollen in diesem Handbuch sowie zu Probenvorbereitungs- und Testtechnologien allgemein (Möglichkeiten der Kontaktaufnahme finden Sie auf der hinteren Umschlagseite und im Internet unter www.qiagen.com).

Kommentare und Vorschläge

Keine spezifischen Schmelzpeaks erkennbar und IC-Schmelzpeak nicht erkennbar

- | | |
|--|--|
| a) Thermocycler falsch programmiert | Programmieren Sie den Thermocycler gemäß „Protokoll: PCR-Amplifikation und Schmelzkurvenanalyse“, Seite 20, und wiederholen Sie den Test. |
| b) Pipettierfehler oder fehlendes Reagenz | Wiederholen Sie den RespiFastTest gemäß „Protokoll: PCR-Amplifikation und Schmelzkurvenanalyse“, Seite 20. |
| c) IC nicht hinzugefügt oder IC vor Zugabe des Lysepuffers zur Probe hinzugefügt | Es ist wichtig, dass die IC und die Carrier-RNA zum Lysepuffer hinzugefügt werden, vorzugsweise nachdem dieser zur Probe gegeben wurde. Dies gilt unabhängig vom verwendeten Extraktionsprotokoll (siehe „Verwenden von interner Kontrolle und Carrier-RNA“, Seite 16). Anderenfalls kann die IC durch in der Probe vorhandene Nukleasen abgebaut werden. Wiederholen Sie die Nukleinsäureextraktion und den RespiFast-Test. |
| d) PCR-Inhibitoren in der Probe | Wiederholen Sie den Test mit einer fünffach verdünnten Lösung der isolierten RNA/DNA. |

Kein IC-Schmelzpeak erkennbar bei erkennbaren pathogenspezifischen Schmelzpeaks

- | | |
|---|--|
| Starke Infektion und/oder mehrere Infektionen | Die IC wurde im Test durch Konkurrenz verdrängt. Das Ergebnis ist trotzdem gültig. |
|---|--|

Kommentare und Vorschläge

Falsche Schmelzpeaks erkennbar

Kreuzkontamination

Achten Sie darauf, dass die Reaktionsschritte in separaten Räumen durchgeführt werden, um Kreuzkontaminationen zu verhindern.

Wiederholen Sie den RespiFast-Test.

Überprüfen Sie das Thermocyclerprogramm und stellen Sie sicher, dass alle Handhabungsschritte wie in „Protokoll: PCR-Amplifikation und Schmelzkurvenanalyse“, Seite 20, beschrieben durchgeführt werden. Achten Sie darauf, dass auf Eis gearbeitet wird, wo dies im Protokoll vorgeschrieben ist.

Wiederholen Sie den RespiFast-Test.

Qualitätskontrolle

Das RespiFast RG Panel wird von PathoFinder BV in Maastricht, Niederlande, hergestellt, innerhalb von gemäß EN ISO 13485:2012 akkreditierten Qualitätssystemen.

Grenzen des Verfahrens

In Verbindung mit anderen klinischen Befunden und Laborergebnissen unterstützt das RespiFast RG Panel die Diagnose von Atemwegsinfektionen. Ein negatives Ergebnis bedeutet nicht unbedingt die Abwesenheit einer viralen oder bakteriellen Atemwegsinfektion. Ein negatives Ergebnis sollte nicht als alleinige Grundlage für eine Diagnose, Behandlung oder andere Therapieentscheidungen verwendet werden. Ein positives Ergebnis schließt eine Koinfektion mit weiteren Pathogenen nicht aus. Das/die nachgewiesene/n Pathogen/e ist/sind unter Umständen nicht der eigentliche Krankheitsauslöser.

In die endgültige Diagnose müssen andere Labortests und die Beurteilung des klinischen Bildes einfließen.













Das Produkt ist nur zur Verwendung durch entsprechend ausgebildetes Laborpersonal bestimmt.

Leistungsmerkmale

Angaben zu den Leistungsmerkmalen des RespiFast RG Panels finden Sie unter www.qiagen.com/p/RespiFast-RG-Panel-CE.

Symbole

Die folgenden Symbole können auf der Verpackung und Kennzeichnung erscheinen:

Symbol	Definition des Symbols
	Inhalt ausreichend für <N> Reaktionen
	Zur Verwendung bis
	In-Vitro-Diagnostikum
	Katalognummer
	Chargennummer
	Materialnummer
	Global Trade Item Number (internationale Artikelnummer)
	Zulässiger Temperaturbereich
	Hersteller
	Die Gebrauchsanweisung beachten
	Achtung
	Von direkter Sonneneinstrahlung fernhalten

Kontaktinformationen

Technische Hinweise und zusätzliche nützliche Informationen finden Sie in unserem Technischen Support-Center unter www.qiagen.com/Support oder telefonisch unter 00800-22-44-6000. Darüber hinaus ist Ihnen das Team vom Technischen Service gerne behilflich, falls Sie Rat oder weitere Informationen zu QIAGEN Produkten benötigen (Kontaktinformationen siehe hintere Umschlagseite oder unter www.qiagen.com).

Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
RespiFast RG Panel	CE IVD, Für 25 Reaktionen: Präamplifikations-Master-Mix, interne Kontrolle, Präamplifikations-Primer-Mix, RespiFast-Puffer, RespiFast-Enzym, Positivkontrolle	4693163
QIAamp MinElute Virus Spin Kit – zur gleichzeitigen Aufreinigung von viraler DNA und RNA aus Nasopharyngealabstrichen		
QIAamp MinElute Virus Spin Kit (50)	Für 50 Mini-Präparationen: 50 QIAamp MinElute Säulen, QIAGEN Protease, Carrier-RNA, Puffer, Collection Tubes (2 ml)	57704
QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit – zur gleichzeitigen automatisierten Aufreinigung von viraler DNA und RNA aus Nasopharyngealabstrichen für den Gebrauch in Kombination mit dem Gerät QIAasymphony SP		
QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit	Für 192 Präparationen (je 200 µl): 2 Reagenzienkartuschen und Enzym-Racks sowie Zubehör	937036
QIAasymphony SP		
QIAasymphony Probenvorbereitungsmodul; 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit		9001297

Rotor-Gene Q MDx – für IVD-validierte Real-Time-PCR-Analysen in klinischen Anwendungen

Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Plattform	Real-Time-PCR-Cycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör, inklusive 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit; ohne Installation und Schulung	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-Time-PCR-Cycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit; inklusive Installation und Schulung	9002033
Rotor-Gene Q – für herausragende Leistung in der Real-Time-PCR		
Rotor-Gene Q 5plex HRM Plattform	Real-Time-PCR-Cycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör, inklusive 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit; ohne Installation und Schulung	9001580

Rotor-Gene Q 5plex HRM System	Real-Time-PCR-Cycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit; inklusive Installation und Schulung	9001650
Zubehör zum Rotor-Gene Q		
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 Streifen mit je 4 Röhrchen und Deckeln, für 1000 Reaktionen mit 10-50 µl	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 Streifen mit je 4 Röhrchen und Deckeln, für 10 000 Reaktionen mit 10-50 µl	981106

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische rechtliche Hinweise finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit- oder Geräte-Handbuch. QIAGEN Kit- und Geräte-Handbücher stehen im Internet unter www.qiagen.com zur Verfügung oder können vom Technischen Service von QIAGEN oder Ihrem Händler vor Ort angefordert werden.

Warenzeichen/Markennamen: QIAGEN®, QIAamp®, MinElute®, QIASymphony®, Rotor-Gene® (QIAGEN-Gruppe); BHQ® (Biosearch Technologies, Inc.); Cy® (GE Healthcare); FAM™, GeneAmp®, ROX™ (Life Technologies Corporation); SmartFinder (PathoFinder B.V.).

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung für das RespiFast RG Panel

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

1. Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt zur Verfügung gestellten Protokollen und dieser Gebrauchsanweisung und mit den Komponenten, die im Panel geliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen seiner Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zum Panel gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zum Panel gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der in mit dem Produkt zur Verfügung gestellten Protokollen, dieser Gebrauchsanweisung sowie in zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschriebenen Anwendungen. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von Anwendern für andere Anwender zur Verfügung gestellt. Diese Protokolle wurden von QIAGEN nicht vollständig getestet und optimiert. QIAGEN gewährt auf diese Protokolle keine Garantie und übernimmt auch keine Garantie dafür, dass sie die Rechte Dritter nicht verletzen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieses Panel und/oder die mit ihm durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieses Panel und seine Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Panels stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen könnten oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihm bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines seiner geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Panel und/oder dessen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen können im Internet unter www.qiagen.com nachgelesen werden.

Hinweis an den Käufer

Dieses Produkt wird von PathoFinder BV in Maastricht, Niederlande, hergestellt, innerhalb von gemäß EN ISO 13485:2012 akkreditierten Qualitätssystemen. Diese Produkte werden nur für die Verwendung durch den Endnutzer verkauft, sie dürfen nicht weiterverkauft, vertrieben oder umgepackt werden.

© 2015 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

Frei bleibende Seite

Frei bleibende Seite

Bestellungen www.qiagen.com/contact | Technischer Service support.qiagen.com | Website www.qiagen.com