

Gebrauchsinformation

SwineFever combi

real time RT-PCR Kit

In vitro Veterinärdiagnostikum zum Nachweis der DNA des Erregers der Afrikanischen Schweinepest (African Swine Fever Virus, ASFV) und der RNA des Erregers der Klassischen Schweinepest (Classical Swine Fever Virus, CSFV) in Probenmaterialien von Schweinen und Wildschweinen (Blut, Gewebe, Tupferproben, Proben in konservierenden Transportmedien).

Die deutsche Gebrauchsinformation ist nach § 11 Absatz 2 TierGesG zugelassen.

Zul.-Nr.

FLI-C 064



G01112-96

G01112-384



96

384



gerbion GmbH & Co. KG
Remsstr. 1
70806 Kornwestheim
Germany
phone: +49 7154 806 20 0
fax: + 49 7154 806 20 29
e-mail: info@gerbion.com
www.gerbion.com



Inhaltsverzeichnis

1	Anwendungszweck	3
2	Anwendungsbereich	3
3	Testprinzip	4
4	Komponenten	4
5	Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte	4
6	Transport, Lagerung und Haltbarkeit	5
7	Wichtige Hinweise	5
8	Allgemeine Hinweise.....	5
9	Art und Beschaffenheit des Probenmaterials	5
10	Probenvorbereitung.....	6
11	Kontrolle der Proben- und Extraktionsqualität	7
11.1	Kontroll-RNA als Extraktionskontrolle.....	7
11.2	Kontroll-RNA als Inhibitionskontrolle.....	7
12	Real time RT-PCR	7
12.1	Wichtige Punkte bevor Sie starten:.....	7
12.2	Durchführung	7
12.3	Geräteeinstellungen.....	9
13	Interpretation der Ergebnisse	11
14	Validierung.....	13
15	Grenzen der Methode	13
16	Troubleshooting.....	14
17	Abkürzungen und Symbole	16

1 Anwendungszweck

In vitro Veterinärdiagnostikum zum simultanen Nachweis der DNA des Erregers der Afrikanischen Schweinepest (African Swine Fever Virus, ASFV) und der RNA des Erregers der Klassischen Schweinepest (Classical Swine Fever Virus, CSFV) in Probenmaterialien von Schweinen und Wildschweinen (Blut, Gewebe, Tupferproben, Proben in konservierenden Transportmedien). Zur Erhöhung der Prozesssicherheit wird in jeder Nachweisreaktion eine Interne Prozesskontrolle (Extraktionskontrolle, IPC) koamplifiziert.

Das Zusammenführen (Poolen) von Proben ist nach Maßgabe der Amtlichen Methodensammlung möglich. Bitte informieren Sie sich über den jeweils aktuellen Stand auf www.fli.de/de/publikationen/amtliche-methodensammlung.

2 Anwendungsbereich

Die Afrikanische Schweinepest ist eine anzeigepflichtige Tierseuche, von der Haus- und Wildschweine betroffen sind. In den afrikanischen Ursprungsländern übertragen Lederzecken das ASFV. Diese spielen in Mitteleuropa keine Rolle. Hier erfolgt eine Übertragung durch direkten Kontakt mit infizierten Tieren (Sekrete, Blut, Sperma), die Aufnahme von Speiseabfällen oder Schweinefleischerzeugnissen bzw. -zubereitungen sowie andere indirekte Übertragungswege (Fahrzeuge, kontaminierte Ausrüstungsgegenstände einschl. Jagdausrüstung, landwirtschaftlich genutzte Geräte und Maschinen, Kleidung). Der Kontakt mit Blut ist der effizienteste Übertragungsweg. Nach einer Infektion entwickeln die Tiere sehr schwere, aber unspezifische Allgemeinsymptome. Die Afrikanische Schweinepest ist keine Zoonose, also zwischen Tier und Mensch übertragbare Infektionskrankheit, und daher für den Menschen ungefährlich.

Die Klassische Schweinepest ist eine weltweit vorkommende, verlustreiche Tierseuche mit großer handelspolitischer und ökonomischer Relevanz. Sie zählt zu den international anzeigepflichtigen Erkrankungen. Eine prophylaktische Impfung ist in der Europäischen Union verboten. Die Erkrankung betrifft ausschließlich Haus- und Wildschweine. Der Erreger der Klassischen Schweinepest (CSFV) ist ein kleines, behülltes RNA-Virus aus dem Genus Pestivirus der Virusfamilie Flaviviridae. Eine enge Verwandtschaft besteht zu den für die Virusdiarrhoe des Rindes (BVD) und die Border Disease des Schafes (BD) verantwortlichen Pestiviren. Diese Verwandtschaft ist für die Diagnose insofern bedeutsam, als Kreuzreaktionen auftreten, die zu falsch-positiven Laborbefunden führen können. Abhängig von Wirts- bzw. Erregereigenschaften (Virulenz des Isolates) sowie des Infektionszeitpunktes (prä- oder postnatal) kann die Klassische Schweinepest in der akuten, chronischen oder "late onset" Verlaufsform auftreten. Besonders die letzteren Formen bereiten Schwierigkeiten bei der klinischen Diagnose und tragen so in besonderem Maße zur Verbreitung des Virus bei.

3 Testprinzip

Der SwineFever combi real time RT-PCR Kit enthält spezifische Primer und fluoreszenzfarbstoffmarkierte Sonden und zusätzliches Material zum simultanen Nachweis der DNA des Erregers der Afrikanischen Schweinepest (African Swine Fever Virus, ASFV), der RNA des Erregers der Klassischen Schweinepest (Classical Swine Fever Virus, CSFV) und der Internen Prozesskontrolle (IPC) mittels real time RT-PCR in offenen real time PCR Systemen (z.B. Stratagene Mx3000/3005, Agilent AriaMx, Roche LightCycler 480II, LifeTechnologies ABI 7500, ThermoFisher Scientific QuantStudio 5, Qiagen Q-Cycler, BioRad CFX96, BMS Mic qPCR Cycler).

Die Detektion der Amplifikation erfolgt in Echtzeit durch die Hybridisierung und anschließende Hydrolyse der ASFV-spezifischen Cy5-markierten und CSFV-spezifischen FAM-markierten Fluoreszenz-Sonden.

Der SwineFever combi real time RT-PCR Kit verfügt über eine Kontroll-RNA (IPC), die während der Extraktion zugefügt und in einem heterologen Amplifikationssystem nachgewiesen wird. Dies ermöglicht zum einen das Aufdecken von Fehlern bei der Extraktion, zum anderen kann eine mögliche Inhibition der RT-PCR identifiziert werden. Dadurch wird das Risiko von falsch-negativen Ergebnissen reduziert. Die Detektion der Kontroll-RNA (IPC) erfolgt im HEX-Kanal.

4 Komponenten

Die Komponenten sind ausreichend für den Ansatz von 96 bzw. 384 Nachweisreaktionen.

Tabelle 1: Komponenten des SwineFever combi real time RT-PCR Kit.

Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt G01112-96	Inhalt G01112-384
Reaktionsmix	gelb	1 x 1325 µl	4 x 1325 µl
Enzym	blau	1 x 19,2 µl	1 x 76,8 µl
Positivkontrolle	rot	1 x 150 µl	1 x 150 µl
Negativkontrolle	grün	1 x 150 µl	1 x 150 µl
Kontroll-RNA	farblos	1 x 480 µl	2 x 960 µl

5 Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- Extraktionskit (z.B. NukEx Mag RNA/DNA, gerbion Art. Nr. G05012)
- Reinstwasser (PCR grade Water)
- sterile Reaktionsgefäße
- Pipetten (variable Volumina)
- sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Tischzentrifuge
- Vortexer

- real time PCR Gerät
- optische PCR Gefäße mit Verschluss
- optional: Pipettiergeräte zur Automation

6 Transport, Lagerung und Haltbarkeit

Der Transport des SwineFever combi real time RT-PCR Kit erfolgt gefroren auf Trockeneis. Alle Komponenten des SwineFever combi real time RT-PCR Kit sind direkt nach Erhalt lichtgeschützt bei -18°C oder niedrigeren Temperaturen zu lagern. Nach Ablauf des auf der Packung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden! Nach Anbruch der Reagenzien können diese bei $+2 - +8^{\circ}\text{C}$ für maximal 6 Monate gelagert werden. Falls die Reagenzien bei -18°C oder niedrigeren Temperaturen gelagert werden, sind bis zu 20 Auftau- und Einfrierzyklen möglich. Kitkomponenten während der gesamten Testdurchführung vor direktem Sonnenlicht schützen.

7 Wichtige Hinweise

- Die SwineFever combi real time RT-PCR muss in für diesen Zweck geeigneten Laboratorien und von speziell geschultem Personal durchgeführt werden.
- Die Richtlinien der Good Laboratory Practice (GLP) sind einzuhalten.
- Alle Proben müssen als potentiell infektiös betrachtet werden und alle mit den Proben in Berührung kommenden Gegenstände müssen als potentiell kontaminiert erachtet werden.

8 Allgemeine Hinweise

- Die Anweisungen der Gebrauchsinformation sind einzuhalten.
- Areale für die Probenvorbereitung und den Ansatz des PCR-Mastermixes sollten strikt getrennt sein.
- Pipetten, Röhrchen und andere Arbeitsmaterialien dürfen nicht von einem Bereich in den anderen zirkulieren.
- Immer Pipettenspitzen mit Filtern verwenden.
- Pipetten und Arbeitsflächen regelmäßig mit geeigneter Dekontaminationslösung reinigen (keine ethanolhaltigen Mittel).
- Komponenten verschiedener Chargen des SwineFever combi real time RT-PCR Kit dürfen nicht zusammen verwendet werden.

9 Art und Beschaffenheit des Probenmaterials

Das Ausgangsmaterial für die Nachweisreaktion ist DNA und RNA, die aus Einzelproben oder Poolproben von Schweinen und Wildschweinen aus Blut, Gewebe, Tupferproben und Proben in konservierenden Transportmedien mittels geeigneter Verfahren extrahiert wurde.

10 Probenvorbereitung

Es wird empfohlen, kommerziell erhältliche Extraktionskits zu verwenden, wie z.B.:

- NukEx Mag RNA/DNA, gerbion Art. Nr. G05012
- NukEx Pure RNA/DNA, gerbion Art. Nr. G05004

Wichtig: Unabhängig vom verwendeten Probenmaterial sollte zusätzlich zu den Proben eine Wasserkontrolle (Reinstwasser) extrahiert werden, anhand derer sich eventuell auftretende Inhibitionen und Kontaminationen ablesen lassen. Diese Wasserkontrolle muss analog einer zu untersuchenden Probe behandelt werden. Außerdem dient die Wasserkontrolle der Überprüfung der Extraktionseffizienz des jeweils verwendeten Extraktionskits.

Beachten Sie bitte auch den Abschnitt „Kontrolle der Proben- und Extraktionsqualität“.

Falls die real time RT-PCR nicht sofort durchgeführt wird, müssen die Nukleinsäureextrakte entsprechend den Angaben des Extraktionskit Herstellers aufbewahrt werden.

Weitere Informationen zur Isolierung von Nukleinsäuren erhalten Sie in der Gebrauchsinformation des Extraktionskits oder vom technischen Service des Extraktionskit Herstellers.

Poolen von Proben

Bitte informieren Sie sich über den jeweils aktuellen Stand auf www.fli.de/de/publikationen/amtliche-methodensammlung.

Blutproben und Proben in konservierenden Transportmedien

Gleich große Aliquots (z.B. je 100 µl) von Einzelproben poolen und gut mischen (vortexen), anschließend nach Herstellervorschrift extrahieren.

Gewebeproben und Tupferproben

Gleich große Aliquots (z.B. je 10 µl) der Aufschlussüberstände von Einzelproben poolen und danach gut mischen (vortexen). Pool nach Herstellervorschrift extrahieren.

11 Kontrolle der Proben- und Extraktionsqualität

Der SwineFever combi real time RT-PCR Kit enthält eine Kontroll-RNA (IPC), die während der Extraktion zugefügt und im HEX-Kanal detektiert wird. Die Detektion der IPC ermöglicht das Aufdecken von Fehlern bei der Extraktion sowie möglicher Inhibitionen der PCR und gibt Aufschlüsse über die Qualität des extrahierten Probenmaterials. Dadurch wird das Risiko von falsch-negativen Ergebnissen reduziert.

11.1 Kontroll-RNA als Extraktionskontrolle

5 µl Kontroll-RNA zu jeder Extraktion zugeben (5 µl x (N+1)), gut mischen.

Führen Sie die Extraktion gemäß der Anleitung des Herstellers durch.

Die Kontroll-DNA darf nicht dem Probenmaterial zugegeben werden.

11.2 Kontroll-RNA als Inhibitionskontrolle

0,2 µl Kontroll-RNA pro Reaktion zum Mastermix zugeben (0,2 µl x (N+1)), gut mischen.

12 Real time RT-PCR

12.1 Wichtige Punkte bevor Sie starten:

- Bitte beachten sie die ‚Wichtigen Hinweise‘ auf Seite 5.
- Bevor Sie die real time RT-PCR ansetzen machen Sie sich mit dem real time PCR Gerät vertraut. Die Programmierung des Temperaturprofils sollte abgeschlossen sein, bevor die real time RT-PCR angesetzt wird.
- Beachten Sie, dass in jedem PCR Lauf mindestens eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle enthalten sein sollte.
- Alle Reagenzien müssen komplett aufgetaut, gemischt und kurz anzentrifugiert werden.

12.2 Durchführung

Die Kontroll-RNA wird als Extraktionskontrolle verwendet (siehe Kapitel 11). Der Master-Mix wird gemäß Tabelle 2 angesetzt.

Der Master-Mix enthält alle benötigten Komponenten außer der Probe. Setzen Sie für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze mindestens einen Ansatz mehr als benötigt an.

Tabelle 2: Herstellung des Mastermix

Reaktionsvolumen	Mastermix Volumen
13,8 µl Reaktionsmix	13,8 µl x (N+1)
0,2 µl Enzym	0,2 µl x (N+1)

Die Kontroll-RNA wird als Inhibitionskontrolle verwendet (siehe Kapitel 11). Der Master-Mix wird gemäß Tabelle 3 angesetzt.

Der Master-Mix enthält alle benötigten Komponenten außer der Probe. Setzen Sie für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze mindestens einen Ansatz mehr als benötigt an.

Tabelle 3: Herstellung des Mastermixes

Reaktionsvolumen	Mastermix Volumen
13,8 µl Reaktionsmix	13,8 µl x (N+1)
0,2 µl Kontroll-RNA*	0,2 µl x (N+1)
0,2 µl Enzym	0,2 µl x (N+1)

*Die durch Zugabe der Kontroll-RNA verursachte Volumenerhöhung kann vernachlässigt werden. Die Sensitivität des Nachweissystems ist dadurch nicht beeinträchtigt.

Ansetzen der real time RT-PCR

- Benötigte Anzahl optischer PCR-Reaktionsgefäße in die dafür vorgesehene Aufnahmevorrichtung des verwendeten real time PCR Geräts stellen bzw. eine optische Mikrotiterplatte verwenden.
- **14 µl** des Mastermixes in jedes Gefäß bzw. in die entsprechende Kavität der optischen Mikrotiterplatte pipettieren.
- **6 µl** der Nukleinsäureeluate (inklusive Eluate der Wasserkontrollen), der Positivkontrolle und der Negativkontrolle in die entsprechenden Gefäße bzw. in die entsprechende Kavität der optischen Mikrotiterplatte pipettieren (Tabelle 4).
- Die Reaktionsgefäße bzw. die optische Mikrotiterplatte sofort nach Zugabe der Eluate verschließen, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren.
- Bei Verwendung eines Roche 480II real time PCR Gerätes müssen die verschlossenen Gefäße bzw. die verschlossene optische Mikrotiterplatte kurz zentrifugiert werden.

Tabelle 4: Ansetzen der real time RT-PCR.

Komponente	Volumen
Mastermix	14,0 µl
Probe	6,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

12.3 Geräteeinstellungen

Für die real time RT-PCR das in Tabelle 5 beschriebene Temperaturprofil benutzen.

Tabelle 5: real time RT-PCR Temperaturprofil

Bezeichnung	Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
Reverse Transkription*	20 min	50°C	1
Initiale Denaturierung	15 min	95°C	1
Amplifikation der DNA			
Denaturierung	15 sec	95°C	45
Annealing	30 sec	57°C	
	Messung am Ende dieses Schrittes		
Elongation	30 sec	72°C	

*Das Temperaturprofil entspricht dem Profil für alle Nachweisverfahren von gerbion zur Detektion der Erreger der Klassischen Schweinepest (CSFV) und der Afrikanischen Schweinepest (ASFV).

Je nach real time PCR Gerät sind weitere Geräteeinstellungen vorzunehmen.

Tabelle 6 gibt beispielhaft eine Übersicht über die notwendigen Einstellungen bei gängigen real time PCR Geräten. Für Angaben zu Einstellungen an weiteren real time PCR Geräten kontaktieren Sie bitte unseren Service unter info@gerbion.com.

Tabelle 6: Übersicht über die notwendigen Geräteeinstellungen

Real time PCR Gerät	Parameter	Detektions-Kanal	Bemerkungen		
LightCycler 480II			Colour Compensation Kit Multiplex 1 (G070MP1-cc) wird nicht benötigt		
	Klassische Schweinepest	FAM (465-510)	Melt Factor	Quant Factor	Max Integration Time (sec)
	Kontroll-RNA (IPC)	HEX (533-580)	1	10	1
	Afrikanische Schweinepest	CY5 (618-660)	1	10	2
Stratagene Mx3000 / Mx3005	Klassische Schweinepest	FAM	Gain 8	Reference Dye: None	
	Kontroll-RNA (IPC)	HEX	Gain 1		
	Afrikanische Schweinepest	Cy5	Gain 4		
AriaMx CFX96	Klassische Schweinepest	FAM	Reference Dye: None		
	Kontroll-RNA (IPC)	HEX			
	Afrikanische Schweinepest	Cy5			
ABI 7500 QuantStudio 5	Klassische Schweinepest	FAM	Option Reference Dye ROX: NO		
	Kontroll-RNA (IPC)	JOE			
	Afrikanische Schweinepest	Cy5			
Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000 Rotor-Gene 6000	Klassische Schweinepest	Green	Gain 5		
	Kontroll-RNA (IPC)	Yellow	Gain 5		
	Afrikanische Schweinepest	Red	Gain 5		
Mic qPCR Cyclcr	Klassische Schweinepest	Green	Gain 8		
	Kontroll-RNA (IPC)	Yellow	Gain 10		
	Afrikanische Schweinepest	Red	Gain 10		

13 Interpretation der Ergebnisse

Die spezifische Amplifikation des Erregers der Klassischen Schweinepest wird im FAM-Kanal (grün) detektiert. Die Amplifikation des Erregers der Afrikanischen Schweinepest wird im Cy5-Kanal (rot) gezeigt. Die Amplifikation der Kontroll-RNA (IPC) wird im HEX-Kanal (gelb) gemessen.

Folgende Ergebnisse können auftreten:

Ct-Werte			Interpretation
FAM (grün) CSFV	Cy5 (rot) ASFV	HEX (gelb) Kontroll- RNA (IPC)	
positiv	positiv	positiv oder negativ	Positives Ergebnis, die Probe enthält RNA von CSFV und DNA von ASFV. Das Ergebnis der Kontroll-RNA ist irrelevant.
positiv	negativ	positiv oder negativ	Positives Ergebnis, die Probe enthält RNA von CSFV. Das Ergebnis der Kontroll-RNA ist irrelevant.
negativ	positiv	positiv oder negativ	Positives Ergebnis, die Probe enthält DNA von ASFV. Das Ergebnis der Kontroll-RNA ist irrelevant.
negativ	negativ	≤40*	Negatives Ergebnis, die Probe enthält weder RNA von CSFV noch DNA von ASFV. Das detektierte Signal der Kontroll-RNA schließt die Möglichkeit einer fehlerhaften Extraktion aus. Außerdem sind weder die Reverse Transkription noch die PCR komplett inhibiert.
negativ	negativ	>40*/ negativ	Es kann keine diagnostische Aussage getroffen werden. Die real time RT-PCR ist entweder inhibiert oder es traten Fehler während der Extraktion auf.

*Je nach Gerät und verwendeter Extraktionsmethode können sich die C_T Bereiche der Kontroll-RNA verschieben. Als Referenz dient der C_T-Wert der ebenfalls extrahierten Wasserkontrolle. Unterscheidet sich der C_T-Wert der Wasserkontrolle im HEX-Kanal stark von dem der Probe (>3 C_T), so liegt eine teilweise Inhibition vor, die dazu führen kann, dass schwach positive Proben nicht erkannt werden (siehe „Troubleshooting“, Seite 14).

Abbildung 1 und Abbildung 2 zeigen Beispiele für positive und negative real time RT-PCR Ergebnisse.

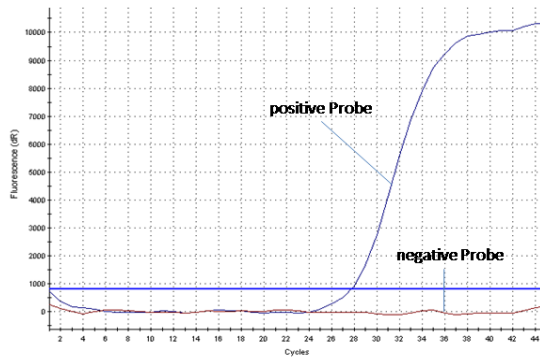


Abbildung 1: Die positive Probe zeigt eine starke Amplifikation im spezifischen FAM-/ Cy5 Kanal, während bei der negativen Probe kein Fluoreszenzsignal detektiert wird.

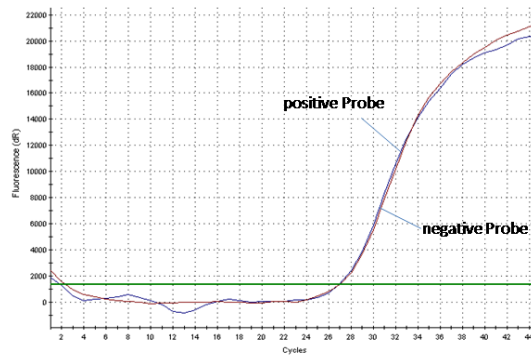


Abbildung 2: Im HEX-Kanal zeigen sowohl die positive als auch die negative Probe ein Signal auf. In diesem Fall liegt keine Inhibition der real time RT-PCR vor, auch verlief die Extraktion erfolgreich. Die negative Probe ist somit als tatsächlich negativ zu werten.

14 Validierung

Negativkontrolle

Die Negativkontrolle muss im FAM-Kanal (grün) und im Cy5-Kanal (rot) unterhalb des Thresholds liegen. Bei einer potentiellen Kontamination dieser Kontrolle (Auftreten einer Kurve) sind die Ergebnisse des Testes nicht auswertbar. Der Test muss wiederholt werden.

Positivkontrolle

Die Positivkontrolle muss im FAM-Kanal (grün) einen positiven Kurvenverlauf zeigen. Der C_T Wert der Positivkontrolle muss <30 betragen. Die Positivkontrolle muss im Cy5-Kanal (rot) einen positiven Kurvenverlauf zeigen. Der C_T -Wert der Positivkontrolle muss <30 betragen. Eine Positivkontrolle außerhalb dieses Bereichs gibt einen Hinweis auf ein Problem bei der Amplifikation. In diesem Fall muss der Test wiederholt werden.

Kontroll-RNA

Alle Extraktionskontrollen müssen im HEX-Kanal (gelb) einen positiven Kurvenverlauf zeigen. Die C_T -Werte der Extraktionskontrollen müssen ≤ 40 betragen. Ein Signal der Extraktionskontrolle $>C_T 40$ deutet auf ein Problem mit der Probenvorbereitung/Probenextraktion hin. Wurde eine Wasserkontrolle mitgeführt, muss hier der C_T -Wert ≤ 37 betragen. Außerdem sollte der Verlauf der Amplifikationskurven berücksichtigt werden. Ein flacher Kurvenverlauf bzw. ein um $>60\%$ verringertes Fluoreszenzsignal im Vergleich zur Wasserkontrolle deuten ebenfalls auf eine Inhibition hin.

Positive Proben können zu einer Inhibition im HEX-Kanal führen. In diesem Fall ist das Ergebnis der Probe valide.

Hinweis: Bei Verwendung der im Abschnitt „Probenvorbereitung“ genannten empfohlenen Extraktionskits sind niedrigere C_T -Werte für die Kontroll-RNA (IPC) zu erwarten. Im Rahmen der Validierung der SwineFever combi real time RT-PCR wurden regelmäßig C_T -Werte ≤ 35 ermittelt.

15 Grenzen der Methode

Die SwineFever combi real time RT-PCR kann nicht direkt mit biologischen Materialien durchgeführt werden. Vor der Anwendung des Tests müssen geeignete Nukleinsäure-Extraktionsverfahren durchgeführt werden.

Wie bei jedem in vitro diagnostischen Test müssen die Ergebnisse, die mit dem SwineFever combi real time RT-PCR Kit erzielt wurden, immer in Verbindung mit dem klinischen Bild betrachtet werden. Ein negatives Testresultat kann eine Infektion mit dem Erreger der Afrikanischen Schweinepest bzw. dem Erreger der Klassischen Schweinepest nicht ausschließen.

16 Troubleshooting

Der folgende Troubleshooting Guide soll bei eventuell auftretenden Problemen mit der real time RT-PCR behilflich sein. Sollten Sie weitere Fragen haben, wenden Sie sich bitte an unsere Wissenschaftler unter info@gerbion.com.

Kein Fluoreszenzsignal im FAM- oder Cy5-Kanal der Positivkontrolle

Der gewählte Kanal entspricht nicht dem im Protokoll angegebenen	Wählen Sie den FAM-Kanal für die Analyse der klassischen Schweinepest-spezifischen Amplifikation, den Cy5-Kanal für die Analyse der afrikanischen Schweinepest-spezifischen Amplifikation und den HEX-Kanal für die Amplifikation der Kontroll-RNA (IPC).
Fehlerhaftes Ansetzen der real time RT-PCR	Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte und vergleichen Sie diese mit den in „Durchführung“ auf den Seiten 7 ff. beschriebenen.
Fehlerhaftes real time RT-PCR Temperaturprofil	Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit dem Protokoll Tabelle 5 auf Seite 9.
Falsche Lagerbedingungen des Kits oder abgelaufenes Haltbarkeitsdatum	Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Haltbarkeitsdatum auf dem Kietikett. Falls nötig, benutzen Sie einen neuen Kit und lagern Sie alle Komponenten wie auf Seite 5 unter „Transport, Lagerung und Haltbarkeit“ beschrieben.

Schwaches oder kein Signal der Kontroll-RNA (IPC) und gleichzeitiges Ausbleiben eines Signals im FAM- oder Cy5-Kanal














Die real time RT-PCR-Bedingungen stimmen nicht mit den im Protokoll beschriebenen überein	Überprüfen Sie die real time PCR-Bedingungen (Seite 9).
real time PCR Inhibition	Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode benutzen (siehe „Proben-vorbereitung“, Seite 5) und beachten Sie die Herstellerangaben. Stellen Sie sicher, dass ethanolhaltige Waschpuffer vollständig entfernt wurden (ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt wird empfohlen). Bei Verwendung einer Magnetpartikelextraktion sollte das Abdampfen von Ethanolresten gewährleistet sein, bevor das Eluat in die real time RT-PCR eingesetzt wird.
real time PCR Inhibition	Als Alternative zu einer erneuten Extraktion inhibierter Proben empfehlen wir die Verdünnung der entsprechenden Eluate 1:3 in Wasser (PCR-grade, nukleasefrei) und die anschließende Wiederholung der real time RT-PCR.

Verlust der RNA/ DNA während des Aufarbeitungsprozesses	Das Ausbleiben eines Signals deutet auf eine fehlerhafte Extraktion hin. Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode verwenden. Halten Sie sich an das Herstellerprotokoll.
Falsche Lagerbedingungen des Kits oder abgelaufenes Haltbarkeitsdatum	Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Haltbarkeitsdatum auf dem Kitetikett. Falls nötig, benutzen Sie einen neuen Kit und lagern Sie alle Komponenten wie auf Seite 5 unter „Transport, Lagerung und Haltbarkeit“ beschrieben.

Detektion eines Signals im FAM- oder Cy5-Kanal der Negativkontrolle

Kontamination des real time PCR Ansatzes	<p>Wiederholen Sie die real time RT-PCR in Replikaten. Falls das Ergebnis der Wiederholungen negativ sein sollte, so ereignete sich die Kontamination während der Befüllung der Reaktionsgefäße.</p> <p>Stellen Sie sicher, dass Sie die Positivkontrolle zuletzt pipettieren und verschließen Sie die Reaktionsgefäße sofort nachdem Sie die jeweilige Probe zugegeben haben. Falls die Negativkontrolle in der Wiederholung wieder ein Signal im FAM- oder Cy5-Kanal ergibt, deutet dies darauf hin, dass eine oder mehrere Kitkomponenten kontaminiert sind. Stellen Sie sicher, dass die Arbeitsbereiche und die Geräte regelmäßig dekontaminiert werden. Wiederholen Sie die real time RT-PCR mit einem neuen Kit.</p>
--	---

17 Abkürzungen und Symbole

DNA	Desoxyribonukleinsäure		Artikelnummer
RNA	Ribonukleinsäure		Inhalt ausreichend für x Prüfungen
PCR	Polymerase Ketten Reaktion		Gebrauchsinformation beachten
ASFV	African Swine Fever Virus		Obere Temperaturbegrenzung
CSFV	Classical Swine Fever Virus		Hersteller
	Reaktionsmix		Verwendbar bis JJJ-MM-TT
	Positivkontrolle		Chargenbezeichnung
	Negativkontrolle		Inhalt
	Enzym		
	Kontroll-RNA (IPC)		