

artus[®] HSV-1/2 TM PCR Kit

Handbuch



24 (Katalog Nr. 4500163)



96 (Katalog Nr. 4500165)

Quantitatives In-vitro-Diagnostikum

Zur Verwendung mit den

AB/PR/SM[®] 7000, 7700 und 7900HT Sequence Detection Systems

Version 1



4500163, 4500165



1046890DE



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, DEUTSCHLAND

R2

MAT

1046890DE



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN ist der führende Anbieter von innovativen Probenvorbereitungs- und Testtechnologien, die die Isolierung und die Analyse von Nukleinsäuren und Proteinen in jedem biologischen Probenmaterial ermöglichen. Unsere fortschrittlichen, qualitativ hochwertigen Produkte und Dienstleistungen stellen den Erfolg von der Probe bis zum Ergebnis sicher.

QIAGEN setzt Standards in:

- der Reinigung von DNA, RNA und Proteinen
- Nukleinsäure- und Protein-Assays
- microRNA-Forschung und RNAi
- der Automatisierung von Probenvorbereitungs- und Testtechnologien

Unsere Mission ist es, Ihnen herausragende Erfolge und neue Erkenntnisse bei Ihrer Forschung zu ermöglichen. Weitere Informationen finden Sie auf der Website www.qiagen.com.

Inhaltsverzeichnis

1. Inhalt	5
2. Lagerung	6
3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte	6
4. Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	7
5. Erreger-Informationen	7
6. Prinzip der Real-Time PCR	8
7. Produktbeschreibung	8
8. Protokoll	9
8.1 DNA-Isolierung	9
8.2 Interne Kontrolle	13
8.3 Quantifizierung	15
8.4 Vorbereitung der PCR	16
8.5 Programmierung der <i>ABI PRISM SDS</i>	21
9. Auswertung	33
10. Troubleshooting	39
11. Spezifikationen	42
11.1 Analytische Sensitivität	42
11.2 Spezifität.....	44
11.3 Präzision.....	45
11.4 Robustheit	48
11.5 Reproduzierbarkeit	48
11.6 Diagnostische Evaluierung	48

12 Besondere Hinweise zum Produkt-Gebrauch	49
13. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen.....	49
14. Qualitätskontrolle	49
15. Literatur.....	49
16. Erklärung der Symbole	50

artus HSV-1/2 TM PCR Kit

Für die Verwendung mit den ABI PRISM 7000 und 7900HT Sequence Detection Systems.

Beachte: Der artus HSV-1/2 TM PCR Kit kann weder in Verbindung mit dem GeneAmp® 5700 SDS, dem ABI PRISM 7700 SDS noch mit dem 384er Plattenformat des ABI PRISM 7900HT SDS verwendet werden.

1. Inhalt

	Beschriftung und Inhalt	Art. Nr. 4500163 24 Reaktionen	Art. Nr. 4500165 96 Reaktionen
Blau	HSV TM Master	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
Gelb	HSV TM Mg-Sol [†]	1 x 1.200 µl	1 x 1.200 µl
Rot	HSV1 LC/RG/TM QS 1 [†] 1 x 10 ⁴ cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rot	HSV1 LC/RG/TM QS 2 [†] 1 x 10 ³ cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rot	HSV1 LC/RG/TM QS 3 [†] 1 x 10 ² cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rot	HSV1 LC/RG/TM QS 4 [†] 1 x 10 ¹ cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rot	HSV2 LC/RG/TM QS 1 [†] 1 x 10 ⁴ cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rot	HSV2 LC/RG/TM QS 2 [†] 1 x 10 ³ cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rot	HSV2 LC/RG/TM QS 3 [†] 1 x 10 ² cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rot	HSV2 LC/RG/TM QS 4 [†] 1 x 10 ¹ cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Grün	HSV TM IC [†]	1 x 1.000 µl	2 x 1.000 µl
Weiß	Water (PCR grade)	1 x 1.000 µl	1 x 1.000 µl

† QS = Quantifizierungsstandard
 IC = Interne Kontrolle
 Mg-Sol = Magnesium-Lösung

2. Lagerung

Die Komponenten des *artus* HSV-1/2 TM PCR Kits werden bei -30 °C bis -15 °C gelagert und sind bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Datum haltbar. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren ($> 2\text{ x}$) sollte vermieden werden, da dadurch die Sensitivität verringert wird. Bei unregelmäßigem Gebrauch sollten deshalb die Reagenzien aliquotiert werden. Sollte die Notwendigkeit bestehen, die Komponenten bei $+4\text{ °C}$ zu lagern, darf ein Zeitraum von fünf Stunden nicht überschritten werden.

3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- Puderfreie Laborhandschuhe
- DNA-Isolierungskit (siehe **8.1 DNA-Isolierung**)
- Pipetten (einstellbar)
- Sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Vortex-Mixer
- Tischzentrifuge mit Rotor für 2 ml-Reaktionsgefäße
- Zentrifuge mit Rotor für Mikrotiterplatten (optional)
- 96-well Reaktionsplatte/Reaktionsgefäße für optische Messungen mit entsprechenden optischen Verschlussmaterialien (siehe **8.4 Vorbereitung der PCR**)
- 96-well zweiteiliger Halterahmen zur Verwendung von optischen Reaktionsgefäßen (*96-Well Tray/Retainer Set*, Kat.-Nr. 403 081, Applied Biosystems), siehe **8.4 Vorbereitung der PCR**
- Kompressionsmatte zur Verwendung mit optischen Klebefolien (*Optical Cover Compression Pads*, Kat.-Nr. 4 312 639, Applied Biosystems), siehe **8.4 Vorbereitung der PCR**
- Applikator zum Verschließen der Reaktionsplatten unter Verwendung von optischen Klebefolien (*Adhesive Seal Applicator Kit*, Kat.-Nr. 4 333 183, Applied Biosystems)
- *ABI PRISM 7000* oder *7900HT SDS*

Beachte: Eine vorliegende gültige Kalibrierung der Farbstoffe (*Pure Spectra Component File*) und des Hintergrundes (*Background Component File*) ist bei Inbetriebnahme der Geräte unbedingt erforderlich.

4. Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Folgendes sollte vom Anwender immer beachtet werden:

- Sterile Pipettenspitzen mit Filter verwenden.
- Positivmaterial (Proben, Kontrollen, Amplifikate) räumlich getrennt von den übrigen Reagenzien lagern, aufreinigen und zur Reaktion zusetzen.
- Alle Komponenten vor Testbeginn vollständig bei Raumtemperatur auftauen.
- Anschließend die Komponenten gründlich durchmischen und kurz zentrifugieren.
- Zügig auf Eis oder im Kühlblock arbeiten.

5. Erreger-Informationen

Das Herpes simplex Virus (HSV) wird in der Bläschenflüssigkeit, im Speichel und im Vaginalsekret gefunden und durch Schmierinfektionen sowie durch Sexualverkehr und perinatal übertragen. Bei einem Großteil der HSV-bedingten Erkrankungen dominiert das Bild der Bläschenbildung auf der Haut und an den Schleimhäuten (Mund und Genitale). Die HSV-Infektion kann als Primärinfektion auftreten, die in > 90 % der Fälle asymptomatisch verläuft, oder als Rezidiv. Zu den v. a. durch HSV-1 ausgelösten Primärinfektionen zählen die Gingivostomatitis, das Ekzema herpeticum, die Keratokonjunktivitis und die Enzephalitis. HSV-2 tritt im Rahmen der Primärinfektion v. a. als Vulvovaginitis, als Meningitis und als generalisierter Herpes des Neugeborenen auf. Als Rezidiv der HSV-Infektion kommt es vor allem zur Bläschenbildung in der Nasolabial- oder Genitalregion. Gefährlicher einzustufen sind die Rezidive der Keratokonjunktivitis und der Meningitis.

6. Prinzip der Real-Time PCR

Bei der Diagnostik mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden spezifische Bereiche aus dem Erregergenom amplifiziert. Die Detektion findet bei der Real-Time PCR mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen statt. Diese sind in der Regel an Oligonukleotid-Sonden gekoppelt, die spezifisch an das PCR-Amplifikat binden. Die Detektion der Fluoreszenzintensitäten im Verlauf der Real-Time PCR ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung der Produkte, ohne die Probenröhrchen nach der PCR wieder öffnen zu müssen (Mackay, 2004).

7. Produktbeschreibung

Der *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* ist ein gebrauchsfertiges System für den Nachweis und die Differenzierung von Herpes simplex Virus-1 und -2-DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) im *ABI PRISM 7000* und *7900HT Sequence Detection System*. Der *HSV TM Master* beinhaltet Reagenzien und Enzyme für die spezifische Amplifikation eines 148 bp langen Abschnitts des Herpes simplex Virus-Genoms. Die Detektion des Amplifikats erfolgt durch die Messung der FAM-Fluoreszenz (HSV-1) und NED-Fluoreszenz (HSV-2) im *ABI PRISM SDS*. Daneben enthält der *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* zum Nachweis einer möglichen PCR-Inhibition ein zweites heterologes Amplifikationssystem. Dieses wird als *Interne Kontrolle (IC)* durch die Messung der VIC-Fluoreszenz nachgewiesen. Dabei wird die Nachweisgrenze der analytischen HSV-PCR (siehe **11.1 Analytische Sensitivität**) nicht herabgesetzt. Es werden externe Positivkontrollen (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4* & *HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*) mitgeliefert, mit deren Hilfe eine Bestimmung der Erregerlast vorgenommen werden kann. Dazu lesen Sie bitte den Absatz **8.3 Quantifizierung**.

8. Protokoll

8.1 DNA-Isolierung

DNA-Isolierungskits werden von verschiedenen Herstellern angeboten. In Abhängigkeit vom Protokoll des gewählten Herstellers setzen Sie die angegebene Probenmenge in die Aufreinigung ein und führen die DNA-Isolierung entsprechend der Vorschrift durch. Folgende Isolierungskits werden empfohlen:

Probenmaterial	Aufreinigungskit	Katalognummer	Hersteller	Carrier-RNA
Serum, Plasma, Liquor, Abstriche	QIAamp [®] UltraSens [®] Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	enthalten
	QIAamp DNA Mini	51 304	QIAGEN	nicht enthalten
Liquor	EZ1 [®] DSP Virus Kit (48)*	62 724	QIAGEN	enthalten

*Zur Verwendung in Kombination mit der BioRobot[®] EZ1 DSP Workstation (Kat. Nr. 9001360) und der EZ1 DSP Virus Card (Kat. Nr. 9017707)

Wichtige Hinweise für die Verwendung des QIAamp UltraSens Virus

Kits und des QIAamp DNA Mini Kits:

- Der Einsatz von **Carrier-RNA** ist für die Effizienz der Aufreinigung und damit für die DNA-/RNA-Ausbeute von entscheidender Bedeutung. Falls der verwendete Isolierungskit keine Carrier-RNA enthalten sollte, beachten Sie bitte, dass bei der Aufreinigung von Nukleinsäuren aus zellfreien Körperflüssigkeiten bzw. Materialien mit geringem DNA-/RNA-Gehalt (z. B. Liquor) die Zugabe von Carrier-RNA (RNA-Homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, Kat.-Nr. 27-4110-01) dringend empfohlen wird. Bitte gehen Sie dann wie folgt vor:
 - a) Resuspendieren Sie hierzu die lyophilisierte Carrier-RNA im Elutionspuffer (nicht im Lysispuffer) des Isolierungskits (z. B. AE-Puffer

des QIAamp DNA Mini Kits) und stellen Sie eine Verdünnung mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ her. Portionieren Sie diese Carrier-RNA-Lösung auf eine Ihren Anforderungen entsprechende Anzahl von Aliquots, die bei -20°C gelagert werden müssen. Vermeiden Sie das wiederholte Auftauen ($> 2 \times$) eines Carrier-RNA-Aliquots.

- b) Pro Aufreinigung sollte 1 μg Carrier-RNA pro 100 μl Lysispuffer eingesetzt werden. Sieht das Extraktionsprotokoll beispielsweise 200 μl Lysispuffer pro aufzureinigende Probe vor, dann setzen Sie 2 μl der Carrier-RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) direkt in den Lysispuffer ein. Vor Beginn jeder Aufreinigung muss ein Gemisch aus Lysispuffer und Carrier-RNA (und ggf. *Interner Kontrolle*, siehe **8.2 Interne Kontrolle**) gemäß folgendem Pipettierschema frisch hergestellt werden.

Anzahl der Proben	1	12
Lysispuffer	z. B. 200 μl	z. B. 2.400 μl
Carrier-RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	2 μl	24 μl
Gesamtvolumen	202 μl	2.424 μl
Volumen für die Aufreinigung	200 μl	je 200 μl

- c) Setzen Sie das frisch hergestellte Gemisch aus Lysispuffer und Carrier-RNA sofort für die Aufreinigung ein. Eine Lagerung des Gemisches ist nicht möglich.

- Der Einsatz von **Carrier-RNA** ist für die Effizienz der Aufreinigung und damit für die DNA-/RNA-Ausbeute von entscheidender Bedeutung. Um eine höhere Stabilität der im QIAamp UltraSens Virus Kit mitgelieferten Carrier-RNA zu erzielen, empfehlen wir folgendes von den Angaben im Handbuch des Isolierungskits abweichendes Vorgehen:
 - a. Resuspendieren Sie die lyophilisierte Carrier-RNA vor Erstbenutzung des Isolierungskits in 310 μl des im Kit enthaltenen Elutionspuffers (Endkonzentration 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, keinen Lysispuffer verwenden) und portionieren Sie diese Carrier-RNA-Lösung auf eine Ihren Anforderungen entsprechende Anzahl von Aliquots, die bei -20°C gelagert werden müssen. Vermeiden Sie das wiederholte Auftauen ($> 2 \times$) eines Carrier-RNA-Aliquots.
 - b. Vor Beginn jeder Aufreinigung muss ein Gemisch aus Lysispuffer und Carrier-RNA (und ggf. *Interner Kontrolle*, siehe **8.2 Interne Kontrolle**) gemäß folgendem Pipettierschema frisch hergestellt werden.

Anzahl der Proben	1	12
Lysispuffer AC	800 μl	9.600 μl
Carrier-RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	5,6 μl	67,2 μl
Gesamtvolumen	805,6 μl	9.667,2 μl
Volumen für die Aufreinigung	800 μl	je 800 μl

- c. Setzen Sie das frisch hergestellte Gemisch aus Lysispuffer und Carrier-RNA sofort für die Aufreinigung ein. Eine Lagerung des Gemisches ist nicht möglich.
- Es wird empfohlen, für die Elution der DNA 50 μl Elutionspuffer zu verwenden, um eine maximale Sensitivität des *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* zu erlangen.
 - Durch die Benutzung des **QIAamp UltraSens Virus Kits** kann eine Aufkonzentrierung der Probe erzielt werden. Sollte es sich bei Ihrem Probenmaterial nicht um Serum oder Plasma handeln, so geben Sie bitte

- mindestens 50 % (v/v) negatives Humanplasma zur Probe.
- Bei Aufreinigungen, die **Ethanol**-haltige Waschpuffer benutzen, stellen Sie unbedingt sicher, dass vor der Elution ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt (drei Minuten, 13.000 Upm) zur Beseitigung von Ethanol-Rückständen durchgeführt wird. Dies verhindert mögliche PCR-Inhibitionen.
 - Der *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit ist nicht geeignet für Aufreinigungsverfahren, die auf der Grundlage von **Phenol** arbeiten.

Wichtiger Hinweis für die Verwendung des EZ1 DSP Virus Kits:

- Der Einsatz von **Carrier-RNA** ist für die Effizienz der Aufreinigung und damit für die DNA-/RNA-Ausbeute von entscheidender Bedeutung. Geben Sie deshalb bitte zu jeder Aufreinigung die erforderliche Menge an Carrier RNA hinzu und halten Sie sich dabei an die Anweisungen im *EZ1 DSP Virus Kit Handbuch*.

Wichtig: Die *Interne Kontrolle* des *artus* HSV-1/2 TM PCR Kits kann direkt in die Aufreinigung eingesetzt werden (siehe **8.2 Interne Kontrolle**).

8.2 Interne Kontrolle

Es wird eine *Interne Kontrolle (HSV TM IC)* mitgeliefert. Mit dieser haben Sie die Möglichkeit, **sowohl die Aufreinigung der DNA als auch eine mögliche Inhibition der PCR** zu kontrollieren (siehe Abb. 1). Bei der Verwendung des **EZ1 DSP Virus Kits** muss die *Interne Kontrolle* gemäß den Angaben im *EZ1 DSP Virus Kit Handbuch* eingesetzt werden. Beim **QIAamp UltraSensVirus Kit** oder dem **QIAamp DNA Mini Kit**, geben Sie die *Interne Kontrolle* in einem Verhältnis von 0,1 µl pro 1 µl Elutionsvolumen zur Aufreinigung hinzu. Verwenden Sie beispielsweise den QIAamp DNA Mini Kit und eluieren die DNA in 50 µl AE-Puffer, dann setzen Sie bitte 5 µl der *Internen Kontrolle* ein. Die Menge der eingesetzten *Internen Kontrolle* ist **nur** abhängig vom Elutionsvolumen. Die *Interne Kontrolle* und Carrier-RNA (siehe

8.1 DNA-Isolierung) dürfen nur zugesetzt werden zum

- Gemisch aus Lysispuffer und Probenmaterial oder
- direkt zum Lysispuffer.

Die *Interne Kontrolle* darf nicht direkt zum Probenmaterial gegeben werden. Bei Zugabe zum Lysispuffer ist zu beachten, dass das Gemisch aus *Interner Kontrolle* und Lysispuffer/Carrier-RNA frisch angesetzt werden muss und sofort einzusetzen ist (Lagerung des Gemischs bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank kann bereits nach wenigen Stunden zum Ausfall der *Internen Kontrolle* und zu einer Verminderung der Aufreinigungseffizienz führen). Pipettieren Sie die *Interne Kontrolle* und die Carrier-RNA **nicht** direkt zum Probenmaterial.

Optional kann die *Interne Kontrolle* **ausschließlich zur Kontrolle einer möglichen PCR-Inhibition** verwendet werden (siehe Abb. 2). Hierfür geben Sie pro Ansatz 2 µl der *Internen Kontrolle* und 10 µl *HSV TM Mg-Sol* direkt zu 20 µl *HSV TM Master* hinzu. Verwenden Sie für jede PCR-Reaktion 30 µl des

so hergestellten *Master Mixes** und fügen Sie anschließend 20 μ l der aufgereinigten Probe hinzu. Sollten Sie einen Lauf für mehrere Proben ansetzen, so erhöhen Sie die benötigten Mengen des *HSV TM Masters*, der *HSV TM Mg-Sol* und der *Internen Kontrolle* entsprechend der Probenzahl (siehe **8.4 Vorbereitung der PCR**).

* Die durch die Zugabe der *Internen Kontrolle* bedingte Volumenerhöhung wird beim Ansetzen der PCR-Reaktion vernachlässigt. Die Sensitivität des Nachweissystems wird nicht beeinträchtigt.

8.3 Quantifizierung

Die mitgelieferten *Quantifizierungsstandards* (HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4) werden wie eine bereits aufgereinigte Probe behandelt und im gleichen Volumen eingesetzt (20 µl). Um in einem *ABI PRISM Sequence Detection System* eine Standardkurve zu erstellen, setzen Sie bitte sowohl für HSV-1 als auch für HSV-2 alle vier mitgelieferten *Quantifizierungsstandards* ein und definieren Sie diese als Standards unter Angabe der entsprechenden Konzentrationen (siehe **8.5 Programmierung der ABI PRISM SDS**). Der Import von Standardkurven aus vorangegangenen Läufen ist mit der *ABI PRISM 7000* und *7900HT SDS* Software nicht möglich.

Beachte: Die *Quantifizierungsstandards* sind definiert als Kopien/µl. Zur Umrechnung der anhand der Standardkurve ermittelten Werte in Kopien/ml Probenmaterial ist folgende Formel anzuwenden:

Ergebnis (Kopien/ml)	=	$\frac{\text{Ergebnis (Kopien/}\mu\text{l)} \times \text{Elutionsvolumen (}\mu\text{l)}}{\text{Probenvolumen (ml)}}$
----------------------	---	--

Bitte beachten Sie, dass grundsätzlich das ursprüngliche Probenvolumen in die o. g. Formel einzusetzen ist. Das ist zu berücksichtigen, wenn das Probenvolumen vor der Nukleinsäure-Aufreinigung verändert worden ist (z. B. Einengung durch Zentrifugation oder Erhöhung durch Auffüllen auf das für die Aufreinigung geforderte Volumen).

Wichtig: Zur Vereinfachung der quantitativen Auswertung von *artus*- Systemen am *ABI PRISM 7000 SDS* gibt es unter www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX einen Leitfaden (**Technical Note zur Quantifizierung am ABI PRISM 7000 SDS**).

8.4 Vorbereitung der PCR

Stellen Sie die für die geplanten Reaktionen erforderliche Anzahl an Reaktionsgefäßen bzw. eine 96-well Reaktionsplatte bereit. In der nachfolgenden Tabelle sind empfohlene Materialien aufgeführt:

Artikel	Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller	Halte-rahmen*	Kompressionsmatte
96-well optische Reaktionsplatte	96-Well Optical Reaction Plate	4 306 737	Applied Biosystems	nein	-
Optische Klebefolien	Optical Adhesive Covers	4 311 971	Applied Biosystems	-	ja
Optische Reaktionsgefäße	ABI PRISM Optical Tubes, 8 Tubes/Strip	4 316 567	Applied Biosystems	ja	-
Optische Reaktionsgefäße	MicroAmp® Optical Tubes	N8010933	Applied Biosystems	ja	-
Optische Deckel (flach)	ABI PRISM Optical Caps, 8	4 323 032	Applied Biosystems	-	nein

Beachten Sie beim Ansetzen der PCR, dass pro PCR-Lauf mindestens ein *Quantifizierungsstandard* sowie eine Negativkontrolle (*Water, PCR grade*) mitgeführt werden. Zur Erstellung einer Standardkurve nutzen Sie pro PCR-Lauf bitte alle mitgelieferten *Quantifizierungsstandards* (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*). Alle Reagenzien sollten vor Testbeginn vollständig bei Raumtemperatur aufgetaut, gut durchmischt (mehrfaches Auf- und Abpipettieren oder kurzes Vortexen) und anschließend anzentrifugiert werden.

Wollen Sie mit der *Internen Kontrolle* sowohl die **Aufreinigung der DNA als auch eine mögliche Inhibition der PCR** kontrollieren, so muss zuvor die *Interne Kontrolle* zur Aufreinigung zugegeben werden (siehe **8.2 Interne**

* Bei der Benutzung des zweiteiligen Halterahmens ist es notwendig, die Reaktionsgefäße beim Einsetzen und beim Herausnehmen zu öffnen. Zur Vermeidung von dadurch bedingten Kontaminationen benutzen Sie bitte ausschließlich den unteren Teil des Halterahmens.

Kontrolle). Verwenden Sie in diesem Fall folgendes Pipettierschema (siehe auch schematische Übersicht in Abb. 1):

		Anzahl der Proben	
		1	12
1. Ansetzen des Master Mixes	HSV TM Master	20 μ l	240 μ l
	HSV TM Mg-Sol	10 μ l	120 μ l
	HSV TM IC	0 μ l	0 μ l
	Gesamtvolumen	30 μl	360 μl
2. Ansetzen der PCR-Reaktion	Master Mix	30 μ l	je 30 μ l
	Probe	20 μ l	je 20 μ l
	Gesamtvolumen	50 μl	je 50 μl

Wollen Sie die *Interne Kontrolle* **ausschließlich zur Kontrolle einer PCR-Inhibition** einsetzen, so muss sie direkt zum *HSV TM Master* zugesetzt werden. In diesem Fall verwenden Sie folgendes Pipettierschema (siehe auch schematische Übersicht in Abb. 2):

		Anzahl der Proben	
		1	12
1. Ansetzen des Master Mixes	HSV TM Master	20 μ l	240 μ l
	HSV TM Mg-Sol	10 μ l	120 μ l
	HSV TM IC	2 μ l	24 μ l
	Gesamtvolumen	32 μl*	384 μl*
2. Ansetzen der PCR-Reaktion	Master Mix	30 μ l*	je 30 μ l*
	Probe	20 μ l	je 20 μ l
	Gesamtvolumen	50 μl	je 50 μl

Pipettieren Sie in jedes Reaktionsgefäß bzw. in jede benötigte Vertiefung der 96-well Reaktionsplatte 30 μ l des Master Mixes. Anschließend geben Sie 20 μ l des Eluats aus der DNA-Isolierung hinzu. Achten Sie darauf, dass die beiden Lösungen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gut durchmischt werden. Verschließen Sie die Reaktionsgefäße mit den dazugehörigen Deckeln bzw. bei Benutzung einer 96-well Reaktionsplatte alternativ mit Hilfe optischer Klebefolien (*Optical Adhesive Covers*). Um das Ansatzvolumen im

* Die durch die Zugabe der *Internen Kontrolle* bedingte Volumenerhöhung wird beim Ansetzen der PCR-Reaktion vernachlässigt. Die Sensitivität des Nachweissystems wird nicht beeinträchtigt.

Röhrchen- bzw. Plattenboden zu sammeln, zentrifugieren Sie die Reaktionsgefäße (in einem für PCR-Röhrchen vorgesehenen Aufbewahrungsrack) bzw. die 96-well Reaktionsplatte in einer Zentrifuge mit Mikrotiterplattenrotor für 30 Sekunden bei 1.780 x g (4.000 Upm). Sollten Sie nicht über eine solche Zentrifuge verfügen, so achten Sie beim Ansetzen der PCR-Reaktionen bitte darauf, sowohl den Master Mix als auch das Probenvolumen auf den Boden der Reaktionsgefäße bzw. der Reaktionseinheiten (well) zu pipettieren. Lagern Sie die Reaktionsansätze bei +4°C, bis das *ABI PRISM*[®] SDS Instrument programmiert ist (siehe **8.3 Programmierung der *ABI PRISM* SDS**) und überführen Sie diese anschließend in das Gerät.

Beachte:

- Setzen Sie bei Nutzung von optischen Reaktionsgefäßen in Kombination mit optischen Deckeln bitte stets einen Halterahmen (*96-Well Tray/Retainer Set*) in das Instrument (*ABI PRISM 7000* und *7900HT SDS*) ein. Bei der Benutzung des zweiteiligen Halterahmens ist es notwendig, die Reaktionsgefäße beim Einsetzen und beim Herausnehmen zu öffnen. Zur Vermeidung von dadurch bedingten Kontaminationen benutzen Sie bitte ausschließlich den unteren Teil des Halterahmens.
- Die Benutzung von 96-well optischen Reaktionsplatten in Kombination mit optischen Klebefolien erfordert das Auflegen einer Kompressionsmatte (*Optical Cover Compression Pads*).

Zugabe der Internen Kontrolle zur Aufreinigung

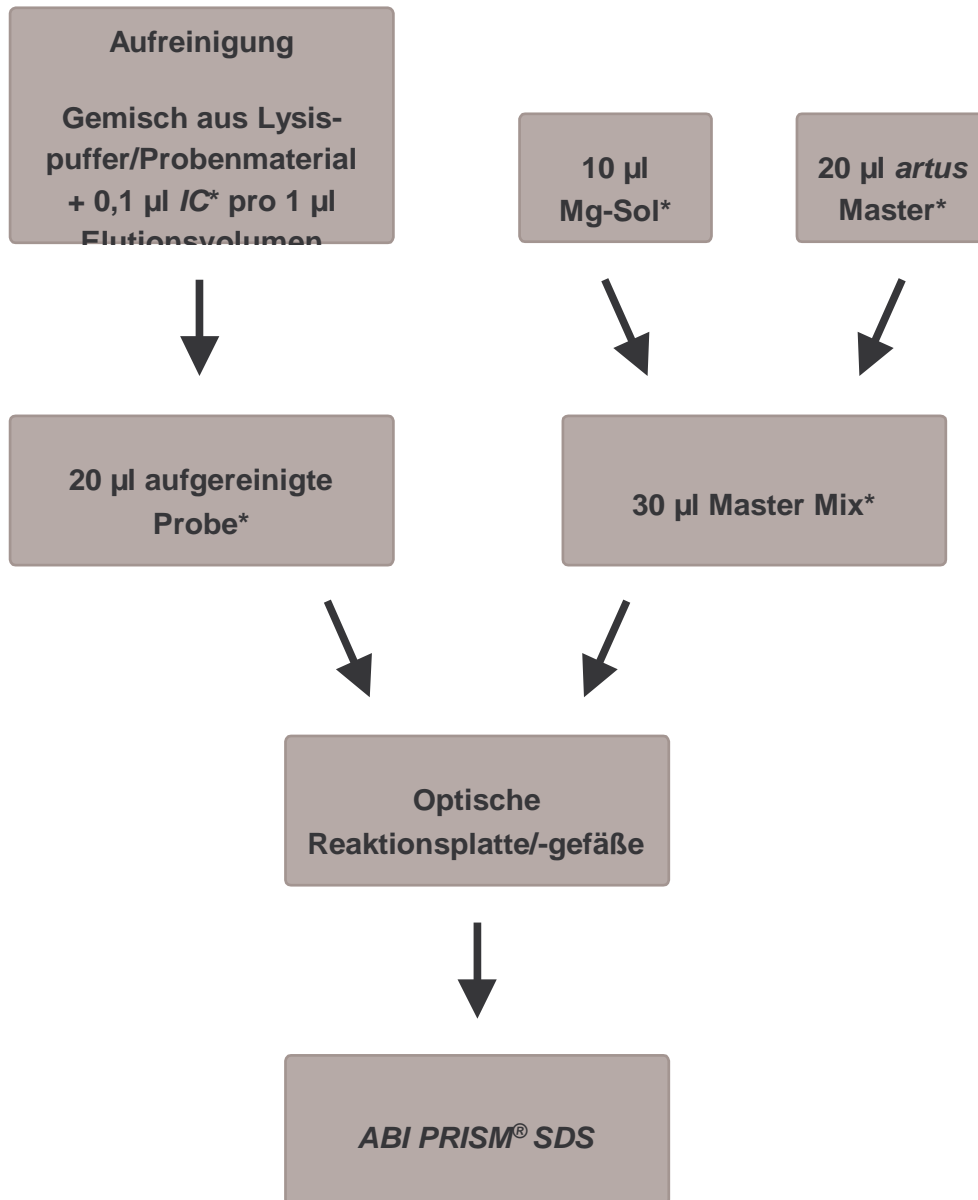


Abb. 1: Schematischer Arbeitsablauf zur Kontrolle von Aufreinigung und PCR-Inhibition.

*

Bei jedem Pipettierschritt ist unbedingt darauf zu achten, dass die zu verwendenden Lösungen vollständig aufgetaut, gut durchmischt und kurz zentrifugiert sind.

Zugabe der Internen Kontrolle zum artus Master

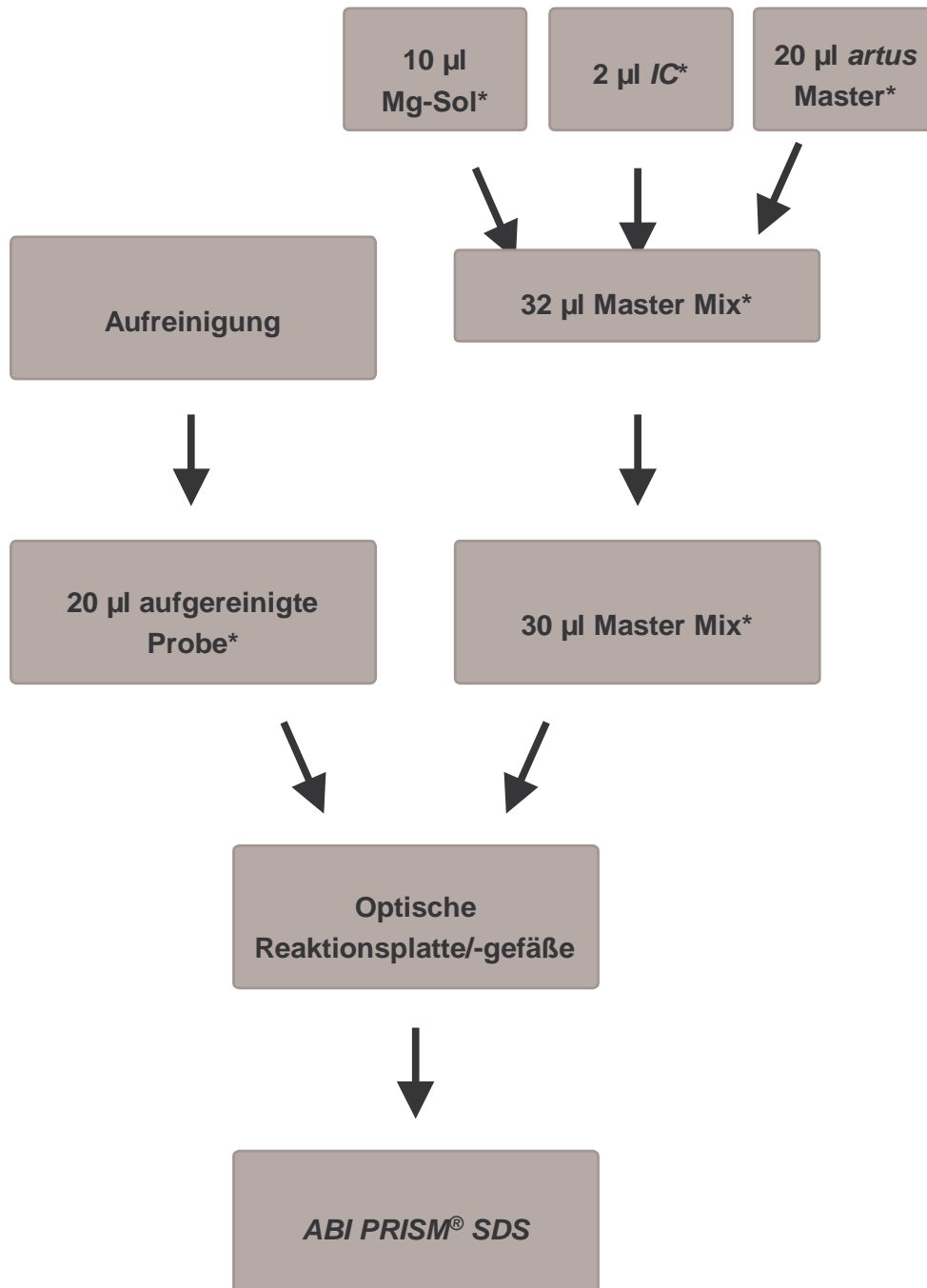


Abb. 2: Schematischer Arbeitsablauf zur Kontrolle der PCR-Inhibition.

* Bei jedem Pipettierschritt ist unbedingt darauf zu achten, dass die zu verwendenden Lösungen vollständig aufgetaut, gut durchmischt und kurz zentrifugiert sind.

8.5 Programmierung der ABI PRISM SDS

Die Software der ABI PRISM[®] 7000 und 7900HT Sequence Detection Systems (SDS) benötigt vor dem Starten des PCR-Laufs einige Zusatzinformationen. Die Vorgehensweise bei der Programmierung der Geräte weicht allerdings erheblich voneinander ab, weshalb diese im Folgenden in getrennten Kapiteln behandelt werden.

8.5.1 Programmierung des ABI PRISM 7000 SDS

Zur Detektion von HSV-DNA erstellen Sie auf Ihrem ABI PRISM 7000 SDS ein Profil gemäß den folgenden sechs Arbeitsschritten (8.5.1.1 – 8.5.1.6). Alle Angaben beziehen sich auf die ABI PRISM 7000 SDS Software-Version 1.0.1. Einzelheiten zur Programmierung des ABI PRISM 7000 SDS entnehmen Sie bitte dem ABI PRISM 7000 SDS User Guide. Zur besseren Übersicht sind die Einstellungen in den Abbildungen durch schwarze Rahmen hervorgehoben.

8.5.1.1 Voreinstellungen bei der Erstellung eines neuen PCR-Laufs

Wählen Sie auf dem ABI PRISM 7000 SDS den unter *File* befindlichen Menüpunkt *New* an und stellen Sie für das neue Dokument die folgenden Grundeinstellungen ein (siehe Abb. 3). Ein zuvor abgespeichertes Template (SDS Template [*.sdt]) steht Ihnen in der *Template*-Liste oder durch Auswahl mittels *Browse*-Funktion zur Verfügung (siehe 8.5.1.5 Speichern des PCR-Laufs). Bestätigen Sie Ihre Eingaben (OK).

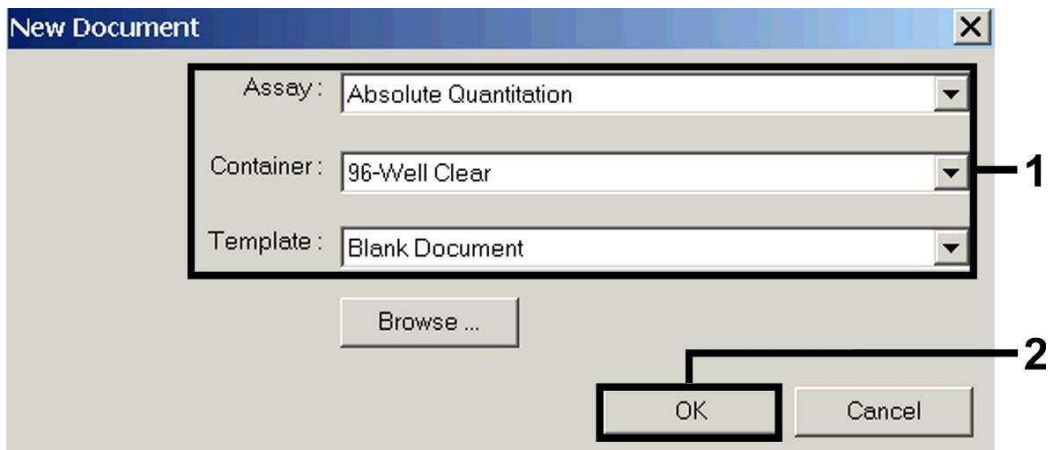


Abb. 3: Voreinstellungen bei der Erstellung eines neuen PCR-Laufs (*New Document*).

8.5.1.2 Erstellung/Auswahl der Detektoren

Mit Hilfe des unter *Tools* befindlichen Untermenüs *Detector Manager* ordnen Sie dem Dokument die entsprechenden Detektorfarbstoffe zu. Zum Nachweis von HSV-DNA sowie der *Internen Kontrolle* mit Hilfe des *artus HSV- 1/2 TM PCR Kits* sind die in der folgenden Tabelle angegebenen Reporter/Quencher zu definieren:

Nachweis	Reporter	Quencher
HSV-1-DNA	FAM	none
HSV-2-DNA	NED	none
<i>Interne Kontrolle (HSV TMIC)</i>	VIC	none

Zur Erstellung dieser Detektoren wählen Sie die im *Detector Manager* links unten lokalisierte Option *File* und anschließend die Option *New* an.

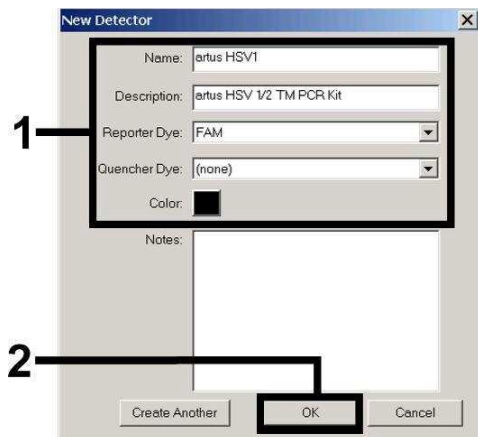


Abb. 4: Erstellung des HSV-1-spezifischen Detektors (*Detector Manager*).

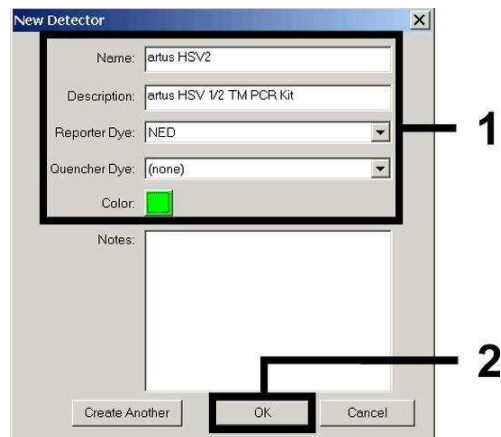


Abb. 5: Erstellung des HSV-2-spezifischen Detektors (*Detector Manager*).

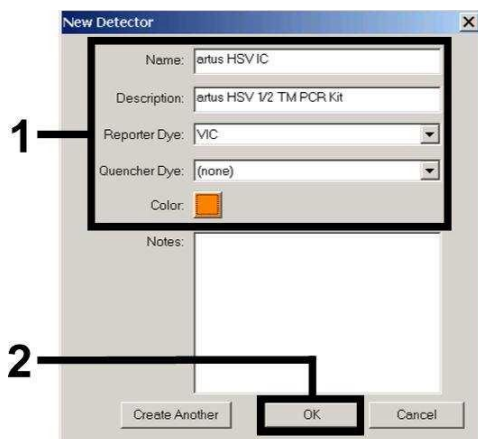


Abb. 6: Erstellung des IC-spezifischen Detektors (*Detector Manager*) bei HSV-1/HSV-2.

In dem nun erscheinenden Fenster definieren Sie (entsprechend Abb. 4 - Abb. 6) zum Nachweis von HSV-1-DNA bzw. HSV-2-DNA die Reporter/Quencher-Kombination **FAM/none** bzw. **NED/none**, zum Nachweis der *Internen Kontrolle* wählen Sie die Kombination **VIC/none** aus. Durch die Bestätigung der Eingaben (OK) kehren Sie zurück zum *Detector Manager*. Markieren Sie die soeben erstellten Detektoren und transferieren Sie jede Auswahl durch Anklicken der Option *Add to Plate Document* zum *Well Inspector* (siehe Abb. 7). Schließen Sie das Fenster (*Done*).

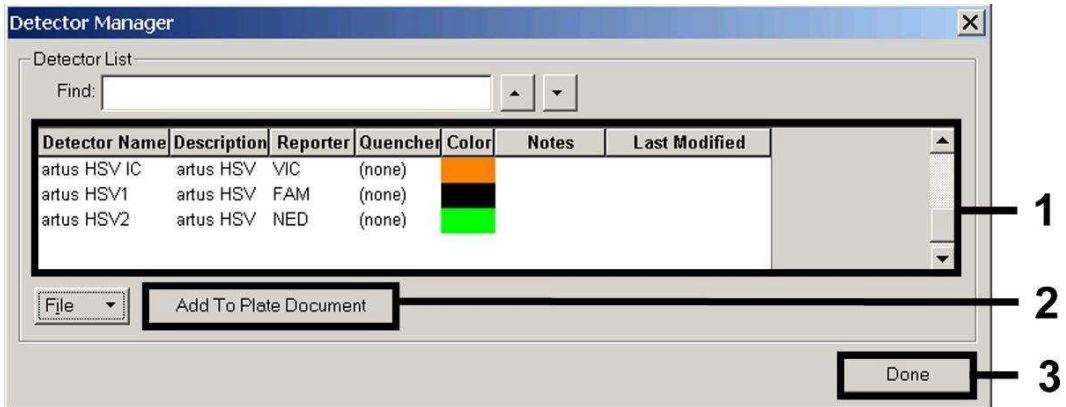


Abb. 7: Auswahl der Detektoren (*Detector Manager*).

8.5.1.3 Zuordnung der notwendigen Informationen zu den Plattenpositionen

Öffnen Sie nun die unter *View* befindliche Option *Well Inspector*, so finden Sie dort die von Ihnen unter 8.5.1.2 ausgewählten Detektoren wieder (siehe Abb. 8 - Abb. 9).

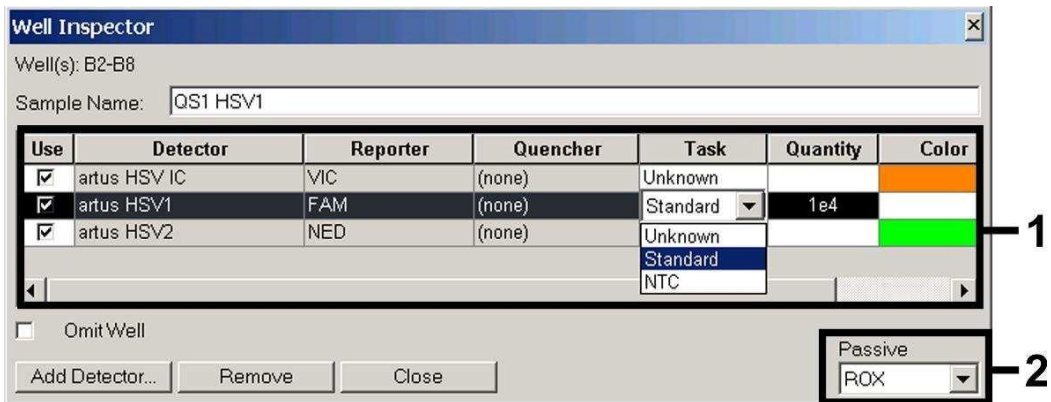


Abb. 8: Zuordnung der notwendigen Informationen (HSV-1) zu den Plattenpositionen (*Well Inspector*).

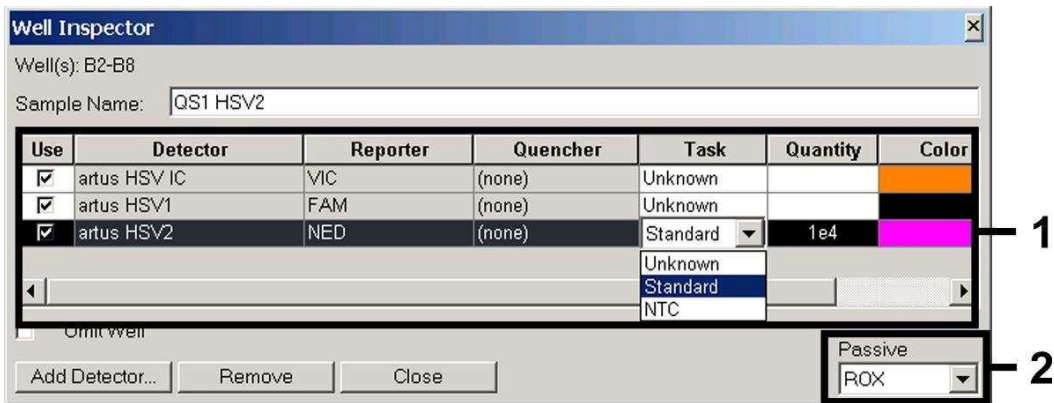


Abb. 9: Zuordnung der notwendigen Informationen (HSV-2) zu den Plattenpositionen (Well Inspector).

Markieren Sie die für den Nachweis von HSV-DNA belegten Positionen der Platte. Ordnen Sie diesen Positionen die ausgewählten Detektoren zu, indem Sie die *Use*-Option aller drei Detektoren aktivieren. Es erscheint dort ein Häkchen. Zur Benennung der einzelnen Reaktionsansätze wählen Sie die entsprechende Position auf der Platte an und tragen Sie den Namen unter *Sample Name* ein. Bedenken Sie dabei, dass Ansätze mit identischem *Sample Name* und identischer Detektorzuweisung von der Software als Replikat identifiziert und hinsichtlich ihrer quantifizierten Erregerlast gemittelt werden. Wählen Sie dann für jeden Probenotyp die entsprechende Funktion (*Task*) gemäß der folgenden Tabelle aus:

Probenotyp	Funktion (<i>Task</i>)	Konzentration (<i>Quantity</i>)	Reporter HSV-1	Reporter HSV-2	Quencher
Probe	Unknown	-	FAM	NED	none
Negativkontrolle	NTC	-	FAM	NED	none
Standard	Standard	siehe 1. Inhalt	FAM	NED	none

Zur Erstellung einer Standardkurve nutzen Sie pro PCR-Lauf alle mitgelieferten *Quantifizierungsstandards* (HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4) und geben die zugehörigen Konzentrationen (siehe 1. Inhalt) für jeden einzelnen Standard ein (*Quantity*). Achten Sie darauf, dass

für einen PCR-Lauf mit dem *artus HSV-1/2 TM PCR Kit ROX* als Passive Referenz (*Passive Reference*) eingestellt sein muss. Die gleichmäßige Verteilung des ROX-Farbstoffs auf alle PCR-Ansätze einer Lot mittels Durchmischung des *HSV TM Masters* gewährleistet das Erkennen und Verrechnen von *tube-to-tube* Variationen (Fluoreszenzunterschiede zwischen verschiedenen PCR-Ansätzen) durch die *Sequence Detection Software* (Normalisierung).

8.5.1.4 Erstellung des Temperaturprofils

Zur Eingabe des Temperaturprofils wechseln Sie in der Software bitte von der *Setup*-Ebene auf die *Instrument*-Ebene. Geben Sie entsprechend Abb. 10 das für die Detektion von HSV-DNA gültige Temperaturprofil ein. Zum Entfernen des in den Voreinstellungen gespeicherten 50°C-Schritts markieren Sie diesen bitte mit Hilfe der linken Maustaste unter gleichzeitigem Halten der *Shift*-Taste und löschen Sie ihn anschließend unter Benutzung der *Backspace*-Taste. Kontrollieren Sie, dass das Reaktionsvolumen auf 50 µl eingestellt ist. Die Option *9600 Emulation* sollte aktiviert sein, die Voreinstellungen des *Auto Increments* unverändert bleiben (*Auto Increment*: 0.0°C, 0.0 Seconds).

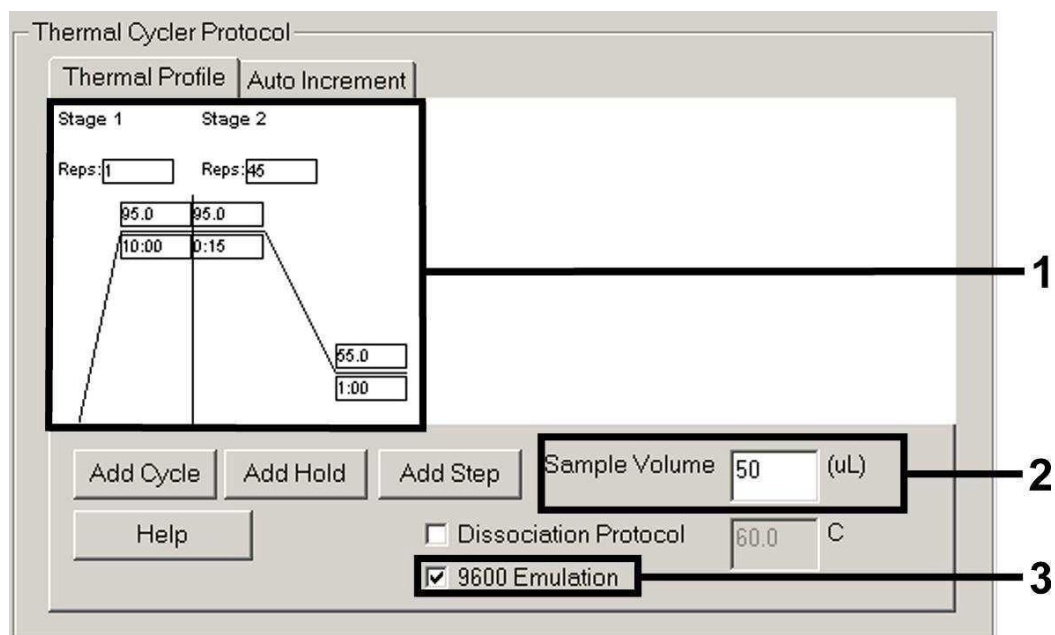


Abb. 10: Erstellung des Temperaturprofils.

8.5.1.5 Speichern des PCR-Laufs

An dieser Stelle können Sie die eingegebenen Einstellungen (*Setup*) als Maske abspeichern, um sie für spätere Anwendungen in veränderter oder unveränderter Form erneut zu nutzen. Durch das Abspeichern der Einstellungen als *SDS Template (*.sdt)* in dem Ordner *Template Directory* (Lokales Laufwerk [C:]*Program Files\ABI PRISM 7000\Templates*, angelegt von Applied Biosystems) ist diese Datei aus der *Template* Drop-down-Liste in dem *New Document*-Fenster direkt anwählbar. In anderen Ordnern gesicherte Vorlagen müssen über *Browse* geöffnet werden. Vor dem Starten des PCR-Laufs achten Sie bitte darauf, diesen erneut als *SDS Document (*.sds)* abzuspeichern. Damit stellen Sie die Speicherung der sich im Verlauf der PCR ansammelnden Daten sicher.

8.5.1.6 Starten des PCR-Laufs

Starten Sie den PCR-Lauf durch Anwählen der Option *Start* unter dem Menüpunkt *Instrument* oder des Feldes *Start* auf der *Instrument*-Ebene.

8.5.2 Programmierung des ABI PRISM 7900HT SDS

Zur Detektion von HSV-DNA erstellen Sie auf Ihrem *ABI PRISM 7900HT SDS* ein Profil gemäß den folgenden sechs Arbeitsschritten (8.5.2.1 - 8.5.2.6). Alle Angaben beziehen sich auf die *ABI PRISM 7900HT SDS* Software- Version 2.1. Einzelheiten zur Programmierung des *ABI PRISM 7900HT SDS* entnehmen Sie bitte dem *ABI PRISM 7900HT SDS User Guide*. Zur besseren Übersicht sind die vorzunehmenden Einstellungen in den Abbildungen durch schwarze Rahmen hervorgehoben.

8.5.2.1 Voreinstellungen bei der Erstellung eines neuen PCR-Laufs

Wählen Sie auf dem *ABI PRISM 7900HT SDS* den unter *File* befindlichen Menüpunkt *New* an und stellen Sie für das neue Dokument die folgenden Grundeinstellungen ein (siehe Abb. 11). Ein zuvor abgespeichertes Template (*ABI PRISM SDS Template Document (*.sdt)*) steht Ihnen in der *Template*- Liste

oder durch Auswahl mittels *Browse*-Funktion zur Verfügung (siehe **8.5.2.5 Speichern des PCR-Laufs**). Bestätigen Sie Ihre Eingaben (OK).

Beachte: Der *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* kann nicht in Verbindung mit dem 384er Plattenformat des *ABI PRISM 7900HT SDS* angewendet werden.

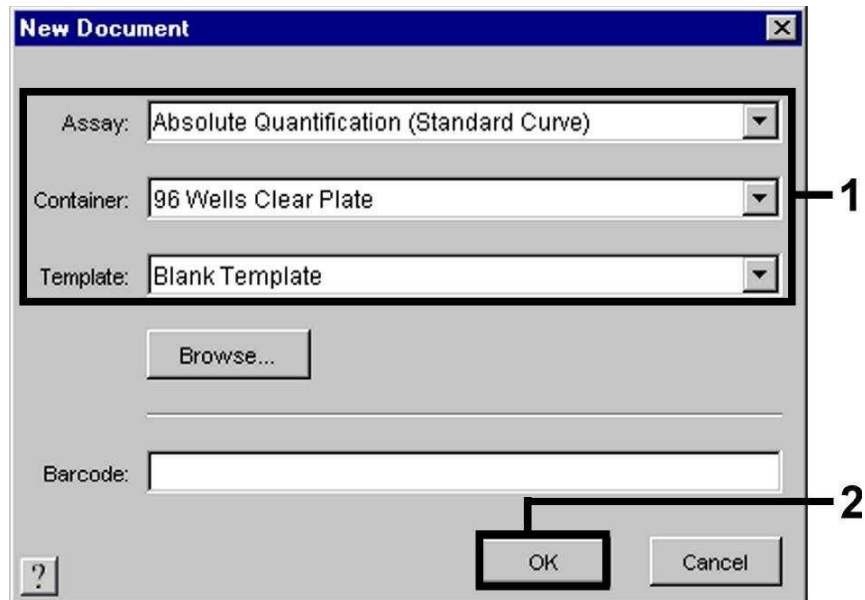


Abb. 11: Voreinstellungen bei der Erstellung eines neuen PCR-Laufs (*New Document*).

8.5.2.2 Erstellung/Auswahl der Detektoren

Mit Hilfe des unter *Tools* befindlichen Untermenüs *Detector Manager* (alternativ: *Setup*-Ebene/*Add Detector*-Funktion anwählen) ordnen Sie dem Dokument die entsprechenden Detektorfarbstoffe zu. Zum Nachweis von HSV-DNA sowie der *Internen Kontrolle* mit Hilfe des *artus HSV- 1/2 TM PCR Kits* sind die in der folgenden Tabelle angegebenen Reporter/Quencher zu definieren:

Nachweis	Reporter	Quencher
HSV-1-DNA	FAM	Non Fluorescent
HSV-2-DNA	NED	Non Fluorescent
<i>Interne Kontrolle (HSV TMIC)</i>	VIC	Non Fluorescent

Zur Erstellung dieser Detektoren wählen Sie die im *Detector Manager* links unten lokalisierte Option *New* an.

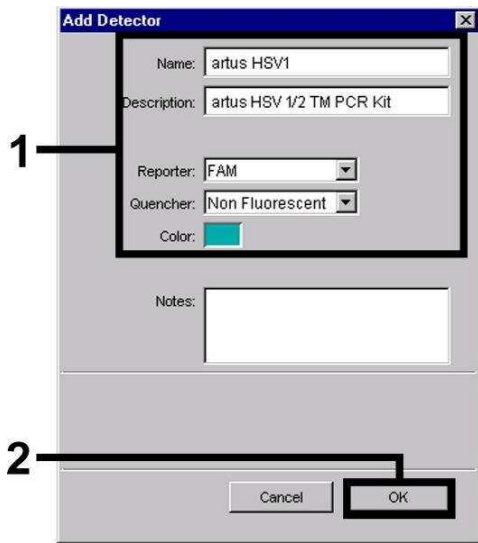


Abb. 12: Erstellung des HSV-1-spezifischen Detektors (*Detector Manager*).

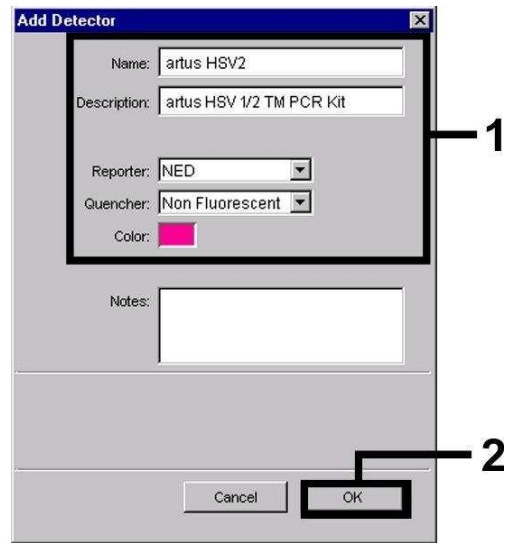


Abb. 13: Erstellung des HSV-2-spezifischen Detektors (*Detector Manager*).

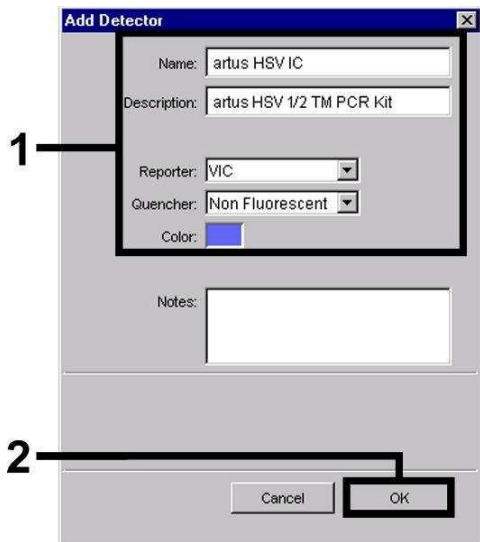


Abb. 14: Erstellung des IC-spezifischen Detektors (*Detector Manager*) für HSV-1/HSV-2.

In dem nun erscheinenden Fenster definieren Sie (entsprechend Abb. 12 - Abb. 14) zum Nachweis von HSV-1-DNA bzw. HSV-2-DNA die Reporter/Quencher-Kombination **FAM/Non Fluorescent** bzw. **NED/Non Fluorescent**, zum Nachweis der *Internen Kontrolle* wählen Sie die Kombination **VIC/Non Fluorescent** aus. Durch die Bestätigung der Eingaben (OK) kehren Sie zurück zum *Detector Manager*. Markieren Sie die soeben erstellten Detektoren und transferieren Sie jede Auswahl durch Anklicken der Option *Copy to Plate Document* zur *Setup-Ebene* (siehe Abb. 15). Schließen Sie das Fenster (*Done*).

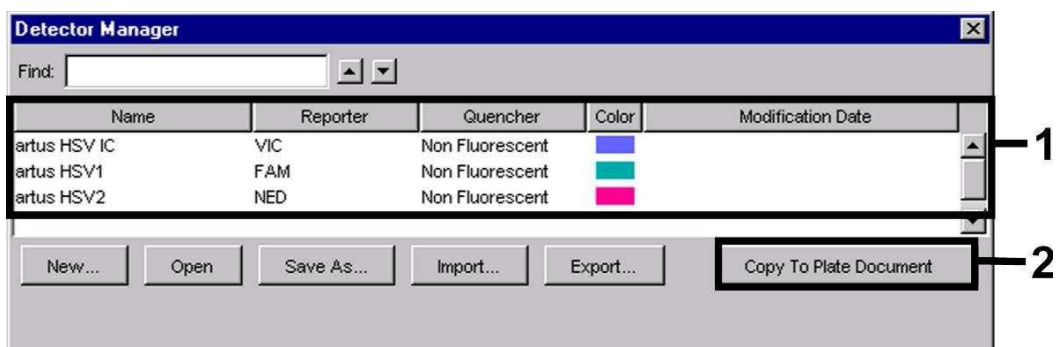


Abb. 15: Auswahl der Detektoren (*Detector Manager*).

8.5.2.3 Zuordnung der notwendigen Informationen zu den Platten-Positionen

Nach dem Schließen des *Detector Managers (Done)* finden Sie die von Ihnen unter 8.5.2.2 ausgewählten Detektoren auf der *Setup-Ebene (Well Inspector)* tabellarisch gelistet wieder (siehe Abb. 16 - Abb. 17).

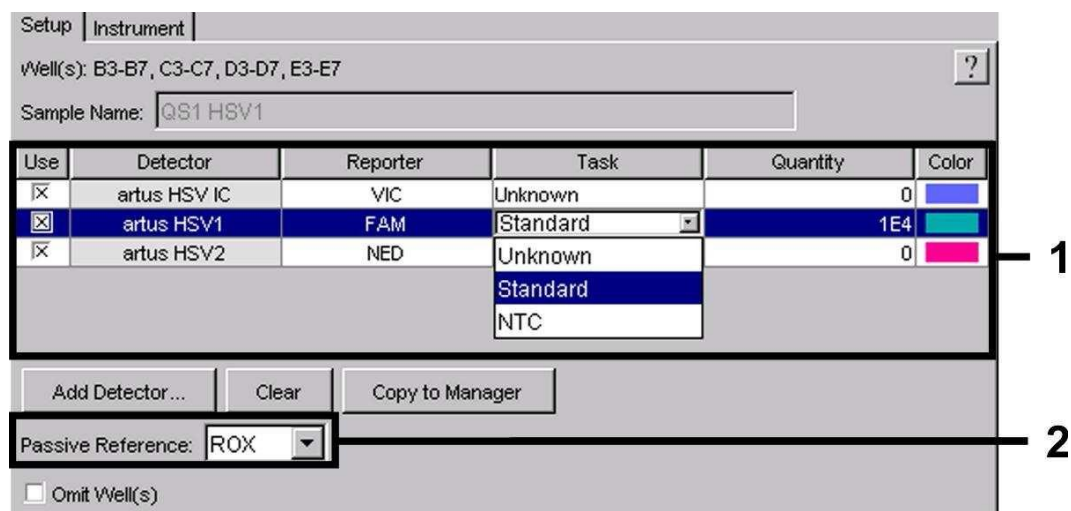


Abb. 16: Zuordnung der notwendigen Informationen (HSV-1) zu den Plattenpositionen.

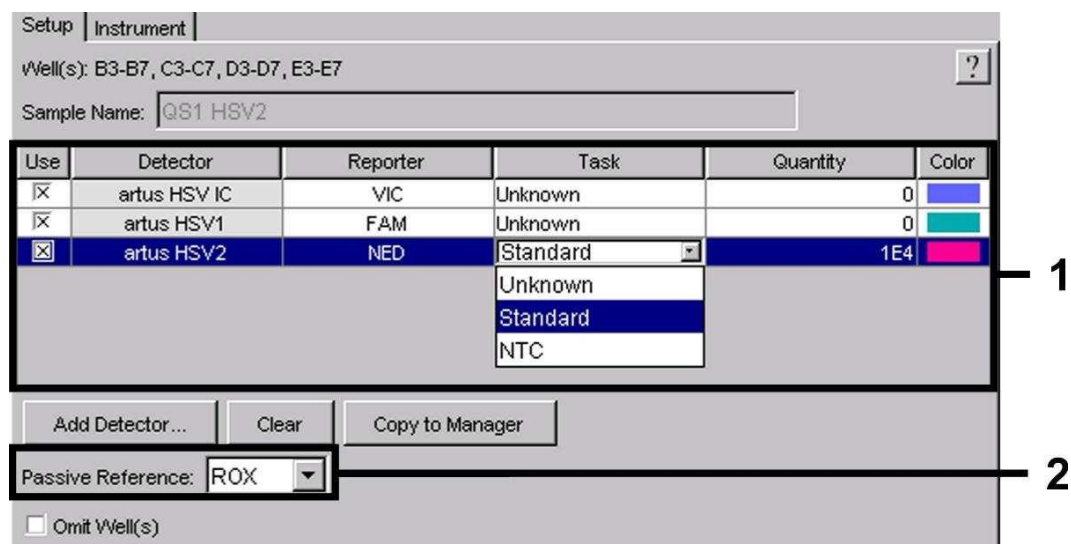


Abb. 17: Zuordnung der notwendigen Informationen (HSV-2) zu den Plattenpositionen.

Markieren Sie die für den Nachweis von HSV-DNA belegten Positionen der Platte. Ordnen Sie diesen Positionen die ausgewählten Detektoren zu, indem

Sie die *Use-Option* aller drei Detektoren durch Anklicken aktivieren. Es erscheint dort ein Kreuz. Zur Benennung der einzelnen Reaktionsansätze wählen Sie die entsprechende Position auf der Platte an und tragen Sie den Namen unter *Sample Name* ein. Bedenken Sie dabei, dass Ansätze mit identischem *Sample Name* und identischer Detektorzuweisung von der Software als Replikat identifiziert und hinsichtlich ihrer quantifizierten Erregerlast gemittelt werden. Wählen Sie dann für jeden Probenotyp die entsprechende Funktion (*Task*) gemäß der folgenden Tabelle aus:

Probenotyp	Funktion (<i>Task</i>)	Konzentration (<i>Quantity</i>)	Reporter HSV-1	Reporter HSV-2	Quencher
Probe	Unknown	-	FAM	NED	Non Fluorescent
Negativkontrolle	NTC	-	FAM	NED	Non Fluorescent
Standard	Standard	siehe 1. Inhalt	FAM	NED	Non Fluorescent

Zur Erstellung einer Standardkurve nutzen Sie pro PCR-Lauf alle mitgelieferten *Quantifizierungsstandards* (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*) und geben die zugehörigen Konzentrationen (siehe 1. **Inhalt**) für jeden einzelnen Standard ein (*Quantity*). Achten Sie darauf, dass für einen PCR-Lauf mit dem *artus HSV-1/2 TM PCR Kit ROX* als Passive Referenz (*Passive Reference*) eingestellt sein muss. Die gleichmäßige Verteilung des ROX-Farbstoffes auf alle PCR-Ansätze einer Lot mittels Durchmischung des *HSV TM Masters* gewährleistet das Erkennen und Verrechnen von *tube-to-tube* Variationen (Fluoreszenzunterschiede zwischen verschiedenen PCR-Ansätzen) durch die *Sequence Detection Software* (Normalisierung).

8.5.2.4 Erstellung des Temperaturprofils

Zur Eingabe des Temperaturprofils wechseln Sie in der Software bitte von der *Setup-Ebene* auf die *Instrument-Ebene*. Geben Sie entsprechend der Abb. 18

das für die Detektion von HSV-DNA gültige Temperaturprofil ein. Kontrollieren Sie, dass das Reaktionsvolumen auf 50 µl eingestellt ist. Die Option *9600 Emulation* sollte aktiviert sein, die Voreinstellungen der *Ramp*-Zeit und des *Auto Increments* unverändert bleiben (*Ramp Time*: 0:00, *Auto Increment*: 0.0°C, 0.0 Seconds).

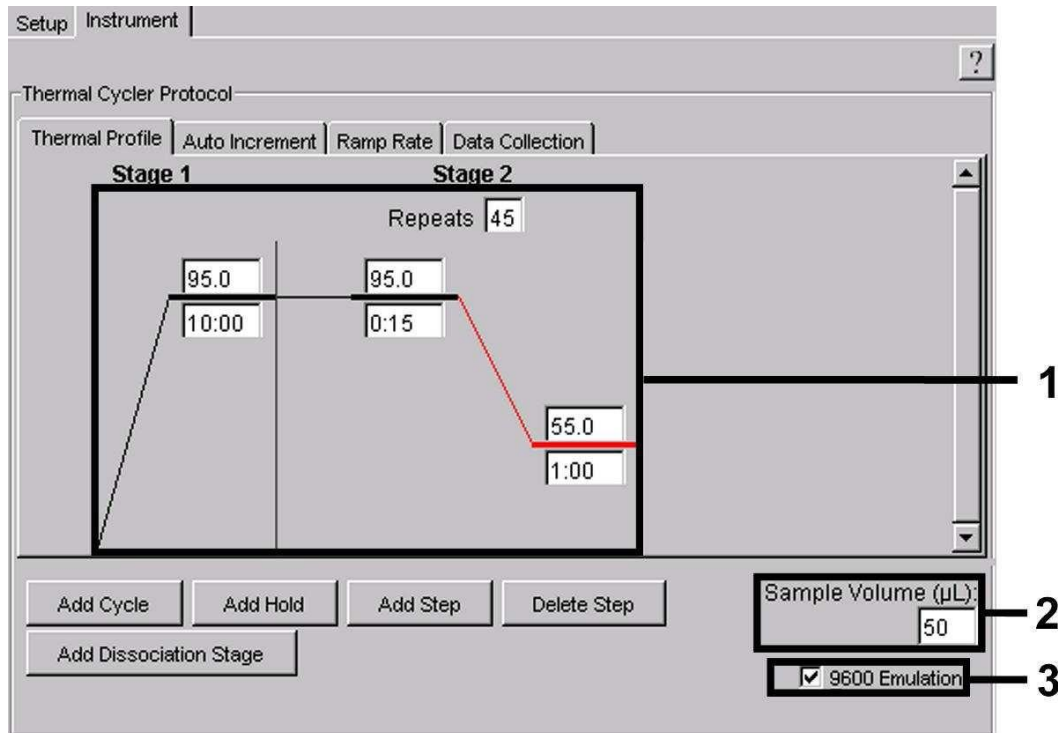


Abb. 18: Erstellung des Temperaturprofils.

Des Weiteren befindet sich auf der *Instrument*-Ebene die Option *Data Collection*. Durch Anwählen dieser Option gelangen Sie in das in Abb. 19 dargestellte Fenster. Jede *Ramp*- und jede *Plateau*-Temperatur ist mit einem Symbol der Datenaufnahme versehen (*Data Collection Icon*), das die Aufnahme der Daten zu diesem Zeitpunkt des Laufes veranschaulicht. Entfernen Sie alle Symbole bis auf das zum Zeitpunkt des *Annealing-Extension*-Schrittes (*Stage2/Step2*), um unnötige Fluoreszenz-Messungen auszusparen. Damit werden Gesamtlaufzeit und Datenmenge so gering wie möglich gehalten.

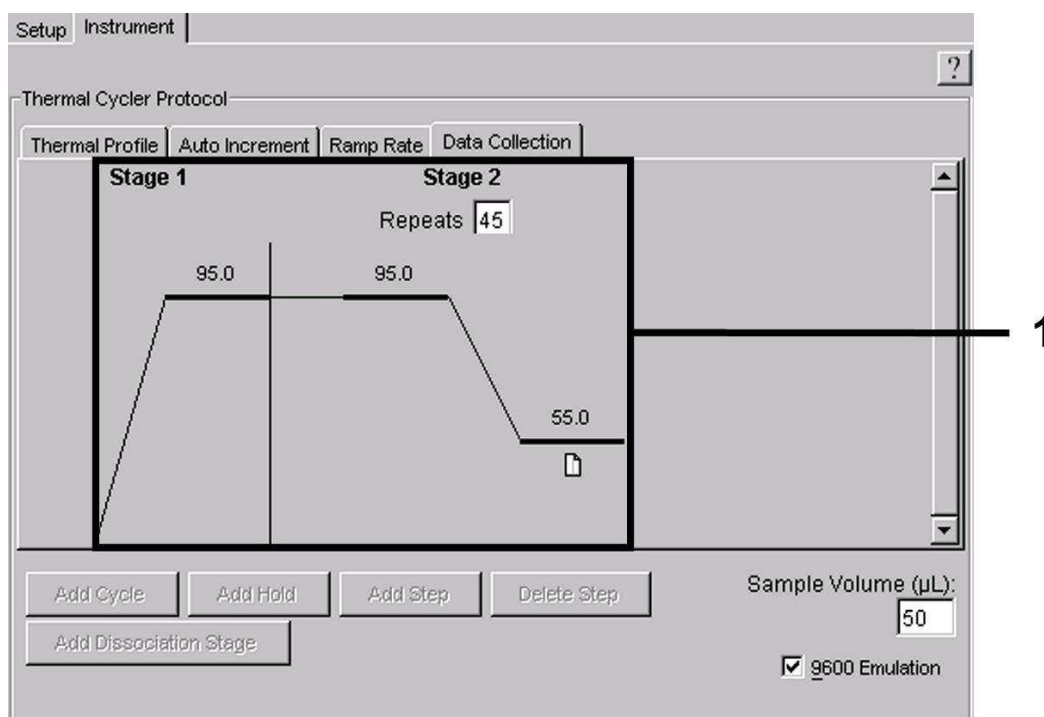


Abb. 19: Datenaufnahme (*Data Collection*).

8.5.2.5 Speichern des PCR-Laufs

An dieser Stelle können Sie die eingegebenen Einstellungen (*Setup*) als Maske abspeichern, um sie für spätere Anwendungen in veränderter oder unveränderter Form erneut zu nutzen. Durch das Abspeichern der Einstellungen als *ABI PRISM SDS Template Document (*.sdt)* in dem Ordner *Template Directory* ([D:]\Program Files\Applied Biosystems\SDS 2.1\Templates, angelegt von Applied Biosystems) ist diese Datei aus der *Template*-Liste in dem *New Document*-Fenster direkt anwählbar. In anderen Ordnern gesicherte Vorlagen müssen über *Browse* geöffnet werden. Vor dem Starten des aktuellen PCR-Laufs achten Sie bitte darauf, diesen erneut als *ABI PRISM SDS Document (*.sds)* abzuspeichern. Damit stellen Sie die Speicherung der sich im Verlauf der PCR ansammelnden Daten sicher.

8.5.2.6 Starten des PCR-Laufs

Starten Sie den PCR-Lauf durch Anwählen der Option *Start* unter dem Menüpunkt *Instrument*.

9. Auswertung

Eine vorliegende, gültige Kalibrierung der Farbstoffe (*Pure Spectra Component File*) und des Hintergrundes (*Background Component File*) ist bei Inbetriebnahme der Geräte unbedingt erforderlich. Diese Kalibrierungsdateien werden wie folgt zur exakten Berechnung der Ergebnisse benötigt:

Sämtliche die Messung beeinflussenden gerätebedingten Störsignale werden von der *Sequence Detection Software* der *ABI PRISM Sequence Detection Systems* mit Hilfe des *Background Component Files* eliminiert.

Zudem treten bei Multicolor-Analysen Interferenzen zwischen den Emissionsspektren der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe auf. Die Software der *ABI PRISM SDS* kompensiert diese Interferenzen durch Verrechnung mit den im *Pure Spectra Component File* gespeicherten Spektraldaten der einzelnen Farbstoffe. Die Zuordnung der im Verlauf der PCR über das gesamte messbare Spektrum gesammelten Fluoreszenzdaten zu den programmierten Detektoren nimmt die Software ebenfalls mit Hilfe der *Pure Spectra Components* vor. Anschließend werden die ermittelten Fluoreszenzdaten der einzelnen Farbstoffe zur Verrechnung von *tube-to-tube* Variationen (Fluoreszenzunterschiede zwischen verschiedenen PCR- Ansätzen) durch das Signal der passiven Referenz (ROX) geteilt. Die auf diese Weise normalisierten Signale können mit Hilfe des *Amplification Plots* ausgewertet werden.

Die bei der Auswertung eines PCR-Laufs genutzten Kalibrierungsdateien werden beim Abspeichern automatisch mitgesichert. Sollten keine **Kalibrierungsdateien** installiert sein, erstellen Sie diese Dateien bitte unter Beachtung der Anleitung im *ABI PRISM SDS User Guide/Manual*.

Sollten Sie mehr als ein *artus*™ PCR-System in Ihren PCR-Lauf integriert haben (**Temperaturprofil beachten**), so analysieren Sie diese Testsysteme bitte getrennt voneinander. Proben mit identischer Bezeichnung (*Sample*

Name) und Detektorzuweisung werden von der *ABI PRISM 7000* und *7900HT SDS Software* automatisch als Replikat identifiziert und hinsichtlich ihrer quantifizierten Erregerlast gemittelt.

Folgende Ergebnisse können auftreten:

1. Ein FAM-Fluoreszenzsignal für HSV-1 bzw. NED-Fluoreszenzsignal für HSV-2 werden detektiert.

Das Ergebnis der Analyse ist positiv: Die Probe enthält HSV-DNA.

In diesem Fall ist die Detektion eines VIC-Fluoreszenzsignals (*Interne Kontrolle*) unwesentlich, da hohe Ausgangskonzentrationen an HSV-DNA (positives FAM-Fluoreszenzsignal für HSV-1 und NED-Fluoreszenzsignal für HSV-2) zu einem reduzierten bis ausbleibenden Fluoreszenz-Signal der *Internen Kontrolle* führen können (Kompetition).

2. Weder ein FAM-Fluoreszenzsignal für HSV-1 noch ein NED-Fluoreszenzsignal für HSV-2 werden detektiert, sondern nur ein VIC-Fluoreszenzsignal (Signal der *Internen Kontrolle*).

In der Probe ist keine HSV-DNA nachweisbar. Sie kann daher als negativ angesehen werden.

Bei negativer HSV-PCR schließt das detektierte Signal der *Internen Kontrolle* die Möglichkeit einer PCR-Inhibition aus.

3. Weder ein FAM-Fluoreszenzsignal für HSV-1 oder ein NED-Fluoreszenzsignal für HSV-2 noch ein VIC-Fluoreszenzsignal werden detektiert.

Eine diagnostische Aussage ist nicht möglich.

Hinweise zu Fehlerquellen und deren Beseitigung sind unter **10. Troubleshooting** aufgeführt.

Beispiele für positive und negative PCR-Reaktionen sind in den Abbildungen 20 - 23 (*ABI PRISM 7000 SDS*) und 24 - 27 (*ABI PRISM 7900HT SDS*) wiedergegeben.

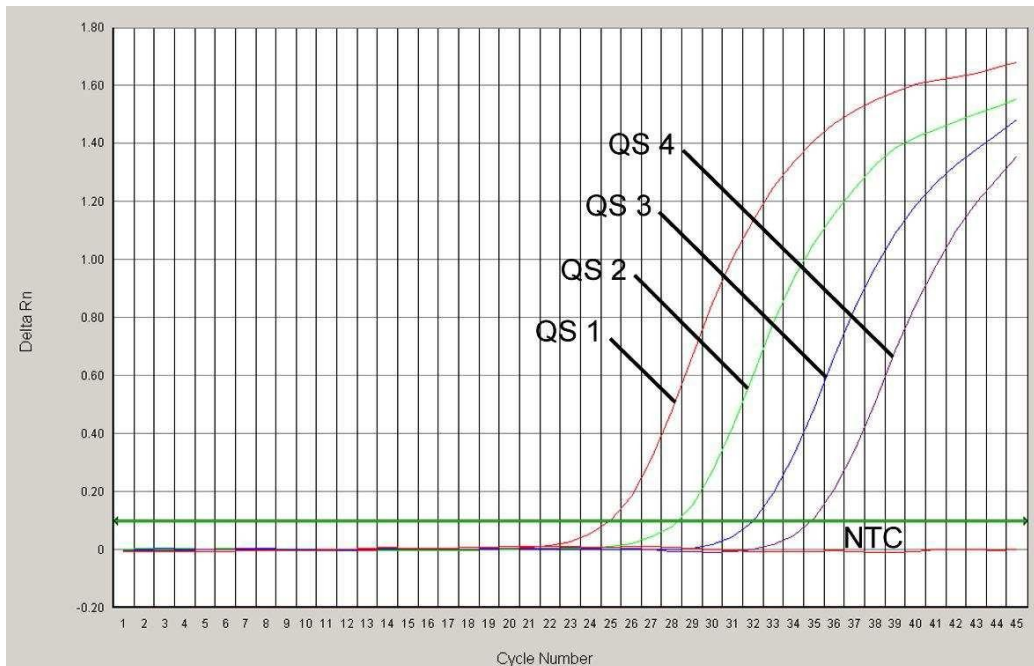


Abb. 20: Nachweis der Quantifizierungsstandards (*HSV1 LC/RG/TM* QS 1 - 4) durch die Detektion eines FAM-Fluoreszenzsignals (*ABI PRISM 7000 SDS*). NTC: non-template control (Negativkontrolle).

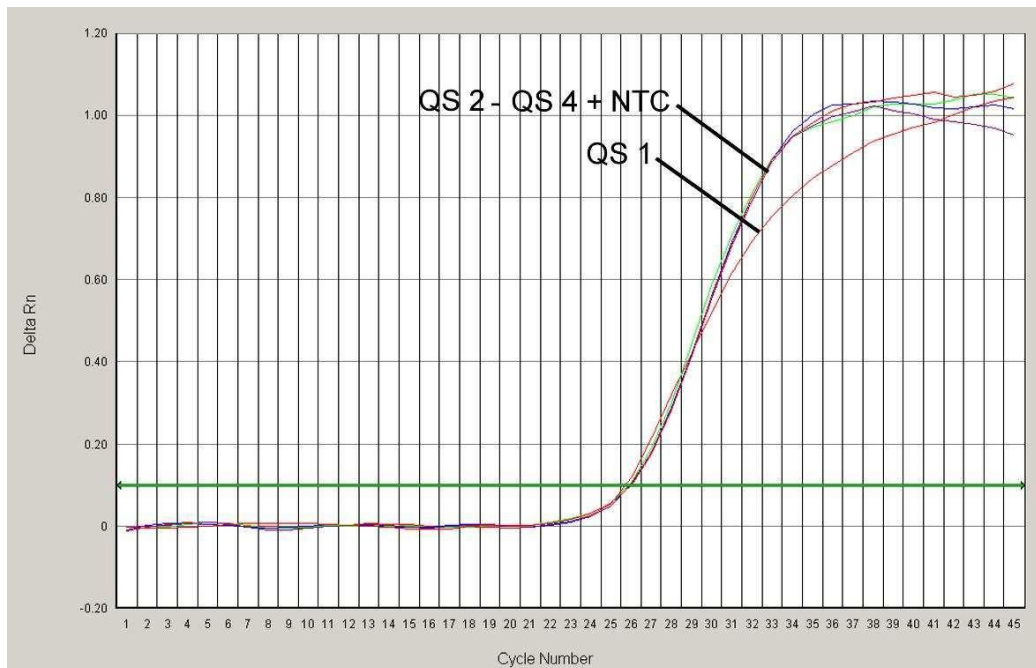


Abb. 21: Nachweis der Internen Kontrolle (IC) durch die Detektion eines VIC-Fluoreszenzsignals (*ABI PRISM 7000 SDS*) bei gleichzeitiger Amplifikation der Quantifizierungsstandards (*HSV1 LC/RG/TM* QS 1 - 4). NTC: non-template control (Negativkontrolle).

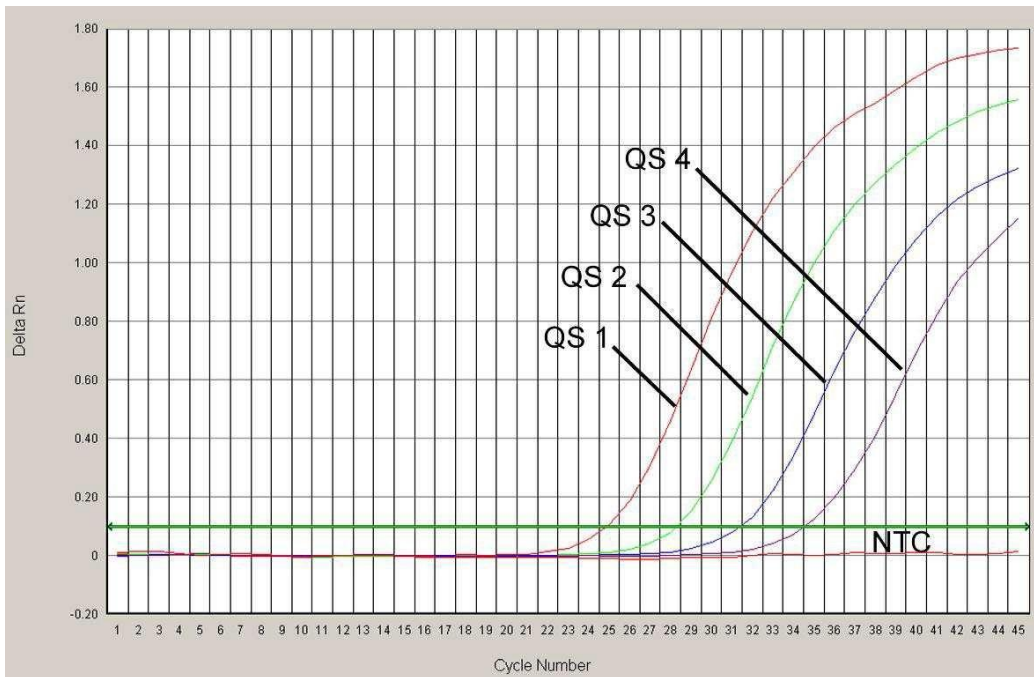


Abb. 22: Nachweis der *Quantifizierungsstandards (HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4)* durch die Detektion eines NED-Fluoreszenzsignals (*ABI PRISM 7000 SDS*). NTC: non-template control (Negativkontrolle).



Abb. 23: Nachweis der *Internen Kontrolle (IC)* durch die Detektion eines VIC-Fluoreszenzsignals (*ABI PRISM 7000 SDS*) bei gleichzeitiger Amplifikation der *Quantifizierungsstandards (HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4)*. NTC: non-template control (Negativkontrolle).

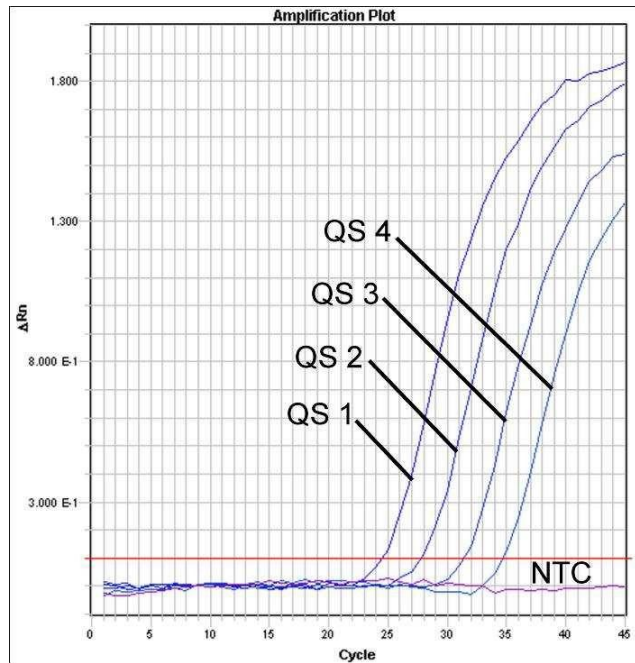


Abb. 24: Nachweis der Quantifizierungsstandards (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4*) durch die Detektion eines FAM-Fluoreszenzsignals (*ABI PRISM 7900HT SDS*). NTC: non-template control (Negativkontrolle).

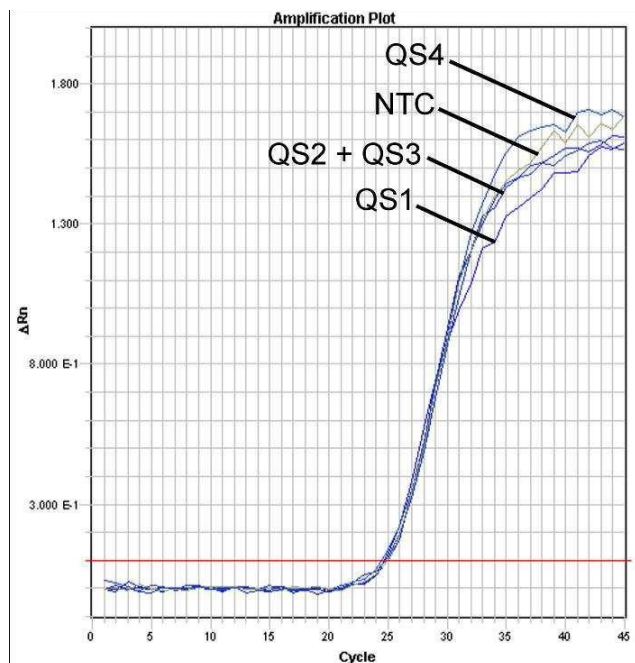


Abb. 25: Nachweis der Internen Kontrolle (IC) durch die Detektion eines VIC-Fluoreszenzsignals (*ABI PRISM 7900HT SDS*) bei gleichzeitiger Amplifikation der Quantifizierungsstandards (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4*). NTC: non-template control (Negativkontrolle).

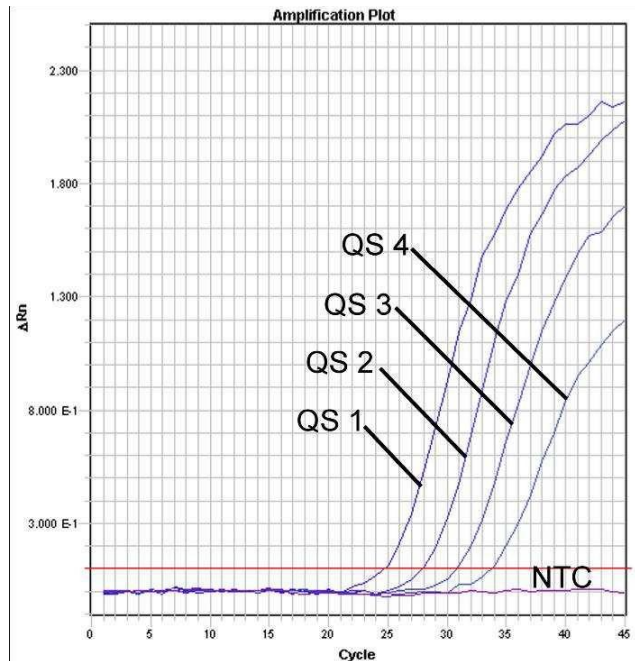


Abb. 26: Nachweis der Quantifizierungsstandards (*HSV2 LC/RG/TM* QS 1 - 4) durch die Detektion eines NED-Fluoreszenzsignals (*ABI PRISM 7900HT SDS*). NTC: non-template control (Negativkontrolle).

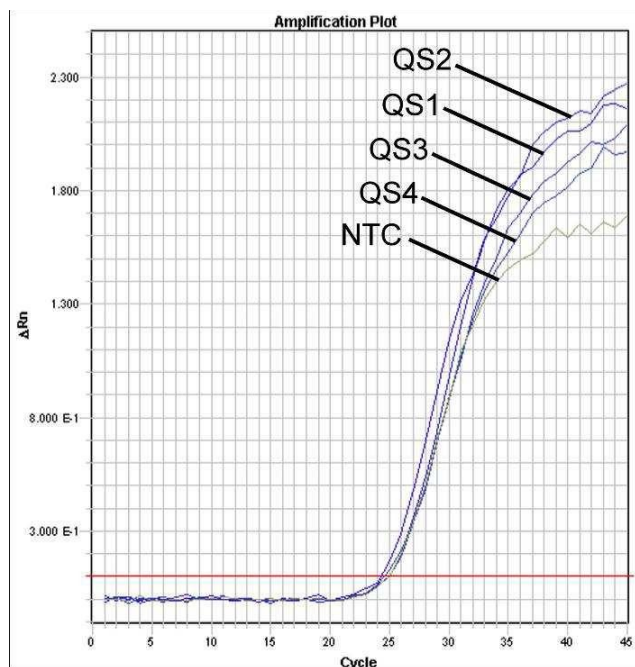


Abb. 27: Nachweis der Internen Kontrolle (IC) durch die Detektion eines VIC-Fluoreszenzsignals (*ABI PRISM 7900HT SDS*) bei gleichzeitiger Amplifikation der Quantifizierungsstandards (*HSV2 LC/RG/TM* QS 1 - 4). NTC: non-template control (Negativkontrolle).

10. Troubleshooting

Weder FAM-Fluoreszenzsignal für HSV-1 noch NED-Fluoreszenzsignal für HSV-2 bei den Positivkontrollen (HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4):

- Die Wahl des Detektorfarbstoffes bei der PCR-Datenanalyse entspricht nicht den Protokollangaben.
 - ❖ Wählen Sie für die Datenanalyse den Detektorfarbstoff FAM für HSV-1 und NED für HSV-2 für die analytische HSV-PCR und den Detektorfarbstoff VIC für die PCR der *Internen Kontrolle*.
- Die unter *Options* befindliche Einstellung der zur Auswertung herangezogenen Daten (*Extension Phase Data Extraction*) stimmt nicht mit den Einstellungen der *Data Collection* überein (für *ABI PRISM 7900HT SDS* siehe **8.5.2.4 Erstellung des Temperaturprofils**).
 - ❖ Analysieren Sie den PCR-Lauf mit korrigierten Einstellungen und wiederholen Sie die Auswertung (*Analysis*).
- Die Programmierung des Temperaturprofils des *ABI PRISM Sequence Detection Systems* ist fehlerhaft.
 - ❖ Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit den Protokollangaben (siehe **8.5 Programmierung der ABI PRISM SDS**).
- Fehlerhaftes Zusammenstellen der PCR-Reaktion.
 - ❖ Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte mit Hilfe des Pipettierschemas (siehe **8.4 Vorbereitung der PCR**) und wiederholen Sie ggf. die PCR.
- Die Lagerungsbedingungen für eine oder mehrere Kit-Komponenten entsprachen nicht den in **2. Lagerung** angeführten Vorschriften oder das Haltbarkeitsdatum des *artus HSV-1/2 TM PCR Kits* wurde überschritten.
 - ❖ Bitte überprüfen Sie sowohl Lagerungsbedingungen als auch Haltbarkeitsdatum (siehe Kit-Etikett) der Reagenzien und verwenden Sie ggf. einen neuen Kit.

Schwaches oder ausbleibendes Signal der Internen Kontrolle (VIC-Fluoreszenzsignal) bei gleichzeitiger Abwesenheit eines FAM-Fluoreszenzsignals für HSV-1 und NED-Fluoreszenzsignals für HSV-2 der spezifischen HSV-PCR:

- Die PCR-Bedingungen entsprechen nicht dem Protokoll.
 - ❖ Überprüfen Sie die PCR-Bedingungen (siehe oben) und wiederholen Sie ggf. die PCR mit korrigierten Einstellungen.
- Die PCR wurde inhibiert.
 - ❖ Stellen Sie sicher, dass Sie ein von uns empfohlenes Aufreinigungsverfahren benutzen (siehe **8.1 DNA-Isolierung**) und halten Sie sich exakt an die Herstellervorschrift.
 - ❖ Vergewissern Sie sich, dass bei der DNA-Aufreinigung der zusätzliche empfohlene Zentrifugationsschritt zur vollständigen Entfernung von Ethanol-Resten vor der Elution durchgeführt wurde (siehe **8.1 DNA-Isolierung**).
- Es liegen aufreinigungsbedingte DNA-Verluste vor.
 - ❖ Sollte die *Interne Kontrolle* zur Aufreinigung zugegeben worden sein, kann ein Ausbleiben des Signals der *Internen Kontrolle* bedeuten, dass aufreinigungsbedingte DNA-Verluste vorliegen. Stellen Sie sicher, dass Sie ein von uns empfohlenes Aufreinigungsverfahren anwenden (siehe **8.1 DNA-Isolierung**) und halten Sie sich an die Herstellervorschrift.
- Die Lagerungsbedingungen für eine oder mehrere Kit-Komponenten entsprachen nicht den in **2. Lagerung** angeführten Vorschriften oder das Haltbarkeitsdatum des *artus HSV-1/2 TM PCR Kits* wurde überschritten.
 - ❖ Bitte überprüfen Sie sowohl Lagerungsbedingungen als auch Haltbarkeitsdatum (siehe Kit-Etikett) der Reagenzien und verwenden Sie ggf. einen neuen Kit.

Ein FAM-Fluoreszenzsignal für HSV-1 und NED-Fluoreszenzsignal für HSV-2 der analytischen PCR bei den Negativkontrollen:

- Es liegt eine Kontamination während der Vorbereitung der PCR vor.
 - ◆ Wiederholen Sie die PCR mit noch unbenutzten Reagenzien in Replikaten.
 - ◆ Verschließen Sie die einzelnen PCR-Gefäße nach Möglichkeit jeweils unmittelbar nach Zugabe der zu untersuchenden Probe.
 - ◆ Pipettieren Sie die Positivkontrollen grundsätzlich zuletzt.
 - ◆ Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig dekontaminiert werden.
- Es liegt eine aufreinigungsbedingte Kontamination vor.
 - ◆ Wiederholen Sie die Aufreinigung und PCR der zu untersuchenden Proben unter Verwendung noch unbenutzter Reagenzien.
 - ◆ Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig dekontaminiert werden.

Sollten weitere Fragen oder Probleme auftreten, kontaktieren Sie bitte unseren Technischen Service.

11. Spezifikationen

11.1 Analytische Sensitivität

Zur Bestimmung der analytischen Sensitivität des *artus* HSV-1/2 TM PCR Kits wurde eine Standard-Verdünnungsreihe für HSV-1 von 25,7 bis nominal 0,008 HSV-Kopieäquivalenten*/ μ l und für HSV-2 von 35,31 bis nominal 0,012 HSV-Kopieäquivalenten*/ μ l erstellt. Diese wurden anschließend unter Benutzung des *artus* HSV-1/2 TM PCR Kits mit den *ABI PRISM 7000* und *7900HT Sequence Detection Systems* analysiert. Die Untersuchungen wurden für jedes Gerät an drei verschiedenen Tagen in Form von Achtfach-Bestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind mit Hilfe einer Probit-Analyse ermittelt worden. Deren graphische Auswertung (*ABI PRISM 7900HT SDS*) ist in Abb. 28 - Abb. 29 dargestellt.

Nachweisgrenze ($p = 0,05$)	
<i>ABI PRISM 7000 SDS</i> (HSV-1)	0,9 Kopien/ μ l
<i>ABI PRISM 7000 SDS</i> (HSV-2)	0,5 Kopien/ μ l
<i>ABI PRISM 7900HT SDS</i> (HSV-1)	1,8 Kopien/ μ l
<i>ABI PRISM 7900HT SDS</i> (HSV-2)	2,0 Kopien/ μ l

Dies bedeutet, dass 0,9 Kopien/ μ l (HSV-1) bzw. 0,5 Kopien/ μ l (HSV-2, *ABI PRISM 7000 SDS*) und 1,8 Kopien/ μ l (HSV-1) bzw. 2,0 Kopien/ μ l (HSV-2, *ABI PRISM 7900HT SDS*) mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 %detektiert werden können.

* Bei dem hier verwendeten Standard handelt es sich um ein kloniertes PCR-Produkt, dessen Konzentration spektral- und fluoreszenzphotometrisch bestimmt wurde.

Probit-Analyse: HSV-1 (ABI PRISM® 7900HT SDS)

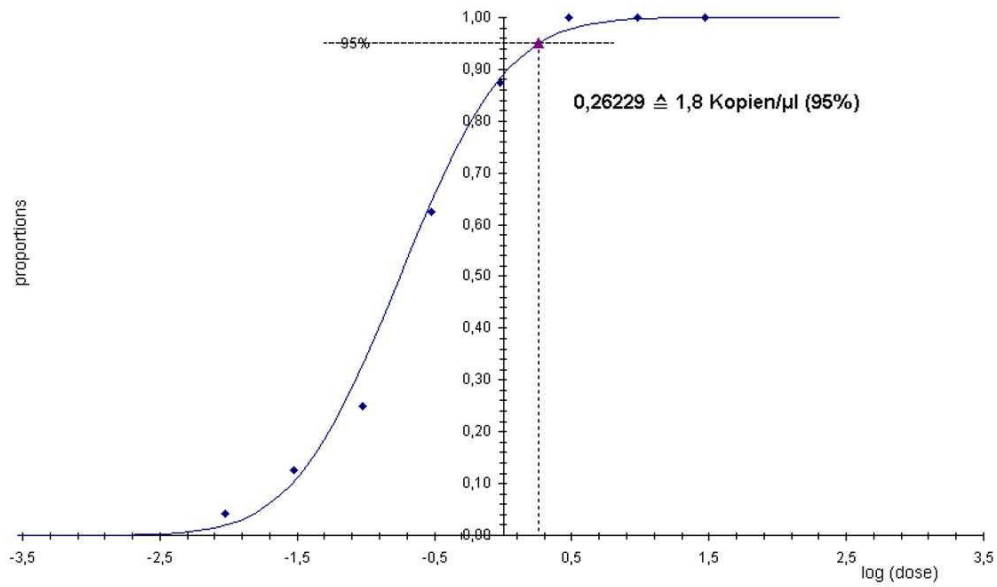


Abb. 28: Analytische Sensitivität für HSV-1 des artus HSV-1/2 TM PCR Kits (ABI PRISM 7900HT SDS).

Probit-Analyse: HSV-2 (ABI PRISM 7900HT SDS)

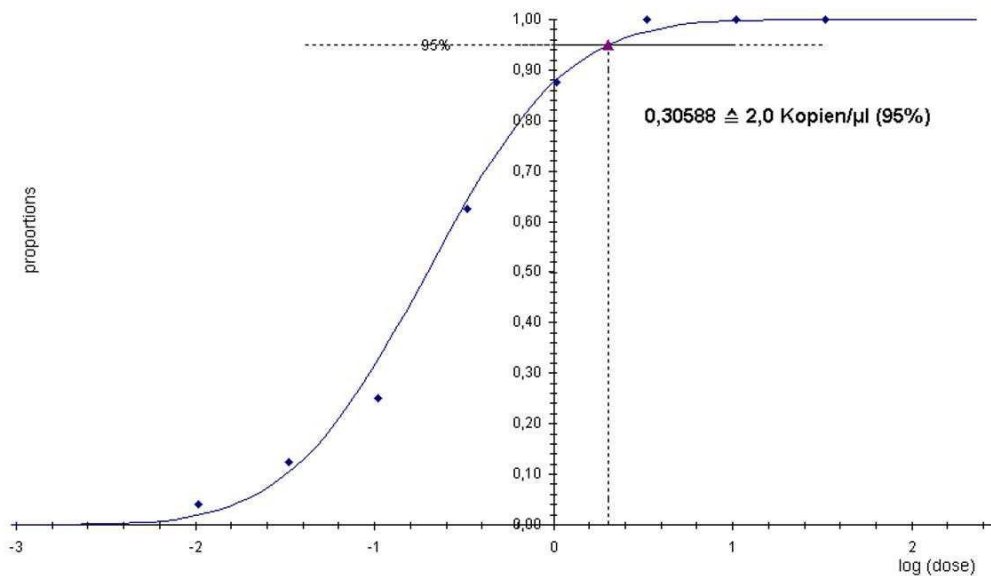


Abb. 29: Analytische Sensitivität für HSV-2 des artus HSV-1/2 TM PCR Kits (ABI PRISM 7900HT SDS).

11.2 Spezifität

Die Spezifität des *artus* HSV-1/2 TM PCR Kits wird in erster Linie durch die Auswahl der Primer und Sonden sowie die Wahl stringenter Reaktionsbedingungen gewährleistet. Die Primer und Sonden sind anhand einer Sequenzvergleichs-Analyse auf eventuelle Homologien zu allen in Genbanken publizierten Sequenzen überprüft worden. Auf diese Weise wurde auch die Detektierbarkeit aller relevanten Stämme kontrolliert.

Für die Bestimmung der Spezifität des *artus* HSV-1/2 TM PCR Kits wurde die in Tabelle 1 aufgeführte Kontrollgruppe auf ihre Kreuzreaktivität untersucht. Keiner der getesteten Erreger war reaktiv.

Tabelle 1: Spezifitätstestung des Kits mit potentiell kreuzreaktiven Erregern.

Kontrollgruppe	HSV-1/2 (FAM/NED)	Interne Kontrolle (VIC)
Humanes Herpesvirus 3 (Varizella-Zoster-Virus)	-	+
Humanes Herpesvirus 4 (Epstein-Barr-Virus)	-	+
Humanes Herpesvirus 5 (Zytomegalievirus)	-	+
Humanes Herpesvirus 6 A	-	+
Humanes Herpesvirus 6 B	-	+
Humanes Herpesvirus 7	-	+
Humanes Herpesvirus 8	-	+
Hepatitis A-Virus	-	+
Hepatitis B-Virus	-	+
Hepatitis C-Virus	-	+
Humanes Immundefizienz-Virus	-	+
Humanes T-zell Leukämie-Virus Typ 1 und 2	-	+
West-Nil-Virus	-	+
Enterovirus	-	+
Parvovirus B19	-	+

11.3 Präzision

Die Präzisionsdaten für den *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit erlauben die Ermittlung der Totalvarianz (Gesamtstreuung) des Testsystems. Diese Totalvarianz setzt sich zusammen aus der **Intra-Assay Variabilität** (Streuung von Proben derselben Konzentration innerhalb eines Versuchsansatzes), der **Inter-Assay Variabilität** (Streuung aufgrund der Anwendung durch verschiedene Personen innerhalb eines Labors und unter Benutzung verschiedener Geräte gleichen Typs) und der **Inter-Chargen Variabilität** (Streuung unter Verwendung unterschiedlicher Chargen). Dabei werden jeweils die Standardabweichung, die Varianz und der Variationskoeffizient sowohl für die Erreger-spezifische als auch für die PCR der *Internen Kontrolle* berechnet.

Diese Daten wurden für den *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit anhand des *Quantifizierungsstandards* mit der geringsten Konzentration (QS 4; 10 Kopien/ μ l) ermittelt. Die Untersuchungen wurden in Form von Achtfach-Bestimmungen durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse wurde anhand der Ct-Werte der Amplifikationskurven (Ct: *threshold cycle*, siehe Tabelle 2/Tabelle 4) und der daraus ermittelten quantitativen Werte in Kopien/ μ l (siehe Tabelle 3/Tabelle 5) vorgenommen. Demnach beträgt die Gesamtstreuung einer beliebigen Probe der genannten Konzentration 2,62 % (Ct, HSV-1) und 2,07 % (Ct, HSV-2) bzw. 14,02 % (Konz., HSV-1) und 14,82 % (Konz., HSV-2), für den Nachweis der *Internen Kontrolle* 1,84 % (Ct, HSV-1) und 1,92 % (Ct, HSV-2). Diese Werte basieren auf der Gesamtheit aller Einzelwerte der ermittelten Variabilitäten.

Tabelle 2: Präzisionsdaten für HSV-1 auf Grundlage der Ct-Werte.

	Standard- abweichung	Varianz	Variations- koeffizient [%]
Intra-Assay Variabilität: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,18	0,03	0,51
Intra-Assay Variabilität: <i>Interne Kontrolle</i>	0,24	0,06	0,87
Inter-Assay Variabilität: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,25	0,06	0,70
Inter-Assay Variabilität: <i>Interne Kontrolle</i>	0,37	0,14	1,36
Inter-Chargen Variabilität: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,23	0,05	0,67
Inter-Chargen Variabilität: <i>Interne Kontrolle</i>	0,17	0,03	0,65
Totalvarianz: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,92	0,84	2,62
Totalvarianz: <i>Interne Kontrolle</i>	0,49	0,24	1,84

Tabelle 3: Präzisionsdaten für HSV-1 auf Grundlage der quantitativen Werte (in Kopien/ μ l).

	Standard- abweichung	Varianz	Variations- koeffizient [%]
Intra-Assay Variabilität: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	1,32	1,75	13,12
Inter-Assay Variabilität: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	1,60	2,56	15,81
Inter-Chargen Variabilität: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	1,22	1,50	12,14
Totalvarianz: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	1,42	2,00	14,02

Tabelle 4: Präzisionsdaten für HSV-2 auf Grundlage der Ct-Werte.

	Standard- abweichung	Varianz	Variations- koeffizient [%]
Intra-Assay Variabilität: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,17	0,03	0,49
Intra-Assay Variabilität: <i>Interne Kontrolle</i>	0,10	0,01	0,37
Inter-Assay Variabilität: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,23	0,05	0,68
Inter-Assay Variabilität: <i>Interne Kontrolle</i>	0,30	0,09	1,10
Inter-Chargen Variabilität: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,24	0,06	0,74
Inter-Chargen Variabilität: <i>Interne Kontrolle</i>	0,25	0,06	0,93
Totalvarianz: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,70	0,49	2,07
Totalvarianz: <i>Interne Kontrolle</i>	0,52	0,27	1,92

Tabelle 5: Präzisionsdaten für HSV-2 auf Grundlage der quantitativen Werte (in Kopien/ μ l).

	Standard- abweichung	Varianz	Variations- koeffizient [%]
Intra-Assay Variabilität: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	1,44	2,06	14,25
Inter-Assay Variabilität: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	1,60	2,56	15,80
Inter-Chargen Variabilität: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	1,48	2,18	14,62
Totalvarianz: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	1,50	2,25	14,82

11.4 Robustheit

Die Überprüfung der Robustheit dient der Ermittlung der Gesamtausfallrate des *artus* HSV-1/2 TM PCR Kits. Hierzu wurden 30 HSV negative Liquorproben mit je 5,4 Kopien/ μ l Elutionsvolumen HSV-1-Kontroll-DNA (dreifache Konzentration der analytischen Sensitivitätsgrenze) versetzt, mit dem QIAamp DNA Mini Kit aufgereinigt (siehe **8.1 DNA-Isolierung**) und mit dem *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit analysiert. In gleicher Weise wurde die Untersuchung für HSV-2 durchgeführt (30 Liquorproben; 6 Kopien/ μ l HSV-2-Kontroll-DNA). Die Ausfallrate betrug sowohl für HSV-1 als auch für HSV-2 für die Gesamtheit der Proben 0 %. Die Robustheit der *Internen Kontrolle* wurde zusätzlich durch die Aufreinigung und Analyse von 30 HSV negativen Liquorproben überprüft. Die Gesamtausfallrate betrug 0 %. Inhibitionen wurden nicht beobachtet. Damit beträgt die Robustheit des *artus* HSV- 1/2 TM PCR Kits ≥ 99 %.

11.5 Reproduzierbarkeit

Die Daten der Reproduzierbarkeit werden zum Zweck der regelmäßigen Leistungsbewertung des *artus* HSV-1/2 TM PCR Kits sowie des Leistungsvergleichs mit anderen Produkten durch die Teilnahme an Ringversuchen erhoben.

11.6 Diagnostische Evaluierung

Der *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit wird derzeit noch in mehreren Studien evaluiert.

12 Besondere Hinweise zum Produkt-Gebrauch

- Alle Reagenzien dürfen ausschließlich zur In-vitro-Diagnostik verwendet werden.
- Die Anwendung sollte durch Personal erfolgen, das speziell in In-vitro-Diagnostika-Verfahren unterrichtet und ausgebildet wurde.
- Die genaue Einhaltung des Protokolls ist unbedingt erforderlich, um optimale PCR-Ergebnisse zu erreichen.
- Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten sind zu beachten. Abgelaufene Reagenzien sind nicht zu benutzen.

13. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Sicherheitsinformationen zum *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern entnehmen (safety data sheets, SDS). Diese finden Sie als kompakte und anwenderfreundliche PDF-Datei unter www.qiagen.com/safety.

14. Qualitätskontrolle

In Übereinstimmung mit dem ISO 9001 und ISO 13485-zertifizierten Qualitäts-Management-System von QIAGEN wurde jede Charge des *artus* HSV-1/2 TM PCR Kits gegen vorgegebene Spezifikationen getestet, um eine einheitliche Produktqualität zu gewährleisten.

15. Literatur

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 - 212.

16. Erklärung der Symbole



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung



Hersteller



Bestellnummer



Materialnummer



Handbuch



In-vitro-diagnostisches Medizinprodukt



Global Trade Item Number (Globale Artikelnummer)



<N>

Inhalt reicht für <N> Tests



Zulässiger Temperaturbereich

QS

Quantifizierungsstandard

IC

Interne Kontrolle

Mg-Sol

Magnesium-Lösung

artus HSV-1/2 TM PCR Kit

Marken und Disclaimer

QIAGEN®, QIAamp®, artus®, BioRobot®, EZ1®, UltraSens® (QIAGEN Gruppe); AB/ PR/SM® MicroAmp®, GeneAmp® (Life Technologies Corporation).

Registrierte Namen, Warenzeichen, usw. in diesem Dokument können nicht, auch bei fehlender Kennzeichnung als solche, als gesetzlich ungeschützt betrachtet werden.

Der artus HSV-1/2 TM PCR Kit, die BioRobot EZ1 DSP Workstation und die EZ1 DSP Virus Kit und Card sind CE-markierte diagnostische Instrumente und Kits in Obereinstimmung mit der Europäischen Richtlinie 98/79/EG über In-vitro-Diagnostika. Nicht in allen Ländern erhältlich.

Die QIAamp Kits sind für den allgemeinen Laborgebrauch. Die Produktangaben oder Produktdarstellungen sind nicht dazu vorgesehen, Informationen für die Diagnose, Prävention oder Behandlung einer Erkrankung zu liefern.

Der Erwerb der artus PCR Kits beinhaltet eine limitierte Lizenz für ihre Verwendung zur Durchführung des Polymerasekettenreaktion-Verfahrens (PCR) in der humanen und veterinären In-vitro-Diagnostik in Verbindung mit einem Thermocycler, dessen Einsatz bei der automatisierten Durchführung der PCR durch die up-front Lizenzgebühr abgedeckt ist, die entweder an Applied Biosystems abgeführt wird oder durch den Erwerb eines autorisierten Thermocyclers entrichtet wird. Das PCR Verfahren ist geschützt durch entsprechende nationale Schutzrechte der U.S. Patente der Nummern 5.219.727 und 5.322.770 und 5.210.015 und 5.176.995 und 6.040.166 und 6.197.563 und 5.994.056 und 6.171.785 und 5.487.972 und 5.804.375 und 5.407.800 und 5.310.652 und 5.994.056; Eigentum der F. Hoffmann-La Roche Ltd.

© 2015 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

