



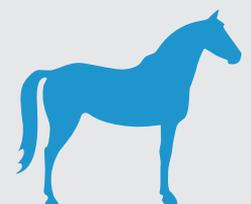
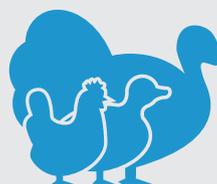
V Nur für *in vitro*
Veterinär-Diagnostik.

Kylt[®]

Kylt[®] Influenza A

Real-Time RT-PCR Detektion

www.kylt.eu



Die deutsche Gebrauchsinformation ist gemäß §11 Abs. 2 TierGesG zugelassen.

Zul.-Nr. FLI-B 672

Kat.-Nr. 31068 / 31069

Kylt® Influenza A

Real-Time RT-PCR Detektion

Revision	Stand	Beschreibung der Änderungen
Rev005	Jun 2023	Änderung des Firmennamens, Geändertes Layout für die Auswertung der Kontrollreaktionen, Ergänzungen in "E. Ähnliche und ergänzende Produkte"
Rev004	Apr 2019	Erweiterung um Tierart Pferd, Änderung der Lagertemperatur auf $\leq -18^{\circ}\text{C}$, Überarbeitung des Layouts

A. Allgemeines

- Das Kylt® Influenza A Real-Time RT-PCR Detektionskit dient dem Nachweis des Influenzavirus Typ A in Probenmaterial vom Vogel, Schwein und Pferd, wie Gewebe und Organe (z. B. Trachea, Lunge, Zäkaltonsillen), Tupferproben (z. B. Nasal-, Tracheal- oder Kloakentupfer), Speichel- und BAL-Proben (BALF / bronchoalveolar lavage fluid, nur Schwein) und Probenmaterial kultureller Anzuchten der vorgenannten Proben (z. B. Zellkulturüberstand, Allantoisflüssigkeit).
- Kylt® Influenza A enthält alle Reagenzien und Kontrollen zur Detektion viraler RNA des Influenzavirus Typ A. Der qualitative Nachweis von Kylt® Influenza A beruht auf einer duplex Real-Time RT-PCR: In einem gemeinsamen Reaktionsansatz werden die beiden Zielgene für Influenzavirus Typ A bzw. für die gespikete Kylt® Interne Kontroll-RNA (IC-RNA) zunächst revers transkribiert (Vorgang der Reversen Transkription (RT)) und in der anschließenden Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mittels entsprechender spezifischer Primerpaare parallel amplifiziert. Die amplifizierten Zielgen-Fragmente werden während der laufenden PCR-Reaktion anhand fluoreszierender Sonden in Echtzeit detektiert (Real-Time RT-PCR). Die spezifischen Sonden für die Detektion der amplifizierten Zielgen-Fragmente von Influenza A bzw. IC-RNA sind mit den Fluoreszenz-Farbstoffen FAM bzw. HEX markiert. Die emittierte Fluoreszenz wird separat jeweils optisch durch den Real-Time PCR Thermocycler erfasst. Anhand dieser beiden unabhängigen Analysen im gleichen Reaktionsansatz je Probe sowie anhand der Negativ- und IVA Positivkontrolle je Lauf wird ein valides, qualitatives Ergebnis zum Influenza A-spezifischen Status der Probe erlangt. Auf diese Art können innerhalb weniger Stunden nach Eingang der Probe Ergebnisse erhalten werden.
- Das Kit wurde für den Gebrauch durch geschultes Laborpersonal nach standardisierten Verfahren entwickelt. Dieser Gebrauchsinformation ist strikt zu folgen.

B. Reagenzien und Materialien

- Kylt® Influenza A enthält folgende Reagenzien:

Reagenz	Farbcode Deckel	Menge bei Kit mit 100 / 25 Reaktionen	Lagerung
2x RT-qPCR-Mix	○ transparent	4 x / 1 x 280 µl	≤ -18 °C
IVA Detektions-Mix	● orange	4 x / 1 x Lyophilisat (final jeweils 150 µl)	≤ -18 °C
Positivkontrolle	● rot	4 x / 2 x Lyophilisat (final jeweils 50 µl)	≤ -18 °C
Negativkontrolle	● blau	2 x 1 ml	≤ -18 °C
Kylt® Internal Kontroll-RNA (IC-RNA)	● schwarz	2 x / 1 x Lyophilizate (final 500 µl)	≤ -18 °C

- Umgehend nach Erhalt sind das Kit und seine Komponenten bei ≤ -18 °C zu lagern. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen des Kits oder der Komponenten sind zu vermeiden. Reagenzien sollten so kurz wie möglich im aufgetauten Zustand verbleiben. Um wiederholtes Einfrieren und Auftauen zu vermeiden, sollten nach dem ersten Auftauen Aliquots adäquater Volumina generiert werden. Das Kit und seine Bestandteile sind bei vorschriftsgemäßer Lagerung bis zu dem angegebenen Ablaufdatum verwendbar (siehe Etikett des Umkartons). Die Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen nicht miteinander vermischen.
- Der IVA Detektions-Mix muss dunkel bei ≤ -18 °C gelagert werden und darf niemals direktem Sonnenlicht ausgesetzt werden. Vor dem ersten Gebrauch wird der lyophilisierte IVA Detektions-Mix rehydriert: Je 150 µl der Negativkontrolle werden zu einem Lyophilisat des IVA-Detektionsmixes gegeben, für kurze Zeit bei Raumtemperatur inkubiert und durch kurzes Puls-Vortexen gemischt. Der rehydrierte IVA Detektions-Mix wird in geeignete Volumina aliquotiert und bei ≤ -18 °C gelagert.
- Vor dem ersten Gebrauch erfolgt die Rehydrierung der IC-RNA durch Zufügen von je 500 µl Negativkontrolle zu einem Lyophilisat der IC-RNA. Diese wird für kurze Zeit inkubiert und durch kurzes Puls-Vortexen gemischt. Die rehydrierte IC-RNA wird in geeignete Volumina aliquotiert und bei ≤ -18 °C gelagert.
- Vor der ersten Anwendung erfolgt die Rehydrierung der lyophilisierten IVA Positivkontrolle durch Zufügen von je 50 µl der Negativkontrolle zu einem Lyophilisat IVA Positivkontrolle. Diese wird für kurze Zeit inkubiert und durch kurzes Puls-Vortexen gemischt. Die rehydrierte IVA Positivkontrolle wird in geeignete Volumina aliquotiert und bei ≤ -18 °C gelagert.
- Diese Detektionsmethode kann auf allen handelsüblichen Real-Time PCR Thermocyclern eingesetzt werden, die die emittierte Fluoreszenz der Farbstoffe FAM und HEX (Emission von 520 und 550 nm) erfassen. Bitte beachten: die standardmäßige Normalisierung gegen ROX (z.B. bei Cyclern der Firma Applied Biosystems) muss deaktiviert werden.
- Wir empfehlen den ausschließlichen Gebrauch von zertifiziert Nuklease-freien Verbrauchsmaterialien sowie von puderfreien Latexhandschuhen. Bitte tragen Sie Handschuhe während des gesamten, experimentellen Prozesses. Handschuhe sind möglichst häufig zu wechseln, insbesondere nach Verschütten oder bei Verdacht auf anderweitige Kontaminationen. Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen ist zwischen jeder Probe die Pipettenspitze zu wechseln.

- Neben dem Verbrauchsmaterial wird zusätzlich Folgendes benötigt (nicht im Kit enthalten):
 - RNA-Extraktionskit / -protokoll (z. B. Kylt® RNA / DNA Purification)
 - Tischzentrifuge
 - Vortexer
 - Mikropipetten, geeignet für Volumina von 1 µl bis 1000 µl
 - Zentrifuge für PCR-Reaktionsgefäße
 - Real-Time PCR Thermocycler

C. Kontrollreaktionen

- Die im Kit enthaltene Negativkontrolle ermöglicht den Ausschluss von Kontaminationen der Reagenzien. Die im Kit enthaltene IVA Positivkontrolle ermöglicht es, die Spezifität und Effizienz der verwendeten Reagenzien, der Reversen Transkription und der Real-Time PCR sowie des Real-Time PCR Thermocyclers zu kontrollieren. Nur wenn sowohl die Negativkontrolle als auch die IVA Positivkontrolle in jedem Real-Time RT-PCR-Lauf durchgeführt und als valide verifiziert werden, kann in der anschließenden Auswertung der gesamte Test als valide gewertet werden.
- Die IC-RNA wird vor der RNA-Präparation in einer standardisierten Kopienanzahl zum entsprechenden Lysispuffer gegeben und mit der Probe aufgereinigt. Im Falle einer erfolgreichen RNA-Präparation und keiner Hemmung der RT und Real-Time PCR wird die IC-RNA im Internen Kontrollkanal (HEX) detektiert. Dieser Kanal dient der Bestätigung wahrnegativer Ergebnisse durch Verifizierung einer erfolgreichen RNA-Präparation sowie des Ausschlusses von Real-Time PCR-Inhibitoren in den RNA-Präparationen.
- Es wird empfohlen eine oder mehr RNA-Isolationskontrollen (RIC) je RNA-Präparationsvorgang, abhängig von der Gesamtanzahl an Proben eines Durchganges, zu verwenden. Die RIC sollte nur aus dem sterilen Puffer bestehen, der auch zur Probenaufreinigung verwendet wird. Die RIC wird wahllos zwischen die Proben eingereiht, wie eine normale Probe behandelt und ermöglicht eine Detektion potentieller Kontaminationen der verwendeten Reagenzien (zusätzlich zur Negativkontrolle) ebenso wie eine Detektion möglicher Kreuzkontaminationen / Verschleppung zwischen individuellen Proben während der RNA-Präparation.
- Bestehen Zweifel an einer korrekten Probennahme und -auswahl, kann ferner die parallele Untersuchung der Proben mittels einer entsprechenden Real-Time (RT)-PCR, welche spezifisch für Referenzgene (eng.: „housekeeping genes“) der jeweiligen Tierart ist, erfolgen (wie z. B. Kylt® Host Cell Real-Time RT-PCR Detektionskit).

D. Protokoll *(siehe auch Kurzanleitung am Ende der Gebrauchsinformation)*

- Die Gesamtmethode des IVA-Nachweises umfasst folgende Schritte:
 1. Probenvorbereitung
 2. RNA-Präparation
 3. Reaktions-Setup, Reverse Transkription und Amplifikation (PCR)
 4. Daten-Auswertung – Validität und qualitatives Ergebnis
- Wir empfehlen eine zügige Arbeitsweise ohne Unterbrechung, um eine potentielle Degradierung der Proben und Reagenzien zu vermeiden. Wenn erforderlich, ist eine Lagerung der finalen RNA-Präparation bei ≤ -18 °C oder ≤ -70 °C bis zur folgenden IVA-Detektion möglich. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der RNA-Präparationen sollte vermieden werden.

1. Probenvorbereitung

- Für die Probenvorbereitung sind die einschlägigen EU-Rechtsverordnungen zu beachten (z.B. für aviäre Proben 2005/734/EC und 2006/437/EC). Sofern eine Poolung von mehr als fünf Proben oder Proben von mehr als fünf Tieren vorgesehen ist, muss die Probenvorbereitung vom Anwender Labor-intern gemäß den Anforderungen seines Qualitätssicherungssystems validiert werden. Für Kylt® Influenza A konnte demonstriert werden, dass maximal zehn Proben oder Proben von zehn Tieren je RNA-Präparation ohne Sensitivitätsverlust gepoolt werden können.
- Tupferproben werden in ausreichendem Volumen steriler Pufferlösung (z. B. physiologische Kochsalzlösung oder 0,1 x TE) gepoolt und eingeweicht. Anschließend werden die Proben durch ausgiebiges Puls-Vortexen ausgewaschen. Der ausgewaschene Überstand wird für die RNA-Präparation verwendet. Einzelne, kleine Tupfer können direkt in Lysispuffer gegeben werden.
- Gewebeproben werden in steriler Pufferlösung (siehe oben) homogenisiert und ein entsprechendes Volumen zur RNA-Präparation verwendet.
- Kulturelles Material wird direkt nach dem entsprechenden Protokoll der RNA-Präparation bearbeitet.

2. RNA-Präparation

- Vor Gebrauch erfolgt eine Vorbereitung des entsprechenden Lysispuffers des Kits zur RNA-Präparation. Je Proben-Präparation werden 5 µl der rehydrierten IC-RNA (siehe auch Kapitel B „Reagenzien und Materialien“) zum entsprechenden Volumen Lysispuffer gegeben. Die Zugabe der IC-RNA erfolgt vor dem Hinzufügen des Probenmaterials zum Lysispuffer.
- **Empfehlung:** Herstellung eines entsprechenden Lysispuffers mit IC-RNA in großem Volumen, Aliquotierung in für die Proben-Präparation der individuellen Proben angemessene Volumina (z. B. in Mikrozentrifugenröhrchen) und Lagerung der Aliquots bei -18 °C bis -20 °C bis zur direkten Verwendung für die RNA-Präparation.
- Mittels kommerziell erhältlicher RNA-Präparationskits (z. B. Kylt® RNA / DNA Purification oder alternative Kits) aufbereitete RNA ist geeignet zur Verwendung in Kylt® Influenza A. Die Konzentration der fertig aufbereiteten RNA sollte zwischen 1 pg/µl und 1 µg/µl liegen. Der Quotient OD260/280 sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen, um eine ausreichende Qualität der aufgereinigten RNA zu gewährleisten.
- Detaillierte Informationen zur RNA-Präparation sind der Gebrauchsanleitung des entsprechenden Kits zu entnehmen.

3. Reaktions-Setup, Reverse Transkription und Amplifikation

- Vor jedem Gebrauch sollte der 2x RT-qPCR-Mix und der rehydrierte IVA Detektions-Mix (siehe auch Kapitel B „Reagenzien und Materialien“) kurz gevortext und abzentrifugiert werden.
- Zur Bestimmung der Gesamtzahl benötigter Reaktionen wird die Anzahl der zu untersuchenden Proben (inklusive RIC(s), wenn durchgeführt) plus zwei weitere Ansätze für die Negativ- und IVA Positivkontrolle gezählt.

- Der Master-Mix wird aus 2x RT-qPCR-Mix und IVA Detektions-Mix für die entsprechende Anzahl an Reaktionen vorbereitet. Je PCR-Plattenvertiefung / Kavität werden 16 µl Master-Mix vorgelegt. Die Real-Time RT-PCR wird in folgender Reihenfolge angesetzt:

Reagenz	Volumen (µl)	
	pro Reaktion	z.B. n=7
2x RT-qPCR-Mix	10 µl	70 µl
IVA Detektions-Mix	6 µl	42 µl
Total Master-Mix	16 µl	112 µl 16 µl pro Reaktion vorlegen
RNA (Negativkontrolle / Probe (/ RIC) / Positivkontrolle)	4,0 µl	
Total Reaktion	20,0 µl	

- Es ist darauf zu achten, den 2x RT-qPCR-Mix und IVA Detektions-Mix nur so kurz wie möglich dem (Sonnen-)Licht auszusetzen und beide Reagenzien nach der Verwendung sofort wieder bei ≤ -18 °C zu lagern. Eine Blasenbildung während des Pipettierens von Master-Mix, Proben und Kontrollen ist zu vermeiden.
- 4 µl der Negativkontrolle werden zur entsprechenden Kavität gegeben und diese, wenn möglich, einzeln verschlossen.
- 4 µl der Proben-RNA (finale RNA-Präparationen – inklusive RIC(s), wenn durchgeführt) werden zur entsprechenden Kavität gegeben und diese, wenn möglich, einzeln verschlossen.
- Zur Risikominimierung potentieller Kreuzkontaminationen werden 4 µl der IVA Positivkontrolle erst nach Zugabe aller Proben und Kontrollen in die entsprechende Kavität gegeben. Vor jedem Gebrauch die rehydrierte IVA-Positivkontrolle (siehe auch Kapitel B „Reagenzien und Materialien“) kurz vortexen und abzentrifugieren.
- Wenn nicht bereits vorher geschehen, werden zum Schluss alle Kavitäten verschlossen. In jedem Fall wird empfohlen, die Kavitäten vor dem Start des Real-Time RT-PCR-Laufes zu zentrifugieren.
- Die Kavitäten werden anschließend in den Real-Time PCR Thermocycler gestellt und der Test mit folgenden Parametern durchgeführt:

Kylt® Profil I				
Schritt	Beschreibung	Temperatur	Dauer	
1	Reverse Transkription	50 °C	10 min	
2	Aktivierung der Polymerase	95 °C	1 min	
3	Denaturierung	95 °C	10 sek	} 42 Zyklen
4	Annealing & Extension	60 °C	1 min	
5	Fluoreszenzmessung	Kanäle FAM und HEX		

- Bitte beachten Sie die Geräte-spezifischen Angaben des Herstellers zu Ihrem Real-Time PCR Thermocycler.
- Die Parameter erlauben eine Kombination von Kylt® Influenza A mit weiteren Kylt® Real-Time RT-PCRs zum Nachweis viraler RNA. Bei der Kombination mehrerer Detektionskits ist auf die Erfassung aller benötigten Kanäle zu achten.

4. Daten-Auswertung – Validität und qualitatives Ergebnis

Allgemeines

- Die Daten der Amplifikationsreaktionen können automatisch mit der spezifischen Software Ihres Real-Time PCR Thermocyclers bearbeitet werden. Alternativ kann der Schwellenwert (Threshold) auch manuell gesetzt werden, wobei es folgende Punkte zu beachten gilt: Der Threshold sollte die FAM-Kurve und HEX-Kurve in ihrem linearen Bereich des Anstiegs schneiden (log-Skalierung der y-Achse). Durch das Setzen des Thresholds entspricht der Schnittpunkt mit der jeweiligen HEX- bzw. FAM-Kurve dem entsprechenden sog. „Cycle of threshold“ (Ct). Dieser korreliert negativ mit der initialen Konzentration der Zielgen-Kopien in der Real-Time RT-PCR-Reaktion.
- Die eigentliche Testauswertung beginnt mit der Bestimmung der Validität des gesamten Real-Time RT-PCR-Laufes. Anhand der IC-RNA kann die Validität jeder Probenreaktion sowie das Testergebnis verifiziert werden. Dies erfolgt mittels des Ct-Wertes des Internen Kontrollkanals (HEX). Anschließend wird der IVA-spezifische Status jeder einzelnen Probe (und der RIC(s), wenn durchgeführt) ermittelt (FAM).
- Das Prüfzertifikat der entsprechenden Kit-Charge weist Ct-Erwartungswerte für den Nachweis der Positivkontrolle im FAM-Kanal und für den Nachweis der IC-RNA im HEX-Kanal für die dort aufgeführten, in der Prüfung eingesetzten Real-Time PCR Thermocycler aus. Die Ct-Erwartungswerte sollten mit einer Abweichung von maximal ± 3 erreicht werden, anderenfalls sind sie ggf. den Labor- und Geräte-spezifischen Bedingungen durch angemessene Verifizierung im Rahmen des Qualitätsmanagements anzupassen.

Testauswertung - Kontrollreaktionen

- Der **Real-Time RT-PCR-Lauf** ist nur dann **valide** wenn die Kurven der Kontrollreaktionen wie folgt ausgewertet werden können:

Kontrollreaktionen	Signal	
	HEX	FAM
Negativkontrolle	negativ	negativ
Positivkontrolle	negativ	positiv

- Die FAM-Kurve der Negativkontrolle ist negativ (Ct > 42).
- Der FAM-Ct-Wert der IVA Positivkontrolle ist positiv und sollte innerhalb der zulässigen Schwankungsbreite des Erwartungswertes liegen.
- Falls eine oder mehrere RNA-Isolierungskontrollen (RIC(s)) mitgeführt wurden, sollten die entsprechenden FAM-Kurven keinen Ct-Wert ergeben (Ct > 42). Der HEX-Ct-Wert der IC-RNA sollte innerhalb der zulässigen Schwankungsbreite des Erwartungswertes liegen.

Testauswertung - Proben

Ziel	Kanal	Signal		
Interne Kontrolle	HEX	positiv	positiv / negativ	negativ
Influenza Virus Typ A	FAM	negativ	positiv	negativ
Die Probe ist Influenza Virus Typ A		negativ	positiv	inhibiert

- Eine **Probe** ist IVA **negativ**, wenn ihre FAM-Kurve negativ ($Ct > 40$) und der HEX-Ct-Wert der IC-RNA innerhalb der zulässigen Schwankungsbreite des Erwartungswertes liegt.
- Eine **Probe** ist IVA **positiv**, wenn ihre FAM-Kurve deutlich positiv ist ($10 \leq Ct < 35$), unabhängig von der HEX-Kurve. Eine Probe mit schwach positiver FAM-Kurve ($35 \leq Ct < 40$) ist als **fraglich** zu beurteilen. Diese Ct-Grenzwerte sind ggf. den Labor- und Geräte-spezifischen Bedingungen durch angemessene Verifizierung im Rahmen des Qualitätsmanagements anzupassen.
- Eine **Probe** ist **inhibiert**, wenn weder ihre FAM-Kurve ($Ct > 40$) noch ihre HEX-Kurve positiv ist (Abweichung des HEX-Ct-Erfahrungswertes > 3).
- **Empfehlung:** Im Falle einer gehemmten Probe kann der Test mit z. B. einer 1:4-Verdünnung der entsprechenden RNA wiederholt werden. Die Negativkontrolle dient hierbei als Verdünnungsmedium. Vorzugsweise kann auch die gesamte RNA-Präparation der Probe mit weniger Originalmaterial wiederholt werden. Anschließend kann zusätzlich eine Ethanolfällung zur Konzentrierung der RNA vorgenommen werden.
- Einfache und zuverlässige Dateneingabe zu den Proben, Start des Real-Time RT-PCR-Laufes sowie anschließende qualitative Proben-Auswertung und Dokumentation der Ergebnisse kann mittels der Kylt® PCR-Software vorgenommen werden.

E. Ähnliche und ergänzende Produkte

Produkt	Artikel Nr.	Inhalt	Beschreibung
Kylt® Host Cells	31106 / 31107	100 / 25	Detektion von tierischem Zellmaterial zur Verifizierung der korrekten Probenahme.
Kylt® RNA / DNA Purification	31315	50	Kombinierte Aufreinigung von RNA und DNA aus Veterinärproben.
Kylt® RNA / DNA Purification HTP	31826	4 x 96	Kombinierte, Magnetic-Beads-basierte Aufreinigung von RNA und DNA aus Veterinärproben, geeignet für automatisierte Hochdurchsatzprozesse. Geeignet für Kylt® Purifier und Kylt® Purifier 48.
Kylt® Purifier	31436	1	Gerät zur automatisierten, auf magnetischen Beads basierenden Aufreinigung von RNA und / oder DNA. Bis zu 96 Proben in unter 30 Minuten. Vorgesehen für Labore mit hohem Durchsatz.
Kylt® Purifier 48	31748	1	Gerät zur automatisierten, auf magnetischen Beads basierenden Aufreinigung von RNA und / oder DNA. Bis zu 48 Proben in unter 30 Minuten. Vorgesehen für Labore mit wenig bis mittlerem Durchsatz.
Kylt® Purifier Spin Tips	31434	5	Platte mit 96 separaten Spin Tips zum Mischen im Kylt® Purifier. Eine Platte pro Lauf wird benötigt. Ausreichend für 480 Proben. Eine Platte pro Lauf wird benötigt.
Kylt® Purifier Plates	31435	20	Platten für die verschiedenen Reagenzien im Aufreinigungskit. 4-5 Platten pro Lauf werden benötigt. Ausreichend für 320 bis 480 Proben (je nach Gerät und Protokoll).

Produktion:

SAN Group Biotech Germany GmbH | Mühlenstr. 13 | 49685 Hoeltinghausen | Germany
www.kylt.eu | kylt-de@san-group.com

Entwicklung, Herstellung und Vertrieb von Kylt® In-Vitro Diagnostika ist ISO 9001:2015 zertifiziert.

Kylt® ist ein eingetragenes Warenzeichen.

Nur für Veterinärgebrauch. Nur für *in vitro*-Gebrauch. Die regulatorischen Anforderungen können je nach Land variieren, dadurch sind ggf. nicht alle beschriebenen Produkte in Ihrer Region erhältlich.

© 2023 SAN Group Biotech Germany GmbH. Alle Rechte vorbehalten. Die in diesem Dokument genannten Marken sind Eigentum der SAN Group Biotech Germany GmbH bzw. der entsprechenden Markeninhaber.



KURZANLEITUNG

Real-Time RT-PCR Setup

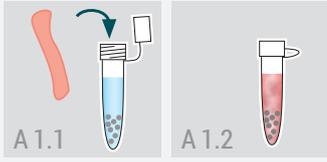
1

A Organ- / Gewebeproben,
z. B. Trachea, Lunge, Ceacaltonsillen

1. Probenvorbereitung

1.1 Gewebe in Röhrchen mit Kochsalzlg. (0,9%) oder 0,1 x TE überführen

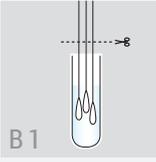
1.2 Homogenisierung



B Sonstige Proben, z.B. Tracheal-, Kloakaltupfer, BALF, Kulturmaterial

1. Probenvorbereitung

max. zulässige Probenanzahl in Röhrchen mit Kochsalzlg. (0,9%) oder 0,1 x TE poolen



2

2. Zentrifugation

2.1 kurz abzentrifugieren

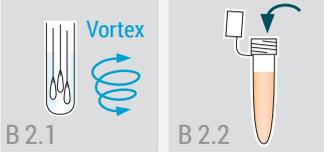
2.2 Überstand überführen



2. Auswaschung

2.1 gründlich vortexen

2.2 Überstand überführen



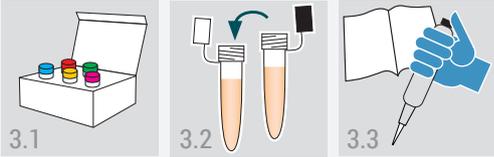
3

3. RNA Präparation

3.1 Verwendung eines kommerziell erhältlichen RNA-Präparationskits

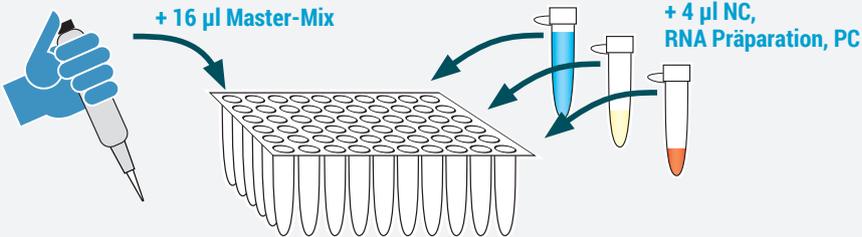
3.2 zunächst Zugabe von 5 µl Kylt IC-RNA je RNA-Präparation zu Lysis-Puffer

3.3 weitere Präparation gemäß Anleitung des entsprechenden Kits



4

Master-Mix verteilen und 4 µl NC, RNA Präparation, ggf. RIC, PC zugeben



+ 16 µl Master-Mix

+ 4 µl NC, RNA Präparation, PC

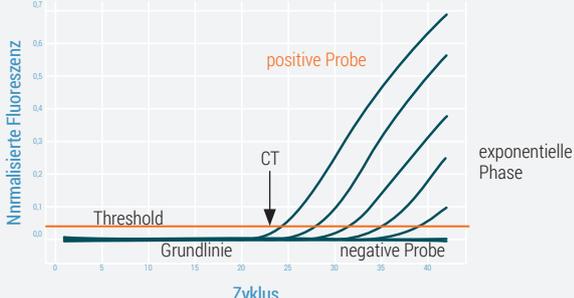
5

Kavitäten verschließen, zentrifugieren (empfohlen) und Thermocycler starten



6

Analyse



Normalisierte Fluoreszenz

positive Probe

CT

exponentielle Phase

Threshold

Grundlinie

negative Probe

Zyklus