

RealPCR* Technischer Leitfaden

Inhaltsverzeichnis

Inhalt

Polymerasekettenreaktion (PCR)	3
PCR-DNA-Synthesesyklus	3
Echtzeit-PCR (qPCR)	4
Formate der Echtzeit-PCR-Nachweise	6
Nukleinsäureextraktion	7
Die modulare RealPCR-Plattform.....	8
Standardisiertes Protokoll für DNA und RNA	8
Empfehlungen für Echtzeit-PCR-Instrumente	8
Methoden zur RealPCR-Probenextraktion	10
RealPCR-Kontrollen	11
Das RealPCR*-Laborüberwachungsset	14
Analysezertifikate und Packungsbeilagen	15
Anforderungen an die Komponentenaufbewahrung	16
Verpackung – Komponentenbeschriftung und Deckelfarbsystem	16
Assay-Vorbereitung	17
Echtzeit-PCR-Analyse und Interpretation.....	17
Häufig gestellte Fragen.....	18
Modulare RealPCR-Plattform und Komponenten	18
Extraktion	18
PCR	19
Anforderungen an den Thermocycler	21
Begriffsbestimmungen	22

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Alle lebenden Organismen enthalten DNA oder RNA als genetisches Material. Basierend auf der Sequenz des genetischen Materials ist es möglich, bestimmte Organismen und/oder Viren in einer Probe zu identifizieren. Die Menge der DNA ist in der Regel zu niedrig, um direkt in einer Probe nachweisbar zu sein; die PCR wird verwendet, um die nachweisbaren Konzentrationen der DNA zu amplifizieren.

Ein RNA-Template wird zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt und dann wird die PCR durchgeführt. Dieser Prozess wird reverse Transkription-PCR (RT-PCR) genannt.

Es gibt mehrere grundlegende Komponenten für die PCR:

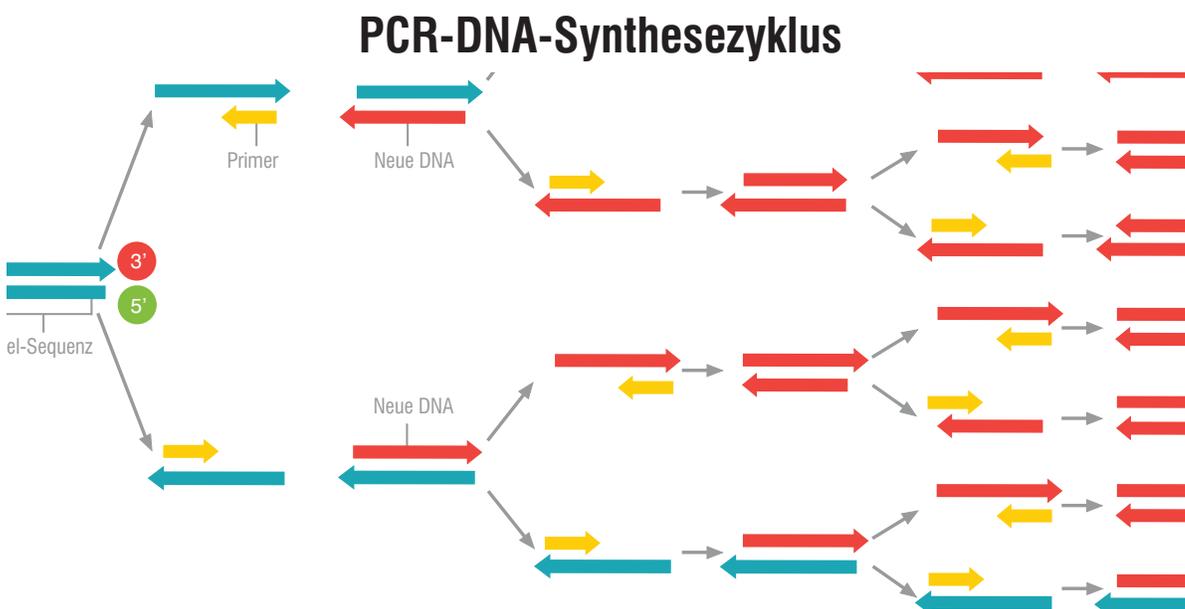
1. Master-Mix: DNA-Polymerase (Enzym, das DNA synthetisieren kann), freie dNTPs (DNA-Bausteine für einen neuen DNA-Strang), Puffer (mit $MgCl_2$) und Reverse Transkriptase (im Fall von RNA-Zielen)
2. Primer: Kurze synthetische DNA-Oligonukleotide, die die Elongation einleiten und den zu amplifizierenden Bereich der DNA definieren
3. Positivkontrolle: Enthält das Testziel und bestätigt, dass die PCR erfolgreich war
4. Negativkontrolle (PCR-Wasser): Indiziert eine Kontamination, sofern positiv

PCR ist ein stufenweiser Prozess, der je nach Programm und PCR-Instrument 1–2 Stunden dauert:

1. Schmelzen (Melting): Die doppelsträngige DNA in der Probe wird bei hoher Temperatur denaturiert (geschmolzen), um einsträngige DNA zu erhalten.
2. Anlagerung (Annealing): Spezifische Primer lagern sich an vorbestimmte Regionen der einsträngigen DNA an.
3. Verlängerung (Elongation): Die DNA-Polymerase verlängert die Primer durch Hinzufügen freier dNTPs.

Nach der PCR wurde die DNA-Ausgangssprobe (elterliche DNA) exponentiell amplifiziert und kann nachgewiesen werden (Abbildung 1). Bei der herkömmlichen PCR erfolgt der Nachweis durch die Gelelektrophorese und DNA-Färbung. Bei der Echtzeit-PCR erfolgt der Nachweis zur gleichen Zeit wie die Amplifikation durch Überwachung der Fluoreszenz nach jedem Heiz- und Kühlzyklus.

Abbildung 1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

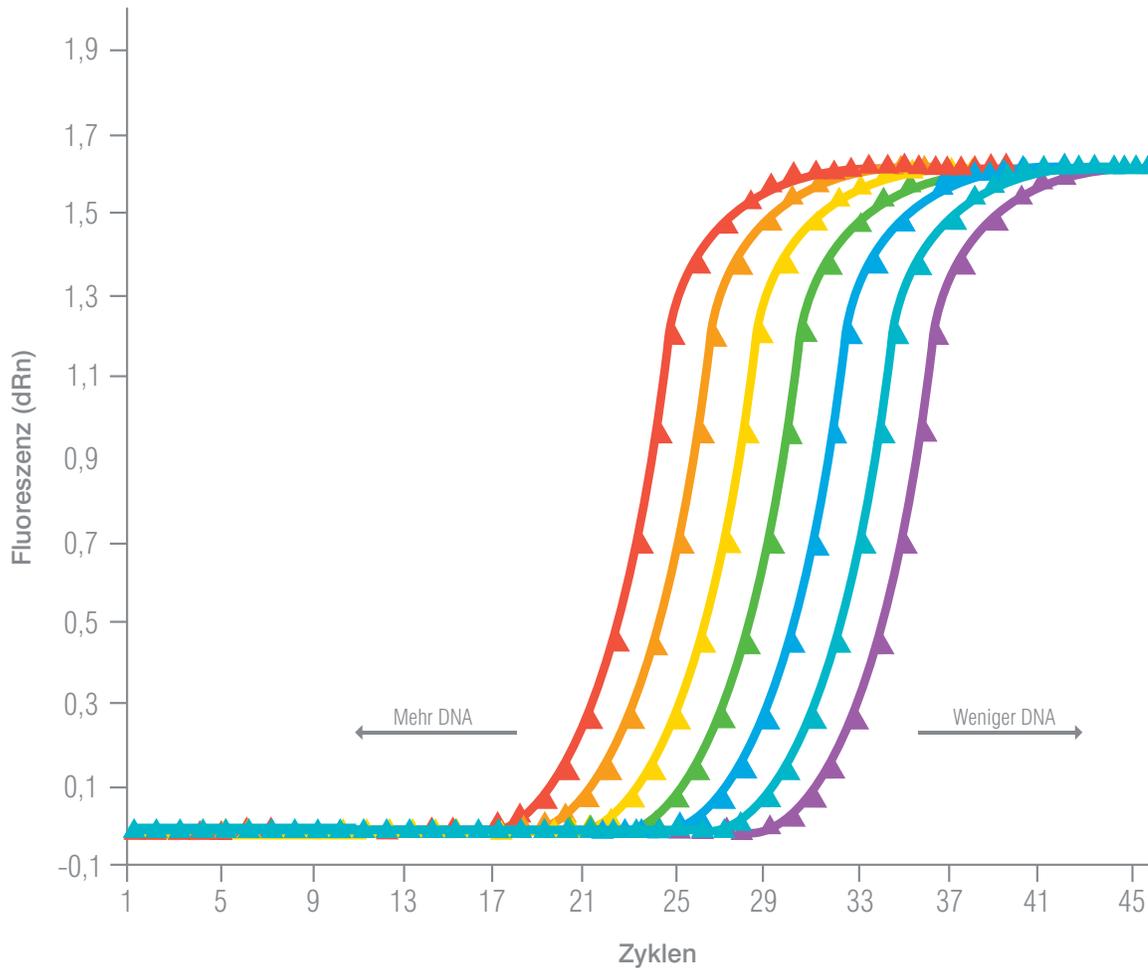


Echtzeit-PCR (qPCR)

Echtzeit-PCR, auch als quantitative oder qPCR bezeichnet, nutzt sowohl Primer als auch Sonden zum Nachweis der Zielnukleinsäure in einer Probe. Sonden sind ähnlich wie Primer, enthalten jedoch zusätzlich Fluoreszenzfarbstoffe, die zum Nachweis des amplifizierten Ziels verwendet werden. Nach jedem qPCR-Zyklus wird die Fluoreszenz in einer Amplifikationskurve überwacht.

Abbildung 2. Echtzeit-PCR-Amplifikationskurve

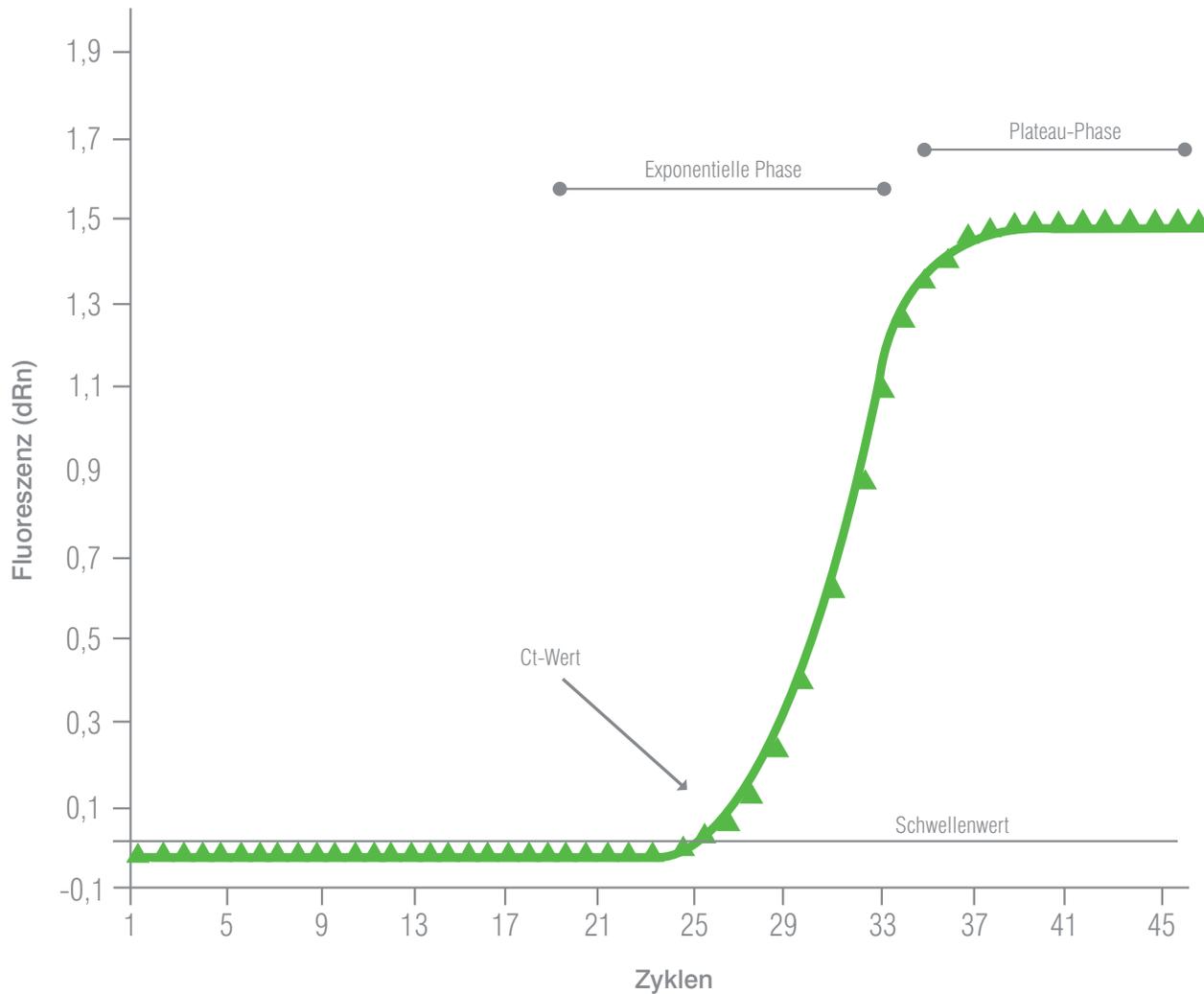
Amplifikationsplots



In der Regel werden bei der Echtzeit-PCR 40–45 Zyklen benötigt, um die kleinste Menge der Zielnukleinsäure in der Probe nachzuweisen. Wie in Abbildung 3 dargestellt ist, wird der PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz einen vordefinierten Grenzwert erreicht, als der „Ct-Wert“ (oder C_q- oder C_p-Wert) bezeichnet. Je mehr Zielnukleinsäure anfänglich in der Probe vorhanden ist, desto früher wird der Ct-Wert erreicht.

Abbildung 3. Merkmale einer Amplifikationskurve

Amplifikationsplots



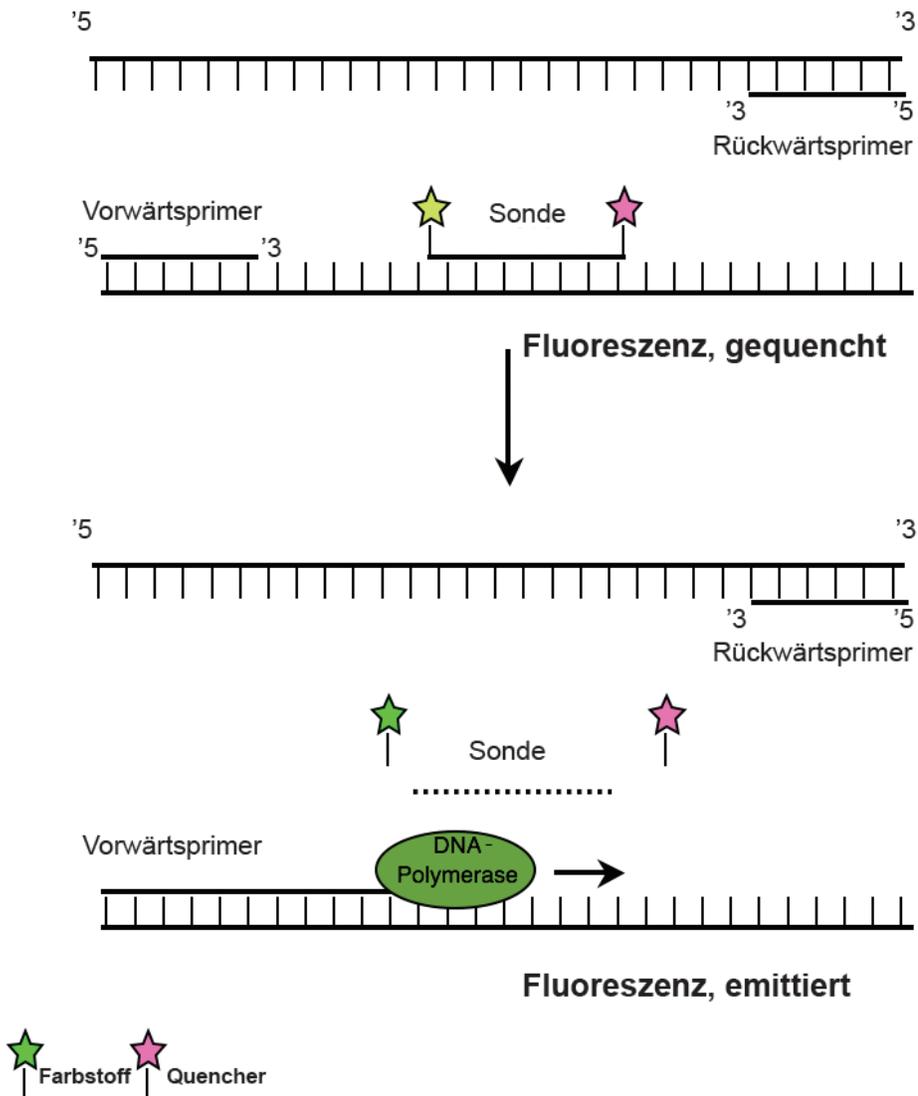
Formate der Echtzeit-PCR-Nachweise

Fluoreszenz ist die Emission von Licht durch eine Substanz, die Licht absorbiert hat. Die Echtzeit-PCR nutzt Fluoreszenzfarbstoffe, um das Vorhandensein eines amplifizierten DNA-Templates zu signalisieren. Somit setzt ein Echtzeit-PCR-Instrument das Reaktionsgemisch einer bestimmten Wellenlänge des Lichts aus (Anregung) und die Reaktion emittiert Licht (Emission) einer anderen Wellenlänge. Der Nachweis-/Filterkanal innerhalb eines Echtzeit-PCR-Instruments liest eine spezifische Wellenlänge, während andere blockiert werden. Alle gängigen Fluoreszenzfarbstoffe, die mit der PCR verwendet werden, haben spezifische Anregungs- und Emissionsspektren (beispielsweise beträgt das FAM*-Anregungsmaximum 495 nm und dessen Emissionsmaximum 520 nm). Bei der Verwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe ist es möglich, gleichzeitig mehrere Ziele innerhalb der gleichen PCR nachzuweisen (Multiplex-PCR).

Hydrolyse-Sonden sind die häufigste Form von qPCR-Sonden und werden häufig in der Human-, Veterinär- und Umweltdiagnose eingesetzt. Diese Sonden verwenden einen Fluoreszenzfarbstoff an einem Ende des DNA-Oligonukleotids und einen Quencher am anderen Ende (siehe Abbildung 4). Während der PCR wird die Sonde speziell an der DNA-Zielsequenz (von der Probe) angelagert (Annealing), die von den beiden Primern flankiert wird.

Da die DNA-Polymerase den neuen DNA-Strang verlängert, wird die Sonde durch die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der Polymerase abgebaut, wodurch das Fluorophor vom Quencher getrennt und die Fluoreszenz emittiert wird. Je mehr DNA in der Reaktion vorhanden ist, desto früher erreicht die Fluoreszenz eine nachweisbare Konzentration, was zu früheren Ct-Werten führt.

Abbildung 4. Hydrolyse-Sonden



Nukleinsäureextraktion

PCR wird durch Inhibitoren in der Probe beeinträchtigt; eine Nukleinsäureextraktion ist erforderlich, um DNA oder RNA von anderen Komponenten in der Probe zu reinigen. Zu den PCR-Inhibitoren gehören Detergenzien, Chelatoren und Nukleasen, die das/die Enzym(e) im Reaktionsgemisch beeinflussen können. Die extrahierte Probe enthält gereinigte DNA oder RNA für das Ziel von Interesse (sofern vorhanden) sowie auch Wirtsnukleinsäuren. Die Extraktionsmethode ist eine wichtige Überlegung für jeden Probentyp und den Echtzeit-PCR-Test.

Reinigungsmethoden

Bindesäulen: Die Bindesäulen enthalten Silikagel-Membrane, die Nukleinsäuren binden, während sie unerwünschtes Material passieren lassen. Dieses Filtrat wird per Vakuum, Zentrifugation oder Schwerkraft durchgezogen, während RNA/DNA an dem Filter haften bleibt und separat eluiert wird.

Magnetic Beads: Magnetic Beads sind Glas- oder Silikamaterialien, die die RNA und/oder DNA in der Probe binden. Das unerwünschte Material wird weggespült und die Nukleinsäuren können aus den Beads in einen sauberen Behälter freigesetzt werden.

Schnellvorbereitungen: Zu den Schnellvorbereitungen gehören u. a. das Aufkochen und schnelle Lysepuffer, die das Reinigungsprotokoll ersetzen. Bei schnellen Lyse-Verfahren wird die Probe einer enzymhaltigen Lösung hinzugefügt und für 30–60 Minuten bei ca. 65 °C erwärmt. Eine anschließende Inkubation bei 97 °C für 10–15 Minuten inaktiviert Enzyme in der schnellen Lyse-Lösung. Die gekühlte Lösung wird als Probe im Echtzeit-PCR-Test verwendet. Schnellvorbereitungsmethoden werden aufgrund von potenziellen Inhibitoren nicht universell eingesetzt. Nur bestimmte Tests und Probentypen sind mit Schnellvorbereitungsmethoden kompatibel.

Die modulare RealPCR-Plattform

Die RealPCR-Plattform verwendet zielspezifische Primer-/Sondengemische mit gemeinsamen Standard-Master-Mixen und einer einzelnen Positivkontrolle (Abbildung 5). Zusätzlich zu den gemeinsamen Reagenzien besitzt die RealPCR-Plattform auch ein standardisiertes PCR-Cycling-Protokoll für alle RNA- und DNA-Tests. Die Vorteile dieser Plattform sind standardisierte Reagenzien, ein einzelnes Cycling-Protokoll für alle RealPCR-Mixe und eine flexible Reagenzienverwaltung. Die RealPCR-Plattform ist auch kompatibel mit den RealPCR-Laborüberwachungs-Tools.

Abbildung 5. RealPCR-Plattform

Die modulare RealPCR-Plattform



Standardisiertes Protokoll für DNA und RNA

Die RealPCR-Plattform verwendet ein einzelnes Cycling-Protokoll, unabhängig davon, ob auf das Vorhandensein auf RNA oder DNA getestet wird. Daher können mehrere Tests gleichzeitig mit demselben PCR-Instrument durchgeführt werden.

Empfehlungen für Echtzeit-PCR-Instrumente

RealPCR-Assays wurden für die folgenden Echtzeit-PCR-Instrumente validiert:

- Applied Biosystems* 7500
- Applied Biosystems* QuantStudio*
- Applied Biosystems* ViiA* 7
- Agilent AriaMx*
- Agilent Mx3000P*
- Agilent Mx3005P*
- Roche LightCycler* 480
- Bio-Rad CFX96*
- QIAGEN* Rotor-Gene* (72 Well Rotor)

RealPCR-Assays funktionieren möglicherweise auch mit anderen PCR-Instrumenten, sollten jedoch validiert werden.

Die meisten Softwareprogramme für das PCR-Instrument haben ähnliche Arbeitsabläufe, die die Definition von Zielen (z. B. BVDV, *Mycoplasma gallisepticum*, Blauzungenvirus) und anderen Parametern umfassen.

Vorbereiten der Reaktion

- Die PCR-Plattenformate variieren je nach Instrument, können jedoch 96-Well-Platten, 8-Streifenröhrchen (in 96-Well-Halter) oder 384-Well-Platten enthalten.
- Die folgenden Parameter müssen zugewiesen oder definiert werden: Name der Probe, Probenpositionen, Cycling-Protokoll und Filterkanäle.

Analyse

- Die meisten Instrumente bieten mehrere Analysemodi.
- Die Instrumenten-Software berechnet den Ausgangs- und Schwellenwert und bestimmt die Ct-Werte.
 - Die Software eines jeden Instruments nutzt verschiedene Algorithmen für Ct-Berechnungen.
 - Es ist möglich, verschiedene Ct-Werte aus derselben Probe an verschiedenen Instrumenten zu erhalten.
 - Es ist möglich, mit verschiedenen Analyseverfahren verschiedene Ct-Werte aus derselben Probe am gleichen Instrument zu erhalten.
 - Auch wenn Ct-Werte variieren können, sollte eine positive Probe immer eine charakteristische Amplifikationskurve gegenüber der PCR-Negativkontrolle aufweisen.
- Die Menge der Zielnukleinsäure kann auf der Grundlage des Ct-Wertes abgeschätzt werden.
 - Früherer Ct-Wert = höhere Mengen des Zielgens
 - Späterer Ct-Wert = geringere Mengen des Zielgens
- Die visuelle Überprüfung der Amplifikationskurven ist wichtig, um die Funktionalität der Instrumenten-Software zu bestätigen.

Export

- Die Instrumenten-Software kann normalerweise Daten für das Datenmanagement exportieren.

Kalibrierung

- Instrumenten-Optik und die thermalen Parameter sollten gemäß den Empfehlungen des Instrumentenherstellers kalibriert werden. In einigen Regionen muss ein externes Unternehmen die thermale Kalibrierung durchführen. Wenn Sie ein Roche LC480 Echtzeit-PCR-Instrument verwenden, kontaktieren Sie den IDEXX-Kundendienst für Anweisungen zur Erstellung einer Farbkompensierungsdatei, die häufig für Multiplex-Tests erforderlich ist.

ROX* passive Referenz und ROX-Normalisierung

ROX ist für einige Echtzeit-PCR-Instrumente erforderlich (Applied Biosystems) oder gilt als optional für andere Instrumente (Agilent). ROX, ein passiver Referenzfarbstoff, wird zur Normalisierung von Fluoreszenz-Signalen verwendet. Die ROX-Normalisierung wird von der Software zur Eliminierung von nicht-amplifikationsbedingten Fluoreszenzen verwendet, wie z. B. Luftbläschen oder Well-zu-Well-Volumenunterschiede. Darüber hinaus hilft ROX bei den Perimeter-Effekten, bei denen Instrumentenkameras Schwierigkeiten haben, die Fluoreszenz aus dem Perimeter einer 96-Well-Platte zu lesen. Die RealPCR-Master-Mixe enthalten einen ROX-Referenzfarbstoff.

Methoden zur RealPCR-Probenextraktion

Einzelheiten zu den Methoden der Probenextraktion, die für jedes RealPCR-Gemisch validiert sind, sind in den jeweiligen Packungsbeilagen des RealPCR-Zielgemisches aufgeführt. Die validierten Methoden umfassen in der Regel ein säulenbasiertes Verfahren und eine Magnetic-Bead-Methode für höhere Testvolumina. Einige Gemische haben auch eine validierte Schnellvorbereitungsmethode. Tabelle 1 enthält die Produktcodes und Packungsbeilagenversionen für die kommerziellen Extraktionsmethoden, auf die in den RealPCR-Packungsbeilagen Bezug genommen wird.

Tabelle 1. Kommerzielle Extraktionsmethoden

Extraktionskit	Gesellschaft	Katalognummer	Version der Packungsbeilage
RealPCR* DNA/RNA Magnetic Bead Kit	IDEXX	99-56102 (n = 384) 99-56106 (n = 96)	06-56102-00
RealPCR* DNA/RNA Spin Column Kit	IDEXX	99-56103 (n = 50)	06-56103-00
RealPCR* Rapid Lysispuffer	IDEXX	99-56370 (n = 100)	06-56370-02
RNeasy* Mini-Kit	QIAGEN	74104 (n = 50) 74106 (n = 250)	Juni 2012
QIAamp* Viral RNA Mini-Kit	QIAGEN	52904 (n = 50) 52906 (n = 250)	Dezember 2014
QIAamp* DNA Mini-Kit	QIAGEN	51304 (n = 50) 51306 (n = 250)	Mai 2016
MagMAX* -96 Viral RNA Isolations-Kit	Life Technologies	AM1836 (n = 96) AMB18365 (n = 5 x 96)	1836M Rev. H
MagMAX* Pathogen RNA/DNA-Kit	Life Technologies	4462359 (n = 480)	4463379 Rev. B
MagMAX* Total Nucleic Acid Isolation Kit	Life Technologies	AM1840 (n = 100)	4385118 Rev. C
NucleoMag* VET Magnetic Extraction Kit	Macherey-Nagel	744200,1 (n = 96) 744200,4 (n = 4x96)	Januar 2017/Rev. 05
NucleoSpin* Virus	Macherey-Nagel	740983,50 (n = 50) 740983,250 (n = 250)	Februar 2015/Rev. 02
NukEx Pure RNA/DNA	Gerbion*	G05004-50 (n = 50) G05004 (n = 200)	Version 3.1/ 2. November 2015
High Pure PCR Template Prep Kit	Roche	11796828001 (n = 100)	Version 20. Oktober 2012

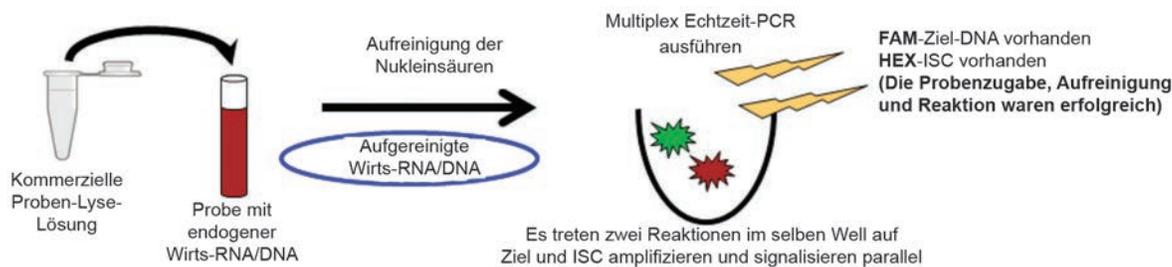
RealPCR-Kontrollen

Interne Probenkontrolle (Internal Sample Control, ISC)

Der primäre interne Kontrollansatz, der mit der modularen RealPCR-Plattform verwendet wird, ist eine ISC. Ein ISC-internes Kontrolldesign ist auf endogene RNA oder DNA aus der Wirtsprobe ausgerichtet. Das ISC-Ziel variiert je nach Art der Probe, Wirtsspezies und Testdesign für das Pathogen-Ziel. Der RealPCR* BVDV RNA Mix erkennt beispielsweise das Vorhandensein von boviner RNA (ISC) sowie das Vorhandensein von BVDV in der Probe. Daher besteht bei der Verwendung der meisten RealPCR-Gemische nicht die Notwendigkeit zum Hinzufügen einer internen Positivkontrolle (IPC) zur Probenextraktion.

Für die ISC-Sonde wird ein anderes Fluorophor verwendet, so dass das Pathogen-Ziel und die ISC-Reaktionen als Multiplex im selben Well ausgeführt werden (Abbildung 6). Ein positives ISC-Signal bestätigt die Probenentnahmetechnik, die Zugabe der Probe zur PCR-Reaktion und die Probenqualität. Darüber hinaus bestätigt der Nachweis der ISC die Aufreinigung der Nucleinsäuren, die reverse Transkription und die Amplifikationsschritte.

Abbildung 6. Interne Probenkontrolle



Die ISC-Primer und Sonden detektieren endogenes genetisches Wirtsmaterial. Die meisten Probentypen enthalten das ISC-Zielgen des Wirts und werden positiv getestet. In manchen Fällen kann eine sehr stark positive Probe die Reaktion der ISC verdrängen, was zu einem geringen oder gar keinem ISC-Signal führt. Dies ist ein gültiges Testergebnis, da das Vorhandensein des Zielgens eine angemessene Probenzugabe, die Extraktion und die PCR bestätigt. Einigen Probentypen fehlt das ISC-Ziel (z. B. Umweltproben); daher wird die RealPCR IPC empfohlen.

RealPCR* Interne Positivkontrolle (IPC)

Einige RealPCR-Gemische verwenden eine IPC als interne Kontrolle. In diesem Fall wird die RealPCR-IPC der Extraktionslyse-Lösung hinzugefügt und dann zusammen mit der Probe aufgereinigt. Die RealPCR-IPC ist ein Pool aller RealPCR internen Kontrollzielgene, einschließlich der ISC endogenen Wirtsziele. Daher kann die RealPCR-IPC zur Ergänzung des ISC-Nachweises für RealPCR-Gemische verwendet werden, die eine ISC interne Kontrolle verwenden.

RealPCR* Positivkontrolle (PC)

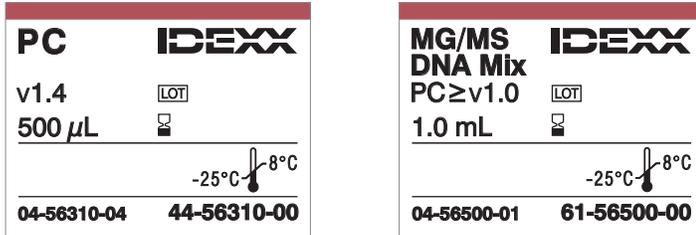
Die PC ist ein einzelnes Fläschchen, das alle RealPCR- und ISC-Ziele enthält und mit allen RealPCR-Zielgemischen verwendet werden kann. Sie verifiziert die Amplifikation der Zielnucleinsäure und bestätigt somit, dass das Zielgemisch und der Master-Mix ordnungsgemäß funktionieren. Außerdem enthält die PC die IDEXX-Signatursequenz, die zur Überwachung auf eine potenzielle PC-Laborkontamination verwendet werden kann (siehe Details unten).

PC und IPC sind getrocknete Komponenten, die bei -25 °C bis 8 °C gelagert werden und für die Verwendung mit dem PCR-Wasser rekonstituiert werden. PC und IPC sollten entsprechend aliquotiert werden, um ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen zu vermeiden, und sollten bei weniger als -15 °C aufbewahrt werden.

Versionskontrolle von RealPCR PC und IPC

Die RealPCR PC und IPC haben Versionsnummern (wie z. B. v1.0). Wenn für die RealPCR-Produktlinie neue zielspezifische Gemische entwickelt werden, werden die Zielsequenzen der PC hinzugefügt und die Versionsnummer der PC wird erhöht (z. B. v1.2 wird auf v1.3 erhöht). Ebenso werden die IPC-Versionen aktualisiert, wenn neue interne Kontrollziele der IPC hinzugefügt werden. Es ist möglich, mehrere Kontrollversionen im Bestand bei IDEXX zu haben. Überholte Kontrollversionen werden mit der Einführung eines neuen RealPCR-Zielgemischs entfernt. Wenn ein Labor mit der Verwendung eines neuen RealPCR-Zielgemischs beginnt, ist es wichtig, die Versionen der PC und der IPC zu bestätigen.

Abbildung 7. Beispiel für eine Versionsidentifikation für die RealPCR-Positivkontrolle



Tabellen 2 und 3 fassen häufig verwendete Echtzeit-PCR-Kontrollen zusammen.

Tabelle 2. RealPCR-Kontrollen

Artikel der Qualitätskontrolle	Art der Kontrolle	Prozess kontrolliert	Empfohlene Frequenz
Positivkontrolle (PK)	Funktionell	qPCR: Primer, Sonden und Master-Mix	Mindestens einer für jeden Ziel-Mix
Negative Zielkontrolle (NK) – Wasser	Kontamination	Kontamination von qPCR-Reagenzien, Verschleppungskontamination	Mindestens einer für jeden Ziel-Mix
Interne Probenkontrolle (ISC) – Wirts-DNA oder RNA	Funktionell	Probenzugabe, Probenintegrität, Extraktion und qPCR	Teil des Zielgemischs (Primer und Sonden inbegriffen)
Interne Positivkontrolle – DNA und RNA (IPC)	Funktionell	Extraktion und qPCR	Für einige Tests erforderlich; optional für den Test, der ISC verwendet

Tabelle 3. Vorgeschlagene Laborkontrollen

Artikel der Qualitätskontrolle	Art der Kontrolle	Prozess kontrolliert	Empfohlene Frequenz
Negative Extraktionskontrolle – Wasser	Kontamination	Kontamination, die während der Extraktion auftritt	Einer für alle 20 extrahierten Proben
RealPCR* Signalprüfung DNA-Mix	Positivkontrolle für Laborüberwachung	Kontamination der Laborumgebung	Wöchentlich bis monatlich
RealPCR* PC-Tracker DNA-Mix	Kontamination	Erkennt die PC-Kontamination in der Laborumgebung	Wöchentlich bis monatlich
Überwachung der Laborkontamination – Zielgemische	Kontamination	Erkennt die Kontamination in der Laborumgebung.	Wöchentlich bis monatlich

Das RealPCR* Laborüberwachungsset

RealPCR PC-Tracker DNA-Mix

Der RealPCR PC-Tracker DNA-Mix enthält Primer und Sonden zur Verstärkung und zum Nachweis der IDEXX-Signatursequenz (einer einzigartigen Sequenz, die nicht in der Natur vorkommt), die in allen IDEXX RealPCR-Positivkontrollen enthalten ist. Der RealPCR PC-Tracker DNA-Mix ist zum Nachweis einer Kreuzkontamination aufgrund der unangemessenen Verwendung von Positivkontrollmaterial vorgesehen. Der Tracker-Mix kann im Rahmen einer regelmäßigen Laborkontaminations-Überwachung verwendet werden, um das Vorhandensein von Kontaminationen aus den RealPCR-Positivkontrollen zu identifizieren. Weitere Informationen hierzu finden Sie in der Packungsbeilage des RealPCR-Laborüberwachungsset.

RealPCR Signalprüfung DNA-Mix

Der RealPCR Signalprüfung DNA-Mix enthält Primer und Sonden zur Amplifikation und dem Nachweis einer konservierten bakteriellen DNA-Sequenz. Der RealPCR Signalprüfung DNA-Mix wird aufgrund des inhärenten Vorkommens von bakterieller DNA positiv mit Wasser getestet und kann daher während der routinemäßigen Laborkontaminations-Überwachung als PCR-Positivkontrolle verwendet werden. Weitere Informationen hierzu finden Sie in der Packungsbeilage des RealPCR-Laborüberwachungsset.

Verfahren zur Laborkontaminations-Überwachung

Die Überwachung der Laborkontamination ist ein tupferbasiertes Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins einer Nukleinsäurenkontamination auf Laboroberflächen, Ausrüstung oder der Umgebung.

Es wird empfohlen, die Häufigkeit der Laborkontaminations-Überwachung (wöchentlich bis monatlich) im Verhältnis zum Volumen der durchgeführten PCR-Tests zu definieren.

Die Proben für die Laborüberwachung sollten mit allen Zielgemischen getestet werden, die im Echtzeit-PCR-Diagnoselabor verwendet werden. Um Kontaminationsrisiken während der Laborüberwachung zu minimieren, sollte eine positive Zielprobe nicht enthalten sein. Der RealPCR Signalprüfung DNA-Mix wird als Positivkontrolle verwendet.

Prozess für die Reinigung von Arbeitsbereichen

1. Für jeden auf Kontamination zu prüfenden Arbeitsplatz ein Wattestäbchen verwenden.
2. Jeden Tupfer kurz in ein 1,5-ml-Röhrchen tauchen, das ca. 300 µl PCR-Wasser enthält. Überschüssiges Wasser aus dem Tupfer entfernen, indem die Spitze gegen die Wand des Röhrchens gedrückt wird. Den Tupfer mit einer Drehbewegung 2–3-mal über etwa 30 cm der Arbeitsfläche streichen.
3. Die Spitze wieder in das Röhrchen geben und 10–15 Sekunden lang kräftig schwenken, um die erfasste Nukleinsäure auf dem Tupfer herauszulösen.
4. Das Wasser aus dem Tupfer entfernen, indem die Spitze gegen die Wand des Röhrchens gedrückt wird; den Tupfer entsorgen und die restliche Flüssigkeit als Probe für jedes RealPCR-Zielgemisch, das getestet wird, verwenden.

Beispiel: Template zur Laborkontaminations-Überwachung

		RealPCR-Zielgemisch				
		A (Test A)	B (Test B)	C (Test C)	D (Test D)	E (Test E)
Probe: Tupfer-Eluat/NTC	Extraktion (Bereich 1)	Bereich 1 Test A	Bereich 1 Test B	Bereich 1 Test C	Bereich 1 Test D	Bereich 1 Test E
	PCR-Gemisch (Bereich 2)	Bereich 2 Test A	Bereich 2 Test B	Bereich 2 Test C	Bereich 2 Test D	Bereich 2 Test E
	Probe/Kontrollen (Bereich 3)	Bereich 3 Test A	Bereich 3 Test B	Bereich 3 Test C	Bereich 3 Test D	Bereich 3 Test E
	qPCR-Instrument (Bereich 4)	Bereich 4 Test A	Bereich 4 Test B	Bereich 4 Test C	Bereich 4 Test D	Bereich 4 Test E
	Wasser (NTK)	Bereich 5 Test A	Bereich 5 Test B	Bereich 5 Test C	Bereich 5 Test D	Bereich 5 Test E

Dekontaminationsverfahren

Eine Dekontamination eines Laborraums wird nach dem Nachweis einer Nukleinsäurenkontamination empfohlen, die zu einem positiven Ct-Wert für ein getestetes Ziel im Rahmen des Laborüberwachungsverfahrens führte. Das Verfahren zur Dekontamination und der Nachkontrolle ist wie folgt:

1. Verwenden Sie für jeden positiven Laborplatz ein angemessenes Dekontaminationsreagenz, wie eine 10 % Bleichlösung[†] (~0,5 % Natriumhypochlorit), DNA AWAY*, DNAZap* oder ein Äquivalent zur Fragmentierung der kontaminierenden Nukleinsäure. Sprühen Sie ausreichend Flüssigkeit auf, um die gesamte Oberfläche zu befeuchten.
2. Lassen Sie die Lösung mindestens 5 Minuten lang einwirken.
3. Dekontaminieren Sie den Bereich, indem Sie ihn mit Papiertüchern abwischen und zweimal mit deionisiertem Wasser abspülen. Wichtig: Natriumhypochlorit hat das Potenzial, mit bestimmten Komponenten zu reagieren, die in den Nukleinsäurekits vorkommen. Es ist wichtig, dass Oberflächen gründlich gespült werden.
4. Führen Sie eine Nachkontrolle der dekontaminierten Stelle(n) gemäß dem Laborüberwachungsverfahren durch; verwenden Sie die Zielgemische, die in der ersten Runde der Laborkontaminations-Überwachung positiv getestet wurden. Integrieren Sie den RealPCR Signalprüfung DNA-Mix als Kontrolle zur Bestätigung einer positiven PCR-Reaktion.
5. Erfassen Sie die Ergebnisse in der Protokollierungsdatei des Programms zur Laborkontaminations-Überwachung.
6. Wenn der Bereich für das Pathogen immer noch positiv ist, wiederholen Sie die Dekontamination und die Nachkontrolle.

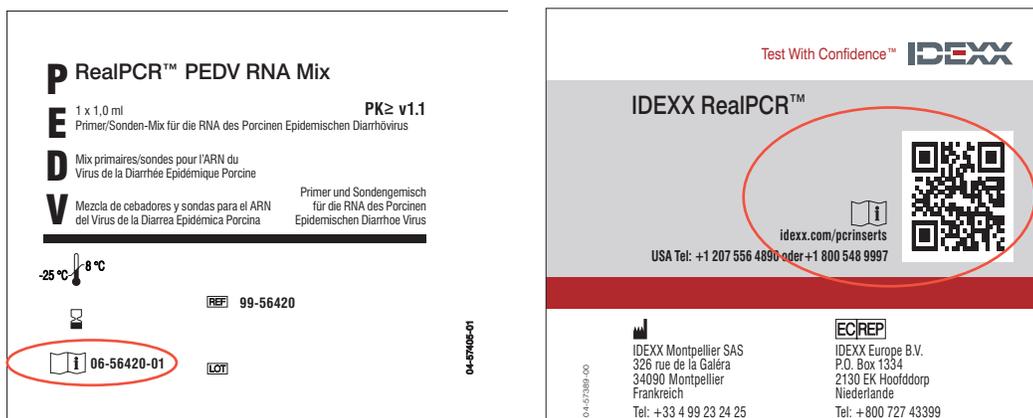
[†]Natriumhypochlorit baut sich schnell über die Zeit ab. Um die maximale Wirksamkeit zu gewährleisten, bereiten Sie alle 2–4 Wochen eine neue Dekontaminationslösung mit destilliertem oder deionisiertem Wasser vor.

Analysezertifikate und Packungsbeilagen

Die Packungsbeilage ist online für jedes einzelne RealPCR-Zielgemisch auf idexx.com/PCRinserts verfügbar.

Die Außenverpackung für alle RealPCR-Produkte führt die Benutzer zu einer Webseite, die eine Sammlung der elektronischen Packungsbeilagen enthält. Dies ermöglicht eine verbesserte Versionskontrolle und Transparenz für Veränderungen und reduziert den Abfall. Die Packungsbeilagennummer der einzelnen Zielgemische ist neben dem **i**-Symbol auf dem äußeren Etikett der Verpackung ausgewiesen. Konsultieren Sie die IDEXX-Webseite (idexx.com) für ein Analysezertifikat jeder Charge der RealPCR-Reagenzien.

Abbildung 8. Wo findet man die RealPCR-Packungsbeilagen



Anforderungen an die Komponentenaufbewahrung

Tabelle 4. RealPCR-Zielgemische, Material und Aufbewahrung

Identifizierung	Deckelfarbe	Menge	Aufbewahrung bei Eingang	Aufbewahrung nach Rekonstitution	Gefrier-/Auftauzyklen
RealPCR-DNA-Zielgemische (DNA TMx), getrocknet	Grün	1 x 1 ml	-25 °C bis 8 °C	-25 °C bis -15 °C	≤6
RealPCR-RNA-Zielgemische (RNA TMx), getrocknet	Gelb	1 x 1 ml	-25 °C bis 8 °C	-25 °C bis -15 °C	≤6

- Es ist wichtig, die Zielgemische vor Licht zu schützen.
- Die RealPCR-Zielgemische vor dem Gebrauch mit dem PCR-Wasser rekonstituieren und nach Bedarf aliquotieren, um wiederholte Einfrier-/Auftauzyklen zu vermeiden; Restmaterial bei weniger als -15 °C aufbewahren.

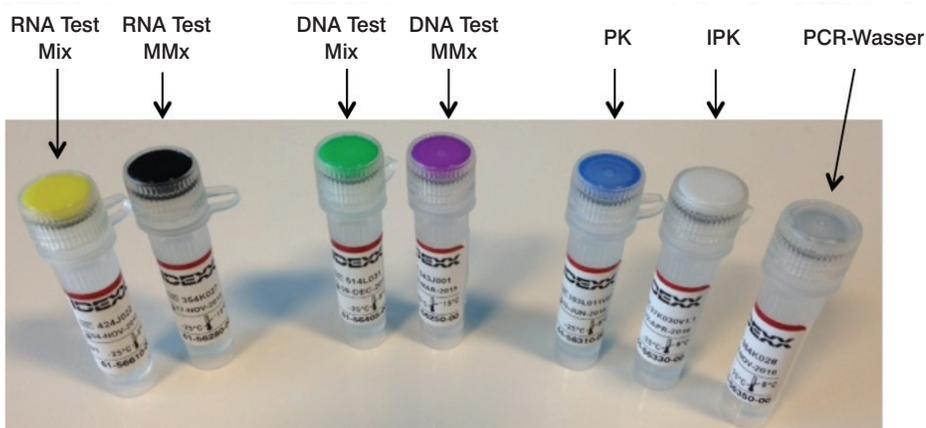
Tabelle 5. RealPCR Standard-Reagenzmaterial und Aufbewahrung

Identifizierung	Deckelfarbe	Menge	Aufbewahrung bei Eingang	Aufbewahrung nach Rekonstitution	Gefrier-/Auftauzyklen
RealPCR DNA* Master-Mix (DNA MMx)	Lila	1x 1 ml	-25 °C bis -15 °C (bei 2 °C–8 °C verschickt)	Nicht zutreffend	≤6
RealPCR* RNA Master-Mix (RNA MMx)	Schwarz	1 x 1 ml	-25 °C bis -15 °C (bei 2 °C–8 °C verschickt)	Nicht zutreffend	≤6
RealPCR Interne Positivkontrolle (IPC), getrocknet	Weiß	1 x 500 µl	-25 °C bis 8 °C	-25 °C bis -15 °C	≤6
RealPCR Positivkontrolle (PC), getrocknet	Blau	1 x 500 µl	-25 °C bis 8 °C	-25 °C bis -15 °C	≤6
RealPCR* PCR-Wasser	Klar	2 x 1 ml	-25 °C bis 8 °C	Nicht zutreffend	Nicht zutreffend

- Es ist wichtig, die Master-Mixe vor Licht zu schützen.
- Die RealPCR-Master-Mixe haben eine besonders hohe Viskosität; Informationen zur Handhabung finden Sie in den jeweiligen Packungsbeilagen.
- Die RealPCR Positivkontrolle und die RealPCR Interne Positivkontrolle vor dem Gebrauch mit dem PCR-Wasser rekonstituieren und nach Bedarf aliquotieren, um wiederholte Einfrier-/Auftauzyklen zu vermeiden; Restmaterial bei weniger als -15 °C aufbewahren.

Verpackung – Komponentenbeschriftung und Deckelfarbsystem

Abbildung 9. RealPCR-Beschriftung und Deckelfarbsystem



Assay-Vorbereitung

Die PCR-Gemische werden vorbereitet, indem das Zielgemisch und der Master-Mix in den entsprechenden Mengen für die Anzahl der zu testenden Proben hinzugefügt werden.

Tabelle 6a. Die RealPCR-Reaktion

Komponente	Volumen
Master-Mix	10 μ l
Zielgemisch	10 μ l
Probe	5 μ l
Gesamtes Reaktionsgemisch	25 μl

Tabelle 6b. Das RealPCR-Standard DNA/RNA-Cycling-Protokoll

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Reverse Transkription (RT)	50 °C	15 Minuten	1
Denaturierung	95 °C	1 Minute	1
Amplifikation	95 °C	15 Sekunden	45
	60 °C	30 Sekunden	

Hinweis: Vergewissern Sie sich, dass das Instrument richtig eingestellt ist, um nach der Amplifikation bei 60 °C die Fluoreszenz aufzuzeichnen.

Echtzeit-PCR-Analyse und Interpretation

Das RealPCR-Cycling-Protokoll ist für die Ausführung der RNA- und DNA-Master-Mixe standardisiert. Nach jedem einzelnen Zyklus wird eine Messung zur Überwachung der Fluoreszenz durchgeführt. Die anfänglichen Messwerte erfassen die Hintergrundfluoreszenz. Dies variiert zwischen Instrumenten, aber viele Instrumente verwenden 3 – 15 Zyklen, um den Hintergrund zu berechnen.

Wenn mehrere RealPCR-Reaktionen in einem einzelnen PCR-Lauf durchgeführt werden, kennzeichnen Sie jedes im PCR-Lauf verwendete Ziel und jede interne Kontrolle. Wenn z. B. auf einer einzigen Platte Tests für Porcine Epidemische Diarrhövirus (PEDV) RNA und übertragbare Gastroenteritis-Virus (TGEV) RNA durchgeführt werden, müssen die PEDV-Wells separat von den TGEV-Wells ausgewertet werden. Dasselbe gilt für die interne Kontrolle, die für jedes Zielgemisch verwendet wird. Anleitungen zur Datenanalyse finden Sie in der Gebrauchsanleitung zu dem jeweiligen Instrument. Um den Grenzwert festzulegen, verwenden Sie die Auto Ct-Einstellung. Für den Agilent Mx3000P und Mx3005P muss die Hintergrund-basierte Methode zur Berechnung der Grenzwertfluoreszenz verwendet werden. Für den Roche LightCycler 480 verwenden Sie die Abs Quant/2nd Derivative Max Methode. Für das QIAGEN Rotor-Gen-Instrument passen Sie den Grenzwert für den Hintergrund in der linearen Phase der exponentiellen Amplifikation manuell an. Dies erfolgt am besten auf Log-Ansicht-Plots und ist für jeden Reporter im Zielgemisch erforderlich.

Unter bestimmten Umständen weist die Software einen Grenzwert zu, der weit unter dem Hintergrundwert liegt, was dazu führt, dass sich für Proben mit typischen Amplifikationskurven keine Ct-Werte ergeben. In diesem Fall muss der Grenzwert manuell justiert werden. Empfehlungen zum Einstellen des Grenzwerts sind den Richtlinien des Instrumentenherstellers zu entnehmen.

Eine positive Probe für das RealPCR-Reagenssystem sollte einen positiven Ct-Wert und eine charakteristische Amplifikationskurve gegenüber der PCR Negativkontrolle aufweisen.

Häufig gestellte Fragen

Modulare RealPCR-Plattform und Komponenten

F: Warum werden die Komponenten mit Eisbeuteln verschickt, während einige Komponenten eine Aufbewahrungsanforderung von -25 °C bis -15 °C haben?

A: Die Master-Mixe wurden auf ordnungsgemäße Leistung geprüft und erhalten nach dem Versand auf Eis ihre volle Aktivität. Um die Langzeithaltbarkeit dieser Reagenzien zu gewährleisten, sollten die Master-Mixe bei -25 °C bis -15 °C aufbewahrt werden, während die anderen Komponenten bei einer Temperatur von 2 °C bis 8 °C aufbewahrt werden können. Nachdem getrocknete Komponenten rekonstituiert wurden, müssen diese ebenfalls bei -25 °C bis -15 °C aufbewahrt werden.

F: Benötige ich Erfahrung in der PCR, um die RealPCR-Reagenzien auszuführen?

A: Es sind keine vorherigen Erfahrungen erforderlich. Der IDEXX-Kundendienst bietet Schulungen für alle neuen Labore, die die modulare RealPCR-Plattform neu verwenden.

F: Benötigen wir separate Räume für die Echtzeit-PCR und die Nukleinsäureextraktion?

A: Ein separater Reinraum für die Vorbereitung des Echtzeit-PCR-Mix und ein separater Raum für die Nukleinsäureextraktion sind optimal. Die Mindestanforderung besteht darin, für diese beiden Schritte separate Labortische und Geräte (Pipetten usw.) zu haben.

F: Wo finde ich die Leistungsdaten für die RealPCR-Reagenzien?

A: Validierungsberichte für einzelne Tests sind vom IDEXX-Kundendienst verfügbar.

F: Wie lange dauert ein PCR Lauf mit der RealPCR-Plattform?

A: Der Echtzeit-PCR-Lauf dauert ≤ 70 Minuten (abhängig vom Instrument). Die Nukleinsäureextraktion dauert normalerweise 1–2 Stunden, abhängig von der Extraktionsmethode und der Anzahl der zu verarbeitenden Proben.

F: Was ist die Haltbarkeit der RealPCR-Komponenten?

A: Alle Komponenten haben eine Mindesthaltbarkeit von 12 Monaten ab dem Herstellungsdatum.

F: Was sind die Kosten für die Einrichtung eines Echtzeit-PCR-Labors?

A: Die Einrichtungskosten können zwischen 20.000 USD und 70.000 USD liegen (15.000 bis 50.000), abhängig vom Grad der Automatisierung der Nukleinsäureextraktion und der Wahl des Echtzeit-PCR-Instruments.

F: Wie viel Laborplatz wird für die Echtzeit-PCR benötigt?

A: Etwa 3–4 m² (30–40 ft²) für Labortische sind erforderlich.

F: Welche Ausrüstung wird benötigt, um ein Echtzeit-PCR-Labor einzurichten?

A: Wenden Sie sich an den IDEXX-Kundendienst für ein Referenzblatt der erforderlichen Ausrüstung.

F: Gibt es Materialsicherheitsdatenblätter (SDBs) für die modularen RealPCR-Komponenten?

A: Ja. Bitte wenden Sie sich an den IDEXX-Kundendienst, um jegliche SDBs anzufordern.

F: Welche Aufsichtsbehörden haben die Reagenzien oder Tests genehmigt?

A: Wenden Sie sich an den IDEXX-Kundendienst für Informationen zu aktuellen behördlichen Genehmigungen.

F: Reagenzien kamen gefroren in meinem Labor an. Können sie dennoch verwendet werden?

A: Ja. Alle RealPCR-Komponenten sind stabil eingefroren.

F: Reagenzien kamen bei Raumtemperatur in meinem Labor an. Können Sie dennoch verwendet werden?

A: Abhängig von der Länge der Zeit können einige Reagenzien auch mit Raumtemperatur bei Ankunft weiterhin in Ordnung sein. Wenden Sie sich an den Kundendienst von IDEXX.

Extraktion

F: Können archivierte Proben verwendet werden?

A: Ja. Für RealPCR-Zielgemische, die eine ISC verwenden, kann eine verlängerte Aufbewahrungszeit jedoch die Wirts-DNA/RNA beeinträchtigen. Dies kann zu einem negativen ISC-Ergebnis führen. Dies gilt auch für Nukleinsäuren und für Gewebe, das für einen längeren Zeitraum aufbewahrt wird.

F: Erkennt das ISC-Ziel für ein RNA-Reagenz auch DNA?

A: Nein. Die RealPCR-RNA-Zielgemische, die ein endogenes Wirts-ISC-Ziel verwenden, werden nur Wirts-RNA erkennen.

F: Können die RealPCR-Zielgemische ISC-Ziele im Serum nachweisen?

A: Ja. RealPCR-Zielgemische, die einen Serumanteil haben, bieten einen guten Nachweis des ISC-Ziels im Serum.

F: Was ist der Unterschied zwischen der PCR-Negativkontrolle und der negativen Extraktionskontrolle?

A: Die PCR-Negativkontrolle wird verwendet, um sicherzustellen, dass in keinem der PCR-Reagenzien eine Kontamination vorhanden ist. Sie kann auch ein Indikator für eine Kontamination sein, die während der Zugabe von Proben zu der PCR-Platte aufgetreten ist. Die negative Extraktionskontrolle überwacht eine potenzielle Kontamination von starken positiven Proben in negative Proben während der Nukleinsäureextraktion.

F: Welcher Probentyp kann mit den RealPCR-Reagenzien verwendet werden?

A: Die Probentypen werden in der Packungsbeilage für jedes RealPCR-Zielgemisch identifiziert.

F: Können gepoolte Proben mit den RealPCR-Reagenzien verwendet werden?

A: Ja. Gepoolte Proben können für einige RealPCR-Zielgemische und Probentypen verwendet werden. Detaillierte Informationen entnehmen Sie bitte der Packungsbeilage.

F: Welches Risiko für eine Kontamination besteht bei der Echtzeit-PCR?

A: Das Kontaminationsrisiko ist erhöht, wenn die Reaktionsgemische in direkter Nähe zur Nukleinsäureextraktion oder der Probenhandhabung vorbereitet werden. IDEXX bietet Anleitungen für das Einrichten eines Überwachungsprogramms für Umgebungskontamination in Laboren.

F: Kann ich Extraktionskits oder Echtzeit-PCR-Instrumente, die nicht von IDEXX für die Verwendung mit den RealPCR-Reagenzien validiert wurden, mit diesen RealPCR-Reagenzien verwenden?

A: Die jeweiligen Packungsbeilagen enthalten eine Liste der validierten Extraktionsmethoden und Instrumente. Kunden, die Protokolle verwenden, die nicht in der Packungsbeilage aufgeführt sind, sollten zuerst die Methode validieren. Kunden in Nordamerika können den IDEXX-Kundendienst kontaktieren und einen Bericht der Leistungsdaten anfordern, der Studien für jedes Reagenzienset zusammenfasst.

F: Kann ich den RealPCR Rapid Lysispuffer für alle Nukleinsäureextraktionen verwenden?

A: Nein, die RealPCR Rapid Lysispuffer sind nur für die Verwendung mit spezifischen RealPCR-Zielgemischen und Probenarten validiert.

PCR

F: Warum gibt es 45 Zyklen im RealPCR-Cycling-Protokoll?

A: Die RealPCR-Plattform wurde mit 45 Zyklen entwickelt, um mit möglichst vielen Instrumenten kompatibel zu sein. Obwohl nicht alle Tests und/oder Instrumente 45 Zyklen erfordern, ist das RealPCR ein standardisiertes System, sodass alle Tests mit dem gleichen Protokoll validiert wurden.

F: Sollten die Komponenten dem Reaktionsgemisch in einer bestimmten Reihenfolge hinzugefügt werden?

A: Ja, das PCR-Gemisch wird vorbereitet, indem der entsprechende Master-Mix zu einem zielspezifischen Gemisch hinzugefügt wird. Für die RNA-Reagenzien wird empfohlen, den RNA-Master-Mix in das zielspezifische Gemisch zu pipettieren, sodass die Pipettenspitze gespült werden kann. Das PCR-Gemisch sollte vor der Handhabung der Proben vorbereitet werden.

F: Warum haben ISC und IPC eine geringere Amplifikationskurve?

A: Die internen Kontrollen verwenden einen anderen Farbstoff, der eine niedrigere Quantenausbeute hat.

F: Was kann dazu führen, dass die ISC negativ ist?

A: Viele Faktoren können zu einem negativen ISC-Signal führen:

- Unsachgemäße Probenahme
- Ein fehlendes Extraktionsverfahren
- Eine Extraktion mit überschüssigen PCR-Inhibitoren
- Ein starkes Ziel, das die ISC-Amplifikation verdrängt
- Die Probe wurde nicht zur PCR-Reaktion hinzugefügt

Im Fall eines negativen Zielgens oder einer negativen ISC (ungültiges Ergebnis) ist es wichtig, das Problem zu beheben. Ein positives Zielgen und ein negatives ISC-Ergebnis ist weiterhin ein gültiges Reagenzergebnis.

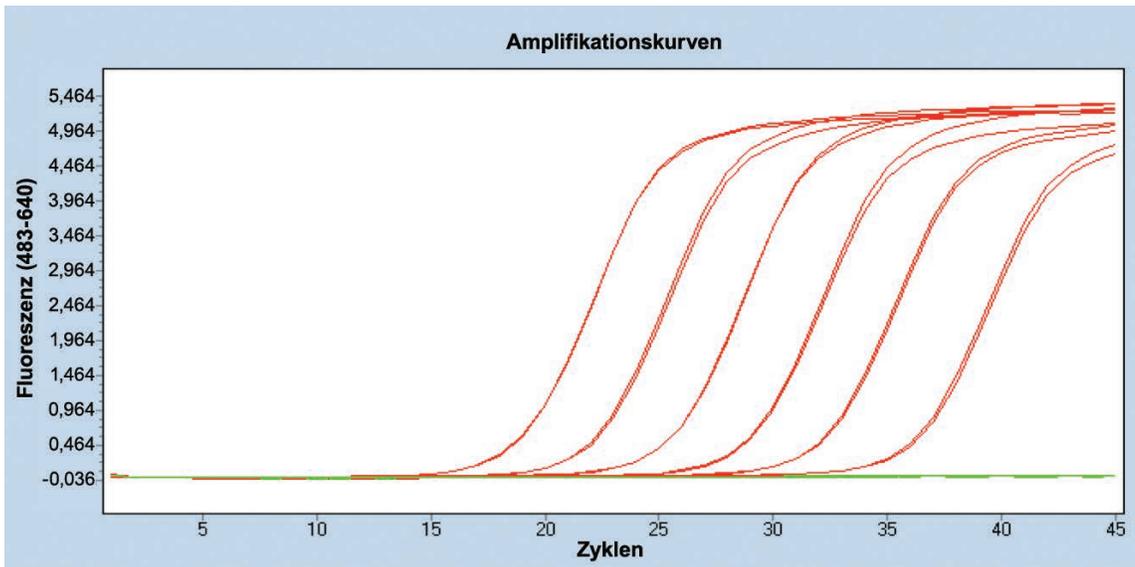
F: Ich bekomme ständig positive Probenergebnisse in Wells, die nur ein Reaktionsgemisch und Wasser enthalten. Woran liegt das?

A: Die RealPCR-Reagenzien sind extrem empfindlich gegenüber dem Vorhandensein von Nukleinsäuren. Jede Kontamination kann leicht zu einer falsch-positiven Probe führen. Nachfolgend finden Sie Empfehlungen zur Kontrolle der Kontamination.

- Achten Sie auf die richtigen Pipettierungstechniken; vermeiden Sie die Produktion von Aerosolen.
- Halten Sie Laborbereiche und Ausrüstung für die Vorbereitung der PCR-Gemische und Probenzugabe getrennt.
- Kontrollieren Sie den Arbeitsablauf des Personals zur Minimierung der Kontamination in den Reinbereich der PCR-Gemische.
- Entsorgen Sie die verschlossenen Reaktionsplatten in Behältern, die sich in einem Bereich außerhalb des Vorbereitungsbereich der PCR-Gemische befinden.

F: Wie sollte eine normale Amplifikationskurve aussehen?

A: Eine typische Amplifikationskurve sollte eine charakteristische S-Form haben. Die Abbildung unten zeigt die Amplifikationskurven für eine zehnfache Serienverdünnung des Templates.



F: Die meisten meiner Amplifizierungskurven haben eine glatte S-Form. Gelegentlich kommt es jedoch zu unregelmäßigen Kurven. Sind diese wirklich positive Ergebnisse?

A: In seltenen Fällen kann eine negative Amplifikationskurve durch die Thermocycler-Software als positiv nachgewiesen werden, obwohl die charakteristische S-Form der Kurve fehlt. Das liegt an der echten exponentiellen Erhöhung der DNA, die während einer erfolgreichen PCR auftritt. Diese unregelmäßigen Kurven können häufig auf eine nicht-amplifikationsbasierte Fluoreszenz verwiesen werden. IDEXX empfiehlt das erneute Testen später Ct-Werte ohne Amplifikationskurve.

F: Warum emittiert die freie Sonde kein Signal?

A: Die freie oder ungebundene Sonde emittiert ein Signal. Das Fluorophor wird jedoch normal gequencht und kann somit durch das optische System des Echtzeit-PCR-Instruments nicht nachgewiesen werden. Erst nach dem Abbau der Sonde wird das Fluorophor ungequencht und ermöglicht, dass das Signal das Instrument erreicht.

F: Kann die Sonde auch dann abgebaut werden, wenn sie nicht an das Ziel angelagert ist (d. h. eine negative Probe)?

A: Wenn das Nachweismisch kontaminiert wird, ist es möglich, dass die Sonde abgebaut wird und somit zum Unquenching des Fluorophors führt. In diesem Fall wäre die Signalintensität sehr hoch, auch in den frühen Zyklen der PCR-Phase. Aus diesem Grund empfiehlt IDEXX die Aliquotierung des Nachweismischs und dadurch eine Minimierung der Handhabung, und die Kontrolle der S-Form der Amplifikationskurven.

F: Was geschieht, wenn eine Blase auf dem Well des PCR vorhanden ist? Was geschieht mit der Kurve?

A: In der Amplifikationskurve kann ein Sprung auftreten. Die Normalisierung mit ROX kann das Problem häufig für Instrumente beheben, die ROX verwenden.

F: Was ist die angemessene Reaktion auf einen späten positiven Ct-Wert (wie z. B. Ct = 42)?

A: Auswertung der Amplifikationskurve vor der Meldung eines endgültigen Ergebnisses. Wenn es kein charakteristisches amplifikationsbasiertes Signal gibt, kann es eine negative Probe sein. Wenn das Ergebnis unklar ist, sollte die Probe erneut getestet werden.

F: Was ist der Ct-Cutoff-Wert für positive Proben?

A: Ein spezifischer Ct-Cutoff-Wert wird für die meisten RealPCR-Reagenzien aufgrund der Variabilität der Instrument-Software-Algorithmen für die Bestimmung des Ct-Werts nicht vorgegeben. Die Amplifikationskurven sollten visuell inspiziert werden, insbesondere für Proben, die mit einem schwachen Ct-Wert identifiziert wurden.

F: Einige Tests haben einen Verdachts-Cutoff-Wert; was ist die Empfehlung für diese Proben?

A: Proben mit einem Ct-Wert, der hinter dem Verdachts-Cutoff liegt, können positiv oder das Ergebnis einer Kontamination sein. Die Analyse der Amplifikationskurven kann darauf hindeuten, ob die Probe tatsächlich positiv ist. Eine erneute Extraktion kann notwendig sein, um eine Kontamination auszuschließen. Wenn eine Kontamination vermutet wird, finden Sie auf Seite 14 Anweisungen zur Einrichtung einer Routine-Laborüberwachung.

Anforderungen an den Thermocycler

F: Wann sollte die RealPCR Interne Positivkontrolle verwendet werden?

A: Die meisten RealPCR-Zielgemische verwenden eine interne Probenkontrolle, die eine interne Positivkontrolle überflüssig macht. Allerdings verwenden einige Zielgemische Probenarten (wie Umweltproben), die unterschiedliche oder begrenzte Mengen an Wirts-DNA oder -RNA enthalten. In diesem Fall wird eine interne Positivkontrolle empfohlen.

F: Welche PCR-Platten und -Abdeckungen verwende ich mit der RealPCR-Plattform?

A: Die Marke der PCR-Platte und der Abdeckung hängen vom verwendeten Instrument ab. Bitte befolgen Sie die Empfehlungen des Herstellers.

F: Was sind die Kalibrierungsempfehlungen für Echtzeit-PCR-Instrumente?

A: Instrumenten-Optik und die thermalen Parameter sollten gemäß den Empfehlungen des Instrumentenherstellers kalibriert werden. In einigen Regionen muss ein externes Unternehmen die thermale Kalibrierung durchführen. Kontaktieren Sie bitte den IDEXX-Kundendienst für weitere Informationen über die Kalibrierung.

F: Was sollte bei der Programmierung des Instruments für den Quencher verwendet werden, wenn Black Hole Quencher* (BHQ*) nicht als Option aufgeführt ist?

A: Sie können auch den nicht-fluoreszenten Quencher (NFQ) verwenden oder einfach „Keiner“ (none) auswählen.

F: Welche Filter sind im qPCR-Instrument erforderlich, um die RealPCR-Reagenzien auszuführen?

A: Alle RealPCR-Reagenzien erfordern FAM und HEX. Der Cy5-Kanal ist für Multiplex-Zielgemische mit zwei Zielen erforderlich und der ROX-Kanal wird von einigen Instrumenten zur Normalisierung des Signals verwendet.

F: Ist eine separate Software für die Interpretation der Ergebnisse erforderlich?

A: Nein, verwenden Sie die Software des Echtzeit-PCR-Instruments für die Interpretation der Ergebnisse.

Begriffsbestimmungen

Amplifikation: Exponentielle Vervielfältigung der Ziel-DNA mithilfe der PCR.

Amplikon: Das Produkt einer PCR-Amplifikation.

Anlagerung (Annealing): Tritt auf, wenn sich komplementäre Sequenzen von einsträngiger DNA oder RNA per Wasserstoffbrückenbindungen paaren, um doppelsträngige DNA zu bilden.

Annealing-Temperatur: Die Temperatur, bei der das Annealing auftritt (siehe *Annealing* oben).

Anregung: Bezieht sich bei der Echtzeit-PCR auf die Wellenlänge des Lichts, die verwendet wird, um die Emission von Licht durch ein Fluorophor auszulösen (siehe *Emission*).

Ct-Wert = Cq-Wert = Cp-Wert: Die Anzahl der Zyklen, die erforderlich sind, um einen Schwellenwert für das Fluoreszenzsignal zu erreichen.

Denaturierung: Erwärmung der Reaktion, um die Trennung der DNA-Stränge zu veranlassen, indem die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen aufgebrochen werden, um einsträngige DNA-Moleküle zu erhalten.

Desoxyribonuklease (DNase): Ein Enzym, das die Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen im Rückgrat der DNA katalysiert und somit die DNA abbaut.

DNA-Polymerase: Das Enzym, das die Synthese von DNA-Strängen aus Nukleotiden katalysiert.

DNA: Desoxyribonukleinsäuren kodieren die genetischen Informationen von lebenden Organismen und vielen Viren.

Echtzeit-PCR: Eine gängige Methode zur Amplifikation, Nachweisung und gleichzeitigen Quantifizierung eines spezifischen DNA-Zielmoleküls.

Emission: Der Vorgang, in dem ein Echtzeit-PCR-Fluorophor Licht produziert, als Reaktion auf die Absorption einer bestimmten Wellenlänge des Lichts (siehe *Anregung*).

Endogen: Im Falle der internen Probenkontrolle (Internal Sample Control, ISC), bezieht sich *endogen* auf das eigene genetische Material des Wirts. Die Verwendung eines endogenen Wirts-Ziel wie z. B. der ISC, ermöglicht die Kontrolle der Probenzugabe, der Probenqualität, der ordnungsgemäßen Extraktion und der erfolgreichen Amplifikation.

Erweiterung: Der Schritt oder Prozess, bei dem die DNA-Polymerase einen neuen DNA-Strang synthetisiert, um den DNA-Template-Strang in Richtung für 5' bis 3' zu verlängern.

Fluoreszenz: Die Emission von Licht durch Material, das Licht absorbiert hat. Bei der Echtzeit-PCR wird die Fluoreszenz gemessen, um die relative Menge der DNA in einer Reaktion nachzuweisen.

Halten: Ein einzelner Temperaturschritt im qPCR-Instrument.

Hydrolyse-Sonde: Ein kurzes synthetisches Oligonukleotid, das zur Identifizierung einer bestimmten DNA-Ziel-Sequenz entworfen wurde. Umfasst einen Reporter und einen Quencher und emittiert Fluoreszenz, sobald es während der Amplifikation von der DNA-Polymerase gespalten wurde.

Interne Kontrolle (IC): Eine RNA- oder DNA-Ziel-Sequenz, die in einem vorbereiteten PCR-Gemisch angereichert wird. Die IC bietet eine positive Kontrolle für die Reverse Transkriptase und DNA-Polymerase-Aktivitäten.

Interne Positivkontrolle (IPC): Eine RNA- oder DNA-Ziel-Sequenz, die in die Probenlyse-Lösung angereichert wird und zusammen mit den Probennukleinsäuren aufgereinigt wird. Die IPC kontrolliert die sachgemäße Nukleinsäureextraktion und die ordnungsgemäße Funktion der Reversen Transkriptase (RNA-Ziele) und der DNA-Polymerase.

Interne Probenkontrolle (Internal Sample Control, ISC): Eine RNA- oder DNA-Ziel-Sequenz die gegenüber der Wirts-Probe endogen oder inhärent ist. Die ISC kontrolliert das Vorhandensein der Probe, Probenqualität, Extraktionsleistung, Reverse Transkriptase und DNA-Polymerase-Aktivitäten.

Kanalfilter: Wählt die entsprechenden Wellenlängen für die Emission und Anregung in Echtzeit-PCR-Instrumenten gemäß der in der Reaktion verwendeten Fluorophore aus.

Begriffsbestimmungen (Fortsetzung)

Komplementäre Stränge: Eine der beiden Ketten, die eine Doppelhelix-DNA bilden, bei der die entsprechenden Positionen in den beiden Ketten aus einem Paar komplementärer Basen zusammengesetzt werden.

Master-Mix: Die PCR-Master-Mixe sind vorgemischte, gebrauchsfertige Lösungen mit DNA-Polymerase, dNTPs, MgCl₂ und Reaktionspuffern in optimalen Konzentrationen für eine effiziente Amplifikation der DNA-Template durch die PCR. Die RNA-Master-Mixe umfassen auch eine umgekehrte Transkriptase, um RNA zu cDNA zu konvertieren.

Negative Extraktionskontrolle (NEK): Eine Mock-Probe, in der Regel Wasser, die verwendet werden kann, um das Vorhandensein einer Kreuzkontamination zwischen Proben während eines Extraktionsprozesses nachzuweisen. Es wird empfohlen, eine NEK für alle 19 Proben durchzuführen, die zur Nukleinsäureaufreinigung verarbeitet werden.

Negativkontrolle (NK): Die PCR-Negativkontrolle verifiziert, dass es keine Kreuzkontamination zwischen Proben oder Kontamination von PCR-Reagenzien, Instrumenten oder der Umwelt gibt.

Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR): Ein Prozess, bei dem DNA-Moleküle exponentiell kopiert werden, indem die Temperatur in der Reaktion verändert wird, um einen nachweisbaren DNA-Wert zu erhalten.

Positivkontrolle (PK): Die PCR-Positivkontrolle verifiziert, dass alle PCR-Reagenzien und -Ausrüstungen ordnungsgemäß funktionieren.

Primer: Ein kurzer synthetischer DNA-Strang, der als Ausgangspunkt für die DNA-Amplifikation dient.

Ramp (Anstieg): Die Dauer der Zeit für die Erhöhung/Senkung der Temperatur im Rahmen des PCR-Cycling-Protokolls.

Ribonuklease (RNase): Eine Nuklease, die den Abbau von RNA katalysiert.

RNA: Ribonukleinsäure-Stränge übermitteln genetische Anweisungen von der DNA zur Übersetzung durch die Proteine. RNA umfasst auch die genetischen Informationen vieler Viren.

ROX: Ein passiver Referenzfarbstoff, der zur Normalisierung des fluoreszierenden Reporter-Signals bei der quantitativen Echtzeit-PCR verwendet wird und dessen Fluoreszenz sich während der Reaktion nicht verändert.

RT-PCR: Reverse (umgekehrte) Transkription der Ziel-RNA zu cDNA mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase; die cDNA kann dann für die PCR verwendet werden.

Schmelztemperatur: Die Temperatur, bei der 50 % aller DNA-Moleküle einer bestimmten Sequenz als doppelsträngig und 50 % als einzelsträngig vorkommen.

Schwellenwert: Ein voreingestellter Wert leicht über dem fluoreszierenden Hintergrund für den Nachweis von DNA-basierter Fluoreszenz.

Standard-Cycling-Programm: Ein einziges PCR-Programm, das für mehrere RNA- und DNA-Ziele verwendet werden kann.

Wellenlänge: Die physikalische Eigenschaft zur Beschreibung der Anregung und Emission von Fluoreszenzfarbstoffen, die in der Echtzeit-PCR verwendet werden. Die Maßeinheit ist Nanometer (nm).

Mit dem Kauf dieses RealPCR-Produkts erhält der Käufer Rechte unter bestimmten Roche-Patenten zur Nukleinsäurenamplifikation und/oder -detektion. Dieses Produkt ist nicht für In-vitro-Diagnostik beim Menschen, Viehbefruchtung, Viehidentifizierung oder GMO-Testanwendungen bestimmt. Außer diesem spezifischen Recht der durch den Kauf bedingten Nutzung werden keine anderweitigen allgemeinen Patent- oder Lizenzrechte gewährt.

Einige Farbstoff-Verbindungen in den RealPCR-Zielgemischen werden unter Lizenz von Biosearch Technologies, Inc. verkauft und sind unter US-amerikanischen und weltweiten Patenten entweder ausgestellt oder angemeldet. Die Lizenz deckt auch tierärztliche Anwendungen ab.

Nicht für den klinischen Gebrauch beim Menschen bestimmt.



IDEXX Laboratories, Inc.

Weltweiter Hauptsitz
One IDEXX Drive
Westbrook, Maine 04092
USA

Tel: +1 207 556 4890 oder
+1 800 548 9997
Fax: +1 207 556 4826 oder
+1 800 328 5461

IDEXX Europe B.V.

Europäischer Hauptsitz
Scorpius 60 Building F
2132 LR Hoofddorp
Niederlande

Tel: +31 23 558 70 00 oder
+800 727 43399
Fax: +31-23-558-72-33

IDEXX Laboratories, Inc.

Hauptsitz Asien
3F-5 No. 88, Rei Hu Street
Nei Hu District
11494 Taipei
Taiwan

Tel: +886 2 6603 9728
Fax: +886-2-2658-8242

IDEXX Brasil

Hauptsitz in Brasilien
1478 Av. Brig. Faria Lima
São Paulo, SP
Brasilien

Tel.: +55 11 3095-5632
Fax: +55-11-3095-5641

Test with Confidence™

© 2017 IDEXX Laboratories, Inc. Alle Rechte vorbehalten. • 09-80571-02-DE-L

*IDEXX, Test with Confidence und RealPCR sind Marken oder eingetragene Marken von IDEXX Laboratories, Inc. oder ihrer Tochterunternehmen in den USA bzw. anderen Ländern. LightCycler ist eine eingetragene Marke der Roche Diagnostics GmbH. FAM und HEX sind Marken der Applera Corporation oder ihren Tochtergesellschaften in den USA und/oder bestimmten anderen Ländern. AriaMx, Mx3000P und Mx3005P sind Marken von Agilent Technologies, Inc. Applied Biosystems, DNAZap, MagMAX, ROX und ViiA sind Marken von Life Technologies Corporation. QIAGEN, QIAamp, Rotor-Gene und RNeasy sind Marken der QIAGEN Group. NucleoMag ist eine eingetragene Marke von der MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG. DNA AWAY ist eine Marke oder eingetragene Marke von Thermo Fisher Scientific. Black Hole Quencher und BHQ sind Marken von Biosearch Technologies, Inc. Alle anderen Produktnamen, Firmennamen und Logos sind Marken oder eingetragene Marken der jeweiligen Eigentümer. Die IDEXX-Datenschutzrichtlinie finden Sie unter idexx.com.