

artus[®] EBV LC PCR

Kit Handbuch



24 (Katalog Nr. 4501063)



96 (Katalog Nr. 4501065)

Quantitatives In-vitro-Diagnostikum

Zur Verwendung mit dem LightCycler[®] Instrument

Version 1



4501063, 4501065



1046892DE



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, DEUTSCHLAND

R2

MAT

1046892DE



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN ist der führende Anbieter von innovativen Probenvorbereitungs- und Testtechnologien, die die Isolierung und die Analyse von Nukleinsäuren und Proteinen in jedem biologischen Probenmaterial ermöglichen. Unsere fortschrittlichen, qualitativ hochwertigen Produkte und Dienstleistungen stellen den Erfolg von der Probe bis zum Ergebnis sicher.

QIAGEN setzt Standards in:

- der Reinigung von DNA, RNA und Proteinen
- Nukleinsäure- und Protein-Assays
- microRNA-Forschung und RNAi
- der Automatisierung von Probenvorbereitungs- und Testtechnologien

Unsere Mission ist es, Ihnen herausragende Erfolge und neue Erkenntnisse bei Ihrer Forschung zu ermöglichen. Weitere Informationen finden Sie auf der Website www.qiagen.com.

Inhaltsverzeichnis

1. Inhalt	5
1. Lagerung	5
3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte	6
4. Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	6
5. Erreger-Informationen	6
6. Prinzip der Real-Time PCR	7
7. Produktbeschreibung	7
8. Protokoll	8
8.1 DNA-Isolierung.....	8
8.2 Interne Kontrolle	11
8.3 Quantifizierung	13
8.4 Vorbereitung der PCR.....	15
8.5 Programmierung des <i>LightCycler</i> Instruments.....	19
9. Auswertung	21
10. Troubleshooting	24
11. Spezifikationen	26
11.1 Analytische Sensitivität.....	26
11.2 Spezifität	27
11.3 Präzision	27
11.4 Reproduzierbarkeit.....	29
11.5 Diagnostische Evaluierung.....	29
12. Besondere Hinweise zum Produkt-Gebrauch	29

13. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen.....	30
14. Qualitätskontrolle	30
15. Literatur.....	30
10. Erklärung der Symbole	31

artus EBV LC PCR Kit

Für die Verwendung mit dem *LightCycler* Instrument.

1. Inhalt

	Beschriftung und Inhalt	Art. Nr. 4501063 24 Reaktionen	Art. Nr. 4501065 96 Reaktionen
Blau	EBV LC Master	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
Rot	EBV LC/RG/TM QS 1 [‡] 5 x 10 ⁴ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Rot	EBV LC/RG/TM QS 2 [‡] 5 x 10 ³ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Rot	EBV LC/RG/TM QS 3 [‡] 5 x 10 ² cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Rot	EBV LC/RG/TM QS 4 [‡] 5 x 10 ¹ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Grün	EBV LC IC [‡]	1 x 1.000 μl	2 x 1.000 μl
Weiß	Water (PCR grade)	1 x 1.000 μl	1 x 1.000 μl

[‡] QS = Quantifizierungsstandard

IC = Interne Kontrolle

1. Lagerung

Die Komponenten des artus EBV LC PCR Kits werden bei –30 °C bis –15 °C gelagert und sind bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Datum haltbar. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren (> 2 x) sollte vermieden werden, da dadurch die Sensitivität verringert wird. Bei unregelmäßigem Gebrauch sollten deshalb die Reagenzien aliquotiert werden. Sollte die Notwendigkeit bestehen, die Komponenten bei +4°C zu lagern, darf ein Zeitraum von fünf Stunden nicht überschritten werden.

3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

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

4. Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Folgendes sollte vom Anwender immer beachtet werden:

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

5. Erreger-Informationen

Die Übertragung des Epstein-Barr-Virus (EBV) erfolgt oral, meist durch kontaminierten Speichel. Die Infektion mit EBV verläuft in der Regel und insbesondere in der Kindheit asymptomatisch. Klinisches Zeichen einer akuten Infektion ist das Pfeiffersche Drüsenfieber mit Fieber, Müdigkeit,

Angina sowie Schwellung der Lymphknoten und der Milz. Bei einigen Patienten können diese Beschwerden chronisch-rezidivierend auftreten. Schwere Verlaufsformen der EBV-Infektion beobachtet man insbesondere bei immunsupprimierten Patienten und Personen mit T-Zell-Defekten.

6. Prinzip der Real-Time PCR

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

7. Produktbeschreibung

Der *artus* EBV LC PCR Kit ist ein gebrauchsfertiges System für den Nachweis von EBV-DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) im *LightCycler* Instrument. Der *EBV LC Master* beinhaltet Reagenzien und Enzyme für die spezifische Amplifikation eines 97 bp langen Abschnitts des EBV-Genoms sowie für die unmittelbare Detektion des Amplifikats im Fluorimeter-Kanal F2 des *LightCycler* Instruments. Daneben enthält der *artus* EBV LC PCR Kit zum Nachweis einer möglichen PCR-Inhibition ein zweites heterologes Amplifikationssystem. Dieses wird als *Interne Kontrolle (IC)* im Fluorimeter-Kanal F3 detektiert. Dabei wird die Nachweisgrenze der analytischen EBV-PCR (siehe 11.1 **Analytische Sensitivität**) nicht herabgesetzt. Es werden externe Positivkontrollen (*EBV LC/RG/TM QS 1 - 4*) mitgeliefert, mit deren Hilfe eine Bestimmung der Erregerlast vorgenommen werden kann. Dazu lesen Sie bitte den Absatz **8.3 Quantifizierung**.

Beachte: Das Temperaturprofil zur Detektion von EBV-DNA mit Hilfe des *artus* EBV LC PCR Kits entspricht dem des *artus* HSV-1/2 LC PCR Kits, des *artus* VZV LC PCR Kits und dem des *artus* CMV LC PCR Kits. Demzufolge können die PCR-Reaktionen für diese *artus*-Systeme in einem Lauf durchgeführt und analysiert werden. Beachten Sie dabei die speziellen Hinweise zur Auswertung unter **8.3 Quantifizierung** und unter 9. Auswertung.

8. Protokoll

8.1 DNA-Isolierung

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

Probenmaterial	Aufreinigungskit	Katalognummer	Hersteller	Carrier-RNA
Serum, Plasma, Liquor	QIAamp [®] DNA Mini Kit (50)	51 304	QIAGEN	nicht enthalten
	QIAamp UltraSens [®] Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	enthalten
Blutzellen	QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	51 104	QIAGEN	nicht enthalten
Plasma	EZ1 [®] DSP Virus Kit (48)*	62 724	QIAGEN	enthalten

*Zur Verwendung in Kombination mit der BioRobot[®] EZ1 DSP Workstation (Kat. Nr. 9001360) und der EZ1 DSP Virus Card (Kat. Nr. 9017707)

Wichtige Hinweise für die Verwendung des QIAamp UltraSens Virus Kits, des QIAamp DNA Blood Mini Kits und des QIAamp DNA Mini Kits:

- Der Einsatz von **Carrier-RNA** ist für die Effizienz der Aufreinigung und damit für die DNA-/RNA-Ausbeute von entscheidender Bedeutung. Falls der verwendete Isolierungskit keine Carrier-RNA enthalten sollte, beachten Sie bitte, dass bei der Aufreinigung von Nukleinsäuren aus zellfreien Körperflüssigkeiten bzw. Materialien mit geringem DNA-/RNA-Gehalt (z. B. Liquor) die Zugabe von Carrier-RNA (RNA-Homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, Kat.-Nr. 27-4110-01) dringend empfohlen wird. Bitte gehen Sie dann wie folgt vor:
 - a) Resuspendieren Sie hierzu die lyophilisierte Carrier-RNA im Elutionspuffer (nicht im Lysispuffer) des Isolierungskits (z. B. AE-Puffer des QIAamp DNA Mini Kits/ QIAamp DNA Blood Mini Kits) und stellen Sie eine Verdünnung mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ her. Portionieren Sie diese Carrier-RNA-Lösung auf eine Ihren Anforderungen entsprechende Anzahl von Aliquots, die bei -20°C gelagert werden müssen. Vermeiden Sie das wiederholte Auftauen (> 2 x) eines Carrier-RNA-Aliquots.
 - b) Pro Aufreinigung sollte 1 μg Carrier-RNA pro 100 μl Lysispuffer eingesetzt werden. Sieht das Extraktionsprotokoll beispielsweise 200 μl Lysispuffer pro aufzureinigende Probe vor, dann setzen Sie 2 μl der Carrier-RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) direkt in den Lysispuffer ein. Vor Beginn jeder Aufreinigung muss ein Gemisch aus Lysispuffer und Carrier-RNA (und ggf. *Interner Kontrolle*, siehe **8.2 Interne Kontrolle**) gemäß folgendem Pipettierschema frisch hergestellt werden.

Anzahl der Proben	1	12
Lysispuffer	z. B. 200 μl	z. B. 2.400 μl
Carrier-RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	2 μl	24 μl
Gesamtvolumen	202 μl	2.424 μl
Volumen für die Aufreinigung	200 μl	je 200 μl

- c) Setzen Sie das frisch hergestellte Gemisch aus Lysispuffer und Carrier-RNA sofort für die Aufreinigung ein. Eine Lagerung des

Gemisches ist nicht möglich.

- 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 UltraSens Virus Kit mitgelieferten Carrier-RNA zu erzielen, empfehlen wir folgendes von den Angaben im Handbuch des Isolierungskits abweichendes Vorgehen:
 - a. Resuspendieren Sie die lyophilisierte Carrier-RNA vor Erstbenutzung des Isolierungskits in 310 μl des im Kit enthaltenen Elutionspuffers (Endkonzentration 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, keinen Lysispuffer verwenden) und portionieren Sie diese Carrier-RNA-Lösung auf eine Ihren Anforderungen entsprechende Anzahl von Aliquots, die bei -20°C gelagert werden müssen. Vermeiden Sie das wiederholte Auftauen ($> 2 \times$) eines Carrier-RNA-Aliquots.
 - b. Vor Beginn jeder Aufreinigung muss ein Gemisch aus Lysispuffer und Carrier-RNA (und ggf. *Interner Kontrolle*, siehe **8.2 Interne Kontrolle**) gemäß folgendem Pipettierschema frisch hergestellt werden.

Anzahl der Proben	1	12
Lysispuffer AC	800 μl	9.600 μl
Carrier-RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	5,6 μl	67,2 μl
Gesamtvolumen	805,6 μl	9.667,2 μl
Volumen für die Aufreinigung	800 μl	je 800 μl

- c. Setzen Sie das frisch hergestellte Gemisch aus Lysispuffer und Carrier-RNA sofort für die Aufreinigung ein. Eine Lagerung des Gemisches ist nicht möglich.
- Es wird empfohlen, für die Elution der DNA 50 μl Elutionspuffer zu verwenden, um eine maximale Sensitivität des *artus* EBV LC PCR Kit zu erlangen.
 - Durch die Benutzung des **QIAamp UltraSens Virus Kits** kann eine Aufkonzentrierung der Probe erzielt werden. Sollte es sich bei Ihrem

Probenmaterial nicht um Serum oder Plasma handeln, so geben Sie bitte mindestens 50 % (v/v) negatives Humanplasma zur Probe.

- Die in Blutentnahmeröhrchen enthaltenen **Antikoagulantien** können inhibierend auf die PCR wirken, werden aber von den aufgeführten Aufreinigungskits gut eliminiert. Es wird empfohlen, auf die Benutzung von Heparin-Blut zu verzichten.
- Bei Aufreinigungen, die **Ethanol**-haltige Waschpuffer benutzen, stellen Sie unbedingt sicher, dass vor der Elution ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt (drei Minuten, 13.000 Upm) zur Beseitigung von Ethanol-Rückständen durchgeführt wird. Dies verhindert mögliche PCR-Inhibitionen.
- Der *artus* EBV LC PCR Kit ist nicht geeignet für Aufreinigungsverfahren, die auf der Grundlage von **Phenol** arbeiten.

Wichtiger Hinweis für die Verwendung des EZ1 DSP Virus Kits:

- Der Einsatz von **Carrier-RNA** ist für die Effizienz der Aufreinigung und damit für die DNA-/RNA-Ausbeute von entscheidender Bedeutung. Geben Sie deshalb bitte zu jeder Aufreinigung die erforderliche Menge an Carrier RNA hinzu und halten Sie sich dabei an die Anweisungen im *EZ1 DSP Virus Kit Handbuch*.

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

8.2 Interne Kontrolle

Es wird eine *Interne Kontrolle* (EBV LC IC) mitgeliefert. Mit dieser haben Sie die Möglichkeit, sowohl die Aufreinigung der DNA als auch eine mögliche Inhibition der PCR zu kontrollieren (siehe Abb. 1). Bei der Verwendung des **EZ1 DSP Virus Kits** muss die *Interne Kontrolle* gemäß den Angaben im *EZ1 DSP*

Virus Kit Handbuch eingesetzt werden. Beim **QIAamp UltraSensVirus Kit**, dem **QIAamp DNA Blood Mini Kit** oder dem **QIAamp DNA MiniKit** geben Sie die *Interne Kontrolle* in einem Verhältnis von 0,1 µl pro 1 µl Elutionsvolumen zur Aufreinigung hinzu. Verwenden Sie beispielsweise den **QIAamp DNA Mini Kit** und eluieren die DNA in 50 µl AE-Puffer, dann setzen Sie bitte 5 µl der *Internen Kontrolle* ein. Die Menge der eingesetzten *Internen Kontrolle* ist **nur** abhängig vom Elutionsvolumen. Die *Interne Kontrolle* und Carrier-RNA (siehe **8.1 DNA-Isolierung**) dürfen nur zugesetzt werden zum

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

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

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

Die *artus EBV LC PCR Kits* und die *artus CMV LC PCR Kits* beinhalten eine identische *Interne Kontrolle (IC)*. Auch die *artus HSV-1/2 LC PCR Kits* und die *artus VZV LC PCR Kits* beinhalten eine identische *Interne Kontrolle*.

8.3 Quantifizierung

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

Sollten Sie mehr als ein Herpes-artus-System in Ihren Lauf integriert haben, so achten Sie bitte darauf, diese mit den zugehörigen *Quantifizierungsstandards* getrennt voneinander zu analysieren.

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

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

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

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

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

8.4 Vorbereitung der PCR

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

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

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

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

		Anzahl der Proben	
		1	12
1. Ansetzen des Master Mixes	EBV LC Master	15 μ l	180 μ l
	EBV LC IC	0,5 μ l	6 μ l
	Gesamtvolumen	15,5 μl*	186 μl*
2. Ansetzen der PCR-Reaktion	Master Mix	15 μ l*	je 15 μ l*
	Probe	5 μ l	je 5 μ l
	Gesamtvolumen	20 μl	je 20 μl

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

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

Zugabe der *Internen Kontrolle* zur Aufreinigung

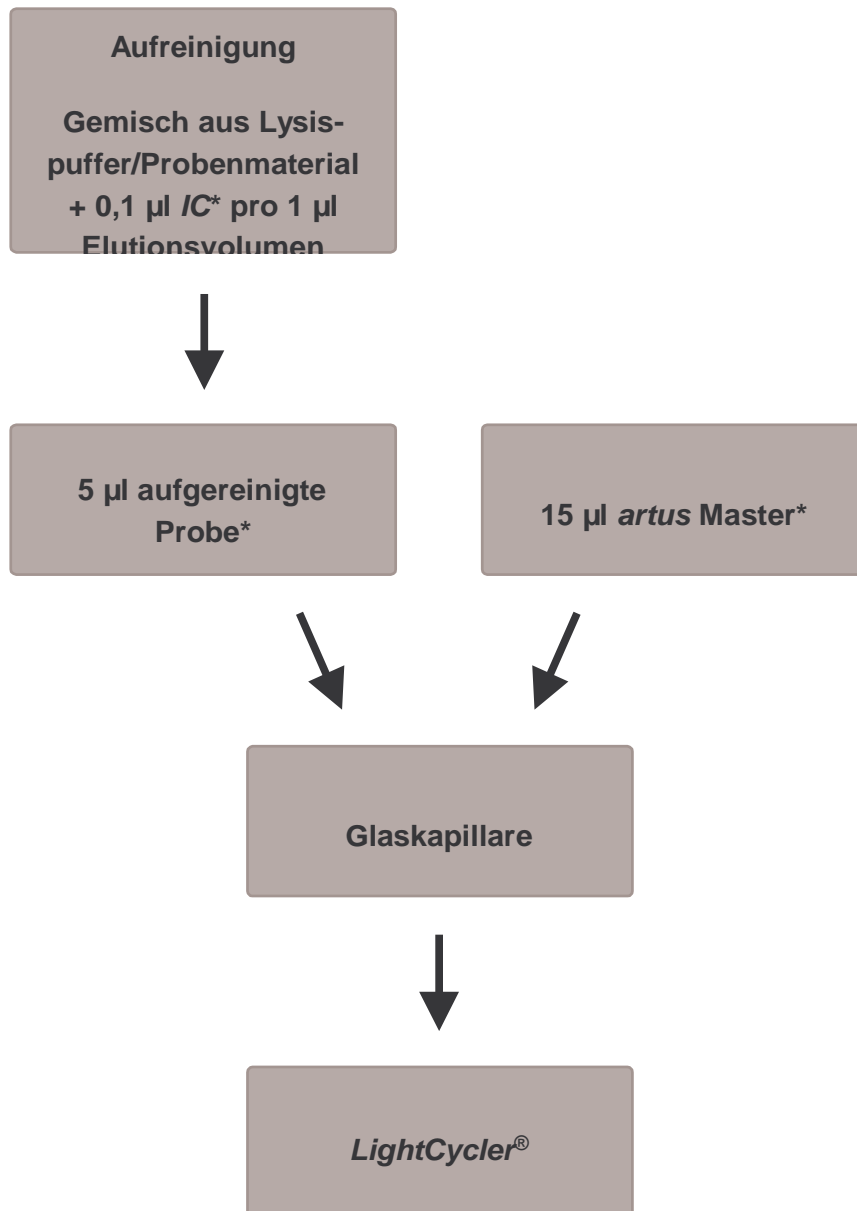


Abb. 1: Schematischer Arbeitsablauf zur Kontrolle von Aufreinigung und PCR-Inhibition.

*

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

Zugabe der Internen Kontrolle zum artus Master

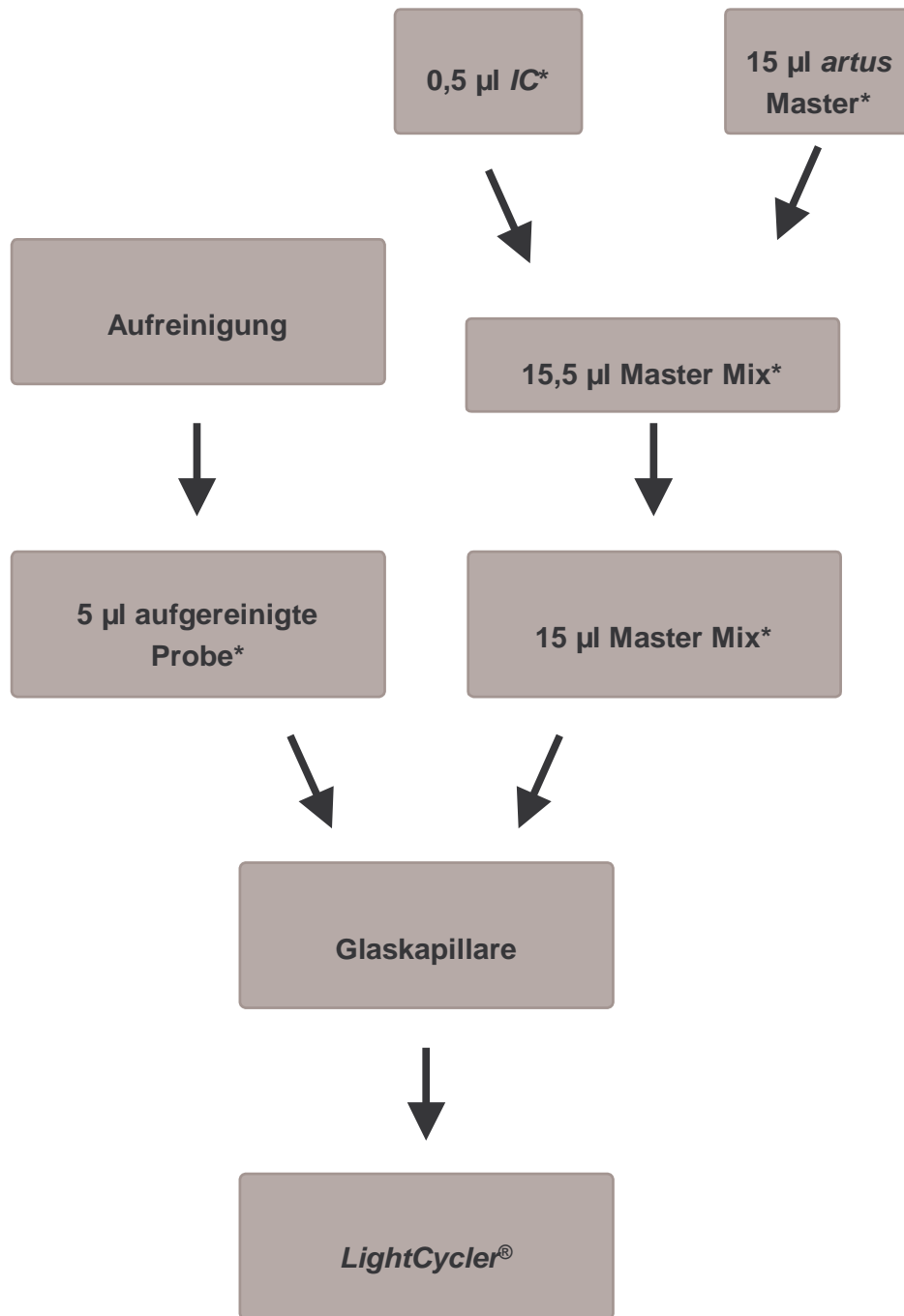


Abb. 2: Schematischer Arbeitsablauf zur Kontrolle der PCR-Inhibition.

*

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

8.5 Programmierung des *LightCycler* Instruments

Zur Detektion der EBV-DNA erstellen Sie auf Ihrem *LightCycler* Instrument ein Temperaturprofil gemäß den folgenden fünf Arbeitsschritten (siehe Abb. 3 - 7).

- | | | |
|----|---|--------|
| A. | Initiale Aktivierung des Hot Start-Enzyms | Abb. 3 |
| B. | Touch Down-Schritt | Abb. 4 |
| C. | Amplifikation der DNA | Abb. 5 |
| D. | Schmelzkurve (optional) | Abb. 6 |
| E. | Kühlung | Abb. 7 |

Beachten Sie insbesondere die Einstellungen für *Analysis Mode*, *Cycle Program Data* und *Temperature Targets*. In den Abbildungen sind diese Einstellungen durch schwarze Rahmen hervorgehoben. Hinweise zur Programmierung des *LightCycler* Instruments finden Sie im *LightCycler Operator's Manual*. Die Erstellung des Schrittes D. Schmelzkurve ist **optional**. Sie wird ausschließlich für die Differenzierung zwischen HSV1 und HSV2 bei gleichzeitigem Einsatz des *artus* HSV-1/2 LC PCR Kits benötigt.

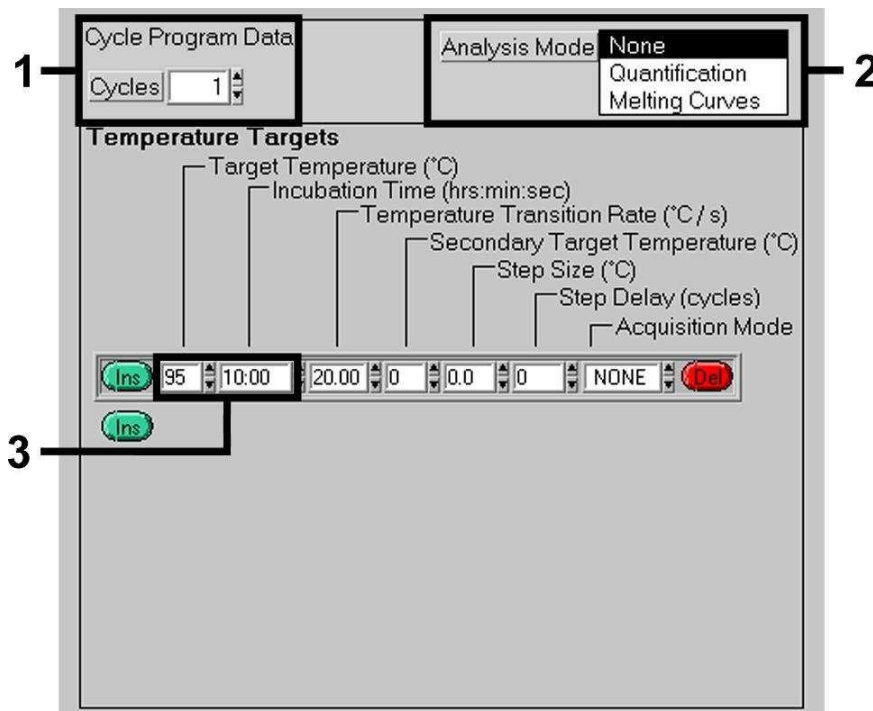


Abb. 3: Initiale Aktivierung des Hot Start-Enzyms.

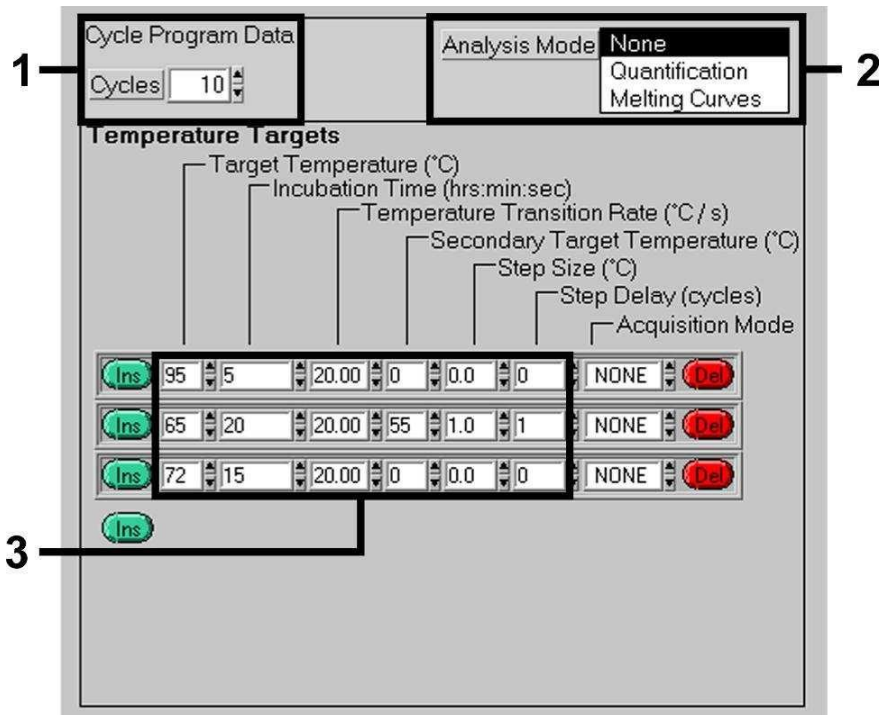


Abb. 4: Touch Down-Schritt.

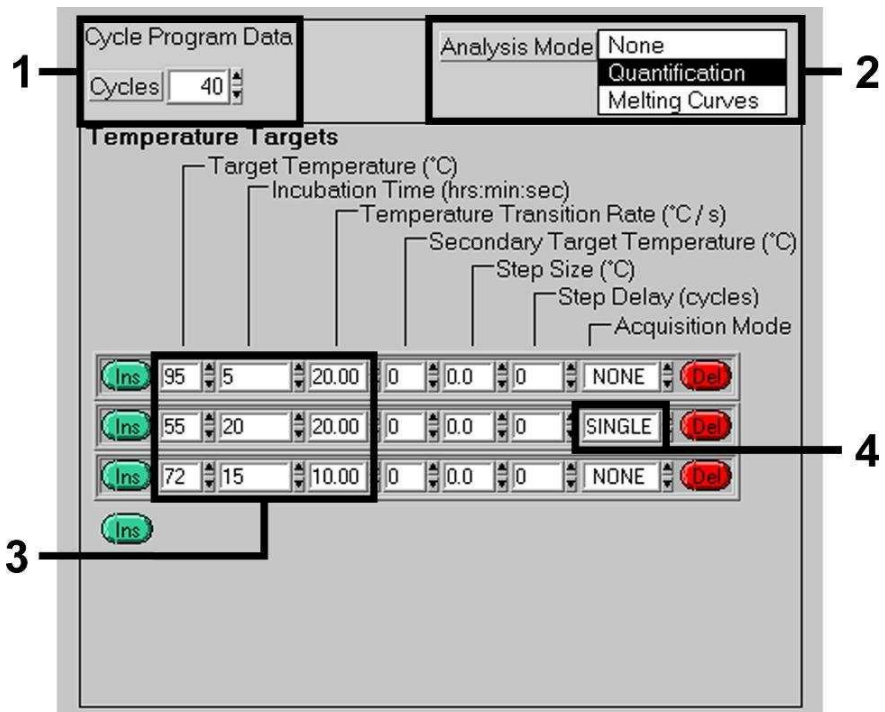


Abb. 5: Amplifikation der DNA.

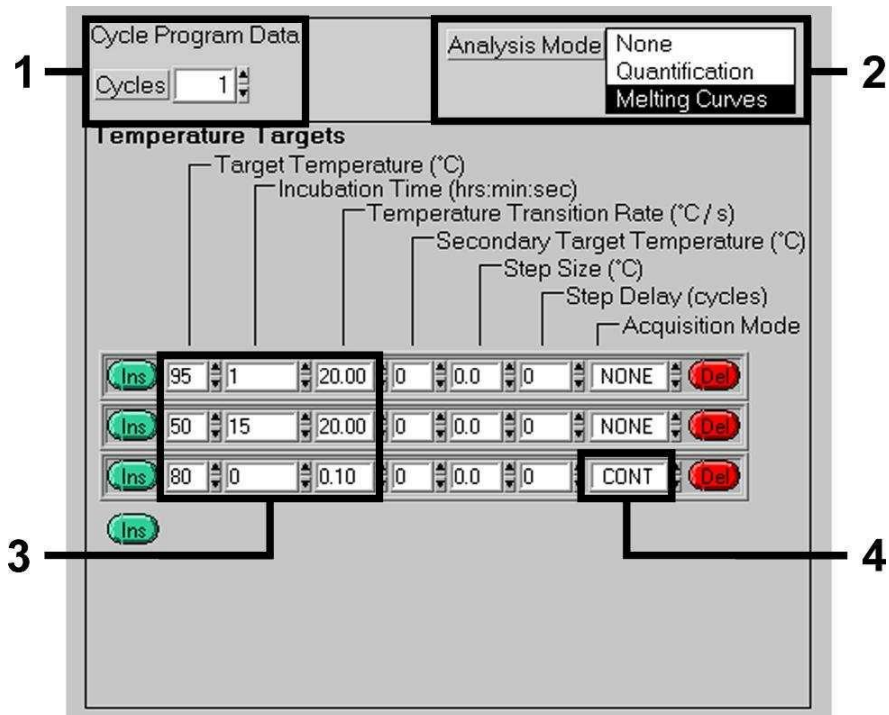


Abb. 6: Schmelzkurve.

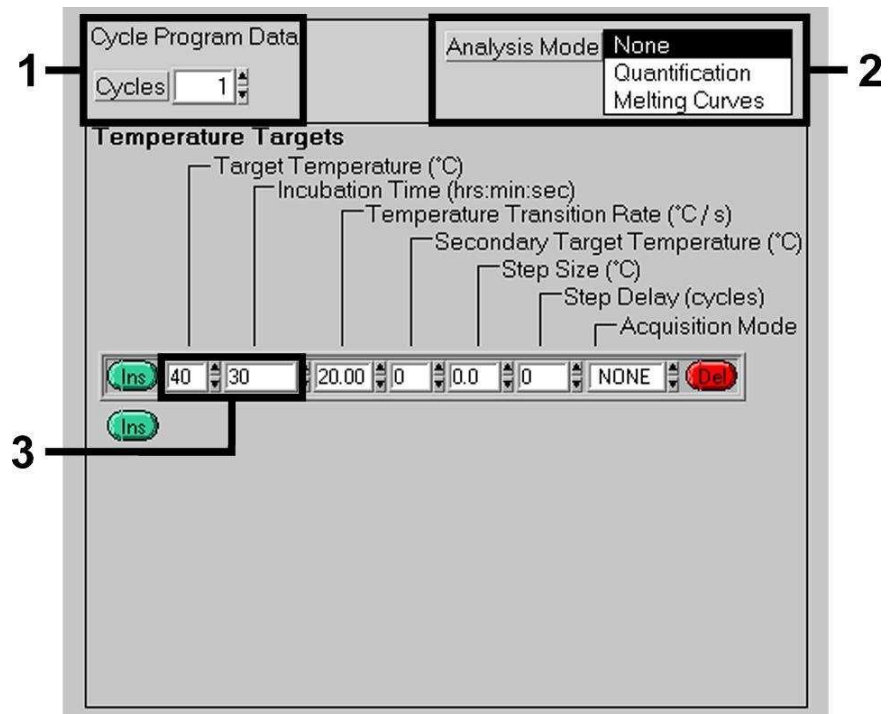


Abb. 7: Kühlung.

9. Auswertung

Bei Multicolor-Analysen treten Interferenzen zwischen den Fluorimeter-Kanälen auf. Die Software des *LightCycler* Instruments enthält eine als *Color Compensation File* bezeichnete Datei, welche diese Einstrahlungen kompensiert. Diese Datei öffnen Sie vor, während oder im Anschluss des PCR-Laufs durch Aktivierung der Schaltfläche *Choose CCC File* bzw. *Select CC Data*. Sollte kein *Color Compensation File* installiert sein, erstellen Sie die Datei bitte unter Beachtung der Anleitung im *LightCycler Operator's Manual*. Nach Aktivierung des *Color Compensation File* erscheinen in den Fluorimeter-Kanälen F1, F2 und F3 getrennte Signale. Zur Analyse der PCR-Ergebnisse, die mit dem *artus* EBV LC PCR Kit gewonnen werden, wählen Sie bitte die Ansichtsfunktionen F2/Back-F1 für die analytische EBV-PCR bzw. F3/Back-F1 für die PCR der *Internen Kontrolle*. Für die Analyse quantitativer Läufe beachten Sie bitte unbedingt den Abschnitt **8.3 Quantifizierung** sowie die **Technical Note zur Quantifizierung am *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 bzw. *LightCycler* 2.0 Instrument** unter www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

Sollten Sie mehr als ein Herpes-*artus*-System in Ihren PCR-Lauf integriert haben, so achten Sie bitte darauf, die EBV-Proben getrennt zu analysieren. Wählen Sie dafür die entsprechenden Rotor-Positionen zur Auswertung aus.

Folgende Ergebnisse können auftreten:

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

Das Ergebnis der Analyse ist positiv: Die Probe enthält EBV-DNA.

In diesem Fall ist die Detektion eines Signals im Kanal F3/Back-F1 unwesentlich, da hohe Ausgangskonzentrationen an EBV-DNA (positives Signal im Kanal F2/Back-F1) zu einem reduzierten bis ausbleibenden Fluoreszenz-Signal der *Internen Kontrolle* im Kanal F3/Back-F1 führen können (Kompetition).

2. Im Fluorimeter-Kanal F2/Back-F1 wird kein Signal detektiert, sondern nur im Kanal F3/Back-F1 (Signal der *Internen Kontrolle*).

In der Probe ist keine EBV-DNA nachweisbar. Sie kann daher als negativ angesehen werden.

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

3. Weder im Kanal F2/Back-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. Troubleshooting** aufgeführt.

Beispiele für positive und negative PCR-Reaktionen sind in Abb. 8 und Abb. 9 wiedergegeben.

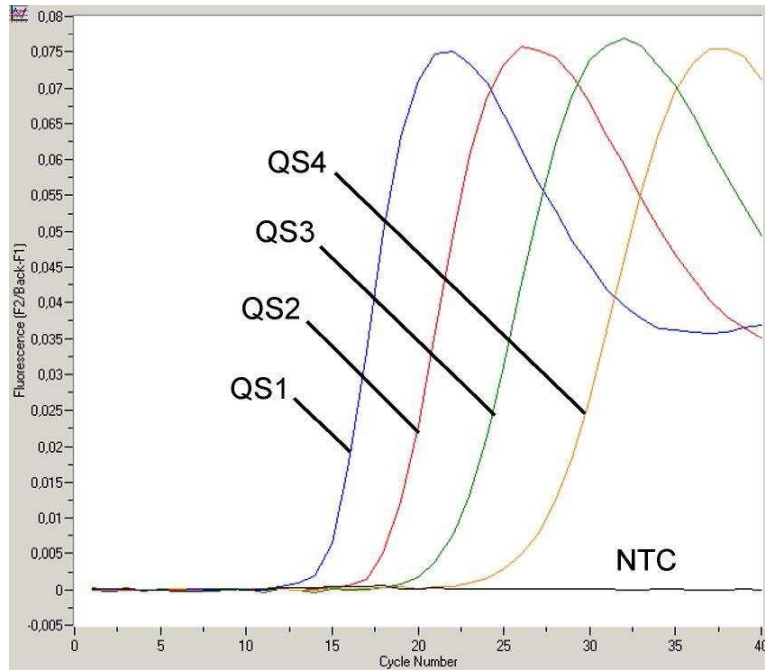


Abb. 8: Nachweis der *Quantifizierungsstandards* (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4) im Fluorimeter-Kanal F2/Back-F1. NTC: non-template control (Negativkontrolle).

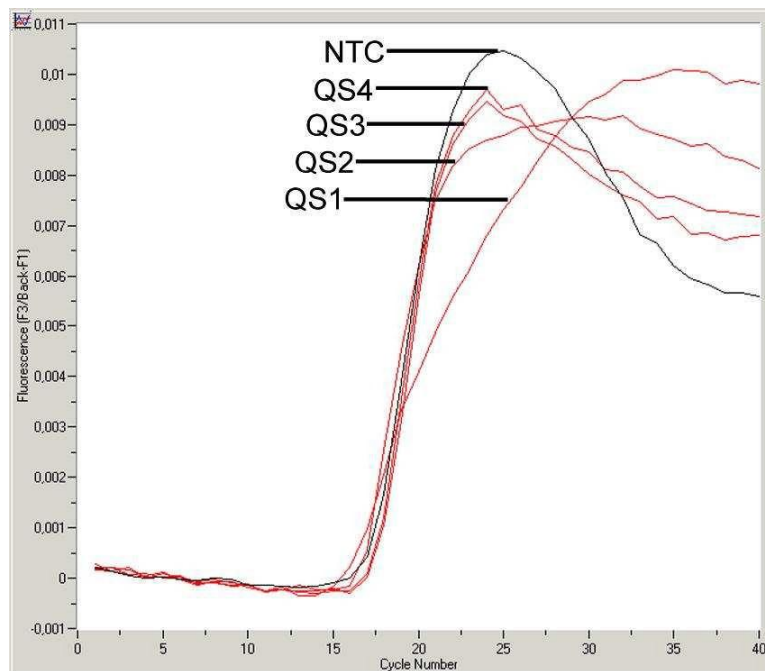


Abb. 9: Nachweis der *Internen Kontrolle* (IC) im Fluorimeter-Kanal F3/Back-F1 bei gleichzeitiger Amplifikation der *Quantifizierungsstandards* (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (Negativkontrolle).

10. Troubleshooting

Kein Signal bei den Positivkontrollen (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4) im

Fluorimeter-Kanal F2/Back-F1:

- Die Wahl des Fluorimeter-Kanals bei der PCR-Datenanalyse entspricht nicht den Protokollangaben.
 - ◆ Wählen Sie für die Datenanalyse den Fluorimeter-Kanal F2/Back-F1 für die analytische EBV-PCR und den Fluorimeter-Kanal F3/Back-F1 für die PCR der *Internen Kontrolle*.
- Die Programmierung des Temperaturprofils des *LightCycler* Instruments ist fehlerhaft.
 - ◆ Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit den Protokollangaben (siehe **8.5 Programmierung des *LightCycler* Instruments**).
- Fehlerhaftes Zusammenstellen der PCR-Reaktion.
 - ◆ Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte mit Hilfe des Pipettierschemas (siehe **8.4 Vorbereitung der PCR**) und wiederholen Sie ggf. die PCR.
- Die Lagerungsbedingungen für eine oder mehrere Kit-Komponenten entsprachen nicht den in **2. Lagerung** angeführten Vorschriften oder das Haltbarkeitsdatum des *artus* EBV LC PCR Kits wurde überschritten.
 - ◆ Bitte überprüfen Sie sowohl Lagerungsbedingungen als auch Haltbarkeitsdatum (siehe Kit-Etikett) der Reagenzien und verwenden Sie ggf. einen neuen Kit.

Schwaches oder ausbleibendes Signal der *Internen Kontrolle* im Fluorimeter-Kanal F3/Back-F1 bei gleichzeitiger Abwesenheit eines Signals im Kanal F2/Back-F1:

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

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

Signale bei den Negativkontrollen im Fluorimeter-Kanal F2/Back-F1 der analytischen PCR.

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

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

11. Spezifikationen

11.1 Analytische Sensitivität

Zur Bestimmung der analytischen Sensitivität des *artus* EBV LC PCR Kits wurde eine Standard-Verdünnungsreihe von 50 bis nominal 0,005 EBV-Kopieäquivalenten^{*}/μl erstellt und mit dem *artus* EBV LC PCR Kit analysiert.

Die Untersuchungen wurden an drei verschiedenen Tagen in Form von Achtfach-Bestimmungen durchgeführt. Das Ergebnis ist mit Hilfe einer Probit-Analyse ermittelt worden. Deren graphische Auswertung ist in Abb. 10 dargestellt. Die analytische Nachweisgrenze des *artus* EBV LC PCR Kits liegt demzufolge bei 5,78 Kopien/μl ($p = 0,05$). Dies bedeutet, dass 5,78 Kopien/μl mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % detektiert werden können.

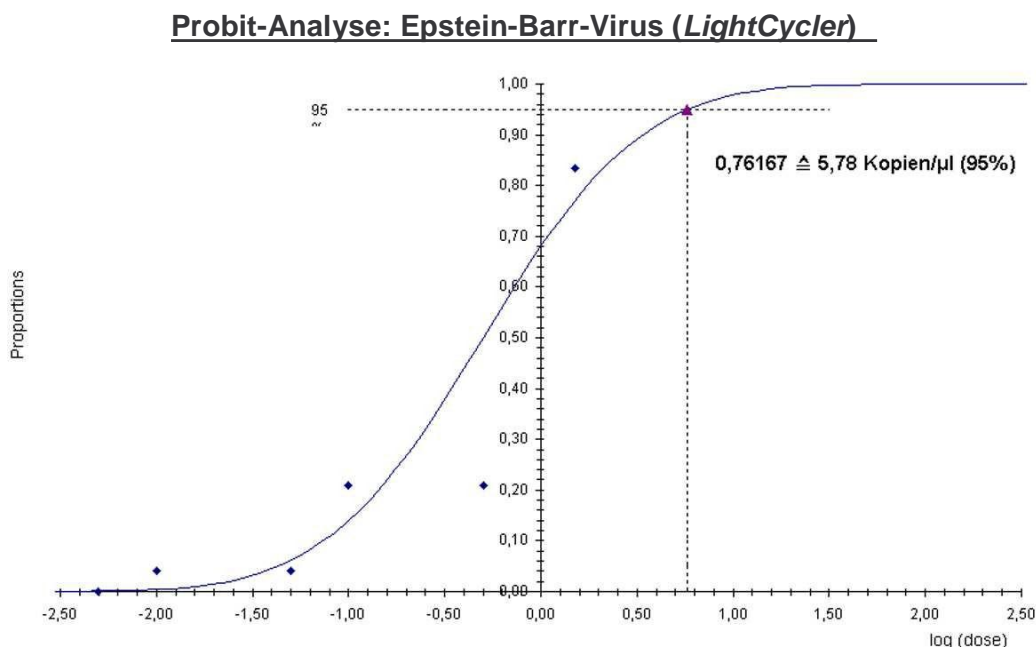


Abb. 10: Analytische Sensitivität des *artus* EBV LC PCR Kits.

^{*} Bei dem hier verwendeten Standard handelt es sich um ein kloniertes PCR-Produkt, dessen Konzentration spektral- und fluoreszenzphotometrisch bestimmt wurde.

11.2 Spezifität

Die Spezifität des *artus* EBV LC PCR Kits wird in erster Linie durch die Auswahl der Primer und Sonden sowie die Wahl stringenter Reaktionsbedingungen gewährleistet. Die Primer und Sonden sind anhand einer Sequenzvergleichs-Analyse auf eventuelle Homologien zu allen in Genbanken publizierten Sequenzen überprüft worden. Auf diese Weise wurde auch die Detektierbarkeit aller relevanten Genotypen kontrolliert.

Die Validierung der Spezifität erfolgte zudem an sechs verschiedenen EBV negativen Serumproben, die mit den im *EBV LC Master* enthaltenen EBV spezifischen Primern und Sonden kein Signal generierten.

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

Tabelle 1: Spezifitätstestung des Kits mit potentiell kreuzreaktiven Erregern.

Kontrollgruppe	EBV (F2/Back-F1)	Interne Kontrolle (F3/Back-F1)
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 T-Zell-Leukämie-Virus 1	-	+
Humanes T-Zell-Leukämie-Virus 2	-	+

11.3 Präzision

Die Präzisionsdaten für den *artus* EBV LC PCR Kit erlauben die Ermittlung der Totalvarianz (Gesamtstreuung) des Testsystems. Diese Totalvarianz setzt sich zusammen aus der **Intra-Assay Variabilität** (Streuung von Proben derselben Konzentration innerhalb eines Versuchsansatzes), der **Inter-Assay Variabilität** (Streuung aufgrund der Anwendung durch verschiedene Personen innerhalb

eines Labors und unter Benutzung verschiedener Geräte gleichen Typs) und der **Inter-Chargen Variabilität** (Streuung unter Verwendung unterschiedlicher Chargen). Dabei werden jeweils die Standardabweichung, die Varianz und der Variationskoeffizient sowohl für die Erreger-spezifische als auch für die PCR der *Internen Kontrolle* berechnet.

Diese Daten wurden für den *artus EBV LC PCR Kit* anhand des *Quantifizierungsstandards* mit der geringsten Konzentration (QS 4; 50 Kopien/ μ l) ermittelt. Die Untersuchungen wurden in Form von Achtfach-Bestimmungen durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse wurde anhand der Ct-Werte der Amplifikationskurven (Ct: *threshold cycle*, siehe Tabelle 2) und der daraus ermittelten quantitativen Werte in Kopien/ μ l (siehe Tabelle 3) vorgenommen. Demnach beträgt die Gesamtstreuung einer beliebigen Probe der genannten Konzentration 1,17 % (Ct) bzw. 14,54 % (Konz.), für den Nachweis der *Internen Kontrolle* 1,02 % (Ct). Diese Werte basieren auf der Gesamtheit aller Einzelwerte der ermittelten Variabilitäten.

Tabelle 2: Präzisionsdaten auf Grundlage der Ct-Werte.

	Standard- abweichung	Varianz	Variations- koeffizient [%]
Intra-Assay Variabilität: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	0,20	0,04	0,90
Intra-Assay Variabilität: <i>Interne Kontrolle</i>	0,04	0,00	0,28
Inter-Assay Variabilität: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	0,27	0,07	1,24
Inter-Assay Variabilität: <i>Interne Kontrolle</i>	0,11	0,01	0,72
Inter-Chargen Variabilität: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	0,47	0,07	1,44
Inter-Chargen Variabilität: <i>Interne Kontrolle</i>	0,19	0,03	1,23
Totalvarianz: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	0,26	0,07	1,17
Totalvarianz: <i>Interne Kontrolle</i>	0,15	0,02	1,02

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

	Standard- abweichung	Varianz	Variations- koeffizient [%]
Intra-Assay Variabilität: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,36	1,85	13,48
Inter-Assay Variabilität: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,68	2,83	16,61
Inter-Chargen Variabilität: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,33	1,77	13,19
Totalvarianz: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,47	2,16	14,54

11.4 Reproduzierbarkeit

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

11.5 Diagnostische Evaluierung

Den *artus* EBV LC PCR Kit wird derzeit noch in mehreren Studien evaluiert.

12. Besondere Hinweise zum Produkt-Gebrauch

- Alle Reagenzien dürfen ausschließlich zur In-vitro-Diagnostik verwendet werden.
- Die Anwendung sollte durch Personal erfolgen, das speziell in In-vitro-Diagnostika-Verfahren (EN375) unterrichtet und ausgebildet wurde.
- Die genaue Einhaltung des Protokolls ist unbedingt erforderlich, um optimale PCR-Ergebnisse zu erreichen.
- Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten sind zu beachten. Abgelaufene Reagenzien sind nicht zu benutzen.

13. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Sicherheitsinformationen zum *artus* EBV LC PCR Kit können Sie dem entsprechenden Sicherheitsdatenblatt entnehmen (safety data sheet, SDS). Dieses finden Sie als kompakte und anwenderfreundliche PDF-Datei unter www.qiagen.com/safety.











14. Qualitätskontrolle

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

15. Literatur

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

10. Erklärung der Symbole

	Verwendbar bis
	Chargenbezeichnung
	Hersteller
	Bestellnummer
	Materialnummer
	Handbuch
	In-vitro-diagnostisches Medizinprodukt
	Global Trade Item Number (Globale Artikelnummer)
	Inhalt reicht für <N> Tests
	Zulässiger Temperaturbereich
QS	<i>Quantifizierungsstandard</i>
IC	<i>Interne Kontrolle</i>

artus EBV LC PCR Kit

Marken und Disclaimer

QIAGEN®, QIAamp®, artus®, BioRobot®, EZ1®, UltraSens® (QIAGEN Gruppe); LightCycler® (Roche Group).

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

Der artus EBV LC PCR Kit, die BioRobot EZ1 DSP Workstation und die EZ1 DSP Virus Kit und Card sind CE-markierte diagnostische Instrumente und Kits in Übereinstimmung mit der Europäischen Richtlinie 98/79/EG über In-vitro-Diagnostika. Nicht in allen Ländern erhältlich.

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

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

© 2015 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

