

November 2019

artus[®] HHV-6 RG PCR Kit Handbuch



Version 1

Zur Verwendung mit Rotor-Gene[®] Q
Thermocyclern

IVD

CE

REF



R5 MAT

4521265

altona Diagnostics GmbH,
Mörkenstraße 12, 22767 Hamburg, DEUTSCHLAND

1117341-DE

Vertrieben von QIAGEN GmbH, QIAGEN Straße 1, 40724 Hilden, DEUTSCHLAND

Inhalt

Verwendungszweck	4
Zusammenfassung und Erläuterung	4
Angaben zum Pathogen	4
Verfahrensprinzip	5
Kitinhalt	6
Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien	7
Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen	8
Warnhinweise	8
Vorsichtsmaßnahmen	8
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	9
Kitkomponenten	9
Verfahren	11
DNA-Extraktion	11
Protokoll: Detektion von HHV-6A- und HHV-6B-spezifischer DNA	13
Interpretation der Ergebnisse	24
Validität des Laufs	24
Qualitative Analyse	25
Quantitative Analyse	27
Anwendungseinschränkungen	29
Qualitätskontrolle	30
Leistungsmerkmale	30
Analytische Sensitivität	30

Analytische Spezifität.....	31
Linearer Bereich	32
Präzision	33
Diagnostische Evaluierung.....	35
Reproduzierbarkeit	36
Symbole	37
Hilfe zur Fehlerbehebung.....	39
Referenzen.....	39
Bestellinformationen	40

Verwendungszweck

Das *artus* HHV-6 RG PCR Kit (96) ist ein *In-vitro*-Diagnostikum auf Basis der Real-Time-PCR-Technik zum Nachweis, zur Differenzierung und zur Quantifizierung von spezifischer DNA des Humanen Herpesvirus 6A (HHV-6A) und des Humanen Herpesvirus 6B (HHV-6B).

Zusammenfassung und Erläuterung

Das *artus* HHV-6 RG PCR Kit ist ein gebrauchsfertiges System zum Nachweis von HHV-6A- und HHV-6B-spezifischer DNA mit Real-Time-PCR auf Rotor-Gene Q Thermocyclern. Der Assay enthält ein heterologes Amplifikationssystem (interne Kontrolle) zur Identifizierung möglicher Inhibitionen der PCR-Reaktion und zur Bestätigung der Integrität der Kit-Reagenzien.

Angaben zum Pathogen

HHV-6 ist der Sammelname für zwei nahe verwandte Viren, HHV-6A und HHV-6B. Bei ihnen handelt es sich um zwei der neun Herpesviren, von denen bekannt ist, dass sie den Menschen infizieren können. Sie gehören zur Gattung *Roseolovirus* innerhalb der Unterfamilie der *Betaherpesvirinae*. Die Primärinfektion mit HHV-6 erfolgt gewöhnlich im Kindesalter vor dem zweiten Lebensjahr. Zu den Symptomen gehören Fieber, Durchfall und Exanthema subitum, d. h. ein Ausschlag, der weitläufiger als Roseola bekannt ist. In einigen Fällen kann die anfängliche Infektion auch zu Fieberkrämpfen, Enzephalitis oder unbeeinflussbaren Anfällen führen. Nach der Primärinfektion bleibt das Virus latent im Körper.

Latentes HHV-6 kann im späteren Leben reaktiviert werden. Die klinischen Erscheinungsformen einer solchen Reaktivierung betreffen verschiedene Körperteile wie das Gehirn, die Lunge, die Nieren und den gastrointestinalen Trakt. Eine Reaktivierung von HHV-6 im Gehirngewebe ist mit neurologischen Störungen assoziiert. In seltenen Fällen können kognitive Beeinträchtigungen, andauernde Behinderungen und Tod die Folge sein.

In den USA, Japan und Europa kann HHV-6B bei immungeschwächten Patienten und bei Kindern für klinische Erscheinungsformen verantwortlich sein, HHV-6A kommt dagegen häufiger bei Kindern in Afrika vor. HHV-6A wird häufig bei Patienten mit chronischen neurologischen Erkrankungen beobachtet. Dazu gehören insbesondere entzündliche neurologische Erkrankungen wie Multiple Sklerose (MS) und Rhomboenzephalitis.

Verfahrensprinzip

HHV-6 RG Master A und HHV-6 RG Master B enthalten die Reagenzien und Enzyme zur spezifischen Amplifikation der Zielabschnitte im Genom von HHV-6A bzw. HHV-6B sowie für die direkte Detektion des spezifischen Amplikons in den Fluoreszenzkanälen Cycling Green und Cycling Red des Rotor-Gene Q Thermocyclers.

Zusätzlich enthält das *artus* HHV-6 RG PCR Kit ein heterologes Amplifikationssystem zur Identifizierung von möglichen Verfahrensfehlern. Dazu dient der Nachweis einer internen Kontrolle (Internal Control, IC) im Fluoreszenzkanal Cycling Yellow des Rotor-Gene Q Thermocyclers.

HHV-6A-DNA-spezifische Sonden sind mit dem Fluorophor FAM™ markiert. Sonden für HHV-6B-DNA sind dagegen mit einem Fluorophor mit den gleichen Merkmalen wie Cy[®]5 markiert. Die für die interne Kontrolle spezifische Sonde ist mit dem Fluorophor JOE™ markiert. Die Markierung der Sonden mit Fluorophoren, die im Spektrum unterschieden werden können, erlaubt die gleichzeitige Detektion und Quantifizierung von HHV-6A- und HHV-6B-spezifischer DNA sowie Detektion der internen Kontrolle in den jeweiligen Kanälen des Rotor-Gene Q Thermocyclers.

Kitinhalt

artus HHV-6 RG PCR Kit		(96)
Katalognummer		4521265
Anzahl der Reaktionen		96
Blau	HHV-6 RG Master A	8 × 60 µl
Lila	HHV-6 RG Master B	8 × 180 µl
Grün	HHV-6 RG IC	1 × 1000 µl
Rot	HHV-6 RG QS*	4 × 250 µl
Weiß	H ₂ O	1 × 500 µl
	Handbuch	1

*Das artus HHV-6 RG PCR Kit enthält 4 Quantifizierungsstandards (QS1–QS4).

Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

Stellen Sie vor dem Gebrauch sicher, dass die Geräte gemäß den Empfehlungen des Herstellers geprüft und kalibriert wurden.

Reagenzien

- QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN Kat.-Nr. 51304 oder 51306; siehe „DNA-Extraktion“, Seite 11)

Verbrauchsmaterialien

- 0.1 ml Strip Tubes and Caps zur Verwendung mit einem 72-Well-Rotor (QIAGEN, Katalog-Nr. 981103 oder 981106)
- Nukleasefreie, DNA-bindungsarme Mikrozentrifugenröhrchen zur Herstellung von Master-Mixes
- Nukleasefreie Pipettenspitzen mit Aerosolfiltern

Geräte

- Rotor-Gene Q MDx 5plex, Rotor-Gene Q 5plex oder Rotor-Gene Q 6plex Thermocycler
- Rotor-Gene Q Software, Version 2.3.1 oder höher
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, Aluminium-Ladeblock für die manuelle Einrichtung von Reaktionen (QIAGEN, Katalog-Nr. 9018901)
- Pipetten (einstellbar) für die Probenvorbereitung
- Pipetten (einstellbar) für die Herstellung des PCR-Master-Mixes
- Pipetten (einstellbar) für die Abgabe von Template-DNA
- Vortexer
- Tischzentrifuge mit Rotor für 2-ml-Reaktionsgefäße

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

Für *in-vitro*-diagnostische Anwendungen.

Lesen Sie alle Anweisungen vor Verwendung des Tests sorgfältig durch.

Warnhinweise

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und eine Schutzbrille.

Vorsichtsmaßnahmen

- Dieses Produkt darf nur von Personal verwendet werden, das speziell in Real-Time-PCR-Techniken und *In-vitro*-Diagnostik geschult wurde.
- Sämtliche Proben sollten immer als infektiös und/oder als biologische Gefahrenstoffe gemäß den sicheren Laborverfahren behandelt werden.
- Tragen Sie beim Arbeiten mit den Proben puderfreie Handschuhe, einen Laborkittel und Augenschutz.
- Vermeiden Sie eine Kontamination der Proben und der Komponenten des Kits mit Mikroben und Nukleasen (DNase/RNase).
- Verwenden Sie immer DNase-/RNase-freie Einwegpipettenspitzen mit Aerosolfiltern.
- Tragen Sie im Umgang mit Kitkomponenten immer puderfreie Einweghandschuhe.
- Verwenden Sie separate und voneinander getrennte Arbeitsbereiche für die Probenvorbereitung, das Ansetzen der Reaktionen und die Amplifikation/Detektion. Die Arbeitsabläufe im Labor sollten immer unidirektional durchgeführt werden. Tragen Sie in jedem Bereich zu jeder Zeit Einweghandschuhe und wechseln Sie diese, bevor Sie einen anderen Bereich betreten.
- Ordnen Sie Vorratsmaterialien und Geräte den einzelnen Arbeitsbereichen zu und transportieren Sie diese nicht von einem Bereich zu einem anderen.

- Lagern Sie positives und/oder potenziell positives Material immer separat von allen anderen Komponenten des Kits.
- Halten Sie die Reaktionsröhrchen/Platten nach der Amplifikation geschlossen, um eine Kontamination durch Amplifikate zu verhindern.
- Je nach Richtlinien bzw. Anforderungen von lokalen, nationalen und/oder bundesstaatlichen Bestimmungen und Akkreditierungsbehörden können zusätzliche Kontrollen getestet werden.
- Bestandteile des Kits, deren Verfallsdatum abgelaufen ist, dürfen nicht verwendet werden.
- Proben- und Testabfälle sind gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen zu entsorgen.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Kitkomponenten

Das *artus* HHV-6 RG PCR Kit wird auf Trockeneis versendet. Die Kitkomponenten müssen beim Empfang gefroren sein. Wenn mindestens eine Komponente beim Empfang nicht gefroren ist bzw. wenn Röhrchen beim Transport beschädigt wurden, wenden Sie sich an den Technischen Service von QIAGEN. Ab dem Zeitpunkt des Empfangs müssen alle Kitkomponenten bei -30 °C bis -15 °C gelagert werden.

Vermeiden Sie es die Masterreagenzien häufiger als zweimal aufzutauen und einzufrieren, weil dies die Assayleistung beeinträchtigen kann. Wenn die Reagenzien nur gelegentlich verwendet werden, sollten sie in Aliquots eingefroren werden. Reagenzien dürfen nicht länger als 2 Stunden bei 4 °C aufbewahrt werden. Schützen Sie HHV-6 RG Master A und HHV-6 RG Master B vor Lichteinwirkung.

Das *artus* HHV-6 RG PCR Kit enthält:

- zwei Master-Reagenzien (HHV-6 RG Master A und HHV-6 RG Master B),
- Template für die interne Kontrolle (HHV-6 RG IC),
- vier Quantifizierungsstandards (HHV-6 RG QS1–QS4),
- für PCR geeignetes Wasser (H₂O).

Die Quantifizierungsstandards enthalten standardisierte Konzentrationen HHV-6-spezifischer DNA. Diese Quantifizierungsstandards wurden gegen den ersten Internationalen Standard für Humane Herpesvirus 6B (HHV-6B) DNA der WHO (NIBSC-Code: 15/266) für Assays mit Nukleinsäureamplifikation (NAT) kalibriert (1).

Zur Kalibrierung von HHV-6A-spezifischem Positivmaterial für das *artus*® HHV-6 RG PCR Kit (96) wurde ein Nukleinsäurenachweistest verwendet, bei dem HHV-6A und HHV-6B nicht unterschieden werden (RealStar® HHV-4/-5/-6 PCR Kit 1.0). Die Kalibrierung erfolgte mit Hilfe des *Parallel-Line Assays* mit dem HHV-6A-spezifischen Positivmaterial und der DNA des ersten WHO Internationalen Standards für das humane Herpesvirus 6B (HHV-6B). Die Kalibrierung wurde mit dem *artus* HHV-6 RG PCR Kit (96) bestätigt.

Die Quantifizierungsstandards können einzeln als Positivkontrollen oder zusammen zur Erzeugung einer **Standardkurve** verwendet werden. Eine solche Standardkurve ermöglicht die Konzentrationsbestimmung der HHV-6A- und/oder HHV-6B-spezifischen DNA in der Probe. Die Konzentrationen der Quantifizierungsstandards sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Konzentrationen der Quantifizierungsstandards

Quantifizierungsstandard	Konzentration (IU/ μ l)	
	HHV-6A	HHV-6B
QS1	10.000	10.000
QS2	1000	1000
QS3	100	100
QS4	10	10

Verfahren

DNA-Extraktion

Es werden HHV-6A- und HHV-6B-spezifische Zielabschnitte der DNA amplifiziert. Die Assayleistung hängt von der Qualität der Template-DNA ab. Daher muss das verwendete Probenvorbereitungskit DNA liefern, die sich für die nachfolgende PCR-Reaktion eignet.

Zur Aufreinigung von DNA für das *artus* HHV-6 RG PCR Kit wird das QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Kat.-Nr. 51304 oder 51306) empfohlen. Die DNA-Aufreinigung ist gemäß den Anweisungen im *QIAamp DNA Mini Handbuch* durchzuführen.

Da die Waschpuffer des QIAamp DNA Mini Kits Ethanol enthalten, sollte vor der Elution ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt durchgeführt werden. Setzen Sie die QIAamp Mini Spin-Säule in ein neues 2-ml-Sammelröhrchen und entsorgen Sie das alte Sammelröhrchen mit dem Filtrat. Zentrifugieren Sie das Röhrchen 10 Minuten bei 17.000 g (~13.000 U/min) in einer Tischzentrifuge.

Wichtig: Die Extraktionseffizienz und die Stabilität der extrahierten Nukleinsäure hängen wesentlich von der Verwendung von Carrier-RNA ab.

Wichtig: Ethanol ist ein starker Inhibitor der Real-Time-PCR. Wenn die Waschpuffer des von Ihnen verwendeten Probenvorbereitungskits Ethanol enthalten, müssen Sie vor der Elution der Nukleinsäure sorgfältig darauf achten, alle Ethanolspuren zu entfernen.

Interne Kontrolle

Das *artus* HHV-6 RG PCR Kit enthält eine heterologe interne Kontrolle. Diese kann entweder nur als PCR-Inhibitionskontrolle oder als Kontrolle des Probenvorbereitungsverfahrens (Nukleinsäureextraktion) und als PCR-Inhibitionskontrolle dienen (Schritt 2a, Seite 13).

Wird die interne Kontrolle nur als PCR-Inhibitionskontrolle und nicht als Kontrolle des Probenvorbereitungsverfahrens benutzt, wird diese direkt in die Mischung von HHV-6 RG Master A und HHV-6 RG Master B zugegeben, wie in Schritt 2b des Protokolls (Seite 14) beschrieben.

Die interne Kontrolle darf nie direkt in die Probe gegeben werden, ganz gleich, welche Methode/welches System für die Nukleinsäureextraktion verwendet wird. Die interne Kontrolle sollte immer in die Probenpuffer-/Lysepuffermischung gegeben werden. Das Volumen der internen Kontrolle, das in die Probenpuffer-/Lysepuffermischung gegeben wird, hängt nur vom Elutionsvolumen ab: Es beträgt 10 % des Elutionsvolumens. Beispielsweise wird die DNA bei Verwendung des QIAamp DNA Mini Kits in 60 µl Buffer AE eluiert. Daher wird 6 µl interne Kontrolle zur Probenpuffer-/Lysepuffermischung jeder Probe gegeben.

Wichtig: Geben Sie die interne Kontrolle und die Carrier-RNA nicht direkt zur Probe hinzu.

Protokoll: Detektion von HHV-6A- und HHV-6B-spezifischer DNA

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Lesen Sie vor Beginn der Arbeit den Abschnitt „Vorsichtsmaßnahmen“ auf Seite 8.
- Machen Sie sich vor Beginn des Protokolls mit dem Rotor-Gene Q Thermocycler vertraut. Siehe Handbuch des Geräts.
- Achten Sie darauf, dass in jedem PCR-Lauf mindestens eine Positiv- und eine Negativkontrolle (Wasser, PCR-Qualität) mitgeführt werden.

Vorbereitende Schritte

- Achten Sie darauf, dass der Kühlblock (Zubehör des Rotor-Gene Q Thermocyclers) auf 2 bis 8 °C vorgekühlt ist.
- Alle Reagenzien sollten vor Gebrauch vollständig aufgetaut, gut durchmischt (mehrfaches Auf- und Abpipettieren oder kurzes Vortex-Mischen) und anschließend kurz zentrifugiert werden.

Verfahren

1. Setzen Sie die gewünschte Anzahl PCR-Röhrchen in die Adapter des Kühlblocks ein.
2. Wenn Sie die interne Kontrolle verwenden, um das DNA-Aufreinigungsverfahren zu überwachen und eine mögliche PCR-Inhibition zu kontrollieren, fahren Sie mit Arbeitsschritt 2a fort. Wenn Sie die interne Kontrolle ausschließlich dazu verwenden, eine mögliche PCR-Inhibition zu kontrollieren, fahren Sie mit Arbeitsschritt 2b fort.

Wichtig: Wurde die interne Kontrolle während der Probenvorbereitung hinzugefügt, muss mindestens die negative Kontrolle (nicht eine negative Probe) die interne Kontrolle enthalten.

- 2a. Die interne Kontrolle wurde der Aufreinigung bereits zugesetzt (siehe „Interne Kontrolle“ auf Seite 11). Setzen Sie in diesem Fall einen Master-Mix nach Tabelle 2 an. Das Reaktionsgemisch enthält mit Ausnahme der Probe normalerweise alle Komponenten, die für die PCR benötigt werden.

Tabelle 2: Ansetzen des Master-Mixes (interne Kontrolle zum Überwachen der DNA-Aufreinigung und zum Kontrollieren einer PCR-Inhibition)

Komponente	1 Reaktion	12 Reaktionen
HHV-6 RG Master A	5 µl	60 µl
HHV-6 RG Master B	15 µl	180 µl
Gesamtvolumen	20 µl	240 µl

- 2b. Die interne Kontrolle muss in die Mischung von HHV-6 RG Master A und HHV-6 Master B direkt zugegeben werden. In diesem Fall setzen Sie einen Master-Mix gemäß Tabelle 3 an. Das Reaktionsgemisch enthält mit Ausnahme der Probe normalerweise alle Komponenten, die für die PCR benötigt werden.

Tabelle 3: Ansetzen des Master-Mixes (interne Kontrolle nur zum Kontrollieren einer PCR-Inhibition)

Komponente	1 Reaktion	12 Reaktionen
HHV-6 RG Master A	5 µl	60 µl
HHV-6 RG Master B	15 µl	180 µl
HHV-6 RG IC	1 µl	12 µl
Gesamtvolumen	21 µl	252 µl

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

3. Pipettieren Sie 20 µl des Master-Mixes in jedes PCR-Röhrchen. Geben Sie dann 10 µl der eluierten Proben-DNA in jedes Röhrchen. Mischen Sie den Inhalt durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gründlich durch. Oder aber geben Sie 10 µl Positivkontrolle oder Quantifizierungsstandard bzw. 10 µl Wasser (PCR-Qualität) als Negativkontrolle hinzu. Achten Sie darauf, dass in jedem Lauf mindestens eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle vorhanden ist. Zur Quantifizierung verwenden Sie alle 4 Quantifizierungsstandards (QS1–QS4).
4. Verschließen Sie die PCR-Röhrchen. Stellen Sie sicher, dass der Schließring (Zubehör des Rotor-Gene Q Thermocyclers) oben am Rotor angebracht ist.

5. Richten Sie zum Nachweis der HHV-6A- und HHV-6B-spezifischen DNA ein Temperaturprofil gemäß den folgenden Arbeitsschritten ein.

Einstellen allgemeiner Assay-Parameter	Abbildungen 1, 2, 3, 4
Initiale Aktivierung des Hot-Start-Enzyms	Abbildung 5
Amplifikation der DNA	Abbildung 6
Einstellen der Sensitivität der Fluoreszenzkanäle	Abbildung 7
Starten des Laufs	Abbildung 8

Alle Angaben beziehen sich auf die Rotor-Gene Q Software ab Version 2.3.1. Weitere Informationen zum Programmieren des Rotor-Gene Systems finden Sie im Benutzerhandbuch des Systems. In den folgenden Abbildungen sind diese Einstellungen schwarz umrahmt.

6. Zuerst öffnen Sie das Dialogfeld **New Run Wizard** (Assistent für neue Läufe) und wählen Sie in der Registerkarte **Advanced** (Erweitert) die Option **Two Step** (Zwei Schritte) (Abbildung 1). Klicken Sie auf **New** (Neu), um fortzufahren.

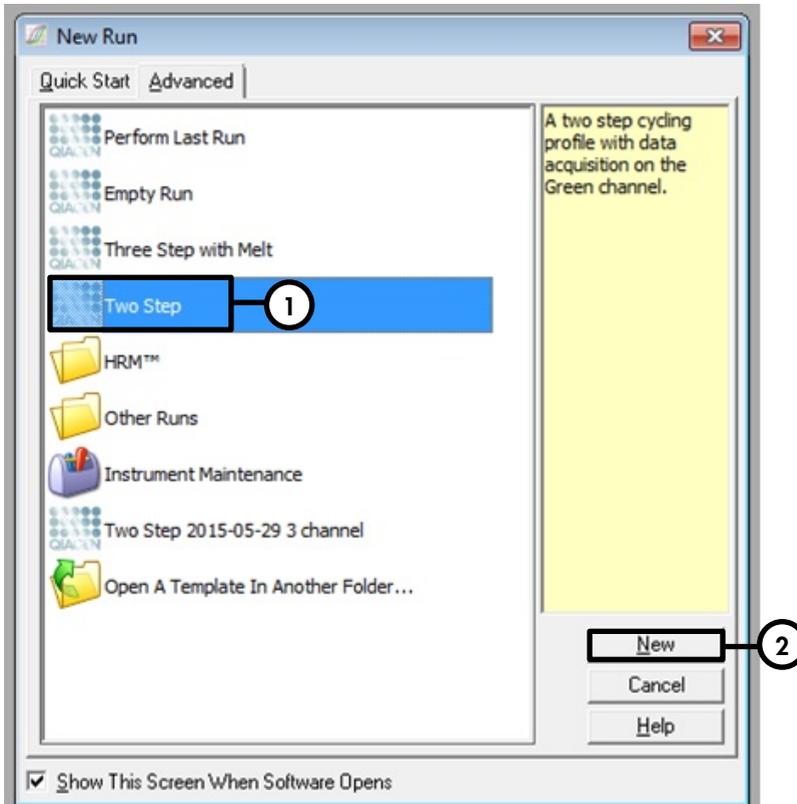


Abbildung 1: Dialogfeld „New Run“ (Neuer Lauf)

7. Im nächsten Dialogfeld des **New Run Wizard** (Assistent für neue Läufe) (Abb. 2) aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Locking Ring Attached** (Schließring angebracht) und klicken Sie auf **Next** (Weiter).

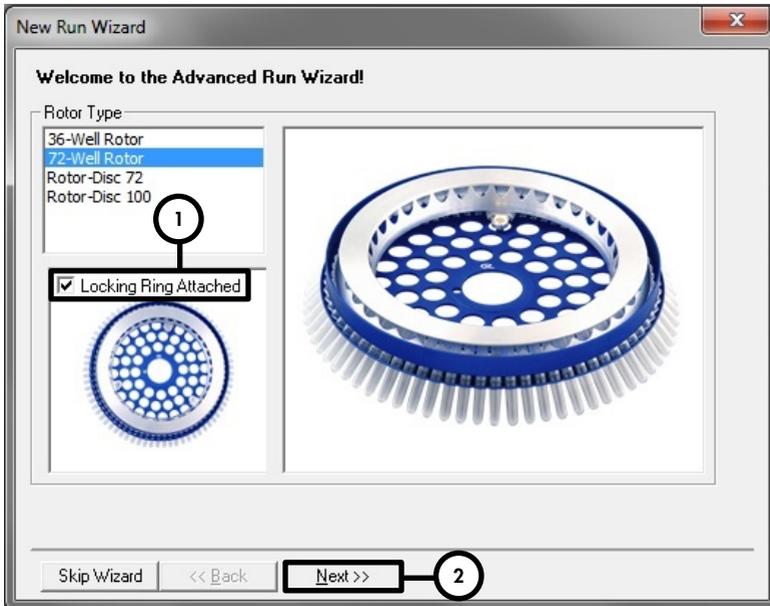


Abbildung 2: Dialogfeld „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe)

8. Wählen Sie als PCR-Reaktionsvolumen **30** und klicken Sie auf **Next** (Weiter) (Abb. 3).

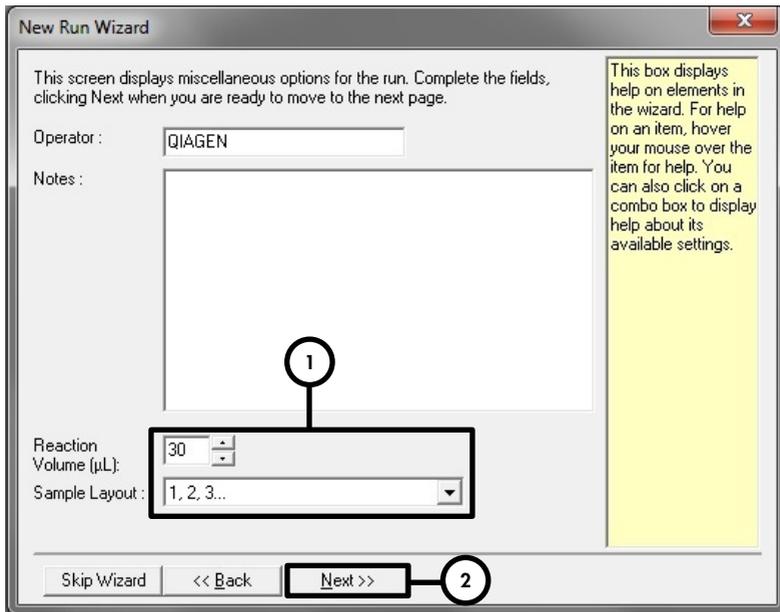


Abbildung 3: Einstellen allgemeiner Assay-Parameter.

9. Klicken Sie im nächsten Dialogfeld des **New Run Wizard** (Assistent für neue Läufe) auf **Edit Profile** (Profil bearbeiten) (Abb. 4) und programmieren Sie das Temperaturprofil wie in Abb. 5 und 6 dargestellt.

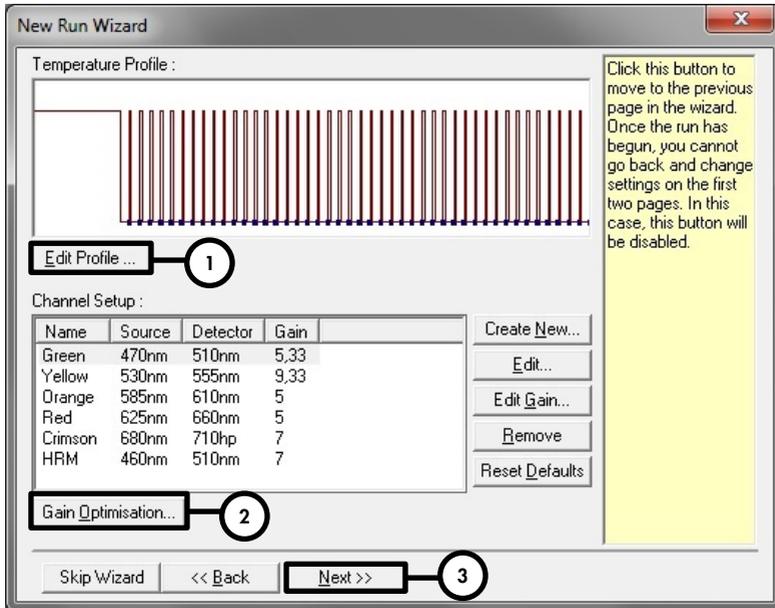


Abbildung 4: Bearbeiten des Profils.

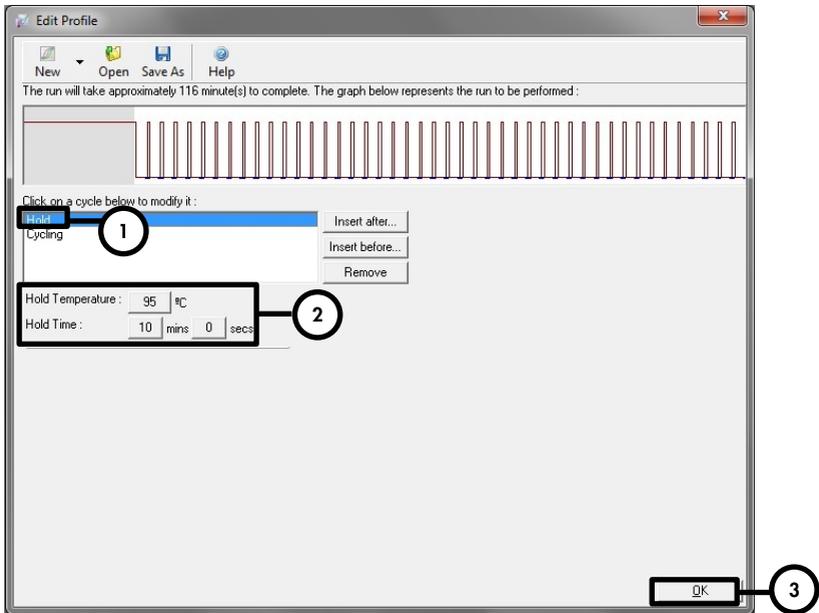


Abbildung 5: Initiale Aktivierung des Hot-Start-Enzyms.

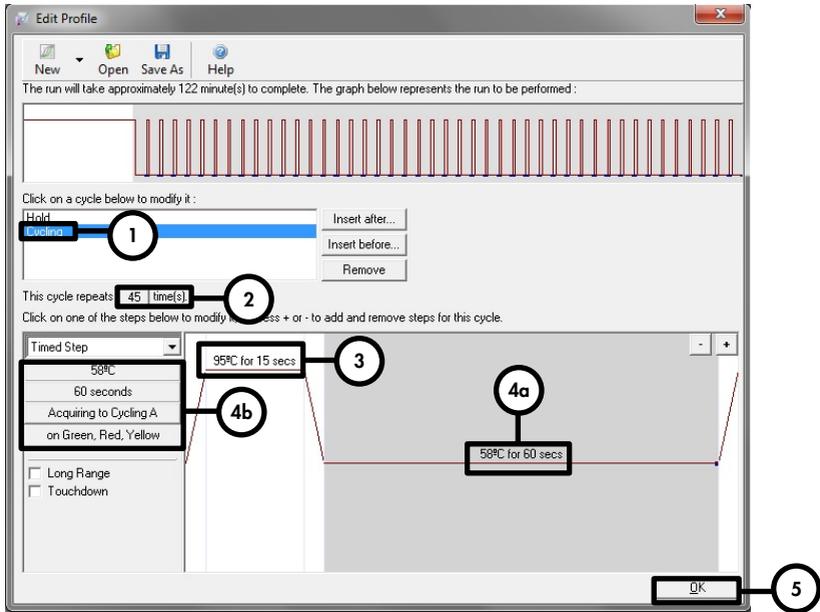


Abbildung 6: Amplifikation der DNA.

10. Der Messbereich der Fluoreszenzkanäle muss auf die Fluoreszenzintensitäten in den PCR-Röhrchen abgestimmt werden. Klicken Sie im Dialogfeld **New Run Wizard** (Assistent für neue Läufe) auf **Gain Optimisation** (Optimierung der Verstärkung) (Abb. 4, Schritt 2), um das Dialogfeld **Auto-Gain Optimisation Setup** (Einrichtung der automatischen Verstärkungsoptimierung) zu öffnen (Abb. 7). Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (Optimierung vor erster Akquisition durchführen) (Abb. 7). Achten Sie darauf, dass alle drei Kanäle (Green, Red und Yellow) für **Auto-Gain Optimisation** (Automatische Verstärkungsoptimierung) ausgewählt sind (Abb. 7). (Wählen Sie die Kanäle im Dropdown-Menü unter **Channel Settings** [Kanaleinstellungen] und klicken Sie auf **Add** [Hinzufügen].) Klicken Sie im Dialogfeld **Auto-Gain Optimisation Setup** (Einrichtung der automatischen Verstärkungsoptimierung) auf **Close** (Schließen), wenn die Verstärkungskalibrierung abgeschlossen ist.

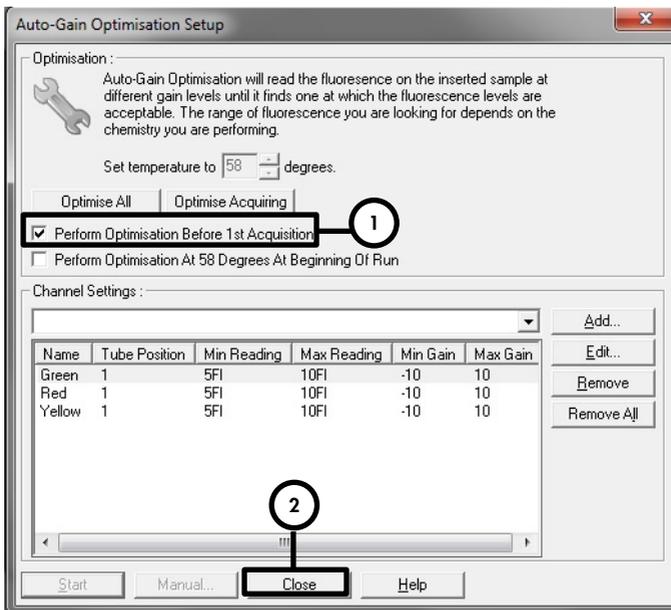


Abbildung 7: Einstellen der Sensitivität der Fluoreszenzkanäle

11. Die bei der Kalibrierung der Kanäle ermittelten Verstärkungswerte werden automatisch gespeichert und im letzten Menüfenster des Programmierverfahrens aufgeführt (Abb. 8). Klicken Sie auf **Start Run** (Lauf starten).

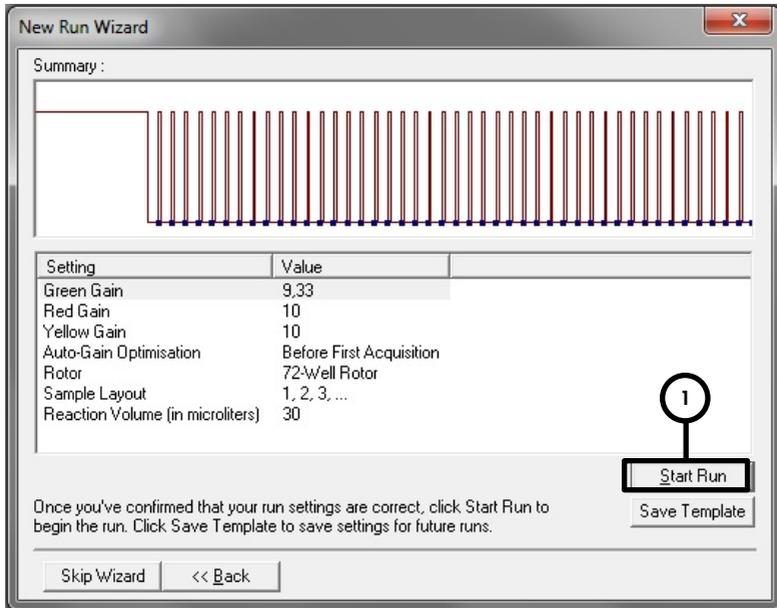


Abbildung 8: Starten des Laufs

12. Nach Abschluss des Laufs analysieren Sie die Daten (siehe „Interpretation der Ergebnisse“ auf Seite 24).

Interpretation der Ergebnisse

Validität des Laufs

Ein valider qualitativer Lauf

Die folgenden Kontrollbedingungen müssen erfüllt sein, damit ein qualitativer Lauf valide ist (Tabelle 4).

Tabelle 4: Kontrollbedingungen für einen validen qualitativen Lauf

Kontroll-ID	Detektionskanal		
	Cycling Green	Cycling Red	Cycling Yellow
Positivkontrolle (QS)	POSITIVE (POSITIV)	POSITIVE (POSITIV)	POSITIVE (POSITIV)
Negativkontrolle	NEGATIVE (NEGATIV)	NEGATIVE (NEGATIV)	POSITIVE (POSITIV)

Ein invalider qualitativer Lauf

Ein qualitativer Lauf ist invalide, wenn der Lauf nicht beendet wurde oder wenn mindestens eine Kontrollbedingung für einen validen qualitativen Lauf nicht erfüllt worden ist.

Ist ein qualitativer Lauf invalide, muss die PCR wiederholt werden. Ist keine DNA übrig, muss die DNA-Extraktion aus den ursprünglichen Proben wiederholt werden.

Valider quantitativer Lauf

Ein quantitativer Lauf ist valide, wenn alle Kontrollbedingungen für einen qualitativen Lauf erfüllt wurden (siehe Tabelle 4 oben). Darüber hinaus muss für korrekte Quantifizierungsergebnisse eine valide Standardkurve erstellt werden. Bei einem validen quantitativen Lauf muss die Standardkurve die folgenden Kontrollparameterwerte aufweisen (Tabelle 5).

Tabelle 5: Kontrollparameter für eine valide Standardkurve

Kontrollparameter	Valider Wert
Steigung	-3,743/-2,765
PCR-Effizienz	85 %/130 %
R Quadrat (R^2)	> 0,98

Ein invalider quantitativer Lauf

Ein quantitativer Lauf ist invalide, wenn der Lauf nicht beendet wurde oder wenn mindestens eine Kontrollbedingung für einen validen quantitativen Lauf nicht erfüllt worden ist.

Ist ein quantitativer Lauf invalide, muss die PCR wiederholt werden. Ist keine DNA übrig, muss die DNA-Extraktion aus den ursprünglichen Proben wiederholt werden.

Qualitative Analyse

Eine Übersicht über die Ergebnisauswertung ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Übersicht der Ergebnisauswertung

Proben-ID	Detektionskanal			Interpretation der Ergebnisse
	Cycling Green	Cycling Red	Cycling Yellow	
A	POSITIVE (POSITIV)	POSITIVE (POSITIV)*	POSITIVE (POSITIV)†	HHV-6A- und HHV-6B- spezifische DNA nachgewiesen.
B	POSITIVE (POSITIV)	NEGATIVE (NEGATIV)*	POSITIVE (POSITIV)†	HHV-6A-spezifische DNA nachgewiesen.
C	NEGATIVE (NEGATIV)	POSITIVE (POSITIV)	POSITIVE (POSITIV)†	HHV-6B-spezifische DNA nachgewiesen.
D	NEGATIVE (NEGATIV)	NEGATIVE (NEGATIV)	POSITIVE (POSITIV)	Weder HHV-6A- noch HHV-6B- spezifische DNA nachgewiesen. Die Probe enthält keine nachweisbaren Mengen HHV-6A- oder HHV-6B- spezifischer DNA.
E	NEGATIVE (NEGATIV)	NEGATIVE (NEGATIV)	NEGATIVE (NEGATIV)	PCR-Inhibition oder Reagenzversagen. Wiederholen Sie das Verfahren mit der ursprünglichen Probe oder entnehmen und testen Sie eine neue Probe.

*Auf Grundlage neuer Sequenzdaten kann eine Kreuzreaktivität des HHV-6B-spezifischen Detektionssystems mit einigen HHV-6A-Stämmen nicht ausgeschlossen werden. Diese Stämme führen – zusätzlich zum Signal im HHV-6A-Detektionskanal (Cycling Green) – zu einem schwachen Signal im HHV-6B-Detektionskanal (Cycling Red).

† Positive Ergebnisse des Cycling-Green- bzw. des Cycling-Red-Detektionskanals sind auch dann valide, wenn im Cycling-Yellow-Kanal keine interne Kontrolle nachgewiesen wird. Durch eine hohe Belastung der Probe mit HHV-6A oder HHV-6B kann das Signal der internen Kontrolle reduziert oder ganz unterdrückt sein.

Quantitative Analyse

Das *artus* HHV-6 RG PCR Kit enthält 4 Quantifizierungsstandards (QS). Diese Standards müssen als solche mit der jeweiligen Konzentration definiert werden, um eine Standardkurve für die quantitative Analyse zu erstellen (Tabelle 1, Seite 10). Mit Standards einer bekannten Konzentration kann eine Standardkurve für die quantitative Analyse erstellt werden.

$$C_T = m \log(N_0) + b$$

- C_T = Zyklusschwellenwert
- m = Steigung
- N_0 = Anfangskonzentration
- b = Achsenabschnitt

Mit der Standardkurve können die Konzentrationen positiver Proben mit unbekannter Konzentration ermittelt werden (Abbildung 9).

$$N_0 = 10^{(C_T - b)/m}$$

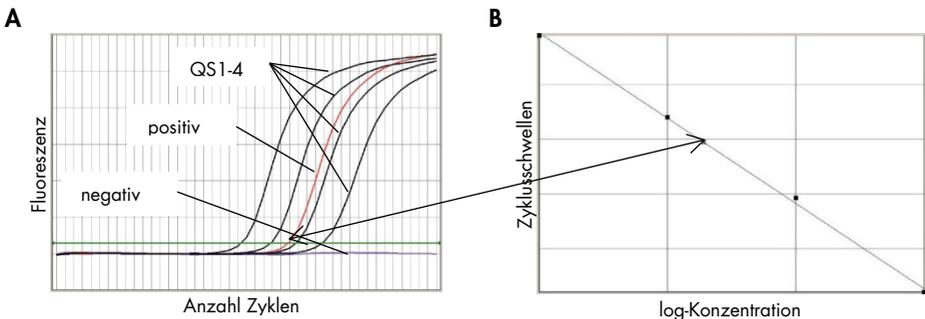


Abbildung 9: In (A) ist das Amplifikationsdiagramm der Quantifizierungsstandards sowie einer positiven und einer negativen Probe dargestellt. (B) zeigt die Standardkurvenanalyse.

Hinweis: Die Probenkonzentration wird in IU/ μ l angegeben und bezieht sich auf die Konzentration der Virus-DNA im Eluat.

Mit der folgenden Formel kann die Viruslast der Originalprobe ermittelt werden.

$$\text{Viruslast (Probe) [IU/ml]} = \frac{\text{Volumen (Eluat) [\mu l]} \times \text{Viruslast (Eluat) [IU/\mu l]}}{\text{Verwendete Probenmenge [ml]}}$$

Anwendungseinschränkungen

- Dieses Produkt darf nur von Personal verwendet werden, das speziell in Real-Time-PCR-Techniken und *In-vitro*-Diagnostik geschult wurde.
- Gute Laborpraktiken sind für die ordnungsgemäße Leistung dieses Assays essentiell.
- Achten Sie äußerst sorgfältig darauf, die Reinheit der Kitkomponenten und der Reaktionsansätze zu bewahren. Überwachen Sie alle Reagenzien auf Verunreinigung und Kontamination. Alle Reagenzien, bei denen Verdacht auf Kontamination besteht, müssen entsorgt werden.
- Ein angemessenes Vorgehen bei der Entnahme, dem Transport, der Lagerung und der Verarbeitung von Proben ist für die optimale Leistung dieses Assays erforderlich.
- Dieser Assay kann nicht direkt auf Proben angewendet werden. Vor dem Assaylauf muss eine geeignete Nukleinsäureextraktion durchgeführt werden.
- Vorhandene PCR-Inhibitoren können zu falsch-negativen oder invaliden Ergebnissen führen.
- Mögliche Mutationen in den Zielregionen des HHV-6A- und/oder HHV-6B-Genoms für die Primer und/oder Sonden dieses Kits können dazu führen, dass die Pathogene nicht erkannt werden.
- Wie bei allen Diagnostiktests müssen die Ergebnisse des *artus* HHV-6 RG PCR Kits vor dem Hintergrund aller klinischen und Laborbefunde ausgewertet werden.
- Aufgrund neuer Sequenzdaten kann eine Kreuzreaktivität des HHV-6B-spezifischen Detektionssystems mit einigen HHV-6A-Stämmen nicht ausgeschlossen werden. Diese Stämme führen – zusätzlich zum Signal im HHV-6A-Detektionskanal (Cycling Green) – zu einem schwachen Signal im HHV-6B-Detektionskanal (Cycling Red).

Qualitätskontrolle

Jede *artus* HHV-6 RG PCR Kit-Charge wird nach festgelegten Prüfkriterien getestet, um eine einheitliche Produktqualität sicherzustellen.

Leistungsmerkmale

Die spezifischen Leistungsmerkmale des *artus* HHV-6 RG PCR Kits wurden ermittelt. Dazu dienten HHV-6A-spezifische DNA (Stamm GS) und HHV-6B-spezifische DNA (Stamm Z-29) mit bekannten Konzentrationen.

Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität des *artus* HHV-6 RG PCR Kits ist definiert als Konzentration (Kopien pro μl Eluat) von HHV-6A- oder HHV-6B-spezifischer DNA, die mit einer Wahrscheinlichkeit von $\geq 95\%$ nachgewiesen werden kann. Die analytische Sensitivität wurde mithilfe einer Verdünnungsreihe von HHV-6A-DNA und HHV-6B-DNA mit bekannten Konzentrationen ermittelt (Tabellen 7 und 8).

Tabelle 7: PCR-Ergebnisse für die Berechnung der analytischen Sensitivität der HHV-6A-spezifischen Amplifikation

Verwendete Konzentration (Kopien/ μl)	Anzahl Replikate	Anzahl positive Proben	Trefferquote (%)
3,33	18	18	100
1,05	18	18	100
0,33	18	11	61
0,11	18	10	56
0,03	18	3	17
0,01	18	1	6
0,003	18	1	6
0,001	18	0	0

Tabelle 8: PCR-Ergebnisse für die Berechnung der analytischen Sensitivität der HHV-6B-spezifischen Amplifikation

Verwendete Konzentration (Kopien/ μ l)	Anzahl Replikate	Anzahl positive Proben	Trefferquote (%)
10,50	18	18	100
3,33	36	36	100
1,05	18	16	89
0,33	18	8	44
0,11	18	1	6
0,03	18	3	17
0,01	18	1	6
0,003	18	0	0

Die analytische Sensitivität des *artus* HHV-6 RG PCR Kits wurde anhand einer Probit-Analyse ermittelt und betrug 1,46 Kopien/ μ l Eluat [95%-Konfidenzintervall (KI): 0,72 bis 4,57 Kopien/ μ l] für HHV-6A-spezifische DNA. Die analytische Sensitivität für den Nachweis von HHV-6B-spezifischer DNA betrug 2,58 Kopien/ μ l Eluat (95%-KI: 1,44 bis 6,30 Kopien/ μ l).

Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität des *artus* HHV-6 RG PCR Kits beruht auf der sorgfältigen Auswahl von Oligonukleotiden (Primer und Sonden). Die Oligonukleotide wurden im Rahmen einer Sequenzvergleichsanalyse gegen öffentlich erhältliche Sequenzen geprüft. So soll sichergestellt werden, dass alle relevanten HHV-6-Genotypen erkannt werden. Darüber hinaus wurde die Spezifität des *artus* HHV-6 RG PCR Kits getestet. Dazu diente ein Panel genomischer DNA/RNA von anderen Herpesviren oder anderen Pathogenen, die für immungeschwächte Patienten relevant sind (Tabelle 9).

Tabelle 9: Auf Kreuzreaktivität getestete Organismen

Organismus	Detektionskanal		
	Cycling Green (HHV-6A)	Cycling Red (HHV-6B)	Cycling Yellow (IC)
Herpes-simplex-Virus 1	negativ	negativ	valide
Herpes-simplex-Virus 2	negativ	negativ	valide
Varicella-Zoster-Virus	negativ	negativ	valide
Epstein-Barr-Virus	negativ	negativ	valide
Cytomegalovirus	negativ	negativ	valide
Humanes Herpesvirus 7	negativ	negativ	valide
Humanes Herpesvirus 8	negativ	negativ	valide
BK-Virus	negativ	negativ	valide
JC-Virus	negativ	negativ	valide
Parvovirus B19	negativ	negativ	valide
Hepatitis-A-Virus	negativ	negativ	valide
Hepatitis-B-Virus	negativ	negativ	valide
Hepatitis-C-Virus	negativ	negativ	valide
Humanes Immundefizienz-Virus 1	negativ	negativ	valide

Bei dem *artus* HHV-6 RG PCR Kit wurde keine Kreuzreaktivität mit den angegebenen Organismen festgestellt.

Linearer Bereich

Der lineare Bereich des *artus* HHV-6 RG PCR Kits wurde anhand einer logarithmischen Verdünnungsreihe mit HHV-6A- und HHV-6B-spezifischer DNA ermittelt. Die DNA-Konzentrationen lagen zwischen 1×10^8 und 10^0 Kopien/ μ l (Abbildung 10). Von jeder Verdünnung wurden mindestens 6 Replikate analysiert.

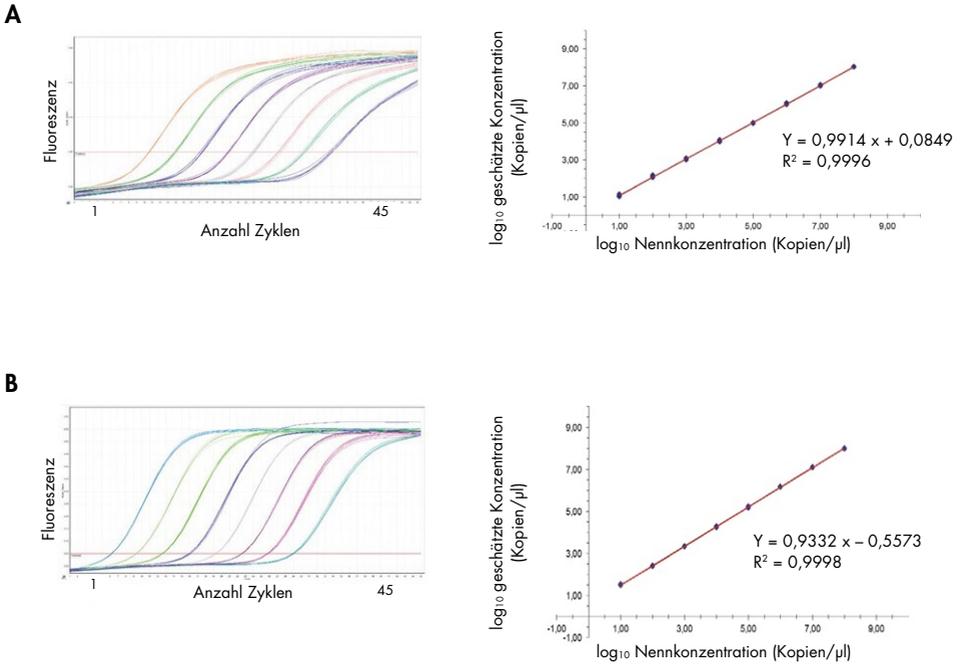


Abbildung 10: Amplifikationskurven und lineare Regressionsanalyse einer Verdünnungsreihe: (A) HHV-6A-spezifische DNA und (B) HHV-6B-spezifische DNA

Der lineare Bereich des *artus* HHV-6 RG PCR Kits für HHV-6A- und HHV-6B-spezifische DNA erstreckt sich über mindestens 7 Größenordnungen.

Präzision

Die Präzision des *artus* HHV-6 RG PCR Kits wurde ermittelt. Dazu wurden die Intra-Assay-Variabilität (Variabilität innerhalb eines einzelnen Experiments), die Inter-Assay-Variabilität (Variabilität im Vergleich verschiedener Experimente) und die Inter-Chargen-Variabilität (Variabilität im Vergleich verschiedener Herstellungsladungen) ermittelt.

Die Variabilitätsdaten werden in Form von Standardabweichung, Varianz und Variationskoeffizient ausgedrückt. Die Daten basieren auf der quantitativen Analyse definierter Konzentrationen von genomischer HHV-6-DNA und auf Zyklusschwellenwerten (C_T) der internen Kontrolle (Tabellen 10 bis 12). Zur Ermittlung der Intra-Assay-, Inter-Assay- und Inter-Chargen-Variabilität wurden mindestens 6 Replikate pro Probe analysiert. Durch Kombination der drei Analysen wurde die Gesamtvarianz berechnet.

Tabelle 10: Präzision der HHV-6A-Amplifikation

HHV-6A-spezifisches System	Durchschnittliche Konzentration (Kopien/μl)	Standardabweichung	Varianz	Variationskoeffizient (%)
Intra-Assay-Variabilität	22,07	2,75	7,56	12,50
Inter-Assay-Variabilität	23,32	2,88	8,28	12,34
Inter-Chargen-Variabilität	23,63	3,02	9,10	12,76
Gesamtvarianz	23,94	2,85	8,12	11,90

Tabelle 11: Präzision der HHV-6B-Amplifikation

HHV-6B-spezifisches System	Durchschnittliche Konzentration (Kopien/μl)	Standardabweichung	Varianz	Variationskoeffizient (%)
Intra-Assay-Variabilität	21,58	4,83	23,32	22,37
Inter-Assay-Variabilität	25,55	3,62	13,10	14,17
Inter-Chargen-Variabilität	24,54	4,63	21,44	18,87
Gesamtvarianz	24,23	4,36	19,04	18,01

Tabelle 12: Präzision der Amplifikation der internen Kontrolle

Interne Kontrolle	Durchschnittlicher Zykluswellenwert (C _i)	Standardabweichung	Varianz	Variationskoeffizient (%)
Intra-Assay-Variabilität	21,97	0,11	0,01	0,51
Inter-Assay-Variabilität	21,98	0,09	0,01	0,40
Inter-Chargen-Variabilität	21,97	0,10	0,01	0,44
Gesamvarianz	21,97	0,09	0,01	0,39

Diagnostische Evaluierung

Die diagnostische Sensitivität und Spezifität des *artus* HHV-6 RG PCR Kits werden regelmäßig untersucht. Dazu werden bereits mit Referenzmethoden untersuchte Referenz- und Diagnostikproben analysiert (Tabelle 13).

Tabelle 13: Diagnostische Evaluierung des *artus* HHV-6 RG PCR Kits

		<i>artus</i> HHV-6 RG PCR Kit		
		HHV-6A	HHV-6B	NEGATIV
Referenz- methode	HHV-6A	8	0	0
	HHV-6B	0	19	0
	NEGATIV	0	0	3

Reproduzierbarkeit

Durch die Analyse von etablierten HHV-6-Ringversuchen wurden die Spezifität, die Sensitivität und die Genauigkeit der Quantifizierung mit dem *artus* HHV-6 PCR Kit untersucht. Um die Reproduzierbarkeit des *artus* HHV-6 RG PCR Kits sicherzustellen, werden die Spezifität und Sensitivität untersucht, indem regelmäßig etablierte HHV-6-Ringversuche und charakterisierte diagnostische Proben analysiert werden (Tabelle 14).

Tabelle 14: Ergebnisse der Analyse eines HHV-6-Ringversuchs (QCMD)

Ringversuch			<i>artus</i> HHV-6 RG PCR Kit		
Proben-ID	Probeninhalt	Erwartete Konzentration (Kopien/ μ l)	Nachgewiesene HHV-6A-Konzentration (Kopien/ μ l)	Nachgewiesene HHV-6B-Konzentration (Kopien/ μ l)	Interne Kontrolle
HHV6DNA14-01	HHV-6B	1002	–	474	valide
HHV6DNA14-02	HHV-6A	596	94	–	valide
HHV6DNA14-03	HHV-6A	3020	522	–	valide
HHV6DNA14-04	HHV-6A	171	66	–	valide
HHV6DNA14-05	HHV-6B	10.000	–	6330	valide
HHV6DNA14-06	HHV-6B	294	–	93	valide
HHV6DNA14-07	HCMV	–	–	–	valide
HHV6DNA14-08	HHV-6-negativ	–	–	–	valide
HHV6DNA14-09	HHV-6B	843	–	894	valide
HHV6DNA14-10	HHV-6B	8954	–	9300	valide

Symbole

Die Symbole in der folgenden Tabelle werden in dieser Gebrauchsanweisung verwendet.

Symbol	Bedeutung des Symbols
 96	Inhalt ausreichend für 96 Tests
	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum
	Katalognummer
	Chargenbezeichnung
	Zulässiger Temperaturbereich
	Hersteller

Symbol

Bedeutung des Symbols



Verwendbar bis



Materialnummer



Global Trade Item Number



Gebrauchsanweisung beachten

Hilfe zur Fehlerbehebung

Die Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler beim QIAGEN Technischen Service stehen unterstützend zur Seite, falls Sie Fragen zu den Informationen und/oder Protokollen in diesem Handbuch oder zu den für die Proben und Tests verwendeten Methoden haben sollten (Kontaktinformationen siehe unter **www.qiagen.com**).

Referenzen

1. Govind, S., Hockley, J., Morris, C., and the Collaborative Study Group. Collaborative Study to establish the 1st WHO International Standard for Human Herpes Virus 6B (HHV-6B) DNA for nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays. WHOECBS Report, 2017. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/260259/WHO-BS-2017.2321-eng.pdf>.

Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
<i>artus</i> HHV-6 RG PCR Kit (96)	Für 96 Reaktionen: Master A und B, 4 Quantifizierungsstandards, interne Kontrolle, H ₂ O (PCR-Qualität)	4521265
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Für 50 DNA-Präparationen: 50 QIAamp Mini Spin Columns, Proteinase K, Reagenzien, Puffer, Sammelröhrchen (2 ml)	51304
QIAamp DNA Mini Kit (250)	Für 250 DNA-Präparationen: 250 QIAamp Mini Spin Columns, Proteinase K, Reagenzien, Puffer, Sammelröhrchen (2 ml)	51306
Rotor-Gene Q und Zubehör		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Real-Time-PCR-Thermocycler mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), Laptop-Computer, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation und Schulung	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Plattform	Real-Time-PCR-Thermocycler mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), Laptop-Computer, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, ohne Installation und Schulung	9002022

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package Plus	Real-Time-PCR-Cycler mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), Laptop-Computer, Software, Zubehör: umfasst Priority Package mit Software, Installation, Schulung, 3 Jahre Garantie auf Teile und Arbeit und 3 vorbeugende Wartungen	9001866
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package	Real-Time-PCR-Cycler mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), Laptop-Computer, Software, Zubehör: umfasst Priority Package mit Software, Installation, Schulung, 2 Jahre Garantie auf Teile und Arbeit und 2 vorbeugende Wartungen	9001865
Rotor-Gene Q 5plex System	Real-Time-PCR-Thermocycler mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), Laptop-Computer, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation und Schulung	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Plattform	Real-Time-PCR-Thermocycler mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), Laptop-Computer, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, ohne Installation und Schulung	9001570

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package Plus	Real-Time-PCR-Thermocycler mit 6 Kanälen (blau, grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), Laptop-Computer, Software, Zubehör: umfasst Priority Package mit Software, Installation, Schulung, 3 Jahre Garantie auf Teile und Arbeit und 3 vorbeugende Wartungen	9001870
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package	Real-Time-PCR-Thermocycler mit 6 Kanälen (blau, grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), Laptop-Computer, Software, Zubehör: umfasst Priority Package mit Software, Installation, Schulung, 2 Jahre Garantie auf Teile und Arbeit und 2 vorbeugende Wartungen	9001869
Rotor-Gene Q 6plex System	Real-Time-PCR-Thermocycler mit 6 Kanälen (blau, grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), umfasst Laptop-Computer, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation und Schulung	9001660
Rotor-Gene Q 6plex Plattform	Real-Time-PCR-Thermocycler mit 6 Kanälen (blau, grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), umfasst Laptop-Computer, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, ohne Installation und Schulung	9001590

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminium-Ladeblock für die manuelle Einrichtung von Reaktionen mit einer Einkanalpipette in 72 x 0,1-ml-Röhrchen	9018901
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250)	250 Streifen mit je 4 Röhrchen und Deckeln, für 1000 Reaktionen je 10–50 µl	981103
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2500)	10 x 250 Streifen mit je 4 Röhrchen und Deckeln, für 10.000 Reaktionen je 10–50 µl	981106

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen

Revisionsverlauf des Dokuments

Datum	Änderungen
R4, September 2018	Änderung der Assay Reporting Units von Kopienzahl zu internationalen Einheiten (<i>International Units, IU</i>).
R5, November 2019	Hinweis zum Umrechnungsfaktor für Quantifizierungsstandards des artus HHV-6 RG PCR Kit (96) aus dem Revisionsverlauf des Handbuchs entfernt. Abschnitt „Angaben zum Pathogen“ um Informationen zu HHV-6A und HHV-6B ergänzt.

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung für das *artus* HHV-6 RG PCR Kit

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer oder Anwender des Produkts die folgenden Bedingungen an:

1. Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt und diesem Handbuch bereitgestellten Protokollen und nur mit den Komponenten, die im Kit mitgeliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen seiner Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zu den Kits gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zu den Kits gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der Anwendungen, die in den mit dem Produkt bereitgestellten Protokollen, diesem Handbuch sowie zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschrieben werden. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von QIAGEN-Anwendern für andere QIAGEN-Anwender zur Verfügung gestellt. Diese Protokolle wurden von QIAGEN nicht eingehend geprüft oder optimiert. QIAGEN übernimmt für diese Protokolle keine Garantie und garantiert auch nicht, dass sie keine Rechte Dritter verletzen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieses Kit und/oder die mit diesem Kit durchgeführten Anwendungen die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieses Kit und seine Komponenten sind für den einmaligen Gebrauch lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, aufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Nutzer des Kits stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen 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 seinen Komponenten entstehen.

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

Der Kauf dieses Produkts berechtigt den Käufer zu dessen Nutzung in der humanen *In-vitro*-Diagnostik. Außer dieser speziellen Berechtigung wird durch den Kauf kein allgemeines Patent und keine Lizenz jeglicher Art erworben.

Warenzeichen: QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, Rotor-Gene®, Sample to Insight® (QIAGEN Group); FAM™, JOE™ (Thermo Fisher Scientific oder Tochtergesellschaften); Cy® (GE Healthcare). Eingetragene Marken, Warenzeichen usw., die in diesem Dokument verwendet werden, gelten auch ohne ausdrückliche Kennzeichnung als gesetzlich geschützt.

1117341 11-19 HB-1996-005 © 2019 altona Diagnostics GmbH, alle Rechte vorbehalten.

