

## Gebrauchsinformation

# virellaCSFV seqc

## real time RT-PCR Kit

In vitro Veterinärdiagnostikum zum Nachweis 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 082



G01124-96

G01124-384



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](mailto:info@gerbion.com)  
[www.gerbion.com](http://www.gerbion.com)



## Inhaltsverzeichnis

1	Anwendungszweck .....	3
2	Anwendungsbereich .....	3
3	Testprinzip .....	3
4	Komponenten .....	4
5	Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte .....	4
6	Transport, Lagerung und Haltbarkeit .....	4
7	Wichtige Hinweise .....	5
8	Allgemeine Hinweise.....	5
9	Art und Beschaffenheit des Probenmaterials .....	5
10	Probenvorbereitung.....	5
11	Kontrolle der Proben- und Extraktionsqualität .....	7
11.1	Kontroll-RNA als Extraktionskontrolle.....	7
12	Real time RT-PCR .....	7
12.1	Wichtige Punkte bevor Sie starten:.....	7
12.2	Durchführung.....	7
12.3	Geräteeinstellungen.....	8
13	Interpretation der Ergebnisse .....	10
14	Validierung.....	12
15	Grenzen der Methode .....	12
16	Troubleshooting.....	13
17	Kit Performance .....	15
17.1	Analytische Sensitivität - CSFV .....	15
17.2	Analytische Sensitivität – Interne Systemkontrolle (ISC).....	16
17.3	Linearität .....	16
17.4	Analytische Spezifität und Sensitivität - Zusammenfassung .....	17
17.5	Präzision .....	17
18	Abkürzungen und Symbole .....	18

## 1 Anwendungszweck

In vitro Veterinärdiagnostikum zum Nachweis 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 werden in jeder Nachweisreaktion eine Interne Prozesskontrolle (Extraktionskontrolle, IPC) und eine Interne Systemkontrolle ( $\beta$ -Actin, ISC) koamplifiziert.

Das Zusammenführen (Poolen) von Proben ist nach Maßgabe der Amtlichen Methodensammlung ([www.fli.de/de/publikationen/amtliche-methodensammlung](http://www.fli.de/de/publikationen/amtliche-methodensammlung)) möglich.

## 2 Anwendungsbereich

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 dass 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 *virellaCSFV seqc real time RT-PCR* Kit enthält spezifische Primer und fluoreszenzfarbstoffmarkierte Sonden und zusätzliches Material zum simultanen Nachweis der RNA des Erregers der Klassischen Schweinepest (Classical Swine Fever Virus, CSFV), der Internen Prozesskontrolle und der Internen Systemkontrolle mittels real time RT-PCR in offenen real time PCR Systemen (z.B. Stratagene Mx3000/3005, Agilent Aria Mx, Roche LightCycler 480II, LifeTechnologies ABI 7500, QuantStudio, Qiagen Q-Cycler, BioRad CFX96, BMS Mic qPCR Cycler).

Die Detektion der Amplifikation erfolgt in Echtzeit durch die Hybridisierung und anschließende Hydrolyse der CSFV-spezifischen FAM-markierten Fluoreszenz-Sonden. Der *virellaCSFV seqc real time RT-PCR* Kit verfügt über eine Kontroll-RNA, die während der Extraktion zugefügt und in einem heterologen Amplifikationssystem

nachgewiesen wird. Die Detektion der Amplifikation der revers transkribierten Kontroll-RNA (Interne Prozesskontrolle, IPC) erfolgt im HEX-Kanal.

Darüber hinaus wird in einem weiteren heterologen Amplifikationssystem ein zellulärer Genbereich ( $\beta$ -Actin, Interne Systemkontrolle, ISC) amplifiziert. Die Detektion der Amplifikation der ISC erfolgt im ROX-Kanal. Die Kontrolle der Proben- und Extraktionsqualität (seqc – sample and extraction quality control) mit Hilfe der ISC und IPC ermöglicht das Aufdecken von Fehlern bei der Extraktion, mögliche inhibitorische Effekte in der PCR und gibt Aufschlüsse über die Qualität des extrahierten zellhaltigen Probenmaterials.

#### 4 Komponenten

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

Tabelle 1: Komponenten des virellaCSFV seqc real time RT-PCR Kit.

Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt G01124-96	Inhalt G01124-384
Reaktionsmix	gelb	1 x 1325 $\mu$ l	4 x 1325 $\mu$ l
Enzym	blau	1 x 19,2 $\mu$ l	4 x 19,2 $\mu$ l
Positivkontrolle	rot	1 x 150 $\mu$ l	1 x 150 $\mu$ l
Negativkontrolle	grün	1 x 150 $\mu$ l	1 x 150 $\mu$ l
Kontroll-RNA	farblos	1 x 480 $\mu$ l	4 x 480 $\mu$ l

#### 5 Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- Extraktionskit (z.B. NukEx Mag RNA/DNA, gerbion Art. Nr. G05012)
- 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 virellaCSFV seqc real time RT-PCR Kit erfolgt gefroren auf Trockeneis oder auf Kühllakkus. Alle Komponenten des virellaCSFV seqc real time RT-PCR Kit sind direkt nach Erhalt lichtgeschützt bei  $-18^{\circ}\text{C}$  oder niedrigeren Temperaturen zu lagern. Nach Ablauf des auf der Packung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden!

Nach Anbruch der Reagenzien können diese bei +2°C bis +8°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 Verwendung vor direktem Sonnenlicht schützen.

## **7 Wichtige Hinweise**

- Die virellaCSFV seqc 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 virellaCSFV seqc real time RT-PCR Kit dürfen nicht zusammen verwendet werden.

## **9 Art und Beschaffenheit des Probenmaterials**

Das Ausgangsmaterial für die Nachweisreaktion ist 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
- QIAamp® cador® Pathogen Mini Kit, Qiagen Art. Nr. 54104/54106

**Wichtig:** Unabhängig vom verwendeten Probenmaterial sollte zusätzlich zu den Proben eine Wasserkontrolle (Reinstwasser) extrahiert werden, anhand derer sich eventuell auftretende Inhibitionen und Kontaminationen beurteilen lassen. Diese

Wasserkontrolle muss analog einer zu untersuchenden Probe behandelt werden. Ein verspätetes Erreichen des  $C_T$ -Wertes der IPC (HEX-Kanal) im Eluat einer Probe von  $>4$   $C_T$  im Vergleich zum  $C_T$ -Wert der IPC im Eluat des extrahierten Wassers deutet auf die Anwesenheit von Inhibitoren in der Nachweisreaktion hin.

**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](http://www.fli.de/de/publikationen/amtliche-methodensammlung).

#### **Blutproben und Proben in konservierenden Transportmedien**

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

#### **Gewebeproben und Tupferproben**

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

## 11 Kontrolle der Proben- und Extraktionsqualität

Der virellaCSFV seqc real time RT-PCR Kit enthält eine Kontroll-RNA (IPC), die während der Extraktion zugefügt und im HEX-Kanal detektiert wird. Im ROX-Kanal wird die Amplifikation eines zellulären Genbereiches ( $\beta$ -Actin, Interne Systemkontrolle, ISC) detektiert. Die Detektion der beiden Kontrollen ermöglicht das Aufdecken von Fehlern bei der Extraktion sowie möglicher Inhibitionen der RT-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  $\mu$ l Kontroll-RNA zu jeder Extraktion zugeben (5  $\mu$ l x (N+1)), gut mischen.

Führen Sie die Extraktion gemäß der Anleitung des Herstellers durch.

**Die Kontroll-RNA darf nicht dem Probenmaterial zugegeben werden.**

## 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 (außer Enzym) müssen komplett aufgetaut, gemischt und kurz an zentrifugiert werden.

### 12.2 Durchführung

Tabelle 2: Herstellung des Mastermix

Reaktionsvolumen	Mastermix Volumen
13,8 $\mu$ l Reaktionsmix	13,8 $\mu$ l x (N+1)
0,2 $\mu$ l Enzym	0,2 $\mu$ l x (N+1)

### 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  $\mu$ l** 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.
- Die Reaktionsgefäße bzw. die optische Mikrotiterplatte sofort nach Zugabe der Eluate verschließen, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren.

Tabelle 3: 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 4 beschriebene Temperaturprofil benutzen.

Tabelle 4: real time RT-PCR Temperaturprofil

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

Je nach real time PCR Gerät sind weitere Geräteeinstellungen vorzunehmen.



Tabelle 5 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](mailto:info@gerbion.com).

Tabelle 5: Übersicht über die notwendigen Geräteeinstellungen

Real time PCR Gerät	Parameter	Detektions-Kanal	Bemerkungen		
LightCycler 480II			Colour Compensation Kit Multiplex 1 (G070MP1-CC) wird benötigt		
			Melt Factor	Quant Factor	Max Integration Time (sec)
	CSFV	FAM (465-510)	1	10	1
	IPC	HEX (533-580)	1	10	2
	ISC	ROX (533-610)	1	10	2
Stratagene Mx3000 / Mx3005	CSFV	FAM	Gain 4		
	IPC	HEX	Gain 1	Reference Dye: None	
	ISC	ROX	Gain 1		
AriaMx CFX96	CSFV	FAM			
	IPC	HEX	Reference Dye: None		
	ISC	ROX			
ABI 7500 ABI Step One QuantStudio	CSFV	FAM			
	IPC	HEX	Option Reference Dye ROX: NO		
	ISC	ROX			
Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000 Rotor-Gene 6000	CSFV	Green	Gain 5		
	IPC	Yellow	Gain 5		
	ISC	Orange	Gain 5		
Mic qPCR Cycler	CSFV	Green	Gain 8		
	IPC	Yellow	Gain 10		
	ISC	Orange	Gain 10		

### 13 Interpretation der Ergebnisse

Die Amplifikation der RNA von CSFV wird im FAM-Kanal (grün) gezeigt. Die Amplifikation der Kontroll-RNA (IPC) wird im HEX-Kanal (gelb) gemessen. Die Detektion der Amplifikation der Internen Systemkontrolle (ISC) erfolgt im ROX-Kanal

Folgende Ergebnisse können auftreten:

Ct-Werte			Interpretation
FAM (grün) CSFV	HEX (gelb) IPC	ROX (orange) ISC	
positiv	positiv oder negativ	positiv oder negativ	<b>Positives Ergebnis, die Probe enthält RNA von CSFV. Valides Resultat.</b> Die Ergebnisse der IPC und ISC sind irrelevant.
negativ	positiv	positiv	<b>Negatives Ergebnis, die Probe enthält keine RNA von CSFV. Valides Resultat.</b>
negativ	negativ	positiv	<b>Extraktionsprobleme oder PCR-Inhibition. Invalides Resultat.</b> Probe verdünnen (1:3 bis 1:5) oder nochmals extrahieren und RT-PCR wiederholen.
negativ	positiv	negativ	<b>Nicht genügend oder schlechtes Probenmaterial. Invalides Resultat.</b> Frisches Probenmaterial extrahieren und RT-PCR wiederholen.
negativ	negativ	negativ	<b>Invalides Resultat.</b> 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<sub>T</sub>-Bereiche der Kontroll-RNA etwas verschieben. Als Referenz dient der C<sub>T</sub>-Wert der ebenfalls extrahierten Wasserkontrolle. Unterscheidet sich der C<sub>T</sub>-Wert der Wasserkontrolle im HEX-Kanal stark von dem der Probe (>4 C<sub>T</sub> verspätet auftretendes Signal im Vergleich zur Wasserkontrolle), so liegt eine teilweise Inhibition vor, die dazu führen kann, dass schwach positive Proben nicht erkannt werden (siehe „Troubleshooting“, Seite 13).

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

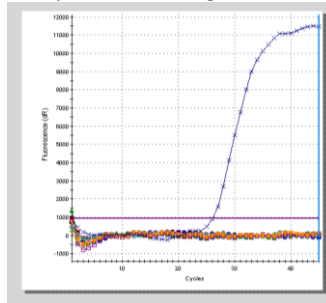


Abbildung 1a: Die positive Probe zeigt eine starke Amplifikation im spezifischen FAM-Kanal, während bei den negativen Proben kein Fluoreszenzsignal detektiert wird.

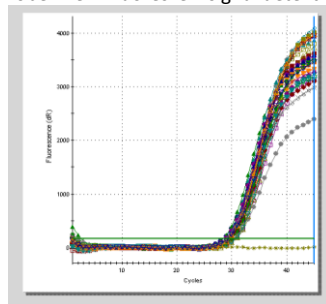


Abbildung 1b: Im HEX-Kanal wird die IPC gemessen. Im Normalfall sollte die IPC ohne große Varianz immer an derselben Stelle den Threshold überschreiten. Im Fall eines späteren  $C_T$ -Wertes der IPC kann von einer Inhibition und/oder Problemen bei der Extraktion ausgegangen werden.

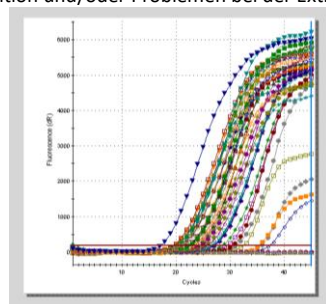


Abbildung 1c: Im ROX-Kanal wird die ISC detektiert. Hierbei können, abhängig von der Qualität und Quantität der DNA im Probenmaterial, sehr unterschiedliche  $C_T$ -Werte gemessen werden.

## 14 Validierung

### Negativkontrolle

Die Negativkontrolle muss im FAM-Kanal (grün) 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. Eine Positivkontrolle außerhalb dieses Bereichs gibt einen Hinweis auf ein Problem bei der reversen Transkription und/oder Amplifikation. In diesem Fall muss der Test wiederholt werden.

### Interne Systemkontrolle, ISC

Die ISC muss im ROX-Kanal (orange) einen positiven Kurvenverlauf zeigen. Die  $C_T$ -Werte sollten hierbei unter 35 liegen. Höhere  $C_T$ -Werte deuten auf zu wenig oder zu stark zersetztes Probenmaterial in der Extraktion hin.

Stark positive CSFV Proben können zu einem Ausfall der Amplifikation der ISC führen. Umgekehrt wurde ein kompetitiver Effekt auf schwach positive CSFV Proben, ausgelöst durch eine starke Beladung eines Eluates mit zellulärer DNA, experimentell ausgeschlossen.

### Interne Prozesskontrolle, IPC

Die IPC muss im HEX-Kanal (gelb) einen positiven Kurvenverlauf zeigen. Die  $C_T$ -Werte der IPC in Reaktionsansätzen mit Eluates aus Probenmaterial sollten maximal 4  $C_T$ -Werte später als die  $C_T$ -Werte in Reaktionsansätzen mit eluierter Wasserkontrolle auftreten. Stark positive Proben im FAM-Kanal können zu einer Inhibition im HEX- und/oder ROX-Kanal führen. In diesem Fall ist das Ergebnis der Probe valide.

## 15 Grenzen der Methode

Testergebnisse sind immer in Zusammenhang mit dem klinischen Bild zu sehen. Ein negatives Testresultat kann eine Infektion mit CSFV nicht ausschließen. Die diagnostische Sensitivität bei sehr schwach positiven Proben kann anhand der Durchführung von Doppelsätzen weiter erhöht werden.

## 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](mailto:info@gerbion.com).

### Kein Fluoreszenzsignal im FAM-Kanal der Positivkontrolle

Der gewählte Kanal entspricht nicht dem im Protokoll angegebenen	Wählen Sie den FAM-Kanal für die Analyse der CSFV-spezifischen Amplifikation, den ROX-Kanal für die Amplifikation der ISC und den HEX- Kanal für die Amplifikation der IPC.
Fehlerhaftes Ansetzen der real time 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 4 auf Seite 8.
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 4 unter „Transport, Lagerung und Haltbarkeit“ beschrieben.

### Schwaches oder kein Signal der Kontroll-RNA und gleichzeitiges Ausbleiben eines Signals im FAM-Kanal

Die real time RT-PCR-Bedingungen stimmen nicht mit den im Protokoll beschriebenen überein	Überprüfen Sie die real time RT-PCR-Bedingungen (Seite 7).
real time RT-PCR Inhibition	Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode benutzen (siehe „Probenvorbereitung“, Seite 5) und beachten Sie die Herstellerangaben. Stellen Sie sicher, dass ethanolhaltige Waschpuffer vollständig entfernt wurden. Bei Verwendung einer Magnetpartikelextraktion sollte das Abdampfen von Ethanolresten gewährleistet sein, bevor das Eluat in die real time RT-PCR eingesetzt wird.
Verlust der RNA während des Aufarbeitungsprozesses	Das Ausbleiben eines Signals deutet auf eine fehlerhafte Extraktion hin. Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode verwenden. Beachten Sie 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 4 unter „Transport, Lagerung und Haltbarkeit“ beschrieben.
---	--

---

**Schwaches oder kein Signal im ROX-Kanal und gleichzeitiges Ausbleiben eines Signals im FAM-Kanal sowie starkes Signal der Kontroll-RNA (IPC) im HEX-Kanal**

---

Ungenügende Probenmenge	Wiederholen Sie die Extraktion mit einer größeren Menge an Probenmaterial.
Ungenügende Probenqualität bzw. ungenügender Probenaufschluss	Überprüfen Sie die Haltbarkeit des genutzten Extraktionskits. Falls Sie eine Gewebeprobe extrahieren, stellen Sie sicher, dass das Gewebe mechanisch oder enzymatisch aufgeschlossen wird.

---

**Detektion eines Signals im FAM-Kanal der Negativkontrolle**

---

Kontamination des real time RT-PCR Ansatzes	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.  Falls die Negativkontrolle in der Wiederholung wieder ein Signal im FAM-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.
---	---

---

## 17 Kit Performance

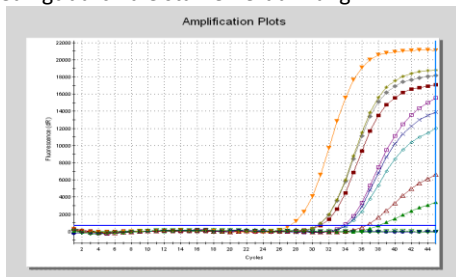
### 17.1 Analytische Sensitivität - CSFV

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection (LoD)) der virellaCSFV seqc real time RT-PCR wurde anhand der Amplifikation serieller Verdünnungen eines CSFV-IVT mit bekannter Konzentration mittels eines Stratagene Mx3005P real time PCR Instrumentes ermittelt. Die LoD der virellaCSFV seqc real time RT-PCR liegt bei 1 Kopie pro Reaktionsansatz.

Tabelle 6: Werte der Prüfung der Nachweisgrenze der virellaCSFV seqc real time RT-PCR anhand einer Verdünnungsreihe – FAM-Kanal (CSFV).

Probenbezeichnung	Konzentration Kopien / Reaktion	C <sub>T</sub> -Wert
		FAM-Kanal
IVT CSFV	100	31,72
		31,77
		31,87
IVT CSFV	10	34,06
		34,02
		34,01
IVT CSFV	1	37,00
		38,08

Die Nachweisgrenze der virellaCSFV seqc real time RT-PCR für CSFV liegt bei 1 Kopie pro RT-PCR-Ansatz. Ein Ausfall der Amplifikation bei 1 Genomkopie pro Reaktionsansatz in einem der 3 Replikate ist nicht auf die mangelnde Sensitivität der RT-PCR zurückzuführen, sondern eine Folge des Pipettierfehlers (sampling error) bedingt durch die starke Verdünnung.



Die beiden letzten Amplifikationskurven mit 1 Kopie im Reaktionsansatz im Original Screenshot (Stratagene Mx3005P) zeigen, dass die Effizienz der virellaCSFV seqc real time RT-PCR geeignet ist, auch sehr niedrige Kopienzahlen zuverlässig zu detektieren.

### 17.2 Analytische Sensitivität – Interne Systemkontrolle (ISC)

Die Sensitivität der virellaCSFV seqc real time RT-PCR für die interne Systemkontrolle wurde anhand einer Verdünnungsreihe der ISC-Zielsequenz mit bekannter Konzentration im 3-fach Ansatz getestet.

Die Nachweisgrenze der virellaCSFV seqc real time RT-PCR für die interne Systemkontrolle liegt bei 1 Kopie pro RT-PCR Ansatz.

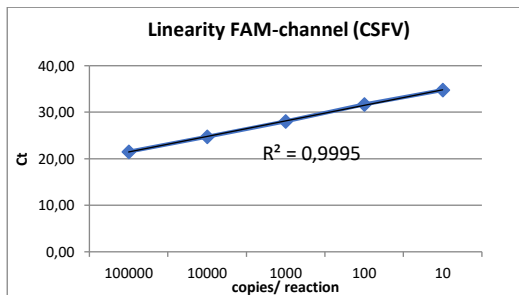
Tabelle 7: Werte der Prüfung der Nachweisgrenze der virellaCSFV seqc real time RT-PCR anhand einer Verdünnungsreihe – ROX-Kanal (ISC).

Probenbezeichnung	Konzentration Kopien / Reaktion	C <sub>T</sub> -Wert
		ROX-Kanal
gBlock ISC	1000	27,48
		27,07
		27,13
gBlock ISC	100	30,94
		30,56
		30,78
gBlock ISC	10	34,32
		34,26
		34,33
gBlock ISC	1	37,33
		38,21
		37,65

### 17.3 Linearität

Die Linearität wurde mittels Verdünnungsreihen ermittelt.

Der R<sup>2</sup>-Wert der virellaCSFV seqc real time RT-PCR für den FAM-Kanal (CSFV) liegt bei 0,9995. Die Effizienz beträgt 99,2239 %.





Der R<sup>2</sup>-Wert der virellaCSFV seqc real time RT-PCR für den ROX-Kanal (ISC) liegt bei 0,9996. Die Effizienz beträgt 108,066 %.

#### 17.4 Analytische Spezifität und Sensitivität - Zusammenfassung

Die analytische Spezifität und Sensitivität wurden mit definierten Referenz- und Feldproben, die sowohl positiv als auch negativ für CSFV waren, sowie definierten Ringversuchs- und Feldproben, die positiv für andere Krankheitserreger waren, ermittelt. Die analytische Spezifität und Sensitivität der virellaCSFV seqc real time RT-PCR liegen bei jeweils 100 %.

Tabelle 8: Sensitivität und Spezifität der virellaCSFV seqc real time RT-PCR.

	positive Proben	negative Proben
virellaCSFV seqc positiv	39	0
virellaCSFV seqc negativ	0	129
	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
	100	100

#### 17.5 Präzision

Die Präzision der virellaCSFV seqc real time RT-PCR wurde anhand der Intra-Assay Variabilität und der Inter-Chargen Variabilität ermittelt. Daten zur Variabilität werden anhand der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten dargestellt.














Tabelle 1: Präzision der virellaCSFV seqc real time RT-PCR.

CSFV (FAM)	Kopien/Reaktion	Standardabweichung	Variationskoeffizient [ %]
Intra-Assay Variabilität	10	0,37	1,07
Inter-Chargen Variabilität	10	0,61	1,76

IPC (HEX)	Kopien/Reaktion	Standardabweichung	Variationskoeffizient [ %]
Intra-Assay Variabilität	100	0,26	0,92
Inter-Chargen Variabilität	100	0,31	1,10

ISC (ROX)	Kopien/Reaktion	Standardabweichung	Variationskoeffizient [ %]
Intra-Assay Variabilität	100	0,50	1,83
Inter-Chargen Variabilität	100	0,19	0,68

## 18 Abkürzungen und Symbole

RNA	Ribonukleinsäure		Artikelnummer
DNA	Desoxyribonukleinsäure		Inhalt ausreichend für x Prüfungen
PCR	Polymerase Ketten Reaktion		Gebrauchsinformation beachten
RT	Reverse Transkription		Obere Temperaturbegrenzung
CSFV	Classical Swine Fever Virus		Hersteller
seqc	sample and extraction quality control		Verwendbar bis JJJJ-MM-TT
ISC	Interne Systemkontrolle		Chargenbezeichnung
IVT	in vitro transcript		Inhalt
	Enzym		
	Reaktionsmix		
	Positivkontrolle		
	Negativkontrolle		
	Kontroll-RNA (IPC)		