

artus[®] WNV LC RT-PCR Kit

Handbuch



Quantitative In-vitro-Diagnostik

Zur Verwendung mit dem Gerät *LightCycler*[®]

Dezember 2014 — Version 1



4509063, 4509065



1046924DE



QIAGEN GmbH, QIAGEN Straße 1, D-40724 Hilden

R3

MAT

1046924DE



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN ist der führende Anbieter innovativer Proben- und Testtechnologien zur Isolierung und zum Nachweis von Bestandteilen aus jeder biologischen Probe. Unsere technologisch und qualitativ hochwertigen Produkte und unser exzellenter Service garantieren Erfolg von der Probenvorbereitung bis zum Ergebnis.

QIAGEN setzt Standards bei:

- Aufreinigung von DNA, RNA und Proteinen
- Testsystemen für Nukleinsäuren und Proteine
- microRNA-Forschung und RNAi
- Automatisierung von Proben- und Testtechnologien

Wir stellen Ihnen die neuesten Technologien zur Verfügung, damit Sie schnell und sicher die besten Ergebnisse erzielen können. Weitere Informationen finden Sie im Internet unter www.qiagen.com.

Inhaltsverzeichnis

1. Inhalt	5
2. Lagerung	5
3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte	6
4. Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	6
5. Informationen zu den Erregern	6
6. Prinzip der Real-Time-PCR	7
7. Produktbeschreibung	7
8. Protokoll	8
8.1 RNA-Isolierung	8
8.2 Interne Kontrolle	9
8.3 Quantifizierung	10
8.4 Vorbereitung der PCR	11
8.5 Programmieren des Geräts <i>LightCycler</i>	16
9. Auswertung	19
10. Hilfe zur Fehlersuche	22
11. Spezifikationen	25
11.1 Analytische Sensitivität	25
11.2 Spezifität	26
11.3 Präzision	28
11.4 Robustheit	30
11.5 Reproduzierbarkeit	30
11.6 Diagnostische Evaluierung	30
12. Anwendungseinschränkungen	30
13. Sicherheitsinformationen	31

14. Qualitätskontrolle.....	31
15. Literatur.....	31
16. Erklärung der Symbole.....	32

artus WNV LC RT-PCR Kit

Zur Verwendung mit dem Gerät *LightCycler*

1. Inhalt

	Etikettierung und Inhalt	Artikelnr. 4509063 24 Reaktionen
Blau	<i>WNV LC Master</i>	2 x 12 Reaktionen
Rot	<i>WNV LC/TM QS 1^a</i> <i>4 x 10⁴ Kopien/μl</i>	1 x 200 μl
Rot	<i>WNV LC/TM QS 2^a</i> <i>4 x 10³ Kopien/μl</i>	1 x 200 μl
Rot	<i>WNV LC/TM QS 3^a</i> <i>4 x 10² Kopien/μl</i>	1 x 200 μl
Rot	<i>WNV LC/TM QS 4^a</i> <i>4 x 10¹ Kopien/μl</i>	1 x 200 μl
Grün	<i>WNV LC IC^c</i>	1 x 1.000 μl
Weiß	Wasser (PCR- Qualität)	1 x 1.000 μl

- ^a QS = *Quantifizierungsstandard*
IC = *Interne Kontrolle*

2. Lagerung

Die Komponenten des *artus WNV LC RT-PCR Kits* sollten bei -15 bis -30 °C gelagert werden – unter diesen Lagerbedingungen sind sie bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren (mehr als 2 mal) sollte vermieden werden, da dadurch die Sensitivität verringert wird. Bei unregelmäßigem Gebrauch sollten deshalb die Reagenzien aliquotiert werden. 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 Einmal-Laborhandschuhe
- RNA-Isolierungskit (siehe 8.1, RNA-Isolierung)
- Pipetten (verstellbar)
- Sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Vortex-Mischer
- Tischzentrifuge mit Rotor für 2-ml-Reaktionsgefäße
- *Color Compensation Set* (Farbkompensations-Set) (Katalognr. 2 158 850) für die Installation einer Datei *Crosstalk Color Compensation*
- *LightCycler* Kapillaren (20 µl)
- *LightCycler* Kühlblock
- *LightCycler* Gerät
- *LightCycler* Verschlusswerkzeug

4. Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Folgendes sollte vom Anwender immer beachtet werden:

- Sterile Pipettenspitzen mit Filter verwenden.
- Positivmaterial (Proben, Kontrollen, Amplifikate) räumlich getrennt von den übrigen Reagenzien aufreinigen, lagern und zur Reaktion zusetzen.
- Alle Komponenten vor Testbeginn vollständig bei Raumtemperatur auftauen.
- Anschließend die Komponenten gründlich durchmischen und kurz zentrifugieren.
- Zügig auf Eis oder im *LightCycler* Kühlblock arbeiten.

5. Informationen zu den Erregern

Der West-Nil-Virus (WNV) gehört zur Familie der Flaviviridae (Genus *Flavivirus*). Infizierte Stechmücken stechen und infizieren gewöhnlich Wildvögel, den Primärwirt des Virus, aber WNV kann auch Pferde und andere

Säugetiere infizieren. 80 % aller infizierten Personen zeigen keinerlei WNV-Symptome. WNV-Infektionen können in seltenen Fällen bei alten Menschen, Kindern und Patienten mit Immunsuppression zu tödlich verlaufender Enzephalitis oder Myokarditis führen.

6. Prinzip der Real-Time-PCR

Bei der Diagnostik mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden spezifische Bereiche aus dem Erregergenom amplifiziert. Bei der Real-Time-PCR wird das entstandene Amplifikat mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen detektiert. Diese sind in der Regel an Oligonukleotid-Sonden gekoppelt, die spezifisch an das PCR-Amplifikat binden. Die Beobachtung der Fluoreszenzintensitäten während des PCR-Laufs (d. h. in Echtzeit, daher „Real-Time-PCR“) ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung des sich anreichernden Produkts, ohne die Reaktionsgefäße nach dem PCR-Lauf wieder öffnen zu müssen (Mackay, 2004).

7. Produktbeschreibung

Der *artus* WNV LC RT-PCR Kit ist ein gebrauchsfertiges System für den Nachweis von WNV-RNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) im Gerät *LightCycler*. Der *WNV LC Master* enthält die Reagenzien und Enzyme für die reverse Transkription und zur spezifischen Amplifikation eines 72 bp langen Abschnitts des WNV-Genoms sowie für den direkten Nachweis dieses Amplifikats im Fluorimeterkanal F1 des Geräts *LightCycler*. Zusätzlich enthält der *artus* WNV LC RT-PCR Kit ein zweites, heterologes Amplifikationssystem zum Nachweis einer möglichen PCR-Inhibition. Dieses wird als *Interne Kontrolle (IC)* im Fluorimeterkanal F3 nachgewiesen. Dabei wird die Nachweisgrenze der analytischen WNV RT-PCR (siehe 11.1, Analytische Sensitivität) nicht beeinträchtigt. Externe Positivkontrollen (*WNV LC/TM QS 1 – 4*) werden mitgeliefert, mit denen die Erregerlast bestimmt werden kann. Dazu lesen Sie bitte den Absatz 8.3, Quantifizierung.

8. Protokoll

8.1 RNA-Isolierung

Kits zur RNA-Isolierung werden von verschiedenen Herstellern angeboten. Die Probemengen für die RNA-Isolierung hängen vom verwendeten Protokoll ab. Führen Sie die RNA-Isolierung nach den Vorschriften des Herstellers aus. Folgender Isolierungskit wird empfohlen.

Probenmaterial	Nukleinsäure-Isolierungskit	Katalognummer	Hersteller	Carrier-RNA
Serum, Plasma, Liquor	QIAamp® Viral RNA Mini Kit (50)	52904	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, wird abweichend vom Benutzerhandbuch des Aufreinigungskits das folgende Verfahren empfohlen:
 - a. Resuspendieren Sie die lyophilisierte Carrier RNA vor der ersten Verwendung des Aufreinigungskits in 310 µl Puffer AE oder Puffer AVE, der mit dem Kit geliefert wurde (Elutionspuffer, Endkonzentration 1 µg/µl, verwenden Sie nicht Lysepuffer). Aliquotieren Sie die Carrier-RNA-Lösung nach Bedarf und lagern Sie diese bei –20 °C. Vermeiden Sie wiederholtes Auftauen (mehr als 2 mal) der aliquotierten Carrier RNA.
 - b. Vor jeder Aufreinigung sollte eine Mischung aus Lysepuffer und Carrier RNA (und gegebenenfalls *Interner Kontrolle*, siehe **8.2** Interne Kontrolle) nach dem folgenden Pipettierschema frisch angesetzt werden:

Anzahl Proben	1	12
Puffer AVL	560 µl	6.720 µl
Carrier RNA (1 µg/µl)	5,6 µl	67,2 µl
Gesamtvolumen	565,6 µl	6.787,2 µl
Volumen pro Aufreinigung	560 µl	je 560 µl

- c. Bitte verwenden Sie den zur Aufreinigung frisch angesetzten Lysepuffer sofort. Eine Lagerung der Mischung ist nicht möglich.
- Die Aufreinigung enthält **Ethanol**-haltige Waschpuffer. Stellen Sie unbedingt sicher, dass vor der Elution ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt (drei Minuten, 13.000 U/min) zur Beseitigung von Ethanol-Rückständen durchgeführt wird. Dies verhindert eine mögliche PCR-Inhibition.
 - Der *artus* WNV LC RT-PCR Kit sollte nicht mit auf **Phenol** basierenden Aufreinigungsverfahren verwendet werden.

Wichtig: Die *Interne Kontrolle* des *artus* WNV LC RT-PCR Kits kann bei der Aufreinigung direkt verwendet werden (siehe **8.2** Interne Kontrolle).

8.2 Interne Kontrolle

Eine *Interne Kontrolle* (*WNV LC IC*) wird mitgeliefert. Diese ermöglicht Ihnen, **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. Beispielsweise wird die RNA bei Verwendung des QIAmp Viral RNA Mini Kits in 60 µl Puffer AVE eluiert. Folglich sollten anfänglich 6 µl der *Internen Kontrolle* zugesetzt werden. Wenn Sie z. B. in 50 µl eluieren, dann verwenden Sie das entsprechende Volumen von 5 µl. Die Menge der eingesetzten *Internen Kontrolle* ist **nur** abhängig vom Elutionsvolumen. Beachten Sie, dass die *Interne Kontrolle* zu der Mischung aus Lysepuffer und Probenmaterial hinzugefügt werden sollte. Ersatzweise kann die *Interne Kontrolle* direkt zum Lysepuffer hinzugefügt werden. Optional können Sie die Carrier RNA zusammen mit der *Internen Kontrolle* zum Lysepuffer hinzufügen (siehe **8.1** RNA-Isolierung). Beachten Sie jedoch, dass die Mischung aus *Interner Kontrolle*/Carrier RNA und Lysepuffer frisch angesetzt und sofort verwendet werden muss (Lagerung der Mischung bei Raumtemperatur oder gekühlt für nur wenige Stunden kann bereits zum Versagen der *Internen Kontrolle* und zu einer Beeinträchtigung der Aufreinigungseffizienz führen). Geben Sie die *Interne Kontrolle* **nicht** direkt zum Probenmaterial hinzu!

Optional kann die *Interne Kontrolle* **ausschließlich zur Kontrolle einer möglichen PCR-Inhibition** verwendet werden (siehe Abb. 2). Hierfür geben Sie pro Ansatz 0,5 µl der *Internen Kontrolle* direkt zu 15 µl *WNV LC Master* hinzu. Verwenden Sie für jede PCR-Reaktion 15 µl der so hergestellten Master-Mischung* und fügen Sie anschließend 5 µl der aufgereinigten Probe hinzu. Sollten Sie einen PCR-Lauf für mehrere Proben ansetzen, so erhöhen Sie die benötigten Mengen des *WNV LC Masters* 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 (5 µl). Um in einem *LightCycler* Gerät eine Standardkurve zu erstellen, sollten alle vier *Quantifizierungsstandards* verwendet werden und im *Sample Loading Screen* (Bildschirmanzeige Probe Laden) als Standards unter Angabe der Konzentrationen definiert werden (siehe *LightCycler Operator's Manual*, Version 3.5, Kapitel B, 2.4. Sample Data Entry). Die so erstellte Standardkurve kann auch für nachfolgende Läufe verwendet werden, wenn mindestens ein Standard **einer** gegebenen Konzentration beim aktuellen Lauf verwendet wird. Dazu muss die zuvor erstellte Standardkurve importiert werden (siehe *LightCycler Operator's Manual*, Version 3.5, Kapitel B, 4.2.5. Quantitation with an External Standard Curve). Dieses Quantifizierungsverfahren kann jedoch zu Ergebnisabweichungen aufgrund der Variabilität zwischen verschiedenen PCR-Läufen führen.

Beachte: Die *Quantifizierungsstandards* sind in Kopien/µl definiert. Zur Umrechnung der anhand der Standardkurve ermittelten Werte in Kopien/ml Probenmaterial muss die folgende Gleichung angewendet werden:

* 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 oben stehende Gleichung einzusetzen ist. Das ist zu berücksichtigen, wenn das Probenvolumen vor der Nukleinsäure-Aufreinigung verändert worden ist (z. B. Einengung durch Zentrifugieren oder Erhöhung durch Auffüllen auf das für die Aufreinigung geforderte Volumen).

Wichtig: Zur Vereinfachung der quantitativen Auswertung von *artus* Systemen am Gerät *LightCycler* gibt es unter www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX einen Leitfaden (**Technical Note zur Quantifizierung am Gerät *LightCycler***).

8.4 Vorbereitung der PCR

Achten Sie darauf, dass der Kühlblock sowie die Kapillaradapter (Zubehör zum Gerät *LightCycler*) auf +4 °C vorgekühlt sind. Setzen Sie die gewünschte Anzahl *LightCycler* Kapillaren in die Adapter des Kühlblocks ein. Achten Sie darauf, dass in jedem PCR-Lauf mindestens ein *Quantifizierungsstandard* und eine Negativkontrolle (*Wasser, PCR-Qualität*) mitgeführt werden. Zum Erstellen 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 (wiederholtes Auf- und Abpipettieren oder mehrfaches Umdrehen der Röhrchen) und anschließend anzentrifugiert werden.

Wenn Sie mit der *Internen Kontrolle* **sowohl die Aufreinigung der RNA als auch eine mögliche Inhibition der PCR** kontrollieren möchten, 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 Proben	1	12
1. Ansetzen der Master-Mischung	<i>WNV LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>WNV LC IC</i>	0 µl	0 µl
	Gesamtvolumen	15 µl	180 µl
2. Ansetzen der PCR-Reaktion	Master-Mischung	15 µl	je 15 µl
	Probe	5 µl	je 5 µl
	Gesamtvolumen	20 µl	je 20 µl

Wenn Sie die *Interne Kontrolle* **ausschließlich zum Kontrollieren einer Inhibition der PCR** verwenden möchten, so muss die Interne Kontrolle direkt zum *WNV LC Master* zugegeben werden. Verwenden Sie in diesem Fall folgendes Pipettierschema (siehe auch schematische Übersicht in Abb. 2):

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

Pipettieren Sie jeweils 15 µl Master-Mischung in das Kunststoff-Reservoir der Kapillare. Geben Sie dann 5 µl eluierte Proben-RNA hinzu. Dementsprechend müssen 5 µl mindestens eines der *Quantifizierungsstandards* (*WNV LC/TM QS 1 – 4*) als eine Positivkontrolle und 5 µl Wasser (*Wasser, PCR-Qualität*) als eine Negativkontrolle verwendet werden. Schließen Sie die Kapillaren. Um die Mischung aus dem Kunststoff-Reservoir in die Kapillare zu überführen, zentrifugieren Sie die Adapter mit den Kapillaren in einer Tischzentrifuge für zehn Sekunden bei maximal 400 x g (2.000 U/min).

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

Zugabe der *Internen Kontrolle* zur Aufreinigung

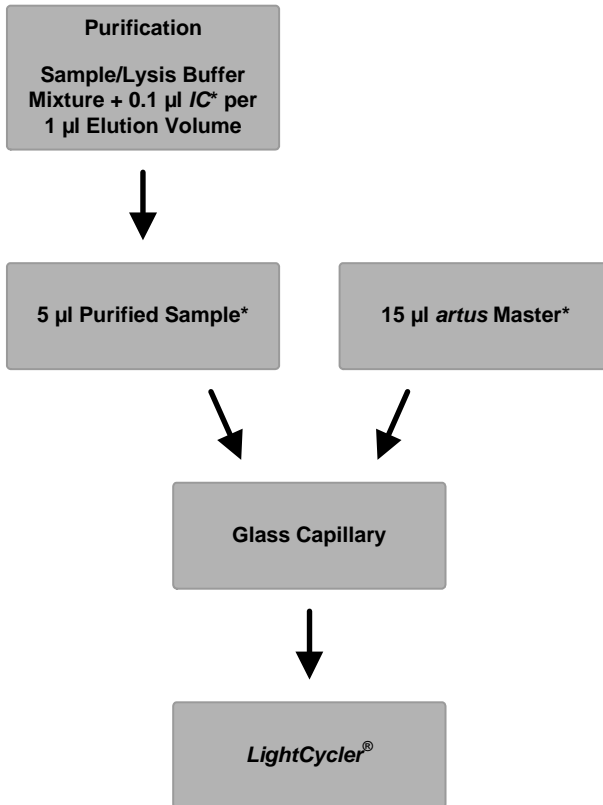


Abb. 1: Schematischer Arbeitsablauf zur Kontrolle von Aufreinigung und PCR-Inhibition.

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

Zugabe der *Internen Kontrolle* zum *artus Master*

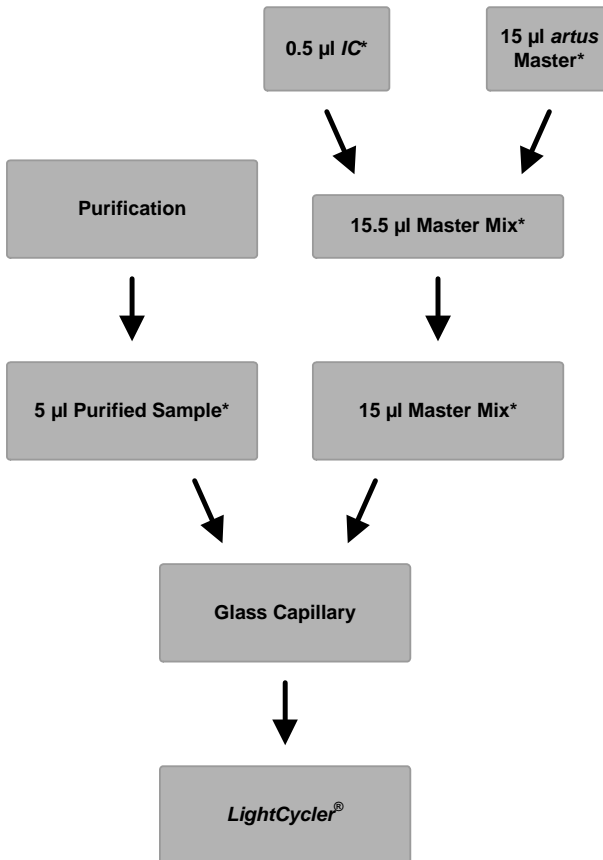


Abb. 2: Schematischer Arbeitsablauf zur Kontrolle der PCR-Inhibition.

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

8.5 Programmieren des Geräts *LightCycler*

Zum Nachweis der WNV-RNA erstellen Sie ein Temperaturprofil am Gerät *LightCycler* entsprechend der folgenden drei Schritte (siehe Abb. 3 bis 6).

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

Achten Sie besonders auf die Einstellungen für *Analysis Mode* (Analysemodus), *Cycle Program Data* (PCR-Programmdaten) und *Temperature Targets* (Zieltemperaturen). Die jeweiligen Einstellungen sind in den Abbildungen durch schwarze Rahmen hervorgehoben. Einzelheiten zur Programmierung des Geräts *LightCycler* entnehmen Sie bitte dem *LightCycler Operator's Manual*.

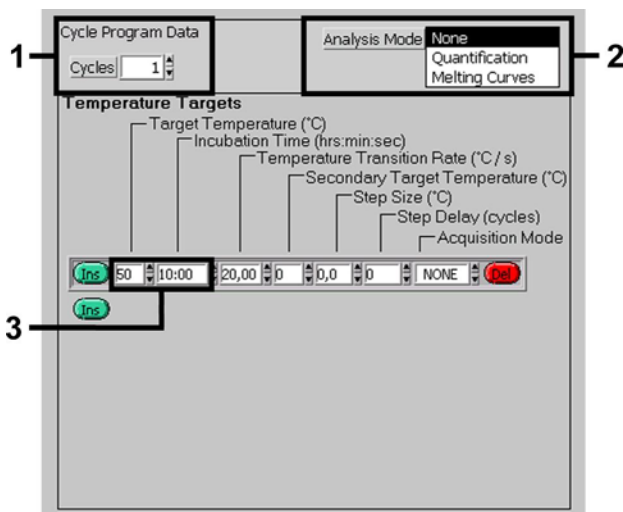


Abb. 3: Reverse Transkription der RNA.

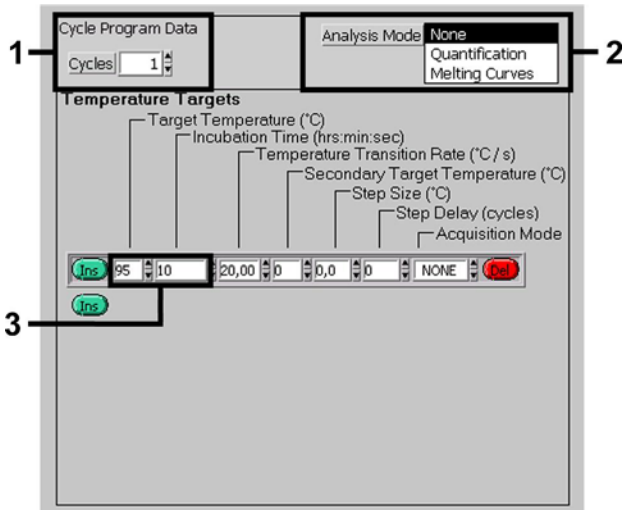


Abb. 4: Initiale Aktivierung des Hot-Start-Enzyms.

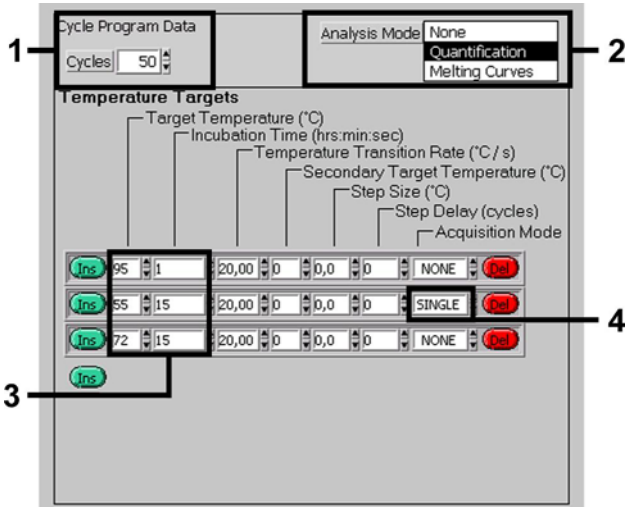


Abb. 5: Amplifikation der cDNA.

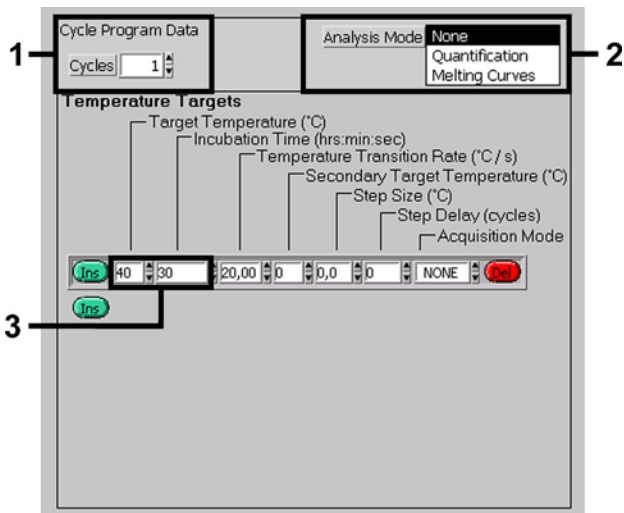


Abb. 6: Kühlung.

9. Auswertung

Bei Multicolor-Analysen treten Interferenzen zwischen den Fluorimeterkanälen auf. Die Software des Geräts *LightCycler* enthält eine Datei mit dem Namen *Color Compensation File*, die diese Interferenzen kompensiert. Öffnen Sie diese Datei vor, während oder nach dem PCR-Lauf durch Aktivieren der Schaltflächen *Choose CCC File* (CCC-Datei auswählen) oder *Select CC Data* (CC-Daten auswählen). Wenn keine *Color Compensation File* installiert ist, erstellen Sie die Datei entsprechend der Anweisungen im *LightCycler Operator's Manual*. Nach Aktivieren der *Color Compensation File* erscheinen in den Fluorimeterkanälen F1, F2 und F3 separate Signale. Zur Auswertung der mit dem *artus WNV LC RT-PCR Kit* gewonnenen PCR-Ergebnisse wählen Sie für die analytische WNV LC RT-PCR die Fluoreszenz-Anzeigeoption F1 bzw. für die RTPCR der *Internen Kontrolle* die Option F3/Back-F1* aus. Zur Vereinfachung der quantitativen Auswertung befolgen Sie bitte die Anweisungen unter **8.3 Quantifizierung** und in der **Technical Note zur Quantifizierung am Gerät LightCycler** unter www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

Folgende Ergebnisse sind möglich:

1. Im Fluorimeterkanal F1 wird ein Signal detektiert.

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

In diesem Fall ist die Detektion eines Signals im Kanal F3/Back-F1 unmaßgeblich, da eine hohe Ausgangskonzentration von WNV-RNA (positives Signal im Kanal F1) zu einem abgeschwächten oder ausbleibenden Fluoreszenzsignal der *Internen Kontrolle* im Kanal F3/Back-F1 führen kann (Kompetition).

2. Im Fluorimeterkanal F1 wird kein Signal detektiert. Gleichzeitig erscheint ein Signal von der *Internen Kontrolle* im Kanal F3/Back-F1.

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

* Bei Verwendung älterer Software-Versionen (bis Version 3.3) ist die Anzeigeoption F3/BackF1 nicht verfügbar. Wählen Sie in diesem Fall F3/F1 aus.

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

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

Eine diagnostische Aussage ist nicht möglich.

Hinweise zu Fehlerquellen und deren Beseitigung sind unter **10** Hilfe **zur Fehlersuche** aufgeführt.

Beispiele für PCR-Reaktionen mit positiven und negativen Ergebnissen sind in Abb. 7 und Abb. 8 gezeigt.

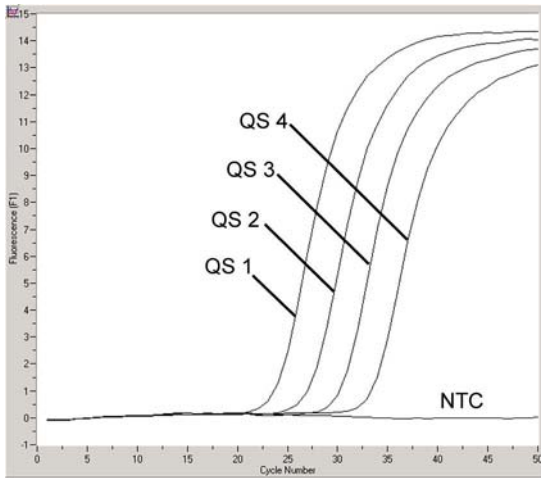


Abb. 7: Nachweis der Quantifizierungsstandards (WNV LC/TM QS 1 – 4) im Fluorimeterkanal F1. NTC: No template control (Kontrolle ohne Template) (Negativkontrolle).

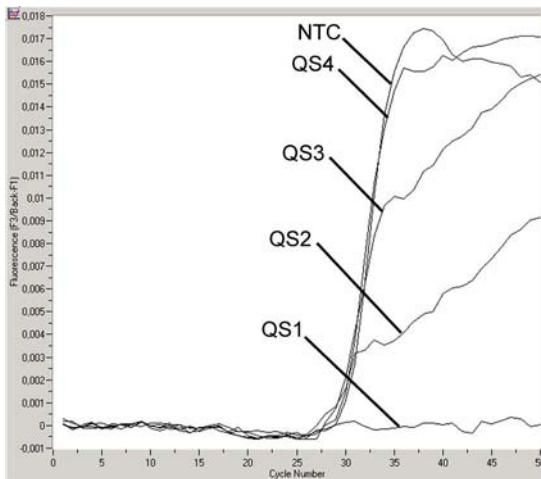


Abb. 8: Nachweis der *Internen Kontrolle* (IC) im Fluorimeterkanal F3/Back-F1 bei gleichzeitiger Amplifikation der Quantifizierungsstandards (WNV LC/TM QS 1 – 4). NTC: No template control (Kontrolle ohne Template) (Negativkontrolle).

10. Hilfe zur Fehlersuche

Kein Signal mit Positivkontrollen (WNV LC/TM QS 1 – 4) im Fluorimeterkanal F1:

- Der ausgewählte Fluorimeterkanal für die PCR-Datenanalyse entspricht nicht dem Protokoll.
 - Wählen Sie bei der Datenanalyse den Fluorimeterkanal F1 für die analytische WNV RT-PCR und den Fluorimeterkanal F3/Back-F1 für die PCR der *internen Kontrolle* aus.
- Programmierung des Temperaturprofils für das Gerät *LightCycler* ist nicht korrekt.
 - Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit den Protokollangaben (siehe **8.5 Programmieren des Geräts *LightCycler***).
- 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 Verfallsdatum des *artus* WNV LC RT-PCR Kits ist abgelaufen.
 - Bitte überprüfen Sie sowohl Lagerungsbedingungen als auch das Verfallsdatum (siehe Kit-Etikett) der Reagenzien und verwenden Sie ggf. ein neues Kit.

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

- Die PCR-Bedingungen entsprechen nicht dem Protokoll.
 - Überprüfen Sie die PCR-Bedingungen (siehe oben) und wiederholen Sie gegebenenfalls 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).
- RNA ging bei der Aufreinigung verloren.
 - Sollte die *Interne Kontrolle* zur Aufreinigung zugegeben worden sein, kann ein Ausbleiben des Signals der *Internen Kontrolle* den Verlust der RNA bei der Aufreinigung bedeuten. Stellen Sie sicher, dass Sie ein von uns empfohlenes Aufreinigungsverfahren benutzen (siehe **8.1**, RNA-Isolierung) und halten Sie sich exakt an die Herstellervorschrift.
- Die Lagerungsbedingungen für eine oder mehrere Kit-Komponenten entsprachen nicht den in **2** Lagerung angeführten Vorschriften oder das Verfallsdatum des *artus WNV LC RT-PCR Kits* ist abgelaufen.
 - Bitte überprüfen Sie sowohl Lagerungsbedingungen als auch das Verfallsdatum (siehe Kit-Etikett) der Reagenzien und verwenden Sie ggf. ein neues Kit.

Signale bei den Negativkontrollen im Fluorimeterkanal F1 der analytischen PCR.

- Beim Ansetzen der PCR ist eine Kontamination aufgetreten.
 - Wiederholen Sie die PCR mit Replikaten mit noch unbenutzten Reagenzien.
 - Verschließen Sie die einzelnen PCR-Gefäße nach Möglichkeit jeweils direkt nach Zugabe der zu untersuchenden Probe.
 - Pipettieren Sie die Positivkontrollen grundsätzlich zuletzt.
 - Achten Sie darauf, dass Arbeitsflächen und Geräte regelmäßig dekontaminiert werden.
- Bei der Aufreinigung ist eine Kontamination aufgetreten.
 - Wiederholen Sie Aufreinigung und PCR der zu untersuchenden Proben unter Verwendung noch unbenutzter Reagenzien.
 - Achten Sie darauf, dass Arbeitsflächen und Geräte regelmäßig dekontaminiert werden.

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

11. Spezifikationen

11.1 Analytische Sensitivität

Zur Bestimmung der analytischen Sensitivität des *artus* WNV LC RT-PCR Kit wurde eine Standard-Verdünnungsreihe von 40 bis nominal 0,01265 in-vitro-transkribierte RNA-Kopien pro Mikroliter des WNV-Amplifikats angesetzt und mit dem *artus* WNV LC RT-PCR Kit analysiert. Die Untersuchungen wurden an drei verschiedenen Tagen in Form von Achtfach-Bestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind mit Hilfe einer Probit-Analyse ermittelt worden. Abb. 9 zeigt eine grafische Darstellung der Probit-Analyse. Die Nachweisgrenze des *artus* WNV LC RT-PCR Kits beträgt 2,4 Kopien/ μ l ($p = 0,05$). Dies bedeutet, dass 2,4 Kopien/ μ l mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % nachgewiesen werden können.

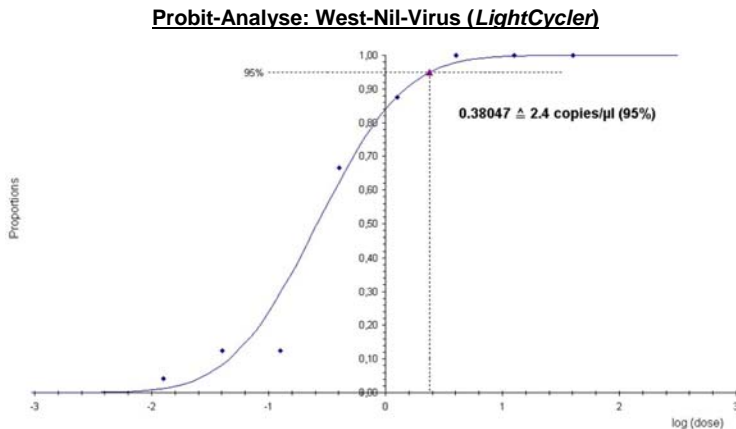


Abb. 9: Analytische Sensitivität des *artus* WNV LC RT-PCR Kits.

11.2 Spezifität

Die Spezifität des *artus* WNV LC RT-PCR Kits wird in erster Linie durch die Auswahl der Primer und Sonden sowie die Wahl stringenter Reaktionsbedingungen gewährleistet. Die Primer und Sonden sind anhand einer Sequenzvergleichsanalyse auf eventuelle Homologien zu allen in Genbanken publizierten Sequenzen überprüft worden. Die Nachweisbarkeit aller relevanten WNV-Stämme ist durch ein Datenbank-Alignment sichergestellt.

Zusätzlich wurde der Einfluss genomischer DNA auf den Nachweis positiver WNV-Proben geprüft. Es wurde gezeigt, dass große Mengen genomischer DNA bei einem PCR-Lauf zur Inhibition der PCR führen können. Deshalb sollte das *artus* WNV LC RT-PCR Kit nur mit zellarmen Probenmaterialien verwendet werden.

Die Validierung der Spezifität erfolgte zudem an 30 verschiedenen WNV-negativen Plasma- und Zerebrospinalflüssigkeitsproben. Bei diesen wurde mit den im *WNV LC Master* enthaltenen WNV-spezifischen Primern und Sonden kein Signal erzeugt.

Zur Bestimmung der Spezifität des *artus* WNV LC RT-PCR Kits wurde die in der folgenden Tabelle (siehe Tabelle 1) aufgeführte Kontrollgruppe auf eine Kreuzreaktivität untersucht. Bei keinem der getesteten Erreger trat eine Reaktion auf.

Tabelle 1: Spezifitätstest des Kits mit potentiell kreuzreaktiven Erregern.

Kontrollgruppe	WNV (F1)	Interne Kontrolle (F3/Back-F1)
St.-Louis-Enzephalitis-Virus	–	+
Japanischer Enzephalitis-Virus	–	+
Gelbfieberevirus	–	+
Denguevirus Typ 1	–	+
Denguevirus Typ 2	–	+
Denguevirus Typ 3	–	+
Denguevirus Typ 4	–	+
Montana-Myotis-leukoencephalitis-Virus	–	+
Modoc-Virus	–	+
Humanes Herpesvirus 1 (Herpes-simplex-Virus 1)	–	+
Humanes Herpesvirus 2 (Herpes-simplex-Virus 2)	–	+
Humanes Herpesvirus 3 (Varizella-Zoster-Virus)	–	+
Humanes Herpesvirus 5 (Zytomegalievirus)	–	+
Humanes Immundefizienz-Virus	–	+
Enterovirus 71	–	+
Coxsackie-Virus A7	–	+
Coxsackie-Virus A24	–	+
Coxsackie-Virus B3	–	+
ECHO-Virus 30	–	+
Hepatitis-A-Virus	–	+
Hepatitis-B-Virus	–	+
Hepatitis-C-Virus	–	+
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	–	+
<i>Plasmodium falciparum</i>	–	+
<i>Listeria welshmerii</i>	–	+
<i>Listeria ivanovii</i>	–	+

11.3 Präzision

Die Präzisionsdaten des *artus* WNV LC RT-PCR Kits 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 bei Anwendung durch verschiedene Personen innerhalb eines Labors unter Benutzung verschiedener Geräte gleichen Typs) und der **Chargenvariabilität** (Streuung bei 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.

Präzisionsdaten des *artus* WNV LC RT-PCR Kits wurden mit dem *Quantifizierungsstandard* der geringsten Konzentration (QS 4; 40 Kopien/ μ l) erhoben. 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) vorgenommen. Zusätzlich wurden auch die Präzisionsdaten der quantitativen Werte in Kopien/ μ l mittels der entsprechenden Ct-Werte ermittelt (siehe Tabelle 3). Demnach beträgt die Gesamtstreuung einer beliebigen Probe der genannten Konzentration 0,79 % (Ct) oder 10,12 % (Konz.) und für den Nachweis der *Internen Kontrolle* 4,28 % (Ct). Diese Werte basieren auf der Gesamtheit aller Einzelwerte der ermittelten Variabilitäten.

Tabelle 2: Präzisionsdaten auf Grundlage der Ct-Werte.

	Standardabweichung	Varianz	Variationskoeffizient [%]
Intra-Assay-Variabilität: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	0,07	0,01	0,22
Intra-Assay-Variabilität: <i>Interne Kontrolle</i>	0,14	0,02	0,46
Inter-Assay-Variabilität: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	0,30	0,09	0,91
Inter-Assay-Variabilität: <i>Interne Kontrolle</i>	0,32	0,10	1,09
Chargenvariabilität: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	0,13	0,02	0,40
Chargenvariabilität: <i>Interne Kontrolle</i>	1,28	1,63	4,62
Totalvarianz: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	0,26	0,07	0,79
Totalvarianz: <i>Interne Kontrolle</i>	1,23	1,51	4,28

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

	Standardabweichung	Varianz	Variationskoeffizient [%]
Intra-Assay-Variabilität: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	2,16	4,65	5,38
Inter-Assay-Variabilität: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	5,63	31,73	13,95
Chargenvariabilität: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	2,53	6,40	6,31
Totalvarianz: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	4,07	16,56	10,12

11.4 Robustheit

Die Überprüfung der Robustheit dient der Ermittlung der Gesamtausfallrate des *artus* WNV LC RT-PCR Kits. Hierzu wurden 30 WNV-negative Plasma- und Zerebrospinalflüssigkeitsproben mit je 7,2 Kopien/ μ l West-Nil-Virus-RNA voller Länge (ca. dreifache Konzentration der analytischen Sensitivitätsgrenze) dotiert. Nach der Aufreinigung mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit (siehe 8.1 RNA-Isolierung) wurden diese Proben mit dem *artus* WNV LC 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 30 WNV-negativen Plasma- und Zerebrospinalflüssigkeitsproben überprüft. Die Gesamtausfallrate betrug 0 %. Inhibitionen wurden nicht beobachtet. Die Robustheit des *artus* WNV LC RT-PCR Kits liegt also bei ≥ 99 %.

11.5 Reproduzierbarkeit

Aktuelle laborspezifische Tests für den Echtzeit-PCR-Nachweis von West-Nil-Virus-RNA liegen nicht vor. Reproduzierbarkeitsdaten werden durch externe Validierung und Beta-Studien und im Vergleich mit anderen Produkten in diagnostischen Studien gewonnen (siehe 11.6 Diagnostische Evaluierung).

11.6 Diagnostische Evaluierung

Gegenwärtig wird der *artus* WNV LC RT-PCR Kit einer Reihe von Evaluierungsstudien unterzogen.

12. Anwendungseinschränkungen

- Alle Reagenzien dürfen ausschließlich zur In-vitro-Diagnostik verwendet werden.
- Die Anwendung sollte durch Personal erfolgen, das speziell in In-vitro-Diagnostika-Verfahren unterrichtet und ausgebildet wurde.
- Die genaue Einhaltung der Anweisungen des Benutzerhandbuchs ist erforderlich, um optimale PCR-Ergebnisse zu erhalten.

- Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten sind zu beachten. Abgelaufene Reagenzien dürfen nicht benutzt werden.
- Selten auftretende Mutationen innerhalb der von den Primern und/oder der Sonde des Kits abgedeckten hochkonservierten Bereichen des Virengenoms können, wenn sie vorliegen, zu einer Unterbestimmung führen oder dazu, dass die Anwesenheit des Virus nicht detektiert wird. Validität und Leistung des Tests werden regelmäßig überprüft, um bei Bedarf Veränderungen vornehmen zu können.

13. Sicherheitsinformationen

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, SDSs). 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.

Entsorgen Sie Proben und Ansätze gemäß Ihren örtlichen Sicherheitsvorschriften.

14. Qualitätskontrolle

Gemäß dem umfassenden Qualitätssicherungssystem (TQM) von QIAGEN wird jede Charge des *artus* WNV LC RT-PCR Kits nach festgelegten Prüfkriterien getestet, um eine einheitliche Produktqualität sicherzustellen.

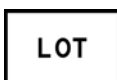
15. Literatur

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

16. Erklärung der Symbole



Verfallsdatum



Chargennummer



Hersteller



Katalognummer



Materialnummer



Handbuch



In-vitro-Diagnostikum



Komponenten



Enthält



Anzahl



Internationale Artikelnummer



<N>

Inhalt ausreichend für <N> Tests



Zulässiger Temperaturbereich



Beachten Sie die Anwendungshinweise

QS

Quantifizierungsstandard

IC

Interne Kontrolle

Notizen

artus WNV LC RT-PCR Kit

Warenzeichen und rechtliche Hinweis

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

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

DER ERWERB DIESES PRODUKTS GEWÄHRT DEM KÄUFER RECHTE NACH EINEM ODER MEHREREN DER US-PATENTE NR. 6,174,670, 7,160,998, 6,569,627 UND 6,245,514 UND IHREN ENTSPRECHUNGEN IN ANDEREN LÄNDERN, DIESES PRODUKT AUSSCHLIESSLICH ZUM BEREITSTELLEN IN-VITRO-DIAGNOSTISCHER DIENSTLEISTUNGEN AN MENSCHEN UND TIEREN ZU VERWENDEN. EINE ALLGEMEINE PATENT- ODER SONSTIGE LIZENZ, WELCHE ÜBER VORGENANNTES NUTZUNGSRECHT DES KÄUFERS DIESES PRODUKTS HINAUSGEHT, WIRD NICHT GEWÄHRT.

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung

Mit Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Anwender des artus WNV LC RT-PCR Kits die folgenden Bedingungen an:

1. Der artus WNV LC RT-PCR Kit darf nur gemäß den Angaben im *artus WNV LC RT-PCR Kit Handbuch* und mit den Komponenten, die im Kit geliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen Ihrer Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zum Kit gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zum Kit gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der im *artus WNV LC RT-PCR Kit Handbuch* und in zusätzlichen, im Internet unter www.qiagen.com verfügbaren, Protokollen beschriebenen Anwendungen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieser Kit und/oder die mit ihm durchgeführten Anwendungen die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieser Kit und seine Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Kits stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen könnten oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder dessen Komponenten entstehen.

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

QIAamp Viral RNA Mini Kit

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

© 2007-2014 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066
Austria ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11
Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556
Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779
Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)
China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325
Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942
Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413
France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928
Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400
Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425
Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061
Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787990
Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300
Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145
Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067
Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436
The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602
Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712
Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368
Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050
Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328
Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12
UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999
USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

1046924DE 148051765



Sample & Assay Technologies