

Gebrauchsinformation

diarellaMAP vet real time PCR Kit

Der diarellaMAP vet real time PCR Kit ist ein in-vitro Veterinärdiagnostikum zum Nachweis der DNA von Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis in Eluaten aus Kotproben und Sammelkotproben aus bis zu 10 Einzelkotproben von Rindern und Kotproben von kleinen Wiederkäuern (Schafen, Ziegen), Sockentupferproben von Rinderkot sowie aus Kulturproben (Koloniematerial von Festnährböden und Bouillon-Kulturen) und mittels real time PCR in offenen real time PCR Systemen (z.B. Mx3000P/3005, Aria Mx, Agilent; LightCycler 480/480II, Roche; ABI 7500, QuantStudio, ThermoFisher; RotorGene 3000/6000, Corbett; RotorGene-Q, Qiagen, Mic qPCR-Cycler, BMS; CFX96, Bio-Rad).

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

Zul.-Nr.

FLI-B 673



G01099-96



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

1 Anwendungszweck

Der diarellaMAP vet real time PCR Kit ist ein in-vitro Veterinärdiagnostikum zum Nachweis der DNA von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Eluaten aus Kotproben und Sammelkotproben aus bis zu 10 Einzelkotproben von Rindern und Kotproben von kleinen Wiederkäuern (Schafen, Ziegen), Sockentupferproben von Rinderkot sowie aus Kulturproben (Koloniematerial von Festnährböden und Bouillon-Kulturen) und mittels real time PCR in offenen real time PCR Systemen (z.B. Mx3000P/3005, Aria Mx, Agilent; LightCycler 480/480II, Roche; ABI 7500, QuantStudio, ThermoFisher; RotorGene 3000/6000, Corbett; RotorGene-Q, Qiagen, Mic qPCR-Cycler, BMS; CFX96, Bio-Rad).

2 Anwendungsbereich

Die Paratuberkulose (Johne'sche Krankheit) ist eine Erkrankung der Wiederkäuer, deren Erreger *M. avium* ssp. *paratuberculosis* seit Anfang des 19. Jahrhunderts bekannt ist. Aufgrund von Ähnlichkeiten im Krankheitsbild und unterstützt durch mikrobiologische und molekularbiologische Untersuchungen wird eine mögliche Beteiligung dieses Erregers auch an der Krankheit „Morbus Crohn“ des Menschen diskutiert. Als Vehikel für die Übertragung wird dabei immer wieder Rohmilch, Rohmilchkäse und sogar pasteurisierte Trinkmilch genannt, da es in der wissenschaftlichen Literatur vermehrte Hinweise auf ein Vorkommen in Milch und ein Überleben von *M. avium* ssp. *paratuberculosis* unter den Bedingungen der Dauer- und Kurzzeiterhitzung gibt. Die Paratuberkulose ist eine in Deutschland meldepflichtige Tierseuche. In Österreich ist sie anzeigepflichtig, in der Schweiz ist sie als zu überwachende Seuche (Meldepflicht) eingestuft.

Bei Rindern beträgt die Inkubationszeit meist mehrere Jahre. Obwohl die Infektion bevorzugt in den ersten 30 Lebenstagen erfolgt, werden klinische Erkrankungen im Regelfall erst bei über zweijährigen Rindern (nach der zweiten bis dritten Kalbung) manifest.

Die Kälber infizieren sich bereits vor der Geburt durch das Muttertier, durch Aufnahme kontaminierter Milch nach der Geburt oder nehmen die Mykobakterien über Futter und Wasser auf, das mit erregerhaltigem Kot verschmutzt ist. Die Ausbreitung des Erregers erfolgt nach der oralen Aufnahme über die Schleimhaut des Magen-Darm-Kanals in die Mesenteriallymphknoten und bei fortgeschrittenen Fällen durch das Blut in andere Organe. Häufig zeigen die Tiere keine klinischen Symptome und

verbleiben als stumme Ausscheider in den Betrieben, so dass sich immer wieder Tiere infizieren können.

Typisches Merkmal dieser chronischen Darmkrankheit sind die unstillbaren, wässrigen Durchfälle. Die Erkrankung verläuft fieberlos und führt über Wochen hinweg bei unvermindert gutem Appetit zu einer ständigen Abmagerung bis hin zur Kachexie. Die Milchleistung nimmt ebenfalls kontinuierlich ab. Die Erkrankung führt nach einigen Wochen bis Monaten stets zum Tode. In den Herden erkranken meist nur Einzeltiere, die jedoch, bis die Krankheit erkennbar wird, über längere Zeiten erhebliche Keimmengen ausscheiden. Ein großer Teil der Infektionen bleibt im latenten Stadium, die Krankheit kommt also nicht zum Ausbruch.

3 Testprinzip

Der diarellaMAP vet real time PCR Kit enthält spezifische Primer und fluoreszenzfarbstoffmarkierte Sonden und zusätzliches Material zum Nachweis der DNA von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Eluaten aus Kotproben und Sammelkotproben von bis zu 10 Einzelkotproben von Rindern und Kotproben von kleinen Wiederkäuern (Schafen, Ziegen), Sockentupferproben von Rinderkot sowie aus Kulturproben (Koloniematerial von Festnährböden und Bouillon-Kulturen) Die Detektion der Amplifikation erfolgt in Echtzeit durch die Hybridisierung und anschließende Hydrolyse der *M. avium* ssp. *paratuberculosis*-spezifischen Fluoreszenz-Sonden. Die Detektion erfolgt im FAM-Kanal.

Zusätzlich verfügt der diarellaMAP vet real time PCR Kit über eine Kontroll-DNA (Interne Prozesskontrolle, IPC), die während der Extraktion zugefügt und in einem heterologen Amplifikationssystem nachgewiesen wird. Dies ermöglicht zum einen das Aufdecken von Fehlern bei der DNA-Extraktion, zum anderen kann eine mögliche Inhibition der PCR identifiziert werden. Dadurch wird das Risiko von falsch-negativen Ergebnissen reduziert. Die Detektion der Kontroll-DNA erfolgt im HEX-Kanal.

4 Komponenten

Die Komponenten sind ausreichend für den Ansatz von 96 Nachweisreaktionen.

Tabelle 1: Komponenten des diarellaMAP vet real time PCR Kit.

Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt
Reaktionsmix	gelb	1 x 1536 µl
Positivkontrolle	rot	1 x 100 µl
Negativkontrolle	grün	1 x 100 µl
Kontroll-DNA	farblos	1 x 480 µl

5 Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- DNA Extraktionskit (z.B. NukEx Mag Extreme, gerbion Art. Nr. G05024/G05025)
- sterile Reaktionsgefäße
- Pipetten (variable Volumina)
- sterile Pipettenspitzen mit Filter
- FastPrep® Cell Disrupter (qbiogene), TissueLyser (Qiagen), Precellys (Bertin Instruments) oder vergleichbares Gerät
- Tischzentrifuge
- Vortexer
- 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 diarellaMAP vet real time PCR Kit erfolgt gefroren auf Trockeneis. Alle Komponenten des diarellaMAP vet real time 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 diarellaMAP vet real time 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 diarellaMAP vet real time PCR dürfen nicht zusammen verwendet werden.

8 Art und Beschaffenheit des Probenmaterials

Das Ausgangsmaterial für die Nachweisreaktion ist DNA, die aus Kotproben und Sammelkotproben aus bis zu 10 Einzelkotproben von Rindern und Kotproben von kleinen Wiederkäuern (Schafen, Ziegen), Sockentupferproben von Rinderkot sowie aus Kulturproben (Koloniematerial von Festnährböden und Bouillon-Kulturen) isoliert wurde.

9 Probenvorbereitung

Es wird empfohlen, kommerziell erhältliche Extraktionskits zu verwenden, wie z.B.:

- NukEx Mag Extreme, gerbion Art. Nr. G05024 (SC) or G05025 (SL)

Vor der DNA Extraktion aus den im Kapitel „Art und Beschaffenheit des Probenmaterials“ genannten Materialien sollte eine Homogenisierung und mechanische Zerstörung der enthaltenen Mykobakterien durchgeführt werden. Die NukEx Mag Extreme Extraktionskits enthalten Homogenisierungsröhrchen, die entweder mit Schraubdeckel (SC) oder Safelock Deckel (SL) versehen sind. Die Gefäße sind zur Verwendung in handelsüblichen Homogenisatoren geeignet. Ein detailliertes Protokoll ist in Verbindung mit dem NukEx Mag Extreme Protokoll erhältlich.

Als weiterer alternativer Extraktionskit wird z.B. empfohlen:

- QIAamp® cador® Pathogen Mini Kit, Qiagen Art. Nr. 54104/54106

Detaillierte Protokolle für die Extraktion von MAP-DNA sind beim Hersteller erhältlich.

Wichtig:

Unabhängig vom verwendeten Probenmaterial 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 zu untersuchenden Probe behandelt werden.

Beachten Sie bitte auch das Kapitel „Kontroll-DNA“.

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

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

10 Kontroll-DNA

Der diarellaMAP vet real time PCR Kit enthält eine Kontroll-DNA (IPC), die zum einen als Kontrolle der DNA-Extraktion dient, zum anderen als interne Kontrolle mögliche Inhibitionen der PCR aufzeigt.

Bei Verwendung der meisten Extraktionskits wird eine zu analysierende Probe zunächst mit einem Lysepuffer gemischt und anschließend inkubiert, um Nukleinsäuren freizusetzen. Die diarellaMAP vet Kontroll-DNA wird dem Lysepuffer beigemischt. Von der Kontroll-DNA werden 5 µl vor der Inkubation zu jeder Probe hinzupipettiert.

Bei Extraktion mit NukEx Mag Extreme erfolgt die Zugabe der Kontroll-DNA zum Puffer EX2 nach der Homogenisierung der Probe. Hiermit wird der komplette Prozess überprüft.

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 müssen komplett aufgetaut, gründlich gemischt und kurz abzentrifugiert werden.
- Pipetten und Arbeitsflächen regelmäßig mit geeigneter Dekontaminationslösung reinigen (keine ethanolhaltigen Mittel).

11.2 Durchführung

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

Reaktionsvolumen	Mastermix Volumen
16,0 µl Reaktionsmix	16,0 µl x (N+1)

Ansetzen der real time PCR

- Benötigte Anzahl optischer PCR-Reaktionsgefäße in die dafür vorgesehene Aufnahmevorrichtung 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 DNA-Eluat (inklusive Eluate der Wasserkontrollen), der Positivkontrolle und der Negativkontrolle in die entsprechenden Gefäße/ in die entsprechenden Vertiefungen der optischen PCR-Reaktionsplatte hinzupipettieren (Tabelle 3).
- Die Reaktionsgefäße/ die optische Reaktionsplatte sofort nachdem die Probe zugefügt wurde verschließen, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren.

Tabelle 3: Ansetzen der real time PCR.

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

11.3 Geräteeinstellungen

Für die real time PCR das in Tabelle 4 beschriebene Temperaturprofil benutzen.

Tabelle 4: real time PCR Temperaturprofil

Bezeichnung	Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	5 min	95°C	1
Amplifikation der DNA			
Denaturierung	10 sec	95°C	45
Annealing und Elongation	40 sec	60°C	
	Messung am Ende dieses Schrittes		

Je nach real time PCR Gerät sind weitere Geräteeinstellungen vorzunehmen. Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die notwendigen Einstellungen bei gängigen Geräten.

Tabelle 5: Übersicht über die notwendigen Geräteeinstellungen

Real time PCR Gerät	Parameter	Detektions-Kanal	Bemerkungen
LightCycler 480II	MAP	465-510	vorinstallierte CC, z.B. Universal CC FAM (510) - VIC (580)
	Kontroll-DNA	533-580	
Stratagene Mx3000P / Mx3005P	MAP	FAM	Reference Dye: None
	Kontroll-DNA	HEX	
Agilent Aria Mx Bio-Rad CFX96	MAP	FAM	Reference Dye: None
	Kontroll-DNA	HEX	
ABI 7500, 7900, One Step (Plus) QuantStudio	MAP	FAM	Reference Dye: No
	Kontroll-DNA	JOE/HEX	
Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000 Rotor-Gene 6000	MAP	Green	Gain 5
	Kontroll-DNA	Yellow	Gain 5
Mic qPCR-Cycler	MAP	Green	Gain 8
	Kontroll-DNA	Yellow	Gain 10

12 Validierung

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 betragen. Eine Positivkontrolle außerhalb dieses Bereichs gibt einen Hinweis auf ein Problem bei der Amplifikation. In diesem Fall muss der Test wiederholt werden.

Kontroll-DNA

Alle Extraktionskontrollen müssen im HEX-Kanal einen positiven Kurvenverlauf zeigen. Die C_T Werte der Extraktionskontrollen müssen ≤ 35 sein. Ein Signal der Extraktionskontrolle höher $C_T 35$ deutet auf ein Problem mit der Probenvorbereitung/Probenextraktion hin. Wurde eine Wasserkontrolle mitgeführt, muss auch hier der C_T Wert ≤ 35 betragen. Stark positive Proben können zu einer Inhibition im HEX-Kanal führen. In diesem Fall ist das Ergebnis der Probe valide.

13 Interpretation der Ergebnisse

Die *M. avium ssp. paratuberculosis*-spezifische Amplifikation wird im FAM-Kanal detektiert. Die Amplifikation der Kontroll-DNA wird im HEX-Kanal gemessen.

Folgende Ergebnisse können auftreten:

C _T Werte		Interpretation
FAM-Kanal	HEX-Kanal	
≤40	positiv oder negativ	Das Ergebnis ist positiv, die Probe enthält <i>Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis</i>-DNA. Das Ergebnis der Kontroll-DNA ist in diesem Fall nicht relevant.
>40	27-35*	Das Ergebnis ist nicht eindeutig interpretierbar. Es sollte eine Wiederholungsuntersuchung der Probe vorgenommen werden. Bestätigt sich das Ergebnis, ist die Probe als positiv zu bewerten. Bei negativem Wert im FAM-Kanal in der Wiederholungs-untersuchung ist die Probe als negativ zu bewerten.
negativ	27-35*	Das Ergebnis ist negativ. Die Probe enthält keine DNA von <i>M. avium ssp. paratuberculosis</i> .
negativ	> 35*	Es kann keine diagnostische Aussage getroffen werden. Die real time PCR wurde inhibiert, oder es trat ein Fehler bei der DNA-Extraktion auf.
negativ	negativ	Es kann keine diagnostische Aussage getroffen werden. Die real time PCR wurde inhibiert, oder es trat ein Fehler bei der DNA-Extraktion auf. Die Negativkontrolle ist in beiden Kanälen negativ.

*Je nach Gerät und verwendeter Extraktionsmethode können sich die C_T Bereiche der Kontroll-DNA etwas verschieben. Als Referenz dient der C_T -Wert der ebenfalls extrahierten Wasserkontrolle. Unterscheidet sich der C_T -Wert im HEX-Kanal 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 PCR Ergebnisse.

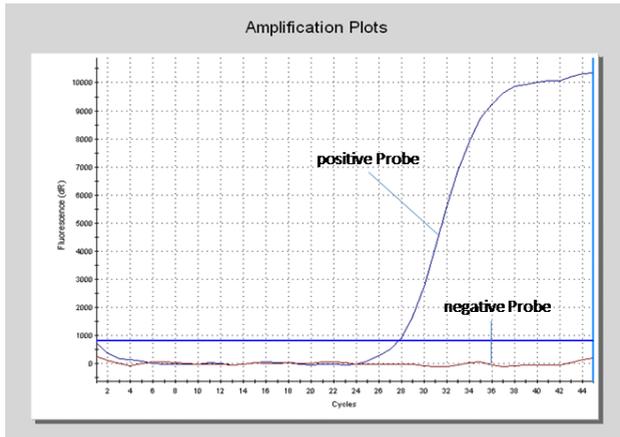


Abbildung 1: Die positive Probe zeigt eine starke Amplifikation im spezifischen FAM-Kanal, während bei der negativen Probe kein Fluoreszenzsignal detektiert wird.

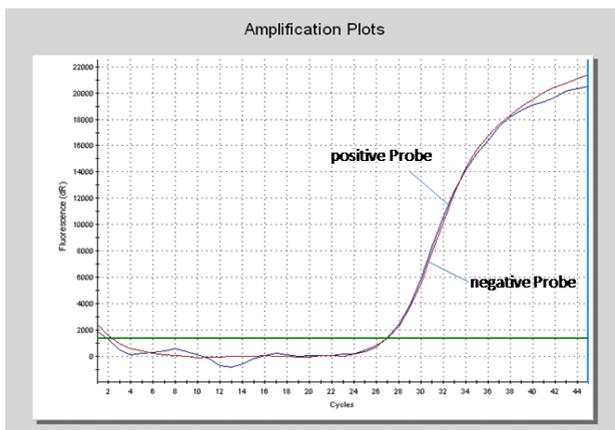


Abbildung 2: Im HEX-Kanal zeigen sowohl die positive als auch die negative Probe ein Signal auf. In diesem Fall liegt keine Inhibition der real time PCR vor, auch verlief die DNA-Extraktion erfolgreich. Die negative Probe ist somit als tatsächlich negativ zu werten.

14 Grenzen der Methode

Testergebnisse sind immer in Zusammenhang mit dem klinischen Bild zu sehen. Ein negatives Testresultat kann eine Infektion mit *M. avium ssp. paratuberculosis* nicht ausschließen. Die diagnostische Sensitivität bei sehr schwach positiven Proben kann anhand der Durchführung von Doppelansätzen weiter erhöht werden.

15 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.

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 MAP-spezifischen Amplifikation und den HEX-Kanal für die Amplifikation der Kontroll-DNA.
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 PCR Temperaturprofil	Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit dem Protokoll im Kapitel „Geräteeinstellungen“.
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 unter „Transport, Lagerung und Haltbarkeit“ beschrieben.

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

Die real time PCR-Bedingungen stimmen nicht mit den im Protokoll beschriebenen überein	Überprüfen Sie die real time PCR-Bedingungen, siehe Kapitel „Real time PCR“.
real time 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 DNA während des Aufarbeitungsprozesses	Das Ausbleiben des Signals deutet auf eine fehlerhafte DNA-Extraktion hin. Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode verwenden. 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 PCR Ansatzes	<p>Wiederholen Sie die real time PCR in Replikaten. Falls das Ergebnis der Wiederholungen negativ sein sollte, so ereignete sich die Kontamination während der Befüllung der Reaktionsgefäße.</p> <p>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 PCR mit einem neuen Kit.</p>
--	---

16 Abkürzungen und Symbole

DNA	Desoxyribonukleinsäure	REF	Artikelnummer
PCR	Polymerase Ketten Reaktion		Inhalt ausreichend für x Prüfungen
MAP	<i>Mycobacterium avium ssp.</i> <i>paratuberculosis</i>		Gebrauchsinformation beachten
REACTION MIX	Reaktionsmix		Obere Temperaturbegrenzung
CONTROL +	Positivkontrolle		Hersteller
CONTROL -	Negativkontrolle		Verwendbar bis JJJJ-MM-TT
CONTROL DNA IPC	Kontroll-DNA (IPC)	LOT	Chargenbezeichnung
		CONT	Inhalt

17 Literatur

A.K. Schwalm, C. Metzger-Boddien, G. Seemann, J. Mandl, A. Obiegala, M. Pfeffer, R. Sting. Field study on bovine paratuberculosis using real-time PCR and liquid culture for testing environmental and individual fecal samples implemented in dairy cow management. J. Dairy Sci. 102, 2019.