

artus[®] VZV TM PCR Kit

Handbuch



24 (Katalog Nr. 4502163)



96 (Katalog Nr. 4502165)

Quantitatives In-vitro-Diagnostikum

Zur Verwendung mit den

ABI PRISM[®] 7000, 7700 und 7900HT Sequence Detection Systems

Version 1



4502163, 4502165



1046901DE



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, DEUTSCHLAND

R2

MAT

1046901DE



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	5
3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte	6
4. Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	7
5. Erreger-Informationen	7
6. Prinzip der Real-Time PCR	7
7. Produktbeschreibung	8
8. Protokoll	9
8.1 DNA-Isolierung	9
8.2 Interne Kontrolle	12
8.3 Quantifizierung	14
8.4 Vorbereitung der PCR	15
8.5 Programmierung der <i>ABI PRISM SDS</i>	20
9. Auswertung	38
10. Troubleshooting	43
11. Spezifikationen	46
11.1 Analytische Sensitivität	46
11.2 Spezifität.....	47
11.3 Präzision.....	48
11.4 Robustheit	50
11.5 Reproduzierbarkeit	50
11.6 Diagnostische Evaluierung	50

12. Besondere Hinweise zum Produkt-Gebrauch	50
13. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	50
14. Qualitätskontrolle	50
15. Literatur	50
16. Erklärung der Symbole	51

artus VZV TM PCR Kit

Für die Verwendung mit den *ABI PRISM 7000*, *7700* und *7900HT Sequence Detection Systems*.

Beachte: Der *artus VZV TM PCR Kit* kann weder in Verbindung mit dem *GeneAmp® 5700 SDS* noch mit dem 384er Plattenformat des *ABI PRISM 7900HT SDS* verwendet werden.

1. Inhalt

	Beschriftung und Inhalt	Art. Nr. 4502163 24 Reaktionen	Art. Nr. 4502165 96 Reaktionen
Blau	VZV TM Master	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
Rot	VZV LC/TM QS 1 st 1 x 10 ⁴ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Rot	VZV LC/TM QS 2 nd 1 x 10 ³ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Rot	VZV LC/TM QS 3 rd 1 x 10 ² cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Rot	VZV LC/TM QS 4 th 1 x 10 ¹ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Grün	VZV TM IC st	1 x 1.000 μl	2 x 1.000 μl
Weiß	Water (PCR grade)	1 x 1.000 μl	1 x 1.000 μl

stQS = Quantifizierungsstandard

IC = Interne Kontrolle

2. Lagerung

Die Komponenten des *artus VZV TM PCR Kits* werden bei -30 bis -15 °C gelagert und sind bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Datum haltbar. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren (> 2 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°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, 7700 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.

* Die Benutzung von Reaktionsgefäßen für optische Messungen mit gewölbten Deckeln ist nur für den *ABI PRISM 7700 SDS* zulässig und erfordert eine Umstellung der Belichtungszeit (siehe **8.5.2 Programmierung des ABI PRISM 7700 SDS, 8.5.2.5 Wichtige Zusatzeinstellungen**).

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 aufreinigen, lagern 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

Die Übertragung des Varizella-Zoster-Virus (VZV) erfolgt von Mensch zu Mensch als Tröpfcheninfektion oder durch direkten Kontakt. Die Infektion mit VZV führt zu leichtem Fieber und mäßig beeinträchtigtem Allgemeinbefinden. Charakteristisch für die Erkrankung ist das polymorphe Exanthem mit Papeln, Bläschen und Krusten, verbunden mit starkem Juckreiz (Windpocken). Schwere Verläufe der VZV-Infektion werden häufig bei immunsupprimierten Patienten beobachtet mit Pneumonien und Enzephalitiden als bedrohliche Komplikation. Nach der akuten Infektion persistieren die Erreger in den sensorischen Spinalganglien und in den Ganglien der Hirnnerven. Bei Nachlassen der Immunität kann es dann zu Exazerbationen kommen (z. B. Lippenherpes, Gürtelrose).

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* VZV TM PCR Kit ist ein gebrauchsfertiges System für den Nachweis von VZV-DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) im *ABI PRISM 7000, 7700 und 7900HT Sequence Detection System*. Der *VZV TM Master* beinhaltet Reagenzien und Enzyme für die spezifische Amplifikation eines 82 bp langen Abschnitts des VZV-Genoms. Die Detektion des Amplifikats erfolgt durch die Messung der FAM-Fluoreszenz im *ABI PRISM SDS*. Daneben enthält der *artus* VZV 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 VZV-PCR (siehe **11.1 Analytische Sensitivität**) nicht herabgesetzt. Es werden externe Positivkontrollen (*VZV LC/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 Kit (50)	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 $1 \mu\text{g}$ Carrier-RNA pro $100 \mu\text{l}$ Lysispuffer eingesetzt werden. Sieht das Extraktionsprotokoll beispielsweise $200 \mu\text{l}$ Lysispuffer pro aufzureinigende Probe vor, dann setzen Sie $2 \mu\text{l}$ 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. $200 \mu\text{l}$	z. B. $2.400 \mu\text{l}$
Carrier-RNA ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)	$2 \mu\text{l}$	$24 \mu\text{l}$
Gesamtvolumen	$202 \mu\text{l}$	$2.424 \mu\text{l}$
Volumen für die Aufreinigung	$200 \mu\text{l}$	je $200 \mu\text{l}$

- 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:
 - Resuspendieren Sie die lyophilisierte Carrier-RNA vor Erstbenutzung des Isolierungskits in $310 \mu\text{l}$ 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 x) 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 µg/µl)	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* VZV 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* VZV 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 VZV TM PCR Kits* kann direkt in die Aufreinigung eingesetzt werden (siehe **8.2 Interne Kontrolle**).

8.2 Interne Kontrolle

Es wird eine *Interne Kontrolle* (VZV 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 UltraSens Virus 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 μ l der *Internen Kontrolle* direkt zu 30 μ l VZV *TM Master* hinzu. Verwenden Sie für jede PCR-Reaktion 30 μ l 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 VZV *TM Masters* 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* (VZV LC/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 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, 7700 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:

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

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*	Kompressions- matte
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

Beachte: Die Benutzung von Reaktionsgefäßen für optische Messungen mit gewölbten Deckeln ist nur für das ABI PRISM 7700 SDS Instrument zulässig und erfordert eine Umstellung der Belichtungszeit (siehe **8.5.2 Programmierung des ABI PRISM 7700 SDS, 8.5.2.5 Wichtige Zusatzeinstellungen**).

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 (VZV LC/TM QS 1 - 4)*. Alle Reagenzien sollten vor Testbeginn vollständig bei Raumtemperatur

* 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.

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 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	VZV TM Master	30 μ l	360 μ l
	VZV 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 VZV 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	VZV TM Master	30 μ l	360 μ l
	VZV 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

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

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 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 **8.5 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, 7700 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

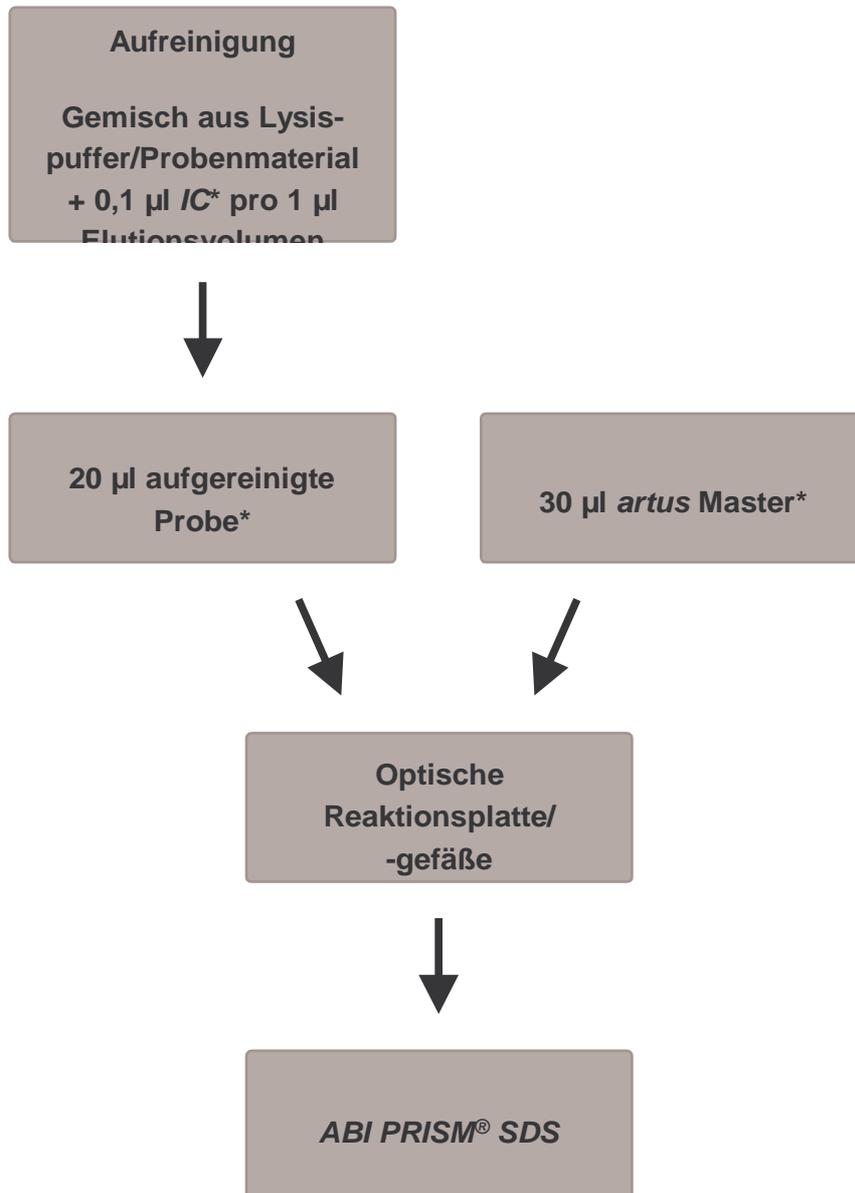


Abb. 1: Schematischer Arbeitsablauf zur Kontrolle von Aufreinigung und PCR-Inhibition.

*

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

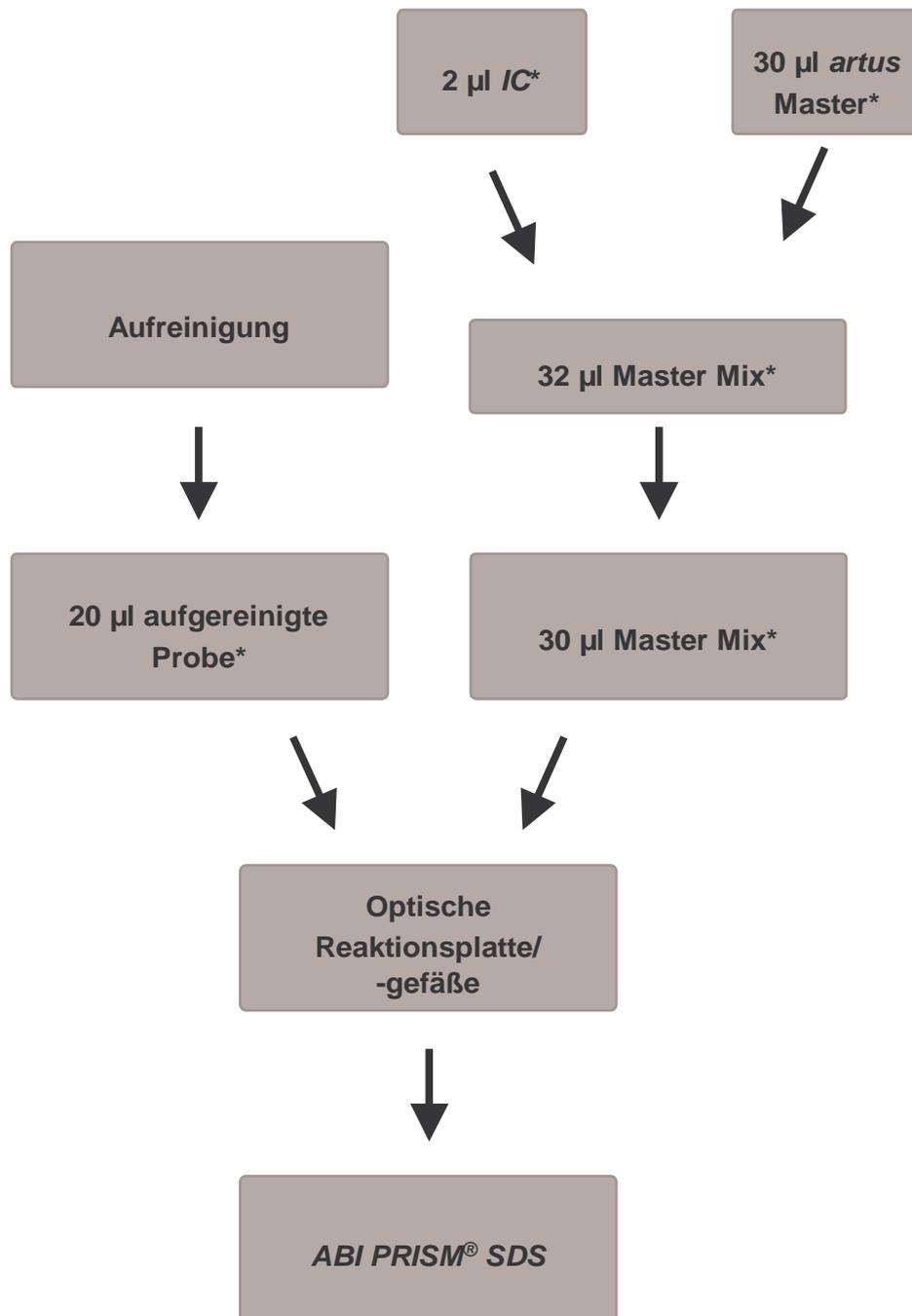


Abb. 2: Schematischer Arbeitsablauf zur Kontrolle der PCR-Inhibition.

* 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, 7700 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 VZV-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).

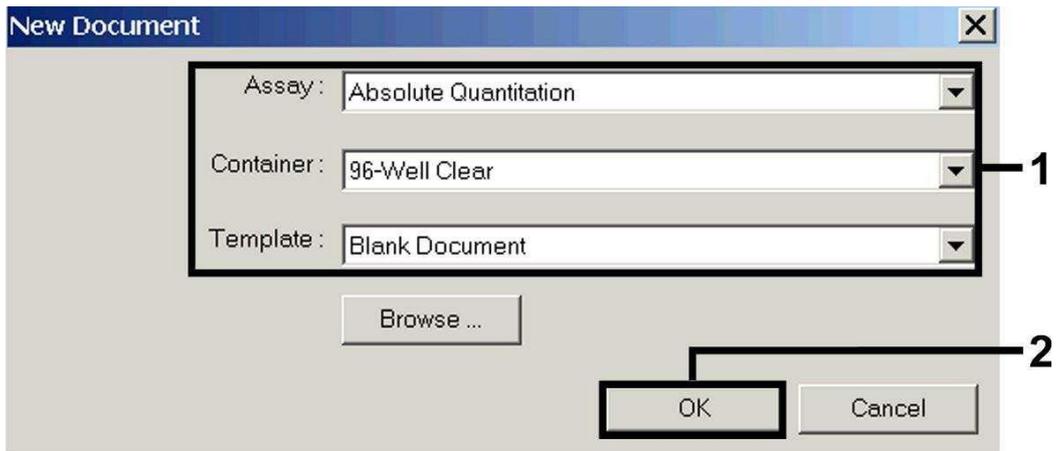


Abb. 3: Voreinstellungen bei der Erstellung eines neuen PCR-Laufs (*New Document*).

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 VZV-DNA sowie der *Internen Kontrolle* mit Hilfe des *artus VZV TM PCR Kits* sind die in der folgenden Tabelle angegebenen Reporter/Quencher zu definieren:

Nachweis	Reporter	Quencher
VZV-DNA	FAM	TAMRA
<i>Interne Kontrolle (VZV 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.

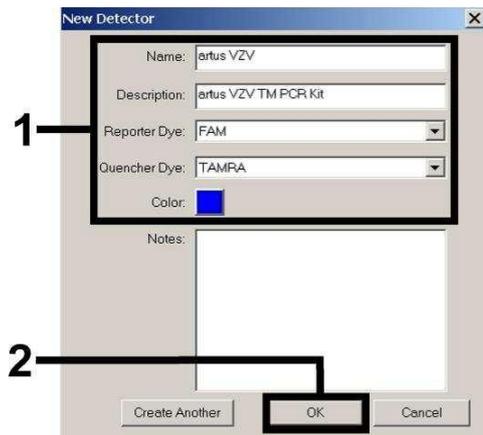


Abb. 4: Erstellung des VZV-spezifischen Detektors (*DetectorManager*).

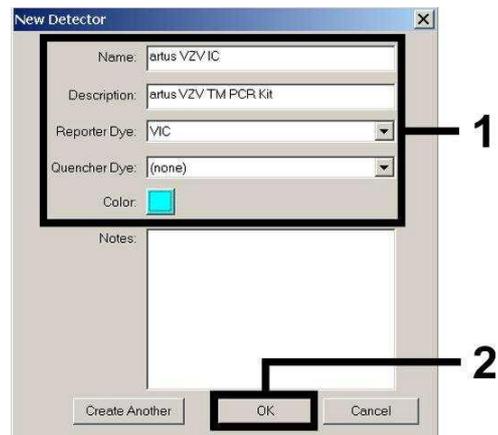


Abb. 5: Erstellung des IC-spezifischen Detektors (*DetectorManager*).

In dem nun erscheinenden Fenster definieren Sie (entsprechend Abb. 4 und Abb. 5) zum Nachweis von VZV-DNA die Reporter/Quencher-Kombination **FAM/TAMRA**, 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. 6). Schließen Sie das Fenster (*Done*).

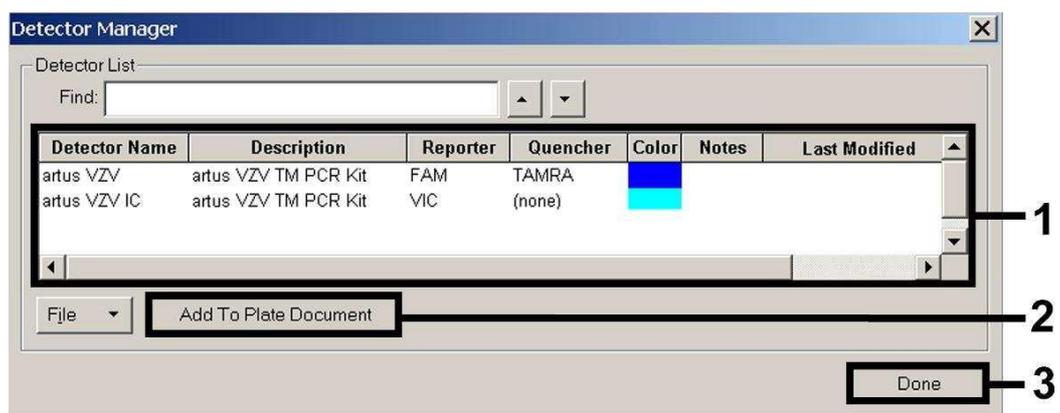


Abb. 6: Auswahl der Detektoren (*Detector Manager*).

8.5.1.3 Zuordnung der notwendigen Informationen zu den Platten- positionen

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. 7).

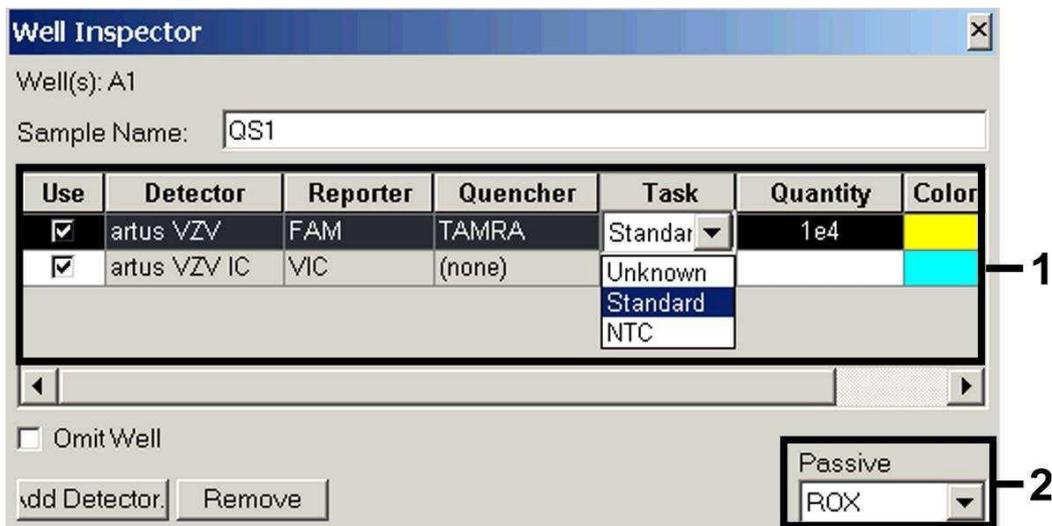


Abb. 7: Zuordnung der notwendigen Informationen zu den Plattenpositionen (*Well Inspector*).

Markieren Sie die für den Nachweis von VZV-DNA belegten Positionen der Platte. Ordnen Sie diesen Positionen die ausgewählten Detektoren zu, indem Sie die *Use*-Option beider 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:

Probentyp	Funktion (Task)	Konzentration (Quantity)	Reporter	Quencher
Probe	Unknown	-	FAM	TAMRA
Negativkontrolle	NTC	-	FAM	TAMRA
Standard	Standard	siehe 1. Inhalt	FAM	TAMRA

Zur Erstellung einer Standardkurve nutzen Sie pro PCR-Lauf alle mitgelieferten *Quantifizierungsstandards* (VZV LC/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 VZV 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 *VZV 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. 8 das für die Detektion von VZV-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).

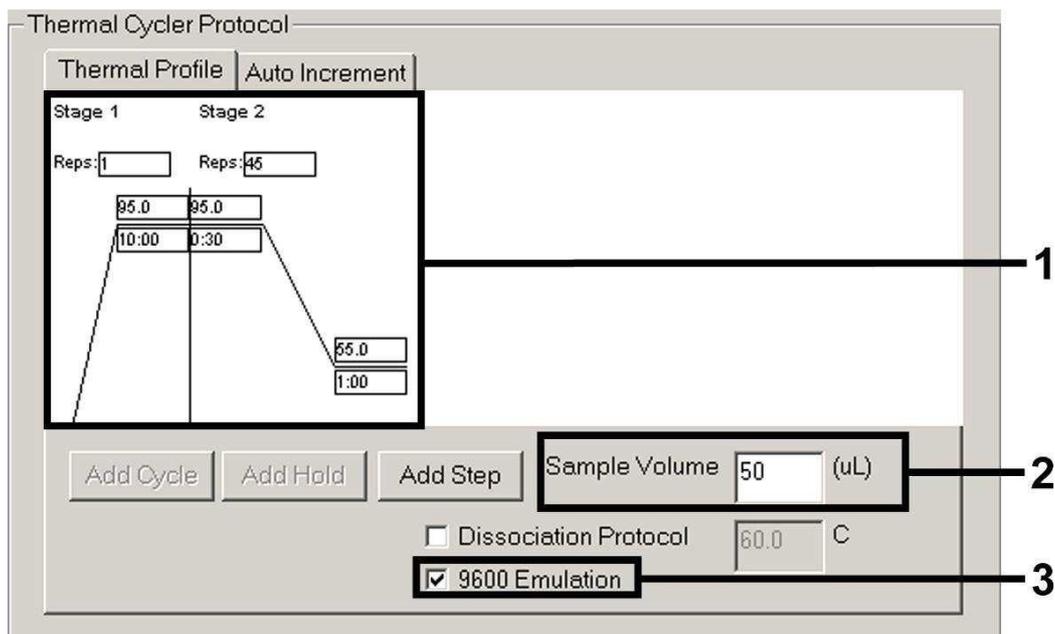


Abb. 8: Erstellung des Temperaturprofils.

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 7700 SDS

Zur Detektion von VZV-DNA erstellen Sie auf Ihrem ABI PRISM 7700 SDS ein Profil gemäß den folgenden sieben Arbeitsschritten (8.5.2.1 - 8.5.2.7). Alle Angaben beziehen sich auf die ABI PRISM 7700 SDS Software- Version 1.9.1. Einzelheiten zur Programmierung des ABI PRISM 7700 SDS entnehmen Sie bitte dem ABI PRISM 7700 SDS User`s Manual. 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 7700 SDS den unter *File* befindlichen Menüpunkt *New Plate* an und stellen Sie für das neue Dokument die folgenden Grundeinstellungen ein (siehe Abb. 9). Bestätigen Sie Ihre Eingaben (OK).

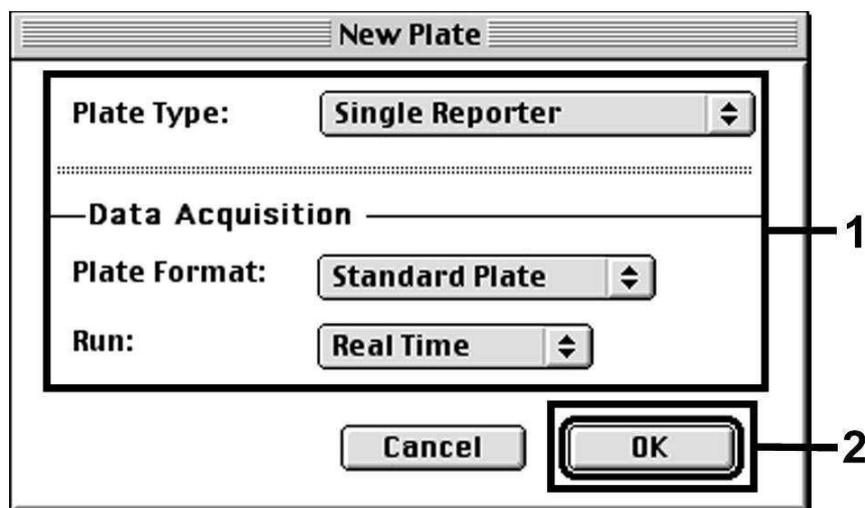


Abb. 9: Voreinstellungen bei der Erstellung eines neuen PCR-Laufs (*New Plate*).

8.5.2.2 Auswahl der Fluoreszenzfarbstoffe und Zuordnung des Probentyps

Mit Hilfe des *Sample Type Setup* (Setup-Ebene: *Sample Type/Sample Type Setup*) ordnen Sie dem Dokument die entsprechenden Detektorfarbstoffe und den entsprechenden Probentyp zu. Zum Nachweis von VZV-DNA sowie der *Internen Kontrolle* mit Hilfe des *artus VZV TM PCR Kits* sind die in der folgenden Tabelle angegebenen Reporter/Quencher zu definieren:

Nachweis	Reporter	Quencher
VZV-DNA	FAM	TAMRA
<i>Interne Kontrolle (VZV TMIC)</i>	VIC	TAMRA

Für die Messung von VZV-DNA mit Hilfe des *artus VZV TM PCR Kits* wählen Sie analog zur Tabelle den Reporterfarbstoff **FAM** an. Dies gilt sowohl für Standards (STND), Proben (UNKN) als auch für Negativkontrollen (UNKN). Für die Messung der *Internen Kontrolle* (IPC+) definieren Sie als Reporter **VIC**. Stellen Sie als Quencher **TAMRA** ein. Die Zuordnung der Farbstoffe und Probentypen im Fenster *Sample Type Setup* ist in Abb. 10 dargestellt.

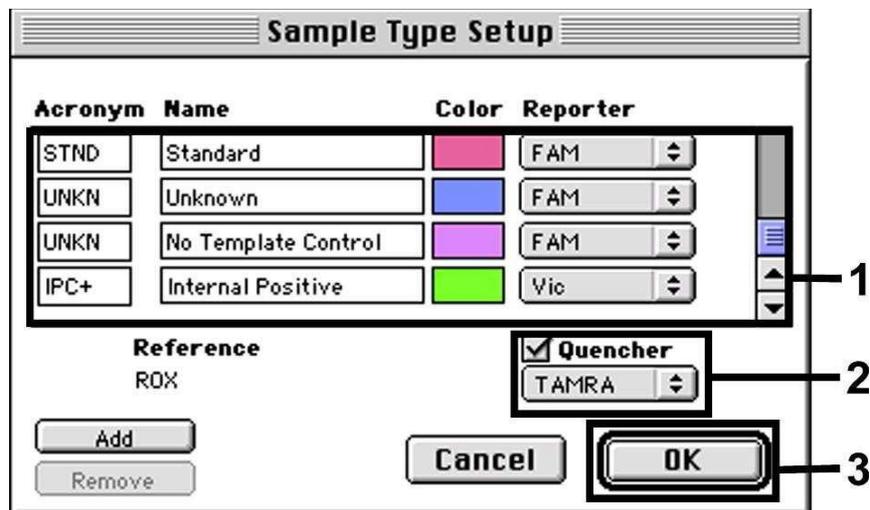


Abb. 10: Auswahl der Fluoreszenzfarbstoffe und Zuordnung des Probentyps (*Sample Type Setup*).

Die Zuordnung des Probenotyps zu einer entsprechenden Funktion (Acronym) erfolgt nach der folgenden Tabelle:

Probenotyp	Funktion Quencher (Acronym)	Konzentration	Reporter	(Quantity)
Probe	UNKN	-	FAM	TAMRA
Negativkontrolle	UNKN	-	FAM	TAMRA
Standard	STND	siehe 1. Inhalt	FAM	TAMRA

8.5.2.3 Zuordnung der notwendigen Informationen zu den Platten- positionen

Für die Zuordnung der Detektoren und Probenotypen zu den einzelnen Plattenpositionen wählen Sie die entsprechenden Felder an. Öffnen Sie dann auf der *Setup*-Ebene das Dialogfenster *Dye Layer* und ordnen Sie den zugehörigen Reporter zu. Aktivieren Sie nun das Pop-up Menü *Sample Type*, so finden Sie in der erscheinenden Liste die dem Reporter im *Sample Type Setup* zugeordneten Probenotypen wieder (siehe Abb. 11). Wählen Sie den passenden Probenotyp aus (siehe Tabelle unter 8.5.2.2) und bestimmen Sie nun mit Hilfe des *Dye Layers* und des *Sample Type*-Menüs die Zuordnung zu den restlichen Plattenpositionen. In dem Feld *Sample Name* kann jeder Probe ein Name zugeordnet werden. Als *Replicate* definierte Felder (Eingabe des Namens der Bezugsprobe in die Spalte *Replicate*) werden von der Software hinsichtlich ihrer quantifizierten Erregerlast gemittelt und ihre Standardabweichung berechnet.

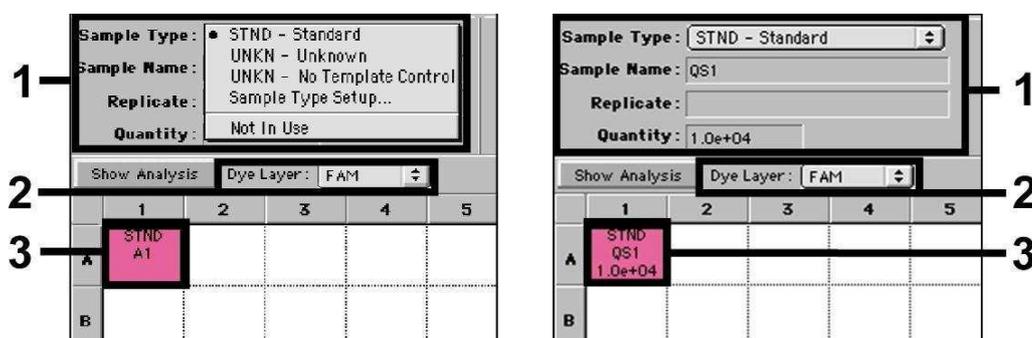


Abb. 11/12: Zuordnung der notwendigen Informationen zu den Plattenpositionen.

Zur Erstellung einer Standardkurve nutzen Sie pro PCR-Lauf alle mitgelieferten *Quantifizierungsstandards* (VZV LC/TM QS 1 - 4) und geben die zugehörigen Konzentrationen (siehe **1. Inhalt**) für jeden einzelnen Standard ein (*Quantity*, siehe Abb. 12). Dies ist jedoch nur möglich, wenn die mit Standards belegten Positionen zuvor mit Hilfe des Menüs *Sample Type* als solche definiert wurden.

8.5.2.4 Erstellung des Temperaturprofils

Zur Eingabe des Temperaturprofils wechseln Sie bitte zum *Thermal Cycler Conditions*-Menü auf der *Setup*-Oberfläche. Geben Sie entsprechend Abb. 13 das für die Detektion von VZV-DNA gültige Temperaturprofil ein. Kontrollieren Sie, dass das Reaktionsvolumen auf 50 µl eingestellt ist. Die Voreinstellungen der *Ramp*-Zeiten und des *Auto Increments* bleiben unverändert (*Ramp Time*: 0:00, *Auto Increment*: 0.0°C, 0.0 Seconds).

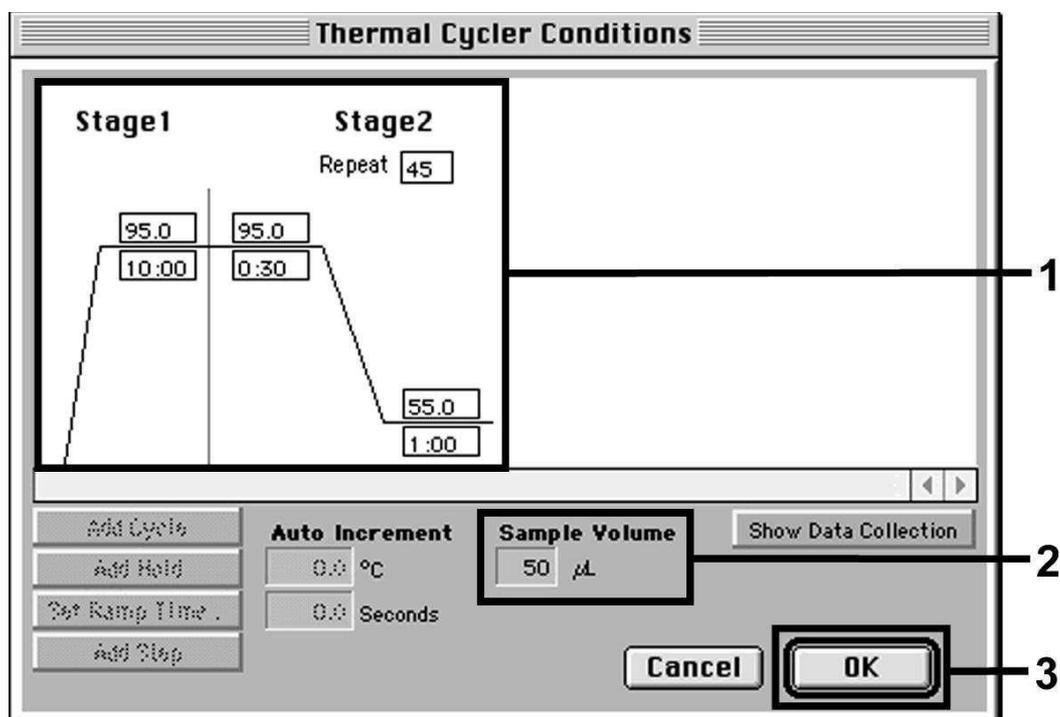


Abb. 13: Erstellung des Temperaturprofils.

Des Weiteren befindet sich in dem *Thermal Cycler Conditions*-Menü die

Option *Show Data Collection*. Durch Anwählen dieser Option gelangen Sie in das in Abb. 14 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 Laufs veranschaulicht. Entfernen Sie durch Anklicken 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.

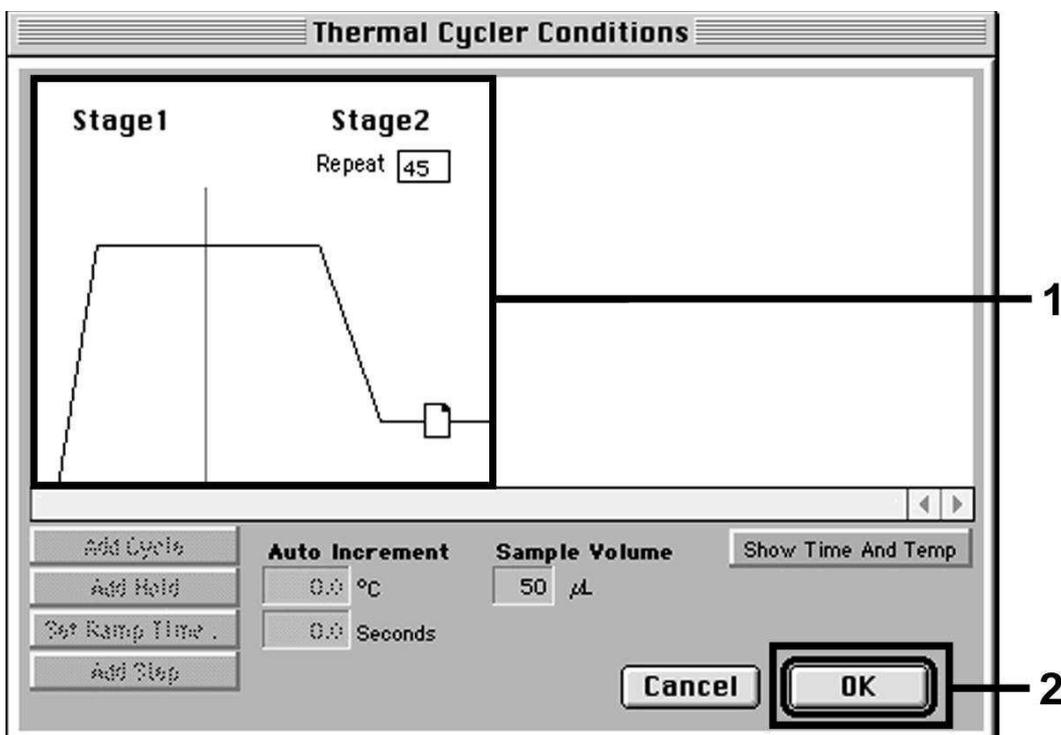


Abb. 14: Datenaufnahme (*Data Collection*).

8.5.2.5 Wichtige Zusatzeinstellungen

Zur Einstellung der Belichtungszeit (Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe), sowie zur Auswahl der *Pure Spectra/Background*-Dateien wechseln Sie bitte von der *Setup*-Ebene zur *Analysis*-Ebene. Wählen Sie den nun aktivierten, im Menü *Instrument* unter *Diagnostics* befindlichen Unterpunkt *Advanced Options* an. Nehmen Sie die Einstellungen gemäß Abb. 15 vor. Durch das Inaktivieren der Wahlfunktion *Spectra Components (Analysis)* werden bei der

erneuten Auswertung bereits analysierter Läufe automatisch die zum Zeitpunkt der Generierung der Daten im *Spectra Components*-Ordner abgelegten aktuellen Kalibrierungsdateien genutzt. Für eine Analyse alter Läufe unter Verwendung neu eingelesener *Spectra Components* aktivieren Sie bitte diese beiden Felder. Achten Sie darauf, dass für einen PCR-Lauf mit dem *artus VZV TM PCR Kit ROX* als Passive Referenz (*Reference*) eingestellt sein muss. Die gleichmäßige Verteilung des ROX-Farbstoffs auf alle PCR- Ansätze einer Lot mittels Durchmischung des *VZV TM Masters* gewährleistet das Erkennen und Verrechnen von *tube-to-tube* Variationen (Fluoreszenzunterschiede zwischen verschiedenen PCR-Ansätzen) durch die *Sequence Detection Software* (Normalisierung).

Beachte: Die Belichtungszeit (*Exposure Time*) bei Nutzung von 96-well Reaktionsplatten für optische Messungen in Verbindung mit optischen Klebefolien (*Optical Adhesive Covers*) oder optischen Reaktionsgefäßen mit flachen Deckeln beträgt zehn Millisekunden. Sollten Sie **optische Reaktionsgefäße mit gewölbten Deckeln** verwenden, so stellen Sie diese Zeitangabe bitte auf **25 Millisekunden** um.

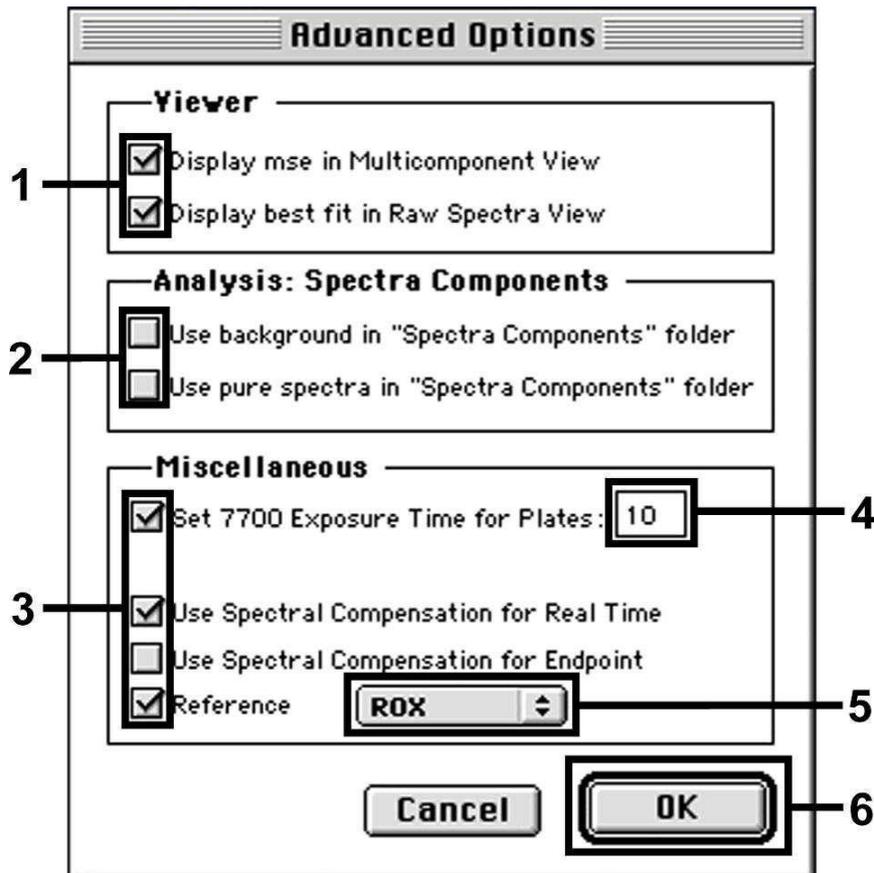


Abb. 15: Wichtige Zusatzeinstellungen (*Advanced Options*).

8.5.2.6 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. Dafür speichern Sie diese Datei im *Stationary File Format* ab. Vor dem Starten des aktuell programmierten PCR-Laufs achten Sie bitte darauf, diesen erneut im *Normal File Format* abzuspeichern. Damit stellen Sie die Speicherung der sich im Verlauf der PCR ansammelnden Daten sicher.

8.5.2.7 Starten des PCR-Laufs

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

8.5.3 Programmierung des ABI PRISM 7900HT SDS

Zur Detektion von VZV-DNA erstellen Sie auf Ihrem *ABI PRISM 7900HT SDS* ein Profil gemäß den folgenden sechs Arbeitsschritten (8.5.3.1 - 8.5.3.6). 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.

8.5.3.1 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. 16). 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 8.5.3.5 *Speichern des PCR-Laufs*). Bestätigen Sie Ihre Eingaben (*OK*).

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

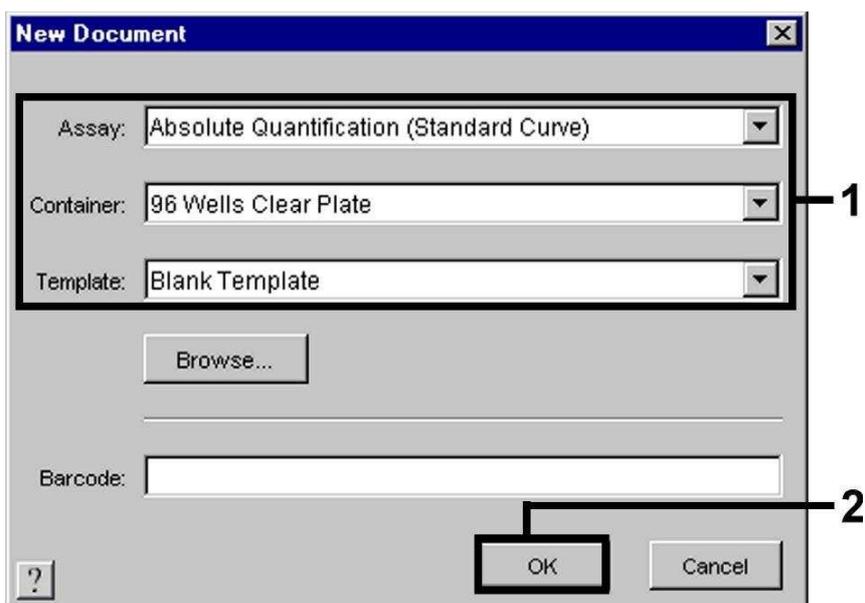


Abb. 16: Voreinstellungen bei der Erstellung eines neuen PCR-Laufs (*New Document*).

8.5.3.2 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 VZV-DNA sowie der *Internen Kontrolle* mit Hilfe des *artus VZV TM PCR Kits* sind die in der folgenden Tabelle angegebenen Reporter/Quencher zu definieren:

Nachweis	Reporter	Quencher
VZV-DNA	FAM	TAMRA
<i>Interne Kontrolle (VZV TMIC)</i>	VIC	Non Fluorescent

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

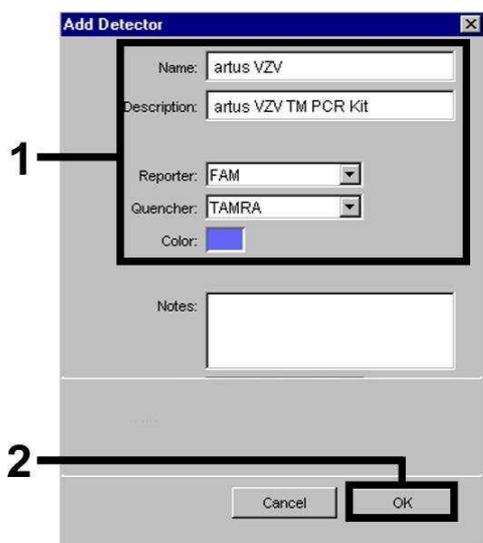


Abb. 17: Erstellung des VZV-spezifischen Detektors (*DetectorManager*).

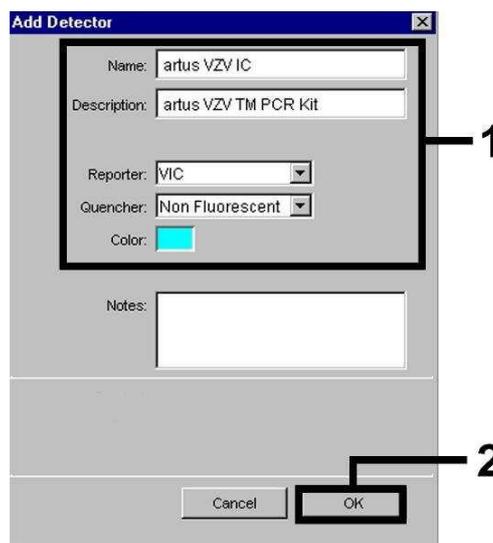


Abb. 18: Erstellung des IC-spezifischen Detektors (*DetectorManager*).

In dem nun erscheinenden Fenster definieren Sie (entsprechend Abb. 17 und Abb. 18) zum Nachweis von VZV-DNA die Reporter/Quencher-Kombination **FAM/TAMRA**, 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. 19). Schließen Sie das Fenster (*Done*).

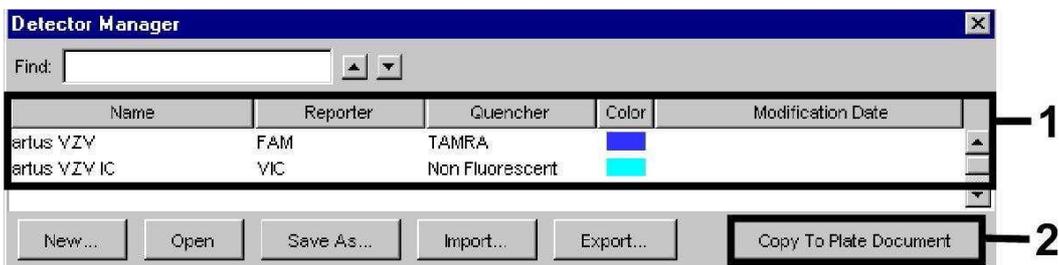


Abb. 19: Auswahl der Detektoren (*Detector Manager*).

8.5.3.3 Zuordnung der notwendigen Informationen zu den Platten- positionen

Nach dem Schließen des *Detector Managers* (*Done*) finden Sie die von Ihnen unter 8.5.3.2 ausgewählten Detektoren auf der *Setup*-Ebene (*Well Inspector*) tabellarisch gelistet wieder (siehe Abb. 20).

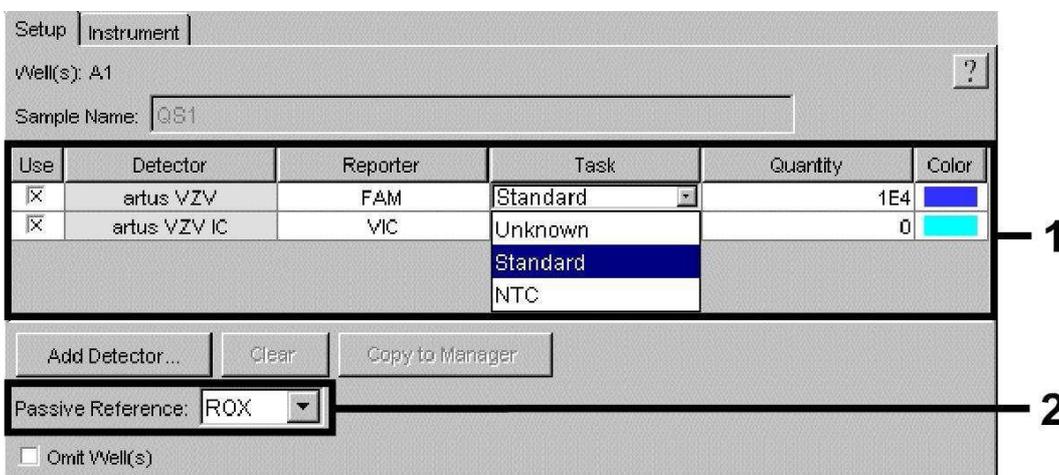


Abb. 20: Zuordnung der notwendigen Informationen zu den Plattenpositionen.

Markieren Sie die für den Nachweis von VZV-DNA belegten Positionen der Platte. Ordnen Sie diesen Positionen die ausgewählten Detektoren zu, indem Sie die *Use-Option* beider Detektoren 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 Probentyp die entsprechende Funktion (*Task*) gemäß der folgenden Tabelle aus:

Probentyp	Funktion (<i>Task</i>)	Konzentration (<i>Quantity</i>)	Reporter	Quencher
Probe	Unknown	-	FAM	TAMRA
Negativkontrolle	NTC	-	FAM	TAMRA
Standard	Standard	siehe 1. Inhalt	FAM	TAMRA

Zur Erstellung einer Standardkurve nutzen Sie pro PCR-Lauf alle mitgelieferten *Quantifizierungsstandards* (VZV LC/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 VZV 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 *VZV TM Masters* gewährleistet das Erkennen und Verrechnen von *tube-to-tube* Variationen (Fluoreszenzunterschiede zwischen verschiedenen PCR-Ansätzen) durch die *Sequence Detection Software* (Normalisierung).

8.5.3.4 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. 21 das für die Detektion von VZV-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).

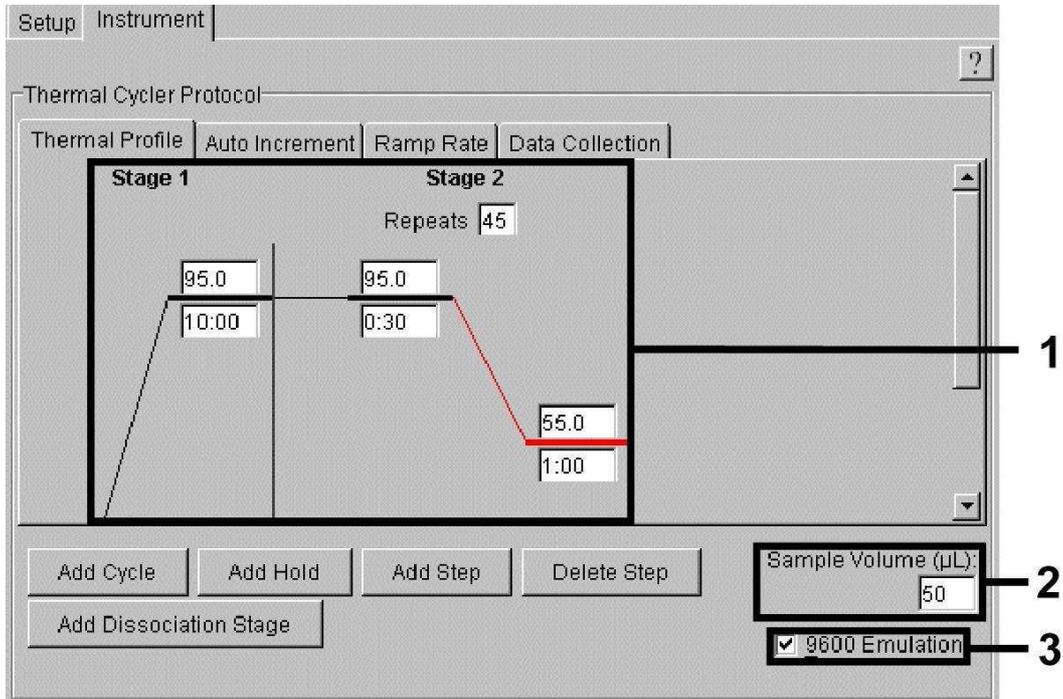


Abb. 21: Erstellung des Temperaturprofils.

Des Weiteren befindet sich auf der *Instrument*-Ebene die Option *Data Collection*. Durch Anwählen dieser Option gelangen Sie in das in Abb. 22 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 Laufs 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.

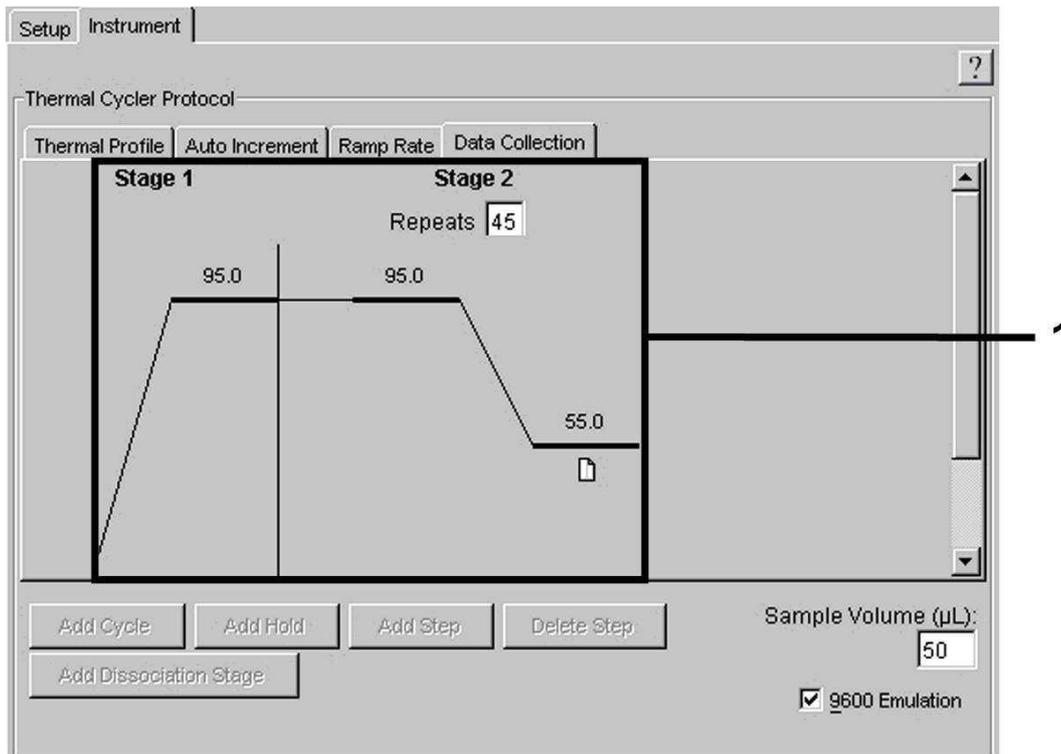


Abb. 22: Datenaufnahme (*Data Collection*).

8.5.3.5 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.

8.5.3.6 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 wird detektiert.

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

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

2. Kein FAM-Fluoreszenzsignal wird detektiert, sondern nur ein VIC-Fluoreszenzsignal (Signal der *Internen Kontrolle*).

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

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

3. Weder ein FAM-Fluoreszenzsignal noch ein VIC-Fluoreszenzsignal wird 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 23/24 (*ABI PRISM 7000 SDS*), 25/26 (*ABI PRISM 7700 SDS*) und 27/28 (*ABI PRISM 7900HT SDS*) wiedergegeben.

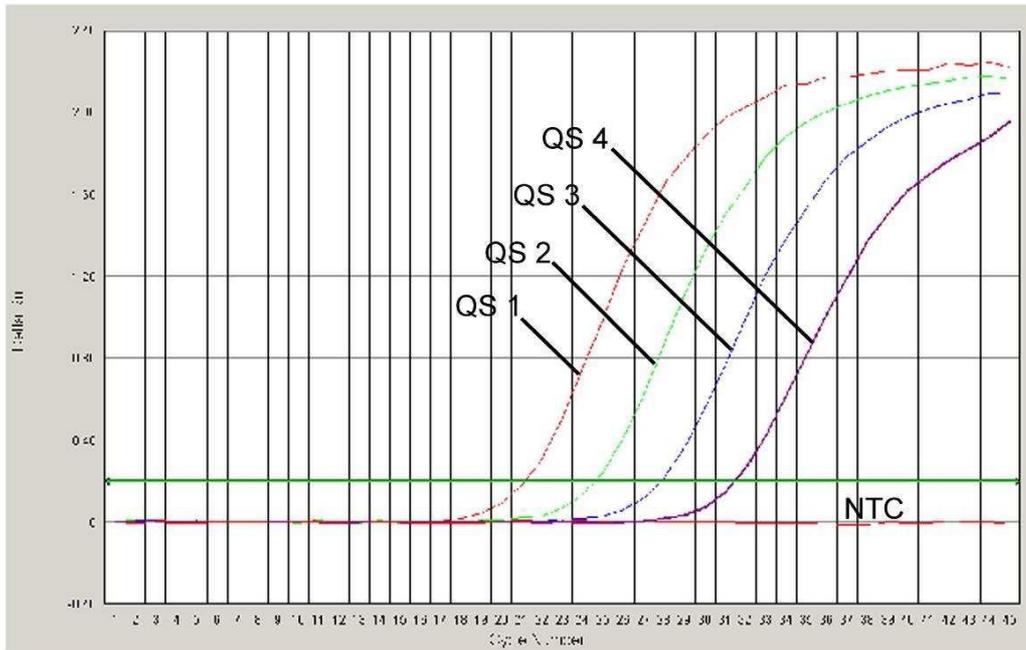


Abb. 23: Nachweis der *Quantifizierungsstandards* (VZV LC/TM QS 1 - 4) durch die Detektion eines FAM-Fluoreszenzsignals (**ABI PRISM 7000 SDS**). NTC: non-template control (Negativkontrolle).

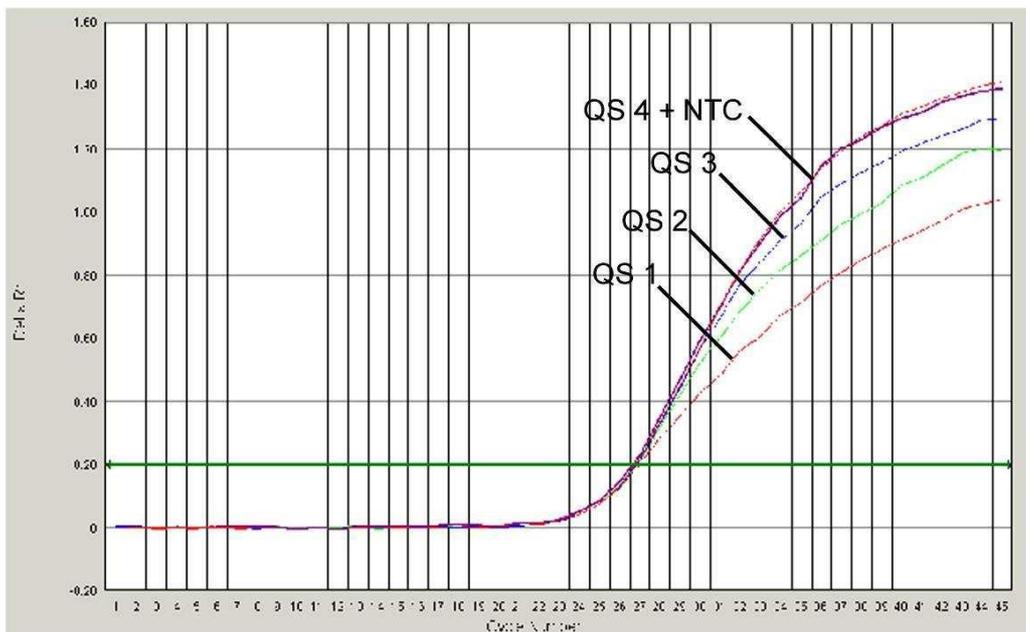


Abb. 24: Nachweis der *Internen Kontrolle* (IC) durch die Detektion eines VIC-Fluoreszenzsignals (**ABI PRISM 7000 SDS**) bei gleichzeitiger Amplifikation der *Quantifizierungsstandards* (VZV LC/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (Negativkontrolle).

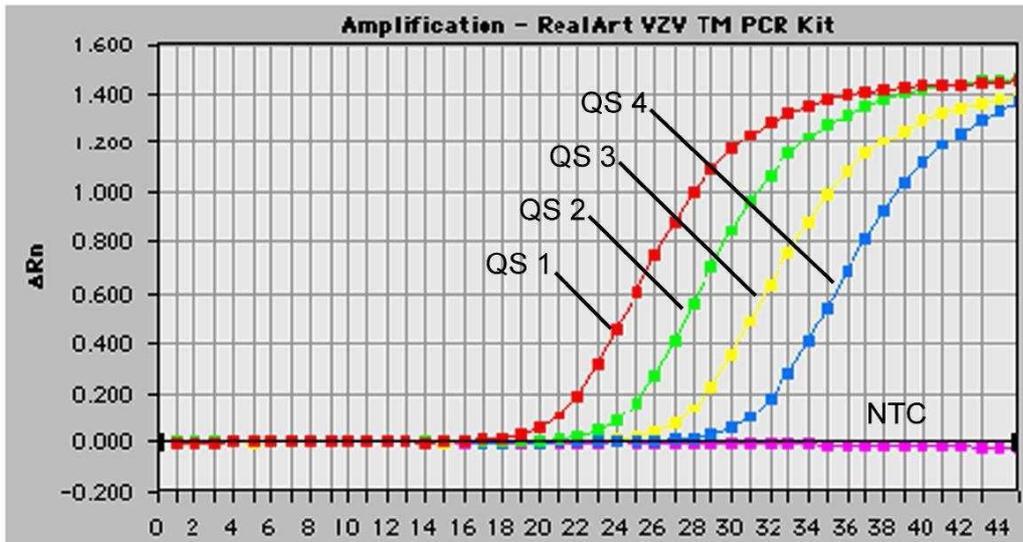


Abb. 25: Nachweis der Quantifizierungsstandards (VZV LC/TM QS 1 - 4) durch die Detektion eines FAM-Fluoreszenzsignals (ABI PRISM 7700 SDS). NTC: non-template control (Negativkontrolle).

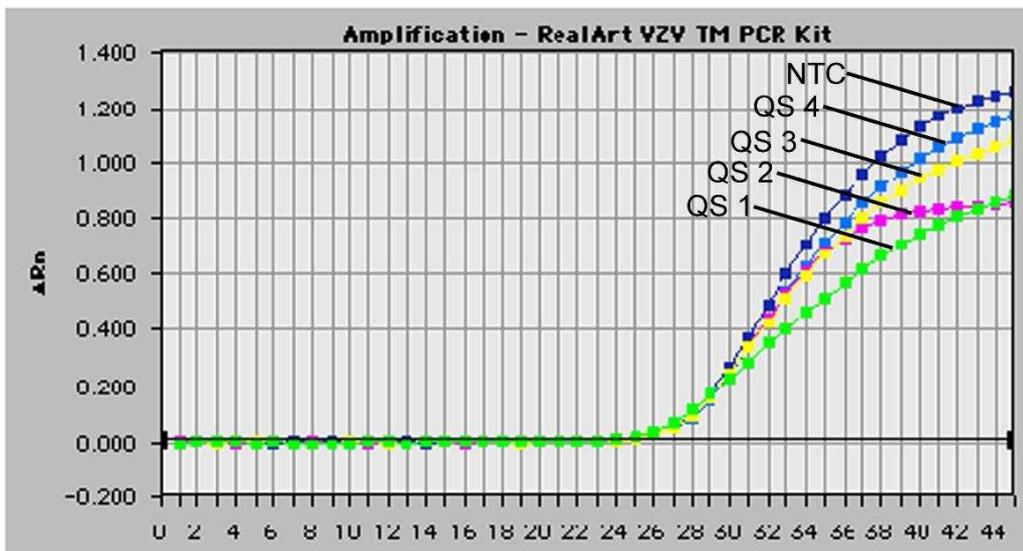


Abb. 26: Nachweis der Internen Kontrolle (IC) durch die Detektion eines VIC-Fluoreszenzsignals (ABI PRISM 7700 SDS) bei gleichzeitiger Amplifikation der Quantifizierungsstandards (VZV LC/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (Negativkontrolle).

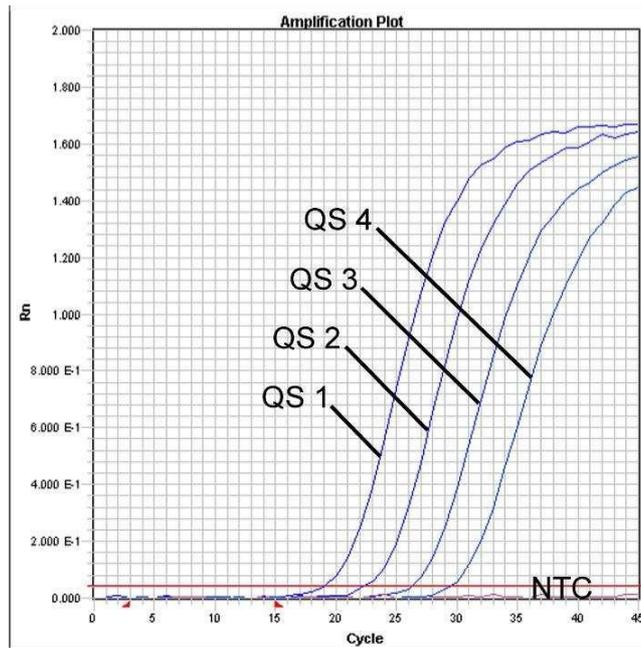


Abb. 27: Nachweis der *Quantifizierungsstandards* (VZV LC/TM QS 1 - 4) durch die Detektion eines FAM-Fluoreszenzsignals (**ABI PRISM 7900HT SDS**). NTC: non-template control (Negativkontrolle).

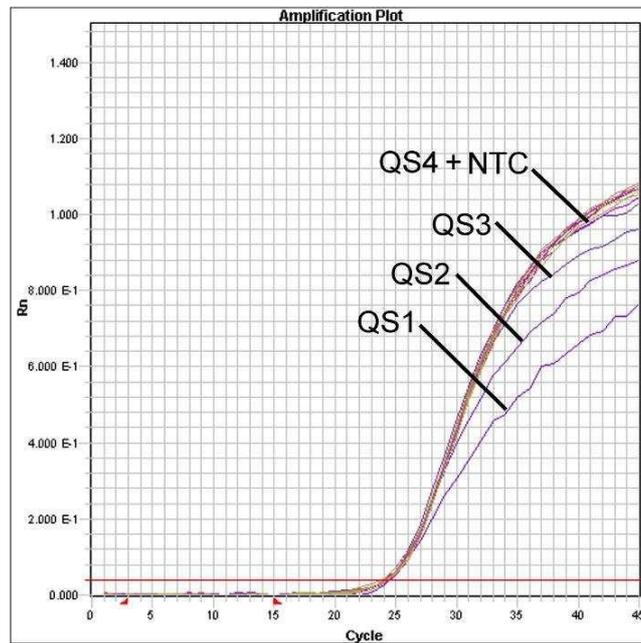


Abb. 28: Nachweis der *Internen Kontrolle* (IC) durch die Detektion eines VIC-Fluoreszenzsignals (**ABI PRISM 7900HT SDS**) bei gleichzeitiger Amplifikation der *Quantifizierungsstandards* (VZV LC/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (Negativkontrolle).

10. Troubleshooting

Kein FAM-Fluoreszenzsignal bei den Positivkontrollen (VZVLC/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 die analytische VZV-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* (siehe **8.5.2.4 Erstellung des Temperaturprofils**) überein (*ABI PRISM 7700 SDS*).
 - ❖ Analysieren Sie den PCR-Lauf mit korrigierten Einstellungen und wiederholen Sie die Auswertung (*Analysis*).
- Die Programmierung des Temperaturprofils des *ABI PRIS 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 VZV 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 der spezifischen VZV-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 VZV 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 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* VZV TM PCR Kits wurde eine Standard-Verdünnungsreihe von 60 bis nominal 0,019 VZV-Kopieäquivalenten*/ μ l erstellt. Diese wurde anschließend unter Benutzung des *artus* VZV TM PCR Kits mit den *ABI PRISM 7000*, *7700* 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 7700 SDS*) ist in Abb. 29 dargestellt.

Nachweisgrenze ($p = 0,05$)	
<i>ABI PRISM 7000 SDS</i>	0,4 Kopien/ μ l
<i>ABI PRISM 7700 SDS</i>	0,6 Kopien/ μ l
<i>ABI PRISM 7900HT SDS</i>	0,3 Kopien/ μ l

Dies bedeutet, dass 0,4 Kopien/ μ l (*ABI PRISM 7000 SDS*), 0,6 Kopien/ μ l (*ABI PRISM 7700 SDS*) bzw. 0,3 Kopien/ μ l (*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 fluoressenzphotometrisch bestimmt wurde.

Probit-Analyse: Varizella-Zoster-Virus (ABI PRISM 7700 SDS)

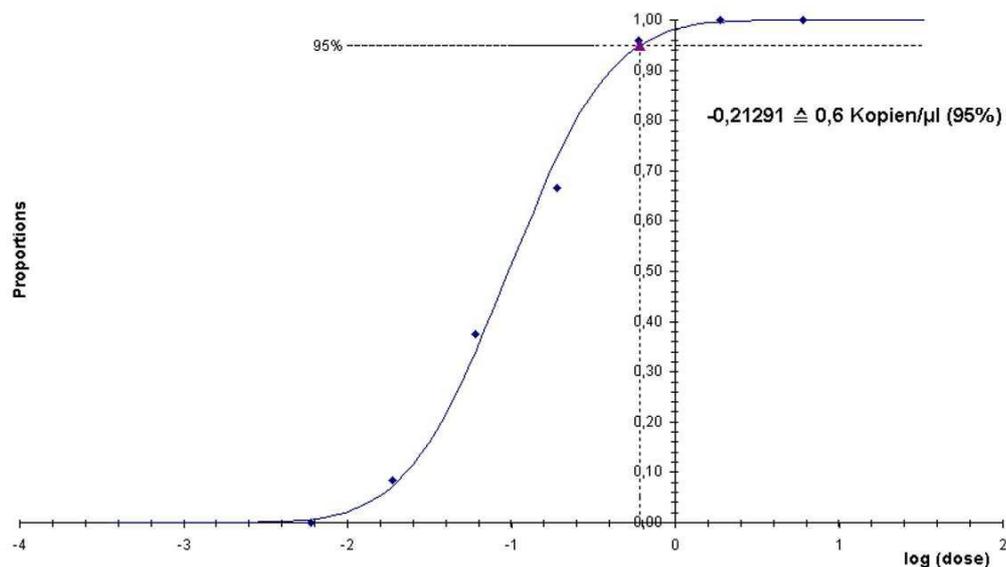


Abb. 29: Analytische Sensitivität des *artus* VZV TM PCR Kits (ABI PRISM 7700 SDS).

11.2 Spezifität

Die Spezifität des *artus* VZV 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 Sequenzvergleichsanalyse auf eventuelle Homologien zu allen in Genbanken publizierten Sequenzen überprüft worden. Auf diese Weise wurde auch die Detektierbarkeit aller relevanten Stämme kontrolliert.

Die Validierung der Spezifität erfolgte zudem an 30 verschiedenen VZV negativen Liquorproben, die mit den im VZV TM Master enthaltenen VZV spezifischen Primern und Sonden kein Signal generierten.

Für die Bestimmung der Spezifität des *artus* VZV 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	VZV (FAM)	Interne Kontrolle (VIC)
Humanes Herpesvirus 1 (Herpes-simplex-Virus 1)	-	+
Humanes Herpesvirus 2 (Herpes-simplex-Virus 2)	-	+
Humanes Herpesvirus 4 (Epstein-Barr-Virus)	-	+
Humanes Herpesvirus 5 (Zytomegalievirus)	-	+
Humanes Herpesvirus 6A	-	+
Humanes Herpesvirus 6B	-	+
Humanes Herpesvirus 7	-	+
Humanes Herpesvirus 8 (Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus)	-	+

11.3 Präzision

Die Präzisionsdaten für den *artus* VZV 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* VZV 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) und der daraus ermittelten quantitativen Werte in Kopien/ μ l (siehe Tabelle 3)

vorgenommen. Demnach beträgt die Gesamtstreuung einer beliebigen Probe der genannten Konzentration 0,72 % (Ct) bzw. 8,33 % (Konz.), für den Nachweis der *Internen Kontrolle* 1,40 % (Ct). Diese Werte basieren auf der Gesamtheit aller Einzelwerte der ermittelten Variabilitäten.

Tabelle 2: Präzisionsdaten auf Grundlage der Ct-Werte.

	Standard- abweichung	Varianz	Variations- koeffizient [%]
Intra-Assay Variabilität: VZV LC/TM QS 4	0,13	0,02	0,42
Intra-Assay Variabilität: <i>Interne Kontrolle</i>	0,08	0,01	0,25
Inter-Assay Variabilität: VZV LC/TM QS 4	0,13	0,02	0,40
Inter-Assay Variabilität: <i>Interne Kontrolle</i>	0,20	0,04	0,64
Inter-Chargen Variabilität: VZV LC/TM QS 4	0,30	0,09	0,93
Inter-Chargen Variabilität: <i>Interne Kontrolle</i>	0,61	0,37	1,98
Totalvarianz: VZV LC/TM QS 4	0,23	0,05	0,72
Totalvarianz: <i>Interne Kontrolle</i>	0,43	0,18	1,40

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

	Standard- abweichung	Varianz	Variations- koeffizient [%]
Intra-Assay Variabilität: VZV LC/TM QS 4	0,95	0,91	9,48
Inter-Assay Variabilität: VZV LC/TM QS 4	0,70	0,48	6,93
Inter-Chargen Variabilität: VZV LC/TM QS 4	0,96	0,91	9,52
Totalvarianz: VZV LC/TM QS 4	0,84	0,70	8,33

11.4 Robustheit

Die Überprüfung der Robustheit dient der Ermittlung der Gesamtausfallrate des *artus* VZV TM PCR Kits. Hierzu wurden 30 VZV negative Liquorproben mit je 1,8 Kopien/ μ l Elutionsvolumen VZV-Kontroll-DNA (dreifache Konzentration der analytischen Sensitivitätsgrenze) versetzt, mit dem QIAamp DNA Mini Kit aufgereinigt (siehe **8.1 DNA-Isolierung**) und mit dem *artus* VZV TM PCR Kit analysiert. Die Ausfallrate für VZV betrug für die Gesamtheit der Proben 0 %. Die Robustheit der *Internen Kontrolle* wurde zusätzlich durch die Aufreinigung und Analyse von 30 VZV negativen Liquorproben überprüft. Die Gesamtausfallrate betrug 0 %. Damit beträgt die Robustheit des *artus* VZV TM PCR Kits ≥ 99 %.

11.5 Reproduzierbarkeit

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

11.6 Diagnostische Evaluierung

Der *artus* VZV 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* VZV 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* VZV 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

artus VZV TM PCR Kit

Marken und Disclaimer

QIAGEN®, QIAamp®, artus®, BioRobot®, EZ1®, UltraSens® (QIAGEN Gruppe); ABI PRISM®; 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 VZV TM PCR Kit, die BioRobot EZ1 DSP Workstation und die EZ1 DSP Virus Kit und Card sind CE-markierte diagnostische Instrumente und Kits in Übereinstimmung 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

