

artus® Parvo B19 LC PCR Kit

Handbuch

 24 (Katalognr. 4504063)

 96 (Katalognr. 4504065)

Quantitative In-vitro-Diagnostik

Zur Verwendung mit dem Gerät *LightCycler®*

Februar 2018 – Version 1



4504063, 4504065



1112175DE



QIAGEN GmbH, QIAGEN Straße 1, D-40724 Hilden

R4



1112175DE



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN ist der führende Anbieter innovativer Proben- und Testtechnologien zur Isolierung und zum Nachweis von Bestandteilen aus jeder biologischen Probe. Unsere technologisch und qualitativ hochwertigen Produkte und unser exzellenter Service garantieren Erfolg von der Probenvorbereitung bis zum Ergebnis.

QIAGEN setzt Standards bei:

- Aufreinigung von DNA, RNA und Proteinen
- Testsysteme für Nukleinsäuren und Proteine
- microRNA-Forschung und RNAi
- Automatisierung von Proben- und Testtechnologien

Wir stellen Ihnen die neuesten Technologien zur Verfügung, damit Sie schnell und sicher die besten Ergebnisse erzielen können. Weitere Informationen finden Sie im Internet unter www.qiagen.com.

Inhaltsverzeichnis

1. Inhalt	4
2. Lagerung	4
3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte	4
4. Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	5
5. Verwendungszweck	5
6. Informationen zu den Erregern	5
7. Prinzip der Real-Time-PCR	5
8. Produktbeschreibung	5
9. Protokoll	5
9.1 DNA-Isolierung	5
9.2 Interne Kontrolle	7
9.3 Quantifizierung	7
9.4 Vorbereitung der PCR	8
9.5 Programmieren des Geräts <i>LightCycler</i>	11
10. Auswertung	12
11. Hilfe zur Fehlersuche	13
12. Spezifikationen	14
12.1 Analytische Sensitivität.....	14
12.2 Spezifität	15
12.3 Präzision	15
12.4 Robustheit.....	16
12.5 Reproduzierbarkeit	16
13. Anwendungseinschränkungen	16
14. Sicherheitsinformationen	17
15. Qualitätskontrolle	17
16. Literatur	17
17. Erklärung der Symbole	18

artus Parvo B19 LC PCR Kit

Zur Verwendung mit dem Gerät *LightCycler*

1. Inhalt

	Etikettierung und Inhalt	Artikelnr. 4504063 24 Reaktionen	Artikelnr. 4504065 96 Reaktionen
Blau	<i>Parvo B19 LC Master</i>	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
Gelb	<i>Parvo B19 LC Mg-Sol[¶]</i>	1 x 400 µl	1 x 400 µl
Rot	<i>Parvo B19 LC QS 1[¶]</i> 1 x 10 ⁵ IU/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rot	<i>Parvo B19 LC QS 2[¶]</i> 1 x 10 ⁴ IU/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rot	<i>Parvo B19 LC QS 3[¶]</i> 1 x 10 ³ IU/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rot	<i>Parvo B19 LC QS 4[¶]</i> 1 x 10 ² IU/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rot	<i>Parvo B19 LC QS 5[¶]</i> 1 x 10 ¹ IU/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Grün	<i>Parvo B19 LC IC[¶]</i>	1 x 1.000 µl	2 x 1.000 µl
Weiß	Wasser (PCR-Qualität)	1 x 1.000 µl	1 x 1.000 µl

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

2. Lagerung

Die Komponenten des *artus Parvo B19 LC PCR Kits* sollten bei -15 bis -30°C gelagert werden – unter diesen Lagerbedingungen sind sie bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren (mehr als 2 mal) sollte vermieden werden, da dadurch die Sensitivität verringert wird. Bei unregelmäßigem Gebrauch sollten deshalb die Reagenzien aliquotiert werden. Die Reagenzien sollten nicht länger als fünf Stunden bei +4°C gelagert werden.

3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- Puderfreie Einmal-Laborhandschuhe
- DNA-Isolierungskit (siehe Abschnitt **9.1 DNA-Isolierung**)
- Pipetten (einstellbar)
- Sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Vortex-Mischer
- Tischzentrifuge mit Rotor für 2-ml-Reaktionsgefäße
- *Color Compensation Set* (Farbkompensations-Set) (Roche Diagnostics, Katalognr. 2 158 850) für die Installation einer Datei *Crosstalk Color Compensation*
- *LightCycler* Kapillaren (20 µl)
- *LightCycler* Kühlblock
- *LightCycler* Gerät
- Verschlusswerkzeug

4. Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Folgendes sollte vom Anwender immer beachtet werden:

- Sterile Pipettenspitzen mit Filter verwenden.
- Positivmaterial (Proben, Kontrollen und 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 *LightCycler* Kühlblock arbeiten.

5. Verwendungszweck

Der *artus* Parvo B19 LC PCR Kit ist ein *In-vitro*-Test zum Nachweis und zur Quantifizierung der DNA des Parvovirus B19 in Humanserum oder EDTA-Plasma mittels Nukleinsäure-Amplifikation.

Der Kit, bei dem eine Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) genutzt wird, ist für die Verwendung zusammen mit dem QIAamp UltraSens Virus Kit, dem QIAamp DNA Mini Kit und den Roche LightCycler 1.1/1.2/1.5/2.0 Geräten konfiguriert.

Der Kit ist nicht als Screening-Test von Blut bzw. Blutprodukten auf eine Infektion mit Parvovirus B19 vorgesehen.

Der *artus* Parvo B19 LC PCR Kit ist für den Gebrauch durch medizinische Fachkräfte als In-vitro-Diagnostikum vorgesehen.

6. Informationen zu den Erregern

Die meisten Infektionen mit Parvovirus B19 sind klinisch asymptomatisch. Die Symptome einer akuten Infektion mit Parovirus B19 sind grippeartig, können jedoch auch denen von Rubella (Röteln) und, besonders bei Erwachsenen, denen von Rheuma ähnlich sein. Parovirus B19 ist eine Hauptursache der aplastischen Krise bei Patientinnen, die unter Schwangerschaftsmegaloblastenanämie leiden. Besonders nach einer Infektion der Mutter während des zweiten und dritten Trimenons können manchmal schwere fetale Komplikationen auftreten.

7. Prinzip der Real-Time-PCR

Bei der Diagnose von Pathogenen mittels PCR werden spezifische Bereiche aus dem Genom des Pathogens amplifiziert. Bei der Real-Time-PCR wird das entstandene Amplifikat mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen detektiert. Diese sind in der Regel an Oligonukleotid-Sonden gekoppelt, die spezifisch an das Amplifikat binden. Die Beobachtung der Fluoreszenzintensitäten während des PCR-Laufs (d.h. in Echtzeit, daher „Real-Time-PCR“) ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung des sich anreichernden Produkts, ohne die Reaktionsgefäße nach dem PCR-Lauf wieder öffnen zu müssen (Mackay, 2004).

8. Produktbeschreibung

Der *artus* Parvo B19 LC PCR Kit ist ein gebrauchsfertiges System für den Nachweis von Parvovirus-B19-DNA durch PCR in *LightCycler* Geräten. Der *Parvo B19 LC Master* enthält die Reagenzien und Enzyme zur spezifischen Amplifikation eines 259 bp langen Abschnitts des Parovirus-B19-Genoms sowie für den direkten Nachweis dieses Amplifikats im Fluorimeterkanal F2 des Geräts *LightCycler*. Zusätzlich enthält der *artus* Parvo B19 LC PCR Kit ein zweites, heterologes Amplifikationssystem zum Nachweis einer möglichen PCR-Inhibition. Dieses wird als *Interne Kontrolle (IC)* im Fluorimeterkanal F3 nachgewiesen. Dabei wird die Nachweisgrenze der analytischen Parvovirus-B19-PCR (siehe Abschnitt **12.1 Analytische Sensitivität**) nicht beeinträchtigt. Externe Positivkontrollen (*Parvo B19 LC QS 1 - 5*) werden mitgeliefert, mit denen die Erregerlast bestimmt werden kann. Dazu lesen Sie bitte den Absatz **9.3 Quantifizierung**.

9. Protokoll

9.1 DNA-Isolierung

Kits zur DNA-Isolierung werden von verschiedenen Herstellern angeboten. Die Probemengen für die DNA-Isolierung hängen vom verwendeten Protokoll ab. Führen Sie die DNA-Isolierung nach den Vorschriften des Herstellers aus. Folgende Kits zur Isolierung werden empfohlen:

Probenmaterial	Nukleinsäure-Isolierungskit	Katalognummer	Hersteller	Carrier-RNA
Serum, Plasma	QIAamp® UltraSens® Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	enthalten
	QIAamp DNA Mini Kit (50)	51 304	QIAGEN	nicht enthalten

- Der Einsatz von **Carrier-RNA** ist für die Effizienz der Aufreinigung und damit für die DNA-/RNA-Ausbeute von entscheidender Bedeutung. Wenn der zu verwendende Isolierungskit keine Carrier-RNA enthält, beachten Sie bitte, dass für die Aufreinigung von Nukleinsäuren aus zellfreien Körperflüssigkeiten und Material mit geringem DNA-/RNA-Gehalt (z. B. Liquor) die Zugabe von Carrier (RNA-Homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, Katalognr. 27-4110-01) dringend empfohlen wird. Gehen Sie in derartigen Fällen wie folgt vor:
 - Resuspendieren Sie die lyophilisierte Carrier RNA unter Verwendung des Elutionspuffers (verwenden Sie nicht den Lysepuffer) des Aufreinigungskits (z. B. Puffer AE des QIAamp DNA Mini Kits), und setzen Sie eine Verdünnung an mit einer Konzentration von 1 µg/µl. Aliquotieren Sie die Carrier-RNA-Lösung nach Bedarf und lagern Sie diese bei –20°C. Vermeiden Sie wiederholtes Auftauen (mehr als 2 mal) der aliquotierten Carrier RNA.
 - Verwenden Sie 1 µg Carrier RNA auf 100 µl Lysepuffer. Wenn das Aufreinigungsprotokoll beispielsweise 200 µl Lysepuffer vorsieht, geben Sie bitte 2 µl Carrier RNA (1 µg/µl) unmittelbar zum Lysepuffer hinzu. Vor jeder Aufreinigung sollte eine Mischung aus Lysepuffer und Carrier RNA (und gegebenenfalls *Interner Kontrolle*, siehe Abschnitt **9.2 Interne Kontrolle**) nach dem folgenden Pipettierschema frisch angesetzt werden:

Anzahl Proben	1	12
Lysepuffer	z. B., 200 µl	z. B., 2.400 µl
Carrier RNA (1 µg/µl)	2 µl	24 µl
Gesamtvolumen	202 µl	2.424 µl
Volumen pro Aufreinigung	200 µl	jeweils 200 µl

- Bitte verwenden Sie die zur Aufreinigung frisch angesetzte Mischung aus Lysepuffer und Carrier RNA sofort. Eine Lagerung der Mischung 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, wird abweichend vom Benutzerhandbuch des Aufreinigungskits das folgende Verfahren empfohlen:
 - Resuspendieren Sie die lyophilisierte Carrier RNA vor der ersten Verwendung des Aufreinigungskits in 310 µl Elutionspuffer, der mit dem Kit geliefert wurde (Endkonzentration 1 µg/µl, verwenden Sie nicht Lysepuffer). Aliquotieren Sie die Carrier-RNA-Lösung nach Bedarf und lagern Sie diese bei –20°C. Vermeiden Sie wiederholtes Auftauen (mehr als 2-mal) der aliquotierten Carrier RNA.
 - Vor jeder Aufreinigung sollte eine Mischung aus Lysepuffer und Carrier RNA (und gegebenenfalls *Interner Kontrolle*, siehe Abschnitt **9.2 Interne Kontrolle**) nach dem folgenden Pipettierschema frisch angesetzt werden:

Anzahl Proben	1	12
Lysepuffer AC	800 µl	9.600 µl
Carrier RNA (1 µg/µl)	5,6 µl	67,2 µl
Gesamtvolumen	805,6 µl	9667,2 µl
Volumen pro Aufreinigung	800 µl	jeweils 800 µl

- Bitte verwenden Sie die zur Aufreinigung frisch angesetzte Mischung aus Lysepuffer und Carrier RNA sofort. Eine Lagerung der Mischung ist nicht möglich.
- Für größte Sensitivität des *artus* Parvo B19 LC PCR Kits wird empfohlen, die DNA in 50 µl Elutionspuffer zu eluieren.
 - Der **QIAamp UltraSens Virus Kit** ermöglicht eine Probenkonzentration. Bei Verwendung eines anderen Probenmaterials als Serum oder Plasma sollten Sie der Probe mindestens 50 % (v/v) negatives Humanplasma zusetzen.
 - Die Aufreinigung enthält **Ethanol**-haltige Waschpuffer. Stellen Sie unbedingt sicher, dass vor der Elution ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt (drei Minuten, 13.000 U/min) zur Beseitigung von Ethanol-Rückständen durchgeführt wird. Dies verhindert eine mögliche PCR-Inhibition.
 - Der *artus* Parvo B19 LC PCR Kit sollte nicht mit auf **Phenol** basierenden Aufreinigungsverfahren verwendet werden.

WICHTIG: Die *Interne Kontrolle* des *artus Parvo B19 LC PCR Kits* kann bei der Aufreinigung direkt verwendet werden (siehe Abschnitt **9.2 Interne Kontrolle**).

9.2 Interne Kontrolle

Eine *Interne Kontrolle (Parvo B19 LC IC)* wird mitgeliefert. Diese ermöglicht Ihnen, **sowohl die Aufreinigung der DNA als auch eine mögliche Inhibition der PCR zu kontrollieren** (siehe Abb. 1). Bei dieser Anwendung geben Sie die *Interne Kontrolle* zu der Aufreinigung in einem Verhältnis von 0,1 µl pro 1 µl Elutionsvolumen hinzu. Beispielsweise wird die DNA bei Verwendung des QIAamp UltraSens Virus Kit in 50 µl Puffer AVE eluiert. Folglich sollten anfänglich 5 µl der *Internen Kontrolle* zugesetzt werden. Die Menge an verwendeter *Interner Kontrolle* hängt **nur** vom Elutionsvolumen ab. Die *Interne Kontrolle* und Carrier-RNA (siehe Abschnitt **9.1 DNA-Isolierung**) dürfen nur

- zu der Mischung aus Lysepuffer und Probenmaterial oder
- direkt zum Lysepuffer zugesetzt werden.

Die *Interne Kontrolle* darf nicht direkt zum Probenmaterial zugesetzt werden. Bei Zugabe zum Lysepuffer beachten Sie bitte, dass die Mischung aus *Interner Kontrolle* und Lysepuffer/Carrier RNA frisch angesetzt und sofort verwendet werden muss (Lagerung der Mischung bei Raumtemperatur oder gekühlt für nur wenige Stunden kann bereits zum Versagen der *Internen Kontrolle* und zu einer Beeinträchtigung der Aufreinigungseffizienz führen). Geben Sie die *Interne Kontrolle* und die Carrier RNA **nicht** direkt zum Probenmaterial hinzu.

Optional kann die *Interne Kontrolle* **ausschließlich zur Kontrolle einer möglichen PCR-Inhibition** verwendet werden (siehe Abb. 2). Geben Sie für diese Anwendung pro Reaktion 0,5 µl der *Internen Kontrolle* und 2 µl *Parvo B19 LC Mg-Sol* direkt zu 13 µl *Parvo B19 LC Master* hinzu. Verwenden Sie für jede PCR-Reaktion 15 µl der so hergestellten Master-Mischung* und geben Sie anschließend 5 µl der aufgereinigten Probe hinzu. Sollten Sie einen PCR-Lauf für mehrere Proben ansetzen, so erhöhen Sie die benötigten Mengen *Parvo B19 LC Master*, *Parvo B19 LC Mg-Sol* und *Interne Kontrolle* entsprechend der Probenzahl (siehe Abschnitt **9.4 Vorbereitung der PCR**).

9.3 Quantifizierung

Die mitgelieferten *Quantifizierungsstandards (Parvo B19 LC QS 1 – 5)* werden wie bereits aufgereinigte Proben behandelt und im gleichen Volumen eingesetzt (5 µl). Um in einem *LightCycler* Gerät eine Standardkurve zu erstellen, sollten alle fünf *Quantifizierungsstandards* verwendet werden und im *Sample Loading Screen* (Bildschirmanzeige Probe Laden) als Standards unter Angabe der Konzentrationen definiert werden (siehe *LightCycler Operator's Manual*, Version 3.5, Kapitel B, 2.4. Sample Data Entry). Die so erstellte Standardkurve kann auch für nachfolgende Läufe verwendet werden, wenn mindestens ein Standard **einer** gegebenen Konzentration beim aktuellen Lauf verwendet wird. Dazu muss die zuvor erstellte Standardkurve importiert werden (siehe *LightCycler Operator's Manual*, Version 3.5, Kapitel B, 4.2.5. Quantitation with an External Standard Curve). Dieses Quantifizierungsverfahren kann jedoch zu Ergebnisabweichungen aufgrund der Variabilität zwischen verschiedenen PCR-Läufen führen.

Beachte: Die *Quantifizierungsstandards* sind in IU/µl definiert. Zur Umrechnung der anhand der Standardkurve ermittelten Werte in IU/ml Probenmaterial muss die folgende Gleichung angewendet werden:

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

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

* Die Volumenzunahme durch Zugabe der *Internen Kontrolle* wird beim Ansetzen des PCR-Assays vernachlässigt. Die Sensitivität des Detektionssystems wird dadurch nicht beeinträchtigt.

WICHTIG: Ein Leitfaden für die quantitative Analyse von *artus* Systemen auf *LightCycler* Geräten finden Sie hier <https://www.qiagen.com/TechnicalNoteLightCycler1> für *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 und hier <https://www.qiagen.com/TechnicalNoteLightCycler2> für *LightCycler* 2.0.

9.4 Vorbereitung der PCR

Achten Sie darauf, dass der Kühlblock sowie die Kapillaradapter (Zubehör zum Gerät *LightCycler*) auf +4°C vorgekühlt sind. Setzen Sie die gewünschte Anzahl *LightCycler* Kapillaren in die Adapter des Kühlblocks ein. Achten Sie darauf, dass in jedem PCR-Lauf mindestens ein *Quantifizierungsstandard* und eine Negativkontrolle (*Wasser, PCR-Qualität*) mitgeführt werden. Zum Erstellen einer Standardkurve nutzen Sie pro PCR-Lauf bitte alle mitgelieferten *Quantifizierungsstandards* (*Parvo B19 LC QS 1 – 5*). Alle Reagenzien sollten vor Testbeginn vollständig bei Raumtemperatur aufgetaut, gut durchmischt (mehrfaches Auf- und Abpipettieren oder kurzes Vortex-Mischen) und anschließend anzenrifugiert werden.

Wenn Sie mit der *Internen Kontrolle* sowohl die **Aufreinigung der DNA als auch eine mögliche Inhibition der PCR kontrollieren** möchten, so muss zuvor die *Interne Kontrolle* zur Aufreinigung zugegeben werden (siehe Abschnitt **9.2 Interne Kontrolle**). Verwenden Sie in diesem Fall das folgende Pipettierschema (siehe schematischer Überblick in Abb. 1):

		Anzahl Proben	
		1	12
1. Ansetzen der Master-Mischung	<i>Parvo B19 LC Master</i>	13 µl	156 µl
	<i>Parvo B19 LC Mg-Sol</i>	2 µl	24 µl
	<i>Parvo B19 LC IC</i>	0 µl	0 µl
	Gesamtvolumen	15 µl	180 µl
2. Ansetzen des PCR-Assays	Master-Mischung	15 µl	jeweils 15 µl
	Probe	5 µl	jeweils 5 µl
	Gesamtvolumen	20 µl	jeweils 20 µl

Wenn Sie die *Interne Kontrolle* **ausschließlich zum Kontrollieren einer Inhibition der PCR** verwenden möchten, so muss die *Interne Kontrolle* direkt zum *Parvo B19 LC Master* zugegeben werden. Verwenden Sie in diesem Fall das folgende Pipettierschema (siehe schematischer Überblick in Abb. 2):

		Anzahl Proben	
		1	12
1. Ansetzen der Master-Mischung	<i>Parvo B19 LC Master</i>	13 µl	156 µl
	<i>Parvo B19 LC Mg-Sol</i>	2 µl	24 µl
	<i>Parvo B19 LC IC</i>	0,5 µl	6 µl
	Gesamtvolumen	15 µl*	186 µl
2. Ansetzen des PCR-Assays	Master-Mischung	15 µl	jeweils 15 µl
	Probe	5 µl	jeweils 5 µl
	Gesamtvolumen	20 µl	jeweils 20 µl

Pipettieren Sie jeweils 15 µl Master-Mischung in das Kunststoff-Reservoir der Kapillare. Geben Sie dann 5 µl eluierte Proben-DNA hinzu. Dementsprechend müssen 5 µl mindestens eines der *Quantifizierungsstandards* (*Parvo B19 LC QS 1 – 5*) als eine Positivkontrolle und 5 µl *Wasser, PCR-Qualität* als eine Negativkontrolle verwendet werden. Schließen Sie die Kapillaren. Um die Mischung aus dem Kunststoff-Reservoir in die Kapillare zu überführen, zentrifugieren Sie die Adapter mit den Kapillaren in einer Tischzentrifuge für zehn Sekunden bei maximal 400 x g (2.000 U/min).

* Die Volumenzunahme durch Zugabe der *Internen Kontrolle* wird beim Ansetzen des PCR-Assays vernachlässigt. Die Sensitivität des Detektionssystems wird dadurch nicht beeinträchtigt.

Zugabe der *internen Kontrolle* zu dem Aufreinigungsverfahren

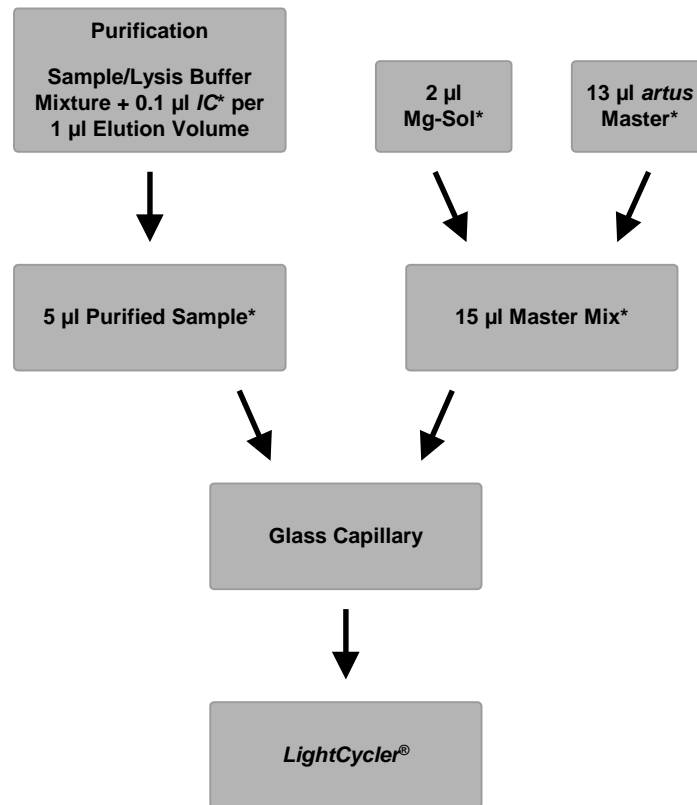


Abb. 1: Schematischer Arbeitsablauf für die Kontrolle sowohl des Aufreinigungsverfahrens als auch der Inhibition der PCR.

*Achten Sie darauf, dass die Lösungen vollständig bei Raumtemperatur aufgetaut, gründlich durchmischt und anschließend anzentrifugiert werden.

Zugabe der *internen Kontrolle* zum *artus* Master

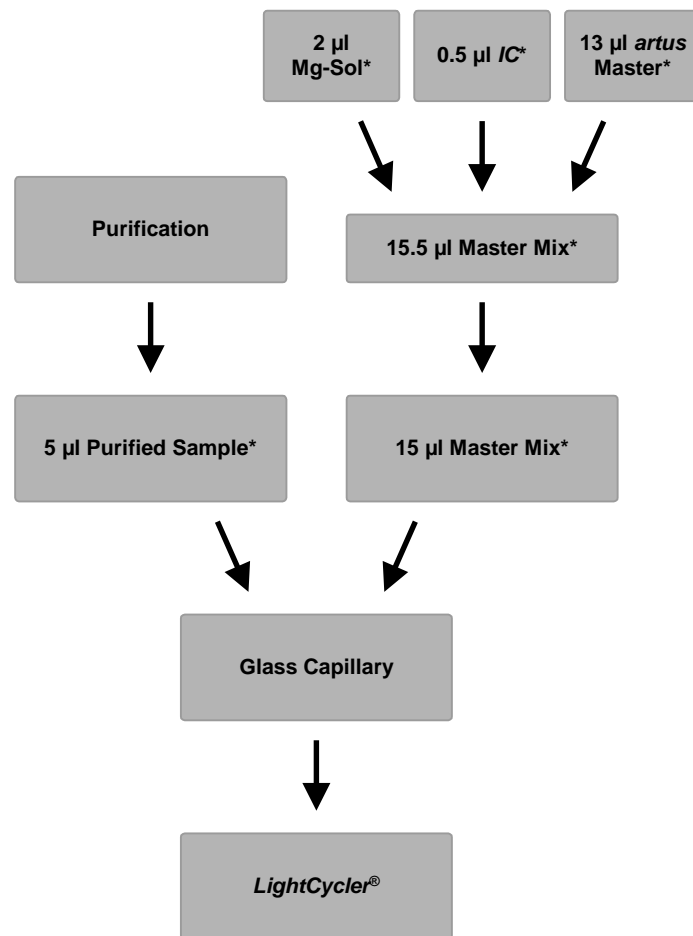


Abb. 2: Schematischer Arbeitsablauf zur Kontrolle der Inhibition der PCR.

*Achten Sie darauf, dass die Lösungen vollständig bei Raumtemperatur aufgetaut, gründlich durchmischt und anschließend anzentrifugiert werden.

9.5 Programmieren des Geräts *LightCycler*

Zum Nachweis der Parvovirus-B19-DNA erstellen Sie ein Temperaturprofil am Gerät *LightCycler* entsprechend der folgenden drei Schritte (siehe Abb. 3-5).

- | | | |
|----|---|--------|
| A. | Initiale Aktivierung des Hot-Start-Enzyms | Abb. 3 |
| B. | Amplifikation der DNA | Abb. 4 |
| C. | Kühlung | Abb. 5 |

Achten Sie besonders auf die Einstellungen für *Analysis Mode* (Analysemodus), *Cycle Program Data* (PCR-Programmdaten) und *Temperature Targets* (Zieltemperaturen). Die jeweiligen Einstellungen sind in den Abbildungen durch schwarze Rahmen hervorgehoben. Einzelheiten zur Programmierung des Geräts *LightCycler* entnehmen Sie bitte dem *LightCycler Operator's Manual*.

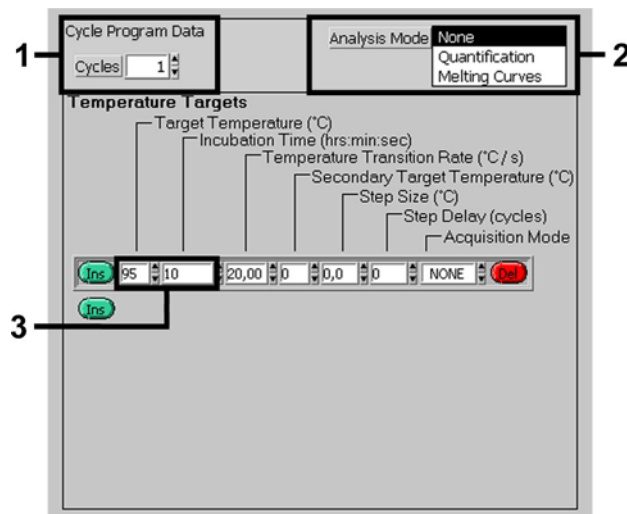


Abb. 3: Initiale Aktivierung des Hot-Start-Enzyms.

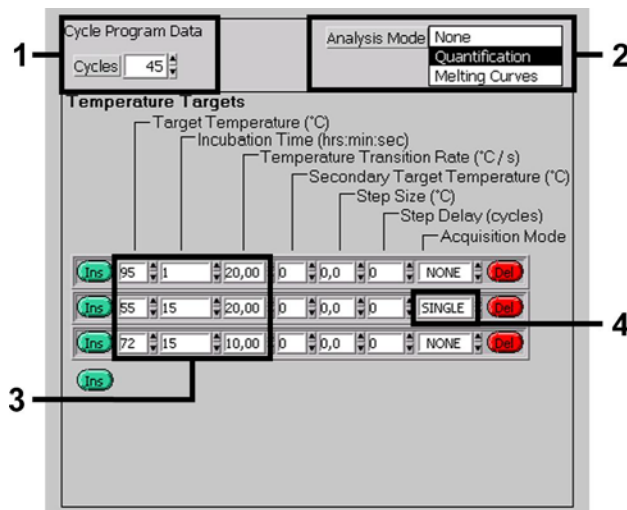


Abb. 4: Amplifikation der DNA.

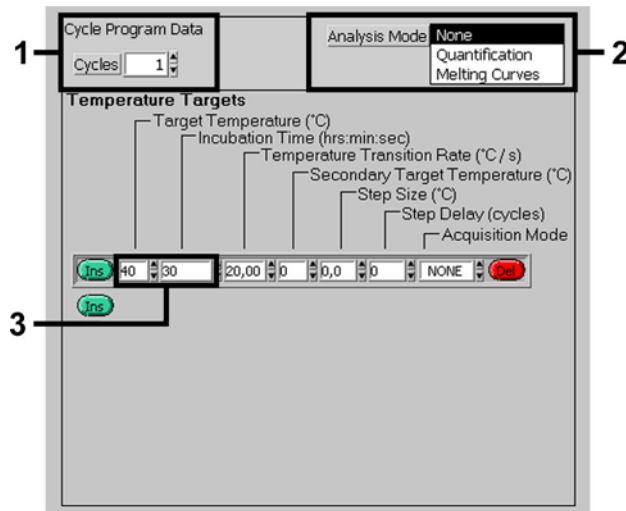


Abb. 5: Kühlung.

10. Auswertung

Bei Multicolor-Analysen treten Interferenzen zwischen den Fluorimeterkanälen auf. Die Software des Geräts *LightCycler* enthält eine Datei mit dem Namen *Color Compensation File*, die diese Interferenzen kompensiert. Öffnen Sie diese Datei vor, während oder nach dem PCR-Lauf durch Aktivieren der Schaltflächen *Choose CCC File* (CCC-Datei auswählen) oder *Select CC Data* (CC-Daten auswählen). Wenn keine *Color Compensation File* installiert ist, erstellen Sie die Datei entsprechend der Anweisungen im *LightCycler Operator's Manual*. Nach Aktivieren der *Color Compensation File* erscheinen in den Fluorimeterkanälen F1, F2 und F3 separate Signale. Zur Auswertung der mit dem *artus Parvo B19 LC PCR Kit* gewonnenen PCR-Ergebnisse wählen Sie für die analytische Parvovirus-B19-PCR die Fluoreszenz-Anzeigeoption F2/Back-F1 bzw. für die PCR der *Internen Kontrolle* die Option F3/Back-F1 aus. Zur Vereinfachung der quantitativen Auswertung befolgen Sie bitte die Anweisungen unter **9.3 Quantifizierung** und in der den Technical Notes, die Sie im Internet unter den folgenden Adressen finden: <https://www.qiagen.com/TechnicalNoteLightCycler1> für LightCycler 1.1/1.2/1.5 und <https://www.qiagen.com/TechnicalNoteLightCycler2> für LightCycler 2.0.

Folgende Ergebnisse sind möglich:

1. Im Fluorimeterkanal F2/Back-F1 wird ein Signal detektiert.

Das Ergebnis der Auswertung ist positiv: Die Probe enthält Parvovirus-B19-DNA.

In diesem Fall ist die Detektion eines Signals im Kanal F3/Back-F1 unmaßgeblich, da eine hohe Ausgangskonzentration von Parvovirus-B19-DNA (positives Signal im Kanal F2/Back-F1) zu einem abgeschwächten oder ausbleibenden Fluoreszenzsignal der *internen Kontrolle* im Kanal F3/Back-F1 führen kann (Kompetition).

2. Im Fluorimeterkanal F2/Back-F1 wird kein Signal detektiert, aber im Kanal F3/Back-F1 das Signal der *internen Kontrolle*.

In der Probe ist keine Parvovirus-B19-DNA nachweisbar. Sie kann daher als negativ angesehen werden.

Bei negativer Parvovirus-B19-PCR schließt das detektierte Signal der *internen Kontrolle* die Möglichkeit aus, dass die PCR inhibiert wurde.

3. Weder im Kanal F2/Back-F1 noch im Kanal F3/Back-F1 wird ein Signal detektiert.

Eine Diagnose ist nicht möglich.

Informationen über Fehlerquellen und ihre Behebung finden Sie in der **11. Hilfe zur Fehlersuche**

Beispiele für PCR-Reaktionen mit positiven und negativen Ergebnissen sind in Abb. 6 und Abb. 7 gezeigt.

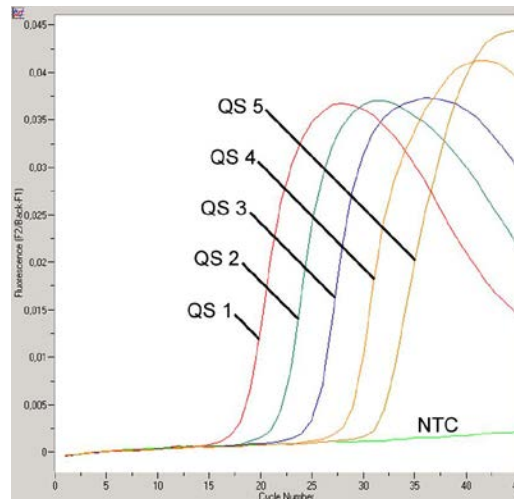


Abb. 6: Detektion der Quantifizierungsstandards (*Parvo B19 LC QS 1 – 5*) im Fluorimeterkanal F2/Back-F1. NTC: Kontrolle ohne Template (Negativkontrolle).

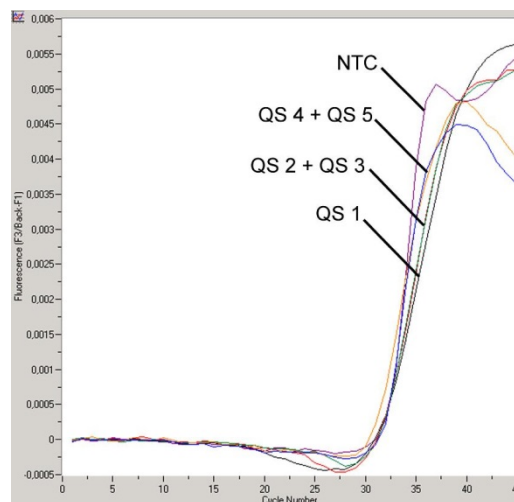


Abb. 7: Nachweis der *Internen Kontrolle (IC)* im Fluorimeterkanal F3/Back-F1 bei gleichzeitiger Amplifikation der Quantifizierungsstandards (*Parvo B19 LC QS 1 – 5*). NTC: Kontrolle ohne Template (Negativkontrolle).

11. Hilfe zur Fehlersuche

Kein Signal mit Positivkontrollen (*Parvo B19 LC QS 1 – 5*) im Fluorimeterkanal F2/Back-F1:

- Der gewählte Fluorimeterkanal für die PCR-Datenanalyse entspricht nicht dem Protokoll.
 - Wählen Sie bei der Datenanalyse den Fluorimeterkanal F2/Back-F1 für die analytische Parvovirus-B19-PCR und den Fluorimeterkanal F3/Back-F1 für die PCR der *internen Kontrolle*.
- Programmierung des Temperaturprofils für das Gerät *LightCycler* ist nicht korrekt.
 - Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit dem Protokoll (siehe Abschnitt **9.5 Programmieren des Geräts *LightCycler***).
- Fehlerhaftes Zusammenstellen der PCR-Reaktion.
 - Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte mit Hilfe des Pipettierschemas (siehe Abschnitt **9.4 Vorbereitung der PCR**) und wiederholen Sie ggf. die PCR.
- Die Lagerungsbedingungen für eine oder mehrere Kit-Komponenten entsprechen nicht den in **2. Lagerung** angeführten Vorschriften oder das Verfallsdatum des *artus Parvo B19 LC PCR Kits* ist abgelaufen.
 - Bitte überprüfen Sie sowohl Lagerungsbedingungen als auch das Verfallsdatum (siehe Kit-Etikett) der Reagenzien und verwenden Sie ggf. ein neues Kit.

Schwaches oder ausbleibendes Signal der *Internen Kontrolle* im Fluorimeterkanal F3/Back-F1 bei gleichzeitiger Abwesenheit eines Signals im Kanal F2/Back-F1:

- Die PCR-Bedingungen entsprechen nicht dem Protokoll.
 - Überprüfen Sie die PCR-Bedingungen (siehe oben) und wiederholen Sie gegebenenfalls die PCR mit korrigierten Einstellungen.
- Die PCR-Reaktion wurde inhibiert.
 - Stellen Sie sicher, dass Sie ein von uns empfohlenes Aufreinigungsverfahren benutzen (siehe Abschnitt **9.1 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 Abschnitt **9.1 DNA-Isolierung**).
- DNA ging bei der Aufreinigung verloren.
 - Sollte die *Interne Kontrolle* zur Aufreinigung zugegeben worden sein, kann ein Ausbleiben des Signals der *Internen Kontrolle* den Verlust der DNA bei der Aufreinigung bedeuten. Stellen Sie sicher, dass Sie ein von uns empfohlenes Aufreinigungsverfahren benutzen (siehe Abschnitt **9.1 DNA-Isolierung**) und halten Sie sich exakt an die Herstellervorschrift.
- Die Lagerungsbedingungen für eine oder mehrere Kit-Komponenten entsprachen nicht den in **2. Lagerung** angeführten Vorschriften oder das Verfallsdatum des *artus Parvo B19 LC PCR Kits* ist abgelaufen.
 - Bitte überprüfen Sie sowohl Lagerungsbedingungen als auch das Verfallsdatum (siehe Kit-Etikett) der Reagenzien und verwenden Sie ggf. ein neues Kit.

Signale bei den Negativkontrollen im Fluorimeterkanal F2/Back-F1 der analytischen PCR.

- Beim Ansetzen der PCR ist eine Kontamination aufgetreten.
 - Wiederholen Sie die PCR mit Replikaten mit noch unbenutzten Reagenzien.
 - Verschließen Sie die einzelnen PCR-Gefäße nach Möglichkeit jeweils direkt nach Zugabe der zu untersuchenden Probe.
 - Pipettieren Sie die Positivkontrollen grundsätzlich zuletzt.
 - Achten Sie darauf, dass Arbeitsflächen und Geräte regelmäßig dekontaminiert werden.
- Bei der Aufreinigung ist eine Kontamination aufgetreten.
 - Wiederholen Sie Aufreinigung und PCR der zu untersuchenden Proben unter Verwendung noch unbenutzter Reagenzien.
 - Achten Sie darauf, dass Arbeitsflächen und Geräte regelmäßig dekontaminiert werden.

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

12. Spezifikationen

12.1 Analytische Sensitivität

Die analytische Nachweisgrenze sowie die analytische Nachweisgrenze unter Berücksichtigung der Aufreinigung (Sensitivitätsgrenzen) wurden für den *artus Parvo B19 LC PCR Kit* untersucht. Die analytische Nachweisgrenze unter Berücksichtigung der Aufreinigung wurde anhand Parvovirus-B19-positiver klinischer Proben und unter Berücksichtigung des verwendeten Aufreinigungsverfahrens bestimmt. Die analytische Nachweisgrenze wurde hingegen ohne klinische Proben und unabhängig von dem Aufreinigungsverfahren anhand eines Standards bekannter Konzentration bestimmt.

Zur Bestimmung der **analytischen Sensitivität** des *artus Parvo B19 LC PCR Kits* wurde eine Standard-Verdünnungsreihe von 116,6 bis nominal 0,03 Parvo B19 IU/µl erstellt und anschließend mit dem *artus Parvo B19 LC PCR Kit* analysiert. Die Untersuchungen wurden an drei verschiedenen Tagen in Form von Achtfach-Bestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mittels Probit-Analyse bestimmt. Abb. 8 zeigt eine grafische Darstellung der Probit-Analyse. Die analytische Nachweisgrenze des *artus Parvo B19 LC PCR Kits* beträgt 1 IU/µl ($p = 0.05$). Dies bedeutet, dass 1 IU/µl mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % nachgewiesen werden können.

[†] Der Standard ist ein geklontes PCR-Produkt, dessen Konzentration mit dem WHO International Parovirus B19 DNA Standard kalibriert wurde.

Probit-Analyse: Parvovirus B19 (LightCycler)

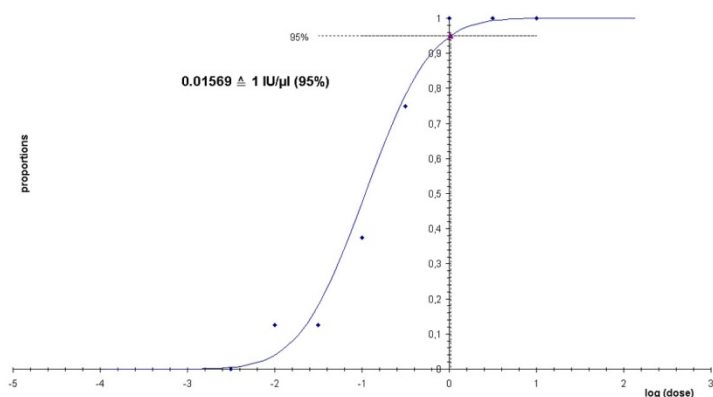


Abb. 8: Analytische Sensitivität des *artus* Parvo B19 LC PCR Kits.

Die **analytische Sensitivität unter Berücksichtigung der Aufreinigung** des *artus* Parvo B19 LC PCR Kits wurde mit einer Verdünnungsreihe nach dem WHO International Parvovirus B19 DNA Standard in klinischen Plasmaproben bestimmt. Diese wurden einer DNA-Aufreinigung mit dem QIAamp UltraSens Virus Kit unterzogen (Extraktionsvolumen: 1 ml, Elutionsvolumen: 70 µl). Jede der sechs Verdünnungen wurde an drei verschiedenen Tagen in Form von Achtfach-Bestimmungen mit dem *artus* Parvo B19 LC PCR Kit analysiert. Die Ergebnisse wurden mittels Probit-Analyse bestimmt. Die analytische Nachweisgrenze unter Berücksichtigung der Aufreinigung des *artus* Parvo B19 LC PCR Kits beträgt 125 IU/µl ($p = 0.05$). Dies bedeutet, dass 125 IU/ml mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % detektiert werden können.

12.2 Spezifität

Die Spezifität des *artus* Parvo B19 LC 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. Die Nachweisbarkeit aller relevanten Genotypen ist dadurch sichergestellt.

Die Validierung der Spezifität erfolgte zudem an 30 verschiedenen Parvovirus-B19-negativen Serumproben. Bei diesen wurde mit den im *Parvo B19 LC Master* enthaltenen Parvovirus-B19-spezifischen Primern und Sonden kein Signal erzeugt.

Zur Bestimmung der Spezifität des *artus* Parvo B19 LC PCR Kits wurde die in der folgenden Tabelle (siehe Tabelle 1) aufgeführte Kontrollgruppe auf eine Kreuzreaktivität untersucht. Bei keinem der getesteten Erreger trat eine Reaktion auf.

Tabelle 1: Spezifitätstest des Kits mit potentiell kreuzreaktiven Erregern.

Kontrollgruppe	Parvovirus B19 (F2/Back-F1)	Interne Kontrolle (F3/Back-F1)
Humanes Herpesvirus 1 (Herpes-simplex-Virus 1)	–	+
Humanes Herpesvirus 2 (Herpes-simplex-Virus 2)	–	+
Humanes Herpesvirus 3 (Varizella-Zoster-Virus)	–	+
Humanes Herpesvirus 5 (Zytomegalievirus)	–	+
Humanes T-lymphotropes Virus 1	–	+
Humanes T-lymphotropes Virus 2	–	+

12.3 Präzision

Die Präzisionsdaten des *artus* Parvo B19 LC PCR Kits erlauben die Ermittlung der Totalvarianz (Gesamtstreuung) des Testsystems. Diese Totalvarianz setzt sich aus der **Intra-Assay-Variabilität** (Streuung von Proben derselben Konzentration innerhalb eines Versuchsansatzes), der **Inter-Assay-Variabilität** (Streuung aufgrund der Anwendung durch verschiedene Personen und unter Benutzung verschiedener Geräte des gleichen Typs innerhalb eines Labors) und der **Inter-Chargen-Variabilität** (Streuung unter Verwendung unterschiedlicher Chargen) zusammen. Dabei werden jeweils die Standardabweichung, die Varianz und der Variationskoeffizient sowohl für die Erreger-spezifische als auch für die PCR der *Internen Kontrolle* berechnet.

Präzisionsdaten des *artus* Parvo B19 LC PCR Kits wurden mit dem *Quantifizierungsstandard* der geringsten Konzentration (QS 5; 10 IU/µl) erhoben. Die Untersuchungen wurden in Form von Achtfach-Bestimmungen durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse wurde anhand der Ct-Werte der Amplifikationskurven (siehe Ct: threshold cycle, siehe Tabelle 2) vorgenommen. Zusätzlich wurden auch die Präzisionsdaten der quantitativen Werte in IU/µl mittels der entsprechenden Ct-Werte ermittelt (siehe Tabelle 3). Demnach beträgt die Gesamtstreuung einer beliebigen Probe der genannten Konzentration 1,62 % (Ct) oder 33,37 % (Konz.) und für den Nachweis der *Internen Kontrolle* 2,13 % (Ct). Diese Werte basieren auf der Gesamtheit aller Einzelwerte der ermittelten Variabilitäten.

Tabelle 2: Präzisionsdaten auf Grundlage der Ct-Werte.

	Standardabweichung	Varianz	Variationskoeffizient [%]
Intra-Assay-Variabilität: <i>Parvo B19 LC QS 5</i>	0,12	0,01	0,36
Intra-Assay-Variabilität: <i>Interne Kontrolle</i>	0,08	0,01	0,27
Inter-Assay-Variabilität: <i>Parvo B19 LC QS 5</i>	0,43	0,18	1,34
Inter-Assay-Variabilität: <i>Interne Kontrolle</i>	0,66	0,44	2,29
Chargenvariabilität: <i>Parvo B19 LC QS 5</i>	0,47	0,22	1,44
Chargenvariabilität: <i>Interne Kontrolle</i>	0,70	0,44	2,39
Totalvarianz: <i>Parvo B19 LC QS 5</i>	0,52	0,27	1,62
Totalvarianz: <i>Interne Kontrolle</i>	0,62	0,39	2,13

Tabelle 3: Präzisionsdaten auf Grundlage der quantitativen Ergebnisse (in IU/µl).

	Standardabweichung	Varianz	Variationskoeffizient [%]
Intra-Assay-Variabilität: <i>Parvo B19 LC QS 5</i>	0,70	0,49	6,04
Inter-Assay-Variabilität: <i>Parvo B19 LC QS 5</i>	0,93	0,87	8,01
Chargenvariabilität: <i>Parvo B19 LC QS 5</i>	4,12	16,77	52,63
Totalvarianz: <i>Parvo B19 LC QS 5</i>	3,34	11,13	33,37

12.4 Robustheit

Die Überprüfung der Robustheit dient der Ermittlung der Gesamtausfallrate des *artus* Parvo B19 LC PCR Kits. Hierzu wurden 30 Parvovirus-B19-negative Serumproben mit je 6 IU/µl Parvovirus-B19-Kontroll-DNA (dreifache Konzentration der analytischen Sensitivitätsgrenze) dotiert. Nach der Aufreinigung mit dem QIAamp DNA Mini Kit (siehe Abschnitt **9.1 DNA-Isolierung**) wurden diese Proben mit dem *artus* Parvo B19 LC PCR Kit analysiert. Die Ausfallrate betrug 0 % für alle Parvovirus-B19-Proben. Zusätzlich wurde auch die Robustheit der *Internen Kontrolle* durch Aufreinigung und Analyse von 30 Parvovirus-B19-negativen Serumproben überprüft. Die Gesamtausfallrate betrug 0 %. Inhibitionen wurden nicht beobachtet. Die Robustheit des *artus* Parvo B19 LC PCR Kits liegt also bei ≥ 99 %.

12.5 Reproduzierbarkeit

Die Daten zur Reproduzierbarkeit erlauben eine regelmäßige Leistungsbewertung des *artus* Parvo B19 LC PCR Kits sowie einen Effizienzvergleich mit anderen Produkten. Diese Daten werden durch die Teilnahme an Ringversuchen erhoben.

13. Anwendungseinschränkungen

- Alle Reagenzien dürfen ausschließlich zur In-vitro-Diagnostik verwendet werden.
- The kit is intended for in vitro diagnostic use by healthcare professionals.
- Die genaue Einhaltung der Anweisungen des Benutzerhandbuchs ist erforderlich, um optimale PCR-Ergebnisse zu erhalten.
- Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten sind zu beachten. Abgelaufene Reagenzien dürfen nicht benutzt werden.
- Für manche zum Genotyp 3 gehörende Sequenzen kann die angegebene Leistung nicht garantiert werden. Aufgrund von Mutationen im Bindungsbereich des Primers/der Sonde kann eine signifikante Senkung der Sensitivität auftreten (Baylis und Buchheit, 2009).
- Selten auftretende Mutationen innerhalb der von den Primern und/oder der Sonde des Kits abgedeckten hochkonservierten Bereichen des Virengensoms können, wenn sie vorliegen, zu einer Unterbestimmung führen oder dazu, dass die Anwesenheit des Virus nicht detektiert wird. Validität und Leistung des Tests werden regelmäßig überprüft, um bei Bedarf Veränderungen vornehmen zu können.

14. Sicherheitsinformationen

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern entnehmen (safety data sheets, SDSs). In unserer Online-Sammlung der Sicherheitsdatenblätter unter www.qiagen.com/safety finden Sie zu jedem QIAGEN® Kit und zu jeder Kit-Komponente das jeweilige SDS als PDF-Datei, die Sie einsehen und ausdrucken können.

Entsorgen Sie Proben und Ansätze gemäß Ihren örtlichen Sicherheitsvorschriften.

15. Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagementsystem von QIAGEN wird jede Charge des *artus* Parvo B19 LC PCR Kits nach festgelegten Prüfkriterien getestet, um eine einheitliche Produktqualität sicherzustellen.

16. Literatur

- (1) Hokynar K, Norja P, Laitinen H, Palomäki P, Garbarg-Chenon A, Ranki A, Hedman K, Söderlund-Venermo M. Detection and differentiation of human parvovirus variants by commercial quantitative real-time PCR Tests. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42 (5): 2013 - 2019.
- (2) Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10 (3): 190 - 212.
- (3) Baylis SA, Buchheit KH. A proficiency testing study to evaluate laboratory performance for the detection of different genotypes of parvovirus B19. *Vox Sang.* 2009; 97 (1): 13 - 20.

17. Erklärung der Symbole

	Verfallsdatum
	Chargennummer
	Hersteller
	Katalognummer
	Materialnummer
	Handbuch
	In-vitro-Diagnostikum
	Komponenten
	Enthält
	Anzahl
	Internationale Artikelnummer
	Inhalt ausreichend für <N> Tests
	Zulässiger Temperaturbereich
	Beachten Sie die Anwendungshinweise
QS	Quantifizierungsstandard
IC	Interne Kontrolle
Mg-Sol	Magnesium-Lösung

artus Parvo B19 LC PCR Kit

Warenzeichen und rechtliche Hinweis

QIAGEN®, QIAamp®, artus®, UltraSens® (QIAGEN Group); LightCycler® (Roche Diagnostics).

Eingetragene Marken, Warenzeichen usw., die in diesem Dokument verwendet werden, auch wenn sie nicht ausdrücklich als solche gekennzeichnet sind, gelten als gesetzlich geschützt.

Der artus Parvo B19 LC PCR Kit ist ein Diagnostik-Kit mit CE-Kennzeichnung entsprechend der europäischen Richtlinie 98/79/EG über In-vitro-Diagnostika. Nicht in allen Ländern erhältlich.

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische rechtliche Hinweise finden Sie im Handbuch des jeweiligen QIAGEN-Kits. Handbücher und Gebrauchsanweisungen zu QIAGEN-Kits sind unter www.qiagen.com abrufbar oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder bei Ihrem örtlichen Distributor angefordert werden.

Der Erwerb dieses Produkts berechtigt den Käufer zur Nutzung des Produkts in der humanmedizinischen In-vitro-Diagnostik. Eine allgemeine Patent- oder sonstige Lizenz, welche über vorgenanntes Nutzungsrecht des Käufers dieses Produkts hinausgeht, wird nicht gewährt.

DER ERWERB DIESES PRODUKTS GEWÄHRT DEM KÄUFER RECHTE NACH EINEM ODER MEHREREN DER US-PATENTE NR. 6,174,670, 7,160,998, 6,569,627 UND 6,245,514 UND IHREN ENTSPRECHUNGEN IN ANDEREN LÄNDERN, DIESES PRODUKT AUSSCHLIESSLICH ZUM BEREITSTELLEN IN-VITRO-DIAGNOSTISCHER DIENSTLEISTUNGEN AN MENSCHEN UND TIEREN ZU VERWENDEN. EINE ALLGEMEINE PATENT- ODER SONSTIGE LIZENZ, WELCHE ÜBER VORGENANNTES NUTZUNGSRECHT DES KÄUFERS DIESES PRODUKTS HINAUSGEHT, WIRD NICHT GEWÄHRT.

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung

Mit Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Anwender des artus Parvo B19 LC PCR Kits die folgenden Bedingungen an:

1. Der artus Parvo B19 LC PCR Kit darf nur gemäß den Angaben im *artus Parvo B19 LC PCR Kit Handbuch* und mit den Komponenten, die im Kit geliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen Ihrer Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zum Kit gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zum Kit gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der im *artus Parvo B19 LC PCR Kit Handbuch* und in zusätzlichen, im Internet unter www.qiagen.com verfügbaren, Protokollen beschriebenen Anwendungen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieser Kit und/oder die mit ihm durchgeführten Anwendungen die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieser Kit und seine Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Kits stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen könnten oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder dessen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen können im Internet unter www.qiagen.com nachgelesen werden.

02/2018 1112175 HB-0010-006 -© 2018 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066
Austria ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11
Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556
Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779
Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)
China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325
Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942
Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413
France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928
Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400
Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425
Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061
Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980
Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300
Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145
Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067
Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436
The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602
Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712
Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368
Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050
Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328
Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12
UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999
USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

1112175DE



Sample & Assay Technologies