

# artus<sup>®</sup> HSV-1/2 LC PCR Kit

## Manuale



24 (N. catalogo 4500063)



96 (N. catalogo 4500065)

Diagnostica quantitativa in vitro

Da utilizzare con lo strumento *LightCycler*<sup>®</sup>

Versione 1



4500063, 4500065



104688811



Q1AGEN GmbH, Q1AGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

R2

**MAT**

1046888IT



## QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN è il leader mondiale nelle tecnologie per campioni e analisi destinate all'isolamento e alla rilevazione del contenuto di qualsiasi campione biologico. I nostri prodotti e i nostri servizi di alta qualità sono una garanzia di successo, dall'analisi del campione al risultato.

### **QIAGEN definisce gli standard:**

- nella purificazione del DNA, RNA e delle proteine
- nell'analisi di acidi nucleici e proteine
- nella ricerca sul microRNA e sull'RNAi
- nelle tecnologie automatizzate per campioni e analisi

Il nostro obiettivo è il vostro successo. Per ulteriori informazioni, visitare il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Indice

1. Contenuto.....	4
2. Conservazione .....	4
3. Materiali e dispositivi aggiuntivi richiesti .....	5
4. Precauzioni generali .....	5
5. Informazioni sull'agente patogeno .....	5
6. Principio della real-time PCR.....	6
7. Descrizione del prodotto.....	6
8. Protocollo .....	8
8.1 Estrazione del DNA.....	8
8.2 Controllo interno.....	11
8.3 Quantificazione .....	12
8.4 Preparazione della PCR .....	13
8.5 Programmazione dello strumento LightCycler .....	17
9. Analisi dei dati .....	20
10. Risoluzione dei problemi.....	24
11. Specifiche .....	26
11.1 Sensibilità analitica.....	26
11.2 Specificità .....	28
11.3 Precisione .....	29
11.4 Robustezza .....	32
11.5 Riproducibilità .....	32
11.6 Valutazione diagnostica .....	32
12. Avvertenze speciali per l'uso del prodotto.....	33
13. Informazioni di sicurezza.....	33
14. Controllo di qualità.....	33
15. Riferimento bibliografico .....	33
16. Spiegazione dei simboli .....	34

# artus HSV-1/2 LC PCR Kit

Kit da utilizzare con lo strumento *LightCycler*.

## 1. Contenuto

	Etichettatura e contenuto	Art. N. 4500163 24 reazioni	Art. N. 4500165 96 reazioni
<b>Blu</b>	HSV LC Master	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
<b>Rosso</b>	HSV1 LC/RG/TM QS 1 <sup>xx</sup> 1 x 10 <sup>4</sup> cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
<b>Rosso</b>	HSV1 LC/RG/TM QS 2 <sup>xx</sup> 1 x 10 <sup>3</sup> cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
<b>Rosso</b>	HSV1 LC/RG/TM QS 3 <sup>xx</sup> 1 x 10 <sup>2</sup> cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
<b>Rosso</b>	HSV1 LC/RG/TM QS 4 <sup>xx</sup> 1 x 10 <sup>1</sup> cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
<b>Rosso</b>	HSV2 LC/RG/TM QS 1 <sup>xx</sup> 1 x 10 <sup>4</sup> cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
<b>Rosso</b>	HSV2 LC/RG/TM QS 2 <sup>xx</sup> 1 x 10 <sup>3</sup> cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
<b>Rosso</b>	HSV2 LC/RG/TM QS 3 <sup>xx</sup> 1 x 10 <sup>2</sup> cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
<b>Rosso</b>	HSV2 LC/RG/TM QS 4 <sup>xx</sup> 1 x 10 <sup>1</sup> cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
<b>Verde</b>	HSV LC IC <sup>xx</sup>	1 x 1.000 μl	2 x 1.000 μl
<b>Bianco</b>	Water (PCR grade)	1 x 1.000 μl	1 x 1.000 μl

<sup>xx</sup>QS = Standard di quantificazione  
IC = Controllo interno

## 2. Conservazione

I componenti dell'artus HSV-1/2 LC PCR Kit devono essere conservati tra -30 e -15 °C e possono essere utilizzati fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Evitare di scongelarli e congelarli più di due volte, poiché ciò potrebbe provocare una riduzione della sensibilità. In caso di utilizzo non regolare è necessario congelare aliquote dei reagenti. Qualora fosse necessario conservare i componenti a +4°C, non superare l'intervallo massimo di cinque ore.

### 3. Materiali e dispositivi aggiuntivi richiesti

- Guanti da laboratorio senza talco
- Kit di estrazione del DNA (vedi **8.1 Estrazione del DNA**)
- Pipette (regolabili)
- Puntali sterili con filtro per pipette
- Agitatore vortex
- Centrifuga da banco con rotore per provette di reazione da 2 ml
- Color Compensation Set (Roche Diagnostics, cat. n. 2 158 850) per l'installazione di un file Crosstalk Color Compensation
- Capillari *LightCycler* (20 µl)
- Cooling block *LightCycler*
- Strumento *LightCycler*
- Capping Tool *LightCycler*

### 4. Precauzioni generali

Chi utilizza il prodotto deve sempre attenersi a quanto segue:

- Utilizzare puntali sterili con filtro per pipette.
- Estrarre e conservare il materiale positivo (campioni, controlli, ampliconi) separatamente da tutti gli altri reagenti e aggiungerlo alla mix di reazione in luogo separato.
- Prima dell'inizio del test scongelare tutti i componenti a temperatura ambiente.
- Una volta scongelati agitare brevemente i componenti su vortex e sottoporli a breve centrifugazione.
- Operare rapidamente in ghiaccio o nel cooling block *LightCycler*.

### 5. Informazioni sull'agente patogeno

Il virus herpes simplex (HSV), presente nei liquidi delle vescicole, nella saliva e nelle secrezioni vaginali, si trasmette in presenza di cattive condizioni igieniche, tramite l'attività sessuale e in fase perinatale. La maggior parte delle malattie legate al virus HSV è accompagnata dalla comparsa di vescicole sulla pelle e alle mucose (bocca e genitali).

L'infezione da HSV può manifestarsi in forma primaria, asintomatica in oltre il 90 % dei casi, oppure come recidiva. Tra le infezioni primarie provocate dal virus HSV-1 sono comprese: gengivostomatite, eczema erpetico, cheratocongiuntivite ed encefalite. Nell'ambito delle infezioni primarie il virus HSV-2 si manifesta principalmente con vulvovaginite, meningite e herpes diffuso dei neonati. Le infezioni recidive da HSV sono caratterizzate dalla comparsa di vescicole nelle regioni nasale, labiale e genitale. Le recidive di cheratocongiuntivite e meningite sono estremamente pericolose.

## 6. Principio della real-time PCR

Per la diagnosi tramite reazione a catena della polimerasi (PCR) vengono amplificate specifiche regioni del genoma dell'agente patogeno. Per la real-time PCR la rilevazione richiede l'impiego di sostanze fluorescenti, di solito associate a sonde oligonucleotidiche, che si legano specificatamente al prodotto di amplificazione. La rilevazione dell'intensità di fluorescenza durante la real-time PCR consente di identificare e quantificare i prodotti senza dover riaprire le provette dei campioni al termine della PCR (Mackay, 2004).

## 7. Descrizione del prodotto

L'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit è un sistema pronto all'uso per la rilevazione e la differenziazione del DNA del virus Herpes Simplex 1 e del virus Herpes Simplex 2 tramite la reazione a catena della polimerasi (PCR) e tramite la curva di dissociazione, utilizzando lo strumento *LightCycler*. L'*HSV LC Master* contiene reagenti ed enzimi per l'amplificazione specifica di una regione di 148 bp del genoma del virus herpes simplex, nonché per la rilevazione immediata dello specifico amplicone nel canale fluorimetrico F2 dello strumento *LightCycler*. L'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit contiene anche un secondo sistema di amplificazione eterologo per la rilevazione di una possibile inibizione della PCR, che viene identificato come *Controllo interno* (IC) nel canale fluorimetrico F3 e non riduce il limite di rilevabilità analitica della PCR di HSV (vedi 11.1 **Sensibilità analitica**).

Per distinguere i diversi sottotipi il sistema utilizza la specifica temperatura di melting (fusione) delle sonde, che durante la curva di dissociazione nel canale fluorimetrico F2 produce un segnale a 69°C per HSV-1, a 66°C per HSV-2. Per effetto di differenti condizioni di estrazione e di conseguenti concentrazioni di tampone si può arrivare a oscillazioni di 1 - 2°C, che però si riferiscono sia all'amplicone HSV-1 che all'amplicone HSV-2. Il kit comprende controlli positivi esterni (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*), che consentono di determinare la carica dell'agente patogeno. A tale proposito, consultare il paragrafo **8.3 Quantificazione**.

**Attenzione:** il profilo della temperatura per la rilevazione del DNA del virus herpes simplex con l'*artus HSV-1/2 LC PCR Kit* corrisponde a quello con *artus EBV LC PCR Kit*, *artus VZV LC PCR Kit* e *artus CMV LC PCR Kit*. Le reazioni di PCR per questi sistemi *artus* possono quindi essere eseguite e analizzate in una sola corsa. A questo proposito osservare le indicazioni specifiche per l'analisi dei dati ai paragrafi **8.3 Quantificazione** e **9. Analisi dei dati**.

## 8. Protocollo

### 8.1 Estrazione del DNA

Sono disponibili kit per l'estrazione del DNA di diversi produttori. Attenendosi al protocollo del produttore prescelto utilizzare la quantità di campione indicata e eseguire l'estrazione del DNA conformemente alle istruzioni. Si raccomanda l'utilizzo dei seguenti kit d'estrazione:

Campione	Kit di estrazione	Numero di catalogo	Produttore	Carrier RNA
siero, plasma, liquor, tamponi	QIAamp® UltraSens Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	incluso
	QIAamp® DNA Mini Kit (50)	51 304	QIAGEN	non incluso
liquor	EZ1® DSP Virus Kit (48)*	62 724	QIAGEN	incluso

\*Per l'impiego in combinazione con la workstation BioRobot EZ1 DSP (cat. n. 9001360) e l'EZ1 DSP Virus Card (cat. n. 9017707).

#### Importante per l'uso del QIAamp UltraSens Virus Kit e del QIAamp DNA Mini Kit:

- L'aggiunta di **carrier RNA** è di importanza fondamentale per l'efficacia della purificazione e quindi per la resa del DNA/RNA. Nel caso in cui il kit di estrazione utilizzato non dovesse contenere carrier RNA, si raccomanda assolutamente di aggiungere carrier RNA (RNA-Homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, cat. n. 27-4110-01) soprattutto quando si estraggono acidi nucleici da fluidi corporei privi di cellule e da materiali a basso contenuto di DNA/RNA (per esempio liquor). Procedere come segue:
  - a) Risospendere il carrier RNA liofilizzato nel tampone di eluizione (non nel tampone di lisi) del kit di estrazione (per es. tampone AE del QIAamp DNA Mini Kit) e effettuare una diluizione ad una concentrazione di 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Ripartire questa soluzione di carrier RNA nel numero desiderato di aliquote, da conservare a  $-20\text{ C}$ . Evitare di scongelare più volte ( $> 2\text{ x}$ ) un'aliquota di carrier RNA.



b) Per ogni procedura di purificazione dovrebbe essere utilizzato 1  $\mu\text{g}$  di carrier RNA per 100  $\mu\text{l}$  di tampone di lisi. Se per esempio il protocollo di estrazione prevede 200  $\mu\text{l}$  di tampone di lisi per ogni campione da purificare, aggiungere 2  $\mu\text{l}$  di carrier RNA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) direttamente al tampone di lisi. Prima dell'inizio di ogni procedura di purificazione deve essere preparata a fresco una miscela di tampone di lisi e di carrier RNA (e eventualmente di Controllo interno, vedi **8.2 Controllo interno**) in base al seguente schema di pipettamento.

Numero dei campioni	1	12
tampone di lisi	per es. 200 $\mu\text{l}$	per es. 2400 $\mu\text{l}$
carrier RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	2 $\mu\text{l}$	24 $\mu\text{l}$
<b>volume totale</b>	<b>202 <math>\mu\text{l}</math></b>	<b>2424 <math>\mu\text{l}</math></b>
<b>volume per la purificazione</b>	<b>200 <math>\mu\text{l}</math></b>	<b>200 <math>\mu\text{l}</math> ciascuno</b>

- c) Utilizzare subito la miscela di tampone di lisi e di carrier RNA preparata a fresco per la purificazione. Non è possibile conservare la miscela.
- L'aggiunta di **carrier RNA** è di importanza fondamentale per l'efficacia della purificazione e quindi per la resa del DNA/RNA. Per ottenere una maggiore stabilità del carrier RNA in dotazione con il QIAamp UltraSens Virus Kit consigliamo la seguente procedura diversa da quella indicata dal manuale del kit di estrazione:
    - a. Prima del primo utilizzo del kit di estrazione risospendere il carrier RNA liofilizzato in 310  $\mu\text{l}$  del tampone di eluizione contenuto nel kit (concentrazione finale 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , non utilizzare tampone di lisi) e ripartire questa soluzione di carrier RNA nel numero desiderato di aliquote, da conservare a  $-20\text{ C}$ . Evitare di scongelare più volte ( $> 2\text{ x}$ ) un' aliquota di carrier RNA.
    - b. Prima dell'inizio di ogni procedura di purificazione deve essere preparata a fresco una miscela di tampone di lisi e di carrier RNA (e eventualmente di *Controllo interno*, vedi **8.2 Controllo interno**) in base al seguente schema di pipettamento.

Numero dei campioni	1	12
tampone di lisi AC	800 $\mu$ l	9600 $\mu$ l
carrier RNA (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	5,6 $\mu$ l	67,2 $\mu$ l
<b>volume totale</b>	<b>805,6 <math>\mu</math>l</b>	<b>9667,2 <math>\mu</math>l</b>
<b>volume per la purificazione</b>	<b>800 <math>\mu</math>l</b>	<b>800 <math>\mu</math>l ciascuno</b>

- Utilizzare subito la miscela di tampone di lisi e di carrier RNA preparata a fresco per la purificazione. Non è possibile conservare la miscela.
- Utilizzando il **QIAamp UltraSens Virus Kit** si ottiene una concentrazione del campione. Se il campione non è siero o plasma, aggiungere il 50 % (v/v) di plasma umano negativo.
- Nelle procedure di estrazione del DNA che richiedono l'utilizzo di tamponi di lavaggio contenenti **etanolo**, assicurarsi di eseguire una fase di centrifugazione aggiuntiva (tre minuti, 13.000 rpm) prima dell'eluizione, onde rimuovere residui di etanolo. Ciò impedisce eventuali inibizioni della PCR.
- L'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit non deve essere utilizzato con procedure di estrazione del DNA basate su **fenolo**.

#### Importante per l'uso dell'EZ1 DSP Virus Kit:

- L'aggiunta di **carrier RNA** è di importanza fondamentale per l'efficacia della purificazione e quindi per la resa del DNA/RNA. Ad ogni estrazione aggiungere un'adeguata quantità di carrier RNA seguendo le istruzioni contenute nell'*EZ1 DSP Virus Kit Handbook*.

**Importante:** il *Controllo interno* dell'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit può essere impiegato direttamente nella procedura di estrazione del DNA (vedi **8.2 Controllo interno**).

## 8.2 Controllo interno

Il kit comprende un *Controllo interno* (HSV LC IC), che consente di verificare **sia la procedura di estrazione del DNA che una possibile inibizione della PCR** (vedi Fig. 1). Se si usa l'**EZ1 DSP Virus Kit** per l'estrazione, il *Controllo interno* deve essere aggiunto seguendo le istruzioni contenute nell'**EZ1 DSP Virus Kit Handbook**. Se si usa il **QIAamp UltraSens Virus Kit** o il **QIAamp DNA Mini Kit**, aggiungere durante l'estrazione il *Controllo interno* in un rapporto di 0,1  $\mu\text{l}$  per 1  $\mu\text{l}$  del volume di eluizione. Ad esempio, se si utilizza il **QIAamp DNA Mini Kit** e il DNA è diluito in 200  $\mu\text{l}$  di tampone AE, aggiungere 20  $\mu\text{l}$  di *Controllo interno*. Se l'eluizione avviene in 100  $\mu\text{l}$ , aggiungere il corrispondente volume di 10  $\mu\text{l}$ . La quantità di *Controllo interno* impiegato dipende **solo** dal volume di eluizione. Il *Controllo interno* e il carrier RNA (vedi **8.1 Estrazione del DNA**), possono essere aggiunti solo

- alla miscela di tampone di lisi e di campione o
- direttamente al tampone di lisi.

Il *Controllo interno* non deve essere aggiunto direttamente al campione. Quando si aggiunge il tampone di lisi occorre considerare che la miscela di *Controllo interno* e di tampone di lisi/carrier RNA va usata immediatamente dopo la sua preparazione (la conservazione della miscela a temperatura ambiente o in frigo può portare già dopo poche ore ad un difettoso funzionamento del *Controllo interno* e quindi ad una minore efficacia della procedura di purificazione). **Non** aggiungere il *Controllo interno* e il carrier RNA direttamente al campione.

In alternativa è possibile utilizzare il *Controllo interno* **esclusivamente per il controllo di una possibile inibizione della PCR** (vedi Fig. 2). A tale scopo aggiungere per ogni reazione 0,5  $\mu\text{l}$  di *Controllo interno* direttamente a 15  $\mu\text{l}$  di **HSV LC Master**. Per ogni reazione di PCR utilizzare 15  $\mu\text{l}$  di **Master Mix\*** preparata come descritto sopra, quindi aggiungere 5  $\mu\text{l}$  di campione purificato.

---

\* L'aumento di volume determinato dall'aggiunta del *Controllo interno* durante la preparazione della PCR è trascurabile. La sensibilità del sistema di rilevazione non viene influenzata.

Se si desidera effettuare una corsa per più campioni, aumentare le quantità di *HSV LC Master* e di *Controllo interno* in base al numero dei campioni (vedi **8.4 Preparazione della PCR**).

L'*artus HSV-1/2 LC PCR Kit* e l'*artus VZV LC PCR Kit* contengono un *Controllo interno (IC)* identico. L'*artus EBV LC PCR Kit* e l'*artus CMV LC PCR Kit* contengono anche un identico *Controllo interno*.

## 8.3 Quantificazione

Gli *Standard di quantificazione* in dotazione (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4* & *HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*) vengono trattati come campioni già purificati e se ne utilizza lo stesso volume (5 µl). Per creare una curva standard nello strumento *LightCycler*, utilizzare tutti e quattro gli *Standard di quantificazione* in dotazione sia per HSV-1 che per HSV-2, definirli come standard in *Sample Loading Screen* e inserire le concentrazioni indicate (vedi *LightCycler Operator's Manual*, Version 3.5, Chapter B, 2.4. *Sample Data Entry*). Tale curva standard può essere impiegata per quantificazioni successive, sempre che in questa corsa venga utilizzato almeno uno standard ad una determinata concentrazione. A tale scopo è necessario importare la curva standard precedentemente creata (vedi *LightCycler Operator's Manual*, Version 3.5, Chapter B, 4.2.5. *Quantification with an External Standard Curve*). Per questa forma di quantificazione è necessario considerare che a causa della variabilità tra le corse della PCR, il risultato può presentare degli scarti.

**Se la corsa integra più sistemi *artus* per herpes, analizzarli separatamente con gli *Standard di quantificazione* corrispondenti.**

**Attenzione:** gli *Standard di quantificazione* vengono definiti in copie/µl. Per convertire in copie/ml di campione i valori ottenuti con l'aiuto della curva standard, utilizzare la formula seguente:

$$\text{risultato (copie/ml)} = \frac{\text{risultato (copie/}\mu\text{l)} \times \text{volume di eluizione (}\mu\text{l)}}{\text{volume del campione (ml)}}$$

Notare che nella formula di cui sopra occorre utilizzare il volume iniziale del campione. Questo è da tenere presente soprattutto quando il volume campione è stato modificato prima dell'estrazione degli acidi nucleici (per esempio per riduzione dovuta a centrifugazione o per aumento dovuto ad aggiunta di volume per raggiungere la quantità richiesta per la purificazione).

**Importante:** per semplificare l'analisi quantitativa dei sistemi *artus* con lo strumento *LightCycler*, consultare la guida disponibile all'indirizzo Internet [www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX](http://www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX) (Technical Note for quantitation on the *LightCycler 1.1/1.2/1.5* or *LightCycler 2.0* Instrument).

## 8.4 Preparazione della PCR

Assicurarsi che il cooling block e i relativi adattatori (accessori dello strumento *LightCycler*) vengano raffreddati a circa +4°C. Posizionare negli adattatori del cooling block il numero di capillari *LightCycler* necessario per le reazioni desiderate. Assicurarsi che per ciascuna corsa di PCR siano eseguiti parallelamente almeno uno *Standard di quantificazione (HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 – 4)* e un controllo negativo (Water, PCR grade). Per la creazione di una curva standard, utilizzare per ogni PCR tutti gli Standard di quantificazione forniti (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*). Prima dell'inizio del test tutti i reagenti devono essere scongelati completamente a temperatura ambiente, ben miscelati (pipettamento ripetuto o breve agitazione su vortex) e infine centrifugati.

Se si desidera utilizzare il *Controllo interno* per controllare **sia la procedura di estrazione del DNA che una possibile inibizione della PCR**, il *Controllo interno* deve essere aggiunto precedentemente alla procedura di purificazione (vedi **8.2 Controllo interno**). In tal caso attenersi al seguente schema di pipettamento (vedi anche panoramica schematica, Fig. 1):

	Numero dei campioni	1	12
1. Preparazione della Master Mix	HSV LC Master	15 $\mu$ l	180 $\mu$ l
	HSV LC IC	0 $\mu$ l	0 $\mu$ l
	<b>volume totale</b>	<b>15 <math>\mu</math>l</b>	<b>180 <math>\mu</math>l</b>
2. Preparazione reazione PCR	Master Mix	15 $\mu$ l	15 $\mu$ l ciascuno
	campione	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l ciascuno
	<b>volume totale</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>	<b>20 <math>\mu</math>l ciascuno</b>

Se si desidera utilizzare il *Controllo interno esclusivamente per la verifica di un'inibizione della PCR*, è necessario aggiungerlo direttamente all'*HSV LC Master*. In tal caso attenersi al seguente schema di pipettamento (vedi anche panoramica schematica, Fig. 2):

	Numero dei campioni	1	12
1. Preparazione della Master Mix	HSV LC Master	15 $\mu$ l	180 $\mu$ l
	HSV LC IC	0,5 $\mu$ l	6 $\mu$ l
	<b>volume totale</b>	<b>15,5 <math>\mu</math>l*</b>	<b>186 <math>\mu</math>l*</b>
2. Preparazione reazione PCR	Master Mix	15 $\mu$ l*	15 $\mu$ l* ciascuno
	campione	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l ciascuno
	<b>volume totale</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>	<b>20 <math>\mu</math>l ciascuno</b>

Nel serbatoio in plastica di ciascun capillare pipettare 15  $\mu$ l di Master Mix. Quindi aggiungere 5  $\mu$ l di DNA estratto. Analogamente è necessario utilizzare come controllo positivo 5  $\mu$ l di almeno uno degli *Standard di quantificazione* di ogni serie di Standard di quantificazione (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*) e come controllo negativo 5  $\mu$ l di acqua (Water, PCR grade). Chiudere i capillari. Per trasferire il contenuto del serbatoio in plastica ai capillari, centrifugare gli adattatori e i relativi capillari in una centrifuga da banco per dieci secondi alla velocità massima di 400 x g (2.000 rpm).

---

\* L'aumento di volume determinato dall'aggiunta del *Controllo interno* durante la preparazione della PCR è irrilevante. La sensibilità del sistema di rilevazione non viene influenzata.

## Aggiunta del *Controllo interno* alla procedura di purificazione

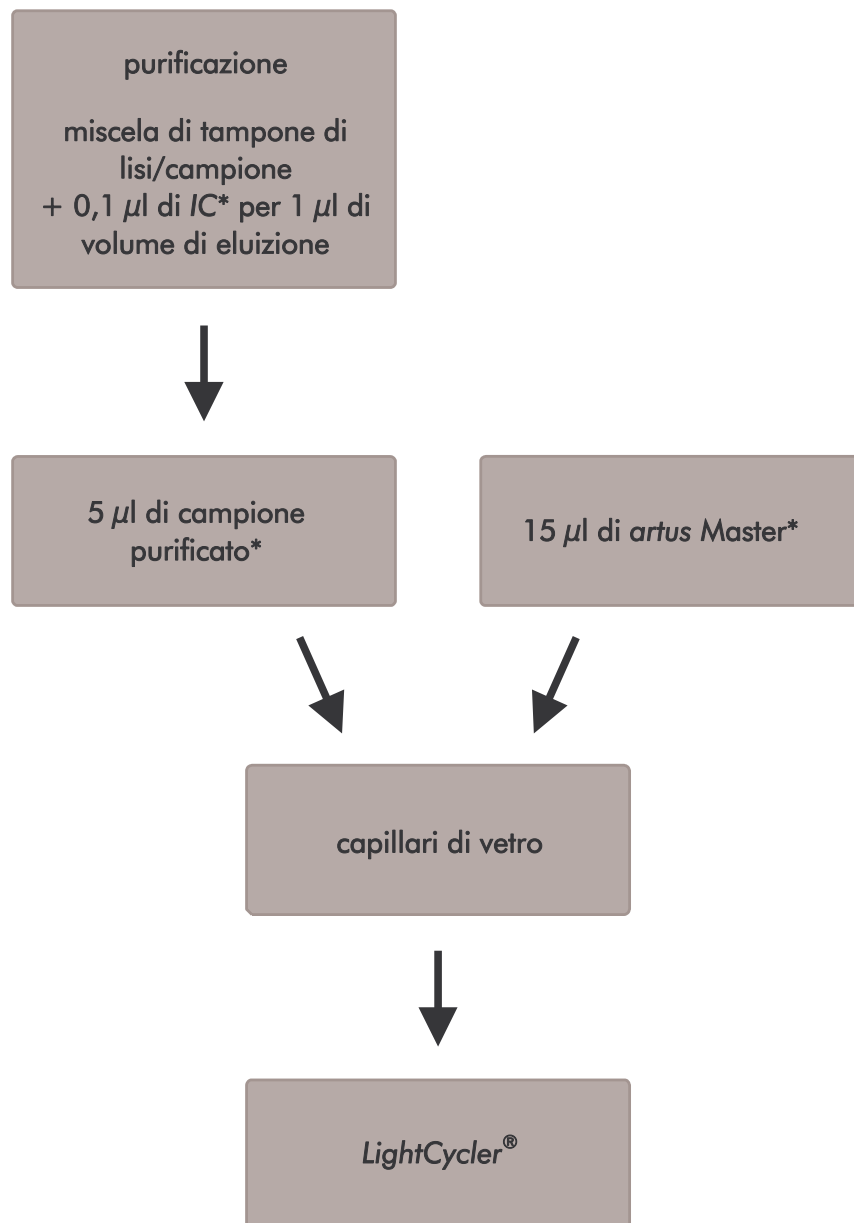


Fig. 1: Schema del ciclo di lavoro per il controllo della procedura di estrazione e dell'inibizione della PCR.

\* Per ogni fase del pipettamento è necessario che le soluzioni da utilizzare vengano completamente scongelate, ben miscelate e sottoposte a breve centrifugazione.

## Aggiunta del Controllo interno alla soluzione artus Master

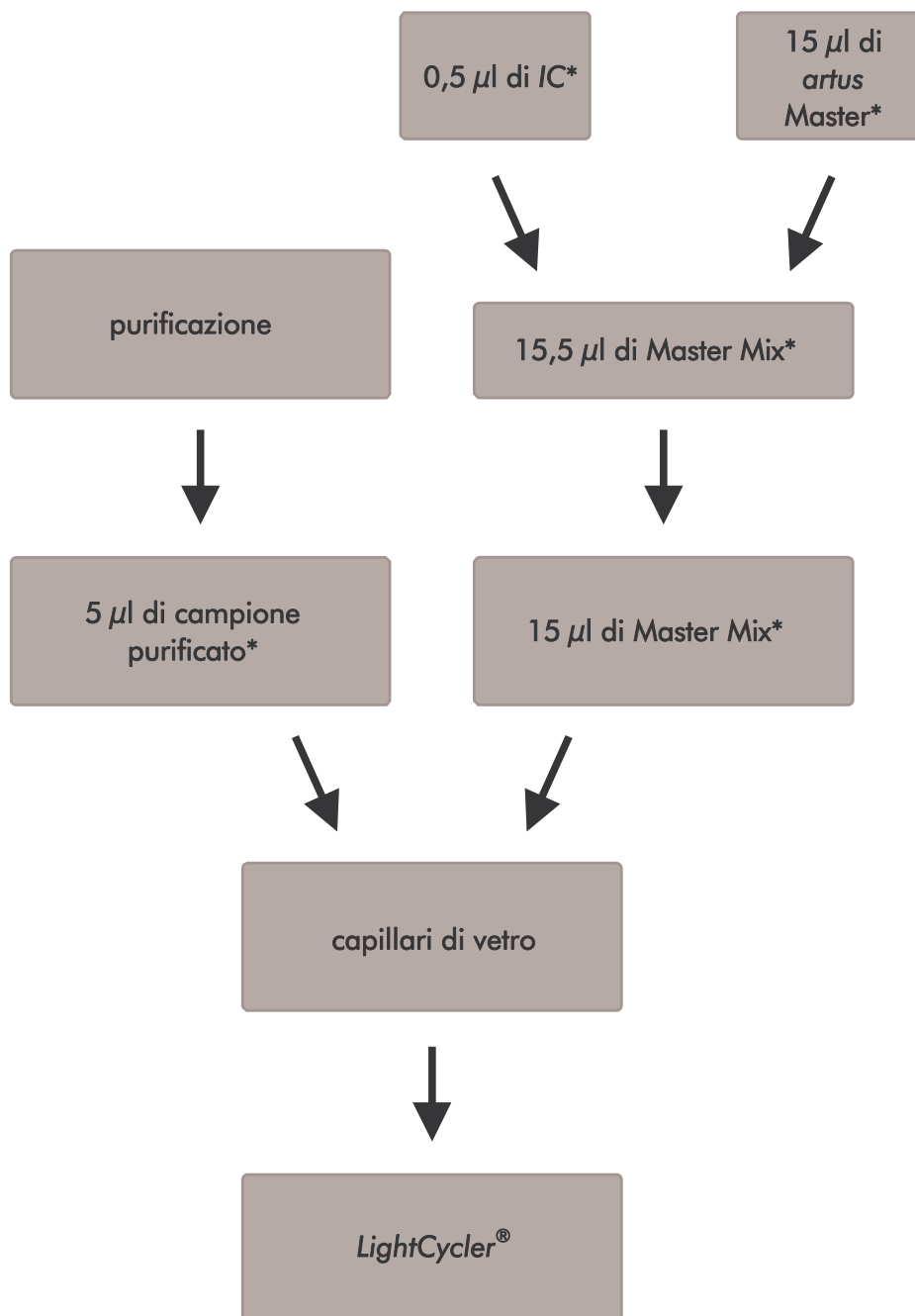


Fig. 2: Schema del ciclo di lavoro per il controllo dell'inibizione della PCR.

\* Per ogni fase del pipettamento è necessario che le soluzioni da utilizzare vengano completamente scongelate, ben miscelate e sottoposte a breve centrifugazione.



## 8.5 Programmazione dello strumento LightCycler

Per rilevare il DNA di virus herpes simplex programmare sullo strumento *LightCycler* un profilo di temperatura secondo le seguenti cinque fasi (vedi Fig. 3 - 7):

- |    |  |        |
|----|--|--------|
| A. | Attivazione iniziale dell'enzima Hot Start | Fig. 3 |
| B. | Touch Down                                 | Fig. 4 |
| C. | Amplificazione del DNA                     | Fig. 5 |
| D. | Curva di dissociazione                     | Fig. 6 |
| E. | Raffreddamento                             | Fig. 7 |

Prestare particolare attenzione alle impostazioni di *Analysis Mode*, *Cycle Program Data* e *Temperature Targets*. Nelle figure tali impostazioni sono evidenziate da riquadri neri. Per ulteriori informazioni sulla programmazione dello strumento *LightCycler*, consultare *LightCycler Operator's Manual*.

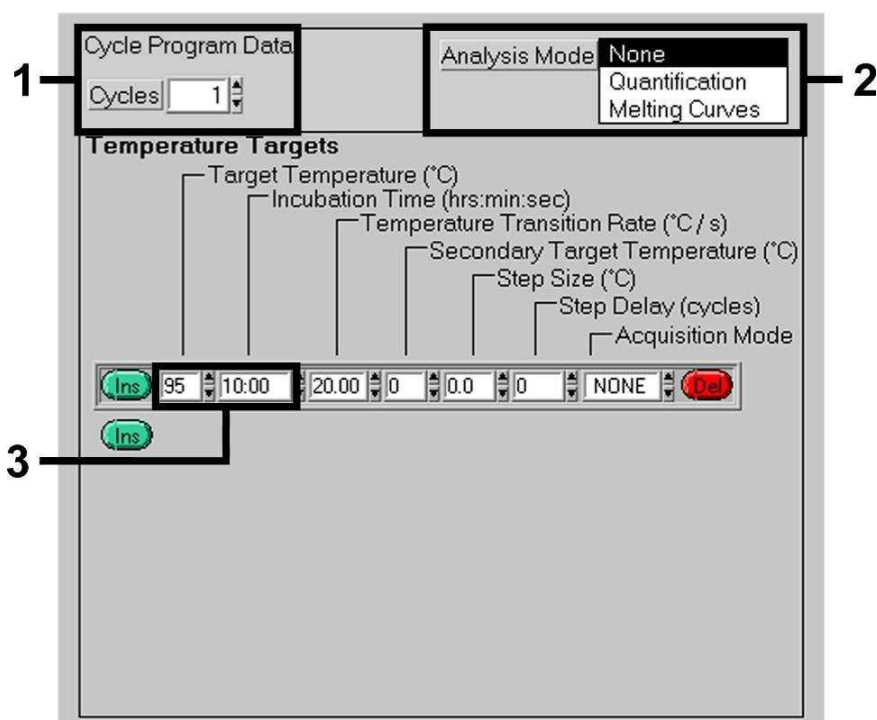


Fig. 3: Attivazione iniziale dell'enzima Hot Start.

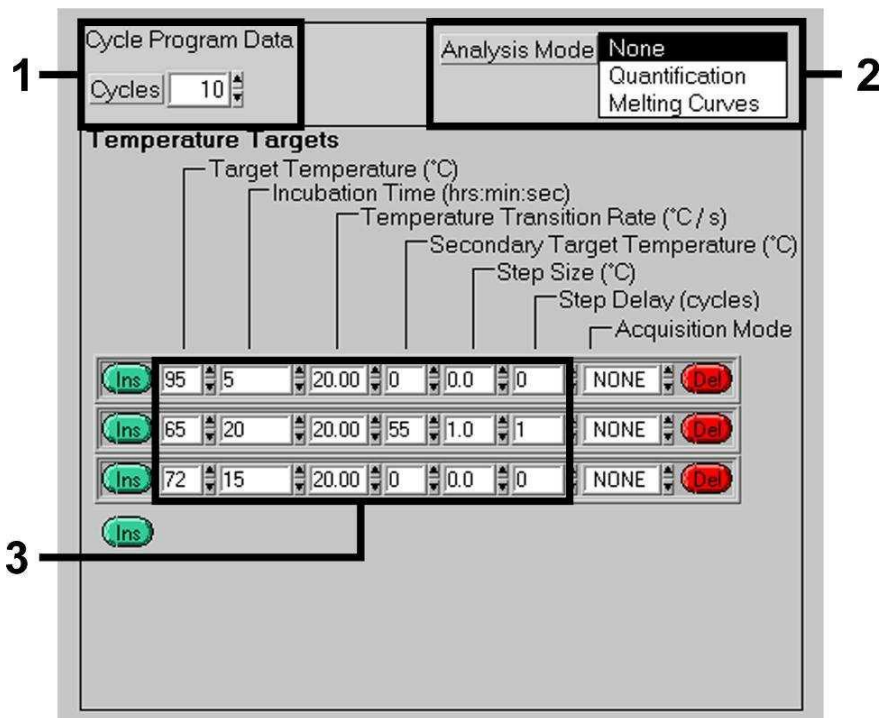


Fig. 4: Touch Down.

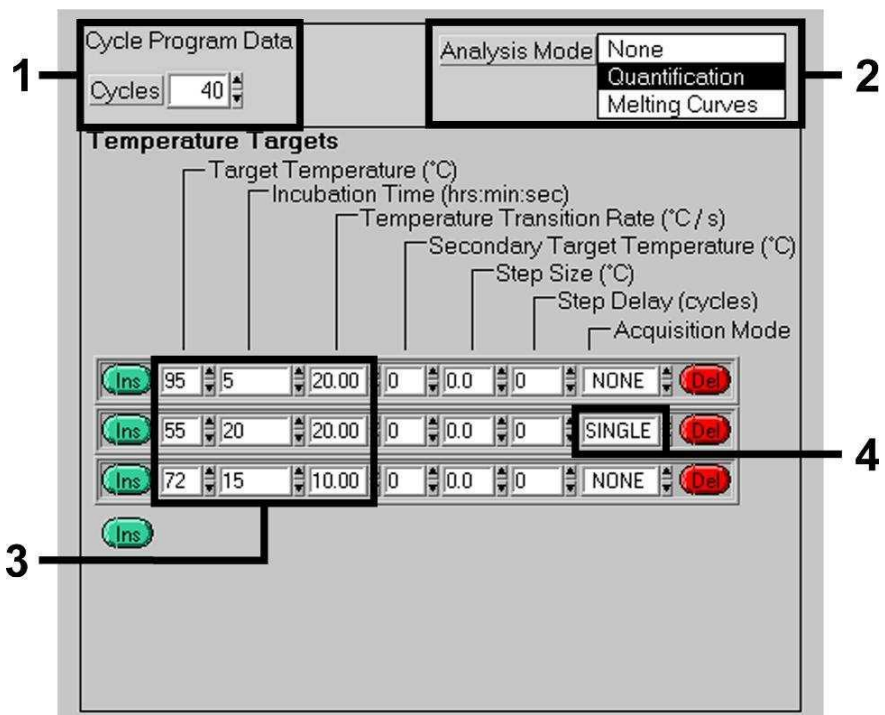


Fig. 5: Amplificazione del DNA.

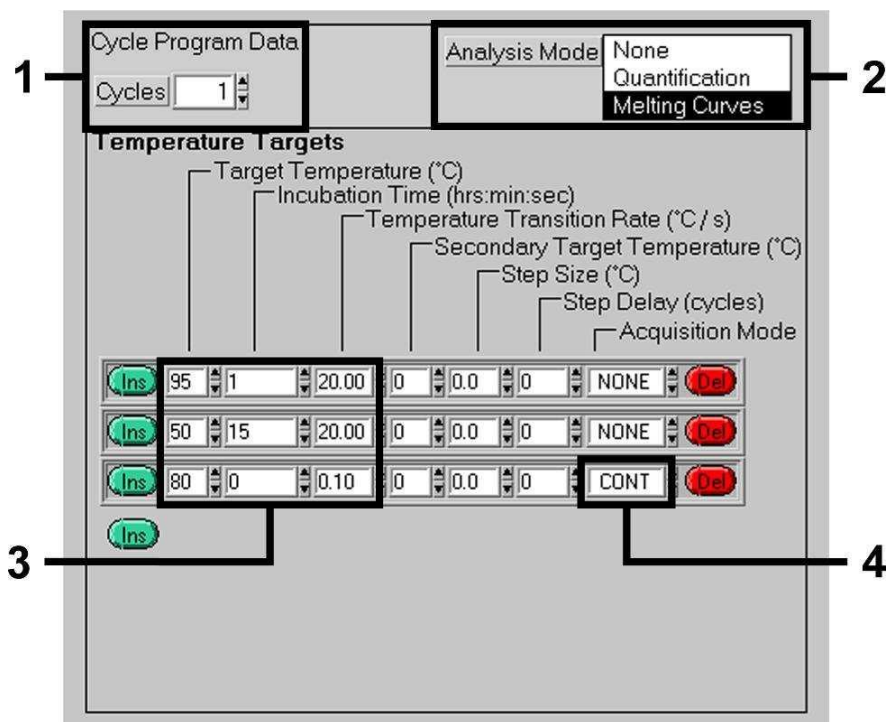


Fig. 6: Curva di dissociazione.

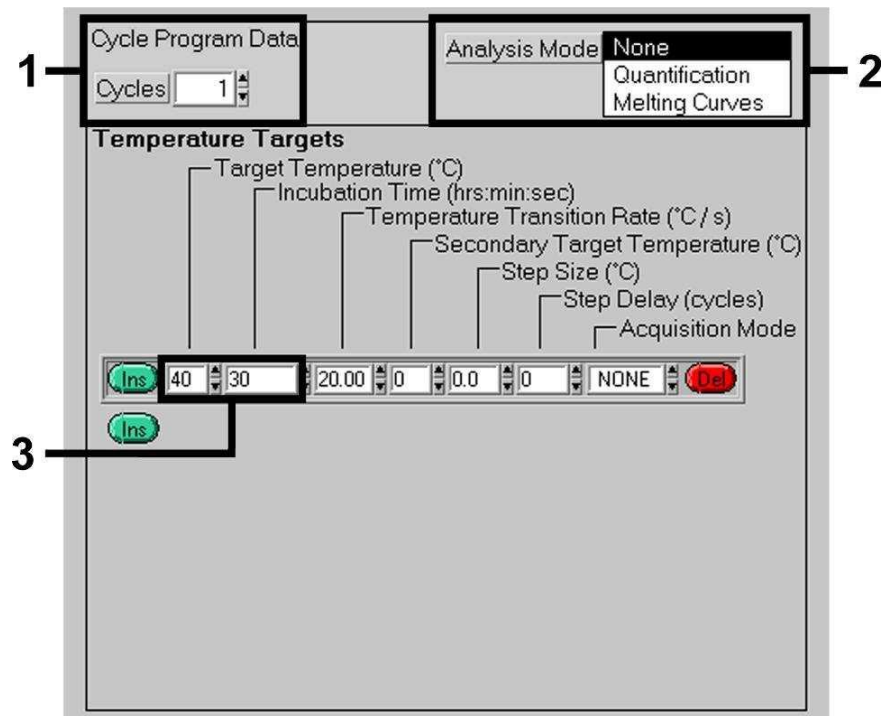


Fig. 7: Raffreddamento.

## 9. Analisi dei dati

Con le analisi Multicolor possono verificarsi interferenze tra i canali fluorimetrici. Il software dello strumento *LightCycler* contiene un file denominato *Color Compensation File*, in grado di compensare queste interferenze. Aprire il file prima, durante o al termine della corsa di PCR, selezionando il pulsante *Choose CCC File* o *Select CC Data*. Se il *Color Compensation File* non è stato installato, procedere seguendo le indicazioni fornite in *LightCycler Operator's Manual*. Dopo l'attivazione del *Color Compensation File* nei canali fluorimetrici F1, F2 e F3 compaiono segnali separati. Per l'analisi dei risultati della PCR ottenuti con l'*artus HSV-1/2 LC PCR Kit* scegliere F2/Back-F1 per la PCR analitica di HSV e F3/Back-F1 per la PCR del *Controllo interno*. Per l'analisi di corse quantitative attenersi al paragrafo **8.3 Quantificazione**, nonché alla **Technical Note for quantitation on the *LightCycler*<sup>®</sup> Instrument**, all'indirizzo [www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX](http://www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX).

Se la corsa integra più sistemi *artus* per herpes, analizzare i campioni di HSV e le curve standard relative separatamente da tutti gli altri sistemi. In questo caso bisogna far attenzione che i campioni HSV-1 vengano analizzati con la curva standard degli standard HSV-1 relativi (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4*) e i campioni HSV-2 con la curva standard degli standard HSV-2 (*HSV2 LC/RG/TM QS 1 – 4*).

Si possono ottenere i seguenti risultati:

1. Nel canale fluorimetrico F2/Back-F1 viene rilevato un segnale.

**Il risultato dell'analisi è positivo: il campione contiene DNA di HSV.**

In questo caso la rilevazione di un segnale nel canale F3/Back-F1 è trascurabile, poiché alte concentrazioni iniziali del DNA di HSV (segnale positivo nel canale F2/Back-F1) possono portare ad un segnale di fluorescenza ridotto o assente del *Controllo interno* nel canale F3/Back-F1 (competizione).

La differenziazione può essere eseguita in base al punto di fusione (canale F2/Back-F1, programma *Melting Curve*) a 69°C per l'amplicone HSV-1, a 66°C per l'amplicone HSV-2. Per effetto di differenti condizioni di estrazione e di

conseguenti condizioni di tampone si può arrivare a oscillazioni di 1 - 2°C, che si riferiscono però sia all'amplicone HSV-1 che all'amplicone HSV-2.

2. Il segnale non viene rilevato nel canale fluorimetrico F2/Back-F1 ma solo nel canale F3/Back-F1 (segnale del *Controllo interno*).

**Nel campione non è possibile rilevare alcun DNA di HSV. Il risultato dell'analisi può essere quindi considerato negativo.**

In caso di PCR negativa per HSV, il segnale del *Controllo interno* rilevato esclude la possibilità di inibizione della PCR.

3. Non vengono rilevati segnali né nel canale F2/Back-F1 né in quello F3/Back-F1.

**Non è possibile formulare una diagnosi.**

Per informazioni riguardo le origini degli errori e le possibili soluzioni, consultare

#### **10. Risoluzione dei problemi.**

Esempi di reazioni di PCR positive e negative e di analisi della curva di dissociazione vengono illustrati in Fig. 8 - Fig. 12.

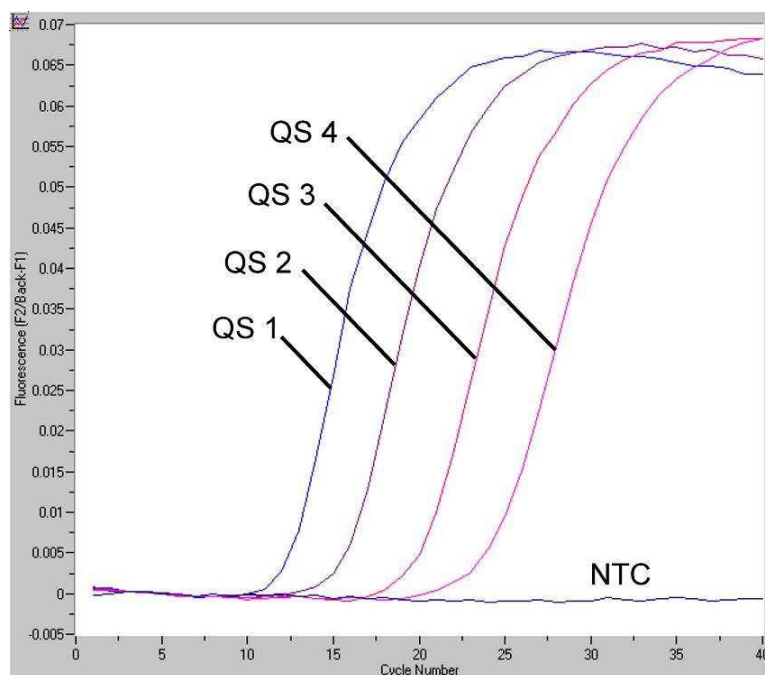


Fig. 8: Rilevazione degli Standard di quantificazione (*HSV1* LC/RG/TM QS 1 - 4) nel canale fluorimetrico F2/Back-F1. NTC: non-template control (controllo negativo).

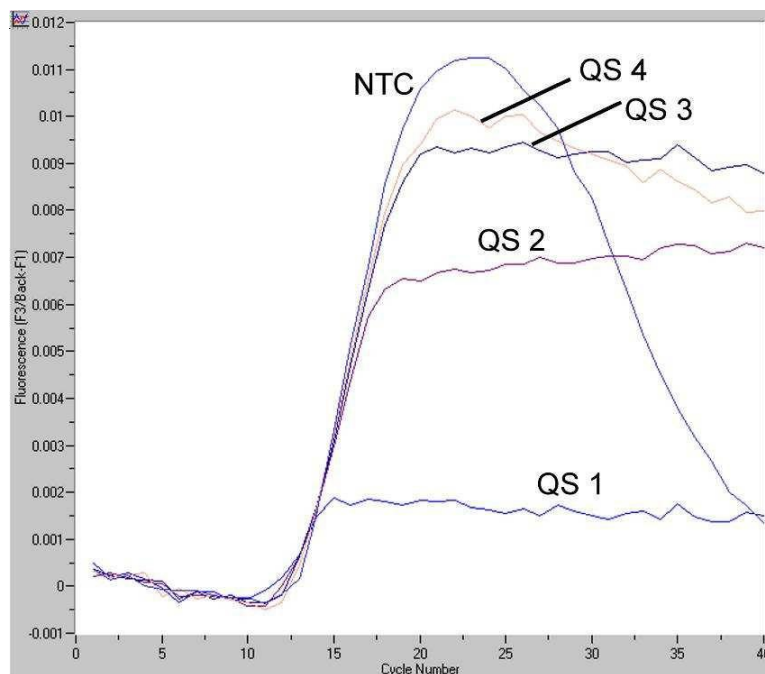


Fig. 9: Rilevazione del Controllo interno (IC) nel canale fluorimetrico F3/Back-F1 con contemporanea amplificazione degli Standard di quantificazione (*HSV1* LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (controllo negativo).

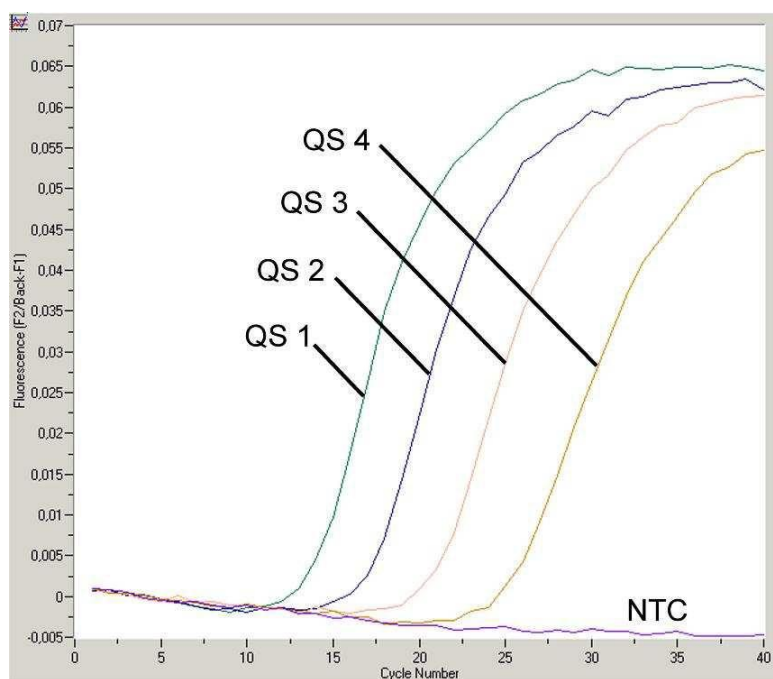


Fig. 10: Rilevazione degli Standard di quantificazione (*HSV2* LC/RG/TM QS 1 - 4) nel canale fluorimetrico F2/Back-F1. NTC: non-template control (controllo negativo).

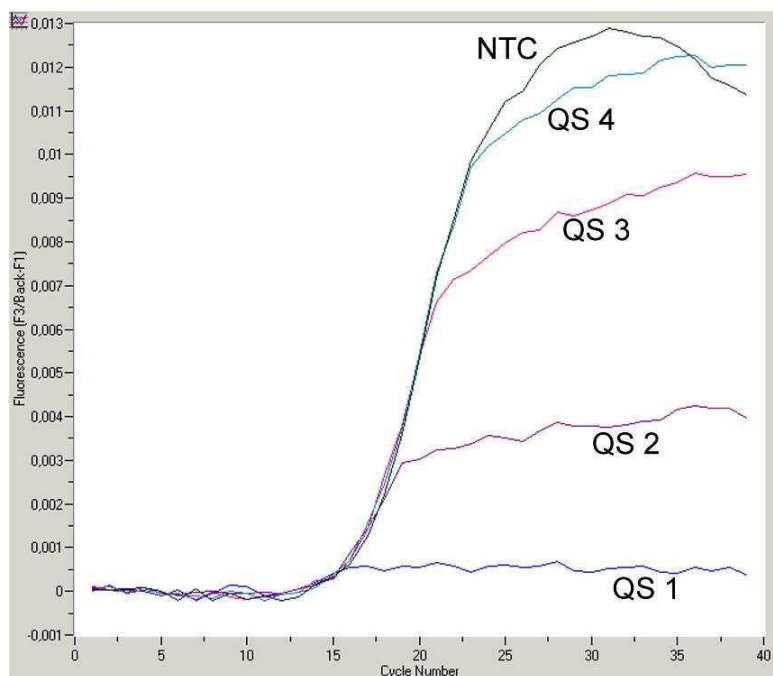


Fig. 11: Rilevazione del *Controllo interno* (IC) nel canale fluorimetrico F3/Back-F1 con contemporanea amplificazione degli Standard di quantificazione (*HSV2* LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (controllo negativo).

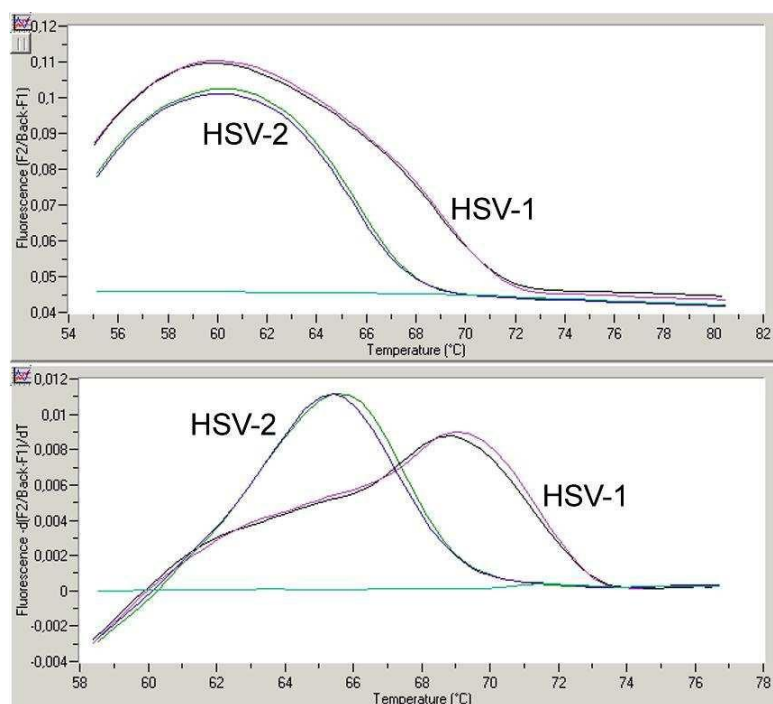


Fig. 12: Differenziazione tra HSV-1 e HSV-2 nel canale fluorimetrico F2/Back-F1 (programma Melting Curve).

## 10. Risoluzione dei problemi

Nessun segnale per i controlli positivi (HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 – 4) nel canale fluorimetrico F2/Back-F1:

- La selezione del canale fluorimetrico durante l'analisi dei dati della PCR non corrisponde a quanto indicato nel protocollo.
  - Per l'analisi dei dati selezionare il canale fluorimetrico F2/Back-F1 per la PCR analitica di HSV-1/2 e il canale fluorimetrico F3/Back-F1 per la PCR del *Controllo interno*.
- Errata programmazione del profilo della temperatura dello strumento *LightCycler*.
  - Confrontare il profilo della temperatura con quanto indicato nel protocollo (vedi **8.5 Programmazione dello strumento *LightCycler***).
- Errata preparazione della reazione PCR.
  - Con l'aiuto dello schema di pipettamento (vedi **8.4 Preparazione della PCR**) verificare nuovamente le fasi operative eseguite e eventualmente ripetere la PCR.



- Le condizioni per la conservazione di uno o più componenti del kit non corrispondono a quanto indicato in **2. Conservazione** o è stata superata la data di scadenza dell'*artus HSV-1/2 LC PCR Kit*.  
→ Verificare sia le condizioni di conservazione che la data di scadenza (vedi etichetta del kit) dei reagenti e utilizzare eventualmente un nuovo kit.

**Segnale del *Controllo interno* debole o mancante nel canale fluorimetrico F3/Back-F1 e contemporanea assenza di segnale nel canale F2/Back-F1:**

- Le condizioni della PCR non corrispondono a quanto indicato nel protocollo.  
→ Verificare le condizioni della PCR (vedi sopra) e eventualmente ripetere la PCR con le impostazioni corrette.
- La PCR è stata inibita.  
→ Assicurarsi di utilizzare una delle procedure di estrazione raccomandate (vedi **8.1 Estrazione del DNA**) e attenersi scrupolosamente alle indicazioni del produttore.  
→ Accertarsi che durante l'estrazione del DNA e prima dell'eluizione sia stata eseguita l'ulteriore fase di centrifugazione consigliata per eliminare eventuali residui di etanolo (vedi **8.1 Estrazione del DNA**).
- Ci sono state perdite di DNA durante l'estrazione.  
→ Se è stato aggiunto il *Controllo interno* alla procedura di purificazione, il mancato segnale del *Controllo interno* può indicare una perdita di DNA dovuta alla purificazione. Assicurarsi di utilizzare una delle procedure di estrazione raccomandate (vedi **8.1 Estrazione del DNA**) e attenersi scrupolosamente alle indicazioni del produttore.
- Le condizioni per la conservazione di uno o più componenti del kit non corrispondono a quanto indicato in **2. Conservazione** o è stata superata la data di scadenza dell'*artus HSV-1/2 LC PCR Kit*.  
→ Verificare sia le condizioni di conservazione che la data di scadenza (vedi etichetta del kit) dei reagenti e utilizzare eventualmente un nuovo kit.

## Segnali nel canale fluorimetrico F2/Back-F1 della PCR analitica con i controlli negativi:

- Si è verificata una contaminazione durante la preparazione della PCR.
  - Ripetere la PCR in replicati con reagenti non ancora utilizzati.
  - Chiudere le singole provette PCR possibilmente subito dopo l'aggiunta del campione da analizzare.
  - Pipettare i controlli positivi rigorosamente per ultimi.
  - Assicurarsi che le superfici di lavoro e gli strumenti vengano regolarmente decontaminati.
- Si è verificata una contaminazione dovuta all'estrazione.
  - Ripetere l'estrazione e la PCR dei campioni da analizzare con reagenti non ancora utilizzati.
  - Assicurarsi che le superfici di lavoro e gli strumenti vengano regolarmente decontaminati.

In caso di dubbi o problemi contattare il nostro servizio tecnico.

## 11. Specifiche

### 11.1 Sensibilità analitica

Per determinare la sensibilità analitica dell'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit è stata effettuata una serie di diluizioni di uno standard da 31,6 fino a circa 0,01 copie equivalenti\*/ $\mu$ l di HSV-1 e HSV-2, poi analizzata con l'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit. Le analisi sono state eseguite in tre diversi giorni su otto replicati. Il risultato è stato determinato grazie a un'analisi probit, illustrata in Fig. 13 e Fig. 14. Il limite di rilevabilità dell'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit è quindi 1 copia/ $\mu$ l ( $p = 0,05$ ) sia per HSV-1 che per HSV-2. Ciò significa che la probabilità di rilevare 1 copia/ $\mu$ l è pari al 95 %.

### Analisi probit: virus herpes simplex 1 (LightCycler)

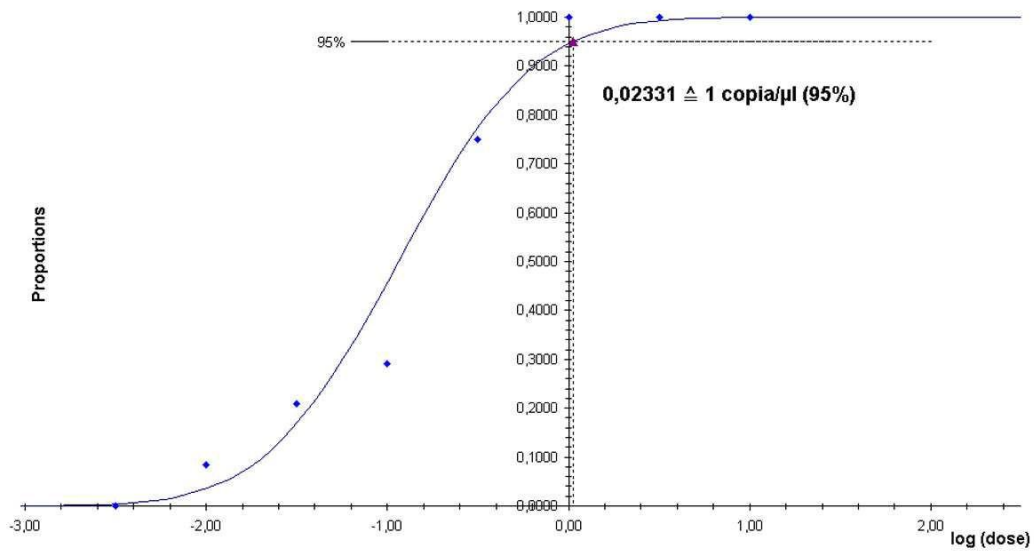


Fig. 13: Sensibilità analitica dell'artus HSV-1/2 LC PCR Kit (HSV-1).

---

\* Lo standard utilizzato è un prodotto PCR clonato, la cui concentrazione è stata determinata tramite fotometria spettrale e di fluorescenza.

## Analisi probit: virus herpes simplex 2 (LightCycler)

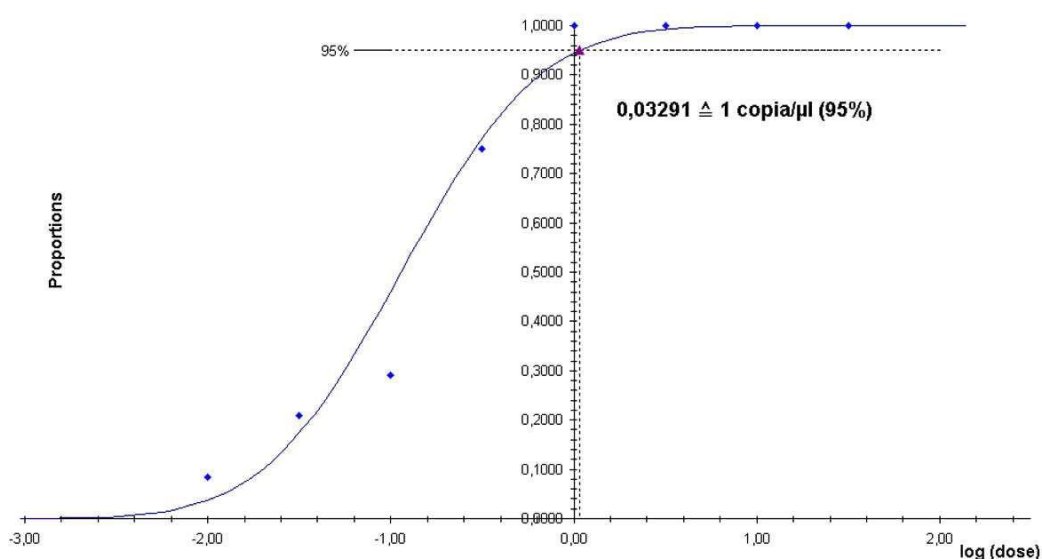


Fig. 14: Sensibilità analitica dell'artus HSV-1/2 LC PCR Kit (HSV-2).

## 11.2 Specificità

La specificità dell'artus HSV-1/2 LC PCR Kit viene garantita in primo luogo dalla scelta dei primer e delle sonde, nonché dalle condizioni stringenti della reazione di PCR. Primer e sonde sono stati controllati per mezzo di un'apposita procedura di confronto delle sequenze, onde verificare l'eventuale presenza di omologie con tutte le sequenze pubblicate nelle banche genomiche. In tal modo è stato possibile garantire anche la rilevabilità di tutti i sottotipi e genotipi significativi.

La convalida della specificità è stata effettuata anche su 30 diversi campioni di liquor HSV-negativi, che non hanno generato alcun segnale con i primer e le sonde specifici per HSV contenuti nell'HSV LC Master.

Per determinare la specificità dell'artus HSV-1/2 LC PCR Kit è stato analizzato il gruppo controllo riportato nella Tabella 1 al fine di verificarne la reattività crociata. Nessuno degli agenti patogeni testati è risultato reattivo.

Tabella 1: Analisi di specificità del kit con agenti patogeni potenzialmente dotati di reattività crociata.

Gruppo controllo	HSV-1/2 (F2/Back-F1)	Controllo interno (F3/Back-F1)
Virus dell'herpes umano 3 (virus varicella-zoster)	-	+
Virus dell'herpes umano 4 (virus di Epstein-Barr)	-	+
Virus dell'herpes umano 5 (citomegalovirus)	-	+
Virus dell'herpes umano 6 A	-	+
Virus dell'herpes umano 6 B	-	+
Virus dell'herpes umano 7	-	+
Virus dell'herpes umano 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus)	-	+

## 11.3 Precisione

I dati di precisione per l'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit consentono di determinare la varianza totale del sistema di analisi. La varianza totale consta della **variabilità intra-assay** (variabilità dei replicati dello stesso campione nello stesso saggio), della **variabilità inter-assay** (variabilità interna di laboratorio derivante dall'impiego da parte di persone diverse all'interno di un laboratorio e dall'utilizzo di diverse apparecchiature dello stesso tipo) e della **variabilità inter-lotto** (variabilità derivante dall'impiego di lotti diversi). In questo modo vengono calcolate singolarmente la deviazione standard, la varianza ed il coefficiente di variazione sia per la PCR specifica dell'agente patogeno che per quella del *Controllo interno*.

Questi dati sono stati ottenuti per l'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit sulla base dello *Standard di quantificazione* alla concentrazione minima (QS 4; 10 copie/ $\mu$ l). Le analisi sono state eseguite con una serie di otto replicati. L'analisi dei risultati è stata ottenuta in base ai valori Ct delle curve di amplificazione (Ct: threshold cycle, Tabella 2/Tabella 4) e dei dati quantitativi da esse risultanti espressi in copie/ $\mu$ l (Tabella 3/Tabella 5).

Pertanto la dispersione totale di un qualsiasi campione alla detta concentrazione è pari a 1,67 % (Ct, HSV-1) e 1,95 % (Ct, HSV-2), o 20,66 % (Conc., HSV-1) e 22,42 % (Conc., HSV-2), per la rilevazione del *Controllo interno* 1,23 % (Ct, HSV-1) e 1,04 % (Ct, HSV-2). Questi valori si basano sulla totalità di ciascuno dei valori delle variabilità determinate.

Tabella 2: Dati di precisione per HSV-1 sulla base dei valori Ct.

	Deviazione standard	Varianza	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-assay: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,27	0,07	1,13
Variabilità intra-assay: <i>Controllo interno</i>	0,03	0,00	0,23
Variabilità inter-assay: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,39	0,15	1,66
Variabilità inter-assay: <i>Controllo interno</i>	0,12	0,01	0,99
Variabilità inter-lotto: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,41	0,17	1,72
Variabilità inter-lotto: <i>Controllo interno</i>	0,17	0,03	1,40
Varianza totale: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,39	0,15	1,67
Varianza totale: <i>Controllo interno</i>	0,15	0,02	1,23

Tabella 3: Dati di precisione per HSV-1 sulla base dei valori quantitativi (in copie/ $\mu$ l).

	Deviazione standard	Varianza	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-assay: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	1,76	3,08	17,34
Variabilità inter-assay: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	2,02	4,08	19,82
Variabilità inter-lotto: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	2,37	5,64	23,10
Varianza totale: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	2,11	4,46	20,66

Tabella 4: Dati di precisione per HSV-2 sulla base dei valori Ct.

	Deviazione standard	Varianza	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-assay: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,22	0,05	0,90
Variabilità intra-assay: <i>Controllo interno</i>	0,04	0,00	0,33
Variabilità inter-assay: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,62	0,38	2,51
Variabilità inter-assay: <i>Controllo interno</i>	0,12	0,01	0,98
Variabilità inter-lotto: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,38	0,14	1,52
Variabilità inter-lotto: <i>Controllo interno</i>	0,14	0,02	1,12
Varianza totale: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,48	0,23	1,95
Varianza totale: <i>Controllo interno</i>	0,13	0,02	1,04

Tabella 5: Dati di precisione per HSV-2 sulla base dei valori quantitativi (in copie/ $\mu$ l).

	Deviazione standard	Varianza	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-assay: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	1,39	1,94	13,82
Variabilità inter-assay: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	2,86	8,20	27,46
Variabilità inter-lotto: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	1,96	3,85	19,27
Varianza totale: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	2,30	5,31	22,42

## 11.4 Robustezza

Il controllo della robustezza serve per determinare la percentuale totale di errore dell'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit. A tale scopo 30 campioni di liquor (HSV-negativi) sono stati miscelati con 3 copie/ $\mu$ l di volume di eluizione di controllo di DNA di HSV-1 (tre volte la concentrazione della soglia di sensibilità analitica). Poi sono stati purificati con il QIAamp DNA Mini Kit (vedi **8.1 Estrazione del DNA**) ed analizzati con l'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit. Allo stesso modo è stata effettuata un'analisi per HSV-2 (30 campioni di liquor; 3 copie/ $\mu$ l di controllo di DNA di HSV-2). Sul totale dei campioni la percentuale di errore per HSV-1 e HSV-2 è risultata pari a 0 %. La robustezza del *Controllo interno* è stata ulteriormente verificata mediante purificazione ed analisi di 30 campioni di liquor HSV-negativi. La percentuale totale d'errore era pari a 0 %. Non sono state riscontrate inibizioni di alcun genere. Pertanto la robustezza dell'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit è risultata  $\geq$  99 %.

## 11.5 Riproducibilità

I dati di riproducibilità vengono rilevati allo scopo di effettuare una valutazione regolare dell'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit ed anche per un confronto con altri prodotti. Tali dati sono stati ottenuti mediante la partecipazione a programmi di controllo di qualità interlaboratori.

## 11.6 Valutazione diagnostica

L'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit è attualmente in corso di valutazione in numerosi studi.



## 12. Avvertenze speciali per l'utilizzo del prodotto

- Tutti i reagenti devono essere impiegati esclusivamente per la diagnostica in vitro.
- L'utilizzo è consentito soltanto a personale dotato delle necessarie conoscenze e competenze in merito alle procedure della diagnostica in vitro.
- Per ottenere risultati PCR ottimali è assolutamente necessario attenersi al protocollo.
- Rispettare le date di scadenza dei singoli componenti, riportate sulla confezione e sulle etichette. Non utilizzare reagenti scaduti.

## 13. Informazioni di sicurezza

Per le informazioni di sicurezza riguardanti l'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit consultare la relativa scheda di sicurezza (safety data sheet, SDS), disponibile all'indirizzo [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) nel comodo e compatto formato PDF.












## 14. Controllo di qualità

In conformità con il sistema di gestione per la qualità di QIAGEN certificato ISO 9001 e ISO 13485 ogni lotto dell'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit è stato testato in base a specificità prestabilite per garantire la costante qualità del prodotto.

## 15. Riferimento bibliografico

- (1) Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 - 212.
- (2) Whiley DM, Syrmis MW, Mackay IM, Sloots TP. Preliminary comparison of three *LightCycler* PCR assays for the detection of Herpes Simplex virus in swab specimens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22: 764 – 767.

## 16. Spiegazione dei simboli

	Data di scadenza
	Codice del lotto
	Fabbricante
	Numero di catalogo
	Numero di materiale
	Manuale
	Dispositivo medico per diagnostica in vitro
	Etanolo
	Global Trade Item Number
 $\Sigma$	Il kit contiene reagenti sufficienti per <N> reazioni
	Limiti di temperatura
<b>QS</b>	<i>Standard di quantificazione</i>
<b>IC</b>	<i>Controllo interno</i>

artus HSV-1/2 LC PCR Kit

Marchi registrati e clausola di esclusione di responsabilita

Q1AGEN®, Q1Aamp®, artus®, BioRobot® EZ1®, UltraSens® (Gruppo Q1AGEN); LightCycler® (Roche Diagnostics).

Nomi, marchi registrati, ecc., usati in questo documento, anche se non contrassegnati specificatamente come tali, non devono essere considerati non protetti da legge.

L'artus HSV-1/2 LC PCR Kit, la workstation BioRobot EZ1 DSP e l'EZ1 DSP Virus Kit e Card sono kit diagnostici contrassegnati CE secondo la Direttiva Europea per la diagnostica In Vitro 98/79/CE. Non disponibili in tutti i paesi.

I kit Q1Aamp sono destinati all'uso generale di laboratorio. Le indicazioni o le rappresentazioni del prodotto non sono destinate a fornire indicazioni per la diagnosi, la prevenzione o il trattamento di malattie.

Con gli artus PCR Kits si acquisisce anche una licenza limitata per il loro impiego nelle procedure di reazione a catena della polimerasi (PCR) nell'ambito della diagnostica umana e veterinaria in vitro, in combinazione con un termociclo, il cui uso nell'esecuzione automatizzata della procedura PCR e coperto da licenza upfront da pagare o a Applied Biosystems o tramite l'acquisto di un termociclo autorizzato. La procedura PCR e coperta da equivalenti nazionali dei brevetti USA n. 5,219,727 e 5,322,770 e 5,210,015 e 5,176,995 e 6,040,166 e 6,197,563 e 5,994,056 e 6,171,785 e 5,487,972 e 5,804,375 e 5,407,800 e 5,310,652 e 5,994,056 in possesso di F. Hoffmann-La Roche Ltd.

© 2007-2015 Q1AGEN, tutti i diritti riservati.

**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

