

## Gebrauchsanweisung

# virellaSBV

## real time RT-PCR Kit

Für den *in-vitro* Nachweis von RNA des Schmallenberg Virus (SBV) in Blut- und Gewebeproben von Wiederkäuern (Rinder, Schafe und Rehe).

*Die deutsche Gebrauchsinformation ist nach § 11 Absatz 2 TierGesG zugelassen.*

**Zul.-Nr.** FLI-B 653



G01080-96



96



gerbion GmbH & Co. KG  
Remsstr. 1  
70806 Kornwestheim  
Germany

phone: +49 7154 806 20 0  
fax: + 49 7154 806 20 29  
e-mail: info@gerbion.com  
www.gerbion.com



## Inhaltsverzeichnis

1	Anwendungszweck .....	3
2	Anwendungsbereich .....	3
3	Testprinzip .....	3
4	Komponenten .....	4
5	Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte .....	4
6	Transport, Lagerung und Haltbarkeit .....	5
7	Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen .....	5
8	Art und Beschaffenheit des Probenmaterials .....	6
9	Probenvorbereitung.....	6
10	Kontroll-RNA .....	7
11	Real time PCR.....	8
11.1	Wichtige Punkte bevor Sie starten:.....	8
11.2	Durchführung .....	8
11.3	Geräteeinstellungen .....	10
12	Validierung.....	11
13	Interpretation der Ergebnisse .....	12
14	Troubleshooting.....	14
15	Abkürzungen und Symbole .....	16

## 1 Anwendungszweck

Der virellaSBV real time RT-PCR Kit dient dem Nachweis der RNA des Schmallenberg Virus in Blut- und Gewebeproben (z.B. Serum, EDTA-Blut, Amnionflüssigkeit, Groß- und Kleinhirn, Milz) von Wiederkäuern (Rinder, Schafe, Rehe).

## 2 Anwendungsbereich

Im Sommer 2011 traten in den Niederlanden die ersten Fälle der Schmallenberg-Virusinfektion auf, im Spätherbst wurden die ersten Fälle in Deutschland beobachtet. Zunächst wurde vermutet, die betroffenen Tiere seien an der Blauzungenkrankheit erkrankt. Im November 2011 wurde vom Friedrich-Loeffler Institut erstmals das Schmallenberg Virus (SBV) als Erreger identifiziert.

Das Virus gehört zur Simbu-Serogruppe der Orthobunyaviren und wird als „Schmallenberg Virus“ bezeichnet, weil der erste Virusnachweis bei Proben von Tieren aus Schmallenberg (Nordrhein-Westfalen) gelang.

Bisher sind Orthobunyaviren in Australien, Asien und Afrika bei Rindern verbreitet. Das Virus wird nach bisherigen Erkenntnissen des FLI nicht von Tier zu Tier, sondern über Insektenstiche von Gnitzen und anderen blutsaugenden Insekten übertragen.

Rinder, Schafe und Ziegen können von dem Schmallenberg Virus befallen werden, wobei erwachsene Tiere nur milde Symptome zeigen. Werden trächtige Tiere infiziert, so können zeitverzögert Störungen der Fruchtbarkeit, Frühgeburten und zum Teil erhebliche Schäden bei den Neugeborenen auftreten.

## 3 Testprinzip

Der virellaSBV real time RT-PCR Kit enthält spezifische Primer und Hydrolyse-Sonden für den Nachweis der RNA des Schmallenberg Virus. Geeignet sind Blutproben (z.B. EDTA-Blut, Serum) und Gewebeproben (z.B. Hirn, Milz) nach vorausgegangener RNA-Extraktion.

Die reverse Transkription (RT) der möglicherweise enthaltenen viralen RNA zu cDNA und die anschließende Amplifikation von SBV-spezifischen Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion erfolgen in einem Schritt. Die Detektion der Amplifikation erfolgt in Echtzeit durch die Hybridisierung und anschließende Hydrolyse der SBV spezifischen TaqMan® Sonden mittels FAM™ Fluoreszenz.

Zusätzlich verfügt die virellaSBV real time RT-PCR über ein zweites heterologes Amplifikationssystem, um den Erfolg der RNA-Extraktion zu überprüfen und eine mögliche Inhibition der RT-PCR zu identifizieren. Hierzu dient die reverse Transkription und Amplifikation einer Kontroll-RNA (Interne Prozesskontrolle, IPC), welche entweder vor der RNA-Extraktion zugefügt wird und somit gleichzeitig als Extraktionskontrolle dient, oder dem Mastermix zupipettiert wird.

In der real time RT-PCR erzeugt die Kontroll-RNA ein Fluoreszenzsignal im HEX-Kanal.

#### 4 Komponenten

Die Komponenten sind ausreichend für den Ansatz von 96 Nachweisreaktionen.

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

Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt
Reaktionsmix	gelb	1 x 1520 µl
Enzym	blau	1 x 19,2 µl
Positivkontrolle	rot	1 x 100 µl
Negativkontrolle	grün	1 x 100 µl
Kontroll-RNA	farblos	1 x 480 µl

#### 5 Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- bei Blutproben: RNA Extraktions-Kit
- Reinstwasser (PCR grade Water)
- sterile Reaktionsgefäße mit Verschluss
- Pipetten (variable Volumina)
- sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Tischzentrifuge
- Vortexer
- Thermoblock
- real time PCR Gerät
- optische PCR Gefäße mit Verschluss oder optische PCR-Reaktionsplatte mit optischer Folie
- optional: Pipettiergeräte zur Automation

## 6 Transport, Lagerung und Haltbarkeit

Der Transport des virellaSBV real time RT-PCR Kit erfolgt gefroren auf Trockeneis. Alle Komponenten des SBV real time RT-PCR Kit sind direkt nach Erhalt lichtgeschützt bei -18°C oder niedrigeren Temperaturen zu lagern. Nach Ablauf des auf der Packung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden!

Nach Anbruch der Reagenzien können diese bei +2 - +8 °C für maximal 6 Monate gelagert werden. Falls die Reagenzien bei -18°C gelagert werden, sind bis zu 20 Auftau- und Einfrierzyklen möglich. Kitkomponenten während der gesamten Testdurchführung vor direktem Sonnenlicht schützen.

## 7 Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Die Anweisungen der Gebrauchsinformation sind einzuhalten.
- Die Richtlinien der Good Laboratory Practice (GLP) sind einzuhalten.
- Die virellaSBV real time RT-PCR muss in für diesen Zweck geeigneten Laboratorien und von speziell geschultem Personal durchgeführt werden.
- Alle Proben müssen als potentiell infektiös betrachtet werden und alle mit den Proben in Berührung kommenden Gegenstände müssen als potentiell kontaminiert erachtet werden.
- Vermeiden Sie eine mikrobielle Kontamination der Eluate und Kitkomponenten sowie eine Kontamination mit DNasen/RNasen.
- Verwenden Sie immer DNase/RNase-freie Einwegpipettenspitzen mit Aerosolbarrieren.
- Tragen Sie beim Umgang mit den Kitkomponenten stets puderfreie Einweghandschuhe.
- Separate und getrennte Arbeitsbereiche für (1) Probenvorbereitung, (2) Reaktionsaufbau und (3) Amplifikations-/Detektionsaktivitäten verwenden. Die Arbeitsabläufe im Labor sollten unidirektional ablaufen. Tragen Sie in jedem Bereich Einweghandschuhe und wechseln Sie diese, bevor Sie einen anderen Bereich betreten.
- Pipetten, Röhrchen und andere Arbeitsmaterialien dürfen nicht von einem Bereich in den anderen zirkulieren.
- Positives und potentiell positives Material muss stets von allen anderen Kitkomponenten separiert bleiben.

- Öffnen Sie die Reaktionsgefäße/Platten nach der Amplifikation nicht, um eine Kontamination mit Amplifikaten zu vermeiden.
- Zusätzliche Kontrollen können gemäß den Richtlinien oder Anforderungen lokaler, staatlicher und/oder bundesstaatlicher Vorschriften oder Akkreditierungsorganisationen getestet werden.
- Reaktionsgefäße nach der PCR nicht autoklavieren, da dies die amplifizierte Nukleinsäure nicht abbaut und das Risiko einer Kontamination des Laborbereichs birgt.
- Entsorgen Sie Proben- und Testabfälle gemäß den örtlichen Sicherheitsvorschriften.
- Komponenten verschiedener Chargen der virellaSBV real time RT-PCR dürfen nicht zusammen verwendet werden.

## 8 Art und Beschaffenheit des Probenmaterials

Das Ausgangsmaterial für die Nachweisreaktion ist virale RNA, die aus bovinen, ovinen und caprinen Blut- oder Gewebeproben (z.B. EDTA-Blut, Serum, Hirn, Milz) oder Amnionflüssigkeit isoliert wurde.

## 9 Probenvorbereitung

Es wird empfohlen, kommerziell erhältliche Extraktionskits zu verwenden.

Extraktion von Blut- und Gewebeproben, z.B. mit:

- NukEx Pure RNA/DNA, gerbion Art. Nr. G05004
- NukEx Mag RNA/DNA, gerbion Art. Nr. G05012
- ZR Viral RNA Kit™ (Zymo Research)
- High Pure Viral RNA Kit (Roche Diagnostics)
- RNeasy Mini Kit (Qiagen)

**Wichtig:** Bei der Probenextraktion sollte zusätzlich zu den Proben eine Wasserkontrolle (Reinstwasser) extrahiert werden, anhand derer sich eventuell auftretende Inhibitionen und Kontaminationen ablesen lassen. Diese Wasserkontrolle muss analog einer Probe behandelt werden.

**Beachten Sie bitte auch das Kapitel „Kontroll-RNA“.**

Falls die real time RT-PCR nicht sofort durchgeführt wird, müssen die RNA-Extrakte entsprechend den Angaben des RNA-Extraktionskit Herstellers aufbewahrt werden.

Weitere Informationen zur Isolierung von RNA erhalten Sie in der Gebrauchsinformation des Extraktionskits oder vom technischen Service des RNA-Extraktionskit Herstellers.

## 10 Kontroll-RNA

Der SBV real time RT-PCR Kit enthält eine Kontroll-RNA (IPC), die zum einen als Kontrolle der RNA-Extraktion dient, zum anderen als interne Kontrolle mögliche Inhibitionen der Reversen Transkription bzw. der PCR aufzeigt.

### Verwendung der Kontroll-RNA als Extraktionskontrolle

Die Kontroll-RNA wird jeder Probe vor der eigentlichen Extraktion beigemischt. Dazu das für eine Extraktion benötigte Puffervolumen mit der Anzahl (N) der durchzuführenden Extraktionen multiplizieren und zum Ausgleich der Pipettierungenauigkeit einen zusätzlichen Ansatz berechnen. Von der Kontroll-RNA 5 µl pro Extraktion (also 5 µl x (N+1)) hinzupipettieren.

**Die Kontroll-RNA darf nicht dem Probenmaterial direkt zugemischt werden, sondern wird dem Lysepuffer des Extraktionskits zugegeben.**

**Folgen Sie Protokoll A zum Ansetzen der real time RT-PCR.**

### Verwendung der Kontroll-RNA als Interne Kontrolle der real time RT-PCR

Ist eine Kontrolle der RNA-Extraktion nicht erwünscht, so kann die Kontroll-RNA dem PCR Mastermix zupipettiert werden und so als interne RT-PCR-Kontrolle mögliche Inhibitionen aufdecken.

**Folgen Sie Protokoll B zum Ansetzen der real time RT-PCR.**

## 11 Real time PCR

### 11.1 Wichtige Punkte bevor Sie starten:

- Bitte beachten Sie das Kapitel „Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen“.
- Bevor Sie die PCR ansetzen machen Sie sich mit dem real time PCR Gerät vertraut. Die Programmierung des Temperaturprofils sollte abgeschlossen sein, bevor die PCR angesetzt wird.
- Beachten Sie, dass in jedem PCR Lauf mindestens eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle enthalten sein sollte.
- Alle Reagenzien - bis auf das Enzym - müssen komplett aufgetaut, gründlich gemischt und kurz abzentrifugiert werden.
- Aufgrund der hohen Viskosität des Enzyms (blauer Deckel) wird eine Vorwärmung bei Raumtemperatur für 15 Minuten empfohlen.
- Pipetten und Arbeitsflächen regelmäßig mit geeigneter Dekontaminationslösung reinigen (keine ethanolhaltigen Mittel).

### 11.2 Durchführung

Falls die Kontroll-RNA als Extraktionskontrolle verwendet wird, bitte Protokoll A folgen. Wird die Kontroll-RNA nur zur Kontrolle einer möglichen Inhibition der real time RT-PCR verwendet, bitte Protokoll B befolgen.

#### Protokoll A

**Die Kontroll-RNA wurde zur RNA-Extraktion bereits zugegeben (siehe Kapitel „Kontroll-RNA“). In diesem Fall wird der Mastermix gemäß Tabelle 2 angesetzt.**

Der Mastermix enthält alle benötigten Komponenten außer der Probe. Setzen Sie für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze mindestens einen Ansatz mehr als benötigt an.

Tabelle 2: Herstellung des Mastermix (Kontroll-RNA wurde während der RNA-Extraktion zugefügt)

Reaktionsvolumen	Mastermix Volumen
15,8 µl Reaktionsmix	15,8 µl x (N+1)
0,2 µl Enzym	0,2 µl x (N+1)



### **Protokoll B**

**Die Kontroll-RNA wird ausschließlich zur Kontrolle der real time RT-PCR verwendet (siehe Kapitel „Kontroll-RNA“). In diesem Fall wird der Mastermix gemäß Tabelle 3 angesetzt.**

Der Mastermix enthält alle benötigten Komponenten außer der Probe. Setzen Sie für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze mindestens einen Ansatz mehr als benötigt an.

Tabelle 3: Herstellung des Mastermix (die Kontroll-RNA wird dem Mastermix beigemischt)

Reaktionsvolumen	Mastermix Volumen
15,8 µl Reaktionsmix	15,8 µl x (N+1)
0,2 µl Kontroll-RNA	0,2 µl x (N+1)
0,2 µl Enzym	0,2 µl x (N+1)

\*Die durch Zugabe der Kontroll-RNA verursachte Volumenerhöhung kann vernachlässigt werden. Die Sensitivität des Nachweissystems ist dadurch nicht beeinträchtigt.

### **Protokoll A und B: Ansetzen der real time RT-PCR**

- Benötigte Anzahl optischer PCR-Reaktionsgefäße in die dafür vorgesehene Aufnahmeverrichtung des verwendeten real time PCR Geräts stellen/ eine optische PCR-Reaktionsplatte verwenden.
- **16 µl** des Mastermix in jedes Gefäß/ in jede Vertiefung der optischen PCR-Reaktionsplatte pipettieren.
- **4 µl** der RNA-Eluat (inklusive Eluate der Wasserkontrollen), der Positivkontrolle und der Negativkontrolle in die entsprechenden Gefäße/ in die entsprechenden Vertiefungen der optischen PCR-Reaktionsplatte hinzupipettieren (Tabelle 4).
- Die Reaktionsgefäße/ die optische Reaktionsplatte sofort nachdem die Probe zugefügt wurde verschließen, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren.

Tabelle 4: Ansetzen der real time RT-PCR.

Komponente	Volumen
Mastermix	16,0 µl
Probe	4,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

### 11.3 Geräteeinstellungen

Für die real time RT-PCR das in Tabelle 5 beschriebene Temperaturprofil benutzen.

Tabelle 5: real time RT-PCR Temperaturprofil

Bezeichnung	Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
<b>Reverse Transkription</b>	10 min	45°C	1
<b>Initiale Denaturierung</b>	5 min	95°C	1
<b>Amplifikation der cDNA</b>			
Denaturierung	10 sec	95°C	45
Annealing und Elongation	30 sec	60°C	
Messung am Ende dieses Schrittes			

Je nach real time PCR Gerät sind weitere Geräteeinstellungen vorzunehmen. Tabelle 6 gibt eine Übersicht über die notwendigen Einstellungen bei gängigen Geräten.

Tabelle 6: Übersicht über die notwendigen Geräteeinstellungen

Real time PCR Gerät	Parameter	Detektions-Kanal	Bemerkungen
LightCycler 480II	SBV	465-510	vorinstallierte CC, z.B. Universal CC FAM (510)
	Kontroll-RNA	533-580	- VIC (580)
Stratagene Mx3000P / Mx3005P	SBV	FAM	Reference Dye: None
	Kontroll-RNA	HEX	
ABI 7500, 7900, One Step (Plus)	SBV	FAM	Reference Dye ROX: NO
	Kontroll-RNA	HEX	
Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000	SBV	Green	Gain 5
Rotor-Gene 6000	Kontroll-RNA	Yellow	Gain 5

## 12 Validierung

Setzen Sie den Threshold wie folgt:

### Negativkontrolle

Die Negativkontrolle muss im FAM-Kanal unterhalb des Thresholds liegen. Bei einer potentiellen Kontamination dieser Kontrolle (Auftreten einer Kurve) sind die Ergebnisse des Testes nicht auswertbar. Der Test muss wiederholt werden.

### Positivkontrolle

Die Positivkontrolle muss im FAM-Kanal einen positiven Kurvenverlauf zeigen. Der  $C_T$  Wert der Positivkontrolle muss  $< 30$  sein. Eine Positivkontrolle außerhalb dieses Bereichs gibt einen Hinweis auf ein Problem bei der Amplifikation. In diesem Fall muss der Test wiederholt werden.

### Interne Kontrolle/ Kontroll-RNA

Alle internen Kontrollen müssen im HEX-Kanal einen positiven Kurvenverlauf zeigen. Die  $C_T$  Werte der internen Kontrollen müssen  $\leq 35$  sein. Ein Signal der internen Kontrolle höher  $C_T 35$ , deutet auf ein Problem mit der Probenvorbereitung/ Probenaufreinigung hin. Wurde eine Wasserkontrolle mitgeführt, muss auch hier der  $C_T$  Wert  $\leq 35$  sein.

Stark positive Proben können zu einer Inhibition der internen Kontrolle führen. In dem Fall ist das Ergebnis der Probe valide.

### 13 Interpretation der Ergebnisse

Die SBV-spezifische Amplifikation wird im FAM-Kanal detektiert. Die Amplifikation der Kontroll-RNA wird im HEX-Kanal gemessen.

Folgende Ergebnisse können auftreten:

C <sub>T</sub> Werte		Interpretation
FAM-Kanal	HEX-Kanal	
≤45	positiv oder negativ	<b>Das Ergebnis ist positiv, die Probe enthält SBV-RNA.</b> In diesem Fall ist die Detektion eines Signals im HEX-Kanal nicht notwendig, da eine hohe SBV cDNA-Konzentration zu einem verminderten bzw. fehlenden Fluoreszenz-signal der Kontroll-RNA führen kann (Kompetition).
negativ	≤35*	<b>Das Ergebnis ist negativ, die Probe enthält keine SBV-RNA.</b> Das detektierte Signal der Kontroll-RNA schließt die Möglichkeit einer fehlerhaften RNA-Extraktion aus (falls die Kontroll-RNA als Extraktionskontrolle benutzt wurde). Außerdem sind weder die Reverse Transkription noch die PCR komplett inhibiert. Unterscheidet sich der C <sub>T</sub> -Wert der internen Kontrolle der Wasserkontrolle stark von dem der Probe, so liegt eine teilweise Inhibition vor, die dazu führen kann, dass schwach positive Proben nicht erkannt werden (siehe Kapitel „Troubleshooting“).
negativ	> 35*	<b>Es kann keine diagnostische Aussage getroffen werden.</b> Die real time PCR wurde inhibiert, oder es trat ein Fehler bei der RNA-Extraktion auf.
negativ	negativ	<b>Es kann keine diagnostische Aussage getroffen werden.</b> Die real time RT-PCR wurde inhibiert, oder es trat ein Fehler bei der Extraktion auf. Wurde die Kontroll-RNA während der Extraktion und nicht direkt in den PCR Mastermix zugefügt, dann ist die Negativkontrolle in beiden Kanälen negativ.

\*Je nach Gerät und verwendeter Extraktionsmethode können sich die C<sub>T</sub> Bereiche der Kontroll-RNA etwas verschieben. Als Referenz dient der C<sub>T</sub> -Wert der ebenfalls extrahierten Wasserkontrolle. Unterscheidet sich der C<sub>T</sub> -Wert der internen Kontrolle der Wasserkontrolle stark von dem der Probe, so liegt eine teilweise Inhibition vor, die dazu führen kann, dass schwach positive Proben nicht erkannt werden (siehe Kapitel „Troubleshooting“).

Abbildung 1 und Abbildung 2 zeigen Beispiele für positive und negative real time RT-PCR Ergebnisse.

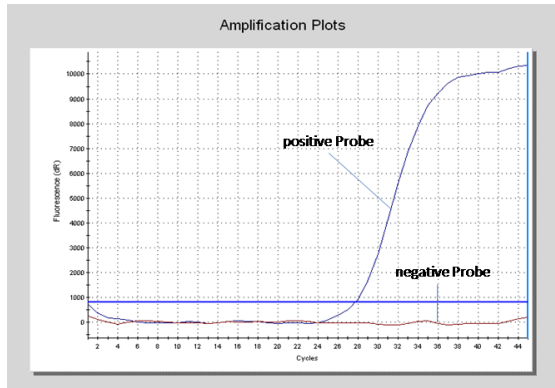


Abbildung 1: Die positive Probe zeigt eine starke Amplifikation im spezifischen FAM-Kanal, während bei der negativen Probe kein Fluoreszenzsignal detektiert wird.

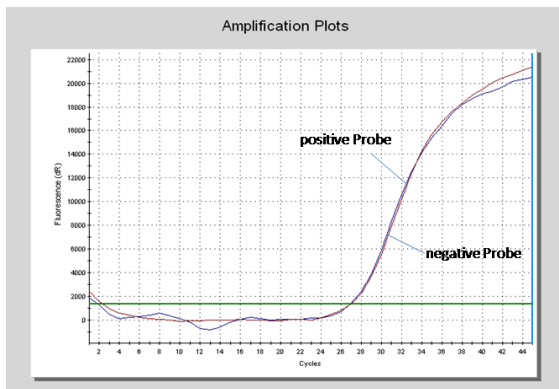


Abbildung 2: Im HEX-Kanal zeigen sowohl die positive als auch die negative Probe ein Signal auf. In diesem Fall liegt keine Inhibition der real time RT-PCR vor, auch verlief die RNA-Extraktion erfolgreich. Die negative Probe ist somit als tatsächlich negativ zu werten.

## 14 Troubleshooting

Der folgende Troubleshooting Guide soll bei eventuell auftretenden Problemen mit der real time PCR behilflich sein. Sollten Sie weitere Fragen haben, wenden Sie sich bitte an unsere Wissenschaftler unter [info@gerbion.com](mailto:info@gerbion.com).

### Kein Fluoreszenzsignal im FAM-Kanal der Positivkontrolle

Der gewählte Kanal entspricht nicht dem im Protokoll angegebenen	Wählen Sie den FAM-Kanal für die Analyse der SBV-spezifischen Amplifikation und den HEX-Kanal für die Amplifikation der Kontroll-RNA.
Fehlerhaftes Ansetzen des Mastermix	Stellen Sie sicher, dass das Enzym dem Mastermix zugesetzt wurde, siehe Kapitel „Real time PCR“.
Fehlerhaftes Ansetzen der real time PCR	Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte und vergleichen Sie diese mit den im Kapitel „Real time PCR“ beschriebenen.
Fehlerhaftes real time RT-PCR Temperaturprofil	Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit dem Protokoll im Kapitel „Geräteinstellungen“.
Falsche Lagerbedingungen des Kits oder abgelaufenes Haltbarkeitsdatum	Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Haltbarkeitsdatum auf dem Kitetikett. Falls nötig, benutzen Sie einen neuen Kit und lagern Sie alle Komponenten wie im Kapitel „Transport, Lagerung und Haltbarkeit“ beschrieben.

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













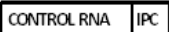
Die real time RT-PCR-Bedingungen stimmen nicht mit den im Protokoll beschriebenen überein	Überprüfen Sie die real time RT-PCR-Bedingungen, siehe Kapitel „Real time PCR“.
real time RT-PCR Inhibition	Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode benutzen (siehe Kapitel „Probenvorbereitung“) und beachten Sie die Herstellerangaben. Stellen Sie sicher, dass ethanolhaltige Waschpuffer vollständig entfernt wurden.

Verlust der RNA während des Aufarbeitungsprozesses	Falls die Kontroll-RNA vor der Extraktion zugefügt wurde, kann das Ausbleiben des Signals auf eine fehlerhafte RNA-Extraktion hinweisen. Stellen Sie sicher, dass sie eine geeignete Extraktionsmethode verwenden (kommerziell erhältliche Kits werden empfohlen). Halten Sie sich an das Herstellerprotokoll.
Falsche Lagerbedingungen des Kits oder abgelaufenes Haltbarkeitsdatum	Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Haltbarkeitsdatum auf dem Kitetikett. Falls nötig, benutzen Sie einen neuen Kit und lagern Sie alle Komponenten wie im Kapitel „Transport, Lagerung und Haltbarkeit“ beschrieben.

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

Kontamination des real time RT-PCR Ansatzes	Wiederholen Sie die real time RT-PCR in Replikaten. Falls das Ergebnis der Wiederholungen negativ sein sollte, so ereignete sich die Kontamination während der Befüllung der Reaktionsgefäße. Stellen Sie sicher, dass Sie die Positivkontrolle zuletzt pipettieren und verschließen Sie die Reaktionsgefäße sofort nachdem Sie die jeweilige Probe zugegeben haben. Falls die Negativkontrolle in der Wiederholung wieder ein Signal im FAM-Kanal ergibt, deutet dies darauf hin, dass eine oder mehrere Kitkomponenten kontaminiert sind. Stellen Sie sicher, dass die Arbeitsbereiche und die Geräte regelmäßig dekontaminiert werden. Wiederholen Sie die real time RT-PCR mit einem neuen Kit.
---	---

## 15 Abkürzungen und Symbole

SBV	Schmallenberg Virus		Artikelnummer
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure		Inhalt ausreichend für x Prüfungen
PCR	Polymerase Ketten Reaktion		Obere Temperaturbegrenzung
RNA	Ribonukleinsäure		Hersteller
RT	Reverse Transkription		Verwendbar bis JJJJ-MM-TT
	Reaktionsmix		Chargenbezeichnung
	Enzym		Inhalt
	Positivkontrolle		Gebrauchsanweisung beachten
	Negativkontrolle		
	Kontroll-RNA (IPC)		