

artus[®] VZV LC PCR

Kit Handbok

 24 (Katalog nr. 4502063)

 96 (Katalog nr. 4502065)

Kvantitativ in vitro-diagnostik

För användning tillsammans med

LightCycler[®] 1.1/1.2/1.5 och *LightCycler 2.0* instrumentet

Januari 2007 – Version 1



4502063, 4502065



1046899SV

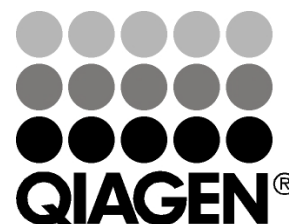


QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R3

MAT

1046899SV



artus VZV LC PCR Kit

Varumärken och friskrivningar

QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, BioRobot®, EZ1® (QIAGEN Group); *LightCycler*® (Roche Diagnostics).

Registrerade namn, varumärken osv. som nämns i detta dokument, även de som inte är specifikt märkta som sådana anses inte oskyddade enligt lag.

artus VZV LC PCR Kit, BioRobot® EZ1® DSP Workstation och EZ1 DSP Virus Kit och Card är CE-märkta diagnostiska produkter i enlighet med EU-direktivet för in vitro-diagnostik 98/79/EG. Kan inte erhållas i alla länder.

QIAamp® Kit är endast avsedda för allmän laboratorieanvändning. Anvisningar och beskrivningar skall inte användas som underlag för diagnos, prevention eller behandling av sjukdom.

Vid inköp av *artus* PCR Kit beviljas en begränsad licens för användning vid polymeras-kedjereaktion (PCR) inom human och veterinärmedicinsk in vitro-diagnostik tillsammans med en termocykel, vars användning i samband med automatiserad PCR inkluderar en up-front betalning. Denna innefattar en avgift till Applied Biosystems eller erläggs i samband med inköp av t.ex. en auktoriserad termocykel. PCR-förfarandet är skyddat av utländska motsvarigheter till U.S. patent nummer 5,219,727 och 5,322,770 och 5,210,015 och 5,176,995 och 6,040,166 och 6,197,563 och 5,994,056 och 6,171,785 och 5,487,972 och 5,804,375 och 5,407,800 och 5,310,652 och 5,994,056 ägda av F. Hoffmann-La Roche Ltd.

© 2007-2014 QIAGEN, alla rättigheter förbehålles.

Innehållsförteckning

1. Innehåll.....	5
2. Förvaring.....	5
3. Material och utrustning som behövs men inte medföljer	6
4. Allmänna försiktighetsåtgärder	6
5. Information om patogener	7
6. Principen för realtids-PCR	7
7. Produktbeskrivning.....	7
8. Protokoll.....	8
8.1 DNA-isolering	8
8.2 Internkontroll.....	11
8.3 Kvantifiering.....	12
8.4 Förberedelse av PCR	13
8.5 Programmering av <i>LightCycler</i> instrumenten.....	18
9. Tolkning av resultat.....	24
9.1 Tolkning av <i>LightCycler 1.1/1.2/1.5</i> instrumentets PCR-data	24
9.2 Tolkning av <i>LightCycler 2.0</i> instrumentets PCR-data	27
10. Felsökning	31
11. Specifikationer.....	33
11.1 Analytisk sensitivitet.....	33
11.2 Specificitet	34
11.3 Precision.....	34
11.4 Robusthet	36
11.5 Reproducerbarhet.....	36
11.6 Diagnostisk utvärdering	36
12. Särskild information om produktanvändning.....	37

13. Säkerhetsinformation.....	37
14. Kvalitetskontroll	37
15. Referenser.....	37
16. Symbolförklaring.....	38

artus VZV LC PCR Kit

För användning tillsammans med *LightCycler 1.1/1.2/1.5* resp. *LightCycler 2.0* instrumentet.

1. Innehåll

	Benämning och innehåll	Art. nr. 4502063 24 reaktioner	Art. nr. 4502065 96 reaktioner
Blå	VZV LC Master	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
Röd	VZV LC/TM QS 1 ^{xx} 1 x 10 ⁴ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Röd	VZV LC/TM QS 2 ^{xx} 1 x 10 ³ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Röd	VZV LC/TM QS 3 ^{xx} 1 x 10 ² cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Röd	VZV LC/TM QS 4 ^{xx} 1 x 10 ¹ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Grön	VZV LC IC ^{xx}	1 x 1.000 μl	2 x 1.000 μl
Vit	Water (PCRgrade)	1 x 1.000 μl	1 x 1.000 μl

^{xx} QS = Kvantifieringsstandard
IC = Internkontroll

2. Förvaring

Komponenterna hos *artus VZV LC PCR Kit* ska förvaras vid –30 till –15 °C och är hållbara till det datum som anges på etiketten. Undvik upprepade tining och frysning (> 2 x), eftersom det minskar sensitiviteten. Reagenser som inte används regelbundet bör därför frysas i portioner. Om det är nödvändigt kan komponenterna förvaras vid +4°C i högst fem timmar.

3. Material och utrustning som behövs men inte medföljer

- Puderfria laboratoriehandskar
- DNA-isoleringskit (se 8.1 DNA-isolering)
- Pipetter (inställbara)
- Sterila pipettspetsar med filter
- Vortex
- Bordscentrifug med rotor för 2 ml rör
- *Color Compensation Set* (Roche Diagnostics, kat.nr. 2 158 850) för framtagning av en *Crosstalk Color Compensation*-fil för *LightCycler 1.1/1.2/1.5* resp. *LightCycler 2.0* instrumentet
- *LightCycler Multicolor Demo Set* (Roche Diagnostics, kat.-nr. 03 624 854 001) för *LightCycler 2.0* instrumentet
- *LightCycler*-kapillärer (20 µl)
- *LightCycler Cooling Block*
- *LightCycler 1.1/1.2/1.5* (Software Version 3.5) resp. *LightCycler 2.0* (Software Version 4.0) instrumentet
- *LightCycler Capping Tool*

4. Allmänna försiktighetsåtgärder

Tänk alltid på följande:

- Använd sterila pipettspetsar med filter.
- Positivt material (prover, kontroller, amplikon) ska förvaras, isoleras och tillsättas till reaktionen i utrymme som är skilt från övriga reagenser.
- Tina alla komponenter fullständigt i rumstemperatur innan testet påbörjas.
- Blanda komponenterna väl och centrifugera en kort stund.
- Arbeta snabbt på is eller i *LightCycler Cooling Block*.

5. Information om patogener

Överföring av varicella-zoster-virus (VZV) sker från människa till människa som droppinfektion eller genom direkt kontakt. Infektion med VZV ger lätt feber och måttlig påverkan av allmäntillståndet. Karakteristiskt för sjukdomen är det polymorfa exantemet med knottror, blåsor och skorpor i kombination med kraftig klåda (vattkoppor). VZV-infektion med svåra förlopp ses ofta hos immunsupprimerade patienter med lung- och hjärninflammationer som hotande komplikation. Efter den akuta infektionen finns patogenen kvar i de sensoriska spinalganglierna och i hjärnnervernas ganglier. Vid nedsatt immunitet kan exacerbationer uppträda (t. ex. läppherpes, bältros).

6. Principen för realtids-PCR

Vid diagnostik med hjälp av polymeras-kedjereaktion (PCR) amplifieras specifika regioner av patogengenomet. Vid realtids-PCR sker detektion med hjälp av fluoroforer. Dessa är i regel bundna till oligonukleotidprober, som binder specifikt till PCR-amplikon. Genom detektion av fluorescensintensiteten under realtids-PCR-förloppet kan produkterna påvisas och kvantifieras utan att provrören behöver öppnas efteråt (Mackay, 2004).

7. Produktbeskrivning

artus VZV LC PCR Kit är ett bruksfärdigt system för påvisning av VZV-DNA med polymeras-kedjereaktion (PCR) i *LightCycler* instrumentet. *VZV LC Master* innehåller reagenser och enzymer för specifik amplifiering av ett 82 bp långt fragment i VZV-genomet samt för omedelbar detektion av amplikon med *LightCycler 1.1/1.2/1.5* resp. *LightCycler 2.0* instrumentet. Dessutom innehåller *artus* VZV LC PCR Kit ett andra heterologt amplifieringssystem för detektion av en eventuell PCR-inhibering.

PCR-produkt	Val av fluorescenskanalerna	
	LightCycler 1.1/1.2/1.5 instrumentet	LightCycler 2.0 instrumentet
VZV	F1/F2	530/640
VZV LC IC	F3/Back-F1	705/Back 530

Amplifikationen och detektionen av denna *internkontroll (IC)* påverkar inte detektionsgränsen av analytisk VZV-PCR negativt (se 11.1 **Analytisk sensitivitet**). Externa positiva kontroller (VZV LC/TM QS 1 - 4) medföljer, med vars hjälp en bestämning av patogenbelastningen kan utföras. Du kan läsa mer om detta i stycket **8.3 Kvantifiering**.

Viktigt: Temperaturprofilen för detektion av VZV-DNA med hjälp av *artus VZV LC PCR Kit*, motsvaras av *artus HSV 1/2 LC PCR Kit*, *artus EBV LC PCR Kit* och *artus CMV LC PCR Kit*. Följaktligen kan PCR-reaktionen för dessa *artus*-systemen genomföras och analyseras i en körning. Märk därvid de speciella hänvisningar för tolkning under

8.3 Kvantifiering och under **9. Tolkning av resultat**.

8. Protokoll

8.1 DNA-isolering

Kit för DNA-isolering kan erhållas från olika tillverkare. Följ tillverkarens protokoll och tillsätt angiven provmängd till isoleringen samt utför DNA-isoleringen enligt anvisningarna. Följande isoleringskits rekommenderas:

Provmaterial	Isoleringskit	Katalog-nummer	Tillverkare	Bärar RNA
Serum, plasma, CSF (Cerebrospinalvätska), utstryk	QIAamp UltraSens Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	Ingår
	QIAamp DNA Mini Kit (50)	51 304	QIAGEN	Ingår ej
CSF (Cerebrospinalvätska)	EZ1 DSP Virus Kit (48)*	62 724	QIAGEN	Ingår

*För användning tillsammans med BioRobot EZ1 DSP Workstation (kat. nr. 9001360) och EZ1 DSP Virus Card (kat. nr. 9017707).

Viktig hänvisning vid användning av QIAamp UltraSens Virus Kit och QIAamp DNA Mini Kit:

- Tillsatsen av **bärrar-RNA** är till för isoleringens effektivitet och därmed av avgörande betydelse för utvinningen av DNA-/RNA. Om det använda isoleringskitet inte innehåller någon bärrar-RNA, bör du vid isolering av nukleinsyror från cellfria kroppsvätskor eller material med låg DNA/RNA-halt (t. ex. likvor) tillsätta bärrar-RNA (RNA-Homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, kat. nr. 27-4110-01). Följande tillvägagångssätt rekommenderas:
 - a) Resuspendera de frystorkade bärrar-RNA i isoleringskitets elueringsbuffert (ej i lyseringsbufferten) (t. ex. QIAamp DNA Mini Kit AE-buffert) och bered en utspädning med en koncentration av 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Portionera denna bärrar-RNA-lösning till det passande antalet alikvoter du behöver, och lagra dem i -20°C . Undvik upprepade tining ($> 2 \times$) av en bärrar-RNA-alikvot.
 - b) För varje isolering skall 1 μg bärrar-RNA per 100 μl lyseringsbuffert användas. Föreslår extraktionsprotokollet t. ex. 200 μl lyseringsbuffert per prov som skall isoleras, skall 2 μl bärrar-RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) tillsättas direkt till lyseringsbufferten. Innan varje isolering påbörjas måste en färsk blandning av lyseringsbuffert och bärrar-RNA (om nödvändigt även *Internkontroll*, se **8.2 Internkontroll**) tillredas enligt följande pipetteringsschema.

Antal prover	1	12
Lyseringsbuffer	t. ex. 200 μl	t. ex. 2.400 μl
Bärrar-RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	2 μl	24 μl
Total volym	202 μl	2.424 μl
Volym per extraktion	200 μl	vardera 200 μl

- c) Tillsätt den färskt tillredda blandningen av lyseringsbuffert och bärrar-RNA direkt till isoleringen. Förvaring av blandningen är inte möjlig.
- Tillsatsen av **bärrar-RNA** är till för isoleringens effektivitet och därmed av avgörande betydelse för utvinningen av DNA-/RNA. För att uppnå en högre stabilitet av det bärrar-RNA som medföljer QIAamp UltraSens Virus

Kit, rekommenderar vi följande tillvägagångssätt, vilket frångår angivelserna i isoleringskitets handbok:

- a. Innan första användningen resuspendera de frystorkade bärar-RNA av isoleringskitet i 310 μl AE eller AVE buffert (eluerings buffert, slutkoncentration 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, använd ingen lyseringsbuffert) och portionera denna bärar-RNA-lösning till det passande antalet alikvoter du behöver, och lagra dem i -20°C . Undvik upprepad tining ($> 2 \times$) av en bärar-RNA-alikvot.
- b. Innan varje isolering påbörjas måste en färsk blandning av lyseringsbuffert och bärar-RNA (om nödvändigt även *Internkontroll*, se **8.2 Internkontroll**) tillredas enligt följande pipetteringschema.

Antal prover	1	12
Lyseringsbuffert AC	800 μl	9.600 μl
Bära-RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	5,6 μl	67,2 μl
Total volym	805,6 μl	9.667,2 μl
Volym per extraktion	800 μl	vardera 800 μl

- c. Tillsätt den färskt tillredda lyseringsbufferten direkt till isoleringen. Förvaring av blandningen är inte möjlig.
- Genom användning av **QIAamp UltraSens Virus Kit** kan provet ytterligare koncentreras. Om provmaterialet inte är serum eller plasma, ska minst 50 % (v/v) negativ humanplasma tillsättas till provet.
 - Om isoleringar med **etanolhaltiga** tvättbuffertar används, ska innan eluering ytterligare ett centrifugeringssteg utföras (tre minuter, 13.000 rpm) så att eventuella etanolrester avlägsnas. Detta förhindrar eventuell PCR-inhibering.
 - *artus* VZV LC PCR Kit är inte lämpligt för isoleringsförfarande baserade på **fenol**.

Viktig hänvisning vid användning av EZ1 DSP Virus Kit:

- Tillsatsen av **bärar-RNA** är till för isoleringens effektivitet och därmed av avgörande betydelse för utvinningen av DNA-/RNA. Tillsätt därför till varje

isolering den angivna mängden bärar-RNA och följ instruktionerna i *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*.

Viktigt: *Internkontrollen* för *artus VZV LC PCR Kit* kan tillsättas direkt i isoleringen (se **8.2 Internkontroll**).

8.2 Internkontroll

En *Internkontroll* (VZV LC IC) medföljer. Med *Internkontrollen* kan du kontrollera **både isoleringen av DNA och en eventuell inhibering av PCR** (se Fig. 1). Vid användning av **EZ1 DSP Virus Kit** skall *Internkontrollen* tillsättas enligt instruktionerna i *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*. Vid användning av **QIAamp UltraSens Virus Kit** eller **QIAamp DNA Mini Kit** tillsätter du *Internkontrollen* till isoleringen i ett förhållande på 0,1 μl per 1 μl elueringsvolym. Om du till exempel använder QIAamp DNA Mini Kit och eluerar DNA i 200 μl AE-buffert, så använder du 20 μl av *Internkontrollen*. Om du t. ex. eluerar i 100 μl , så använder du motsvarande 10 μl . Mängden använd *Internkontroll* beror **enbart** på elueringsvolymen. *Internkontroll* och bärar-RNA (se **8.1 DNA-isolering**) får endast tillsättas till

- blandning av lyseringsbuffert och provmaterial eller
- direkt till lyseringsbufferten.

Internkontroll får inte tillsättas direkt till provmaterialet. Beakta att vid tillsättning till lyseringsbufferten blandningen av *Internkontroll*, lyseringsbuffert och bärar-RNA då måste vara färskt tillredd och användas direkt (förvaras blandningen i rumstemperatur eller i kylskåp kan detta redan efter några timmar leda till bortfall av *Internkontrollen*, och till en minskning av isoleringsefficienten). Pipettera **inte** *Internkontroll* och bärar-RNA direkt till provmaterialet.

Alternativt kan *Internkontroll* användas **enbart för kontroll av en eventuell PCR-inhibering** (se Fig. 2). I så fall tillsätter du 0,5 μl *Internkontroll* per reaktion direkt till 15 μl VZV LC Master. För varje PCR-reaktion används 15 μl

av den så tillverkade Master Mixen* varefter 5 µl av det renade provet tillsätts. Om du förbereder en körning för flera prover, ökar du den erforderliga mängden VZV LC Master och Internkontroll motsvarande antalet prover (se **8.4 Förberedelse av PCR**).

artus HSV-1/2 LC PCR Kit och artus VZV LC PCR Kit innehåller en identisk Internkontroll (IC). artus EBV LC PCR Kit och artus CMV LC PCR Kit innehåller också en identisk Internkontroll.

8.3 Kvantifiering

De medföljande Kvantifieringsstandarderna (VZV LC/TM QS 1 - 4) behandlas på samma sätt som ett redan isolerat prov och används i samma volym (5 µl). För att ta fram en standardkurva på LightCycler instrumentet, använder du samtliga fyra medföljande Kvantifieringsstandarder på följande sätt.

LightCycler 1.1/1.2/1.5 instrumentet

Definiera VZV LC/TM QS 1 - 4 som standarder i Sample Loading Screen och ange den angivna koncentrationen (se LightCycler Operator's Manual, Version 3.5, Chapter B, 2.4. Sample Data Entry).

LightCycler 2.0 instrumentet

För definition av standarderna aktiverar du i fönstret Samples menybalk, funktionen Analysis Type och väljer Absolute Quantification. Nu kan VZV LC QS 1 - 4 definieras som standarder och de tillhörande koncentrationerna anges (se LightCycler Operator's Manual, Version 4.0, Chapter 2.2 Entering Sample Information). Se till att funktionen Enable

Controls inte är aktiverat, då detta annars kan leda till ett begränsat urval av analys-alternativ vid utvärderingen av data (se **9.2 Tolkning av LightCycler 2.0 instrumentets PCR-data**).

Denna standardkurva kan även användas för efterföljande kvantifieringar, om minst en standard av en definierad koncentration medtas vid den aktuella testomgången. Den tidigare framtagna standardkurvan måste då importeras

* Den volymökning som uppstår vid tillsats av Internkontroll ignoreras vid beredning av PCR-reaktionen. Detektionssystemets sensitivitet påverkas inte.

(se *LightCycler Operator's Manual*, Version 3.5, Chapter B, 4.2.5. Quantification with an External Standard Curve resp. Version 4.0, Chapter 4.2.2 Saving a Standard Curve). Tänk dock på att det vid denna form av kvantifiering kan förekomma resultatavvikelser mellan PCR-omgångarna till följd avvariabiliteten.

Om mer än ett Herpes-*artus*-system är integrerat i en körning är det viktigt att dessa analyseras med tillhörande *Kvantifieringsstandarder separerade från varandra*.

Obs! *Kvantifieringsstandarderna* anges som kopior/ μ l. Vid omräkning av de värden som framtagits med hjälp av standardkurvan i kopior/ml provmaterial används följande formel:

$$\text{Resultat (kopior/ml)} = \frac{\text{resultat (kopior/\mu l)} \times \text{elueringsvolymen (\mu l)}}{\text{provolymen (ml)}}$$

Tänk på att den ursprungliga provvolymen skall användas i den ovanstående formeln. Detta är att beakta när provvolymen för nukleinsyreisoleringen ändrats (t. ex. minskning genom centrifugering eller ökning genom påfyllnad för att nå den volym som krävs för isolering).

Viktigt: Riktlinjer för tolkning av kvantitativa resultat för *artus*-systemen på *LightCycler 1.1/1.2/1.5* resp. *LightCycler 2.0* instrumentet finns på [www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX/___\(Technical Note for quantitation on the LightCycler 1.1/1.2/1.5 or LightCycler 2.0 Instrument\)](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 Förberedelse av PCR

Kontrollera att Cooling Block med de däri ingående adaptrarna (tillbehör till *LightCycler* instrumentet) är kylt till ca +4°C. Placera det antal *LightCycler*-kapillärer som behövs för de planerade reaktionerna i Cooling Block adaptrarna. Observera att minst en *Kvantifieringsstandard* samt minst en negativ kontroll (*Water, PCR grade*) ska medtas vid varje PCR-körning. För framtagning av en standardkurva ska för varje PCR-körning samtliga

medföljande *Kvantifieringsstandarder* (VZV LC/TM QS 1 - 4) användas. Innan testet påbörjas ska alla reagenser tinas fullständigt i rumstemperatur och blandas väl (pipetteras upp och ned flera gånger eller vortexas en kort stund) och därefter kort centrifugeras.

Om du med *Internkontrollen* vill kontrollera **både isoleringen av DNA och en eventuell inhibering av PCR**, ska du tillsätta *Internkontroll* redan vid isoleringen (se **8.2 Internkontroll**). Använd i så fall följande pipetteringsschema (se även den schematiska översikten i Fig. 1):

		Antal prover	
		1	12
1. Beredning av Master Mix	VZV LC Master	15 µl	180 µl
	VZV LC IC	0 µl	0 µl
	Total volym	15 µl	180 µl
2. Beredning av PCR-reaktion	Master Mix	15 µl	vardera 15 µl
	Prov	5 µl	vardera 5 µl
	Total volym	20 µl	vardera 20 µl

Om du vill använda *Internkontroll* **enbart för kontroll av en PCR-inhibering**, ska du tillsätta den direkt till VZV LC Master. I så fall använder du följande pipetteringsschema (se även den schematiska översikten i Fig. 2):

		Antal prover	
		1	12
1. Beredning av Master Mix	VZV LC Master	15 µl	180 µl
	VZV LC IC	0,5 µl	6 µl
	Total volym	15,5 µl*	186 µl*
2. Beredning av PCR-reaktion	Master Mix	15 µl*	vardera 15 µl*
	Prov	5 µl	vardera 5 µl
	Total volym	20 µl	vardera 20 µl

Pipettera i plastbehållaren till varje kapillär 15 µl av Master Mix. Tillsätt därefter 5 µl eluat från DNA-isoleringen. På motsvarande sätt måste 5 µl av minst en av *Kvantifieringsstandarderna* (VZV LC/TM QS 1 - 4) tillsättas som positiv kontroll och 5 µl vatten (*Water, PCR grade*) som negativ kontroll.

* Den volymökning som uppstår vid tillsats av *Internkontroll* ignoreras vid beredning av PCR-reaktionen. Detektionssystemets sensitivitet påverkas inte.

Förslut kapillärerna. För att överföra blandningen från plastbehållaren till kapillärerna, centrifugera adaptrar med kapillärer i en bordscentrifug i tio sekunder vid max. 400 x g (2.000 rpm).

Tillsats av *Internkontroll* till isolering

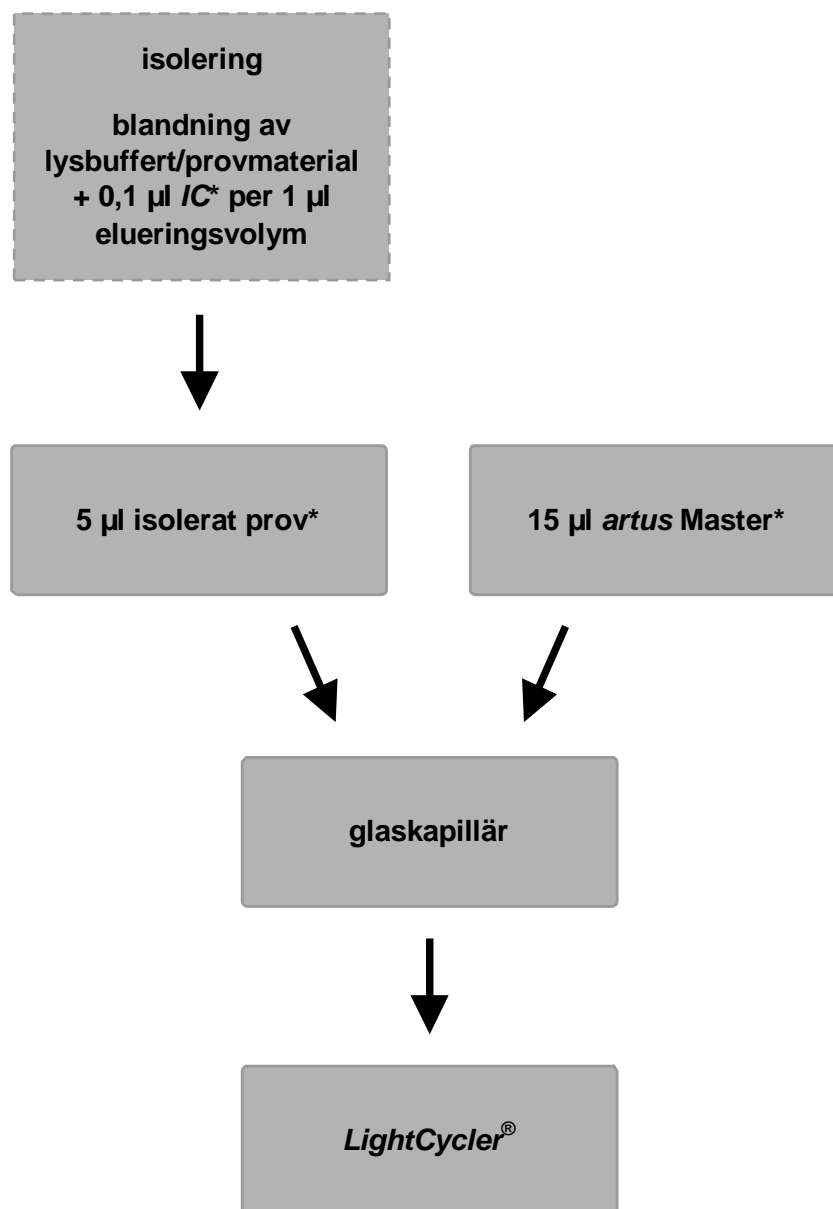


Fig. 1: Schematiskt arbetsförlopp för kontroll av isolering och PCR-inhibering.

* Vid varje pipetteringssteg är det mycket viktigt att se till att de lösningar som ska användas är helt upptinade, väl blandade och centrifugerade en kortstund

Tillsats av Internkontroll till artus Master

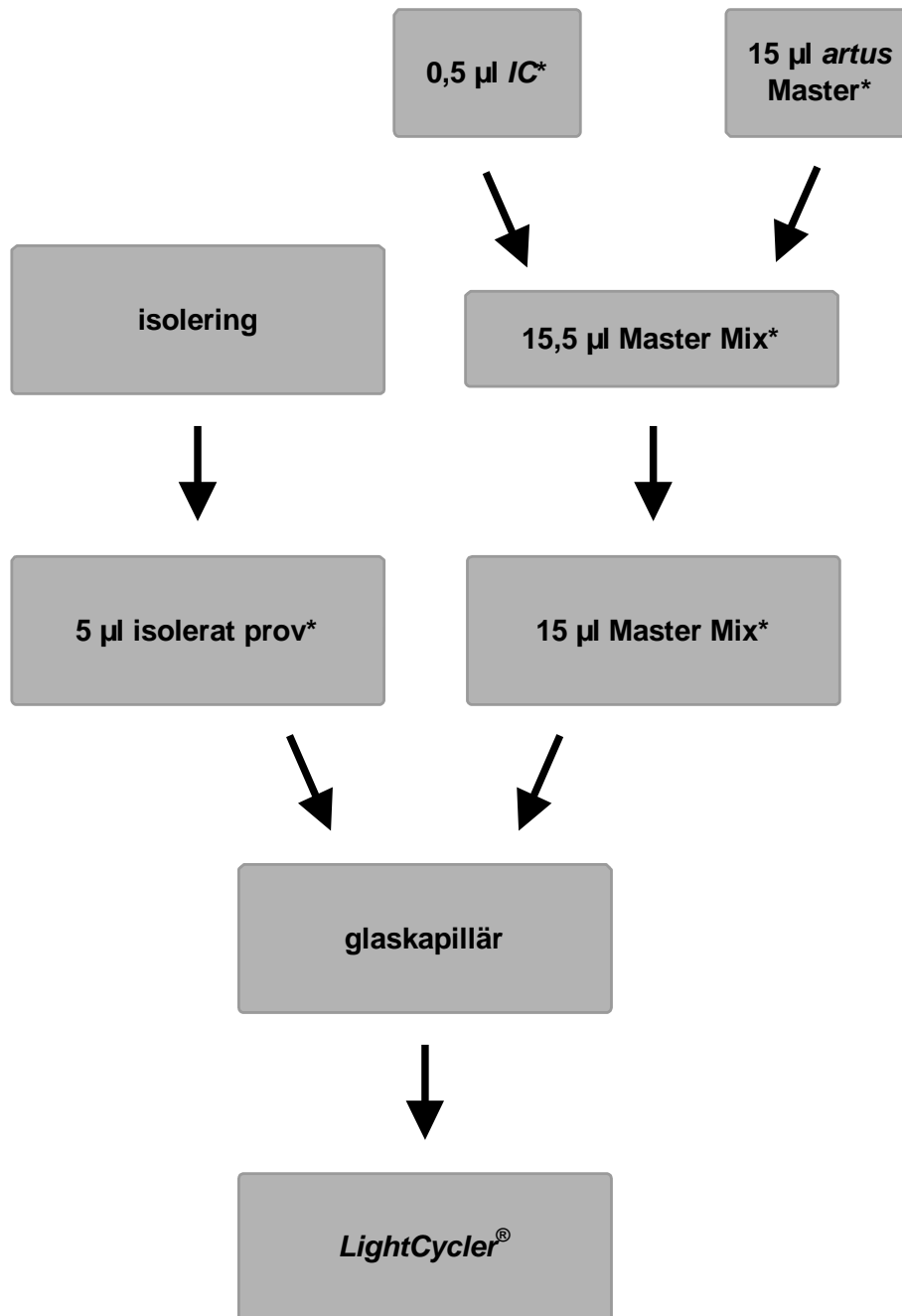


Fig. 2: Schematiskt arbetsförlöpp för kontroll av PCR-inhibering.

* Vid varje pipetteringssteg är det mycket viktigt att se till att de lösningar som ska användas är helt upptinade, väl blandade och centrifugerade en kortstund.

8.5 Programmering av *LightCycler* instrumenten

8.5.1 Programmering av *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 instrumentet

För detektion av VZV-DNA programmeras en temperaturprofil på *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 instrumentet enligt dessa fem steg (se Fig. 3 - 7).

- | | | |
|----|---|--------|
| A. | Initial aktivering av Hot Start-enzymet | Fig. 3 |
| B. | Touch-Down-steg | Fig. 4 |
| C. | Amplifiering av DNA | Fig. 5 |
| D. | Smältkurva (valfritt) | Fig. 6 |
| E. | Kylning | Fig. 7 |

Observera speciellt inställningarna för *Analysis Mode*, *Cycle Program Data* och *Temperature Targets*. Dessa inställningar markeras i figurerna med en svart ram. Mer information om programmering av *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 instrumentet finner du i *LightCycler Operator's Manual*. Steg D. Smältkurva är **valfritt**. Det behövs endast vid differentiering mellan HSV-1 och HSV-2 vid samtida insats av *artus* HSV1/2 LC PCR Kit.

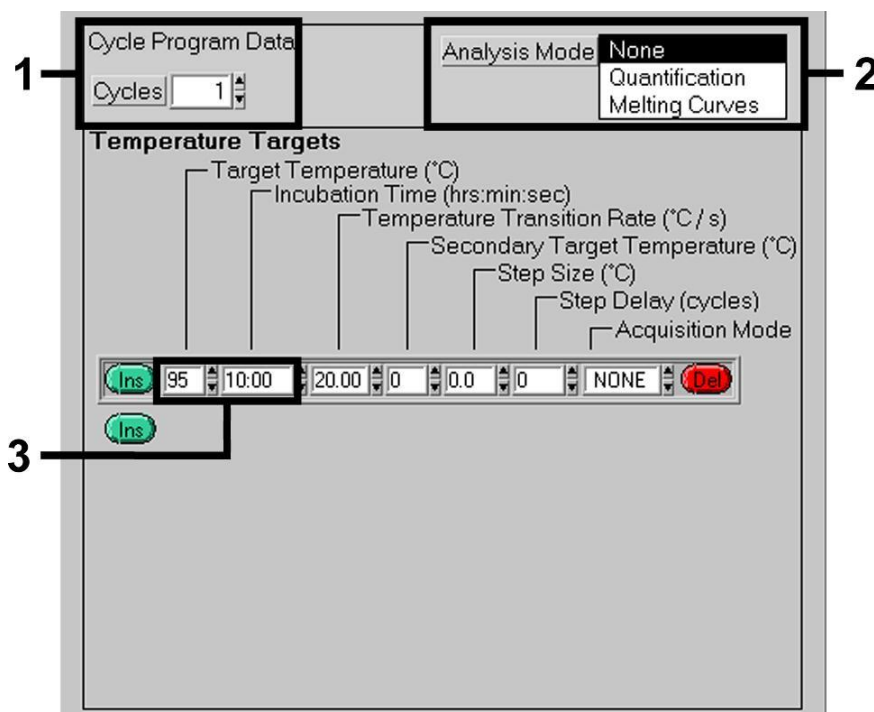


Fig. 3: Initial aktivering av Hot Start-enzymet.

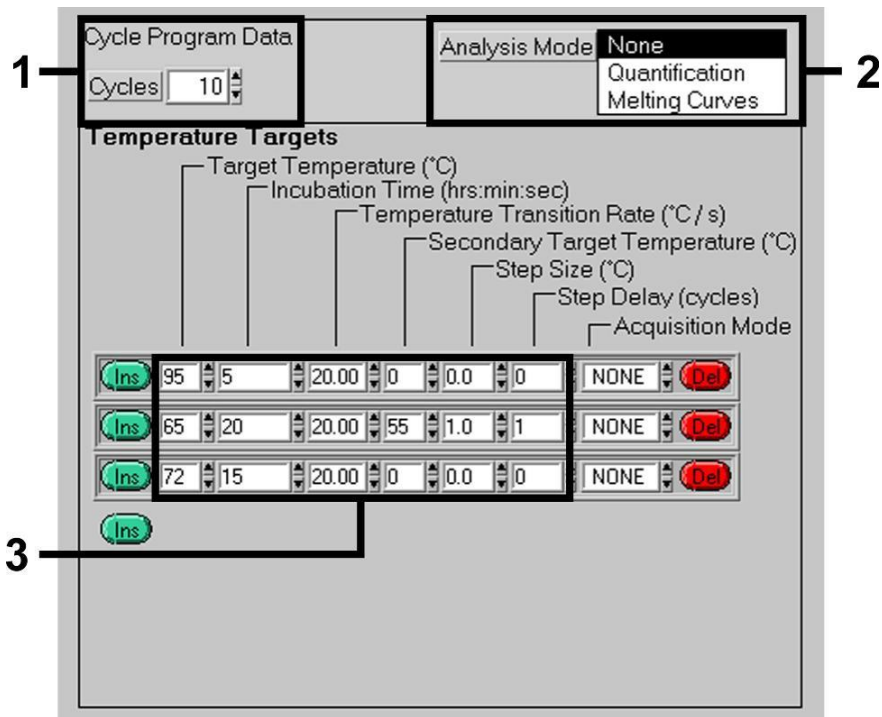


Fig. 4: Touch-Down step.

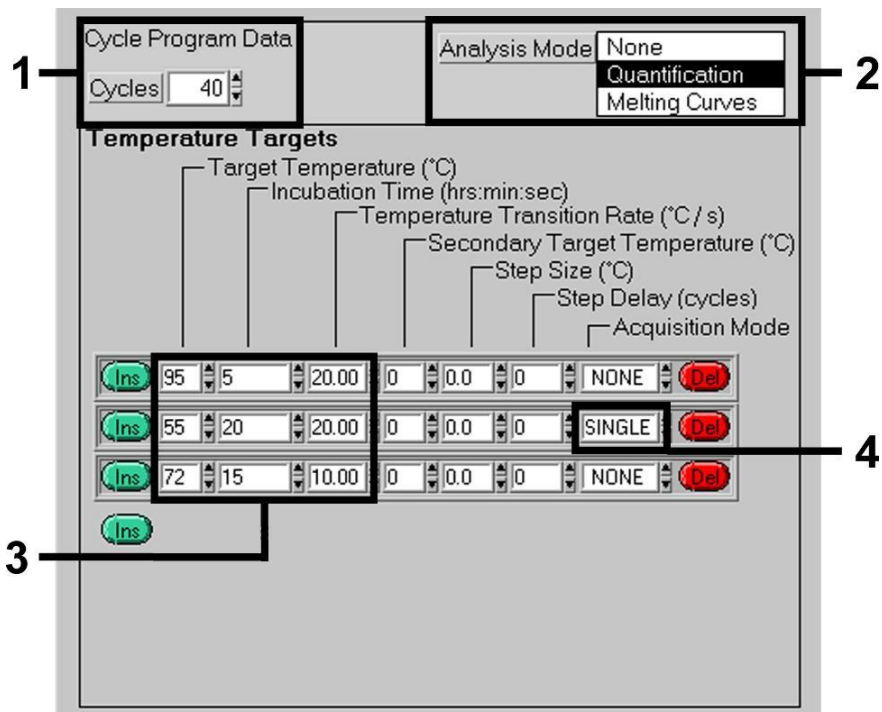


Fig. 5: Amplifying avDNA.

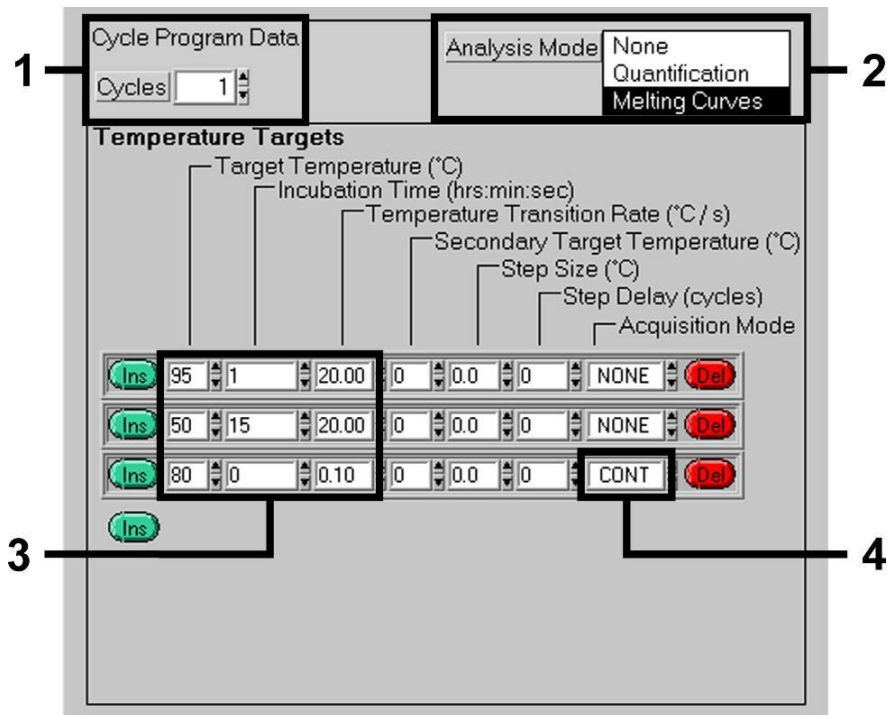


Fig. 6: Smältkurva.

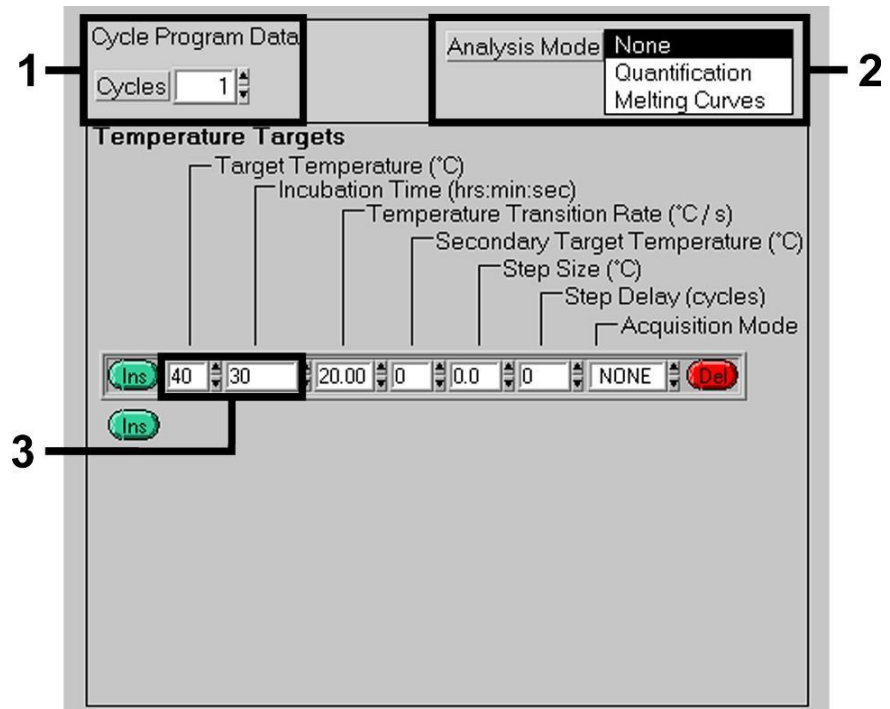


Fig. 7: Kylning.

8.5.2 Programmering av *LightCycler 2.0* instrumentet

För att programmera en PCR-körning på *LightCycler 2.0* instrumentet aktiverar du alternativet *New* i menybalken och väljer därefter *LightCycler Experiment*.

Därefter kan du för detektion av VZV-DNA skapa en temperaturprofil på *LightCycler 2.0* instrumentet enligt dessa fem programsteg (se Tabell 1).

- A. Initial aktivering av Hot Start-enzymet
- B. Touch-Down-steg
- C. Amplifiering av DNA
- D. Smältkurva (**valfritt**)
- E. Kylning

Steg D. Smältkurva är **valfritt**. Det behövs endast vid differentiering mellan HSV-1 och HSV-2 vid samtida insats av *artus HSV1/2 LC PCR Kit*.

Tänk på att du till att börja med anger antalet förbereda kapillärer för denna PCR-körningen (*Max. Seek Pos.*) (se Fig. 8).

Tabell 1: Framtagning av temperaturprofilen.

Program	Target [°C]	Hold [hh:mm:ss]	Ramp Rate [°C/s]	Sec Target	Step Size [°C]	Step Delay [cycles]	Acq. Mode	Cycles	Analysis Mode
Aktivering	95	00:10:00	20	0	0	0	None	1	None
Touch Down	95	00:00:05	20	0	0	0	None	10	None
	65	00:00:20	20	55	1	1	None		
	72	00:00:15	20	0	0	0	None		
Amplifiering av DNA	95	00:00:05	20	0	0	0	None	40	Quantification
	55	00:00:20	20	0	0	0	Single		
	72	00:00:15	20	0	0	0	None		
Smältkurva	95	00:00:01	20	0	0	0	None	1	Melting Curve
	50	00:00:15	20	0	0	0	None		
	80	00:00:00	0,1	0	0	0	Cont.		
Kylning	40	00:00:30	20	0	0	0	None	1	None

Ange provspecifikationerna genom att trycka på knappen *Samples*.

- Börja med att ange det totala antalet tänkta PCR-beredningar (*Sample Count*) i fönstret *Capillary View*.
- I anslutning kan du tilldela proven namn under *SampleName*.
- Efter detta väljer du fluorescenskanalerna 530 under *Selected Channels* för att detektera analytisk VZV-PCR och 705 för att påvisa PCR av *Internkontrollen*.
- För definition av standarderna och för tilldelningen av de motsvarande koncentrationerna väljer du under *Analysis Type* alternativet *Absolute Quantification* (se **8.3 Kvantifiering**).
- Se till att funktionen *Enable Controls* **inte** är aktiverat, då detta annars leder till ett begränsat urval av analys-optioner vid utvärderingen av data (*Fit Points*-Modus står annars inte till förfogande, se **9.2 Tolkning av LightCycler 2.0 instrumentets PCR-data**). Under *Target Name* kan du tilldela de valda fluorescenskanalerna 530 och 705 de målsekvenser (VZV resp. *Internkontroll*) som skall påvisas. Ifyllandet av spalten *Target Name* kan underlättas med funktionen *Auto Copy*. Definitionen av *Target Name* är till för att förbättra överblicken, detta är dock inte obligatoriskt.
- För att ta fram en standardkurva vid analysen av data måste *Kvantifieringsstandarderna* definieras med de motsvarande koncentrationerna. För att göra detta väljer du *Standard* under *Sample Type* och anger de motsvarande koncentrationen under *Concentration*.
- Den programmerade temperaturprofilen kan sparas på hårddisken för att användas på nytt för vidare körningar. För att göra detta aktiverar du funktionen *Save As...* under menyn *File*. I fönstret som öppnas väljer du under *Templates and Macros* underförteckningen *Run Templates* och sparar under ett passande namn datan där.
- För att starta PCR-körningen, byter du till knappen *Run* och aktiverar *Start Run* (se Fig. 8). Efter att ha angivet destinationen för var datan skall sparas startas PCR-programmet.

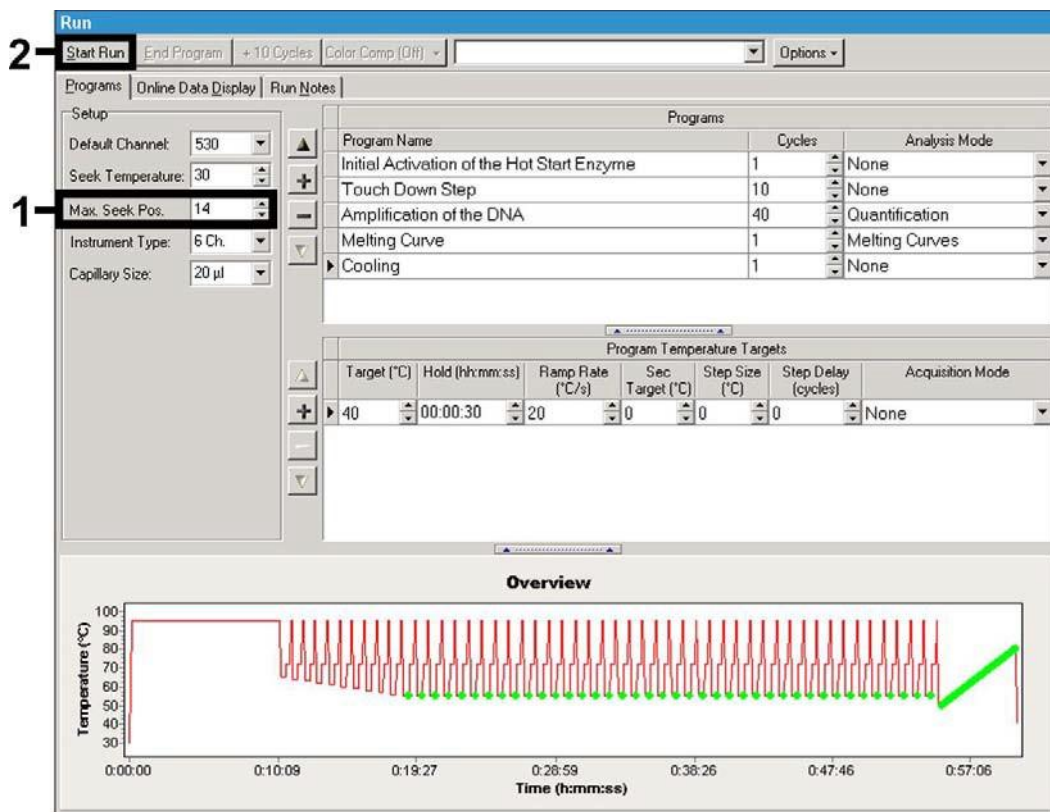


Fig. 8: Start av PCR-körningen.

9. Tolkning av resultat

9.1 Tolkning av *LightCycler 1.1/1.2/1.5* instrumentets PCR-data

För att analysera de data som har tagits fram med *LightCycler 1.1/1.2/1.5* instrumentet rekommenderar vi att *LightCycler Software Version 3.5.* används. Vid flerfärgs-analysen uppträder interferenser mellan fluorimeterkanalerna. Programvaran till *LightCycler 1.1/1.2/1.5* instrumentet innehåller en fil som benämns *Color Compensation File*, som kompenserar dessa störningar.

Öppna filen innan, under eller omedelbart efter PCR-körningen genom att aktivera knappen *Choose CCC File* resp. *Select CC Data*. Om det inte finns någon *Color Compensation File* installerad, måste du skapa filen enligt anvisningarna i *LightCycler Operator's Manual*. Efter att ha aktiverat *Color Compensation File* visas skilda signaler i fluorimeterkanalerna F1, F2 och F3. För analys av PCR-resultaten, vilka tas fram med *artus VZV LC PCR Kit* väljer du displayfunktionerna F1/F2 för analytisk PCR, resp. F3/Back-F1 för PCR av *Internkontrollen*. För analys av kvantitativa körningar ska du följa anvisningarna i avsnittet **8.3 Kvantifiering**, samt **Technical Note for quantitation on the *LightCycler 1.1/1.2/1.5* Instrument** på www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX/.

Om mer än ett *Herpes-artus*-system är integrerat i en PCR-körning är det viktigt att VZV-proven analyseras separerade från varandra. Välj därför ut de motsvarande rotor-positionerna för tolkning av resultaten.

Följande resultat kan förekomma:

1. I fluorimeterkanalen F1/F2 detekteras en signal.

Analysresultatet är positivt. Provet innehåller VZV-DNA.

I detta fall är detektion av en signal i kanalen F3/Back-F1 oväsentlig, eftersom höga initiala koncentrationer av VZV-DNA (positiv signal i kanalen F1/F2) kan leda till en reducerad eller utebliven fluorescenssignal för *Internkontrollen* i kanalen F3/Back-F1 (konkurrens).

2. I fluorimeterkanalen F1/F2 detekteras ingen signal, utan endast i kanalen F3/Back-F1 (*Internkontrollens* signal).

Inget VZV-DNA kan påvisas i provet. Det kan därför anses som negativt.

Vid negativ VZV-PCR utesluter detektionen av *Internkontroll*-signalen möjligheten av en PCR-inhibering.

3. Ingen signal detekteras vare sig i kanal F1/F2 eller i kanal F3/Back-F1.

Något diagnosresultat kan inte erhållas.

Information om felkällor och hur dessa åtgärdas finns i **10. Felsökning**.

Exempel på positiva och negativa PCR-reaktioner finns i Fig. 9 och Fig. 10.

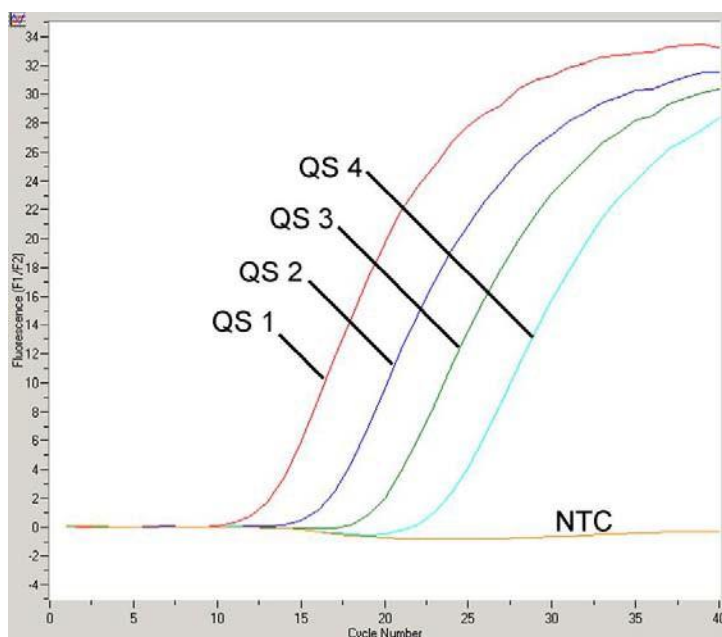


Fig. 9: Detektion av Kvantifieringsstandarderna (VZV LC/TM QS 1 - 4) i fluorimeterkanal F1/F2 hos *LightCycler 1.1/1.2/1.5* instrumentet. NTC: non-template control (negativ kontroll).

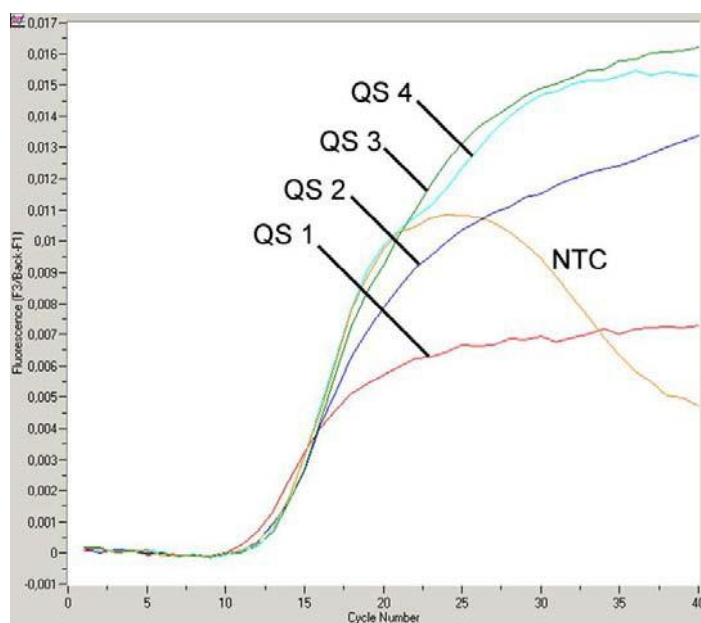


Fig. 10: Detektion av Internkontrollen (IC) i fluorimeterkanal F3/Back-F1 hos *LightCycler 1.1/1.2/1.5* instrumentet med samtidig amplifiering av Kvantifieringsstandarderna (VZV LC/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (negativ kontroll). Orsakat av den begränsade kompensationen av fluorescensinterferensen uppkommer överlagringar av internkontrollens signaler i F3 genom positiva signaler från F1. På grund av detta är en utvärdering av *internkontrollens* (F3) signaler för starkt positiva prover och kontroller inte möjligt.

9.2 Tolkning av *LightCycler 2.0* instrumentets PCR-data

För att analysera de data som har tagits fram med *LightCycler 2.0* instrumentet rekommenderar vi att *LightCycler Software Version 4.0.* används. Beakta även hänvisningarna i *LightCycler 2.0 Instrument Operator's Manual Version 4.0.*

För att analysera PCR-data orienterar du dig efter följande schema (se Fig. 11):

- Aktivera funktionen *Analysis* i menybalken och välj alternativet *Absolute Quantification*, med vilket i princip alla amplifikationsdata som genereras med *artus LC PCR kit* bör analyseras.
- *LightCycler*[®] Software Version 4.0 innehåller en fil med beteckningen *Color Compensation File*, vilken kompenserar signal-interferenser mellan fluorescenskanalerna. Denna fil öppnar du under eller i anslutning till PCR-körningen genom att aktivera knappen *Color Comp (On/Off)* och därefter *Select Color Compensation* (se Fig. 11). Om ingen *Color Compensation File* finns installerad, skapar du filen under beaktning av anvisningarna i *LightCycler*[®] Operator's Manual.
- Efter att ha aktiverat *Color Compensation File* dyker det upp skilda signaler i de enskilda fluorescenskanalerna. För att analysera PCR-resultaten som tagits fram med *artus VZV LC PCR Kit*, väljer du displayfunktionen 530/640 för analytisk VZV-PCR resp. 750/Back 530 för PCR av *Internkontrollen*.

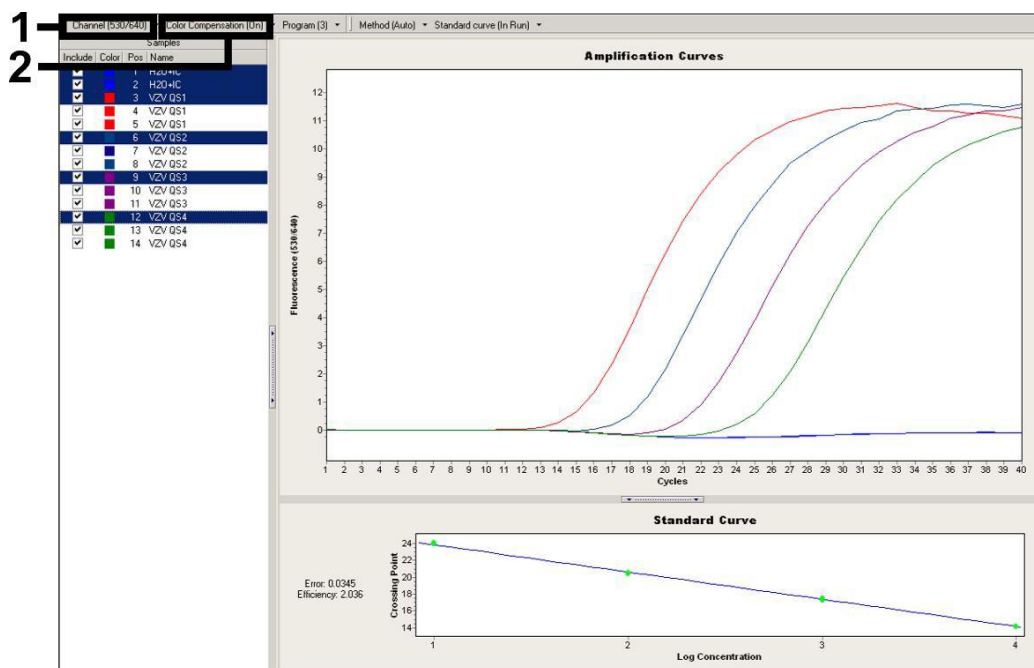


Fig. 11: Aktivering av *Color Compensation File* och val av fluorescenskanal.

För analysen av kvantitativa körningar beakta även avsnittet **8.3 Kvantifiering** samt **Technical Note for quantitation on the *LightCycler 2.0* Instrument** på www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX/.

När inställningarna av analys-optionerna har avslutats kan följande resultat förekomma:

1. I fluorescenskanalen 530/640 detekteras en signal.

Analysresultatet är positivt. Provet innehåller VZV-DNA.

I detta fall är detektion av en signal i kanalen 705/Back 530 oväsentlig, eftersom höga initiala koncentrationer av VZV-DNA (positiv signal i kanalen 530/640) kan leda till en reducerad eller utebliven fluorescenssignal för *Internkontrollen* i kanalen 705/Back 530 (konkurrens).

2. I fluorescenskanalen 530/640 detekteras ingen signal, utan endast i kanalen 705/Back 530 (*Internkontrollens* signal).

Inget VZV-DNA kan påvisas i provet. Det kan därför anses som negativt.

Vid negativ VZV-PCR utesluter detektionen av *Internkontroll*-signalen möjligheten av en PCR-inhibering.

3. Ingen signal detekteras vare sig i kanal 530/640 eller i kanal 705/Back 530.

Något diagnosresultat kan inte erhållas.

Information om felkällor och hur dessa åtgärdas finns i **10. Felsökning**.

Exempel på positiva och negativa PCR-reaktioner finns i Fig. 12 och Fig. 13.

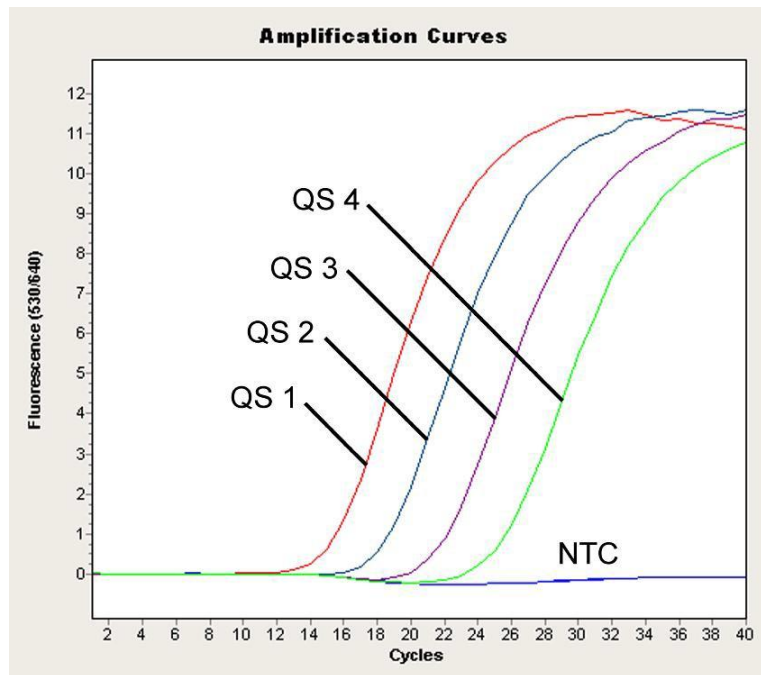


Fig. 12: Detektion av Kvantifieringsstandarderna (VZV LC/TM QS 1 - 4) i fluorescenskanal 530/640 hos *LightCycler 2.0* instrumentet. NTC: non-template control (negativ kontroll).

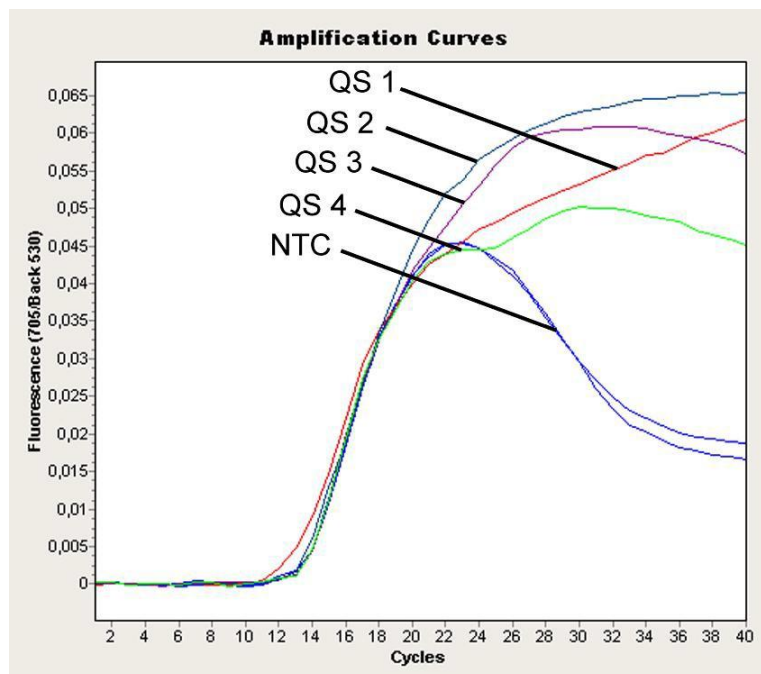


Fig. 13: Detektion av Internkontrollen (IC) i fluorescenskanal 705/Back 530 hos *LightCycler 2.0* instrumentet med samtidig amplifiering av Kvantifieringsstandarderna (VZV LC/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (negativ kontroll).

10. Felsökning

Ingen signal för de positiva kontrollerna (VZV LC/TM QS 1 - 4) i fluorescenskanal F1/F2 resp. 530/640:

- Valet av fluorescenskanal vid analysen av PCR-data motsvarar inte angivelserna i protokollet.
 - ❖ Välj för analysen av data fluorescenskanal F1/F2 resp. 530/640 för den analytiska VZV -PCR och fluorescenskanal F3/Back-F1 resp. 705/Back 530 för PCR av *Internkontrollen*.
- Programmeringen av temperaturprofilen för *LightCycler 1.1/1.2/1.5* resp. *LightCycler 2.0* instrumentet är felaktig.
 - ❖ **8.5 Programmering av *LightCycler* instrumentet**).
- Felaktig sammanställning av PCR-reaktionen.
 - ❖ Kontrollera arbetsstegen med hjälp av pipetteringsschemat (se **8.4 Förberedelser av PCR**) och upprepa, om nödvändigt, PCR.
- Förvaringsanvisningarna för en eller flera av kit-komponenterna har inte följts enligt föreskrifterna i **2. Förvaring**, eller hållbarhetsdatumet för *artus VZV LC PCR Kit* har löpt ut.
 - ❖ Kontrollera både förvaringsförutsättningarna så väl som datumet för reagenserna hållbarhet (se kit-etikett) och använd, om nödvändigt, ett nytt kit.

Svag eller utebliven signal för *Internkontrollen* i fluorescenskanal F3/Back-F1 resp. 705/Back 530 tillsammans med frånvaro av signal i kanal F1/F2 resp. 530/640:

- PCR-förhållandena motsvarar inte protokollet.
 - ❖ Kontrollera PCR-förhållandena (se ovan) och upprepa, om nödvändigt, PCR med korrigerade inställningar.
- PCR har inhiberats.
 - ❖ Kontrollera att du har använt ett reningsförfarande som rekommenderas av oss (se **8.1 DNA-isolering**) och var noga med att följa tillverkarens anvisningar exakt.

- ❖ Förvissa dig om att hos DNA-isoleringen det rekommenderade extra centrifugeringssteget för fullständigt avlägsnande av etanol-rester genomfördes innan elueringen (se **8.1 DNA-isolering**).
- Det förekommer DNA-förluster orsakade av reningsförfarandet.
 - ❖ Har *Internkontrollen* tillsatts för isolering kan en utebliven signal för *Internkontrollen* betyda att det föreligger DNA-förluster orsakade av reningsförfarandet. Kontrollera att du har använt ett reningsförfarande som rekommenderas av oss (se **8.1 DNA-isolering**) och var noga med att följa tillverkarens anvisningar.
- Förvaringsanvisningarna för en eller flera av kit-komponenterna har inte följts enligt föreskrifterna i **2. Förvaring**, eller hållbarhetsdatumet för *artus VZV LC PCR Kit* har löpt ut.
 - ❖ Kontrollera både förvaringsförutsättningarna så väl som datumet för reagenserna hållbarhet (se kit-etikett) och använd, om nödvändigt, ett nytt kit.

Signal hos de negativa kontrollerna i fluorescenskanal F1/F2 resp. 530/640 i analytisk PCR.

- En kontamination föreligger under PCR förberedelserna.
 - ❖
 - ❖ Förslut de enskilda PCR-reaktionsbehållarna om möjligt direkt efter tillsats av de undersökta proverna.
 - ❖
 - ❖ Försäkra er om att arbetsplatser och apparater dekontamineras regelbundet.
- En kontamination orsakad av isoleringen föreligger.
 - ❖ Upprepa isoleringen och PCR av de undersökta proverna med hjälp av oanvända reagenser.
 - ❖ Försäkra er om att arbetsplatser och apparater dekontamineras regelbundet.

Om du skulle ha ytterligare frågor eller om andra problem uppträder, ber vi dig kontakta den tekniska servicen.

11. Specifikationer

11.1 Analytisk sensitivitet

För bestämning av den analytiska sensitiviteten för *artus* VZV LC PCR Kit under användning av *LightCycler 1.1/1.2/1.5* instrumentet bereddes en standard-spädningsserie från 60 till nominellt 0,019 VZV-kopieekvivalenter*/ μl som analyserades med *artus* VZV LC PCR kit. Undersökningarna genomfördes tre olika dagar i form av åttafaldiga bestämningar. Resultatet har tagits fram med hjälp av en probit-analys. Den grafiska utvärderingen framgår av Fig. 14. Den analytiska detektionsgränsen för *artus* VZV LC PCR kit i samband med *LightCycler 1.1/1.2/1.5* instrumentet ligger således på 0,8 kopior/ μl ($p = 0,05$). Detta innebär att med 95 % konfidens 0,8 kopior/ μl kan detekteras.

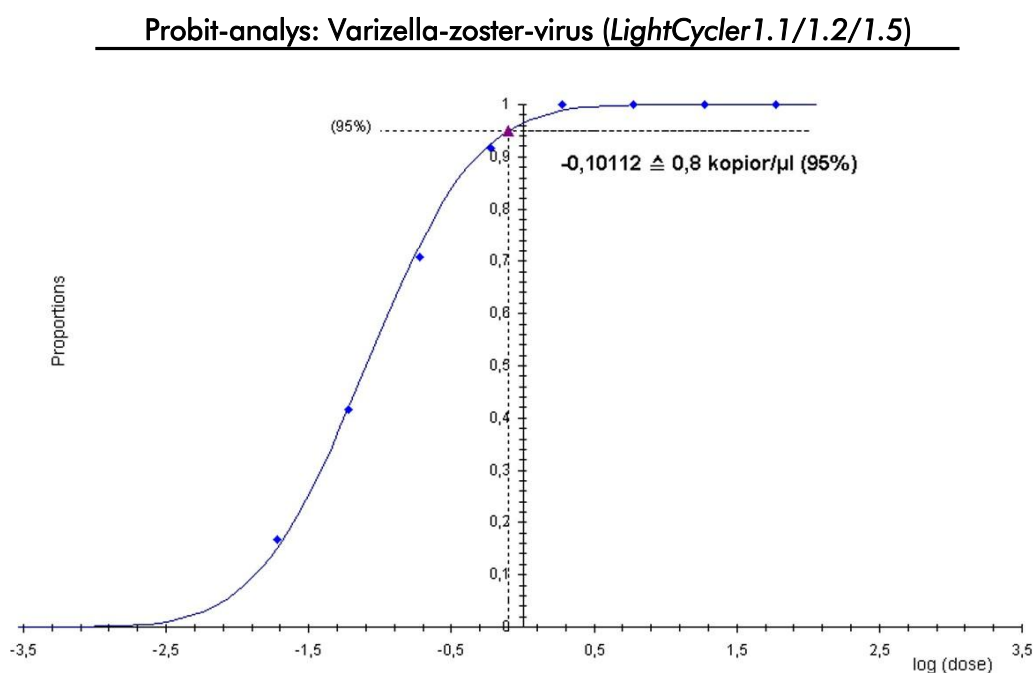


Fig. 14: Analytisk sensitivitet för *artus* VZV LC PCR Kit under användandet av *LightCycler 1.1/1.2/1.5* instrumentet.

* Den standard som används här är en klonad PCR-produkt vars koncentration har bestämts spektral- och fluorescensfotometriskt.

11.2 Specificitet

Specificiteten för *artus* VZV LC PCR Kit garanteras i första hand genom val av primers och prober samt val av stringenta reaktionsförhållanden. Primers och prober kontrolleras med en sekvensjämförelse-analys med avseende på eventuella homologier mot alla i genbanker publicerade sekvenser. På så sätt kontrolleras även att alla relevanta stammar detekteras.

Valideringen av specificiteten genomfördes även på 30 olika CSF (Cerebrospinalvätska) prover, vilka inte genererade någon signal med de specifika VZV primers och prober som är integrerade i *VZV LC Master*.

För bestämning av specificiteten av *artus* VCV LC PCR Kit undersöktes den i Tabell 2 angivna kontrollgruppen med avseende på korsreaktivitet. Ingen av de testade patogenerna var reaktiv.

Tabell 2: Kitets specificitetstest med eventuella korsreaktiva patogener.

Kontrollgrupp	VZV (F1/F2)	Internkontroll (F3/Back-F1)
Humant herpesvirus 1 (Herpes-simplex-virus 1)	-	+
Humant herpesvirus 2 (Herpes-simplex-virus 2)	-	+
Humant herpesvirus 4 (Epstein-Barr-virus)	-	+
Humant herpesvirus 5 (Cytomegalievirus)	-	+
Humant herpesvirus 6A	-	+
Humant herpesvirus 6B	-	+
Humant herpesvirus 7	-	+
Humant herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus)	-	+

11.3 Precision

Precisionsdatan för *artus* VZV LC PCR Kit tillåter framtagandet av totalvariansen (total spridning) av testsystemet. Denna totalvarians består av **Intra-Assay-variabilitet** (variabilitet mellan prover av samma koncentration inom en undersökningsomgång). **Inter-Assay-variabilitet** (lab-intern variabilitet på grund av att olika enskilda personer använder olika instrument

av samma typ) och **Inter-Batch-variabilitet** (variabilitet under användande av olika batcher). Därvid förmedlas standardavvikelsen, variansen och variationskoefficienten, såväl för det patogen-specifika som för PCR av *Internkontrollen*.

Dessa data togs fram för *artus VZV LC PCR Kit* med hjälp av *Kvantifieringsstandarden* med den minsta koncentration (QS 4; 10 kopior/ μ l). Undersökningarna utfördes i form av åttafaldiga bestämningar. Utvärderingen av resultaten gjordes med amplifikationskurvornas Ct-värden (Ct: *threshold cycle*, Tabell 3) och de därifrån förmedlade kvantitativa värdena i kopior/ μ l (Tabell 4). Således utgör den totala spridningen hos ett godtyckligt prov med den benämnda koncentrationen 0,88 % (Ct) resp. 11,40 % (konc.) och för detektion av *Internkontrollen* 1,26 % (Ct). Dessa värden baserar på summan av alla enskilda värden av den förmedlade variabiliteten.

Tabell 3: Precisionsdata baserade på Ct-värdena.

	Standard- avvikelse	Varians	Variations- koefficient [%]
Intra-Assay-variabilitet: <i>VZV LC/TM QS 4</i>	0,21	0,04	0,89
Intra-Assay-variabilitet: <i>Internkontroll</i>	0,04	0,00	0,33
Inter-Assay-variabilitet: <i>VZV LC/TM QS 4</i>	0,17	0,03	0,75
Inter-Assay-variabilitet: <i>Internkontroll</i>	0,09	0,01	0,69
Inter-Batch-variabilitet: <i>VZV LC/TM QS 4</i>	0,21	0,04	0,89
Inter-Batch-variabilitet: <i>Internkontroll</i>	0,15	0,02	1,16
Totalvarians: <i>VZV LC/TM QS 4</i>	0,21	0,04	0,88
Totalvarians: <i>Internkontroll</i>	0,16	0,03	1,26

Tabell 4: Precisionsdata baserade på de kvantitativa värdena (i kopior/ μ l).

	Standard- avvikelse	Varians	Variations- koefficient [%]
Intra-Assay-variabilitet: VZV LC/TM QS 4	1,33	1,77	13,19
Inter-Assay-variabilitet: VZV LC/TM QS 4	0,97	0,94	9,66
Inter-Batch-variabilitet: VZV LC/TM QS 4	1,29	1,67	12,83
Totalvarians: VZV LC/TM QS 4	1,15	1,32	11,40

11.4 Robusthet

Undersökningen av robustheten tjänar syftet att förmedla den totala felfrekvensen för *artus* VZV LC PCR Kit. För detta ändamål blandades 30 VZV negativa CSF (Cerebrospinalvätska)-prover med vardera 2,1 kopior/ μ l elutionsvolymen VZV-kontroll-DNA (trefaldig koncentration av den analytiska sensitivitetsgränsen), isolerades med QIAamp DNA Mini Kit (se

8.1 DNA-isolering) och analyserades med *artus* VZV LC PCR Kit. Felfrekvensen för VZV var 0 % för alla proven. *Internkontrollens* robusthet prövades dessutom genom isolering och analys av 30 VZV negativa CSF (Cerebrospinalvätska) prover. Felfrekvensen var 0 %. Robustheten för *artus* VZV LC PCR Kit är således ≥ 99 %.

11.5 Reproducerbarhet

Data för reproducerbarhet har insamlats för regelbunden utvärdering av prestanda för *artus* VZV LC PCR Kit samt för jämförelse av prestanda med andra produkter, vilket uppfylls genom deltagande i provningsjämförelser.

11.6 Diagnostisk utvärdering

artus VZV LC PCR Kit utvärderas för närvarande i ett flertal studier.

12. Särskild information om produktanvändning

- Samtliga reagenser är endast avsedda att användas för in vitro-diagnostik.
- Utförandet bör ske av personal som fått särskild undervisning och utbildning i in vitro-diagnostik-förfarandet (EN375).
- För att erhålla optimala PCR-resultat är det mycket viktigt att protokollet följs exakt.
- Beakta utgångsdatumet som finns på de enskilda komponenternas förpackningar och etiketter. Utgångna reagenser får inte användas.

13. Säkerhetsinformation

Säkerhetsinformation för *artus* VZV LC PCR Kit hittar du i tillhörande säkerhetsdatablad (material safety data sheets, MSDS). Detta hittar du som kompakt och användarvänlig PDF-fil under www.qiagen.com/safety.

14. Kvalitetskontroll

Enligt QIAGENs certifierade kvalitets-management-system ISO 9001 och ISO 13485 testades varje tillverkningsbatch *artus* VZV LC PCR Kit mot fastlagda specifikationer, för att garantera en enhetlig produktkvalitet.

15. Referenser

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 - 212.

16. Symbolförklaring



Används före



Tillverkningsbetsnummer



Tillverkare



Beställningsnummer



Materialnummer



Handbok



Medicinteknisk produkt för in vitro-diagnostik



GS1-artikelnnummer (Global Trade Item Number)



<N>

Innehållet räcker för <N> test



Temperaturintervall

QS

Kvantifieringsstandard

IC

Internkontroll

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



