



MOLBIOL

LightMix® in-vitro Diagnostik-Kit
Ureaplasma urealyticum /
Ureaplasma parvum

Kat.-Nr.: 40-0461-32

Nachweis genomischer DNA von *Ureaplasma urealyticum* /
und Ureaplasma parvum

zur Anwendung mit einem

LightCycler® von Roche Diagnostics

Reagenzien für 96 Reaktionen

Bei Ankunft:

**Die vorgemischten PCR-Reagenzien und die Kontrollen
vor Licht geschützt bei Raumtemperatur lagern (nicht einfrieren).**

**Die FastStart DNA Master HybProbe Reagenzien gefroren lagern (-20 °C)
(sofern mitgeliefert)**



Inhaltsverzeichnis

1. Produktinformation	3
1.1. Verwendungszweck	3
1.2. Technische Vorgaben	3
1.2.1. Klinische Proben	3
1.2.2. Geräte, Software und Produktionsleistung	3
1.2.3. Geräte vom Typ LightCycler® - Kanal (Filter) Einstellungen	4
1.3. Inhalt	4
1.4. Lagerung und Stabilität	5
2. Zusätzliche Ausrüstung und Reagenzien	6
2.1. Erforderliche Ausrüstung	6
2.2. Optional Ausrüstung	6
2.3. Vorbereitung der Probe	6
3. Hintergrundinformationen	7
3.1. Medizinischer Hintergrund	7
3.2. Methode und Funktionsprinzip des Assays	7
3.3. Kontrollreaktion	8
3.3.1. Spiked Extraktionskontrolle (sEC)	8
3.3.2. Interne Kontrolle (IC)	8
3.4. Leistungsmerkmale	8
3.4.1. Diagnostisch Spezifität, Sensitivität und Prädiktive Werte	9
3.4.2. Diagnostische Spezifität	9
4. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise	10
5. Vorbereitung der Probe	11
5.1. Vorbereitung des Extraction Control Targets (nECT)	11
5.1.1. Verwendung von nECT als spiked Extraktionskontrolle (empfohlen)	11
5.1.2. Verwendung von nECT als Interne Kontrolle	11
5.2. Abstriche	11
5.2.1. Abstriche im Transportmedium	11
5.2.2. Abstriche in Agarose	11
5.3. X480	12
6. Programmierung	12
6.1. Farbkompensation	12
6.2. Geräte mit Kapillartechnik	12
6.3. Multiwell-Geräte	13
7. Versuchsprotokoll	14
7.1. Ansetzen der Reagenzien	14
7.1.1. LightCycler® FastStart DNA HybProbe Master	14
7.1.2. Ansetzen der lyophilisierten PSR	14
7.1.3. Negativkontrolle (NTC = No Template Control) und Verdünnungsmittel (DIL)	14
7.1.4. Vorbereitung der Kontroll-DNAs	15
7.2. Ansetzen des Reaktionsgemischs	15
7.2.1. Ansetzen des Reaktionsgemischs für 32 Reaktionen beschrieben	15
7.2.2. Ansetzen des Reaktionsgemischs für eine Reaktion	15
7.3. Lagerung und Stabilität der verdünnten Komponenten	16
7.4. Laden der Kontrollen und der Proben	17
7.4.1. Merkmale der Proben	17
7.4.2. Laden der Kapillaren / Wells	17
7.4.3. Geräte mit Kapillartechnik	17
7.4.4. Multiwell-Geräte	17
8. Datenanalyse und Interpretation	18
8.1. Grenzen und Interferenzen	18
8.2. Kalibrierung	18
8.3. Qualitätskontrolle - Akzeptanzkriterien	18
8.3.1. Negativkontrolle (NTC)	18
8.3.2. Positivkontrolle für <i>U. urealyticum</i> - <i>U. parvum</i>	19
8.3.3. Fehler bei den Kontrollläufen	19
8.3.4. Proben	19
8.3.5. Anormale Schmelzkurven	20
8.4. Lesen der Ergebnisse	20
8.4.1. Amplifikationsanalyse: Geräte mit Kapillartechnik	20
8.4.2. Schmelzkurvenanalyse: Geräte mit Kapillartechnik	21
8.4.3. Amplifikationsanalyse: Multiwell-Geräte	22
8.4.4. Schmelzkurvenanalyse: Multiwell-Geräte	23
8.5. Interpretation der Daten	25
9. Fehlersuche und -behebung	26
10. Literaturnachweis	27
11. Sicherheitsdatenblatt	28
12. Überarbeitungsverlauf	28

1. Produktinformation

1.1. Verwendungszweck

Dieses Produkt ist ein *in-vitro*-Nukleinsäureamplifikationstest zum Nachweis und zur Unterscheidung genomischer DNA von *Ureaplasma urealyticum* (U.u.) und *Ureaplasma parvum* (U.p.) aus Nukleinsäureextrakten, die aus humanen Urogenitalabstrichen gewonnen wurden.

Dieses Diagnostikum darf ausschließlich von entsprechend ausgebildetem Fachpersonal angewendet werden.

Anmerkung: Die Leistung des Assays kann nur bei Verwendung mit einem LightCycler® gewährleistet werden (für Einzelheiten hierzu siehe 1.2.2).

1.2. Technische Vorgaben

1.2.1. Klinische Proben

Für die Durchführung des Tests sind 5 µl aufgereinigte DNA in wässriger Lösung erforderlich.

Der Test wird an DNA durchgeführt, die aus humanen Urogenitalabstrichen gewonnen wurde.

Vor der Extraktion der Probe Kapitel 5. **Vorbereitung der Probe** lesen.

Wie viel biologisches Material (biologische Probe) mit einem Abstrich gewonnen wird, hängt stark von der Probennahme selbst ab, weshalb eine absolute Quantifizierung unmöglich ist.

1.2.2. Geräte, Software und Produktionsleistung

Ein Kit enthält Reagenzien für 96 Reaktionen, die jeweils in einem Volumen von 20 µl durchgeführt werden.

Für jeden Lauf werden eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle benötigt.

In der nachstehenden Tabelle sind einige der Merkmale des Kits zusammengefasst:

LightCycler®	Software-version (oder höher)	Dauer eines Laufs (ca.)	Max. Probenanz. pro Lauf ⁽¹⁾	Maximale Produktionsleistung des Kits ⁽¹⁾	Minimale Produktionsleistung des Kits ^(1,2)
LC1.X	3.5 ⁽⁵⁾	70 min	30 + 2 Kontr.	90	32
LC 2.0	4.05	70 min	30 + 2 Kontr.	90	32
LC480 II ⁽⁴⁾ (96 Wells)	1.5	100 min	94 + 2 Kontr.	94	32
LC480 II ⁽⁴⁾ (384 Wells)	1.5	100 min	382 ⁽³⁾ + 2 Kontr.	94	32
z 480 (offener Kanal)	1.5	100 min	94 + 2 Kontr.	94	32

- 1 In jedem Lauf müssen 2 Kontrollreaktionen mitgeführt werden: eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle (NTC = No-Target Control).
- 2 Für die Berechnung wurde die Analyse einer einzigen klinischen Probe pro Lauf zugrunde gelegt.
- 3 Hierfür sind vier Kits erforderlich.
- 4 Die „erste Version“ des LightCycler® 480 kann für dieses Kit nicht verwendet werden.
- 5 Falls möglich, auf die Softwareversion 4.10 oder höher upgraden.

Table 1.

1.2.3. Geräte vom Typ LightCycler® - Kanal (Filter) Einstellungen

Gerät	Farbstoff / Name des Kanals			
	530	LC610	LC640	LC690
LightCycler® 1.X	F1	---	F2	F3
LightCycler® 2.0	530	610	640	705
LightCycler® 480 II	465-510	498-610	498-640	498-660
cobas z 480 Analyzer	465-510	498-610	498-645	498-700

Table 2.

1.3. Inhalt

Lyophilisierte vorgemischte PCR-Reagenzien

 **Bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt lagern**

Deckel-farbe	Etikett	Beschreibung des Inhalts	Reaktion/ Röhrenstatus	Insgesamt
3 x	Violett	PSR Parameterspezifische Reagenzien (PSR) Primer und Hybridisierungs-sonden, spezifisch für: <i>U.urealyticum</i>, <i>U.parvum</i> und Kontrollreaktion ≤0.01 pg unmarkierte Oligonukleotide ≤0.01 pg Fluorescein-markierte Oligonukleotide ≤0.01 pg LightCycler Rot 640 markierte Oligonukleotide (U.p.) ≤0.01 pg LightCycler Rot 690 markierte Oligonukleotide (U.p.) ≤0.01 pg LightCycler Rot 640 markierte Oligonukleotide (EC)	32 Reaktionen Lyophilisiert blau-grünes Pellet	96 Reak.

Kontroll-DNA

 **Bei Raumtemperatur lagern**

Deckel-farbe	Etikett	Beschreibung des Inhalts	Reaktion/ Röhrenstatus	Insgesamt
1 x	Orange	Positivkontrolle für <i>Ureaplasma urealyticum</i> / <i>Ureaplasma parvum</i> ≤0.01 pg Plasmid-Target (synthetisch) [1E4 Kopien / Reaktion]	32 Reaktionen Lyophilisiert blaues Pellet	32 Reak.
1 x	Weiß	Extraction Control Target (Target zur Kontrolle der Extraktion) ≤0.01 pg Plasmid-Target (synthetisch) [4.8E6 Kopien: Gesamtmenge]	100 Reaktionen lyophilisiert blaues Pellet	96 Reak.
1 x	Schwarz	Negativkontrolle (No Template Control) Stabilisierer (DNA)	blaues Pellet	---

Polymerase-Mix: LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe

 **Nach der Anlieferung bei -20 °C lagern.**

Die FastStart DNA Master HybProbe ist nur in Kits enthalten, die direkt von TIB MOLBIOL an Kunden in Mitteleuropa geliefert werden ⁽¹⁾.

Die FastStart DNA Master HybProbe ist in den Kits, die von Roche Diagnostics oder dessen Vertriebspartner vor Ort geliefert werden, nicht enthalten.

Deckel-farbe	Etikett	Beschreibung des Inhalts	Reaktionen Röhrenlage-rung	Insgesamt
3 x	Rot	1a LightCycler® FastStart Enzym	32 Reaktionen gefroren	96 Reak.
3 x	Weiß	1b LightCycler® FastStart Reaction Mix Hyb-Probe	32 Reaktionen gefroren	96 Reak.

3 x⁽²⁾	Farblos	Wasser	H ₂ O mit PCR-Qualität	gefroren	96 Reak.
3 x⁽²⁾	Blau	MgCl₂	MgCl ₂ , 25 mM	32 Reaktionen gefroren	96 Reak.
1) Das FastStart Enzym wird von TIB MOLBIOL bei Raumtemperatur versandt. 2) Das von Roche Diagnostics gelieferte FastStart Enzym enthält nur 2 Röhrchen H ₂ O und 1 Röhrchen MgCl ₂ , die gelieferte Menge ist jedoch für die beschriebene Verwendung dieses Kits ausreichend.					

Table 3.

1.4. Lagerung und Stabilität

Auf die **unterschiedlichen Lagerbedingungen** für die Reagenzien und den Polymerase-Mix achten!

Lagerungsbedingungen

Reagenzien und Kontrollen

Die lyophilisierten Reagenzien (vorgemischte PSR-Reagenzien und Kontroll-DNA) vor Licht geschützt und bei Raumtemperatur (18 °C / 25 °C) lagern.

Diese trockenen Reagenzien nicht einfrieren. Das Verfalldatum ist auf dem Etikett des Kits angegeben.

Polymerase-Mix

Die LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe bei -15 °C bis -25 °C lagern. Siehe Verfalldatum auf dem Etikett des Polymerase-Röhrchens.

Transport/Versand

Die Produkte werden bei Umgebungstemperatur transportiert bzw. versandt (ohne Kühlung). Die Transportstabilität der Reagenzien und der FastStart Enzymkomponenten von Roche wurde unter üblichen europäischen Versandbedingungen getestet (30 °C und weniger). Für die getrockneten Reagenzien (PSR) wurde nachgewiesen, dass sie eine vorübergehende Inkubation tolerieren können, z. B. zwei Tage bei 60 °C, eine Situation, die in arabischen Ländern auftreten kann.

2. Zusätzliche Ausrüstung und Reagenzien

2.1. Erforderliche Ausrüstung

LightMix® Kit – Color Compensation HybProbes

TIB Molbiol
Kat.-Nr. 05 997 704 001

LightCycler® 2.0

LightCycler® 2.0
LightCycler®-Software Version 4.05 oder
LightCycler®-Software Version 4.10 oder höher
LightCycler® Capillaries (Kapillaren, 20 µl)
oder

Roche Diagnostics
Kat.-Nr. 12 011 468 001
Außer Handel
Kat.-Nr. 04 779 584 001
Kat.-Nr. 11 909 339 001

LightCycler® 480 II

LightCycler® 480 II
cobas 4800 System (cobas z 480 Analyzer)
LightCycler®-Software Version 1.5 oder höher
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, weiß oder
LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, weiß

Roche Diagnostics
Kat.-Nr. 05 015 278 001
Kat.-Nr. 05 200 881 001
Kat.-Nr. 04 994 884 001
Kat.-Nr. 04 729 692 001
Kat.-Nr. 04 729 749 001

Allgemeines Material

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)
Nukleasefreies Wasser mit PCR-Qualität

jeder Hersteller
jeder Hersteller

2.2. Optional Ausrüstung

Extraction Control Target (nECT)

TIB Molbiol
Kat.-Nr. 07 891 253 001
Roche Diagnostics
Kat.-Nr. 03 709 582 001
Kat.-Nr. 03 357 317 001

LC Carousel Centrifuge 2.0 (230 Volt)
Capping Tool

2.3. Vorbereitung der Probe

Vorbereitung der Probe von Hand:

High Pure PCR Template Preparation Kit (#)
oder High Pure Viral Nucleic Acid Kit (#)
Ethanol p.a.
Isopropanol p.a.

Roche Diagnostics
Kat.-Nr. 11 796 828 001
Kat.-Nr. 11 858 874 001
jeder Hersteller
jeder Hersteller

Automatisierte Probenvorbereitung:

MagNA Pure 96
MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit
MagNA Pure 96 IVD
MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit
MagNA Pure (#)
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I
MagNA Pure 2.0 (#)
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I
MagNA Pure Compact (S)
MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I
X480 (#)
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit und
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit

Roche Diagnostics
Kat.-Nr. 05 195 322 001
Kat.-Nr. 05 467 497 001
Kat.-Nr. 06 541 089 001
Kat.-Nr. 06 543 588 001
Außer Handel
Kat.-Nr. 03 003 990 001
Kat.-Nr. 05 197 686 001
Kat.-Nr. 03 003 990 001
Kat.-Nr. 03 731 146 001
Kat.-Nr. 03 730 964 001
Kat.-Nr. 05 200 890 001
Kat.-Nr. 05 235 782 190
Kat.-Nr. 05 235 863 190



(#) Es ist ein zusätzliches Röhrchen Extraction Control Target (Extraktion-Kontroll-Target) erforderlich.



3. Hintergrundinformationen

3.1. Medizinischer Hintergrund

Die Identifizierung von *Ureaplasmen* mittels Kultur ist mühsam. NAT-basierte Tests wie die PCR sind deshalb auf dem Weg, die Nachweismethoden der ersten Wahl zu werden.

Ureaplasmen (*U. urealyticum* und *U. parvum*) sind Bakterien, die der gleichen Familie angehören, den *Mycoplasmataceae*. Sie sind Teil der normalen Genitalflora und werden horizontal, aber auch während der Geburt übertragen. *Ureaplasma* wird mit Harnröhrenentzündungen, Unfruchtbarkeit, Frühgeburten, Intraamnialen Infektionen und Totgeburten in Verbindung gebracht.

Bei Früh- und Neugeborenen kann eine Infektion mit *Mykoplasmen* oder *Ureaplasmen* eine Lungenentzündung, Sepsis, Meningitis und branchopulmonale Dysplasie verursachen.

Für die Probennahme werden Genitalabstriche bevorzugt, Urin hat sich als unzureichend erwiesen.

3.2. Methode und Funktionsprinzip des Assays

Dieses Gerät amplifiziert und weist Fragmente der Genome von *Ureaplasmen* in einem Nukleinsäureextrakt nach, der aus Abstrichen gewonnen wurde.

Ein zum Teil erhaltenes Fragment des Ureasegens wird mit spezifischen Primern (182 bp long) amplifiziert und mit einer normalen Fluorescein-Sonde, einer spezifischen mit dem Farbstoff LightCycler® Rot 640 für *U. parvum* markierten Sonde oder einer spezifischen mit dem Farbstoff LightCycler® Rot 690 für *U. urealyticum* markierten Sonde nachgewiesen.

Die Pathogene werden anhand der Farben der Farbstoffe unterschieden.

Nach jedem PCR-Zyklus binden die Sonden während des Annealing-Schritts an das durch die PCR erzeugte Target und bringen so die Fluorophore in unmittelbare Nähe. Der Donor-Fluorophor Fluorescein wird durch Licht angeregt, ein Teil der Energie wird auf den Akzeptor-Farbstoff übertragen und nachgewiesen. Die Fluoreszenzintensitäten werden in Abhängigkeit von der Zykluszahl dargestellt, wodurch ein Bild der Amplifikation entsteht. Zudem wird ein Crossing Point (Cp) berechnet, der mit dem Logarithmus der Konzentration des Targets in der Probe in Beziehung steht.

Um zu überprüfen, ob das richtige Produkt gebildet wurde, können Hybridisierungssonden zur Identifizierung des PCR-Produkts in einer Schmelzkurvenanalyse verwendet werden. Der Schmelzpunkt (Tm) hängt sowohl von der Länge und dem G+C-Gehalt als auch vom Grad der Homologie mit der Sensorsonde ab. Bei diesem Produkt wird die Tm zur Unterscheidung verwendet. Leichte Temperaturverschiebungen sind akzeptabel, da die Form der Kurve auch von der Menge des Produkts abhängt.

Eine signifikante Abnahme der Schmelztemperatur ist ein Hinweis auf eine Sequenzvariation, die eine eventuelle geringere Signalstärke im Quantifizierungsdiagramm erklärt und Anlass für eine anschließende Analyse der Probe oder des PCR-

Produkts mittels DNA-Sequenzierung sein kann (wenden Sie sich an: service@tib-molbiol.de, wenn Sie Unterstützung wünschen).

Mit Hilfe der mitgelieferten Kontroll-DNAs kann ein Vergleich mit unbekannten Patientenproben angestellt werden.

3.3. Kontrollreaktion

Aus dem Extraction Control Target (**nECT**) wird ein zusätzliches PCR-Produkt von 182 bp amplifiziert und mit einer kurzen, mit LightCycler® Rot 640 markierten Sonde nachgewiesen, die nur in der Schmelzkurvenanalyse sichtbar ist.

Die Kontrollreaktion stört die analytische Reaktion nicht. Sie ist empfindlicher, wenn Inhibitoren vorhanden sind, bei hochpositiven Proben findet dagegen keine Amplifikation statt. Die Kontrollreaktion muss in negativen und niedrig konzentrierten Proben sichtbar sein, während sie in Gegenwart höherer Mengen an Target-DNA (1.000 Kopien/Reaktion oder mehr) nicht stattfindet.

Das Extraction Control Target kann auf zwei unterschiedliche Arten eingesetzt werden: entweder als Spiked Extraktionskontrolle (3.3.1) oder als Interne Kontrolle (3.3.2).

	Pathogen		
	<i>U. Urealyticum</i>	<i>U. parvum</i>	Kontrolle
Kanal	LC690	LC640	LC640
PCR-Fragment	182 bp	182 bp	182 bp
Tm Schmelzkurve	67-69 °C	66-68 °C	49-51 °C

Table 4.

3.3.1. Spiked Extraktionskontrolle (sEC)

Mit dem Verfahren der gespikten Extraktionskontrolle (**sEC**) wird die Extraktion überprüft und festgestellt, ob Amplifikationsinhibitoren vorhanden sind (empfohlenes Verfahren).



Die Wiederfindungsrate des aufgereinigten Plasmids im nECT hängt vom angewendeten Extraktionsverfahren ab. Die Menge des nECT muss entsprechend angepasst werden. Siehe genaue Anleitung in Abs, 5.1.

3.3.2. Interne Kontrolle (IC)

Mit der Internen Kontrolle (**IC**) wird nur festgestellt, ob Amplifikationsinhibitoren vorhanden sind.



Dieses Verfahren ist verpflichtend, wenn die Extraktion mit einem MagNA Pure Compact durchgeführt wird.

3.4. Leistungsmerkmale

Analytische Spezifität

Die Spezifität für das Target-Gen und die Eignung der für diesen Test verwendeten Amplifikation mittels PCR wurden mithilfe einer direkten DNA-Sequenzierung des Amplikons nachgewiesen.

Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität für geklonte Standards beträgt 10 Kopien pro PCR, was 500 Kopien / ml klinischer Probe entspricht.

3.4.1. Diagnostisch Spezifität, Sensitivität und Prädiktive Werte

Die Zellkultur ist die Goldstandard-Methode für *Ureaplasma*. Um falsch positive Proben richtig identifizieren zu können, wurden alle nicht übereinstimmenden Proben auch mit zwei anderen unabhängigen PCR-Systemen amplifiziert. Es wurden nur die Proben als wirklich positiv betrachtet, die in beiden PCR-Analysen positiv waren. Nur diese wurden dann zu den in der Kultur positiven Proben hinzugefügt.

			Kultur + 2 unabhängige PCRs			Prävalenz	57.5 %
TIB Molbiol	U.u./U.p.		Neg	Pos		Empfind- lichkeit	96.9 %
		167	71	96		Spezifität	95.8 %
	Neg	71	68	3		PPV	96.9 %
	Pos	96	3	93		NPV	95.8 %

3.4.2. Diagnostische Spezifität

Es wurden insgesamt 24 verschiedene einfach infizierte biologische Proben parallel durch Sequenzierung und mit dem vorliegenden Kit analysiert. Die DNA-Sequenzierungsdaten wurden mit ABI 3730xl von LGC Genomics GmbH, Berlin, erhalten.

Von den analysierten Proben wurden 11 als *U. urealyticum* und 13 als *U. parvum* identifiziert.

Studienergebnisse: Die Ergebnisse der beiden Analysemethoden stimmten zu 100 % überein.

4. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

Vorschriften für den Umgang mit dem Produkt

Dieses Produkt ist ein *in-vitro*-Diagnostikum und darf ausschließlich von entsprechend ausgebildetem Fachpersonal angewendet werden.

Es sind die allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen zu berücksichtigen, die für den Umgang mit typischen Labormaterialien generell gelten.

Bei den Arbeitsabläufen müssen die Grundprinzipien der guten Laborpraxis befolgt werden. Aufgrund des Kontaminationsrisikos müssen die Vorbereitung der PCR und die Amplifikation mittels PCR in räumlich getrennten Bereichen durchgeführt werden.

Keine Reagenzien aus verschiedenen Chargen miteinander mischen.

Die Reagenzien nach dem Verfalldatum nicht mehr verwenden.

Die Version der Anleitung benutzen, die mit dem Kit geliefert wurde (siehe Etikett des Kits).

Allgemeine Labortechniken

Alle Materialien menschlichen Ursprungs und die zugehörigen Abfälle sind als potenziell infektiös zu betrachten. Alle Arbeitsflächen gründlich mit von den Behörden vor Ort zugelassenen Desinfektionsmitteln reinigen.

Im Arbeitsbereich des Labors darf nicht gegessen, getrunken oder geraucht werden.

Nicht mit dem Mund pipettieren.

Bei der Arbeit mit den Proben und den Bestandteilen des Kits Einweghandschuhe, Laborkittel und einen angemessenen Augenschutz tragen.

Beim Pipettieren der Reagenzien diese weder mikrobiell noch mit Nukleasen kontaminieren. Es müssen unbedingt sterile Einwegspitzen verwendet werden.

Nach der Arbeit mit den Proben und den Bestandteilen des Kits gründlich die Hände waschen.

Vorbereitung der Probe

Für eine sachgerechte Handhabung und Entsorgung wird auf die Sicherheitshinweise in der Packungsbeilage des verwendeten Produktes verwiesen (siehe Kapitel 2.3).

Amplifikation und Nachweis

Vor der Anwendung dieses Produkts bitte die Betriebsanleitung des LightCycler® lesen.

Eine Probendatei mit der genauen Belegung speichern, damit die Proben fehlerfrei identifiziert werden können.

Die Einstellungen des LightCycler® kontrollieren und sicherstellen, dass sie mit denen übereinstimmen, die im folgenden Abschnitt „PCR-Protokoll“ für Ihr Gerät angegeben sind.

Die Kapillaroberfläche oder Plattenabdeckung nicht ohne Handschuhe berühren.

Bitte die Bedienungsanleitung und die Sicherheitshinweise in der Betriebsanleitung des LightCycler® lesen.

Umgang mit Abfällen

Alle nicht verwendeten Reagenzien und Abfälle gemäß den vor Ort geltenden Gesetzen entsorgen.

5. Vorbereitung der Probe

Wie viel biologisches Material (biologische Probe) mit einem Abstrich gewonnen wird hängt stark von der Probennahme selbst ab, weshalb eine absolute Quantifizierung nicht möglich ist.

5.1. Vorbereitung des Extraction Control Targets (nECT)

Das Röhrchen 1 Minute lang bei 10.000 rpm zentrifugieren, das nECT in einem PBS-Volumen auflösen, das vom verwendeten Extraktionsverfahren abhängt (siehe unten). Mischen und herunterzentrifugieren (die PBS ist nicht im Lieferumfang des Kits enthalten).

Extraktionsverfahren	Kat.-Nr.	PBS
Internes Kontrollverfahren	(siehe 3.3.2).	1200 µl
High Pure PCR Template Preparation Kit	11 796 828 001	600 µl
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	11 858 874 001	600 µl
MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit	05 467 497 001	1200 µl
MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit	06 543 588 001	1200 µl
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I	03 003 990 001	600 µl
cobas [®] 4800 System Sample Preparation Kit (§)	05 235 863 190	600 µl
MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (#)	03 730 964 001	1200 µl

(§) Für spezifische Anweisungen siehe 5.3.
(#) Es ist nur die Anwendung des **Internen Kontrollverfahrens** erlaubt (siehe 3.3.2).



Table 5.

5.1.1. Verwendung von nECT als spiked Extraktionskontrolle (empfohlen)

Wenn das spiked Extraction Control-Verfahren (sEC) durchgeführt wird, 10 µl des **Extraction Control Targets** zu der zu extrahierenden Probe hinzugeben.

Daran denken, dass die No Target Control (**NTC**, Negativkontrolle) und die Verdünnungsmittel für die Kontroll-DNAs (**DIL**) durch Hinzugabe von **nECT** noch fertiggestellt werden müssen (siehe 7.1.3).

5.1.2. Verwendung von nECT als Interne Kontrolle

Wenn das Interne Kontrollverfahren durchgeführt wird, das Extraction Control Target **nur** bei der Vorbereitung des Reaktionsgemischs verwenden (siehe 7.2).

5.2. Abstriche

5.2.1. Abstriche im Transportmedium

200 µl Transportmedium verwenden.

Die Nukleinsäure mit dem entsprechenden Extraktionskit aufreinigen, wie in den zugehörigen Extraktionsprotokollen beschrieben, und in 50 µl extrahieren.

5.2.2. Abstriche in Agarose

Wenn der Vaginal- oder Harnröhrenabstrich in Agarose im Prüflabor ankommt, den Abstrich in 250 µl PBS dispergieren, die Agarosepartikel 3-5 Minuten sedimentieren

lassen (Agarose ist ein bekannter PCR-Inhibitor) und den Überstand als Transportmedium betrachten (5.2.1).

5.3. X480

Die Deep-Well-Platte mit 10 µl nECT bestücken. 400 µl des Transportmediums für die Extraktion verwenden und die Elution auf 100 µl einstellen.

Die aufgereinigte DNA gekühlt lagern (4 °C - 8 °C).

Wenn sie über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden muss, ist sie einzufrieren (-20 °C).



6. Programmierung

6.1. Farbkompensation



Bei der Verwendung des

LightMix® Kit Ureaplasma urealyticum / Ureaplasma parvum ist eine Farbkompensation erforderlich.

Die Analyse der Daten mit einer deaktivierten „Farbkompensation“ führt zu einem ungültigen Auslesen der Ergebnisse.

6.2. Geräte mit Kapillartechnik

Für Einzelheiten siehe Betriebsanleitung des LightCycler®.

Das Protokoll besteht aus vier Programmabschnitten (Tab. 5):

1. **Denaturierung** der Probe und Aktivierung des Enzyms
2. **Cycling** Amplifikation der Target-DNA mittels PCR
3. **Schmelzen** Identifizierung der mittels PCR amplifizierten DNA-Sequenz
4. **Abkühlung** des Geräts

Step:	1	2			3			4
Parameter:								
Analysis Mode	None	Quantification mode			Melting Curves mode			None
Cycles	1	50			1			1
Target °C	95	95	62	72	95	40	85	40
Hold hh:mm:ss	00:10:00	00:00:05	00:00:05	00:00:15	00:00:20	00:00:20	00:00:00	00:00:30
Ramp Rate °C/s	20	20	20	20	20	20	0.2	20
Sec Target °C	0	0	55	0	0	0	0	0
Step Size °C	0	0	0.5	0	0	0	0	0
Step Delay Cycles	0	0	1	0	0	0	0	0
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Cont.	None

Anmerkung:

Bei der Programmierung die Standardwerte der Software beibehalten: max. Probenanzahl = 32 und Kapillarengröße = 20 µl. Suchtemperatur = 40 °C und Kanal = 640.

Das Programm und die Standardwerte als „**RUN Template**“ speichern, das bei jedem Lauf geladen werden kann.

Erst kurz vor dem Start des Laufs die Anzahl der Proben (Standard = 32) auf die tatsächliche Anzahl der Proben plus Kontrollen in dem Lauf ändern, damit das Gerät nicht aufgrund fehlender Kapillaren stehen bleibt.

Für Anweisungen siehe Betriebsanleitung

Table 6. **Programmierung von Geräten mit Kapillartechnik.**

6.3. Multiwell-Geräte

LightCycler® 480 II und cobas z 480 Analyzer.

Für Einzelheiten siehe Betriebsanleitung des LightCycler®.

Nachweisformat: Multicolor

Siehe folgende Anleitung:

LightMix® Kit Color Compensation HybProbes Kat.-Nr. 40-0318-00

Reaktionsvolumen: 20 µl



Programmierung:

Das Protokoll besteht aus vier Programmabschnitten (Tab. 6):

1. **Denaturierung** der Probe und Aktivierung des Enzyms
2. **Cycling** Amplifikation der Target-DNA mittels PCR
3. **Schmelzen** Identifizierung der mittels PCR amplifizierten DNA-Sequenz
4. **Abkühlung** des Geräts

Step:	1	2			3			4
Parameter:								
Analysis Mode	None	Quantification mode			Melting Curves mode			None
Cycles	1	50			1			1
Target °C	95	95	62	72	95	40	85	40
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Cont.	None
Hold hh:mm:ss	00:10:00	00:00:05	00:00:05	00:00:15	00:00:30	00:02:00	00:00:00	00:00:30
Ramp Rate C°/s 96	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	0.14	1.5
Ramp Rate C°/s 384	4.6	4.6	2.4	4.6	4.6	2.0	0.14	1.5
Acquisitions per °C	-	-	-	-	-	-	1	-
Sec Target °C	0	0	55	0	-	-	-	-
Step Size °C	0	0	0.5	0	-	-	-	-
Step Delay Cycles	0	0	1	0	-	-	-	-

Anmerkung:

Das Programm und die Standardwerte als „**RUN Template**“ speichern, das bei jedem Lauf geladen werden kann. Darauf achten, dass nur 1 Acquisition pro Sekunde programmiert wird und nicht der Standardwert 3. Mehr Acquisitions verringern die Steigung der Schmelzkurve, erhöhen die Versuchsdauer und führen zu Fehlfunktionen des Kits.

Table 7. **Programmierung eines Multiwell-Geräts (96 Wells und 384 Wells)**

7. Versuchsprotokoll

Zuerst das Gerät programmieren und dann die Lösungen vorbereiten (siehe **6. Programmierung** und die Details in der Betriebsanleitung des LightCycler® nachlesen).

7.1. Ansetzen der Reagenzien

7.1.1. LightCycler® FastStart DNA HybProbe Master

1	Das LightCycler® FastStart Enzym 1a immer kühlen.
2	Das LightCycler® FastStart Reaktionsgemisch 1b auftauen. Hierzu das Röhrchen 3 - 5 Minuten lang bei 30 °C- 35 °C erwärmen.
3	Die Röhrchen kurz anzentrifugieren, um die Tropfen zu sammeln.
4	Die Lösung muss partikelfrei sein.
5	60 µl von 1b in das Röhrchen 1a pipettieren.
6	Die Lösung vorsichtig mit einer Pipette mischen. Nicht vortexen! Blasenbildung vermeiden. 
7	Die Röhrchen zentrifugieren, um die Tropfen zu sammeln.
8	Das Reagens verwenden, um das Reaktionsgemisch anzusetzen (6.3).
9	Übrig gebliebenes Reagens bei 4 °C lagern.

7.1.2. Ansetzen der lyophilisierten PSR

►	Das Reagenzröhrchen reicht für 32 Reaktionen.
1	Das Röhrchen bei 10.000 rpm 1 Minute lang zentrifugieren.
2	Kontrollieren, ob sich das blaue Pellet am Boden des Röhrchens befindet.
3	In jedes-Röhrchen 66 µl Wasser mit PCR-Qualität hinzugeben.
4	20 s bei Raumtemperatur inkubieren lassen.
5	10 s vortexen.
6	Die Röhrchen zentrifugieren, um die Tropfen zu sammeln.

► Für eine 20 µl PCR-Reaktion 2 µl Reagenz verwenden.

7.1.3. Negativkontrolle (NTC = No Template Control) und Verdünnungsmittel (DIL)

Ein sauberes Röhrchen mit **DIL** beschriften.

Das **NTC**- und das **DIL**-Röhrchen wie beschrieben mit PCR-Wasser und **nECT** füllen:

Extraktionsverfahren	H ₂ O	nECT
Internes Kontrollverfahren	1000 µl	---
High Pure PCR Template Preparation Kit	975 µl	25 µl
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	975 µl	25 µl
MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit	950 µl	50 µl
MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit	950 µl	50 µl
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I	975 µl	25 µl
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit	975 µl	25 µl
MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I	1000 µl	---

Table 8.

Die **NTC** reicht für 32 Reaktionen.

► Für eine 20 µl PCR-Reaktion **5 µl NTC** verwenden.

Die **NTC** nicht am gleichen Ort bearbeiten, an dem auch die Positivkontrollen bearbeitet werden.

Das **DIL** reicht zum Ansetzen aller **Standards/Kontrollen** aus:

Es muss frisch angesetzt und sofort nach der Verwendung entsorgt werden.

Das **DIL**, das in der direkten Nähe der Positivkontrollen verwendet wird, kann möglicherweise kontaminiert werden.

7.1.4. Vorbereitung der Kontroll-DNAs

►	Das Kontrolle -Reagenzröhrchen reicht für 32 Reaktionen.
1	Die beiden Röhrchen bei 10.000 rpm 1 Minute lang zentrifugieren.
2	Kontrollieren, ob sich das blaue Pellet am Boden des Röhrchens befindet.
3	Das Pellet durch Hinzufügen von 160 µl DIL lösen.
4	20 s bei Raumtemperatur inkubieren lassen.
5	10 s vortexen, dann die Röhrchen zentrifugieren, um die Tropfen zu sammeln.

► Für eine 20 µl PCR-Reaktion **5 µl** der **Kontrolle** verwenden.

► In jedem Lauf müssen alle **Kontrollen** mitgeführt werden.

Hinweis: Beim Öffnen der Röhrchen kann der Arbeitsplatz kontaminiert werden (Aerosol).

7.2. Ansetzen des Reaktionsgemischs

Wenn 32 Reaktionen vorbereitet werden (ein PSR-Röhrchen und ein CTR-Röhrchen) wird verhindert, dass gelöste oder aktivierte Reagenzien von unterschiedlichen Volumina gelagert werden müssen. Bezüglich der Lagerung und Stabilität der verdünnten Komponenten wird auf Kapitel 7.3 verwiesen. Wie das Reaktionsgemisch für weniger Proben angesetzt wird, ist im Schritt 7.2.2

7.2.1. Ansetzen des Reaktionsgeschmischs für 32 Reaktionen beschrieben.



Die linke Spalte „**sEC**“ für das gespikte Extraktionskontrollverfahren verwenden (siehe 3.3.1 und 5.1).

Die rechte Spalte „**IC**“ für das Interne Kontrollverfahren verwenden (siehe 3.3.2).

Das Reaktionsgemisch im PSR-Reagenzröhrchen ansetzen:

		sEC	IC
Bestandteile		32 Reaktionen	
In das PSR -Röhrchen (violetter Deckel) mit bereits		66.0 µl	66.0 µl
H ₂ O, PCR-Qualität (farbloser Deckel)		283.8 µl	267.3 µl
Mg ²⁺ -Lösung 25 mM (blauer Deckel)		79.2 µl	79.2 µl
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (roter Deckel), siehe 7.1.1		66.0 µl	66.0 µl
nECT , wenn als Interne Kontrolle verwendet (weißer Deckel), siehe 3.3.2		---	16.5 µl
	Den „ langhalsigen Deckel “ des PSR -Röhrchens durch den roten Deckel des FastStarts ersetzen		
Gesamtvolumen		495.0 µl	495.0 µl

Table 9. Volumen der Komponenten zum Ansetzen von 32 Reaktionsgemischen

Das Reaktionsgemisch vorsichtig durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette mischen.

Ein hoher Prozentsatz fehlgeschlagener Versuche ist auf ein nicht homogenes Reaktionsgemisch zurückzuführen!



7.2.2. Ansetzen des Reaktionsgemischs für eine Reaktion

Die linke Spalte „**sEC**“ für das gespikte Extraktionskontrollverfahren verwenden (siehe 3.3.1 und 5.1).

Die rechte Spalte „**IC**“ für das Interne Kontrollverfahren verwenden (siehe 3.3.2).



Das Reaktionsgemisch ansetzen und hierzu jedes Volumen mit der Anzahl der zu analysierenden biologischen Proben plus drei Reaktionen (**NTC**, eine **Kontrolle**, ein zusätzlicher Ansatz) multiplizieren.

Das Reaktionsgemisch in einem gekühlten Röhrchen ansetzen:

	sEC	IC
Bestandteile	Eine Reaktion	
H ₂ O, PCR-Qualität (farbloser Deckel)	8.6 µl	8.1 µl
Mg ²⁺ -Lösung 25 mM (blauer Deckel)	2.4 µl	2.4 µl
PSR (violetter Deckel), siehe 7.1.2	2.0 µl	2.0 µl
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (roter Deckel), siehe 6.2.1	2.0 µl	2.0 µl
nECT, wenn als Interne Kontrolle verwendet (weißer Deckel), siehe 3.3.2	---	0.5 µl
Volumen des Reaktionsgemischs	15.0 µl	15.0 µl

Table 10. Volumen der Komponenten zum Ansetzen eines einzelnen Reaktionsgemischs



Das Reaktionsgemisch vorsichtig durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette mischen.
Ein hoher Prozentsatz fehlgeschlagener Versuche ist auf ein nicht homogenes Reaktionsgemisch zurückzuführen!



7.3. Lagerung und Stabilität der verdünnten Komponenten

Reaktionsgemisch

Das fertige Reaktionsgemisch mit den vorgemischten PCR-Reagenzien, der LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe und dem MgCl₂ kann gekühlt (4 °C bis 8 °C) 5 Tage lang aufbewahrt werden. Eine längere Lichteinwirkung ist zu vermeiden.

Lyophilisierte vorgemischte PCR-Reagenzien

Nachdem sie verdünnt wurden, können die Reagenzien gekühlt (4 °C bis 8 °C) bis zu 30 Tage lang aufbewahrt werden. Eine längere Lichteinwirkung ist zu vermeiden.

LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe

Das angesetzte FastStart-Mastermix (1a+1b) kann gekühlt (4 °C - 8 °C) 30 Tage lang gelagert werden.

Kontrollen

Die gelösten Kontrollen sind gekühlt (4 °C - 8 °C) 30 Tage lang stabil. Wenn sie über einen längeren Zeitraum verwendet werden sollen, mehrere Aliquote abfüllen und diese bei -20 °C einfrieren. Bei -20 °C gelagerte Kontrollen sind 180 Tage lang stabil.

Anmerkung:

Wenn die Kontrollen mehr als fünf (5) mal eingefroren und wieder aufgetaut wurden, kann sich der Cp-Wert im Vergleich zu dem Röhrchen mit den frisch aufgelösten verschieben. Die Kontrolle sollte nicht mehr verwendet werden, wenn sich der Cp-Wert um mehr als 1 Zyklus ändert.

7.4. Laden der Kontrollen und der Proben

7.4.1. Merkmale der Proben

In der nachstehenden Tabelle sind die Merkmale der Kontrollen zusammengefasst:

Nummer	Name der Probe	LC1.X	LC2.0	LC480II	z 480	Quantifizierung Probentyp
1	NTC		610	498-610	498-610	Unbekannt
		F2	640	498-640	498-645	Negativ
		F3	705	498-660	498-700	Negativ
2	Pos.kontr U.u. - U.p.		610	498-610	498-610	Unbekannt
		F2	640	498-640	498-645	Positiv für <i>U. parvum</i>
		F3	705	498-660	498-700	Positiv für <i>U. urealyticum</i>
3...	Probe		610	498-610	498-610	Unbekannt
		F2	640	498-640	498-645	Unbekannt
		F3	705	498-660	498-700	Unbekannt

Die vorgeschlagene Beladungsreihenfolge vereinfacht die Programmierung der „Sample List“ (Probenliste) in den LightCycler® Geräten

Table 11.

7.4.2. Laden der Kapillaren / Wells

In jedem Lauf muss eine Negativkontrolle (**NTC**) mitgeführt werden, um nachzuweisen, dass keine Kontaminationen mit Target-DNA oder PCR-Produkt vorliegen. Zudem muss eine **Positivkontrolle** vorhanden sein, um die Leistung des Kits sicherzustellen.

Laden der Kapillaren / Wells

1	Vorsichtig mischen, herunterzentrifugieren und kontrollieren, ob sich auch wirklich keine Luftblasen in dem Reaktionsgemisch-Röhrchen befinden.
2	15 µl pro Kapillare/Well pipettieren.
3	Beim Ansetzen des Laufs immer an die Kontrollen denken: 5 µl der Negativkontrolle (NTC) hinzufügen (schwarzer Deckel)  5 µl der U.u.-U.p. Positivkontrolle hinzufügen (oranger Deckel)
4	5 µl der Probe in die verbleibenden Kapillaren/ Wells geben.
5	Die Kapillaren/ Platte verschließen und zentrifugieren. Kontrollieren, ob auch wirklich keine Luftblasen vorhanden sind. 
6	Den Rotor/ die Platte in den LightCycler® einsetzen.
7	Nur bei der Kapillartechnik: die Anzahl der Proben eingeben.
8	Den Lauf starten.
9	Den Namen der Untersuchung eingeben, wenn dazu aufgefordert wird.
10	Die Probandaten im Proben-Fenster speichern.

7.4.3. Geräte mit Kapillartechnik

In „Samples data - Capillary View“ den Namen der Probe, wie in der zweiten Spalte der Tabelle 11 angegeben, eingeben. „Analysis Type – Abs Quant“ auswählen. Nur Kanal 610, 640 und 705 auswählen!

7.4.4. Multiwell-Geräte

Im Fenster „Sample Editor“ (Proben-Editor) im Bereich „Step 1: Select Workflow“ (Schritt 1: Arbeitsablauf wählen) die Option „Abs Quant“ wählen. Den Namen der Probe, wie in der zweiten Spalte der Tabelle 11 angegeben, eingeben.

8. Datenanalyse und Interpretation

8.1. Grenzen und Interferenzen

Dieser Test ist für *Ureaplasma urealyticum* und *Ureaplasma parvum* spezifisch.

8.2. Kalibrierung

Die Kalibrierung muss wie in den Absätzen 7.4, 8.3.1, 8.3.2 und 8.3.3 beschrieben durchgeführt werden.

8.3. Qualitätskontrolle - Akzeptanzkriterien

Um eine zuverlässige Untersuchung durchführen zu können, müssen die Negativkontrolle **NTC** und die **Kontrollen** in jedem Lauf mitgeführt werden.

Zusätzlich zu den Reagenzien, die zum Nachweis von *U. urealyticum* und *U. parvum* notwendig sind, enthalten die PSR auch Primer und Sonden für die Amplifikation eines fremden DNA-Targets (**nECT**), das der PCR wie im **spiked Extraction Control (sEC)-Verfahren** (siehe 3.3.1) oder im **Internal Control (IC)-Verfahren** (siehe 3.3.2) beschrieben zugesetzt wird.

Am Ende des Laufs ist in der Schmelzkurvenanalyse ein spezifischer Schmelzpeak in **LC640** bei einer Temperatur von 49-51°C zu sehen, der die Amplifikation von **nECT** anzeigt.

Die Amplifikation, die bei einer Annealing-Temperatur von 55 °C durchgeführt wird, stellt sicher, dass das **nECT**-Signal nicht sichtbar ist und somit die Quantifizierung der Targets nicht beeinträchtigt.

Die Kontrollreaktion muss in negativen und niedrig konzentrierten Proben sichtbar sein, während sie in Gegenwart höherer Mengen an Target-DNA (1.000 Kopien/PCR oder mehr) nicht stattfindet.



Die Farbkompensation aktivieren.

Die Analyse der Daten mit einer deaktivierten „Farbkompensation“ führt zu einem ungültigen Auslesen der Ergebnisse.

8.3.1. Negativkontrolle (NTC)

Die **NTC Negativkontrolle** ist verpflichtend – sie ahmt negative klinischen Proben nach.

Die Amplifikationsanalyse der **NTC** muss in den Kanälen **LC640** und **LC690** ein **negatives Ergebnis** ergeben.

Wenn in einem dieser Kanäle eine Amplifikation sichtbar ist, liegt eine Kontamination oder ein Pipettierfehler vor. Der Lauf ist dann ungültig und das gesamte Verfahren muss wiederholt werden (Amplifikation und Nachweis).

Wenn das Problem weiterhin besteht, das Wasser und/oder die Reagenzien wechseln und den Lauf wiederholen.

Die Schmelzkurvenanalyse der **NTC** muss ein **negatives Ergebnis** im Kanal **LC690** ergeben.

Die **NTC** muss ein **positives Ergebnis** mit einer T_m von 49-51 °C im Kanal **LC640** ergeben.

Wenn die **nECT**-Schmelzkurve fehlt, ist der Lauf ungültig und das gesamte Verfahren muss wiederholt werden (Amplifikation und Nachweis).

8.3.2. Positivkontrolle für *U. urealyticum* - *U. parvum*

Das Mitführen der **U.u.-U.p. Pos Ctr** ist **verpflichtend**: Die Positivkontrolle ahmt positive Proben nach.

Die Amplifikationsanalyse der **NTC** muss in den Kanälen **LC690** und **LC640** ein **positives Ergebnis** ergeben. Der Cp-Wert muss mit den erwarteten Ergebnissen übereinstimmen (siehe 8.4). Wenn keine Amplifikation stattgefunden hat, siehe Anweisungen in 8.3.3.

Die Schmelzkurvenanalyse muss eine **Schmelzkurve** mit $T_m = 67-69\text{ °C}$ im Kanal **LC690** ergeben und eine Schmelzkurve mit $T_m = 66-68\text{ °C}$ im Kanal **LC640** ergeben. Es kann zusätzlich eine Schmelzkurve mit $T_m = 49-51\text{ °C}$ im Kanal **LC640** vorhanden sein, die **nECT** entspricht.

8.3.3. Fehler bei den Kontrollläufen

Vollständige Daten für die Kontrollen sind unerlässlich, um genaue Ergebnisse für Patientenproben zu erhalten.

Läufe ohne angemessene Ergebnisse für die **Kontrollen** müssen wiederholt werden.



Bevor ein Lauf wiederholt wird, an häufige/allgemeine Fehler denken. Vor allem das Amplifikationsprogramm überprüfen und kontrollieren, ob das Master-Mix richtig ist und die verwendete $MgCl_2$ -Konzentration stimmt. Außerdem ist zu bedenken, dass auch eine unsachgemäße Lagerung der Reagenzien zu einem Versagen des Produktes führen kann.

8.3.4. Proben

Negative klinische Proben

Die Amplifikationsanalyse zeigt **kein Amplifikationssignal** in den Kanälen **LC690** und **LC640**.

Die Schmelzkurvenanalyse muss eine Schmelzkurve mit $T_m = 49-51\text{ °C}$ im Kanal **LC640** ergeben, die **nECT** entspricht.



Klinische Proben, die weder eine Amplifikation des Targets noch ein nECT-Signal aufweisen, sind ungültig, und das gesamte Verfahren muss wiederholt werden (Probenvorbereitung, Amplifikation und Nachweis).

Für *Ureaplasma urealyticum* positive klinische Proben

Die Amplifikationsanalyse im Kanal **LC690** eine **positive Amplifikation** zeigen.

Die Schmelzkurvenanalyse muss eine Schmelzkurve im Kanal **LC690** mit $T_m = 67-69\text{ °C}$ ergeben.

Möglicherweise ist auch eine Schmelzkurve mit $T_m = 49-51\text{ °C}$ im Kanal **LC640** vorhanden, die **nECT** entspricht.

Für *Ureaplasma parvum* positive klinische Proben

Die Amplifikationsanalyse zeigt im Kanal **LC640** eine **positive Amplifikation**.

Die Schmelzkurvenanalyse muss eine Schmelzkurve im Kanal **LC640** mit $T_m = 66-68\text{ °C}$ ergeben.

Möglicherweise ist auch eine Schmelzkurve mit $T_m = 49-51\text{ °C}$ im Kanal **LC640** vorhanden, die **nECT** entspricht.



Es wurde häufig eine Mehrfachinfektion beobachtet.

8.3.5. Anormale Schmelzkurven

Manchmal treten aufgrund von Varianten anormale Schmelzkurven auf. In diesem Fall muss dann eine andere Methode zur Überprüfung des amplifizierten Produkts verwendet werden.

Abweichungen bitte an service@tib-molbiol.de melden.

Sie können gerne Proben mit Abweichungen in der Schmelzkurve an die Labors von TIB Molbiol GmbH in Berlin schicken, um die erhaltenen Ergebnisse durch DNA-Sequenzierung bestätigen zu lassen.

8.4. Lesen der Ergebnisse

Die Daten wie in der Betriebsanleitung des LightCycler® beschrieben analysieren.

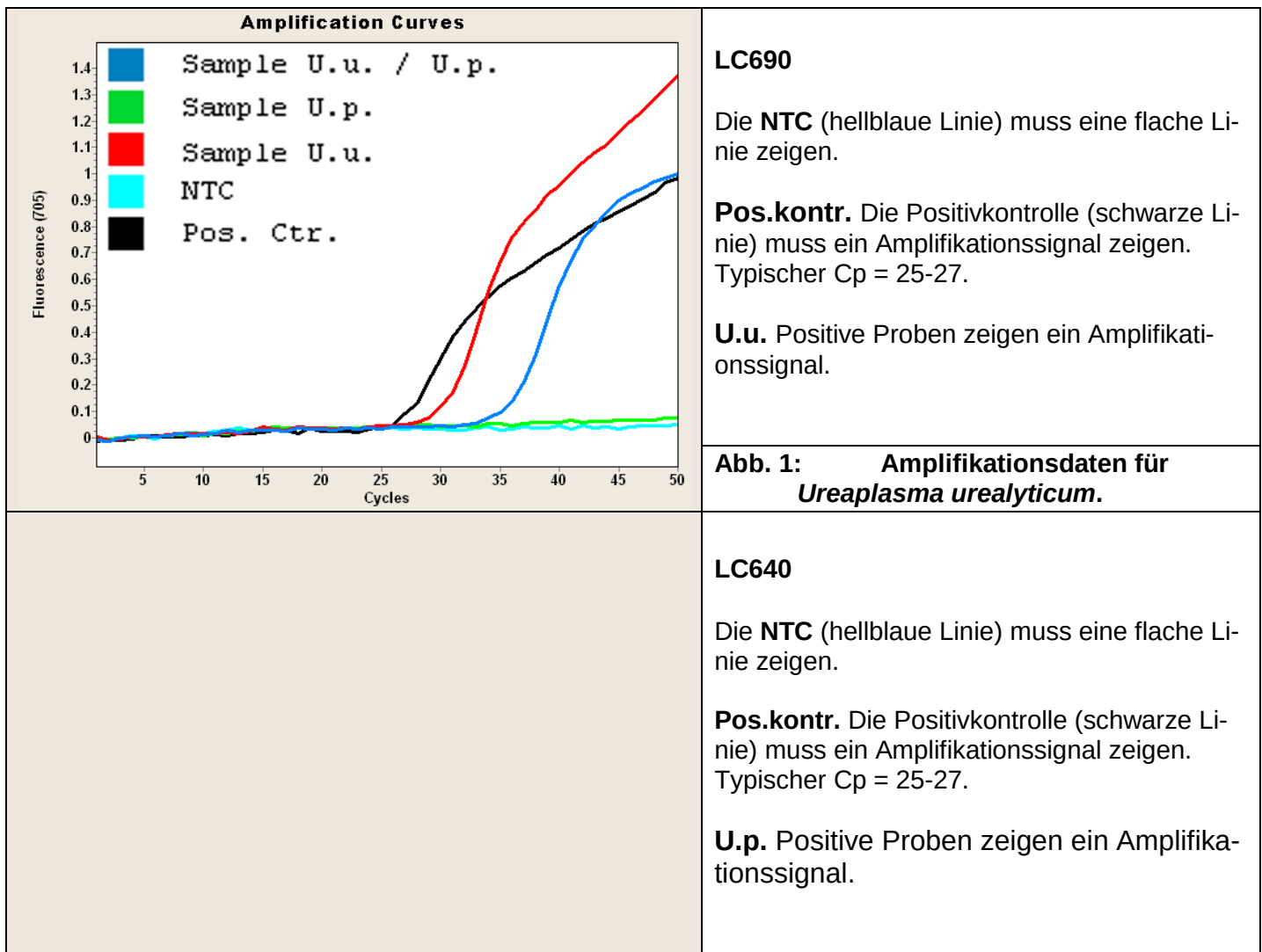


Die Farbkompensation aktivieren!

Die Analyse der Daten mit einer deaktivierten „Farbkompensation“ führt zu einem ungültigen Auslesen der Ergebnisse.

8.4.1. Amplifikationsanalyse: Geräte mit Kapillartechnik

Die Daten für *Ureaplasma* im Kanal LC690 ansehen und die für *Ureaplasma parvum* im Kanal LC640, Analysemodus „Absolute Quantifikation“.



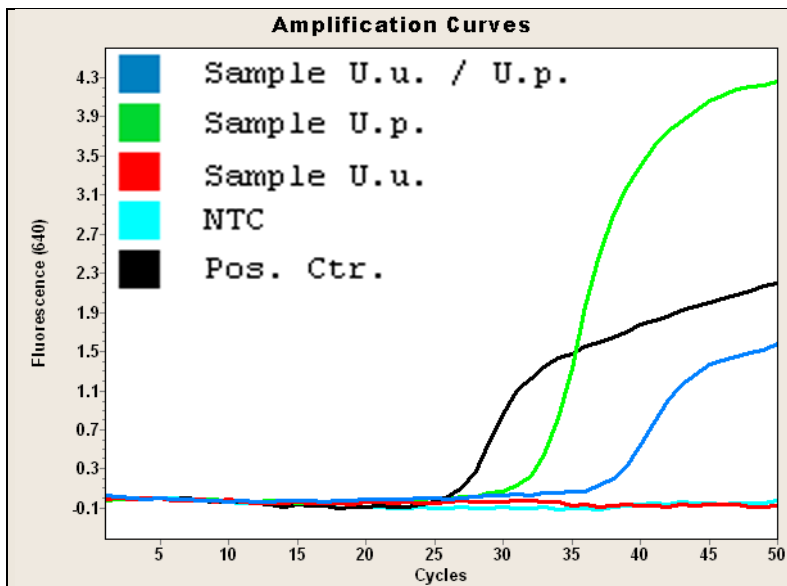
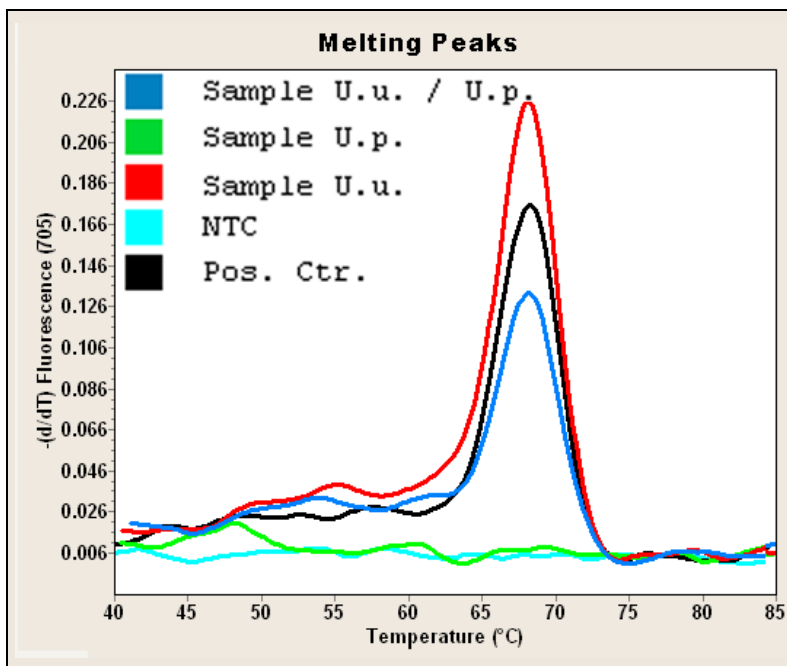


Abb. 2: Amplifikationsdaten für *Ureaplasma parvum*.

Anmerkung: Die Cp-Werte können innerhalb der verschiedenen Ansätze um ± 1.5 °C schwanken. Bei Variationen siehe: **8.3.3 Fehler bei den Kontrollläufen**.

8.4.2. Schmelzkurvenanalyse: Geräte mit Kapillartechnik

Die Daten für *Ureaplasma* im Kanal LC690 ansehen und die für *Ureaplasma parvum* im Kanal LC640, Analysemodus „Tm Calling“. Es wird auch das nECT-Signal im Kanal LC640 erkannt.



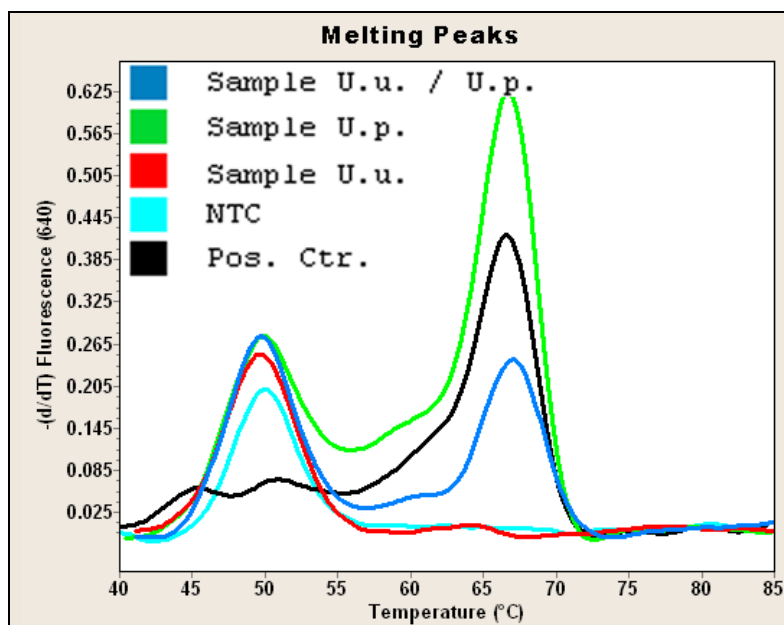
LC690

Die **NTC** (hellblaue Linie) muss eine flache Linie zeigen.

Pos.kontr. Die Positivkontrolle (schwarze Linie) muss einen Schmelzpeak zeigen. $T_m = 67-69^\circ\text{C}$.

U.u. Positive Proben zeigen einen Schmelzpeak.

Abb. 3: Schmelzkurve für *Ureaplasma urealyticum*.



LC640

Die **NTC** Negativkontrolle (hellblaue Linie) MUSS einen spezifischen Schmelzpeak zeigen, der dem **nECT**-Signal mit einer $T_m = 49-51^\circ\text{C}$ entspricht.

Pos.kontr. Die Positivkontrolle (schwarze Linie) muss einen Schmelzpeak zeigen. $T_m = 66-68^\circ\text{C}$.

Das **nECT**-Signal fehlt in der Regel.

U.p. Positive Proben zeigen einen Schmelzpeak mit einer $T_m = 66-68^\circ\text{C}$. Das **nECT**-Signal kann vorhanden sein.

Abb. 4: Schmelzkurve für *Ureaplasma parvum*.

	EC	U.u.	U.p.
Sample U.u. / U.p.	49.84	68.16	67.22
Sample U.p.	49.86		66.68
Sample U.u.	49.60	68.00	
NTC	49.71		
Pos. Ctr.		68.08	66.70

Abb. 5: Einzelheiten zur Schmelzkurventemperatur.

Anmerkung: Die Werte für die Schmelztemperaturen (T_m) können innerhalb der verschiedenen Läufe um $\pm 2.5^\circ\text{C}$ schwanken.

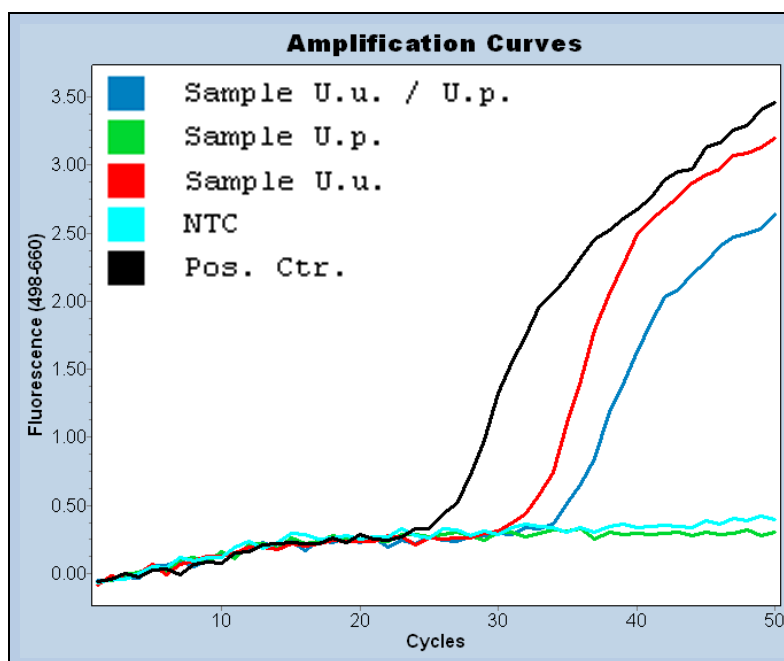


nECT Schmelzkurve im Kanal LC640 $T_m = 49-51^\circ\text{C}$.

Die **nECT**-Schmelzkurve ist für positive Proben und **Pos.kontr.** nicht relevant und kann auch fehlen.

8.4.3. Amplifikationsanalyse: Multiwell-Geräte

Die Daten für *Ureaplasma* im Kanal LC690 ansehen und die für *Ureaplasma parvum* im Kanal LC640, Analysemodus „Abs Quant/2nd Derivative Max“.



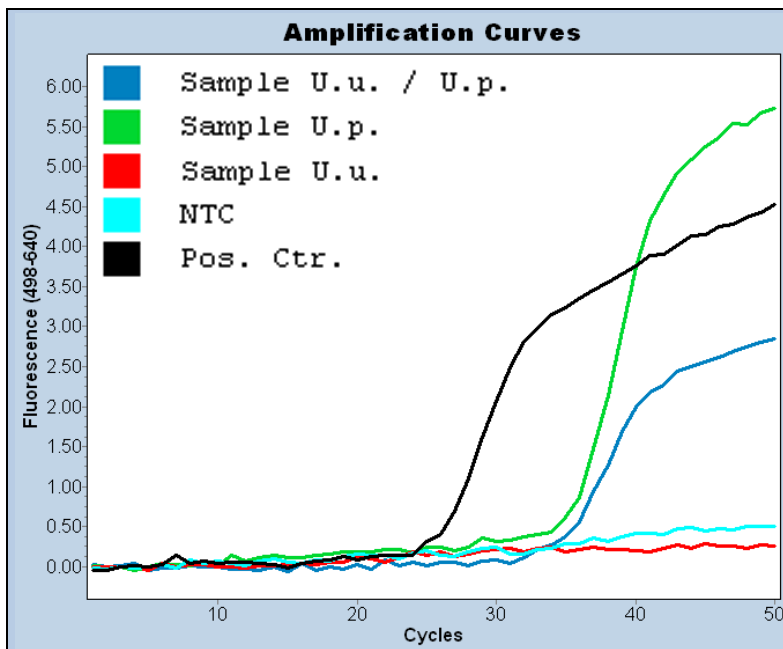
LC690

Die **NTC** (hellblaue Linie) muss eine flache Linie zeigen.

Pos.kontr. Die Positivkontrolle (schwarze Linie) muss ein Amplifikationssignal zeigen. Typischer $C_p = 25-27$.

U.u. Positive Proben zeigen ein Amplifikationssignal.

Abb. 6: Amplifikationsdaten für *Ureaplasma urealyticum*.



LC640

Die **NTC** (hellblaue Linie) muss eine flache Linie zeigen.

Pos.kontr. Die Positivkontrolle (schwarze Linie) muss ein Amplifikationssignal zeigen.

Typischer $C_p = 25-27$.

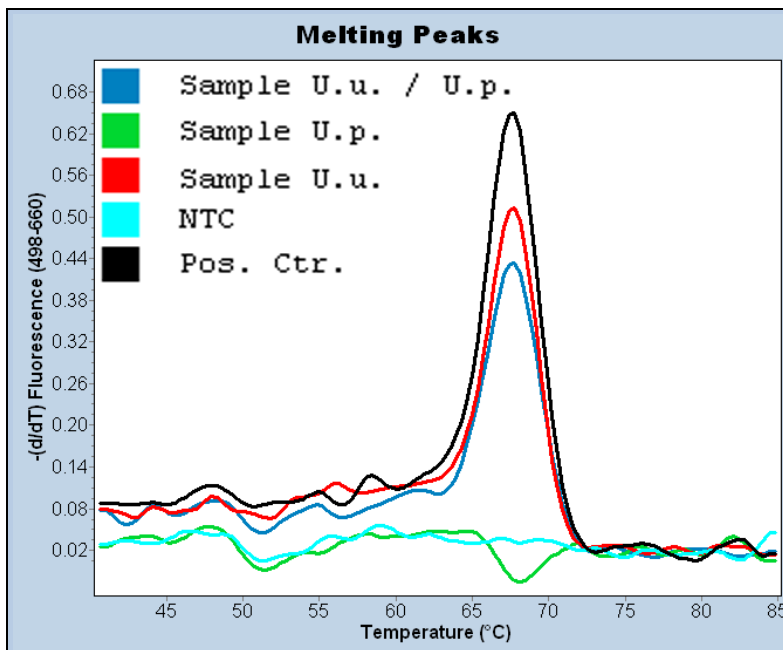
U.p. Positive Proben zeigen ein Amplifikationssignal.

Abb. 7: Amplifikationsdaten für *Ureaplasma parvum*.

Anmerkung: Die C_p -Werte können innerhalb der verschiedenen Ansätze um ± 1.5 °C schwanken. Bei Variationen siehe: **8.3.3 Fehler bei den Kontrollläufen.**

8.4.4. Schmelzkurvenanalyse: Multiwell-Geräte

Die Daten für *Ureaplasma* im Kanal LC690 ansehen und die für *Ureaplasma parvum* im Kanal LC640, Analysemodus „Tm Calling“. Es wird auch das nECT-Signal im Kanal LC640 erkannt.



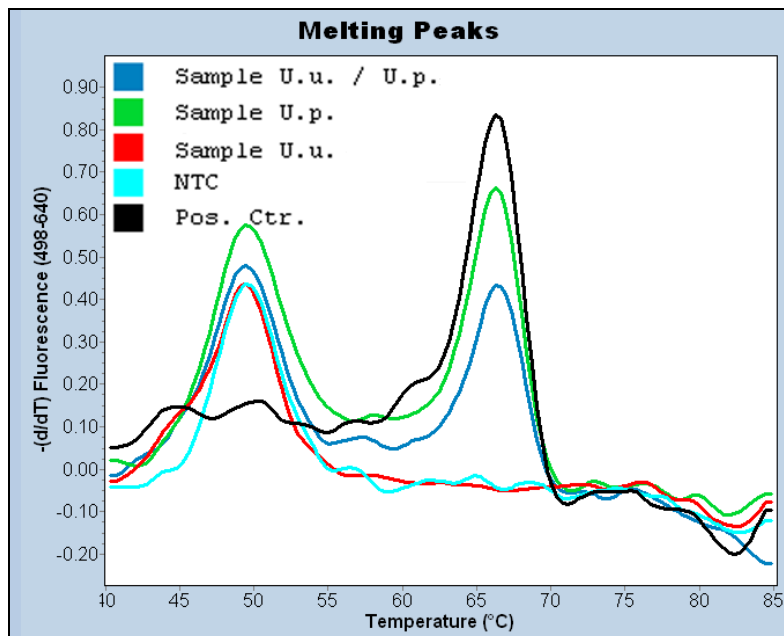
LC690

Die **NTC** (hellblaue Linie) muss eine flache Linie zeigen.

Pos.kontr. Die Positivkontrolle (schwarze Linie) muss einen Schmelzpeak zeigen. $T_m = 67-69^\circ\text{C}$.

U.u. Positive Proben zeigen einen Schmelzpeak.

Abb. 8: Schmelzkurve für *Ureaplasma urealyticum*.



LC640

Die **NTC** Negativkontrolle (hellblaue Linie) MUSS einen spezifischen Schmelzpeak zeigen, der dem **nECT**-Signal mit einer $T_m = 49-51$ °C entspricht.

Pos.kontr. Die Positivkontrolle (schwarze Linie) muss einen Schmelzpeak zeigen. $T_m = 66-68$ °C.

Das **nECT**-Signal fehlt in der Regel.

U.p. Positive Proben zeigen einen Schmelzpeak mit einer $T_m = 66-68$ °C. Das **nECT**-Signal kann vorhanden sein.

Abb. 9: Schmelzkurve für *Ureaplasma parvum*.

	EC	U.u.	U.p.
Sample U.u. / U.p.	49.45	67.73	66.30
Sample U.p.	49.53		66.33
Sample U.u.	49.44	67.72	
NTC	49.45		
Pos. Ctr.		67.69	66.31

Abb. 10: Einzelheiten zur Schmelzkurventemperatur.

Anmerkung: Die Werte für die Schmelztemperaturen (T_m) können innerhalb der verschiedenen Läufe um $\pm 2,5$ °C schwanken.



nECT Schmelzkurve im Kanal LC640 $T_m = 49-51$ °C.

Die nECT-Schmelzkurve ist für positive Proben und Pos.kontr. nicht relevant und kann auch fehlen.

8.5. Interpretation der Daten

Zuerst die Ergebnisse der Kontrollen überprüfen: Damit der Lauf gültig ist, müssen alle Kontrollen stimmen.

Kontrollen			Ergebnisse
Amplifikation	Amplifikation	Schmelzkurve 49-51 °C	
LC690	LC640	LC640	
NTC			
Negativ	Negativ	Schmelzkurve	Negativkontrolle OK
Negativ	Negativ	Negativ	nECT fehlgeschlagen Kontrollieren, ob sEC/IC verwendet wurde!
Amplifikation	Amplifikation	nicht relevant	Negativkontrolle fehlgeschlagen ⁽¹⁾ Kontamination! Wiederholen!
U.u.-U.p. Pos.kontr.			
Amplifikation	Amplifikation	nicht relevant	Positivkontrolle OK
Amplifikation	Negativ	nicht relevant	U. parvum Positivkontrolle fehlgeschlagen
Negativ	Amplifikation	nicht relevant	U.urealyticum Positivkontrolle fehlgeschlagen
Negativ	Negativ	nicht relevant	Positivkontrolle fehlgeschlagen

Anmerkung: (1) Wenn in einem der Kanäle (LC610 oder LC640) eine Amplifikation zu sehen ist, in die Negativkontrolle fehlgeschlagen.

Table 12.

Dann die Ergebnisse für die klinischen Proben wie folgt ablesen:

Klinische Proben			Ergebnisse
Amplifikation	Amplifikation	Schmelzkurve 49-51 °C	
LC690	LC640	LC640	
Negativ	Negativ	Schmelzkurve	
Negativ	Negativ	Schmelzkurve	Negativ für U.u. und U.p. (nicht nachweisbar)
Amplifikation	Negativ	nicht relevant	Positiv für U. urealyticum
Negativ	Amplifikation	nicht relevant	Positiv für U. parvum
Amplifikation	Amplifikation	nicht relevant	Positiv für U. urealyticum und U. parvum
Negativ	Negativ	Negativ	Amplifikationskontrolle fehlgeschlagen Kontrollieren, ob sEC/IC verwendet wurde und ab der Extraktion wiederholen.



Bei klinischen Proben mit Mehrfachinfektion sind die entsprechenden Amplifikations- und Schmelzdaten zu sehen.

Table 13.

9. Fehlersuche und -behebung

Gerätespezifische Codes:	Geräte mit Kapillartechnik	Multiwell-Geräte
Ereignis	Mögliche Ursache	Lösung
Keine Probe erkannt	Keine Zentrifugation	Kapillare zentrifugieren
Alle PCRs sind negativ	Es wurde ein falscher Nachweiskanal gewählt	Vor der Analyse den richtigen Kanal einstellen
	Falsches Amplifikationsprotoll	Das Programm des Geräts kontrollieren
Die Baseline der verschiedenen Proben stimmt nicht überein	Pipettierfehler	Sicherstellen, dass die einzelnen Proben mit den gleichen Mengen angesetzt wurden
	Das Reaktionsgemisch ist nicht homogen	Das Reaktionsgemisch 10-mal mit einer sauberen 200-µl-Pipettenspitze aufziehen und erst dann in das Reaktionsgefäß pipettieren.
	Die Mikrotiterplatte wurde schlecht verschlossen	Sicherstellen, dass die Mikrotiterplatte fachgerecht verschlossen ist
Baseline mit „Sawtooth“ Profil	Das Gemisch ist nicht homogen	Die Mikrotiterplatte vor dem Lauf zentrifugieren
	Die Kapillare steckt nicht richtig im Karussell	Die Kapillare fest in das Karussell drücken
Kein Signal für die Positivkontrolle	Fehler beim Einrichten des Geräts	Kontrollieren, welches Well für die Positivkontrolle eingerichtet wurde
	PSR/MgCl ₂ -Konzentration stimmt nicht	Den Assay wiederholen
	Positivkontrolle oder Standard ist degradiert	Ein neues Aliquot der Positivkontrolle oder des Standards verwenden
Positives Signal in der NTC Negativkontrolle	Fehler beim Einrichten des Geräts	Kontrollieren, welches Well für die Negativkontrolle eingerichtet wurde
	Pipettierfehler	Beim Pipettieren der Proben, der Negativkontrollen, der Positivkontrollen und der Standards genau die Anweisungen auf dem Arbeitsblatt befolgen.
	Pipettierfehler	Für jede Probe eine neue Pipettenspitze verwenden
	Pipettierfehler	Der Inhalt des Probenröhrchens darf nicht tropfen
	Das PCR-Wasser ist kontaminiert.	Ein neues Aliquot PCR-Wasser verwenden
	Das Reaktionsgemisch ist kontaminiert	Neue Aliquote der Reagenzien verwenden, um das Reaktionsgemisch anzusetzen
	Der Extraktions-/Vorbereitungsbereich für die Amplifikationsreaktionen ist kontaminiert	Die Oberflächen und Geräte mit wässrigen Reinigungsmitteln reinigen, die Laborkittel waschen, die Röhrchen und Pipettenspitzen austauschen
	Der Extraktions-/Vorbereitungsbereich für die Amplifikationsreaktionen ist kontaminiert	LightCycler® Uracil-DNA Glycosylase (Kat.-Nr. 03 539 806 001) zum Reaktionsgemisch hinzugeben (siehe Anleitung)
Kein Signal in den Proben	Zu wenig DNA	Die DNA-Konzentration kontrollieren
	Die Probe wird inhibiert	Die Probe verdünnen und die PCR wiederholen, oder die Extraktion und die PCR wiederholen, oder Positivkontrolle hinzufügen und wiederholen

Die Schmelzkurve liegt außerhalb des erwarteten Temperaturbereichs	Möglicherweise ist die Target-Sequenz verändert	Durch Wiederholung überprüfen, das Virus sequenzieren (sofern zutreffend). Bitte an service@tib-molbiol.de melden und/oder die Proben zur weiteren Analyse an das Labor in Berlin schicken.
--	---	---

10. Literaturnachweis

[1] Ellen Vancutsem, Oriane Soetens, Maria Breugelmans, Walter Foulon, and Anne Naessens
Modified Real-Time PCR for Detecting, Differentiating, and Quantifying *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*.

The Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 13, No. 2, March 2011

[2] Robertson JA, Vekris A, Bebear C, Stemke GW.

Polymerase chain reaction using 16S rRNA gene sequences distinguishes the two biovars of *Ureaplasma urealyticum*.

J Clin Microbiol. 1993 Apr;31(4):824-30

Hinweis für den Käufer - Patente und Warenzeichen

Dieses LightMix® Kit wird unter Lizenz von Roche Diagnostics verkauft (weltweit außer USA). Der Kauf dieses Produkts berechtigt zu dessen Verwendung als *in-vitro*-Diagnostikum, d. h. zur Amplifikation und zum Nachweis von Nukleinsäuresequenzen in Proben menschlichen Ursprungs. Es wird keine andere Art von Lizenz übertragen, außer dem Recht, das vorliegende Produkt zu nutzen, was sich aus dem Kauf ergibt.

Abgesehen von den ausdrücklich genannten Lizenzen übernimmt TIB MOLBIOL keine Garantie dafür, dass dieses Kit und/oder seine Verwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzen.

LightCycler®, cobas, MagNA Pure® and High Pure® sind Markenzeichen von Roche.

ABI 3730xl Genetic Analyzer und Sequencing Analysis sind von Applied Biosystems eingetragene Produkte.

LightMix® ist ein Markenzeichen von TIB MOLBIOL.

SimpleProbe®, Hybridisierungssonden und LightMix® Kits werden unter Lizenz von Roche hergestellt.

Klassifizierung / Referenzen

Referenz	Klassifizierung
EDMA	15.30.04.49 (15.01.08.40) (15.01.40.90)
CPV	33694000-1
EAN	4260159333794
Roche SAP-Nr.	07821034001

FastStart Enzym

Die FastStart DNA Master HybProbe ist nur in den Kits für TIB MOLBIOL-Kunden in Mitteleuropa enthalten.

Wenn dieses Kit über Roche Diagnostics oder deren lokale Vertriebshändler vertrieben wird, wird die FastStart DNA Master HybProbe als separates Produkt geliefert:

Roche Diagnostics Kat.-Nr. 03 003 248 001 Kit für 96 Reaktionen

Roche Diagnostics Kat.-Nr. 12 239 272 001 Kit für 480 Reaktionen

11. Sicherheitsdatenblatt

Nach OSHA 29CFR1910.1200, Commonwealth of Australia [NOHSC:1005, 1008 (1999)] und den EU-Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG benötigen alle Produkte, die nicht mehr als 1 % eines als gefährlich oder krebserregend eingestuften Bestandteils enthalten, kein Sicherheitsdatenblatt.

Das Produkt ist nicht gefährlich, nicht giftig und unterliegt nicht den IATA-Einschränkungen. Das Produkt ist weder menschlichen noch tierischen oder pflanzlichen Ursprungs. Das Produkt enthält synthetische Oligonukleotid-Primer und Sonden.

12. Überarbeitungsverlauf

Anmerkungen: Rot gekennzeichnete Änderungen sind mit einer Änderung der Labortechniken verbunden

Blau gekennzeichnete Änderungen sind Verbesserungen und Änderungen in der Zusammensetzung

Version	Änderung	Datum
150430	Erste Ausgabe	30.04.2015
151126	Seite 22, Korrektur auf Abb. 5. Seite 24, Korrektur auf Abb. 10.	26.11.2015
160116	X480 zugelassen (Kapitel 2. und 5.3). Änderungen in den Vorbereitungsverfahren für nECT (5.1), NCT und DIL (7.1.3). Internes Kontrollverfahren: nECT-Volumen beim Ansetzen des Master Mixes geändert (7.2.1 und 7.2.2). Redaktionelle Änderungen.	16.01.2016
181010	Abschnitt 2.1 und 2.2: Roche Katalognummern für LightMix® Kit Color Compensation HybProbes und Extraction Control Target hinzugefügt	10.10.2018
190423	Abschnitt 7.2: Genauere Beschreibung der Vorbereitung des Reaktionsgemischs. Abschnitt 7.3: Änderung der Lagerung des Reaktionsgemischs: Dauer von 30 auf 5 Tage verkürzt.	23.04.2019
V231102	Roche SAP-Nummer wurde aufgenommen	02.11.2023

Hergestellt von:

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
Eresburgstrasse 22-23
12103 Berlin, Deutschland
www.tib-molbiol.com

