

# artus<sup>®</sup> SARS RG RT-PCR Kit

## Handbuch



24 (Katalog Nr. 4511263)

Quantitatives In-vitro-Diagnostikum

Zur Verwendung mit dem  
artus<sup>™</sup> 3000 und dem Rotor-Gene<sup>®</sup> 3000

Version 1



4511263



1046936DE



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, DEUTSCHLAND

R2

**MAT**

1046936DE



## **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](http://www.qiagen.com).

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Inhalt.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Lagerung.....</b>	<b>5</b>
<b>3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte.....</b>	<b>6</b>
<b>4. Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen .....</b>	<b>6</b>
<b>5. Erreger-Informationen.....</b>	<b>10</b>
<b>6. Prinzip der Real-Time PCR .....</b>	<b>11</b>
<b>7. Produktbeschreibung .....</b>	<b>11</b>
<b>8. Protokoll.....</b>	<b>12</b>
8.1 Präanalytik: Entnahme, Lagerung und Transport von Proben.....	12
8.2 RNA-Isolierung .....	13
8.3 Interne Kontrolle .....	15
8.4 Quantifizierung .....	16
8.5 Vorbereitung der PCR .....	18
8.6 Programmierung des <i>artus 3000</i> bzw. <i>Rotor-Gene3000</i> .....	22
<b>9. Auswertung.....</b>	<b>27</b>
<b>10. Troubleshooting .....</b>	<b>29</b>
<b>11. Spezifikationen .....</b>	<b>31</b>
11.1 Analytische Sensitivität .....	31
11.2 Spezifität.....	32
11.3 Präzision.....	30
11.4 Robustheit .....	31
11.5 Reproduzierbarkeit .....	32

11.6 Diagnostische Evaluierung .....	32
<b>12. Besondere Hinweise zum Produkt-Gebrauch .....</b>	<b>32</b>
<b>13. Sicherheitsinformationen .....</b>	<b>32</b>
<b>14. Qualitätskontrolle .....</b>	<b>33</b>
<b>15. Literatur.....</b>	<b>33</b>
<b>16. Erklärung der Symbole .....</b>	<b>34</b>

## artus SARS RG RT-PCR Kit

Für die Verwendung mit dem artus 3000 bzw. dem Rotor-Gene 3000\*.

### 1. Inhalt

	Beschriftung und Inhalt	Art.-Nr. 4511263 24 Reaktionen
Blau	SARS-CoV RG/TM Master	2 x 12 rxns
Rot	SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 <sup>xx</sup> 1 x 10 <sup>4</sup> cop/μl	1 x 200 μl
Rot	SARS-CoV LC/RG/TM QS 2 <sup>xx</sup> 1 x 10 <sup>3</sup> cop/μl	1 x 200 μl
Rot	SARS-CoV LC/RG/TM QS 3 <sup>xx</sup> 1 x 10 <sup>2</sup> cop/μl	1 x 200 μl
Rot	SARS-CoV LC/RG/TM QS 4 <sup>xx</sup> 1 x 10 <sup>1</sup> cop/μl	1 x 200 μl
Grün	SARS-CoV LC/RG/TM IC <sup>xx</sup>	1 x 1.000 μl
Weiß	Water (PCR grade)	1 x 1.000 μl

<sup>xx</sup>QS = Quantifizierungsstandard  
IC = Interne Kontrolle

### 2. Lagerung

Die Komponenten des artus SARS RG RT-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 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.

---

\* Das artus SARS RG RT-PCR Kit kann auch in Verbindung mit dem Rotor-Gene™ 2000 verwendet werden.

### 3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- Puderfreie Laborhandschuhe
- RNA-Isolierungskit (siehe 8.2 RNA-Isolierung)
- Pipetten (einstellbar)
- Sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Vortex-Mixer
- Tischzentrifuge mit Rotor für 2 ml-Reaktionsgefäße
- *artus 3000* bzw. *Rotor-Gene 3000*
- 0,1 ml PCR-Reaktionsgefäße für die Verwendung des 72-well-Rotors (0.1 ml Strip Tubes and Caps, QIAGEN Hamburg, Cat. No.: 4699982;  
0.1 ml tubes, Corbett Research, Cat. No.: ST-1001)
- Alternativ: 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße für die Verwendung des 36-well-Rotors (z. B. 0.2 ml PCR Tubes, QIAGEN Hamburg, Cat. No.: 4699983; 0.2 ml tubes, Corbett Research, Cat. No.: SE- 1003F)
- Kühlblock (72-/96-Well Loading Block, QIAGEN Hamburg, Cat. No.: 4699980/4699981; 72/96 well loading block, Corbett Research, Cat.No.:3001-008/3001-009)

### 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 (72/96 well loading block) arbeiten.



## 5. Erreger-Informationen

Coronaviren gehören zur Familie der *Coronaviridae* und sind große umhüllte Positiv-Strang-RNA-Viren, die hochvirulente Krankheiten bei Menschen und Haustieren verursachen. Zwei bisher bekannte humane Coronaviren sind für ein Drittel der normalen Erkältungskrankheiten und nosokomialen Infekte der oberen Atemwege bei Frühgeborenen verantwortlich.

Ein neues Mitglied der Coronavirus-Familie gilt als Verursacher des schweren akuten Atemwegssyndroms („Severe Acute Respiratory Syndrome“, SARS). Ein Teil des Polymerase-Gens des SARS-Coronavirus (SARS-CoV) wurde bei einem Patienten durch das Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg und durch kooperierende Laboratorien per PCR identifiziert. Auf der Basis dieses Tests wurde ein kommerzielles Real-Time RT-PCR-System für den direkten Nachweis des SARS-CoV entwickelt. Die PCR kann genetisches Material des SARS-CoV in verschiedenen Proben (Blut, Atemwegs-Sekrete oder Gewebe) detektieren.

### Auswertung der Testergebnisse

**Wichtig:** Beachten Sie bitte die offiziellen Hinweise der Weltgesundheitsorganisation (WHO) auf folgender Internetadresse: <http://www.who.int/csr/sars/guidelines/en>.

**Positive Testergebnisse:** Ein positiver SARS-CoV-Test weist darauf hin, dass eine SARS-CoV-Infektion vorliegt, auch wenn der Patient keine SARS-Symptome zeigt.

**Negative Testergebnisse:** Ein negativer SARS-CoV-Test schließt nicht aus, dass der Patient an SARS erkrankt ist. Die Gründe für ein negatives Testergebnis trotz einer SARS-Symptomatik können sein:

- Zum Zeitpunkt der Probenentnahme war das Virus in dem Probenmaterial nicht enthalten (es ist derzeit unklar, in welchem

Stadium der SARS-CoV-Pathogenese das Virus in einem bestimmten Probenmaterial nachweisbar ist).

- Der Patient zeigt SARS-ähnliche Symptome, die durch einen anderen Erreger verursacht werden.

## 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 SARS RG RT-PCR Kit* ist ein gebrauchsfertiges System für den Nachweis von SARS-CoV-RNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) im *artus 3000* bzw. *Rotor-Gene 3000*. Der *SARS-CoV RG/TM Master* beinhaltet Reagenzien und Enzyme für die reverse Transkription und spezifische Amplifikation eines 92 bp langen Abschnitts des SARS-CoV-Genoms sowie für die unmittelbare Detektion des Amplifikats im Fluoreszenz-Kanal Cycling A.FAM des *artus 3000* bzw. *Rotor-Gene 3000*. Daneben enthält der *artus SARS RG RT-PCR Kit* zum Nachweis einer möglichen PCR-Inhibition ein zweites heterologes Amplifikationssystem. Dieses wird als *Interne Kontrolle (IC)* im Fluoreszenz-Kanal Cycling A.JOE detektiert. Dabei wird die Nachweisgrenze der analytischen SARS-CoV RT-PCR (siehe **11.1 Analytische Sensitivität**) nicht herabgesetzt. Es werden externe Positivkontrollen (*SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4*) mitgeliefert, mit deren Hilfe eine Bestimmung der

Erregerlast vorgenommen werden kann. Dazu lesen Sie bitte den Absatz **8.4 Quantifizierung**.

## **8. Protokoll**

### **8.1 Präanalytik: Entnahme, Lagerung und Transport von Proben**

**Beachte:** Alle Proben sind als potentiell infektiös zu behandeln.

**Wichtig:** Bisher vorliegende Daten weisen Sputum als am besten geeignetes Probenmaterial zum SARS-CoV-Nachweis aus. Wir empfehlen daher die Verwendung dieses Materials mit dem *artus* SARS RG RT-PCR Kit.

Die interne Validierung des *artus* SARS RG RT-PCR Kits wurde mit Serumproben durchgeführt. Andere Probenmaterialien wie BAL, nasopharyngeale Spülung, Abstriche, Lungengewebe und Sputum sind noch nicht vollständig validiert. Bitte nutzen Sie nur die empfohlenen RNA-Isolierungs-Kits (siehe **8.2 RNA-Isolierung**) für die Proben-Vorbereitung.

Bei bestimmten Probenmaterialien sind besondere Vorschriften zur Entnahme, Lagerung und Transport unbedingt zu berücksichtigen.

**Beachte:** Beachten Sie auch hierzu die offiziellen Hinweise der WHO auf folgender Internetseite: <http://www.who.int/csr/sars/sampling/en/>.

#### **8.1.1 Probenentnahme**

Zur Entnahme von Abstrichproben bitte folgende Materialien verwenden:  
Nur Abstrichtupfer mit Dacron<sup>®</sup>- oder Rayon-Spitzen auf Stielen aus Kunststoff verwenden. **Keine Abstrichtupfer mit Holz- oder Aluminiumstiel benutzen.**

#### **8.1.2 Probenlagerung**

*Die Testleistung kann durch routinemäßiges Einfrieren oder lÜngere Lagerung der Proben beeintrÜchtigt werden.*

Die Lagerung der Proben erfolgt bei 2 - 8°C. (Wenn die Abstrichproben zu

einem Untersuchungslabor verschickt werden müssen, sind sie sobald wie möglich nach Entnahme in Übereinstimmung mit den Laborvorschriften für den Transport von SARS-CoV zu versenden.)

Abstrichproben, die nicht direkt nach Eingang im Labor getestet werden, sind bei 2 - 8°C zu lagern und innerhalb von einem Tag zu verarbeiten. Abstrichproben, die nicht innerhalb von einem Tag nach Entnahme verarbeitet werden können, müssen bei -20°C oder kälter gelagert und innerhalb von 30 Tagen nach Entnahmedatum getestet werden.

### 8.1.3 Probentransport

Abstrichproben müssen gekühlt transportiert werden.

Wenn die Abstrichproben zu einem Labor verschickt werden müssen, sind sie sobald wie möglich nach der Entnahme in Übereinstimmung mit den Laborvorschriften für den Transport unter Kühlung zu versenden. Die Proben sind nach den geltenden lokalen und staatlichen Vorschriften für den Transport von krankheitsverursachenden Stoffen zu versenden.\*

## 8.2 RNA-Isolierung

RNA-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 RNA-Isolierung entsprechend der Vorschrift durch. Folgende Isolierungskits werden empfohlen:

Probenmaterial	Aufreinigungskit	Katalognummer	Hersteller	Carrier-RNA
Sputum, Serum, BAL, nasopharyngeale Spülung, Urin	QIAamp Viral RNA Mini Kit (50)	52 904	QIAGEN	enthalten
Lungengewebe	RNeasy Mini Kit (50)	74 104	QIAGEN	nicht enthalten

\* International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41st Edition, 2000.704.

Bei Verwendung von Sputum als Probenmaterial beachten Sie bitte folgenden Hinweis: Zur Probenaufbereitung mischen Sie die Probe in einem Reaktionsgefäß zu gleichen Teilen mit einer 0,9 % NaCl-Lösung, die 1 % N-Acetylcystein (Sigma Kat.-Nr. A 8199) enthält (z. B. 300 µl Sputum + 300 µl NaCl-Gemisch). Nach einer Inkubation des Gemischs bei Raumtemperatur für 30 min setzen Sie 140 µl des Lysats für die nachfolgende RNA-Aufreinigung mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit ein und folgen den weiteren Protokollangaben des Herstellers.

- 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 Viral RNA Mini 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 µg/µl, 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 **8.3 Interne Kontrolle**) gemäß folgendem Pipettierschema frisch hergestellt werden.

Anzahl der Proben	1	12
Lysispuffer AVL	560 µl	6.720 µl
Carrier-RNA (1 µg/µl)	5,6 µl	67,2 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>565,6 µl</b>	<b>6.787,2 µl</b>
<b>Volumen für die Aufreinigung</b>	<b>560 µl</b>	<b>je 560 µl</b>

- c. Setzen Sie das frisch hergestellte Gemisch aus Lysispuffer und Carrier-RNA sofort für die Aufreinigung ein. Eine Lagerung des Gemisches ist nicht möglich.
- 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* SARS RG RT-PCR Kit ist nicht geeignet für Aufreinigungsverfahren, die auf der Grundlage von **Phenol** arbeiten.

**Wichtig:** Die *Interne Kontrolle* des *artus* SARS RG RT-PCR Kits kann direkt in die Aufreinigung eingesetzt werden (siehe **8.3 Interne Kontrolle**).

## 8.3 Interne Kontrolle

Es wird eine *Interne Kontrolle* (*SARS-CoV LC/RG/TM IC*) mitgeliefert. Mit dieser haben Sie die Möglichkeit, **sowohl die Aufreinigung der RNA als auch eine mögliche Inhibition der PCR** zu kontrollieren (siehe Abb. 1). Für diese Anwendung geben Sie die *Interne Kontrolle* in einem Verhältnis von 0,1  $\mu$ l pro 1  $\mu$ l Elutionsvolumen zur Aufreinigung hinzu. Verwenden Sie beispielsweise den QIAamp Viral RNA Mini Kit und eluieren die RNA in 60  $\mu$ l AVE-Puffer, dann setzen Sie bitte 6  $\mu$ l der *Internen Kontrolle* ein. Wenn Sie z. B. in 50  $\mu$ l eluieren, so setzen Sie entsprechend 5  $\mu$ l ein. Die Menge der eingesetzten *Internen Kontrolle* ist **nur** abhängig vom Elutionsvolumen. Die *Interne Kontrolle* und Carrier-RNA (siehe **8.2 RNA-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 Inhibition der PCR** verwendet werden (siehe Abb. 2). Hierfür geben Sie pro Ansatz 1  $\mu\text{l}$  der *Internen Kontrolle* direkt zu 15  $\mu\text{l}$  SARS-CoV RG/TM Master hinzu. Verwenden Sie für jede PCR-Reaktion 15  $\mu\text{l}$  des so hergestellten Master Mixes\* und fügen Sie anschließend 10  $\mu\text{l}$  der aufgereinigten Probe hinzu. Sollten Sie einen Lauf für mehrere Proben ansetzen, so erhöhen Sie die benötigten Mengen des SARS-CoV RG/TM Masters und der *Internen Kontrolle* entsprechend der Probenzahl (siehe **8.5 Vorbereitung der PCR**).

## 8.4 Quantifizierung

Die mitgelieferten *Quantifizierungsstandards* (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) wurden gegen die Standards des Robert-Koch-Instituts, Berlin, kalibriert. Sie werden wie eine bereits aufgereinigte Probe behandelt und im gleichen Volumen eingesetzt (10  $\mu\text{l}$ ). Um im *artus 3000* bzw. *Rotor-Gene 3000* eine Standardkurve zu erstellen, setzen Sie bitte alle vier mitgelieferten *Quantifizierungsstandards* ein, definieren Sie diese im Menüfenster *Edit Samples* als Standards und geben Sie die angegebenen Konzentrationen ein (siehe *artus 3000 Software Manual* bzw. *Rotor-Gene Manual*, Version 4.6). Auch für nachfolgende Quantifizierungen kann diese Standardkurve verwendet werden, wenn mindestens ein Standard **einer** definierten

Konzentration während des aktuellen Laufs mitgeführt wird. Dafür ist es erforderlich, die zuvor erstellte Standardkurve zu importieren (siehe *artus 3000 Software Manual* bzw. *Rotor-Gene Manual*, Version 4.6). Bei dieser Form der Quantifizierung muss jedoch berücksichtigt werden, dass es infolge der Variabilität zwischen den PCR-Läufen zu Abweichungen im Ergebnis kommen kann.

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

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

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).

---

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

**Wichtig:** Zur Vereinfachung der quantitativen Auswertung von *artus*- Systemen am *artus 3000* bzw. *Rotor-Gene 3000* gibt es unter [www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX](http://www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX) einen Leitfaden (Technical Note zur Quantifizierung am *artus 3000* bzw. *Rotor-Gene 3000*).

## 8.5 Vorbereitung der PCR

Stellen Sie sicher, dass der Kühlblock (Zubehör des *artus 3000* bzw. *Rotor-Gene 3000*) auf etwa +4°C vorgekühlt ist. Setzen Sie die für die geplanten Reaktionen erforderliche Anzahl PCR-Reaktionsgefäße ein. Beachten Sie dabei, 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 (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4)*. Alle Reagenzien sollten vor Testbeginn vollständig bei Raumtemperatur aufgetaut, gut durchmischt (mehrfaches Auf- und Abpipettieren oder mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes) und anschließend anzentrifugiert werden.

Wollen Sie mit der *Internen Kontrolle* sowohl die **Aufreinigung der RNA als auch eine mögliche Inhibition der PCR** kontrollieren, so muss zuvor die *Interne Kontrolle* zur Aufreinigung zugegeben werden (siehe **8.3 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	SARS-CoV RG/TM Master		15 µl	180 µl
	SARS-CoV LC/RG/TM IC		0 µl	0 µl
	Gesamtvolumen		15 µl	180 µl
2. Ansetzen der PCR-Reaktion	Master Mix		15 µl	je 15 µl
	Probe		10 µl	je 10 µl
	Gesamtvolumen		25 µl	je 25 µl

Wollen Sie die *Interne Kontrolle* **ausschließlich zur Kontrolle einer PCR-**

**Inhibition** einsetzen, so muss sie direkt zum *SARS-CoV RG/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	<i>SARS-CoV RG/TM Master</i>	15 $\mu$ l	180 $\mu$ l
	<i>SARS-CoV LC/RG/TM IC</i>	1 $\mu$ l	12 $\mu$ l
	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>16 <math>\mu</math>l*</b>	<b>192 <math>\mu</math>l*</b>
2. Ansetzen der PCR-Reaktion	Master Mix	15 $\mu$ l*	je 15 $\mu$ l*
	Probe	10 $\mu$ l	je 10 $\mu$ l
	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>	<b>je 25 <math>\mu</math>l</b>

Pipettieren Sie in jedes PCR-Reaktionsgefäß 15  $\mu$ l des Master Mixes. Anschließend geben Sie 10  $\mu$ l des Eluats aus der RNA-Isolierung hinzu und mischen gründlich durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren. Entsprechend müssen als Positivkontrolle 10  $\mu$ l von mindestens einem der Quantifizierungsstandards (*SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4*) und als Negativkontrolle 10  $\mu$ l Wasser (*Water, PCR grade*) eingesetzt werden. Verschließen Sie die PCR-Reaktionsgefäße. Achten Sie darauf, dass ein *Locking Ring* (Zubehör des *artus 3000* bzw. *Rotor-Gene 3000*) auf den Rotor aufgesetzt wird, um ein unbeabsichtigtes Öffnen der Reaktionsgefäße während des Laufs zu verhindern.

---

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

## Zugabe der *Internen Kontrolle* zur Aufreinigung

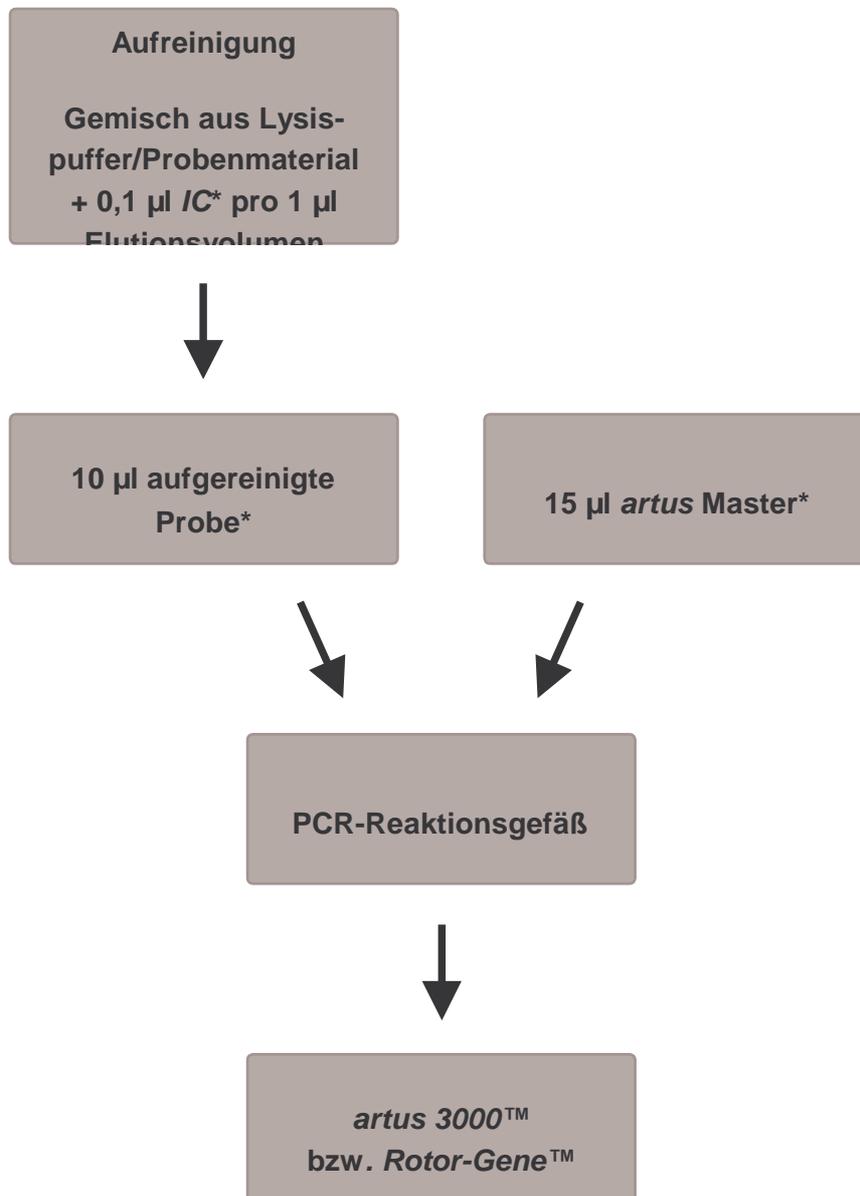


Abb. 1: Schematischer Arbeitsablauf zur Kontrolle von Aufreinigung und PCR-Inhibition.

\*

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

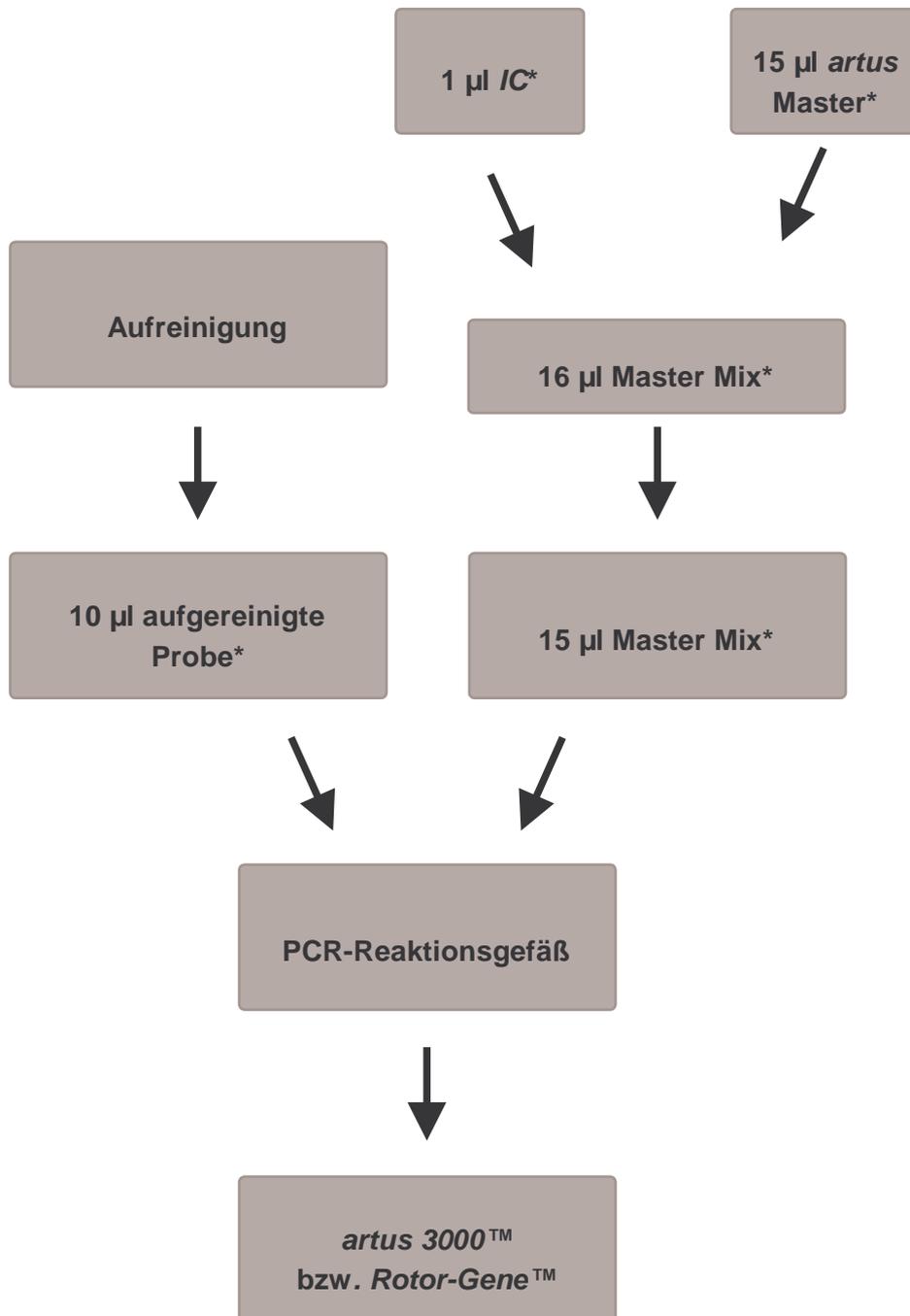


Abb. 2: Schematischer Arbeitsablauf zur Kontrolle der PCR-Inhibition.

\*

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

## 8.6 Programmierung des *artus 3000* bzw. *Rotor-Gene 3000*

Zur Detektion der SARS-CoV-RNA erstellen Sie auf Ihrem *artus 3000* bzw. *Rotor-Gene 3000* ein Temperaturprofil gemäß den folgenden sechs Arbeitsschritten (siehe Abb. 3 - 8).

- |    |  |        |
|----|--|--------|
| A. | Einstellung allgemeiner PCR-Parameter                            | Abb. 3 |
| B. | Reverse Transkription der RNA                                    | Abb. 4 |
| C. | Initiale Aktivierung des Hot Start-Enzyms                        | Abb. 5 |
| D. | Amplifikation der cDNA   | Abb. 6 |
| E. | Einstellung der Sensitivität der Fluoreszenz-Kanäle              | Abb. 7 |
| F. | Start des <i>artus 3000</i> - bzw. <i>Rotor-Gene 3000</i> -Laufs | Abb. 8 |

Alle Angaben beziehen sich auf die *artus 3000*-Software- Version 5.0.69 bzw. *Rotor-Gene*-Software-Version 4.6.94. Einzelheiten zur Programmierung des *artus 3000* bzw. *Rotor-Gene 3000* entnehmen Sie bitte dem *artus 3000 Software Manual* bzw. dem *Rotor-Gene Manual*, Version 4.6. In den Abbildungen sind diese Einstellungen durch schwarze Rahmen hervorgehoben.

Übertragen Sie zunächst das PCR-Reaktionsvolumen in das Menüfenster *New Experiment Wizard* (siehe Abb. 3).

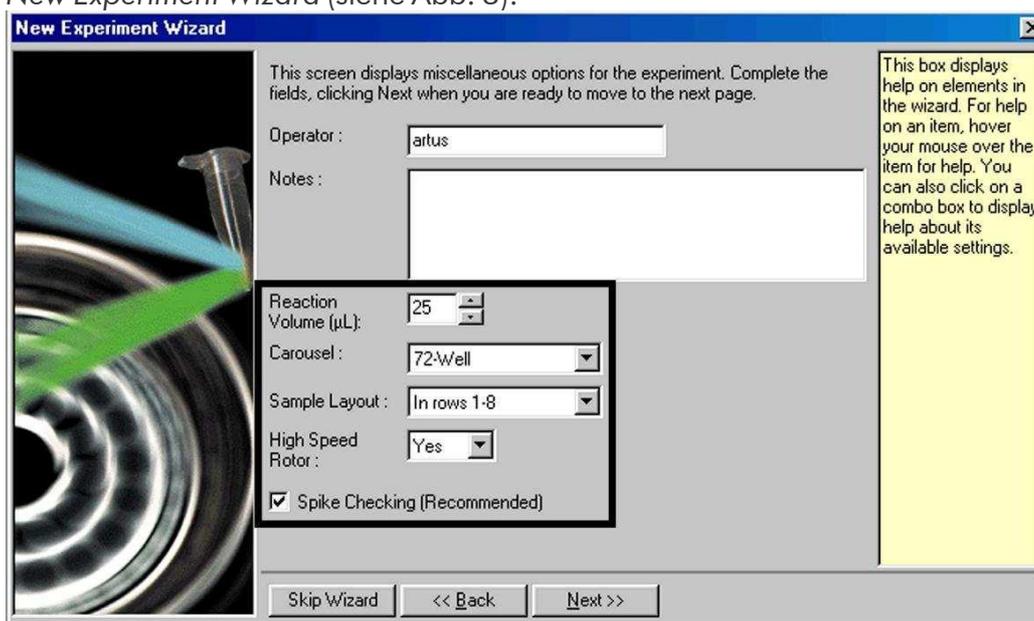


Abb. 3: Einstellung allgemeiner PCR-Parameter.

Die Programmierung des Temperaturprofils wird durch Aktivierung der Funktion *Edit* im nächsten *New Experiment Wizard*-Menüfenster vorgenommen (siehe Abb. 4, 5 und 6).

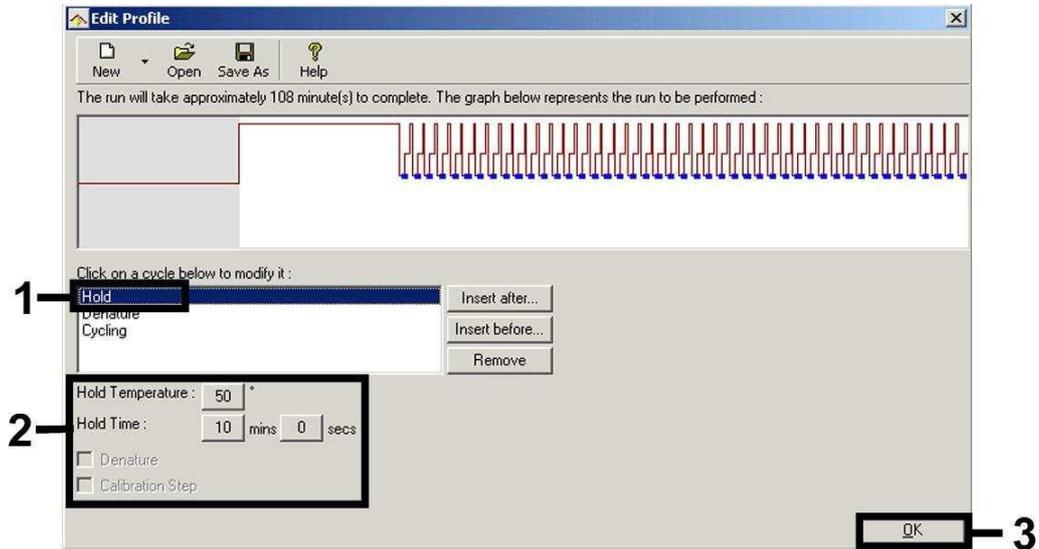


Abb. 4: Reverse Transkription der RNA.

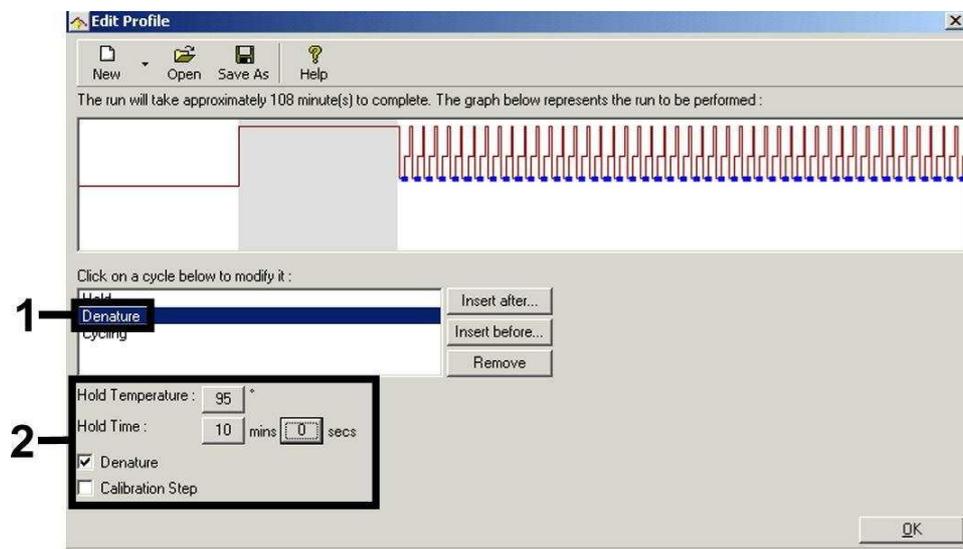


Abb. 5: Initiale Aktivierung des Hot Start-Enzyms.

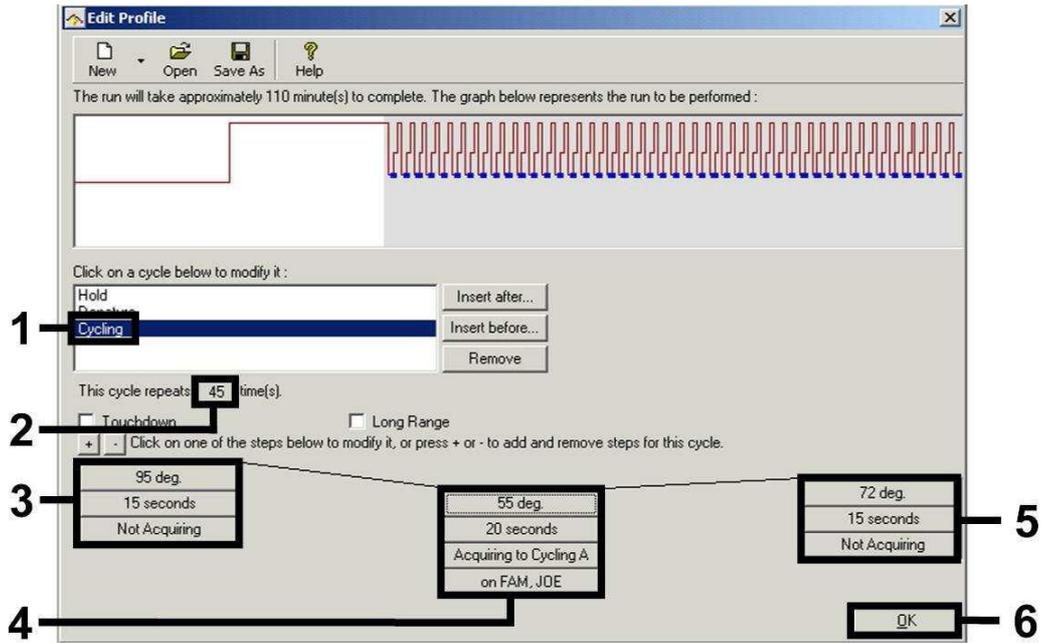


Abb. 6: Amplifikation der cDNA.

Entsprechend der Fluoreszenz-Intensitäten in den PCR-Ansätzen muss der Messbereich der Fluoreszenz-Kanäle bestimmt werden. Diese Einstellung erfolgt im Menüfenster *Auto Gain Calibration Setup* (Aktivierung im Menüfenster *New Experiment Wizard* unter *Calibrate*). Bitte stellen Sie die Kalibrierungs-Temperatur auf die Annealing-Temperatur des Amplifikations-Programms ein (siehe Abb. 7).

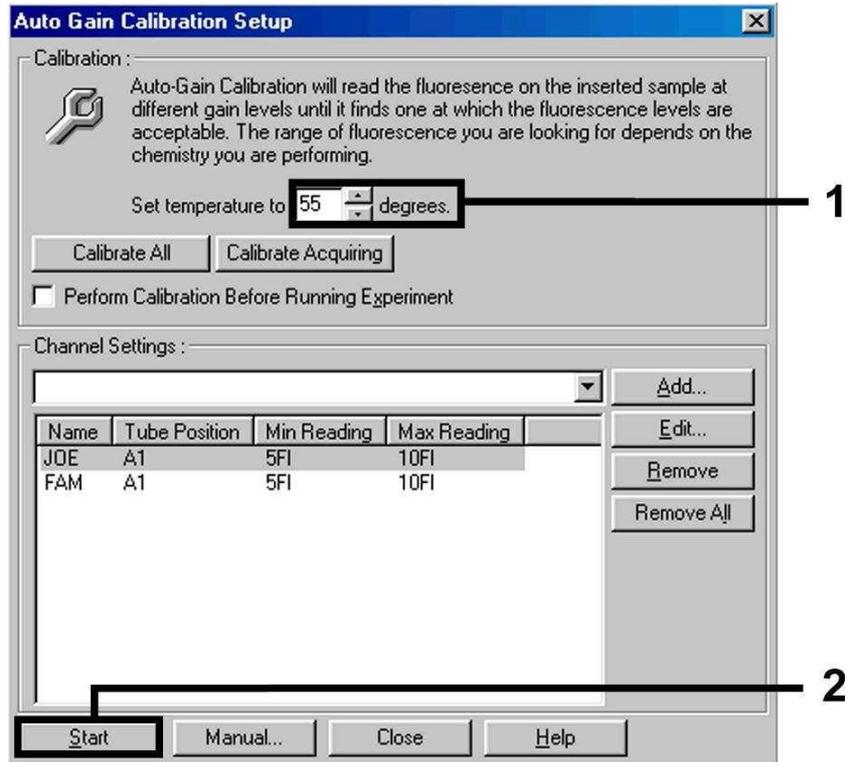


Abb. 7: Einstellung der Sensitivität der Fluoreszenz-Kanäle.

Die durch die Kanal-Kalibrierung ermittelten *Gain*-Werte werden automatisch gespeichert und sind im letzten Menüfenster der Programmierung aufgeführt (siehe Abb. 8).

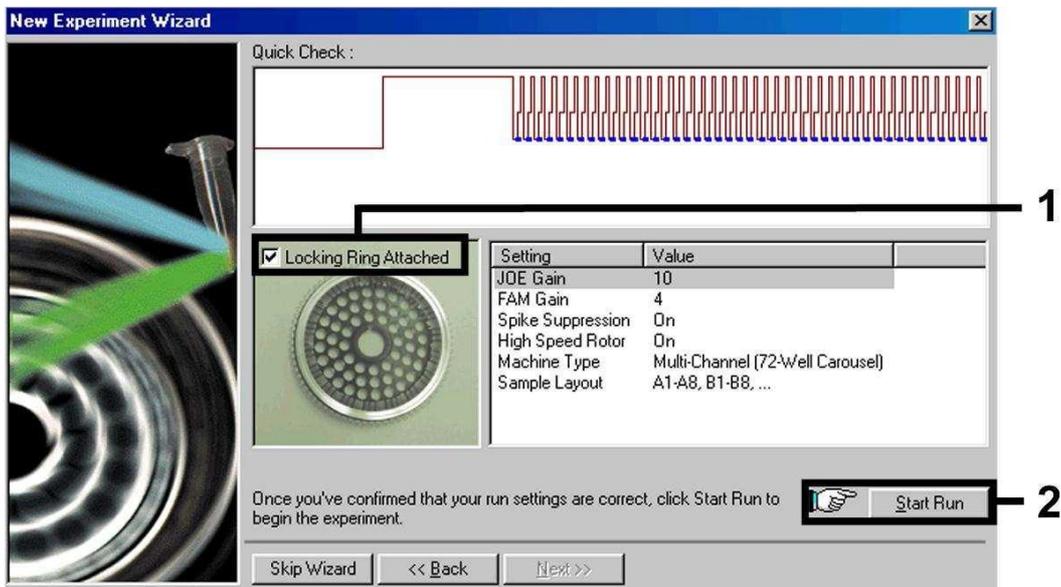


Abb. 8: Start des *artus 3000™* - bzw. *Rotor-Gene™ 3000*-Laufs.

## 9. Auswertung

Die Auswertung erfolgt mit der *artus 3000-* bzw. *Rotor-Gene-Software* nach Anleitung des Herstellers (*artus 3000 Software Manual* bzw. *Rotor-Gene Manual, Version 4.6*).

Folgende Ergebnisse können auftreten:

1. Im Fluoreszenz-Kanal Cycling A.FAM wird ein Signal detektiert.

**Das Ergebnis der Analyse ist positiv: Die Probe enthält SARS-CoV-RNA.**

In diesem Fall ist die Detektion eines Signals im Kanal Cycling A.JOE unwesentlich, da hohe Ausgangskonzentrationen an SARS-CoV-RNA (positives Signal im Kanal Cycling A.FAM) zu einem reduzierten bis ausbleibenden Fluoreszenz-Signal der *Internen Kontrolle* im Kanal Cycling A.JOE führen können (Kompetition).

2. Im Fluoreszenz-Kanal Cycling A.FAM wird kein Signal detektiert, sondern nur im Kanal Cycling A.JOE (Signal der *Internen Kontrolle*).

**In der Probe ist keine SARS-CoV-RNA nachweisbar. Sie kann daher als negativ angesehen werden.**

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

3. Weder im Kanal Cycling A.FAM noch im Kanal Cycling A.JOE wird ein Signal 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 Abb. 9 und Abb. 10 wiedergegeben.

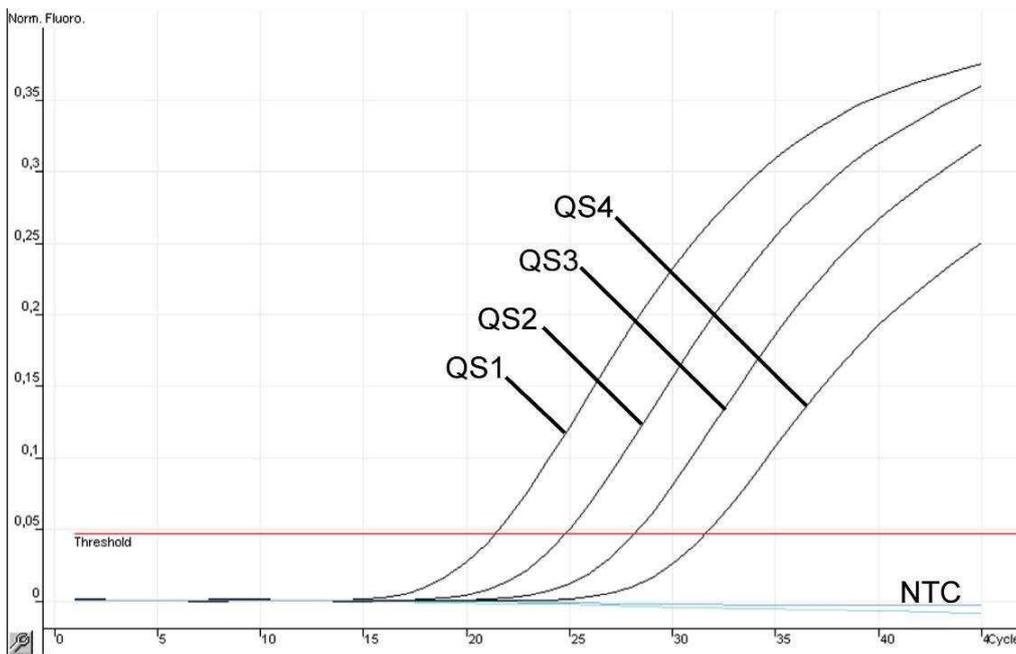


Abb. 9: Nachweis der Quantifizierungsstandards (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) im Fluoreszenz-Kanal Cycling A.FAM. NTC: non-template control (Negativkontrolle).

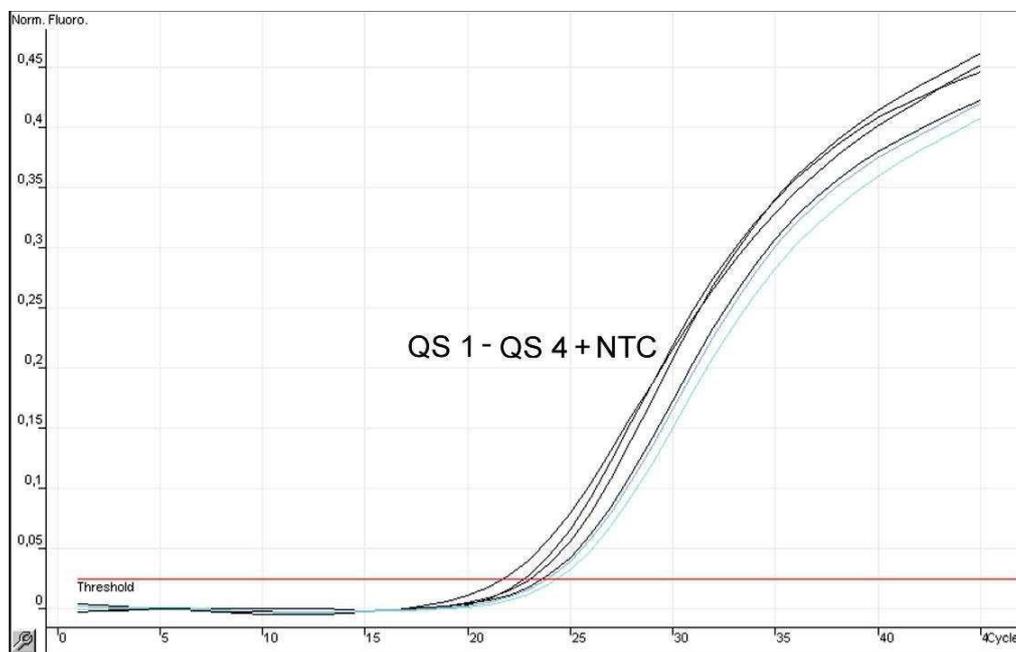


Abb. 10: Nachweis der Internen Kontrolle (IC) im Fluoreszenz-Kanal Cycling A.JOE bei gleichzeitiger Amplifikation der Quantifizierungsstandards (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (Negativkontrolle).

## 10. Troubleshooting

Kein Signal bei den Positivkontrollen (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) im

Fluoreszenz-Kanal Cycling A.FAM:

- Die Wahl des Fluoreszenz-Kanals bei der PCR-Datenanalyse entspricht nicht den Protokollangaben.
  - ❖ Wählen Sie für die Datenanalyse den Fluoreszenz-Kanal Cycling A.FAM für die analytische SARS-CoV RT-PCR und den Fluoreszenz-Kanal Cycling A.JOE für die RT-PCR der *Internen Kontrolle*.
- Die Programmierung des Temperaturprofils des *artus 3000* bzw. *Rotor-Gene 3000* ist fehlerhaft.
  - ❖ Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit den Protokollangaben (siehe **8.6 Programmierung des artus 3000 bzw. Rotor-Gene 3000**).
- Fehlerhaftes Zusammenstellen der PCR-Reaktion.
  - ❖ Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte mit Hilfe des Pipettierschemas (siehe **8.5 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 SARS RG RT-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* im Fluoreszenz-Kanal Cycling A.JOE bei gleichzeitiger Abwesenheit eines Signals im Kanal Cycling A.FAM:

- 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 Aufreinigerungsverfahren benutzen (siehe **8.2 RNA-Isolierung**) und halten Sie sich exakt an die Herstellervorschrift.

- ❖ Vergewissern Sie sich, dass bei der RNA-Aufreinigung der zusätzliche empfohlene Zentrifugationsschritt zur vollständigen Entfernung von Ethanol-Resten vor der Elution durchgeführt wurde (siehe **8.2 RNA-Isolierung**).
- Es liegen aufreinigungsbedingte RNA-Verluste vor.
  - ❖ Sollte die *Interne Kontrolle* zur Aufreinigung zugegeben worden sein, kann ein Ausbleiben des Signals der *Internen Kontrolle* bedeuten, dass aufreinigungsbedingte RNA-Verluste vorliegen. Stellen Sie sicher, dass Sie ein von uns empfohlenes Aufreinigungsverfahren anwenden (siehe **8.2 RNA-Isolierung**) und halten Sie sich an die Herstellervorschrift.
- Die Lagerungsbedingungen für eine oder mehrere Kit-Komponenten entsprechen nicht den in **2. Lagerung** angeführten Vorschriften oder das Haltbarkeitsdatum des *artus SARS RG RT-PCR Kits* wurde überschritten.
  - ❖ Bitte überprüfen Sie sowohl Lagerungsbedingungen als auch Haltbarkeitsdatum (siehe Kit-Etikett) der Reagenzien und verwenden Sie ggf. einen neuen Kit.

#### Signale bei den Negativkontrollen im Fluoreszenz-Kanal Cycling A.FAM der analytischen RT-PCR.

- 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* SARS RG RT-PCR Kits wurde eine Standard-Verdünnungsreihe von 10 bis nominal 0,003 *in vitro* transkribierten RNA-Kopien pro  $\mu\text{l}$  des SARS-CoV-Amplikons erstellt und mit dem *artus* SARS RG RT-PCR Kit analysiert. Die Untersuchungen wurden an drei verschiedenen Tagen in Form von Achtfach-Bestimmungen durchgeführt. Das Ergebnis ist mit Hilfe einer Probit-Analyse ermittelt worden. Deren graphische Auswertung ist in Abb. 11 dargestellt. Die analytische Nachweisgrenze des *artus* SARS RG RT-PCR Kits liegt demzufolge bei 0,5 Kopien/ $\mu\text{l}$  ( $p = 0,05$ ). Dies bedeutet, dass 0,5 Kopien/ $\mu\text{l}$  mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % detektiert werden können.

#### Probit-Analyse: SARS-Coronavirus (*artus 3000/Rotor-Gene 3000*)

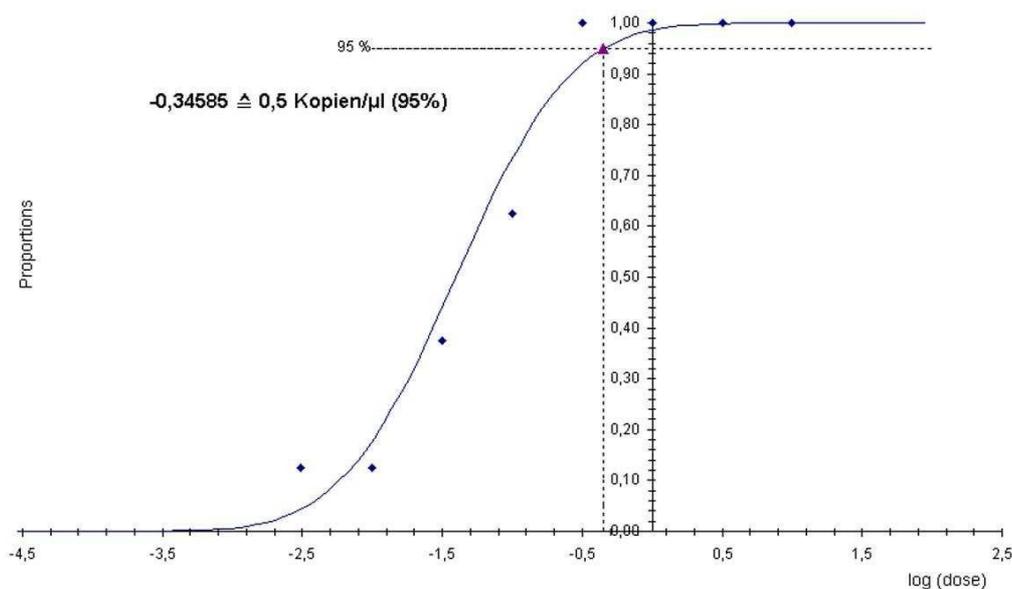


Abb. 11: Analytische Sensitivität des *artus* SARS RG RT-PCR Kits.

## 11.2 Spezifität

Die Spezifität des *artus* SARS RG RT-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 Sub- und Genotypen kontrolliert.

Die Validierung der Spezifität erfolgte zudem an 30 verschiedenen SARS-CoV negativen Serumproben, die mit den im SARS-CoV RG/TM Master enthaltenen SARS-CoV spezifischen Primern und Sonden kein Signal generierten.

Für die Bestimmung der Spezifität des *artus* SARS RG RT-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	SARS-CoV (Cycling A.FAM)	Interne Kontrolle (Cycling A..JOE)
HCoV OC 43 ATCC (Human coronavirus OC 43)	-	+
HCoV 229 E ATCC (Human coronavirus 229 E)	-	+
SB 1 + 4 HCoV (Human coronavirus SB 1 + 4)	-	+
SB 164 HCoV (Human coronavirus SB 164)	-	+
IBV Beaudelle (Avian infectious bronchitis virus Beaudelle)	-	+
BCV 212 (Bovine CoV212)	-	+
TGEV Perdue (Porcine transmissible gastroenteritis virus Perdue)	-	+
TGEV Pur 46 C 188 (Porcine transmissible gastroenteritis virus Pur)	-	+



## 11.3 Präzision

Die Präzisionsdaten für den *artus* SARS RG RT-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* SARS RG RT-PCR Kit anhand des *Quantifizierungsstandards* mit der geringsten Konzentration (QS 4; 10 Kopien/ $\mu$ 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) vorgenommen. Demnach beträgt die Gesamtstreuung einer beliebigen Probe der genannten Konzentration 1,66 %, für den Nachweis der *Internen Kontrolle* 1,28 %. 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: <i>SARS-CoV LC/RG/TM QS4</i>	0,15	0,02	0,48
Intra-Assay Variabilität: <i>Interne Kontrolle</i>	0,40	0,15	1,67
Inter-Assay Variabilität: <i>SARS-CoV LC/RG/TM QS4</i>	0,23	0,05	0,75
Inter-Assay Variabilität: <i>Interne Kontrolle</i>	1,13	1,28	4,53
Inter-Chargen Variabilität: <i>SARS-CoV LC/RG/TM QS4</i>	0,52	0,25	1,69
Inter-Chargen Variabilität: <i>Interne Kontrolle</i>	0,94	0,63	3,62
Totalvarianz: <i>SARS-CoV LC/RG/TM QS4</i>	0,51	0,26	1,66
Totalvarianz: <i>Interne Kontrolle</i>	1,13	1,28	1,28

## 11.4 Robustheit

Die Überprüfung der Robustheit dient der Ermittlung der Gesamtausfallrate des *artus SARS RG RT-PCR Kits*. Hierzu wurden 30 SARS-CoV negative Serumproben mit je 1,5 Kopien/ $\mu$ l Elutionsvolumen SARS-CoV-Kontroll-RNA (dreifache Konzentration der analytischen Sensitivitätsgrenze) versetzt, mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit aufgereinigt (siehe **8.2 RNA-Isolierung**) und mit dem *artus SARS RG RT-PCR Kit* analysiert. Die Ausfallrate für SARS-CoV betrug für die Gesamtheit der Proben 0 %. Die Robustheit der *Internen Kontrolle* wurde zusätzlich durch die Aufreinigung und Analyse von 30 SARS-CoV negativen Serumproben überprüft. Die Gesamtausfallrate betrug 0 %. Inhibitionen wurden nicht beobachtet. Damit beträgt die Robustheit des *artus SARS RG RT-PCR Kits*  $\geq 99$  %.

## 11.5 Reproduzierbarkeit

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

## 11.6 Diagnostische Evaluierung

Der *artus* SARS RG RT-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. Sicherheitsinformationen

Sicherheitsinformationen zum *artus* SARS RG RT-PCR Kit können Sie dem entsprechenden Sicherheitsdatenblatt entnehmen (safety data sheet, SDS). Dieses finden Sie als kompakte und anwenderfreundliche PDF-Datei unter [www.qiagen.com/safety](http://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* SARS RG RT-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



Ethanol



Global Trade Item Number (Globale Artikelnummer)



<N>

Inhalt reicht für <N> Tests



Zulässiger Temperaturbereich

**QS**

*Quantifizierungsstandard*

**IC**

*Interne Kontrolle*

artus SARS RG RT-PCR Kit

Marken und Disclaimer

QIAGEN®, QIAamp®, artus® **Rotor-Gene**® (QIAGEN Gruppe); Dacron® (Invista, Inc.).

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

Der artus SARS RG RT-PCR Kit ist ein CE-markierter diagnostischer Kit 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.

© 2007-2015 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

