

September 2017

QIASymphony[®] RGQ Anwendungsblatt

artus[®] EBV QS-RGQ Kit (Probentyp: Plasma)

IVD



REF

4501363DE *artus* EBV QS-RGQ Kit, Version 1.



Überprüfen Sie die Verfügbarkeit aktualisierter Dokumentationsunterlagen in elektronischer Form unter www.qiagen.com/products/artusebvpcrkitce.aspx, bevor Sie Tests durchführen.

Allgemeine Informationen

| | |
|-------------------------------------|--|
| Kit | <i>artus</i> EBV QS-RGQ Kit, Version 1 (Katalog-Nr. 4501363) |
| Validiertes Probenmaterial | EDTA-Humanplasma |
| Aufreinigung im Vorfeld | QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (Katalog-Nr. 937055) |
| Probenvolumen (inkl. Zusatzvolumen) | 1200 µl |
| Assay-Parameter-Set | <i>artus_EBV_plasma1000_V5</i> <i>MA_artus_EBV_plasma1000_V5*</i> |
| Standard-Assay-Kontroll-Set | Cellfree1000_V7_DSP_artus_EBV |
| Elutionsvolumen | 60 µl |
| Erforderliche Softwareversion | Version 4.0 oder höher |
| Volumen Master-Mix | 30 µl |
| Volumen Template | 20 µl |
| Anzahl der Reaktionen | 6–24 |
| Laufzeit auf AS-Modul | Für 6 Reaktionen: ca. 9 Minuten Für 72 Reaktionen: ca. 35 Minuten |

* Protokoll für Multi-Assay-Lauf mit *artus* CMV QS-RGQ Kit zum Laden von CMV RG IC für die Aufreinigung und das Assay-Setup.

Erforderliche, nicht mitgelieferte Materialien

Aufreinigungs-Kit

- QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (Katalog-Nr. 937055)

Adapter für QIASymphony SP

- Elution Microtube Rack QS (Elutionsröhrchen-Rack QS) (Kühladapter, EMT, v2, Qsym, Katalog-Nr. 9020730)
- Träger

- Tube Insert 3B (für Rörcheneinsatz 3B) (Einsatz 2,0 ml v2, samplecarr. (24), Qsym, Katalog-Nr. 9242083)

Verbrauchsmaterialien für QIASymphony SP

- Sample Prep Cartridges, 8-well (Probenvorbereitungskartuschen mit 8 Vertiefungen) (Katalog-Nr. 997002)
- 8-Rod Covers (8-Magnetstab-Schutzhülsen) (Katalog-Nr. 997004)
- Filter-Tips (Filterspitzen), 1500 µl (Katalog-Nr. 997024)
- Filter-Tips (Filterspitzen), 200 µl (Katalog-Nr. 990332)
- Elution Microtubes CL (Elutionsröhrchen CL) (Katalog-Nr. 19588)
- Tip disposal bags (Abfallbeutel für Pipettenspitzen) (Katalog-Nr. 9013395)
- Micro tubes 2.0 ml Type H or Micro tubes 2.0 ml Type I (2-ml-Mikro-Schraubröhrchen vom Typ H oder Typ I) (Sarstedt®, Katalog-Nr. 72.693 und 72.694, www.sarstedt.com) für Proben und interne Kontrollen

Adapter und Reagenzienhalter für den QIASymphony AS

- Reagent holder 1 QS (Reagenzienhalter 1 QS) (Kühladapter, Reagenzienhalter 1, Qsym, Katalog-Nr. 9018090)
- RG Strip Tubes 72 QS (RG Strip-Röhrchen 72 QS) (Kühladapter, RG Strip-Röhrchen 72, Qsym, Kat.-Nr. 9018092)

Verbrauchsmaterialien für QIASymphony AS

- Strip Tubes and Caps (Strip-Röhrchen und Deckel), 0,1 ml (Katalog-Nr. 981103)
- Tubes, conical, 2 ml, Qsym AS (Konische Röhrchen, 2 ml, Qsym AS) (Katalog-Nr. 997102) oder Micro tubes 2.0 ml Type I (Mikroröhrchen 2,0 ml vom Typ I) (Sarstedt, Katalog-Nr. 72.694.005)
- Möglicherweise: Tubes, conical, 5 ml, Qsym AS (Konische Röhrchen, 5 ml, Qsym AS) (Katalog-Nr. 997104) oder Tubes with flat base from PP (Schraubröhrchen mit flachem Boden aus PP) (Sarstedt, Katalog-Nr. 60.558.001)
- Filter-Tips (Filterspitzen), 1500 µl (Katalog-Nr. 997024)
- Filter-Tips (Filterspitzen), 200 µl (Katalog-Nr. 990332)
- Filter-Tips (Filterspitzen), 50 µl (Katalog-Nr. 997120)
- Tip disposal bags (Abfallbeutel für Pipettenspitzen) (Katalog-Nr. 9013395)

Lagerung und Handhabung der Proben

| | |
|--------------------|---|
| Probennahme | Blutprobe 5 bis 10 ml EDTA-Blut 8x überkopf mischen — nicht schütteln! Heparinisierte Humanproben dürfen nicht verwendet werden. |
| Probenlagerung | Trennung: 20 Minuten zentrifugieren bei 800 bis 1.600 x g innerhalb von 24 Stunden nach Probenahme Isoliertes Plasma in ein steriles Polypropylen-Röhrchen überführen Die Sensitivität des Assays kann durch routinemäßiges Einfrieren oder durch eine längere Lagerung der Proben verringert werden. |
| Probentransport | Bruchsicher transportieren Lieferung innerhalb von 24 Stunden Postversand entsprechend den gesetzlichen Vorgaben für den Transport von pathogenem Material* Blutproben müssen gekühlt verschickt werden (2 bis 8 °C) |
| Störsubstanzen | Heparin (ab 10 IU/ml) beeinträchtigt die PCR. Proben in Röhrchen mit Heparin als Antikoagulans oder Proben von heparinisierten Patienten dürfen nicht verwendet werden. |
| Probenvorbereitung | Schaumbildung in und auf den Proben vermeiden. Proben vor dem Beginn des Laufs auf Raumtemperatur (15–25 °C) bringen. |

* International Air Transport Association (IATA) (internationaler Luftverkehrsverband). Dangerous Goods Regulations (Regelungen zum Transport gefährlicher Güter).

Verfahren

Vorbereitung der Carrier-RNA und Zugabe der internen Kontrolle zu den Proben

Bei der Verwendung des QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kits zusammen mit dem *artus* EBV QS-RGQ Kit muss die interne Kontrolle (EBV RG IC) im Aufreinigungsverfahren mitgeführt werden, um die Überwachung der Effizienz der Probenvorbereitung und des folgenden Assays zu ermöglichen.

Vergewissern Sie sich bei einem Multi-Assay-Lauf, bei dem im selben PCR-Lauf sowohl EBV als auch auf CMV getestet werden, dass die interne Kontrolle CMV RG IC des *artus* CMV QS-RGQ Kits während der Aufreinigung mitgeführt wird. Verwenden Sie eine CMV RG IC derselben Charge sowohl für die Probenvorbereitung als auch für den Assay-Setup der PCR-Kontrollen. Benutzen Sie keinesfalls eine CMV RG IC mit einer anderen Chargennummer.

Interne Kontrollen müssen zusammen mit der Carrier-RNA (CARRIER)-Puffer AVE (AVE)-Mischung zugegeben werden, wobei das Gesamtvolumen des Gemischs aus interner Kontrolle, Carrier-RNA (CARRIER) und Puffer AVE (AVE) weiterhin 120 µl beträgt.

Die Tabelle gibt die Zugabe von interner Kontrolle zu der Isolation in einem Verhältnis von 0,1 µl pro 1 µl Elutionsvolumen wieder. Wir empfehlen, unmittelbar vor jedem Lauf frische Mischungen herzustellen. Oder aber verwenden Sie das Werkzeug „IC Calculator“ in der QIASymphony Management Console.

| Komponente | Volumen (µl) (Sarstedt-Röhrchen)* | Volumen (µl) (Corning-Röhrchen)† |
|--|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Carrier-RNA-Vorratslösung (CARRIER) | 5 | 5 |
| Interne Kontrolle‡ | 9 | 9 |
| AVE-Puffer | 106 | 106 |
| Endvolumen pro Probe (ohne Totvolumen) | 120 | 120 |
| Gesamtvolumen für n Proben | $(n \times 120) + 360^{\S}$ | $(n \times 120) + 600^{\P}$ |

* 2-ml-Mikro-Schraubröhrchen vom Typ H und Typ I, Sarstedt, Katalog-Nr. 72.693 und 72.694.

† 14-ml-Rundbodenröhrchen, 17 x 100 mm, aus Polystyrol (Corning® Inc., Katalog-Nr. 352051; dieses Röhrchen wurde früher von Becton Dickinson und wird jetzt von Corning Inc. angeboten).

‡ Die Berechnung der Menge der internen Kontrolle basiert auf den ursprünglichen Elutionsvolumen (90 µl). Das zusätzliche Totvolumen hängt von der Art des verwendeten Probenröhrchens ab.

§ Interne Kontrollmischung ausreichend für 3 zusätzliche Proben (d. h. 360 µl) ist erforderlich. Füllen Sie nicht mehr als 1,92 ml Gesamtvolumen ein (entsprechend maximal 13 Proben. Diese Volumen sind spezifisch für 2-ml-Mikro-Schraubröhrchen vom Typ H und Typ I, Sarstedt Katalog-Nr. 72.693 und 72.694).

¶ Interne Kontrollmischung ausreichend für 5 zusätzliche Proben (d. h. 600 µl) ist erforderlich. Füllen Sie nicht mehr als 13,92 ml Gesamtvolumen ein (entsprechend maximal 111 Proben. Diese Volumen sind spezifisch für 14-ml-Rundbodenröhrchen, 17 x 100 mm, aus Polystyrol (Corning Inc., Katalog-Nr. 352051; dieses Röhrchen wurde früher von Becton Dickinson und wird jetzt von Corning Inc. angeboten).

Einrichten des QIA Symphony SP

Schublade „Waste“ (Abfall)

| | |
|---|--|
| Verbrauchsartikel-Containerhalter, Positionen 1–4 | Leere Verbrauchsartikel-Container |
| Halter für Abfallbeutel | Abfallbeutel |
| Halter für Flüssigabfallbehälter | Flüssigabfallbehälter leeren und einsetzen |

Schublade „Eluate“ (Eluat)

| | |
|------------------|--|
| Elutions-Rack | Elutionsröhrchen CL auf Elutionsröhrchen-Rack QS und Träger Stellplatz 1, Kühlposition, verwenden |
| Elutionsvolumen* | Vorausgewähltes Elutionsvolumen: 60 µl Anfängliches Elutionsvolumen: 90 µl |

* Das Elutionsvolumen für das Protokoll ist vorausgewählt. Es handelt sich um das minimal verfügbare Eluatvolumen im abschließenden Elutionsröhrchen. Das anfängliche Volumen der Elutionslösung ist erforderlich, um sicherzustellen, dass das tatsächlich erhaltene Eluatvolumen dem vorausgewählten Volumen entspricht.

Schublade „Reagents and Consumables“ (Reagenzien und Verbrauchsartikel)

| | |
|---|---|
| RC Position 1 und 2 | Laden Sie 1 Reagenzienkartusche (RC) für bis zu 48 Proben oder 2 neue Reagenzienkartuschen (RC) für bis zu 96 Proben |
| Tip-Rack-Halter, Positionen 1–18 | Laden Sie ausreichend Racks mit Einmalfilterspitzen, 200 µl und 1.500 µl (siehe „Erforderliches Plastikzubehör für 1 bis 4 Probenbatches“ auf Seite 7) |
| Verbrauchsartikel-Containerhalterposition, Position 1-4 | Laden Sie Verbrauchsartikel-Container mit Probenvorbereitungskartuschen und 8-Magnetstab-Schutzhülsen (siehe „Erforderliches Plastikzubehör für 1 bis 4 Probenbatches“ auf Seite 7) |

Schublade „Sample“ (Probe)

| | |
|-------------------------------------|---|
| Probentyp | EDTA-Humanplasma |
| Probenvolumen (inkl. Zusatzvolumen) | 1200 µl |
| Probenröhrchen | 2-ml-Mikro-Schraubröhrchen vom Typ H oder Typ I (Sarstedt, Katalog-Nr. 72.693 und 72.694) |
| Einsatz | Röhrcheneinsatz 3B (Katalog-Nr. 9242083) |

Erforderliches Plastikzubehör für 1 bis 4 Probenbatches

| Komponente | ein Batch, 24 Proben* | zwei Batches, 48 Proben* | drei Batches, 72 Proben* | vier Batches, 96 Proben* |
|---|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Einmal-Filterspitzen, 200 µl ^{†‡} | 28 | 52 | 76 | 100 |
| Einmal-Filterspitzen, 1500 µl ^{†‡} | 113 | 206 | 309 | 402 |
| Probenvorbereitungskartuschen [§] | 21 | 42 | 54 | 72 |
| 8-Magnetstab-Schutzhülsen [¶] | 3 | 6 | 9 | 12 |

* Bei mehr als einem Röhrchen mit internen Kontrollen pro Charge oder mehr als einem Inventar-Scan sind zusätzliche Einmalfilterspitzen erforderlich.

[†] Jedes Spitzen-Rack enthält 32 Filterspitzen.

[‡] Bei der Anzahl der erforderlichen Filterspitzen sind die für 1 Inventar-Scan pro Reagenzienkartusche benötigten Filterspitzen mit berücksichtigt.

[§] Ein Verbrauchsartikel-Container enthält 28 Probenvorbereitungskartuschen.

[¶] Ein Verbrauchsartikel-Container enthält zwölf 8-Magnetstab-Schutzhülsen.

Einrichten des QIASymphony AS

Verbrauchsmaterialien

Beim Einrichten werden die passenden Positionen für jeden Verbrauchsartikel auf dem QIASymphony AS Modul auf dem Touchscreen des Geräts angezeigt.

| Verbrauchsmaterial | Name auf Touchscreen | Verwendung mit Adapter/ Reagenzienhalter |
|---|---|---|
| Strip-Röhrchen und Deckel, 0,1 ml (250) | QIA#981103 *StripTubes 0.1 | RG Strip-Röhrchen 72 QS |
| Konische Röhrchen, 2 ml, Qsym AS (500) ^{†‡} | QIA#997102 *T2.0 ScrewSkirt [§] | Reagenzienhalter 1 QS |
| Konische Röhrchen, 5 ml, Qsym AS (500) ^{†‡} | QIA#997104 *T5.0 ScrewSkirt [§] | Reagenzienhalter 1 QS |

* Bezeichnet Labormaterial, das mit einem Kühladapter mit Barcode gekühlt werden kann.

[†] Für Komponenten des Master-Mix, vom System angesetzten Master-Mix, Assay-Standards und Assay-Kontrollen.

[‡] Alternativ können die in „Erforderliche, nicht mitgelieferte Materialien“ auf Seite 2 beschriebenen Röhrchen von Sarstedt verwendet werden.

[§] Der auf dem Touchscreen für das betreffende Röhrchen angezeigte angehängte Buchstabe „(m)“ bedeutet, dass die Flüssigkeitsstandsrechnungen für Reagenzien, die einen konkaven Meniskus ausbilden, optimiert wurden.

Adapter und Reagenzienhalter

| Rack/Reagenzienhalter | Name | Erforderliche Anzahl [¶] |
|-----------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| Reagenzienhalter | Reagenzienhalter 1 QS | 1 |
| Proben-Racks | RG Strip-Röhrchen 72 QS | 1 |

[¶] Für einen Assay-Lauf mit 72 Reaktionen berechnet.

Filterspitzen

Stellen Sie zunächst Tip-Racks in die Tip-Rack-Stellplätze 1, 2 und 3 der Schublade „Eluate and Reagents“ und dann die Tip-Racks in die Tip-Rack-Stellplätze 7, 8 und 9 der Schublade „Assays“.

| Verbrauchsmaterial | Name auf Touchscreen | Minimale Anzahl für 24 Reaktionen | Minimale Anzahl für 72 Reaktionen |
|-------------------------------|-----------------------------|--|--|
| Filterspitzen, 1500 µl (1024) | 1500 µl | 4 | 5 |
| Filterspitzen, 200 µl (1024) | 200 µl | 9 | 8 |
| Filterspitzen, 50 µl (1024) | 50 µl | 25 | 73 |
| Pipettenspitzen-Abfallbeutel | – | 1 | 1 |

PCR auf dem Rotor-Gene Q*Thermocycler

Die Details des Protokolls finden im softwarespezifischen Protokollblatt *Settings to run artus QS-RGQ Kits* unter www.qiagen.com/products/artusebvpcrkitce.aspx.

Spezifische Einstellungen für das *artus* EBV QS-RGQ Kit

Die spezifischen Software-Einstellungen ab Rotor-Gene® Software 2.1 werden nachfolgend aufgeführt.

| | |
|---|---|
| Reaktionsvolumen (µl) | 50 |
| Halten | Haltetemperatur: 95 Grad Haltedauer: 10 Minuten |
| Zyklen | 45 mal 95 Grad für 15 Sekunden 65 Grad für 30 Sekunden (Daten in den Kanälen Grün, Gelb erfassen und Touchdown-Funktion über 10 Zyklen aktivieren) 72 Grad für 20 Sekunden |
| (Einrichtung der automatischen Verstärkungsoptimierung) | 65 Grad (Proben: grün; IC: gelb) |

Multi-Assay-Lauf

Der Messbereich der Fluoreszenzkanäle muss auf die Fluoreszenzintensitäten in den PCR-Röhrchen abgestimmt werden. Klicken Sie im Dialog **New Run Wizard** (Assistent für neuen Lauf) auf **Gain Optimisation** (Verstärkungsoptimierung), um den Dialog **Auto-Gain Optimisation Setup** (Einrichten der automatischen Verstärkungsoptimierung) anzuzeigen (siehe Schritt 6 und Abbildung 7 im Protokollblatt *Settings to run artus QS-RGQ Kits*).

Stellen Sie bei einem einzelnen Lauf die Kalibriertemperatur auf **65** ein, damit diese mit der Annealing-Temperatur des Amplifikationsprogramms übereinstimmt. Stellen Sie für einen Multi-Assay-Lauf, in dem sowohl auf EBV als auch auf CMV im selben PCR-Lauf getestet wird, die Fluoreszenzkanalintensitäten manuell ein.

* Ggf. Rotor-Gene Q 5plex HRM Instrument mit Produktionsdatum ab Januar 2010. Das Herstellungsdatum kann aus der Seriennummer auf der Rückseite des Geräts abgeleitet werden. Die Seriennummer hat das Format „MMJJNNN“, wobei „MM“ für den Produktionsmonat in Ziffern, „JJ“ für die letzten beiden Ziffern des Produktionsjahres und „NNN“ für die eindeutige Instrumentenkennung steht.

1. Klicken Sie auf **Edit** (siehe Abbildung 1), um die Fluoreszenzkanäle zu bearbeiten.

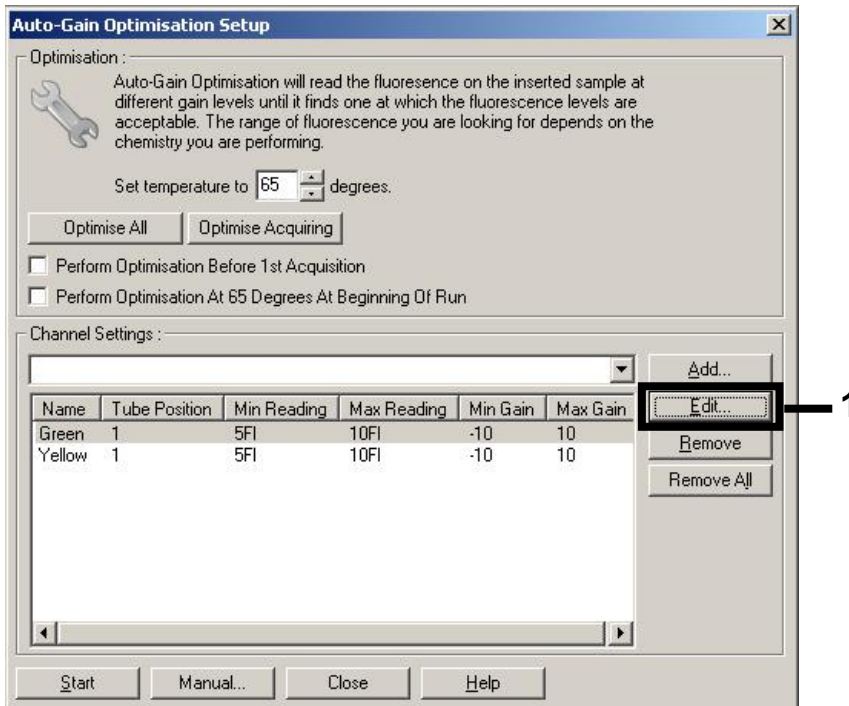


Abbildung 1. Manuelles Einstellen der Fluoreszenzkanalintensitäten. Stellen Sie die Intensität für alle Fluoreszenzkanäle bei unterschiedlichen Röhrenpositionen für verschiedene Assays (CMV und EBV) ein.

2. Legen Sie die Röhrenposition für ein Röhren des ersten *artus* Assays fest (z. B. EBV). Legen Sie die Röhrenposition für alle Fluoreszenzkanäle fest und klicken Sie auf **OK** (siehe Abbildung 2).

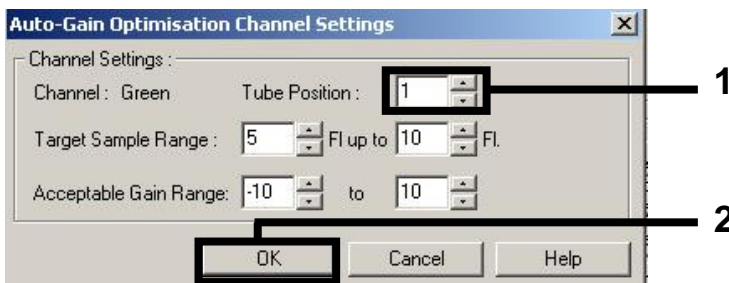


Abbildung 2. Einstellen der Röhrenposition.

3. Klicken Sie auf **Start**, um mit der Optimierung der Verstärkung für den ersten *artus* Assay zu beginnen (siehe Abbildung 3).

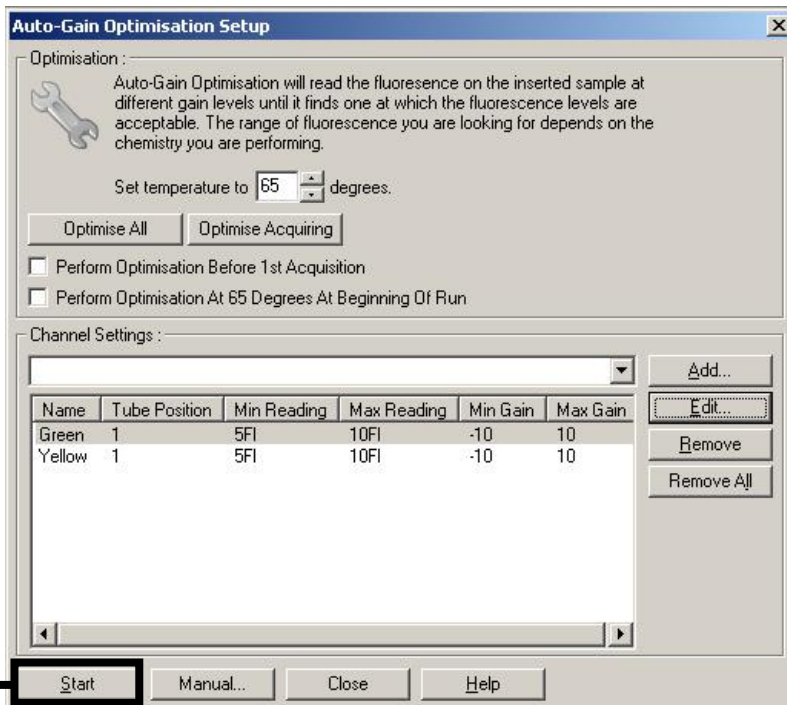


Abbildung 3. Starten der Verstärkungsoptimierung.

4. Ein neues Fenster **Running Auto-Gain Optimisation** (Durchführung der automatischen Verstärkungsoptimierung) wird angezeigt. Warten Sie, bis die Meldung **Completed** (Beendet) in diesem Fenster angezeigt wird (siehe Abbildung 4). Notieren Sie die ausgewählten Werte für beide Kanäle, und klicken Sie auf **Close** (Schließen) (siehe Abbildung 4).

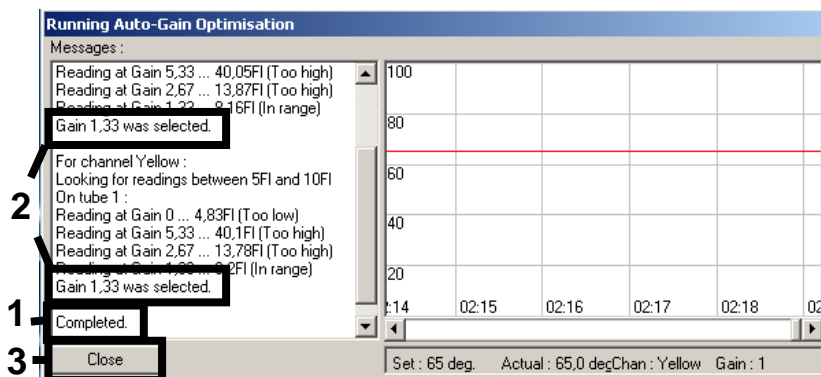


Abbildung 4. Verstärkungsoptimierung beendet. Notieren Sie die Verstärkungswerte (in diesem Fall „1,33“ für beide Fluoreszenzkanäle).

5. Wiederholen Sie die Schritte 1 bis 4 für eine Röhrenchenposition des zweiten *artus* Assay (z. B. CMV).
6. Klicken Sie auf **Edit Gain** (Verstärkung bearbeiten) (siehe Abbildung 5), um die Verstärkungswerte manuell zu bearbeiten.

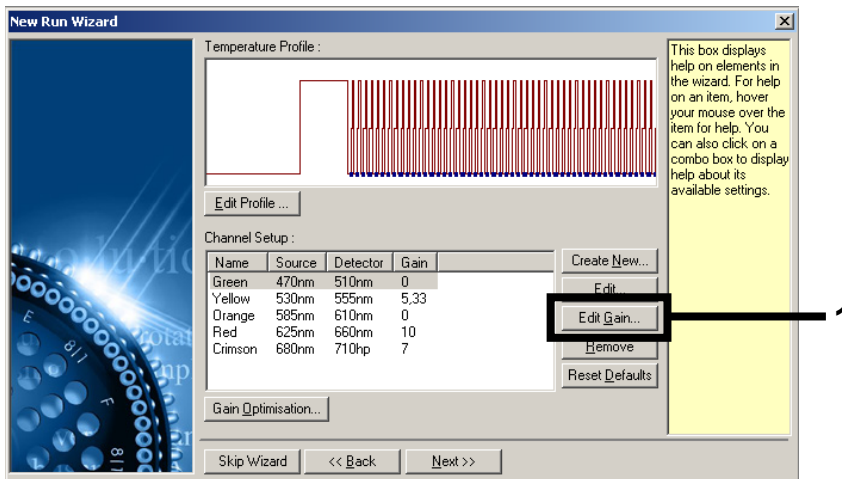


Abbildung 5. Manuelles Bearbeiten der Verstärkungswerte.

7. Wählen Sie den niedrigsten in Schritt 4 notierten Verstärkungswert für Cycling Green aus und geben Sie diesen Wert manuell in das Fenster **Gain for Green** (Grünverstärkung) ein (siehe Abbildung 6). Wählen Sie den niedrigsten in Schritt 4 notierten Verstärkungswert für Cycling Yellow aus und geben Sie diesen Wert manuell in das Fenster **Gain for Yellow** (Gelbverstärkung) ein (siehe Abbildung 6).

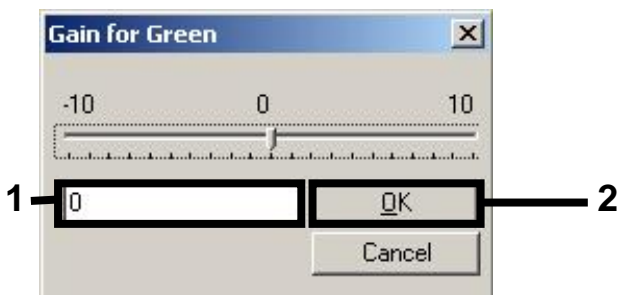


Abbildung 6. Manuelle Eingabe der niedrigsten Verstärkungswerte.

8. Die bei der Kalibrierung der Kanäle ermittelten (oder manuell zugewiesenen) Verstärkungswerte werden automatisch gespeichert und im letzten Menüfenster des Programmierungsprotokolls aufgeführt (siehe Abbildung 7). Klicken Sie auf **Start Run** (Lauf starten).

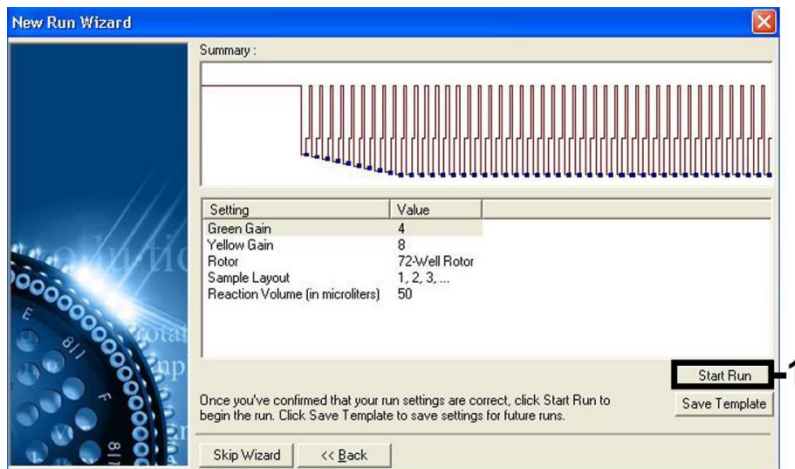


Abbildung 7. Starten des Laufs.

Interpretation der Ergebnisse

Dieser Abschnitt beschreibt eine Interpretation der Ergebnisse auf dem Rotor-Gene Q. Prüfen Sie für eine Analyse des gesamten Arbeitsablaufs von der Probe bis zum Ergebnis auch die Probenstatusinformationen aus den QIAasymphony SP/AS Ergebnisdateien. Nur Proben mit einem gültigen Status dürfen verwendet werden.

Der *artus* EBV QS-RGQ Kit kann auf dem Rotor-Gene Q laufen, wobei eine manuelle Analyse mit der Rotor-Gene Q Software ab 2.1 verwendet wird. Die folgenden Abschnitte beschreiben eine Interpretation der Ergebnisse mit der Rotor-Gene Software ab Version 2.1.

Signalnachweis und Schlussfolgerungen – Plasma

| Signal im Kanal Cycling Green | Signal im Kanal Cycling Yellow | Quantitatives Ergebnis (Kopien/ml) | Interpretation |
|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|---|
| Ja | Ja | < 157 | Gültiges Ergebnis: EBV-DNA nachgewiesen, < 157 Kopien/ml. Quantifizierung nicht möglich, da das quantitative Ergebnis unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Reproduzierbarkeit des positiven Ergebnisses ist nicht gesichert. |
| Ja | Ja | ≥ 157 und < 631 | Gültiges Ergebnis: EBV-DNA nachgewiesen, < 631 Kopien/ml. Quantifizierung nicht möglich, da das quantitative Ergebnis unterhalb des linearen Bereichs des Assays liegt. |
| Ja | Ja/Nein** | ≥ 631 und ≤ 1 × 10 ⁷ | Gültiges Ergebnis: EBV-DNA nachgewiesen, Konzentration wurde berechnet. Quantitatives Ergebnis liegt im linearen Bereich des Assays. |
| Ja | Ja/Nein** | > 1 × 10 ⁷ | Gültiges Ergebnis: EBV-DNA nachgewiesen, > 1 × 10 ⁷ Kopien/ml. Quantifizierung nicht möglich, da das quantitative Ergebnis oberhalb des linearen Bereichs des Assays liegt.* |
| Nein | Ja | – | Gültiges Ergebnis: Keine nachweisbare EBV-DNA.† |
| Nein | Nein | – | Ungültiges Ergebnis: Es ist kein Ergebnis möglich.‡ |

* Wenn eine Quantifizierung erwünscht ist, verdünnen Sie die Probe mit EBV-freiem Plasma und verarbeiten Sie diese erneut. Multiplizieren Sie das quantitative Ergebnis der erneut verarbeiteten Probe mit dem Verdünnungsfaktor.

† Wenn bei einer negativen Probe der C_T-Wert für die interne Kontrolle mehr als 3 Zyklen über dem C_T-Wert für die interne Kontrolle der Kontrolle ohne Template bei diesem Lauf liegt (C_T IC_{Sample} – C_T IC_{NTC} > 3), sollte diese Probe als ungültig behandelt werden. Es ist kein Ergebnis möglich.

‡ Informationen über Fehlerquellen und ihre Behebung finden Sie in der „Troubleshooting guide“ (Hilfe zur Fehlersuche) des artus EBV QS-RGQ Kit Handbuchs.

** In diesem Fall ist die Detektion eines Signals im Kanal Cycling Yellow unmaßgeblich, da eine hohe Ausgangskonzentration von EBV-DNA (positives Signal im Kanal Cycling Green) zu einem abgeschwächten oder ausbleibenden Fluoreszenzsignal der internen Kontrolle im Kanal Cycling Yellow führen kann (kompetitive Interferenz).

Einrichten eines Schwellenwertes für die PCR-Analyse

Die optimalen Einstellungen für einen Schwellenwert bei einer gegebenen Kombination aus Rotor-Gene Q Thermocycler und *artus* QS-RGQ Kit sollten empirisch durch Testen jeder einzelnen Kombination ermittelt werden, da es sich um einen relativen Wert handelt, der vom diagnostischen Arbeitsablauf insgesamt abhängt. Der Schwellenwert kann auf einen vorläufigen Wert von 0,04 bei der Analyse des ersten PCR-Laufs eingestellt werden, aber dieser Wert sollte in einer vergleichenden Analyse der nächsten Läufe des Arbeitsablaufes feinjustiert werden. Der Schwellenwert sollte manuell auf einen Wert gerade oberhalb des Hintergrundsignals der Negativkontrollen und der negativen Proben eingestellt werden. Der aus diesen Experimenten berechnete mittlere Schwellenwert kann sehr wahrscheinlich für die Mehrzahl zukünftiger Läufe verwendet werden; dennoch sollte der Anwender den gewonnenen Schwellenwert in regelmäßigen Zeitabständen überprüfen. Der Schwellenwert liegt üblicherweise im Bereich von 0,03–0,05 und sollte nach Rundung nicht mehr als drei Dezimalstellen aufweisen.

Quantifizierung

Die Quantifizierungsstandards (EBV QS 1–4) des *artus* EBV QS-RGQ Kits werden wie aufgereinigte Proben behandelt und im gleichen Volumen eingesetzt (20 µl). Um eine Standardkurve auf dem Rotor-Gene Q zu erstellen, setzen Sie bitte alle 4 Quantifizierungsstandards ein und definieren Sie diese im Dialogfeld **Edit Samples** (Proben bearbeiten) des Rotor-Gene Q als Standards mit den angegebenen Konzentrationen (siehe Gerätehandbuch).

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

$$\text{Ergebnis im Probenmaterial (Kopien/ml)} = \frac{\text{Ergebnis im Eluat (Kopien/}\mu\text{l)} \times \text{anfängliches Elutionsvolumen (90 }\mu\text{l)}^*}{\text{Probenvolumen (ml)}}$$

Es sollte grundsätzlich das anfängliche Probenvolumen in die oben stehende Gleichung eingesetzt werden. Darauf ist zu achten, wenn das Probenvolumen vor der Nukleinsäure-Aufreinigung verändert wurde (z. B. Volumenreduktion durch Zentrifugieren oder Volumenerhöhung durch Auffüllen auf das zur Isolierung erforderliche Volumen).

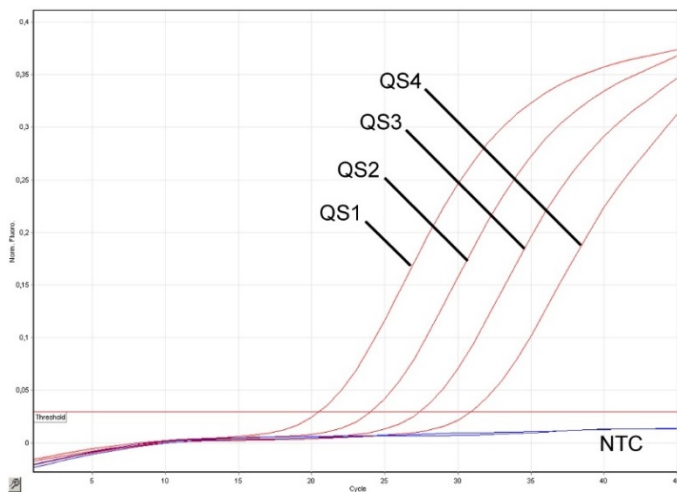
Stellen Sie bei einem Multi-Assay-Lauf, bei dem sowohl auf CMV als auch auf EBV im gleichen PCR-Lauf getestet werden soll, sicher, dass die Proben unter Verwendung der entsprechenden Quantifizierungsstandards – separat für CMV und EBV – analysiert werden.

* Die Berechnung beruht auf dem anfänglichen Elutionsvolumen (90 µl).

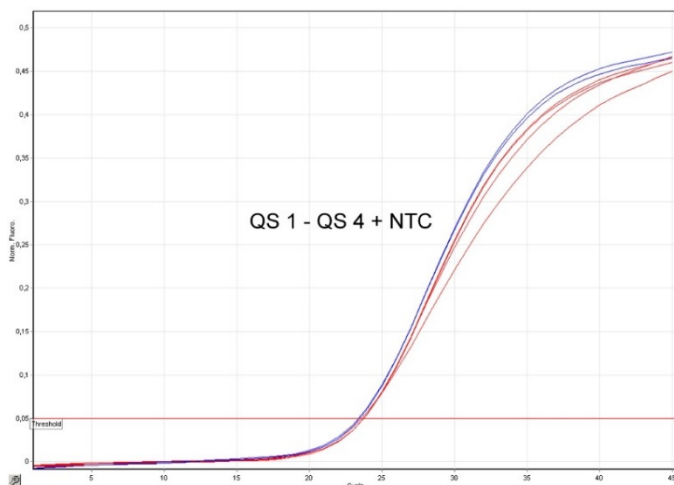
Umrechnungsfaktor

1 Kopie/ml entspricht 0,142 IU/ml beim Nachweis von EBV-DNA aus humanem EDTA-Plasma mit dem Rotor-Gene Q. Dieser Umrechnungsfaktor gilt, wenn der auf diesem Applikationsblatt beschriebene Arbeitsablauf eingehalten wird. Der Umrechnungsfaktor ist ein ungefährer Mittelwert des gesamten dynamischen Bereichs des Assays.

Beispiele positiver und negativer PCR-Reaktionen



Nachweis der Quantifizierungsstandards (EBV QS 1-4) im Fluoreszenzkanal Cycling Green.
NTC: Kontrolle ohne Template (Negativkontrolle).



Nachweis der internen Kontrolle (IC) im Fluoreszenzkanal Cycling Yellow bei gleichzeitiger Amplifikation der Quantifizierungsstandards (EBV QS 1-4). NTC: Kontrolle ohne Template (Negativkontrolle).

Bearbeitungshistorie des Dokuments

September 2017 Zusätzliche Informationen zum Umrechnungsfaktor (Kopien zu IU/ml). Die Fußnote, dass bis zu 216 Assays in einem AS-Lauf eingerichtet werden können, wurde entfernt. Erforderliche Materialien wurden geändert. Jetzt werden nur noch Materialien genannt, die für die Einrichtung eines integrierten Laufs mit maximal 72 Reaktionen auf QS-SP/AS erforderlich sind. Ausführlichere Informationen zur Verwendung von Materialien für Multi-Assay-Läufe mit EBV (Verwendung von CMV-IC) wurden hinzugefügt. Im Abschnitt „Verfahren“ wurden Informationen zur Verwendung der QIASymphony Management Console Software für Carrier-RNA und zur Vorbereitung von internen Kontrollen hinzugefügt. Laborgeräte-Hersteller wurde von BD auf Corning geändert. Die Einstellungen für RGQ-Läufe wurden besser beschrieben (Verwendung der Touchdown-Funktion, Erfassungen). Es wurden Informationen zur Interpretation der Ergebnisse hinzugefügt, insbesondere den Fall „pathogen-positiv und IC-negativ“. Anweisungen zum Rotor-Gene AssayManager wurden entfernt. Die quantitativen Ergebnismesswerte wurden laut der aktualisierten Grenzwerte des linearen Bereichs geändert. Der Unterschied zwischen Eluat- und Probenkonzentration in der quantitativen Berechnung wurde deutlicher gemacht. Die Aufzählung unter „Aufreinigung im Vorfeld“ wurde angepasst. Aktualisierte QIASymphony Protokollversion: Erhöhung der Versionsnummer des „Assay-Parameter-Sets“ von V4 auf V5 und des „Standard-Assay-Kontroll-Sets“ von V6 auf V7.

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

Warenzeichen: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, artus®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); BD™ (Becton, Dickinson and Company); Corning® (Corning Inc.); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.). Bei registrierten Namen, Marken usw., die in diesem Dokument genannt werden, ist nicht davon auszugehen, dass sie gesetzlich nicht geschützt sind, auch wenn sie nicht ausdrücklich als registrierter Name bzw. registrierte Marke gekennzeichnet sind. 09/2017 HB-0357-S02-002
© 2012–2017 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten

Bestellungen www.qiagen.com/shop | Technischer Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com