

# artus<sup>®</sup> HBV RG PCR Kit Handbuch

 24 (Katalognr. 4506263)

 96 (Katalognr. 4506265)

Version 1



Quantitative In-vitro-Diagnostik

Zur Verwendung mit den Rotor-Gene<sup>®</sup> Q Thermocyclern



4506263, 4506265



1046920DE



QIAGEN GmbH, QIAGEN Straße 1, D-40724 Hilden

R4

MAT

1046920DE



## **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](http://www.qiagen.com).



# Inhaltsverzeichnis

<b>Kit-Inhalt</b>	<b>6</b>
<b>Symbole</b>	<b>6</b>
<b>Lagerung</b>	<b>7</b>
<b>Vorgesehener Verwendungszweck</b>	<b>7</b>
<b>Anwendungseinschränkungen</b>	<b>7</b>
<b>Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen</b>	<b>8</b>
<b>Qualitätskontrolle</b>	<b>8</b>
<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
Prinzip	9
Informationen zu den Erregern	9
Leistungsmerkmale	10
<b>Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien</b>	<b>19</b>
<b>Wichtige Hinweise</b>	<b>20</b>
Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	20
Probennahme, Lagerung und Transport	20
DNA-Isolierung	22
Interne Kontrolle	22
Einstellen des Schwellenwerts für die PCR-Analyse	23
Quantifizierung	23
<b>Protokoll: PCR und Auswertung</b>	<b>25</b>
<b>Hilfe zur Fehlersuche</b>	<b>35</b>
<b>Literatur</b>	<b>38</b>
<b>Bestellinformationen</b>	<b>39</b>







## Kit-Inhalt









<b>artus HBV RG PCR Kit</b>			<b>(24)</b>	<b>(96)</b>
<b>Katalognr.</b>			<b>4506263</b>	<b>4506265</b>
<b>Anzahl der Reaktionen</b>			<b>24</b>	<b>96</b>
Blau	HBV RG/TM Master		2 x 12 Reaktionen	8 x 12 Reaktionen
Rot	HBV RG/TM QS 1* (1 x 10 <sup>5</sup> IU/μl)	<b>QS</b>	200 μl	200 μl
Rot	HBV RG/TM QS 2* (1 x 10 <sup>4</sup> IU/μl)	<b>QS</b>	200 μl	200 μl
Rot	HBV RG/TM QS 3* (1 x 10 <sup>3</sup> IU/μl)	<b>QS</b>	200 μl	200 μl
Rot	HBV RG/TM QS 4* (1 x 10 <sup>2</sup> IU/μl)	<b>QS</b>	200 μl	200 μl
Rot	HBV RG/TM QS 5* (1 x 10 <sup>1</sup> IU/μl)	<b>QS</b>	200 μl	200 μl
Grün	HBV RG/TM IC <sup>†</sup>	<b>IC</b>	1.000 μl	2 x 1.000 μl
Weiß	Wasser (PCR-Qualität)		1.000 μl	1.000 μl
	Handbuch		1	1

\* Quantifizierungsstandard.

† Interne Kontrolle.

## Symbole

 <N>	Inhalt ausreichend für <N> Assays
	Verfallsdatum
	In-vitro-Diagnostikum
	Katalognummer
	Chargennummer
	Materialnummer

	Komponenten
	Enthält
	Anzahl
	Internationale Artikelnummer
	Zulässiger Temperaturbereich
	Hersteller
	Beachten Sie die Anwendungshinweise
	Wichtiger Hinweis

## Lagerung

Die Komponenten des *artus* HBV RG 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 werden kann. Bei unregelmäßigem Gebrauch sollten deshalb die Reagenzien aliquotiert werden. Die Reagenzien sollten nicht länger als 5 Stunden bei 2 bis 8 °C gelagert werden.

## Vorgesehener Verwendungszweck

Der *artus* HBV RG PCR Kit ist ein In-vitro-Test zur Quantifizierung der DNA des Hepatitis-B-Virus (HBV) in Humanplasma mittels Nukleinsäure-Amplifikation. Dieser diagnostische Testkit verwendet die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und wurde für die Verwendung mit den Rotor-Gene Q Thermocyclern konfiguriert.

## Anwendungseinschränkungen

Alle Reagenzien dürfen ausschließlich zur In-vitro-Diagnostik verwendet werden.

Die Anwendung des Produkts muss durch Personal erfolgen, das speziell in Verfahren unterrichtet und ausgebildet wurde, die unter Verwendung von In-vitro-Diagnostika durchgeführt werden.

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.

## **Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen**

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](http://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.

## **Qualitätskontrolle**

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagementsystem von QIAGEN wird jede Charge des *artus* HBV RG PCR Kits nach festgelegten Prüfkriterien getestet, um eine einheitliche Produktqualität sicherzustellen.

## Einleitung

Der *artus* HBV RG PCR Kit ist ein gebrauchsfertiges System für den Nachweis von HBV-DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf den RotorGene Q Thermocyclern. Der HBV RG/TM Master enthält die Reagenzien und Enzyme zur spezifischen Amplifikation eines 134 bp langen Abschnitts des HBV-Genoms sowie für den direkten Nachweis dieses Amplifikats im Fluoreszenzkanal Cycling Green des Rotor-Gene Q oder des Rotor-Gene 6000 oder im Cycling A.FAM™ des Rotor-Gene 3000.

Daneben enthält der *artus* HBV PG PCR Kit zum Nachweis einer möglichen PCR-Inhibition ein zweites heterologes Amplifikationssystem. Diese wird als interne Kontrolle (IC) im Fluoreszenzkanal Cycling Yellow des RotorGene Q oder Rotor-Gene 6000 oder im A.JOE™ des Rotor-Gene 3000 nachgewiesen. Dabei wird die Nachweisgrenze der analytischen HBV-PCR (siehe „Analytische Sensitivität“ auf Seite 10) nicht beeinträchtigt. Externe Positivkontrollen (HBV RG/TM QS 1 - 5) werden mitgeliefert, mit denen die Menge der viralen DNA bestimmt werden kann. Lesen Sie hierzu bitte den Abschnitt „Quantifizierung“ auf Seite 23.

## Prinzip

Beim Nachweis von Pathogenen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden spezifische Bereiche aus dem Genom des Pathogens 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 Amplifikat binden. Die Beobachtung des Verlaufs der Fluoreszenzintensität während der PCR (in Echtzeit, daher „Real-Time-PCR“) ermöglicht den Nachweis und die quantitative Bestimmung des sich anreichernden Produkts, ohne die Probenröhrchen nach der PCR wieder öffnen zu müssen.\*

## Informationen zu den Erregern

Das Hepatitis-B-Virus (HBV) wird vorwiegend über Blut und Blutprodukte übertragen. Sexuell, oral oder perinatal erworbene Infektionen sind jedoch ebenfalls möglich. Nach einem allgemeinen Krankheitsgefühl mit Appetitlosigkeit, Erbrechen und abdominellen Beschwerden kommt es bei etwa 10 bis 20 % der Patienten zu Fieber, Exanthenen (Hautausschlag) sowie rheumaähnlichen Muskel- und Gelenksbeschwerden. 2 bis 14 Tage später entwickelt sich ein Ikterus (Gelbsucht), der mit Juckreiz verbunden sein kann. Eine fulminante akute Hepatitis tritt bei etwa 1 % der infizierten Patienten auf und endet häufig tödlich. Bei 5 bis 10 % der Hepatitis-B-Patienten kommt es zu einer chronischen Leberentzündung, die zur Entwicklung einer Leberzirrhose und zu einem Leberkarzinom führen kann.

\* Mackay, I.M. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory, Clin. Microbiol. Infect. **10**, 190.



## Leistungsmerkmale

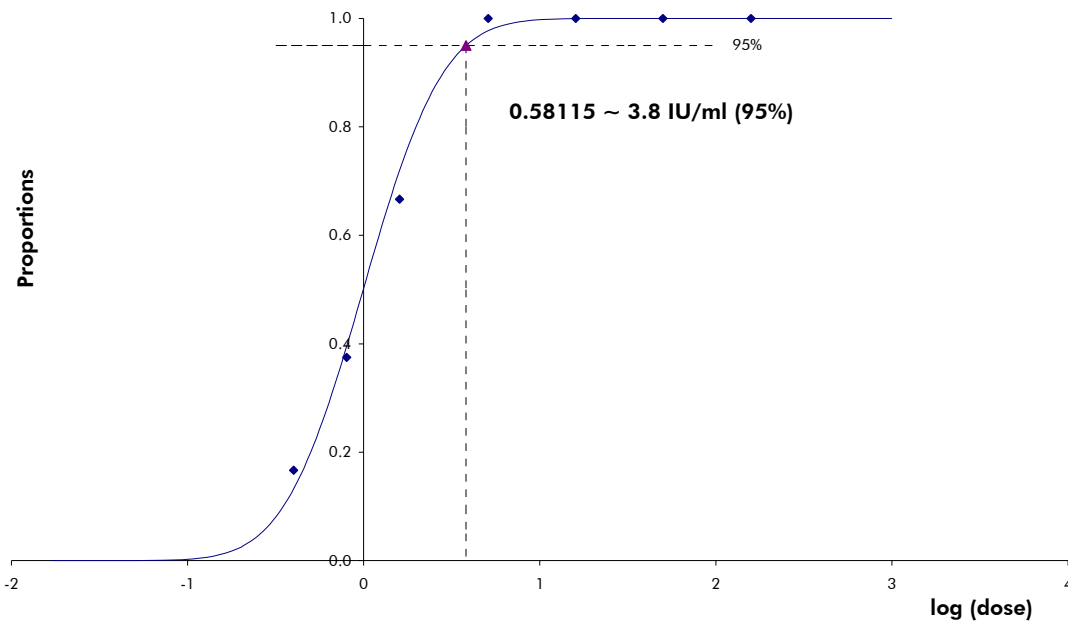
### Analytische Sensitivität

Für die Validierung des *artus* HBV PG PCR Kits wurde sowohl die analytische Nachweisgrenze als auch die analytische Nachweisgrenze unter Berücksichtigung der Aufreinigung (Sensitivitätsgrenzen) bestimmt. Die analytische Nachweisgrenze unter Berücksichtigung der Aufreinigung wurde anhand HBV-positiver klinischer Proben und unter Berücksichtigung des verwendeten Aufreinigungsverfahrens bestimmt. Die analytische Nachweisgrenze wurde hingegen ohne klinische Proben und unabhängig von dem Aufreinigungsverfahren anhand eines Standards bekannter Konzentration bestimmt.

Zum Bestimmen der analytischen Sensitivität des *artus* HBV RG PCR Kits wurde eine Verdünnungsreihe von 10 bis nominal 0,0003 HBV IU/ $\mu$ l angesetzt und mit dem *artus* HBV RG PCR Kit auf Rotor-Gene Thermocyclern analysiert. Die Untersuchungen wurden an drei verschiedenen Tagen in Form von Achtfach-Bestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mittels Probit-Analyse bestimmt. Die analytische Nachweisgrenze des *artus* HBV RG PCR Kits in Kombination mit dem Rotor-Gene 3000 Thermocycler beträgt 0,02 IU/ $\mu$ l ( $p = 0,05$ ). Dies bedeutet, dass 0,02 IU/ $\mu$ l mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % nachgewiesen werden können.

Die Gleichwertigkeit der Thermocycler Rotor-Gene 3000 und Rotor-Gene Q/6000 wurde auf der Basis der technischen Daten, bestätigt durch einen Vergleich der Analyseleistung, gezeigt. Auf beiden Systemen wurden parallel Probit-Analysen durchgeführt. Die analytische Nachweisgrenze auf dem Rotor-Gene Q/6000 liegt innerhalb des Vertrauensbereichs des RotorGene 3000. Folglich kann das *artus* HBV RG PCR Kit zum Nachweis von HBV-DNA mit ähnlicher Sensitivität auf dem Rotor-Gene Q/6000 Thermocycler eingesetzt werden.

Die analytische Sensitivität unter Berücksichtigung der Aufreinigung (QIAamp<sup>®</sup> DSP Virus Kit) des *artus* HBV PG PCR Kits wurde mit einer Verdünnungsreihe des „WHO 1st International HBV DNA Standard“ von 158 bis nominal 0,4 HBV IU/ml in klinischen Plasmaproben bestimmt. Diese wurden einer DNA-Aufreinigung mit dem QIAamp DSP Virus Kit unterzogen (Extraktionsvolumen: 0,5 ml, Elutionsvolumen: 26  $\mu$ l). Jede der sieben Verdünnungen wurde an drei verschiedenen Tagen in Form von Achtfach-Bestimmungen mit dem *artus* HBV PG PCR Kit analysiert. Die Ergebnisse wurden mittels Probit-Analyse bestimmt. Abbildung 1 zeigt eine grafische Darstellung der Probit-Analyse. Demzufolge liegt für den *artus* HBV RG PCR Kit in Kombination mit dem Rotor-Gene 3000 Thermocycler die analytische Nachweisgrenze unter Berücksichtigung der Aufreinigung bei 3,8 IU/ml ( $p = 0,05$ ). Dies bedeutet, dass 3,8 IU/ml mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % nachgewiesen werden können.



**Abbildung 1. Probit-Analyse: HBV (Rotor-Gene 3000).** Analytische Sensitivität unter Berücksichtigung der Aufreinigung (QIAamp DSP Virus Kit, QIAGEN) des *artus* HBV RG PCR Kits auf dem Rotor-Gene 3000 Thermocycler.

## Spezifität

Die Spezifität des *artus* HBV RG 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 Genotypen wurde sowohl durch ein Datenbank-Alignment als auch durch eine PCR auf den Rotor-Gene Thermocyclern mit den folgenden Genotypen (siehe Tabelle 1) sichergestellt.

**Tabelle 1. Spezifitätstest relevanter Genotypen**

<b>Virus</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Quelle</b>	<b>HBV (Cycling Green oder A.FAM)</b>	<b>Interne Kontrolle (Cycling Yellow oder A. JOE)</b>
HBV	A (USA)	Teragenix*	+	+
HBV	B (Indonesien)	Teragenix	+	+
HBV	C (Indonesien)	Teragenix	+	+
HBV	C (Venezuela)	Teragenix	+	+
HBV	D (USA)	Teragenix	+	+
HBV	E (Elfenbeinküste)	Teragenix	+	+
HBV	F (Venezuela)	Teragenix	+	+
HBV	G (USA)	Teragenix	+	+
HBV	H (Nicaragua)	Teragenix	+	+

\* Teragenix Corporation, Florida, USA

Für weitere Spezifitätstests wurden HBV-Stämme herangezogen, für die im Genombereich der Pre-Core-Region Sequenzunterschiede bekannt sind (HBV Pre-Core Mutant Panel, Teragenix, Florida, USA). Alle neun Pre-Core-Mutantenstämme des Panels konnten mit dem *artus* HBV RG PCR Kit nachgewiesen werden.

Die Validierung der Spezifität erfolgte zudem an 100 verschiedenen HBV-negativen Plasmaproben. Bei diesen wurde mit den im HBV RG/TM Master enthaltenen HBV-spezifischen Primern und Sonden kein Signal erzeugt.

Für die Überprüfung einer potentiellen Kreuzreaktivität des *artus* HBV RG PCR Kits wurde die in Tabelle 2 aufgeführte Gruppe von Kontrollen untersucht (Seite 13). Bei keinem der getesteten Erreger trat eine Reaktion auf. Bei Mischinfektionen traten keine Kreuzreaktivitäten auf.

### **Linearer Bereich der Quantifizierung**

Der lineare Bereich der Quantifizierung (analytische Messung) des *artus* HBV RG PCR Kits wurde durch die Analyse einer Verdünnungsreihe von HBV-Quantifizierungsstandards über einen Konzentrationsbereich von  $1 \times 10^8$  IU/ $\mu$ l bis  $1 \times 10^{-2}$  IU/ $\mu$ l bestimmt. Die Verdünnungsreihe wurde zuvor gegen den „WHO 1st International HBV DNA Standard“ kalibriert.

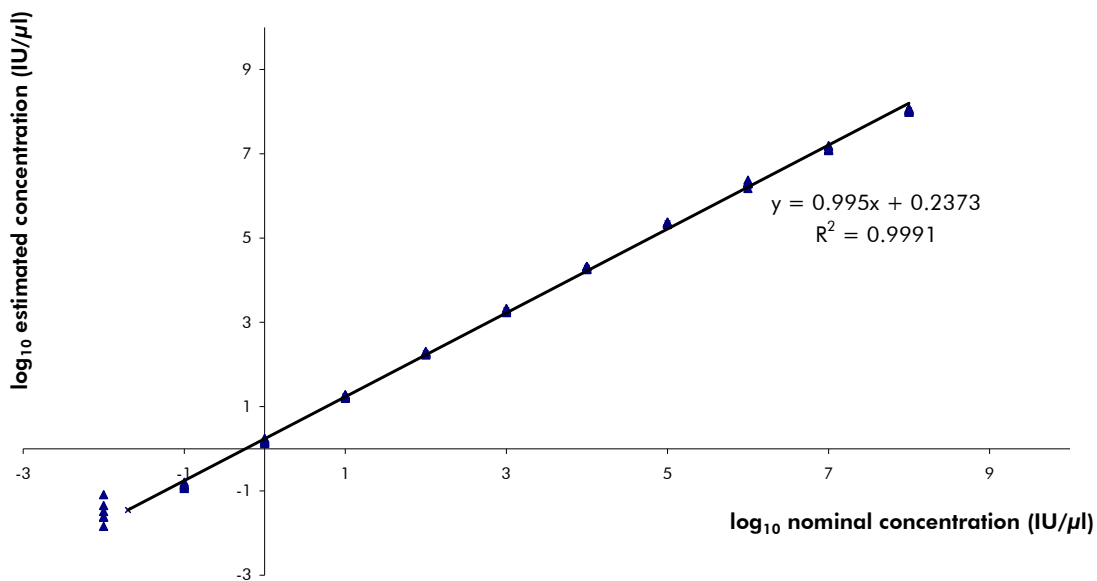
Jede Verdünnungsstufe wurde in Replikaten ( $n = 8$  für Konzentrationen  $\geq 1 \times 10^0$  IU/ $\mu$ l;  $n = 16$  für Konzentrationen  $< 1 \times 10^0$  IU/ $\mu$ l) mit dem artus HBV RG PCR Kit auf Rotor-Gene Thermocyclern getestet.

**Tabelle 2. Spezifitätstest des Kits mit potenziell kreuzreaktiven Pathogenen**

<b>Kontrollgruppe</b>	<b>HBV (Cycling Green oder Cycling A.FAM)</b>	<b>Interne Kontrolle (Cycling Yellow oder Cycling A. JOE))</b>
Humanes Herpesvirus 1 (Herpes-simplex-Virus 1)	–	+
Humanes Herpesvirus 2 (Herpes-simplex-Virus 2)	–	+
Humanes Herpesvirus 3 (Varicella-Zoster-Virus)	–	+
Humanes Herpesvirus 4 (Epstein-Barr-Virus)	–	+
Humanes Herpesvirus 5 (Zytomegalievirus)	–	+
Humanes Herpesvirus 6	–	+
Humanes Immundefizienz-Virus 1	–	+
Hepatitis-A-Virus	–	+
Hepatitis-C-Virus	–	+
Parvovirus B19	–	+
Gelbfiebervirus	–	+
Humanes T-lymphotropes Virus Typ 1 und Typ 2	–	+
Coxsackievirus B3	–	+
Denguevirus 1–4	–	+
<i>Escherichia coli</i>	–	+

Der lineare Bereich der Quantifizierung des *artus* HBV RG PCR Kits erstreckt sich demnach über Konzentrationen von 0,02 IU/ $\mu$ l bis mindestens 1 x 10<sup>8</sup> IU/ $\mu$ l (Abbildung 2).

Unter der Annahme, dass der QIAamp DSP Virus Kit für die DNA-Aufreinigung benutzt wird, kann der *artus* HBV RG PCR Kit einen linearen Bereich der Quantifizierung von 1,1 IU/ml bis mindestens 4 x 10<sup>9</sup> IU/ml abdecken.



**Abbildung 2.** Linearer Bereich des *artus* HBV RG PCR Kits. Berechnung des linearen Bereichs der Quantifizierung: Die Gerade wurde ermittelt durch eine lineare Regression der log<sub>10</sub>-Werte der berechneten Konzentrationen mit den log<sub>10</sub>-Werten der nominellen Konzentrationen. Die Gleichung der Regressionsgeraden ist in der Abbildung angegeben.

## Präzision

Die Präzisionsdaten für den *artus* HBV RG PCR Kit erlauben eine 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). Aus den erhaltenen Daten wurden jeweils die Standardabweichung, die Varianz und der Variationskoeffizient sowohl für die erregerspezifische PCR als auch für die PCR der internen Kontrolle berechnet.

Präzisionsdaten des *artus* HBV RG PCR Kits anhand des Quantifizierungsstandards mit der geringsten Konzentration (QS 5; 10 IU/ $\mu$ l) ermittelt. Die Untersuchungen wurden in Form von Achtfach-Bestimmungen

durchgeführt. Die Ergebnisse für die Präzision wurden anhand der  $C_T$ -Werte der Amplifikationskurven berechnet ( $C_T$ : threshold cycle, siehe Tabelle 3 auf Seite 15) vorgenommen. Zusätzlich wurde auch die Präzision der quantitativen Werte in IU/ $\mu$ l mittels der entsprechenden  $C_T$ -Werte ermittelt (Tabelle 4). Demnach beträgt die Gesamtstreuung einer beliebigen Probe der genannten Konzentration 1,29 % ( $C_T$ ) bzw. 8,99 % (Konzentration) und für den Nachweis der internen Kontrolle 1,87 % ( $C_T$ ). Diese Werte basieren auf der Gesamtheit aller Einzelwerte der ermittelten Variabilitäten.

**Tabelle 3. Präzision auf Grundlage der  $C_T$ -Werte**

	<b>Standardabweichung</b>	<b>Varianz</b>	<b>Variationskoeffizient (%)</b>
Intra-Assay-Variabilität: HBV RG/TM QS 5	0,09	0,01	0,32
Intra-Assay-Variabilität: Interne Kontrolle	0,10	0,01	1,06
Inter-Assay-Variabilität: HBV RG/TM QS 5	0,14	0,02	0,49
Inter-Assay-Variabilität: Interne Kontrolle	0,29	0,08	1,00
Chargenvariabilität: HBV RG/TM QS 5	0,38	0,15	1,39
Chargenvariabilität: Interne Kontrolle	0,62	0,39	2,23
Totalvarianz: HBV RG/TM QS 5	0,36	0,13	1,29
Totalvarianz: Interne Kontrolle	0,52	0,27	1,87

**Tabelle 4. Ergebnisse der Präzision auf Grundlage der quantitativen Werte (in IU/ $\mu$ l)**

	Standardabweichung	Varianz	Variationskoeffizient (%)
Intra-Assay-Variabilität: HBV RG/TM QS 5	0,93	0,87	9,28
Inter-Assay-Variabilität: HBV RG/TM QS 5	0,79	0,63	7,92
Chargenvariabilität: HBV RG/TM QS 5	1,03	1,05	10,21
Totalvarianz: HBV RG/TM QS 5	0,90	0,81	8,99

### Robustheit

Die Überprüfung der Robustheit dient der Ermittlung der Gesamtausfallrate des *artus* HBV RG PCR Kits. Hierzu wurden 100 HBV-negative Plasmaproben mit je 0,05 IU/ $\mu$ l Elutionsvolumen HBV-Kontroll-DNA (ca. dreifache Konzentration der analytischen Sensitivitätsgrenze) dotiert. Nach der Aufreinigung mit dem QIAamp DSP Virus Kit (siehe „DNA-Isolierung“ auf Seite 22) wurden diese Proben mit dem *artus* HBV RG PCR Kit analysiert. Die Ausfallrate für HBV betrug für die Gesamtheit der Proben 0 %. Die Robustheit der internen Kontrolle wurde zusätzlich durch die Aufreinigung und Analyse von 100 HBV-negativen Plasmaproben überprüft. Die Gesamtausfallrate betrug 0 %. Eine Inhibition wurde nicht festgestellt. Damit beträgt die Robustheit des *artus* HBV RG PCR Kits  $\geq 99$  %.

### Reproduzierbarkeit

Die Daten zur Reproduzierbarkeit erlauben eine regelmäßige Leistungsbewertung des *artus* HBV RG PCR Kits sowie einen Effizienzvergleich mit anderen Produkten. Diese Daten werden durch die Teilnahme an etablierten Ringversuchsprogrammen erhoben.

### Diagnostische Bewertung

Bei einer Studie in zwei unabhängigen Labors wurde das *artus* HBV RG PCR Kit mit dem COBAS® TaqMan® HBV Assay verglichen. Dabei wurden 287 retrospektive und prospektive Plasmaproben untersucht.

Die HBV-DNA zum Testen des *artus* HBV RG PCR Kits wurde mit dem QIAamp DSP Virus Kit isoliert, und die Analyse wurde auf dem Rotor-Gene 3000 Thermocycler durchgeführt. Für Vergleichstests mit dem COBAS TaqMan HBV Assay wurde HBV-DNA nach den Herstelleranweisungen auf der Packungsbeilage isoliert. Die mit dem *artus* HBV RG PCR Kit erzielten Ergebnisse wurden mit denen des COBAS TaqMan HBV Assays verglichen.

Die Ergebnisse des COBAS TaqMan HBV Assay als Referenz vorausgesetzt ergibt sich für die Gesamtheit der untersuchten Plasmaproben somit eine diagnostische Sensitivität des *artus* HBV RG PCR Kits von 100 % und eine diagnostische Spezifität von 97 %. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 5 gezeigt.

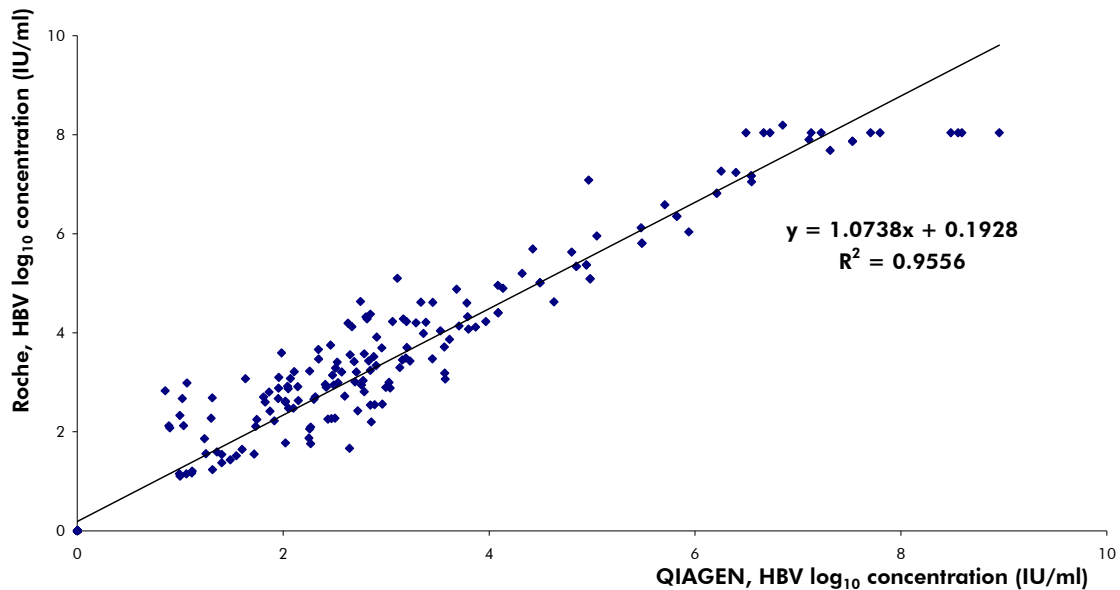
**Tabelle 5. Ergebnisse der vergleichenden Validierungsstudie**

		COBAS TaqMan HBV Assay		
		+	-	Gesamt
<b><i>artus</i> HBV RG PCR Kit</b>	+	186	3	189
	-	0	98	98

Weitere Tests der drei unvereinbaren Proben bestätigten die Ergebnisse des *artus* HBV RG PCR Kits. Folglich kann angenommen werden, dass die Diskrepanz auf einer höheren Sensitivität des *artus* HBV RG PCR Kits beruht.

Die Korrelation der quantitativen Ergebnisse beider Testsysteme wurde mit Hilfe einer linearen Regression analysiert. Die Ergebnisse beider Kits sind in Abbildung 3 vergleichend dargestellt.





**Abbildung 3.** Vergleich des COBAS TaqMan HBV Assays (Roche, HBV; mit Probenaufreinigung unter Verwendung des High Pure Systems) mit dem artus HBV RG PCR Kit (QIAGEN, HBV; mit Probenaufreinigung unter Verwendung des QIAamp DSP Virus Kits). Die Korrelation der quantitativen Ergebnisse beider Testsysteme (Tabelle 5) wurde mit Hilfe einer linearen Regression analysiert. Die Ergebnisse beider Kits sind in einer XY-(Streu)-Auftragung mit log-log-Skalierung dargestellt.

## Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDSs) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

- DNA-Isolierungskit (siehe „DNA-Isolierung“ auf Seite 22)
- Pipetten (verstellbar)\*
- sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Laborschüttler (Vortex)\*
- Tischzentrifuge\* mit Rotor für 2-ml-Reaktionsgefäße
- Rotor-Gene Q oder Rotor-Gene Thermocycler\* mit Fluoreszenzkanälen für Cycling Green und Cycling Yellow oder mit Fluoreszenzkanälen für Cycling A.FAM und Cycling A.JOE
- Rotor-Gene Q Software-Version ab 1.7.94 (Rotor-Gene 6000 Software-Version 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94; Rotor-Gene 3000 Software-Version 6.0.23)
- Strip-Röhrchen und Deckel, 0,1 ml, zur Verwendung mit 72-well-Rotor (Kat.-Nr. 981103 oder 981106)
- Ersatzweise: PCR-Röhrchen, 0,2 ml, zur Verwendung mit 36-well-Rotor (Kat.-Nr. 981005 oder 981008)
- Kühlblock (Ladeblock 72 x 0,1-ml-Röhrchen, Kat.-Nr. 9018901, oder Ladeblock 96 x 0,2-ml-Röhrchen, Kat.-Nr. 9018905)

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

# Wichtige Hinweise


## Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Folgendes sollte vom Anwender immer beachtet werden:

- Sterile Pipettenspitzen mit Filter verwenden.
- Positivmaterial (Proben, Positivkontrollen, Amplifikate) räumlich getrennt von den übrigen Reagenzien aufreinigen, lagern und zur Reaktion zusetzen.
- Alle Komponenten vor Assay-Beginn bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C) vollständig auftauen.
- Nach dem Auftauen die Komponenten durchmischen (durch Auf- und Abpipettieren oder stoßweises Mischen auf dem Laborschüttler [Vortex]) und dann kurz zentrifugieren.
- Arbeiten Sie zügig und halten Sie die Komponenten auf Eis oder im Kühlblock (72/96-well-Ladeblock).

## Probennahme, Lagerung und Transport

 Alle Proben sind als potenziell infektiös zu behandeln.

 Nach aktuellen Daten ist EDTA- oder Citrat-Plasma das am besten geeignete Probenmaterial zum HBV-Nachweis. Wir empfehlen daher die Verwendung dieser Materialien mit dem *artus* HBV RG PCR Kit.

Die interne Validierung des *artus* HBV RG PCR Kits wurde mit humanem EDTA-Plasma durchgeführt. Andere Probenmaterialien wurden nicht validiert. Bitte nutzen Sie nur den empfohlenen Kit zur DNA-Isolierung (siehe „DNA-Isolierung“ auf Seite 22) für die Probenvorbereitung.

Bei Verwendung von bestimmtem Probenmaterial sind besondere Anweisungen zu Probennahme, Transport und Lagerung streng einzuhalten.

### Probennahme

Jede Blutentnahme führt zu einer Verletzung der Blutgefäße (Arterien, Venen, Kapillaren). Es darf nur einwandfreies und steriles Material eingesetzt werden. Für die Blutentnahme stehen geeignete Einmal-Artikel zur Verfügung. Bei der Venenpunktion sollten nicht zu feinumige Kanülen verwendet werden. Die venöse Blutentnahme sollte an einer geeigneten Stelle im Bereich der Ellenbeuge, des Unterarms oder des Handrückens erfolgen. Das Blut muss mit Standard-Blutentnahmeröhrchen entnommen werden (mit roter Kappe von Sarstedt oder entsprechende Röhrchen eines anderen Herstellers). Es sollten 5-

10 ml EDTA-Blut entnommen werden. Die Röhrchen sollten direkt nach der Blutentnahme über Kopf gemischt werden (8 x, nicht schütteln).

**i** Proben von Personen unter Heparintherapie dürfen nicht verwendet werden (siehe „Störsubstanzen“ auf Seite unten).

### **Probenlagerung**

Das Vollblut sollte innerhalb von 6 Stunden durch 20-minütiges Zentrifugieren bei 800 bis 1.600 x g in Plasma und zelluläre Bestandteile getrennt werden. Das abgetrennte Plasma muss in sterile Polypropylen-Röhrchen überführt werden. Die Sensitivität des Assays kann durch routinemäßiges Einfrieren oder durch eine längere Lagerung der Proben verringert werden. Im Virus eingeschlossene DNA ist bei 4 °C mehrere Tage lang haltbar, bei -20 °C mehrere Wochen und bei -70 °C sogar mehrere Monate oder Jahre.\*

### **Probentransport**

Probenmaterial sollte grundsätzlich in bruchsicheren Transportbehältern transportiert werden, um einer potenziellen Infektionsgefahr durch Auslaufen der Probe vorzubeugen. Die Proben sollten gemäß den örtlichen und nationalen Anweisungen zum Transport von Stoffen, die Krankheitserreger enthalten könnten, transportiert werden.†

Die Proben sollten innerhalb von sechs Stunden verschickt werden. Eine Lagerung am Ort der Abnahme wird nicht empfohlen. Ein Transport auf dem Postweg ist möglich, wenn dabei die Rechtsvorschriften zum Transport von Stoffen, die Krankheitserreger enthalten könnten, beachtet werden. Ein Probentransport mit einem Kurier wird empfohlen. Blutproben sollten gekühlt (2 bis 8 °C), Plasmaproben tiefgefroren (-15 bis -30 °C) versandt werden.

### **Störsubstanzen**

Erhöhte Bilirubin- ( $\leq 15$  mg/dl) und Lipid-Werte ( $\leq 800$  mg/dl) sowie hämolytische Proben führen zu keiner Beeinflussung des Systems. Heparin (ab 10 IU/ml) beeinträchtigt die PCR. Proben, die mit Röhrchen gewonnen wurden, die Heparin als Antikoagulanzen enthalten, sollten nicht verwendet werden. Auch Proben von Patienten unter Heparintherapie dürfen nicht verwendet werden.

\* Arbeitskreis Blut, V17 (09.1997), Bundesgesundheitsblatt 11/1997, Seiten 452 bis 456.

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

## DNA-Isolierung

Das QIAamp DSP Virus Kit (QIAGEN, Kat.-Nr. 60704) ist validiert für die Aufreinigung viraler DNA aus Humanplasma mit dem *artus* HBV RG PCR Kit. Führen Sie die Aufreinigung viraler DNA entsprechend den Anweisungen im *QIAamp DSP Virus Kit Handbuch* durch.

**i** 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 DSP Virus Kit mitgelieferten Carrier-RNA zu erzielen, folgen Sie bitte den in der Gebrauchsanweisung aufgeführten Angaben zu Rekonstitution und Lagerung der Carrier-RNA („Preparing reagents and buffers“).

**i** Die interne Kontrolle des *artus* HBV RG PCR Kits kann bei der Aufreinigung direkt verwendet werden (siehe „Interne Kontrolle“ weiter unten). Achten Sie darauf, bei der Aufreinigung auch eine negative Plasmaprobe mitzuführen. Das entsprechende Signal der darin enthaltenen internen Kontrolle dient als Grundlage für eine Bewertung der Aufreinigung.

## Interne Kontrolle

Eine interne Kontrolle (HBV RG/TM IC) wird mitgeliefert. Mit ihr kann sowohl das DNA-Isolierungsverfahren kontrolliert als auch die PCR auf mögliche Inhibition überprüft werden. 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 DNA bei Verwendung des QIAamp DSP Virus Kits in 60 µl Elutionspuffer (AVE) eluiert. Folglich sollten anfänglich 6 µl der internen Kontrolle zugesetzt werden. Die Menge der eingesetzten internen Kontrolle ist nur abhängig vom Elutionsvolumen.

**i** Die interne Kontrolle und Carrier-RNA (siehe „DNA-Isolierung“ auf Seite 22) dürfen nur zu der Mischung aus Lysepuffer und Probenmaterial oder direkt zum Lysepuffer zugesetzt werden.

Die interne Kontrolle darf nicht direkt zum Probenmaterial zugesetzt werden. Bei Zugabe zum Lysepuffer beachten Sie bitte, dass die Mischung aus interner Kontrolle und Lysepuffer–Carrier-RNA 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).

**i** Geben Sie die interne Kontrolle und die Carrier-RNA nicht direkt zum Probenmaterial hinzu.

Um eine Aufreinigung als erfolgreich zu werten, muss der  $C_T$ -Wert der internen Kontrolle einer in der Aufreinigung (QIAamp DSP Virus Kit) mitgeführten negativen Plasmaprobe unter Verwendung der Rotor-Gene Q Thermocycler  $C_T = 29 \pm 3$  (threshold: 0,03) erreichen. Die angegebene Streuung ist durch die Geräte- und Aufreinigungsvarianz bedingt. Eine höhere Abweichung weist auf Probleme mit der Aufreinigung hin. In diesem Fall muss diese überprüft und gegebenenfalls neu validiert werden. Sollten weitere Fragen oder Probleme auftreten, kontaktieren Sie bitte den Technischen Service bei QIAGEN.


Optional kann die interne Kontrolle ausschließlich zur Kontrolle einer möglichen PCR-Inhibition verwendet werden. Für diese Anwendung geben Sie die interne Kontrolle direkt zu dem HBV RG/TM Master hinzu, wie in Arbeitsschritt 2b des Protokolls beschrieben (Seite 26).

## Einstellen des Schwellenwerts für die PCR-Analyse

Die optimalen Einstellungen für einen Schwellenwert bei einer gegebenen Kombination aus Rotor-Gene Q Thermocycler und *artus* RG PCR Kit müssen empirisch durch Testen jeder einzelnen Kombination ermittelt werden, da es sich um einen relativen Wert handelt, der vom diagnostischen Arbeitsablauf insgesamt abhängt. Als Ausgangspunkt kann der Schwellenwert 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 Arbeitsablaufs 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 bis 0,05 und sollte nach Rundung nicht mehr als drei Dezimalstellen aufweisen.

## Quantifizierung

Die mitgelieferten Quantifizierungsstandards (HBV RG/TM QS 1 - 5) werden wie eine bereits aufgereinigte Probe behandelt und im gleichen Volumen eingesetzt (20  $\mu$ l). Um eine Standardkurve auf dem Rotor-Gene Q Thermocycler zu erstellen, setzen Sie bitte alle 5 Quantifizierungsstandards ein und definieren Sie diese im Dialogfeld „Edit Samples“ (Proben bearbeiten) als Standards mit den angegebenen Konzentrationen (siehe Gerätehandbuch).

 Die Quantifizierungsstandards sind in IU/ $\mu$ l definiert.\* Zur Umrechnung der anhand der Standardkurve ermittelten Werte in IU/ml Probenmaterial muss die folgende Gleichung angewendet werden:

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

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).

\* Der Standard wurde mit dem WHO 1st International HBV Standard kalibriert.

# Protokoll: PCR und Auswertung



## Wichtige Hinweise vor Beginn

- Lesen Sie vor Beginn den Abschnitt „Wichtige Hinweise“ auf den Seiten 20 bis 23.
- Machen Sie sich vor Beginn des Protokolls mit dem Rotor-Gene Q Thermocycler vertraut. (Siehe Anwenderhandbuch des Geräts.)
- Achten Sie darauf, dass in jedem PCR-Lauf mindestens ein Quantifizierungsstandard und eine Negativkontrolle (Wasser, PCR-Qualität) mitgeführt werden. Zur Erstellung einer Standardkurve verwenden Sie bei jedem PCR-Lauf alle 5 mitgelieferten Quantifizierungsstandards (HBV RG/TM QS 1 - 5).

## Vor Beginn durchzuführende Arbeiten

- Achten Sie darauf, dass der Kühlblock (Zubehör zum Rotor-Gene Q Thermocycler) auf 2 bis 8 °C vorgekühlt ist.
- Alle Reagenzien sollten vor Testbeginn vollständig bei Raumtemperatur aufgetaut, gut durchmischt (mehrfaches Auf- und Abpipettieren oder kurzes Vortex-Mischen) und anschließend anzentrifugiert werden.

## Verfahren

- 1. Setzen Sie die gewünschte Anzahl PCR-Röhrchen in die Adapter des Kühlblocks ein.**
  - 2. Wenn Sie die interne Kontrolle verwenden, um das DNA-Aufreinigungsverfahren zu überwachen und eine mögliche PCR-Inhibition zu kontrollieren, folgen Sie Arbeitsschritt 2a. Wenn Sie die interne Kontrolle ausschließlich verwenden, um eine mögliche PCR-Inhibition zu kontrollieren, folgen Sie Arbeitsschritt 2b.**
- 2a. Die interne Kontrolle wurde der Aufreinigung schon zugesetzt (siehe „Interne Kontrolle“ auf Seite 22). Setzen Sie in diesem Fall eine Master-Mischung nach Tabelle 6 an.**



**Tabelle 6. Ansetzen der Master-Mischung (interne Kontrolle wird zum Überwachen der DNA-Aufreinigung und zum Kontrollieren einer PCR-Inhibition verwendet)**

<b>Anzahl Proben</b>	<b>1</b>	<b>12</b>
HBV RG/TM Master	30 $\mu$ l	360 $\mu$ l
HBV RG/TM IC	0 $\mu$ l	je 0 $\mu$ l
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>30 <math>\mu</math>l</b>	<b>je 360 <math>\mu</math>l</b>

**2b. Die interne Kontrolle muss dem HBV RG/TM Master direkt zugesetzt werden. Setzen Sie in diesem Fall eine Master-Mischung nach Tabelle 7 an.**

Die Reaktionsmischung enthält typischerweise alle für die PCR benötigte Komponenten außer der Probe.

**Tabelle 7. Ansetzen der Master-Mischung (interne Kontrolle wird ausschließlich zum Kontrollieren einer PCR-Inhibition verwendet)**

<b>Anzahl Proben</b>	<b>1</b>	<b>12</b>
HBV RG/TM Master	30 $\mu$ l	360 $\mu$ l
HBV RG/TM IC	2 $\mu$ l	24 $\mu$ l
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>32 <math>\mu</math>l*</b>	<b>384 <math>\mu</math>l*</b>

\* Die Volumenzunahme durch Zugabe der internen Kontrolle wird beim Ansetzen des PCR-Assays vernachlässigt. Die Sensitivität des Detektionssystems wird dadurch nicht beeinträchtigt.

**3. Pipettieren Sie 30  $\mu$ l der Master-Mischung in jedes PCR-Röhrchen. Geben Sie dann 20  $\mu$ l eluierte Proben-DNA hinzu (siehe Tabelle 8). Dementsprechend müssen 20  $\mu$ l mindestens eines der Quantifizierungsstandards (HBV RG/TM QS 1 - 5) als eine Positivkontrolle und 20  $\mu$ l Wasser (Wasser, PCR-Qualität) als eine Negativkontrolle verwendet werden.**

**Tabelle 8. Ansetzen des PCR-Assays**

<b>Anzahl Proben</b>	<b>1</b>	<b>12</b>
Master mix (Master-Mischung)	30 $\mu$ l	je 30 $\mu$ l
Probe	20 $\mu$ l	je 20 $\mu$ l
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>	<b>je 50 <math>\mu</math>l</b>

- 4. Verschließen Sie die PCR-Röhrchen. Setzen Sie unbedingt den Schließring (locking ring, Zubehör des Rotor-Gene Thermocyclers) auf den Rotor, um ein unbeabsichtigtes Öffnen der Reaktionsgefäße während des Laufs zu verhindern.**
- 5. Erstellen Sie zum Nachweis der HBV-DNA ein Temperaturprofil gemäß den folgenden Arbeitsschritten.**

<b>Einstellen allgemeiner Assay-Parameter</b>	<b>Abbildungen 4, 5, 6</b>
<b>Initiale Aktivierung des Hot-Start-Enzyms</b>	<b>Abbildung 7</b>
<b>Amplifikation der DNA</b>	<b>Abbildung 8</b>
<b>Einstellen der Sensitivität der Fluoreszenzkanäle</b>	<b>Abbildung 9</b>
<b>Starten des Laufs</b>	<b>Abbildung 10</b>

Alle Angaben beziehen sich auf die Rotor-Gene Q Software-Version 1.7.94, RotorGene 6000 Software-Versionen 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94 und RotorGene 3000 Software-Version 6.0.23. Einzelheiten zur Programmierung des RotorGene Thermocyclers entnehmen Sie bitte dem Anwenderhandbuch des Geräts. Die jeweiligen Einstellungen sind in den Abbildungen durch schwarze Rahmen hervorgehoben. Die Abbildungen umfassen auch RotorGene Q Thermocycler. Wo für den Rotor-Gene 3000 Thermocycler abweichende Werte erforderlich sind, ist dies im Text beschrieben.

6. Öffnen Sie zunächst das Dialogfeld „New Run Wizard“ (Assistent für neuen Lauf) (Abb. 4). Markieren Sie das Kontrollkästchen „Locking Ring Attached“ (Schließring angebracht) und klicken Sie dann auf „Next“ (Weiter).

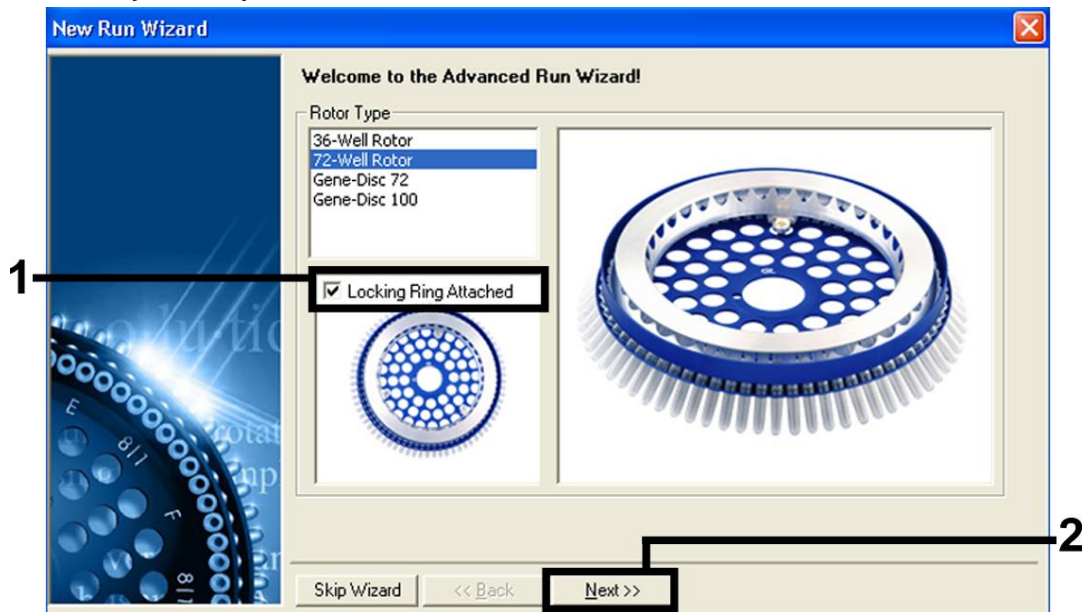


Abbildung 4. Das Dialogfeld „New Run Wizard“.

7. Wählen Sie als Volumen der PCR-Reaktion „50“ und klicken Sie auf „Next“ (Abb. 5).

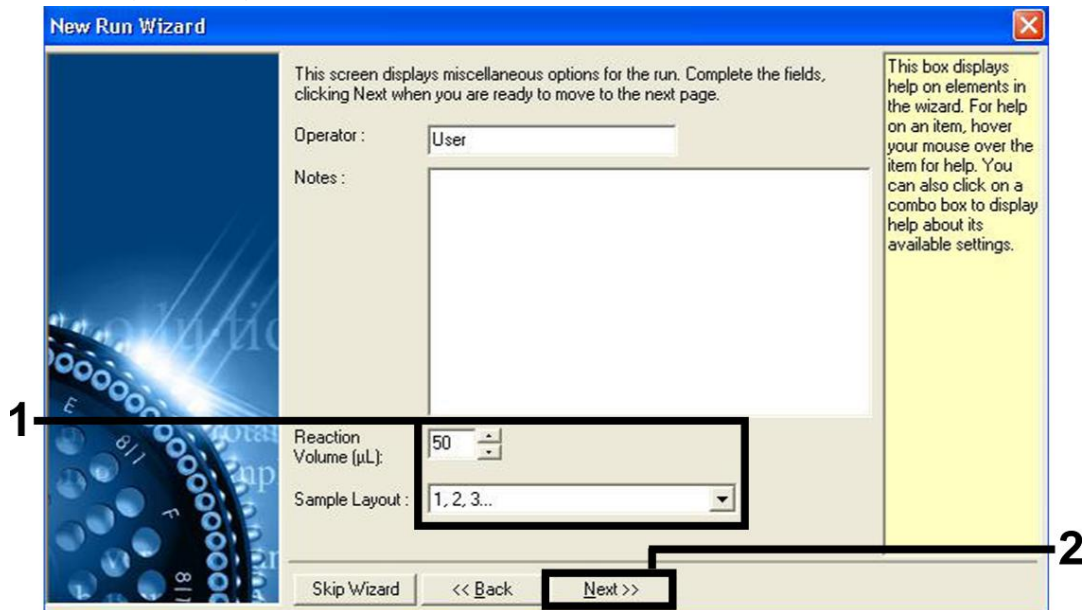


Abbildung 5. Einstellen allgemeiner Assay-Parameter.

8. Klicken Sie im nächsten Dialogfeld „New Run Wizard“ (Abb. 6) auf die Schaltfläche „Edit Profile“ (Profil bearbeiten) und programmieren Sie das Temperaturprofil wie in Abb. 6 bis 8 gezeigt.

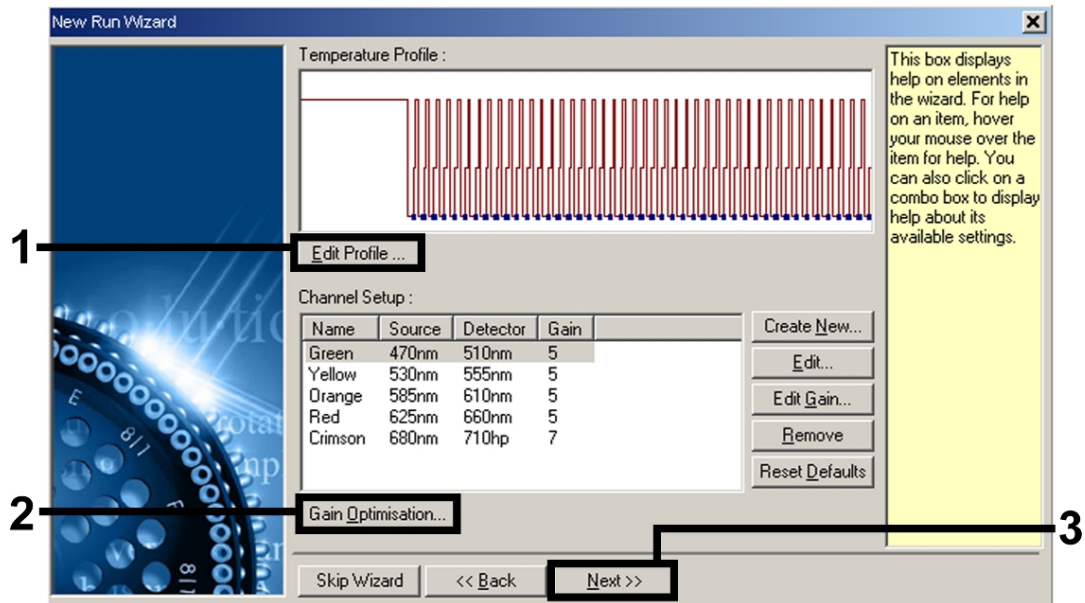


Abbildung 6. Bearbeiten des Profils.

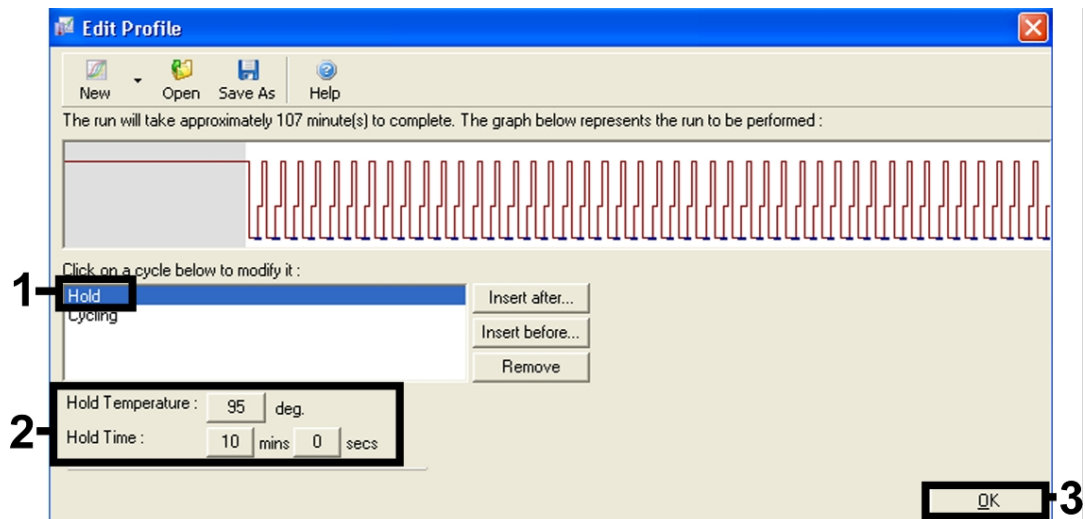
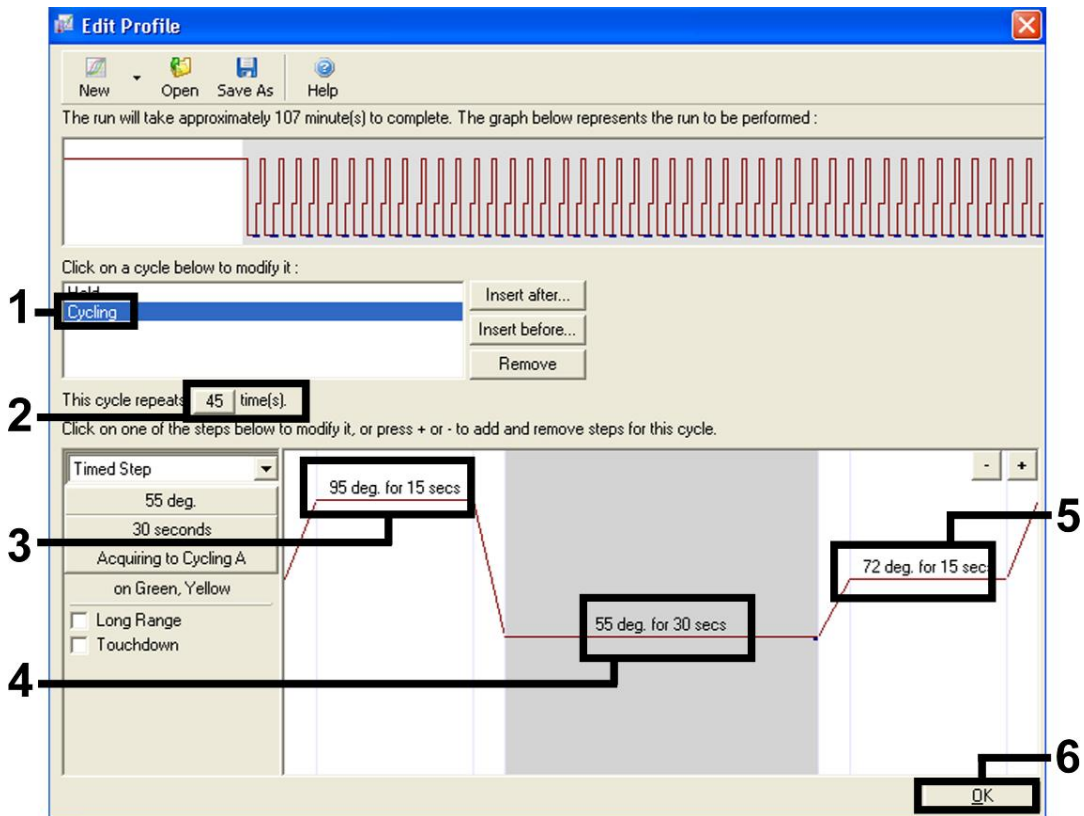
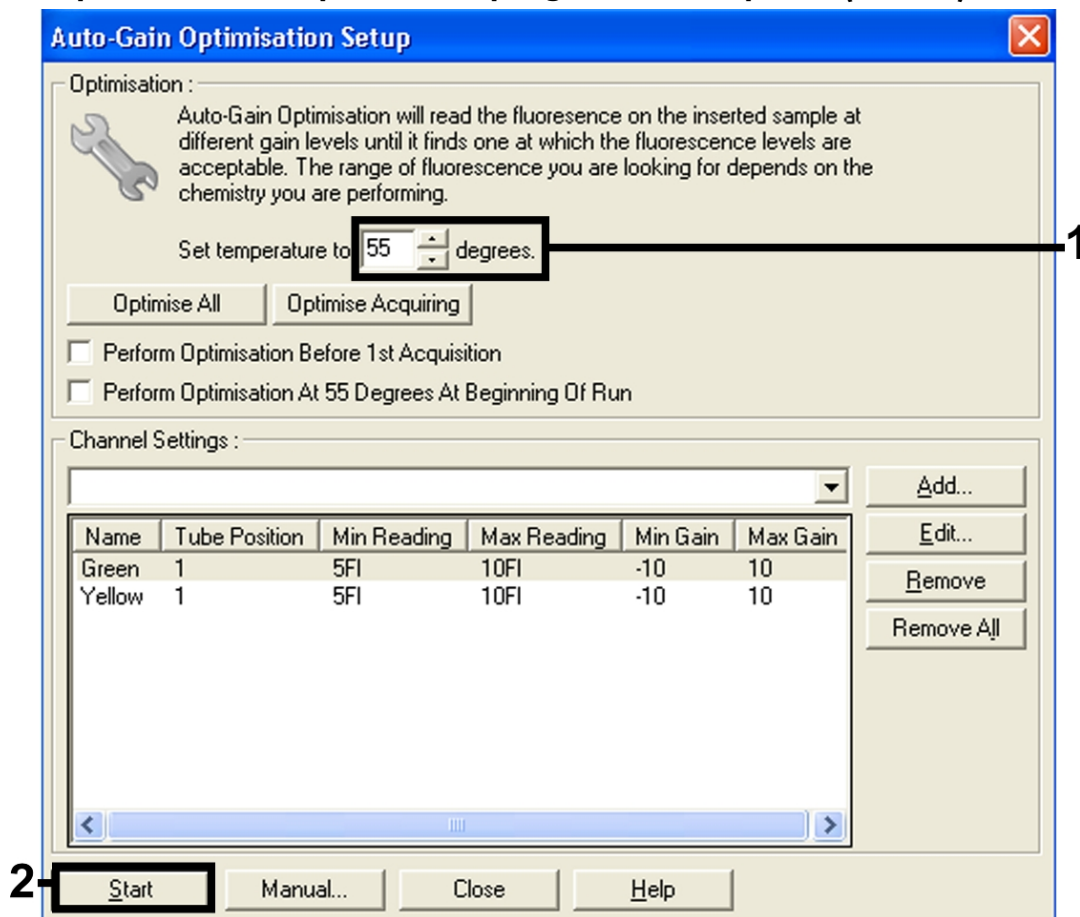


Abbildung 7. Initiale Aktivierung des Hot-Start-Enzyms.



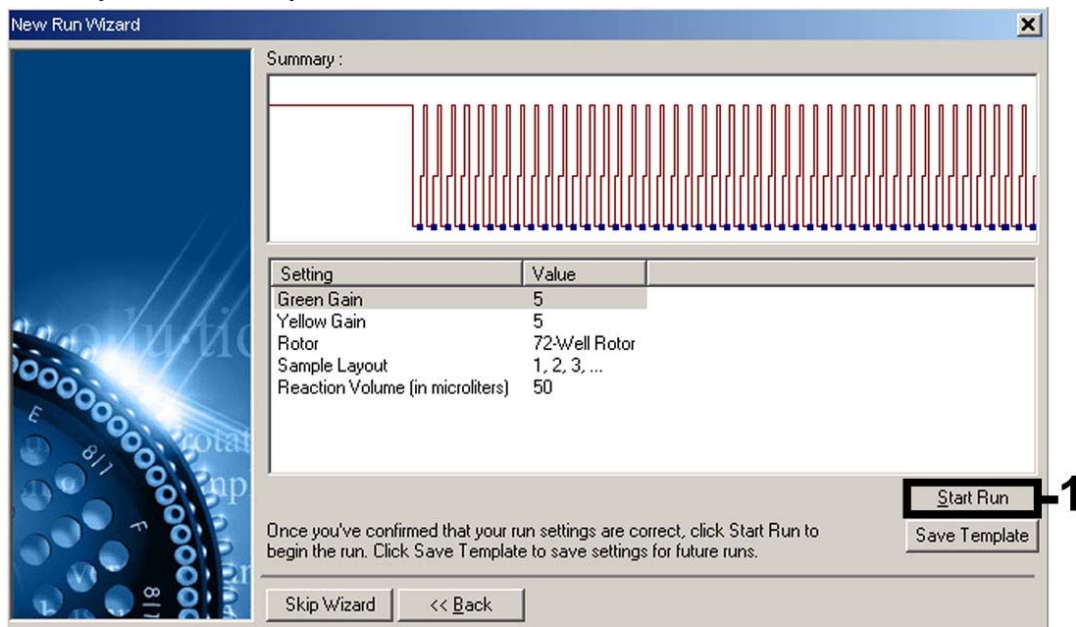
**Abbildung 8. Amplifikation der DNA.** Beachten Sie, dass die Software auf dem Rotor-Gene 3000 Thermocycler die Fluoreszenzfarbstoffe als „FAM/Sybr, JOE“ definiert.

9. Der Messbereich der Fluoreszenzkanäle muss auf die Fluoreszenzintensität in den PCR-Ansätzen abgestimmt werden. Klicken Sie im Dialogfeld „New Run Wizard“ auf „Gain Optimisation“ (Optimierung der Verstärkung), um das Dialogfeld (siehe Abb. 6) „Auto-Gain Optimisation Setup“ (Einrichten der Optimierung der automatischen Verstärkung) zu öffnen. Stellen Sie die Kalibrierungstemperatur auf „55“, damit sie der Annealing-Temperatur des Amplifikationsprogramms entspricht (Abb. 9).



**Abbildung 9. Einstellen der Sensitivität der Fluoreszenzkanäle.** Beachten Sie, dass die Software auf dem Rotor-Gene 3000 Thermocycler die Fluoreszenzfarbstoffe als „FAM/Sybr“ und „JOE“ definiert.

**10. Die bei der Kalibrierung der Kanäle ermittelten Verstärkungswerte werden automatisch gespeichert und im letzten Menüfenster des Programmierverfahrens aufgeführt (Abb. 10). Klicken Sie auf „Start Run“ (Lauf starten).**



**Abbildung 10. Starten des Laufs.** Beachten Sie, dass die Software auf dem Rotor-Gene 3000 Thermocycler die Fluoreszenzfarbstoffe als „FAM/Sybr“ und „JOE“ definiert.

**11. Werten Sie nach Abschluss des Laufs die Daten aus. Folgende Ergebnisse können auftreten (11a, 11b und 11c).**

Beispiele für PCR-Reaktionen mit positiven und negativen Ergebnissen sind in Abb. 11 und Abb. 12 gezeigt.

**11a. Im Fluoreszenzkanal Cycling Green wird ein Signal detektiert. Das Ergebnis der Analyse ist positiv: Die Probe enthält HBV-DNA.**

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

**i** Beachten Sie, dass auf dem Rotor-Gene 3000 Thermocycler die relevanten Kanäle Cycling A.FAM für das positive Signal und Cycling A.JOE für die interne Kontrolle sind.

**11b. Im Fluoreszenzkanal Cycling Green wird kein Signal detektiert, aber im Kanal Cycling Yellow das Signal der internen Kontrolle. In der Probe ist keine HBV-DNA nachweisbar. Sie kann daher als negativ angesehen werden.**

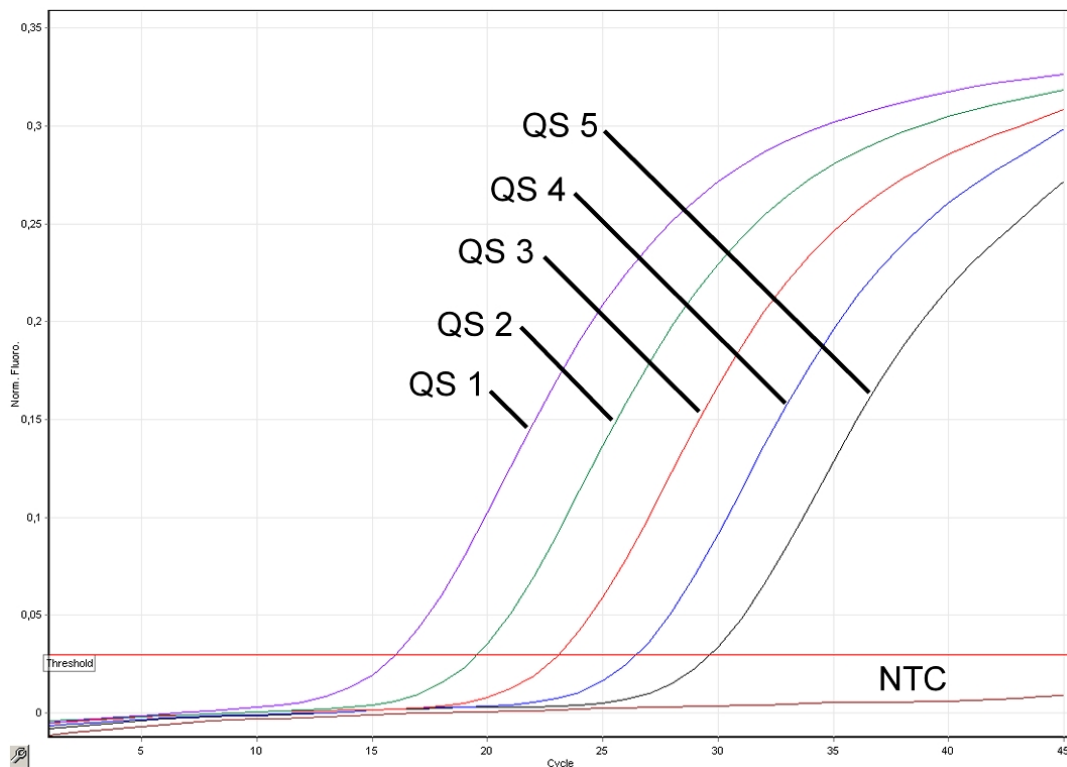
Bei negativer HBV-PCR schließt das detektierte Signal der internen Kontrolle die Möglichkeit einer PCR-Inhibition aus.

**i** Beachten Sie, dass auf dem Rotor-Gene 3000 Thermocycler die relevanten Kanäle Cycling A.JOE für die interne Kontrolle und Cycling A.FAM für das Fehlen eines Signals sind.

**11c. Weder im Kanal Cycling Green noch im Kanal Cycling Yellow wird ein Signal detektiert. Eine Aussage zum Ergebnis ist nicht möglich.**

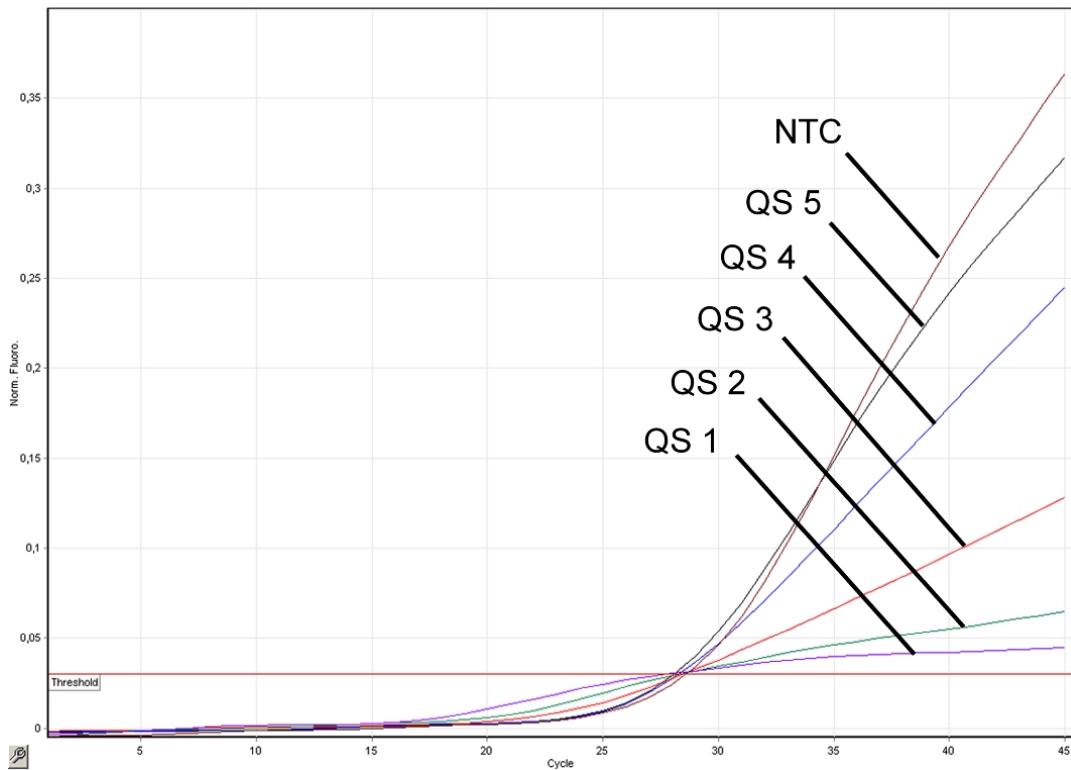
Informationen zu Fehlerquellen und deren Beseitigung finden Sie unter „Hilfe zur Fehlersuche“ auf Seite 35.

**i** Beachten Sie, dass auf dem Rotor-Gene 3000 Thermocycler die relevanten Kanäle Cycling A.FAM und Cycling A.JOE sind.



**Abbildung 11. Nachweis der Quantifizierungsstandards (HBV RG/TM QS 1 - 5) im Fluoreszenzkanal Cycling Green. NTC: No template control (Kontrolle ohne Template) (Negativkontrolle).**





**Abbildung 12. Detektion der internen Kontrolle (IC) im Fluoreszenzkanal Cycling Yellow bei gleichzeitiger Amplifikation der Quantifizierungsstandards (HBV RG/TM QS 1 - 5). NTC: No template control (Kontrolle ohne Template) (Negativkontrolle).**






## Hilfe zur Fehlersuche

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

### Kommentare und Vorschläge

---






#### **Kein Signal bei den Positivkontrollen (HBV RG/TM QS 1 - 5) im Fluoreszenzkanal Cycling Green oder Cycling A.FAM**

- |  |  |
|--|--|
| a) Der ausgewählte Fluoreszenzkanal für die PCR-Datenanalyse entspricht nicht dem Protokoll                                |  Wählen Sie bei der Datenanalyse den Fluoreszenzkanal Cycling Green oder Cycling A.FAM für die analytische HBV-PCR und den Fluoreszenzkanal Cycling Yellow oder Cycling A.JOE für die PCR der internen Kontrolle aus. |
| b) Programmierung des Temperaturprofils für den RotorGene Thermocycler ist nicht korrekt                                   |  Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit dem Protokoll. Siehe „Protokoll: PCR und Auswertung“ auf Seite 25.   |
| c) Fehlerhafte Konfiguration der PCR   |  Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte mit Hilfe des Pipettierschemas und wiederholen Sie ggf. die PCR. Siehe „Protokoll: PCR und Auswertung“ auf Seite 25.   |
| d) Die Lagerbedingungen einer oder mehrerer Komponenten des Kits entsprachen nicht den Anweisungen in „Lagerung“ (Seite 7) |  Überprüfen Sie sowohl die Lagerbedingungen als auch das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Etikett des Kits) und verwenden Sie gegebenenfalls einen neuen Kit.  |
| e) Das Verfallsdatum des <i>artus</i> HBV RG PCR Kits ist abgelaufen   |  Überprüfen Sie sowohl die Lagerbedingungen als auch das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Etikett des Kits) und verwenden Sie gegebenenfalls einen neuen Kit.  |

## Kommentare und Vorschläge

---

### **Schwaches oder ausbleibendes Signal der internen Kontrolle in einer bei der Aufreinigung mit dem QIAamp DSP Virus Kit mitgeführten negativen Plasmaprobe ( $C_T = 29 \pm 3$ ; threshold, 0,03) im Fluoreszenzkanal Cycling Yellow oder Cycling A.JOE bei gleichzeitiger Abwesenheit eines Signals im Kanal Cycling Green oder Cycling A.FAM**

- a) Die PCR-Bedingungen entsprechen nicht dem Protokoll  Überprüfen Sie die PCR-Bedingungen (siehe oben) und wiederholen Sie gegebenenfalls die PCR mit korrigierten Einstellungen.
- b) Die PCR wurde inhibiert  Stellen Sie sicher, dass Sie das von uns empfohlene Aufreinigungsverfahren benutzen und halten Sie sich exakt an die Anweisungen des Herstellers.
- c) DNA ging bei der Aufreinigung verloren  Wenn die interne Kontrolle bei der Aufreinigung zugegeben wurde, kann ein Ausbleiben des Signals der internen Kontrolle bedeuten, dass DNA während der Aufreinigung verloren ging. Verwenden Sie unbedingt das empfohlene Aufreinigungsverfahren (siehe „DNA-Isolierung“ auf Seite 22) und halten Sie sich exakt an die Anweisungen des Herstellers.
- d) Die Lagerbedingungen einer oder mehrerer Komponenten des Kits entsprachen nicht den Anweisungen in „Lagerung“ (Seite 7)  Überprüfen Sie sowohl die Lagerbedingungen als auch das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Etikett des Kits) und verwenden Sie gegebenenfalls einen neuen Kit.
- e) Das Verfallsdatum des *artus* HBV RG PCR Kits ist abgelaufen  Überprüfen Sie sowohl die Lagerbedingungen als auch das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Etikett des Kits) und verwenden Sie gegebenenfalls einen neuen Kit.

## Kommentare und Vorschläge

---

### Signale bei den Negativkontrollen im Fluoreszenzkanal Cycling Green oder Cycling A.FAM der analytischen PCR

- a) Kontamination bei Vorbereitung der PCR
- ① Wiederholen Sie die PCR mit Replikaten mit noch unbenutzten Reagenzien.
  - ① Verschließen Sie die einzelnen PCR-Gefäße nach Möglichkeit jeweils direkt nach Zugabe der zu untersuchenden Probe.
  - ① Pipettieren Sie die Positivkontrollen grundsätzlich zuletzt.
  - ① Achten Sie darauf, dass Arbeitsflächen und Geräte regelmäßig dekontaminiert werden.
- b) Kontamination bei der Aufreinigung
- ① Wiederholen Sie Aufreinigung und PCR der zu untersuchenden Proben unter Verwendung noch unbenutzter Reagenzien.
  - ① Achten Sie darauf, dass Arbeitsflächen und Geräte regelmäßig dekontaminiert werden.

## Literatur

QIAGEN führt eine umfangreiche und aktuelle Online-Datenbank mit wissenschaftlichen Publikationen, in denen die Anwendung von QIAGEN Produkten beschrieben wird. Umfassende Suchoptionen ermöglichen Ihnen das Auffinden der für Sie interessanten Artikel durch eine einfache Stichwortsuche oder durch Eingabe von Anwendung, Forschungsgebiet, Titel usw.

Zugang zur vollständigen Literaturliste haben Sie online über die QIAGEN Reference Database unter [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp). Alternativ können Sie sich an den Technischen Service bei QIAGEN oder an Ihren örtlichen Distributor wenden.

## Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Katalognr.
artus HBV RG PCR Kit (24)	Für 24 Reaktionen: Master, 5 Quantifizierungsstandards, interne Kontrolle, Wasser (PCR-Qualität)	4506263
artus HBV RG PCR Kit (96)	Für 96 Reaktionen: Master, 5 Quantifizierungsstandards, interne Kontrolle, Wasser (PCR-Qualität)	4506265
<b>QIAamp DSP Virus Kit — zur Aufreinigung viraler Nukleinsäuren aus Humanplasma bei in-vitro-diagnostischen Anwendungen.</b>		
QIAamp DSP Virus Kit	Für 50 Präparationen: QIAamp MinElute® Spin-Säulen, Puffer, Reagenzien, Röhrchen, Säulenerweiterungen und VacConnectors	60704
<b>Rotor-Gene Q MDx — für IVD-validierte Echtzeit-PCR-Analyse bei klinischen Anwendungen</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Echtzeit-PCR-Cycler mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), Laptop-Computer, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation und Schulung	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Plattform	Echtzeit-PCR-Cycler mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), Laptop-Computer, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, ohne Installation und Schulung	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Echtzeit-PCR-Cycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation und Schulung	9002033

<b>Produkt</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Katalognr.</b>
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Plattform	Echtzeit-PCR-Cycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, ohne Installation und Schulung	9002032
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Echtzeit-PCR-Thermocycler mit 6 Kanälen (blau, grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), umfasst Laptop-Computer, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation und Schulung	9002043
Rotor-Gene Q MDx 6plex Plattform	Echtzeit-PCR-Thermocycler mit 6 Kanälen (blau, grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), umfasst Laptop-Computer, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, ohne Installation und Schulung	9002042
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	Echtzeit-PCR-Cycler mit 2 Kanälen (grün, gelb), Laptop-Computer, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation und Schulung	9002003
Rotor-Gene Q MDx 2plex Plattform	Echtzeit-PCR-Cycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 2 Kanälen (grün, gelb) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, ohne Installation und Schulung	9002002
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	Echtzeit-PCR-Cycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 2 Kanälen (grün, gelb) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation und Schulung	9002013

<b>Produkt</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Katalognr.</b>
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Plattform	Echtzeit-PCR-Cycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 2 Kanälen (grün, gelb) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, ohne Installation und Schulung	9002012
<b>Rotor-Gene Q — für überragende Leistung bei der Echtzeit-PCR</b>		
Rotor-Gene Q 5plex System	Echtzeit-PCR-Cycler mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), Laptop-Computer, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation und Schulung	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Plattform	Echtzeit-PCR-Cycler mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), Laptop-Computer, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, ohne Installation und Schulung	9001570
Rotor-Gene Q 5plex HRM System	Echtzeit-PCR-Cycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation und Schulung	9001650
Rotor-Gene Q 5plex HRM Plattform	Echtzeit-PCR-Cycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, ohne Installation und Schulung	9001580
Rotor-Gene Q 6plex System	Echtzeit-PCR-Thermocycler mit 6 Kanälen (blau, grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), umfasst Laptop-Computer, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation und Schulung	9001660



<b>Produkt</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Katalognr.</b>
Rotor-Gene Q 6plex Plattform	Echtzeit-PCR-Thermocycler mit 6 Kanälen (blau, grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), umfasst Laptop-Computer, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, ohne Installation und Schulung	9001590
Rotor-Gene Q 2plex System	Echtzeit-PCR-Cycler mit 2 Kanälen (grün, gelb), Laptop-Computer, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation und Schulung	9001620
Rotor-Gene Q 2plex Plattform	Echtzeit-PCR-Cycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 2 Kanälen (grün, gelb) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, ohne Installation und Schulung	9001550
Rotor-Gene Q 2plex HRM System	Echtzeit-PCR-Cycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 2 Kanälen (grün, gelb) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation und Schulung	9001630
Rotor-Gene Q 2plex HRM Plattform	Echtzeit-PCR-Cycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 2 Kanälen (grün, gelb) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, ohne Installation und Schulung	9001560
<b>Rotor-Gene Q Zubehör</b>		
Ladeblock 72 x 0,1-ml-Röhrchen	Aluminium-Block für manuelles Ansetzen der Reaktion mit einer Einkanal-Pipette in 72 x 0,1-ml-Röhrchen	9018901

<b>Produkt</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Katalognr.</b>
Ladeblock 96 x 0,2-ml-Röhrchen	Aluminium-Block für manuelles Ansetzen der Reaktion in einem 8 x 12 Standard-Array mit 96 x 0,2-ml-Röhrchen	9018905
Strip-Röhrchen und Deckel, 0,1 ml (250)	250 Streifen mit je 4 Röhrchen und Deckeln, für 1.000 Reaktionen	981103
Strip-Röhrchen und Deckel, 0,1 ml (2.500)	10 x 250 Streifen mit je 4 Röhrchen und Deckeln, für 10.000 Reaktionen	981106
PCR-Röhrchen, 0,2 ml (1.000)	1.000 dünnwandige Röhrchen für 1.000 Reaktionen	981005
PCR-Röhrchen, 0,2 ml (10.000)	10 x 1.000 dünnwandige Röhrchen für 10.000 Reaktionen	981008

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](http://www.qiagen.com) abrufbar oder können vom Technischen Service bei QIAGEN oder von Ihrem örtlichen Distributor angefordert werden.



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.

Marken: QIAGEN®, QIAamp®, artus®, MinElute®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); COBAS®, TaqMan® (Roche Group); FAM™, JOE™, SYBR® (Life Technologies Corporation).

Der artus HBV RG PCR Kit und der QIAamp DSP Virus Kit sind Diagnostik-Kits mit CE-Kennzeichnung entsprechend der europäischen Richtlinie 98/79/EG über In-vitro-Diagnostika. Nicht in allen Ländern erhältlich.

#### **Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung**

Mit Nutzung dieses Produkts erkennen KÜufer und Anwender des artus HBV RG PCR Kits die folgenden Bedingungen an:

1. Der artus HBV RG RCR Kit darf nur gemäß den Angaben im artus HBV RG RCR 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 HBV RG PCR Kit Handbuch und in zusätzlichen, im Internet unter [www.qiagen.com](http://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](http://www.qiagen.com) nachgelesen werden.

© 2009-2014 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 800-787980

**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)

