



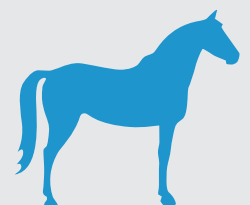
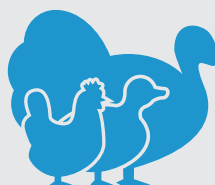
**V** Nur für *in vitro*  
Veterinär-Diagnostik.

# Kylt<sup>®</sup>

## Kylt<sup>®</sup> IVA beta

Real-Time RT-PCR Detektionskit zum Nachweis von  
Influenzavirus Typ A

[www.kylt.eu](http://www.kylt.eu)



Art. Nr. 31163 / 31164 (100 / 25 Reaktionen)

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

Zulassungsnummer: FLI-C 024

## Kylt® IVA beta

### Real-Time RT-PCR Detektionskit zum Nachweis von Influenzavirus Typ A

| Revision | Stand    | Beschreibung der Änderungen  |
|----------|----------|--|
| Rev006   | Jun 2023 | Änderung des Firmennamens, Geändertes Layout für die Auswertung der Kontrollreaktionen, Ergänzungen in "F. Ähnliche und ergänzende Produkte" |
| Rev005   | Sep 2019 | Layout, Matrix Pferd, Lagertemperatur  |

#### A. Allgemeines

- Kylt® IVA beta RT-qPCR dient dem spezifischen Nachweis von viraler RNA des Influenzavirus Typ A (IVA). Das Produkt ist geeignet für die Analyse von Proben vom Vogel, Wildvogel, Schwein und Pferd, wie Gewebe und Organe (z. B. Trachea, Lunge und Zäkaltonsillen), Tupferproben (z. B. Nasal-, Tracheal- oder Kloakentupfer), Speichel- und BAL-Proben (BALF / bronchoalveolar lavage fluid, nur Schwein), Kotproben und Probenmaterial kultureller Anzuchten der vorgenannten Proben (z. B. Zellkulturüberstand, Allantoisflüssigkeit).
- Der qualitative Nachweis mit Kylt® IVA beta RT-qPCR basiert auf einer duplex Real-Time RT-PCR: In einem gemeinsamen Reaktionsansatz werden parallel durch spezifische Primerpaare die beiden Zielgene für Influenzavirus Typ A sowie für die endogene Kontrolle (beta-Aktin RNA) zunächst revers transkribiert (Vorgang der Reversen Transkription (RT)) und dann in der Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) 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. der Internen Kontrolle 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 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® IVA beta RT-qPCR enthält die folgenden Reagenzien:

| Reagenz          | Deckel Farbcode | Menge bei Kit mit 100 / 25 Reaktionen  | Lagerung |
|------------------|-----------------|--|----------|
| 2x RT-qPCR-Mix   | ○ transparent   | 4 x / 1 x 280 µl                       | ≤ -18 °C |
| Detektions-Mix   | ● grün          | 4 x / 1 x Lyophilisat (à final 150 µl) | ≤ -18 °C |
| Positivkontrolle | ● rot           | 4 x / 2 x Lyophilisat (à final 50 µl)  | ≤ -18 °C |
| Negativkontrolle | ● blau          | 1 x 1 ml                               | ≤ -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 ist zu vermeiden. Reagenzien sollten so kurz wie möglich im aufgetauten Zustand verbleiben. Bei regelmäßiger Untersuchung nur weniger Proben sollten entsprechende Aliquots der Reagenzien vor der Lagerung bei ≤ -18 °C vorbereitet werden. Die Aliquots des Detektions-Mixes sollten so dosiert werden, dass sie nicht mehr als dreimal eingefroren und aufgetaut werden. Die Negativkontrolle kann alternativ bei +2 °C bis +8 °C gelagert 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 Detektions-Mix muss dunkel gelagert werden und sollte nicht direktem (Sonnen-)Licht ausgesetzt werden. Vor dem ersten Gebrauch wird der lyophilisierte Detektions-Mix rehydriert: Je 150 µl der Negativkontrolle werden zu einem Lyophilisat des Detektions-Mixes gegeben, für kurze Zeit inkubiert und durch kurzes Puls-Vortexen gemischt. Eine Lagerung in entsprechenden Aliquots bei ≤ -18 °C wird empfohlen.
- Die Reagenzien sind geeignet ein größeres Volumen eines Arbeits-Master-Mixes vorzubereiten und zu nutzen, siehe auch den 4. Punkt "Empfehlung" in Kapitel 3 "Reaktions-Setup, Reverse Transkription und Amplifikation" in Abschnitt E. "Protokoll".
- Vor dem ersten Gebrauch, wird die Positivkontrolle rehydriert: je 50 µl der Negativkontrolle werden zu einem Lyophilisat gegeben, für kurze Zeit inkubiert und durch kurzes Puls-Vortexen gemischt. Eine Lagerung in entsprechenden Aliquots bei ≤ -18 °C wird empfohlen. Die Positivkontrolle enthält Zielgene sowohl für den spezifischen Kanal für den Influenzavirus Typ A-Nachweis als auch für den Internen Kontrollkanal für den β-Actin-Nachweis.
- 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 ABI Cyclern) muss deaktiviert werden.

## C. Nicht enthaltene Ausstattung und Reagenzien

- Neben Verbrauchsmaterial werden folgende Geräte benötigt, die nicht in Kylt® IVA beta RT-qPCR enthalten sind:
  - 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 und -platten
  - Real-Time PCR Thermocycler
- Ergänzende Kylt® Produkte: Kapitel F "Ähnliche und Ergänzende Produkte".

- Wir empfehlen den ausschließlichen Gebrauch von zertifiziert Nuklease-freien Verbrauchsmaterialien sowie von puderfreien Schutzhandschuhen. Handschuhe sind während des gesamten Arbeitsprozesses zu tragen. Die Handschuhe sind möglichst häufig zu wechseln, insbesondere nach Verschütten oder bei Verdacht auf anderweitige Kontaminationen.

## D. Kontrollreaktionen

- Die Positivkontrolle ermöglicht es, die Spezifität und Effizienz der Reagenzien und des PCR-Laufes selbst sowie die einwandfreie Funktion der Real-Time RT-PCR und des Real-Time PCR Thermocyclers zu kontrollieren.
- Die Negativkontrolle ermöglicht es, den Eintrag von Kontaminationen auszuschließen. Nur wenn sowohl die Positiv- als auch die Negativkontrolle in jedem PCR-Lauf angewendet und als valide verifiziert werden, kann der gesamte Lauf in der abschließenden Auswertung als valide bewertet werden.
- Die Interne Kontrolle basiert auf der Detektion von beta-Aktin RNA, welche ubiquitär in den Zellen des Wirtes vorkommt aus dem die Probe stammt. Die beta-Aktin RNA wird in jeder einzelnen Reaktion revers transkribiert und coamplifiziert (Kanal HEX) und erlaubt die Evaluation der Probenahme, Probenlagerung und -transport, Probenvorbereitung und der Real-Time RT-PCR selbst.
- Es wird empfohlen eine oder mehrere 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 Probenvorbereitung 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.

## E. Protokoll *(siehe auch Kurzanleitung am Ende dieser Gebrauchsinformation)*

- Die Gesamtmethode des Nachweises umfasst folgende Schritte:
  1. Probenvorbereitung
  2. RNA Aufbereitung
  3. Reaktions-Setup, Reverse Transkription und Amplifikation (Real-Time RT-PCR)
  4. Auswertung – Validität und Qualitatives Ergebnis
- Es wird empfohlen, das Protokoll ohne Unterbrechung zu befolgen, um eine potentielle Degradierung der vorbereiteten Proben und Reagenzien zu vermeiden. Wenn erforderlich, können fertige RNA Präparationen bei  $\leq -18\text{ °C}$  oder  $\leq -70\text{ °C}$  gelagert werden. 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/EG und 2006/437/EG). 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® IVA beta RT-qPCR 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) 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.

## 2. RNA Präparation

### a) Kylt® RNA Präparation (mit Kylt® RNA / DNA Purification Produkten)

- Detaillierte Informationen sind den Gebrauchsanweisungen für die Kylt® RNA / DNA Purification Produkte zu entnehmen, siehe auch Abschnitt F "Ähnliche und Ergänzende Produkte".
- Die Konzentration der fertig aufbereiteten RNA sollte zwischen 1pg/µl und 1µg/µl liegen. Der Quotient OD 260/280 sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen, um eine ausreichende Qualität der aufgereinigten RNA zu gewährleisten.

### b) RNA Präparation mit anderen Methoden

- Die Konzentration der fertig aufbereiteten RNA sollte zwischen 1pg/µl und 1µg/µl liegen. Der Quotient OD260/280 sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen, um eine ausreichende Qualität der aufgereinigten RNA zu gewährleisten.
- Andere Kits oder Hausmethoden können zur RNA Präparation verwendet werden, solange die Qualität eine ausreichende Amplifikation und Detektion der Internen Kontroll-RNA ermöglicht.

## 3. Reaktions-Setup, Reverse Transkription und Amplifikation (Real-Time RT-PCR)

- 2x RT-qPCR-Mix und der rehydrierte Detektions-Mix (siehe auch Kapitel B "Reagenzien und Materialien") werden vor jedem Gebrauch kurz durch Vortexen gemischt und zentrifugiert.
- Zu Beginn wird die Zahl benötigter PCR-Reaktionen bestimmt: zu der Anzahl der zu untersuchenden Proben (inklusive RIC(s), wenn durchgeführt) werden zwei weitere Reaktionen für die Negativkontrolle und die Positivkontrolle addiert.
- Der Master-Mix wird aus 2x RT-qPCR-Mix und 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   | Beispiel n=7                                 |
| 2x RT-qPCR-Mix   | 10 µl          | 70 µl  |
| Detektions-Mix   | 6 µl           | 42 µl  |
| <b>Total Master-Mix</b>                                    | <b>16 µl</b>   | <b>112 µl</b><br>16 µl pro Reaktion vorlegen |
| RNA (Negativkontrolle / Probe / RIC(s) / Positivkontrolle) | 4,0 µl         |  |
| <b>Total Reaktion</b>                                      | <b>20,0 µl</b> |  |

- Alternativ kann auch ein größeres Volumen eines einsatzfertigen Arbeits-Master-Mixes vorbereitet werden. Dieser Arbeits-Master-Mix kann für mind. sechs Monate bei ≤ -18 °C gelagert werden. Der Arbeits-Master-Mix sollte so aliquotiert sein, dass er im Gebrauch nicht mehr als drei Frier-Tau-Zyklen ausgesetzt wird.
- Der 2x RT-qPCR-Mix und der Detektions-Mix sollten (Sonnen-)Licht möglichst nur kurz ausgesetzt werden und sofort wieder bei der richtigen Temperatur gelagert werden. Eine Blasenbildung sollte beim Pipettieren von Master-Mix, Proben und Kontrollen vermieden werden.
- 4 µl der Negativkontrolle werden in die entsprechende Kavität gegeben und nach Möglichkeit einzeln verschlossen.
- 4 µl 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 Positivkontrolle erst nach Zugabe aller Proben und Kontrollen in die entsprechende Kavität gegeben. Vor jedem Gebrauch die aufgetaute Positivkontrolle kurz vortexen und abzentrifugieren (siehe auch Kapitel B „Reagenzien und Materialien“).
- 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 Platte wird in den Real-Time PCR Thermocycler gestellt und die Amplifikation mit dem Kylt® Profil I wie unten angegeben gestartet.

| Kylt® Profil I |                        |                    |        |             |
|----------------|------------------------|--------------------|--------|-------------|
| Schritt        | Beschreibung           | Temperatur         | Dauer  |             |
| 1              | Reverse Transkription  | 50 °C              | 10 min |             |
| 2              | Aktivierung 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 |        |             |

- Kylt® Profil I ermöglicht die Kombination von Läufen dieser und den meisten anderen Kylt® RT-qPCR Detektionsmethoden sowie qPCR Detektionsprodukten.
- Bei einem kombinierten Real-Time (RT)-PCR Lauf muss unbedingt sichergestellt werden, dass alle benötigten Kanäle detektiert werden.
- Bitte beachten Sie die Geräte-spezifischen Angaben des Herstellers zu Ihrem Real-Time PCR Thermocycler.

#### 4. Auswertung - Validität und qualitatives Ergebnis

##### Allgemeines

- Die Daten der Amplifikationsreaktionen können automatisch mit der spezifischen Software des Real-Time PCR Thermocyclers verarbeitet werden. Alternativ kann auch manuell ein Threshold gesetzt werden, dabei ist folgendes zu beachten: Der Threshold sollte die FAM-Kurve und die HEX-Kurve im Bereich des linearen Anstiegs schneiden (logarithmische Skalierung der y-Achse). Durch das Setzen der Thresholds ergeben dessen Schnittpunkte mit der HEX- und der FAM-Kurve die entsprechenden sogenannten "Cycle Thresholds" (Ct), die negativ mit der anfänglichen Konzentration der Zielgen-Kopien in der Real-Time PCR-Reaktion korrelieren.
- Nur Kurvenverläufe mit einer typischen exponentiellen Amplifikation, d.h. die Kurve der Rohdaten zeigt zu Beginn eine flache Basislinie, gefolgt von einem deutlichen (exponentiellen) Anstieg der Fluoreszenz und gegebenenfalls dem Erreichen einer Plateau-Phase (bei logarithmischer Skalierung der y-Achse), sind als positiv zu bewerten.
- Für die Testauswertung wird zunächst die Validität des Laufes bestimmt. Danach wird die Validität der einzelnen Proben mit Hilfe der Internen Kontrolle anhand des zugehörigen Kanals (HEX) bestimmt. Schlussendlich wird der Influenzavirus Typ A-spezifische Status jeder Probe analysiert (FAM).
- Das Prüfzertifikat der entsprechenden Kit-Charge weist Ct-Erwartungswerte für den IVA-spezifischen Nachweis im FAM-Kanal und für den Nachweis von beta-Aktin im HEX-Kanal der Positivkontrolle für die dort aufgeführten, in der Prüfung eingesetzten Real-Time PCR Thermocycler aus. Die Ct-Erwartungswerte sollten mit einer Abweisung von maximal ± 3 erreicht werden, andernfalls 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   | <b>positiv</b> | <b>positiv</b> |

- Die FAM-Kurve der Negativkontrolle ist negativ (Ct > 42).
- Die FAM- und HEX-Ct-Werte der IVA Positivkontrolle sind positiv und sollten innerhalb der zulässigen Schwankungsbreite des Erwartungswertes liegen.
- Falls eine oder mehrere RNA-Isolationskontrollen (RIC(s)) mitgeführt wurden, sollten die entsprechenden FAM- und HEX-Kurven keinen Ct-Wert ergeben (Ct > 42 und CT > 35).

## Testauswertung - Proben

| Ziel                                      | Kanal | Signal         |                   |                |
|---|-------|----------------|-------------------|----------------|
| Interne Kontrolle                         | HEX   | <b>positiv</b> | positiv / negativ | negativ        |
| Influenzavirus Typ A                      | FAM   | negativ        | <b>positiv</b>    | negativ        |
| <b>Die Probe ist Influenzavirus Typ A</b> |       | <b>negativ</b> | <b>positiv</b>    | <b>gehemmt</b> |

- Eine **Probe** ist **negativ für Influenzavirus Typ A**, wenn ihre HEX-Kurve positiv (Ct < 35), aber ihre FAM-Kurve negativ ist.
- Eine **Probe** ist **positiv für Influenzavirus Typ A**, wenn ihre FAM-Kurve positiv ist (Ct < 42), unabhängig von der HEX-Kurve.
- Eine **Probe** ist **gehemmt**, wenn weder ihre FAM-Kurve noch ihre HEX-Kurve (Ct < 35) positiv ist.
- Empfehlung:** Im Fall eines invaliden Testergebnisses kann der Test mit z. B. einer 1:4-Verdünnung der entsprechenden RNA wiederholt werden, um eine Hemmung auszuschließen. Die Negativkontrolle dient hierbei als Verdünnungsmedium. Vorzugsweise kann auch die gesamte RNA-Präparation der Probe mit weniger Originalmaterial wiederholt werden. Anschließend kann zusätzlich eine Ethanol-fällung 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® Software vorgenommen werden.

## F. Ähnliche und Ergänzende Produkte

| Produkt                          | Artikel Nr. | Inhalt | Beschreibung  |
|----------------------------------|-------------|--------|---|
| 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.<br>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.<br>Bis zu 96 Proben in unter 30 Minuten.<br>Vorgesehen für Labore mit hohem Durchsatz.               |
| Kylt® Purifier 48                | 31748       | 1      | Gerät zur automatisierten, auf magnetischen Beads basierenden Aufreinigung von RNA und / oder DNA.<br>Bis zu 48 Proben in unter 30 Minuten.<br>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.<br>Ausreichend für 480 Proben. Eine Platte pro Lauf wird benötigt.                                 |
| Kylt® Purifier Plates            | 31435       | 20     | Platten für die verschiedenen Reagenzien im Aufreinigungs kit. 4-5 Platten pro Lauf werden benötigt.<br>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

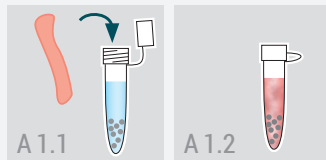
## Real-Time RT-PCR Setup

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

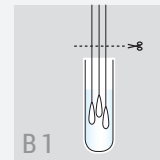


1.2 Homogenisierung

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

#### 1. Probenvorbereitung

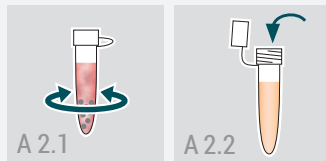
max. zulässige Probenanzahl in Röhrchen mit Kochsalzlg. (0,9%) oder 0,1 x TE poolen



2

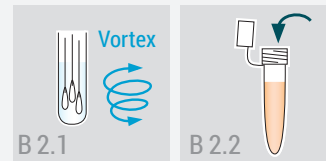
#### 2. Zentrifugation

2.1 kurz abzentrifugieren  
2.2 Überstand überführen



#### 2. Auswaschung

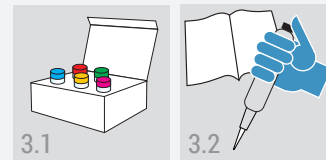
2.1 gründlich vortexen  
2.2 Überstand überführen



3

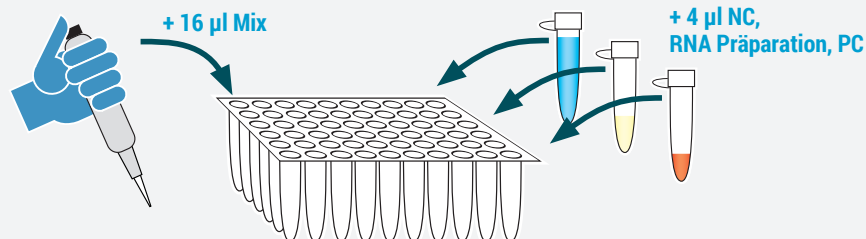
#### 3. RNA Präparation

3.1 Verwendung eines kommerziell erhältlichen RNA-Präparationskits  
3.2 weitere Präparation gemäß Anleitung des entsprechenden Kits



4

Master Mix verteilen und 4 µl NC, RNA Präparation und PC zugeben



5

Kavitäten verschließen, zentrifugieren (empfohlen) und Thermocycler starten



6

Analyse

