



artus[®] VZV LC PCR Kit

Manual de uso

 24 (Nr. cat. 4502063)

 96 (Nr. cat. 4502065)

Diagnóstico cuantitativo in vitro

para utilizar con los sistemas

LightCycler[®] 1.1/1.2/1.5 y *LightCycler* 2.0

Enero 2015 – Versión 1



4502063, 4502065



1046899ES



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANIA

R3

MAT

1046899ES



Sample & Assay Technologies

artus VZV LC PCR Kit

Marcas comerciales y cláusulas de exclusión

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

Todos los nombres registrados, marcas comerciales, etc, usados en este documento, incluso aquellos que no estén específicamente marcados, están protegidos por la ley.

El *artus* VZV LC PCR Kit, el BioRobot[®] EZ1[®] DSP Workstation, el EZ1 DSP Virus Kit y Card son dispositivos de diagnóstico marcados con CE siguiendo la directiva europea de diagnóstico in vitro 98/79/EC. No disponible en todos los países.

Los QIAamp[®] Kits están indicados para el uso general en el laboratorio. No están indicados para proporcionar información acerca del diagnóstico, prevención o tratamiento de enfermedades.

La compra de kits de PCR de *artus* incluye una licencia de limitación de uso al proceso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) aplicada al diagnóstico in vitro en humanos y veterinaria en combinación con un termociclador, cuyo uso en el proceso automatizado de la PCR está protegido por derechos de pre-pago, bien con el pago a Applied Biosystems o como compra, p. ej. de un termociclador autorizado. El proceso de la PCR está protegido por las patentes americanas enumeradas a continuación y sus equivalentes en los países correspondientes Nr. 5,219,727 y 5,322,770 y 5,210,015 y 5,176,995 y 6,040,166 y 6,197,563 y 5,994,056 y 6,171,785 y 5,487,972 y 5,804,375 y 5,407,800 y 5,310,652 y 5,994,056 propiedad de F. Hoffmann-La Roche Ltd.

Índice

1. Contenido	5
2. Almacenamiento	5
3. Materiales y dispositivos adicionales necesarios	6
4. Medidas generales de seguridad	6
5. Información acerca del agente patógeno	7
6. Principio de la PCR a tiempo real	7
7. Descripción del producto	7
8. Protocolo	9
8.1 Purificación del ADN.....	9
8.2 Control interno	12
8.3 Cuantificación	13
8.4 Preparación de la PCR	14
8.5 Programación de los sistemas <i>LightCycler</i>	19
9. Análisis.....	25
9.1 Análisis de los datos de la PCR con los sistemas	25
<i>LightCycler</i> 1.1/1.2/1.5	25
9.2 Análisis de los datos de la PCR con el sistema	28
<i>LightCycler</i> 2.0.....	28
10. Solución de problemas.....	32
11. Especificaciones.....	34
11.1 Sensibilidad analítica	34
11.2 Especificidad	35
11.3 Precisión.....	36

11.4 Robustez.....	38
11.5 Reproducibilidad.....	38
11.6 Evaluación diagnóstica.....	38
12. Limitaciones en la utilización del producto	38
13. Información de seguridad.....	39
14. Control de calidad.....	39
15. Bibliografía	39
16. Explicación de los símbolos.....	40

artus VZV LC PCR Kit

Para utilizar con los sistemas *LightCycler 1.1/1.2/1.5* o *LightCycler 2.0*.

1. Contenido

	Rotulado y contenido	Art. No. 4502063 24 reacciones	Art. No. 4502065 96 reacciones
Azul	VZV LC Master	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
Rojo	VZV LC/TM QS 1 [‡] 1 x 10 ⁴ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Rojo	VZV LC/TM QS 2 [‡] 1 x 10 ³ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Rojo	VZV LC/TM QS 3 [‡] 1 x 10 ² cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Rojo	VZV LC/TM QS 4 [‡] 1 x 10 ¹ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Verde	VZV LC IC [‡]	1 x 1.000 μl	2 x 1.000 μl
Blanco	Water (PCR grade)	1 x 1.000 μl	1 x 1.000 μl

[‡] QS = *Estándar de cuantificación*
IC = *Control interno*

2. Almacenamiento

Los componentes del *artus VZV LC PCR Kit* deben almacenarse a una temperatura de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y pueden ser utilizados hasta la fecha indicada en la etiqueta. Evite congelarlos y descongelarlos repetidamente (más de 2 veces), ya que puede disminuir su sensibilidad. En caso de no usarlos regularmente, es recomendable dividir los reactivos en alícuotas. Si fuera necesario almacenar los componentes a $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, el período de tiempo no debe superar las cinco horas.

3. Materiales y dispositivos adicionales necesarios

- Guantes de laboratorio sin talco
- Kit de purificación del ADN (véase **8.1 Purificación del ADN**)
- Pipetas (graduables)
- Puntas de pipeta estériles con filtro
- Agitador vortex
- Centrífuga de mesa con rotor para tubos de reacción de 2 ml
- *Color Compensation Set* (Roche Diagnostics, Art. No. 2 158 850) para crear un archivo *Crosstalk Color Compensation* para los sistemas *LightCycler 1.1/1.2/1.5* o *LightCycler 2.0*
- *LightCycler Multicolor Demo Set* (Art. No. 03 624 854 001) para el sistema *LightCycler 2.0*
- Capilares *LightCycler* (20 µl)
- Cooling Block (Bloque de refrigeración), *LightCycler*
- Sistemas *LightCycler 1.1/1.2/1.5* (Software Version 3.5) o *LightCycler 2.0* (Software Version 4.0)
- Capping Tool, *LightCycler*

4. Medidas generales de seguridad

El usuario debe tener siempre en cuenta las siguientes indicaciones:

- Se deben utilizar puntas de pipeta estériles con filtro.
- Se deben purificar, almacenar y añadir a la reacción las muestras positivas (muestras, controles, amplificadas) por separado del resto de reactivos.
- Todos los componentes deben descongelarse completamente a temperatura ambiente antes de iniciar el ensayo.
- A continuación, deben mezclarse los componentes a conciencia y centrifugarlos brevemente.
- Inmediatamente, se debe trabajar en hielo o en el Cooling Block (Bloque de refrigeración), *LightCycler*.

5. Información acerca del agente patógeno

La transmisión del virus varicela zoster (VZV) se produce de persona a persona mediante secreciones respiratorias o por contacto directo. La infección por este virus produce fiebre ligera y afecta de forma moderada el estado general de salud. Es característico de esta enfermedad el exantema polimórfico con pápulas, vesículas y costras ligado a un prurito intenso conocido como varicela. Infecciones severas del VZV se han observado frecuentemente en pacientes inmunodeprimidos y pueden dar lugar a complicaciones peligrosas como neumonía y encefalitis. Tras la infección aguda el agente patógeno persiste en los ganglios espinales sensoriales y en los ganglios de los nervios craneales. En caso de remisión de la inmunidad se pueden producir exacerbaciones (por ejemplo, herpes labial, herpes zoster).

6. Principio de la PCR a tiempo real

El diagnóstico de un patógeno mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se basa en la amplificación de regiones específicas del genoma del patógeno. En la PCR a tiempo real el producto amplificado se detecta con la ayuda de fluorocromos. Éstos están acoplados a sondas de oligonucleótidos que se van ligando específicamente a la secuencia que se amplifica. La detección de las intensidades de fluorescencia en el transcurso de la PCR a tiempo real hace posible la detección y la cuantificación del producto amplificado, sin necesidad de volver a abrir los tubos de reacción tras realizar la PCR (Mackay, 2004).

7. Descripción del producto

El *artus* VZV LC PCR Kit es un sistema listo para utilizar e indicado para la detección del ADN del VZV mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el sistema *LightCycler*. La *VZV LC Master* contiene reactivos y enzimas para la amplificación específica de un fragmento de 82 pb del genoma del VZV, así como para la detección inmediata del fragmento amplificado con los sistemas *LightCycler 1.1/1.2/1.5* o *LightCycler 2.0*.

Además, el *artus* VZV LC PCR Kit contiene un segundo sistema de amplificación heterólogo para comprobar si se produce una inhibición de la PCR.

Producto de PCR	Selección de los canales de fluorescencia	
	Sistemas <i>LightCycler</i> 1.1/1.2/1.5	Sistema <i>LightCycler</i> 2.0 [®]
VZV	F1/F2	530/640
VZV LC IC	F3/Back-F1	705/Back 530

La amplificación y detección del *Control interno (IC)* no afecta al límite de detección de la PCR analítica del VZV (véase **11.1 Sensibilidad analítica**). Se suministran controles positivos externos (*VZV LC/TM QS 1 - 4*) que permiten determinar la carga patógena. Para más información al respecto, véase el apartado **8.3 Cuantificación**.

Atención: El perfil de la temperatura para la detección del ADN del virus varicela zoster con la ayuda del *artus* VZV LC PCR Kit es igual al del *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit, al del *artus* EBV LC PCR Kit, y al del *artus* CMV LC PCR Kit. Las reacciones de PCR para este sistema *artus* pueden por lo tanto ser realizadas y analizadas en el mismo ensayo. Observe las indicaciones especiales para el análisis en **8.3 Cuantificación** y en **9. Análisis**.

8. Protocolo

8.1 Purificación del ADN

Diversos fabricantes ofrecen kits de purificación del ADN. Ajuste la cantidad de muestra indicada para la purificación de acuerdo al protocolo que escoja, y siga las instrucciones del fabricante. Se recomiendan los siguientes kits de purificación:

Muestra	Kit de purificación	Artículo Número	Fabricante	Carrier de ARN
Suero, plasma, LCR, hisopados	QIAamp UltraSens Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	incluido
	QIAamp DNA Mini	51 304	QIAGEN	no incluido
LCR	EZ1 DSP Virus Kit (48)*	62 724	QIAGEN	incluido

*Para utilizar en combinación con BioRobot EZ1 DSP Workstation (Nr. cat. 9001360) y EZ1 DSP Virus Card (Nr. cat. 9017707).

Nota importante para el uso del QIAamp UltraSens Virus Kit y QIAamp DNA Mini Kit:

- La utilización de un **carrier de ARN** mejora la eficiencia de la purificación y por ello el rendimiento en la obtención de ADN/ARN. En caso de que el kit de purificación utilizado no contenga un carrier de ARN, le recomendamos encarecidamente, que durante la purificación de los ácidos nucleicos obtenidos a partir de muestras humanas pobres en células o con poco contenido de ADN/ARN (por ejemplo, líquido cefalorraquídeo), añada un carrier de ARN (RNA-Homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, No. Art: 27-4110-01). Por favor lea las instrucciones siguientes:
 - Resuspenda el carrier de ARN liofilizado en el tampón de elución (no en el de lisis) del kit de purificación (por ejemplo, el tampón AE del QIAamp DNA Mini Kit) en una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Prepare el número de alícuotas necesarias de la solución de carrier de ARN así preparada y almacénelas a -20°C . Evite congelar y descongelar las alícuotas de carrier de ARN (más de dos veces).

- b) Para cada purificación debe añadirse 1 μg del carrier de ARN por 100 μl del tampón de lisis. Si el kit de purificación utiliza 200 μl de tampón de lisis para cada muestra, entonces añada 2 μl del carrier de ARN (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) directamente al tampón de lisis. La mezcla del tampón de lisis y carrier de ARN (así como el *Control interno*, véase **8.2 Control interno**) debe prepararse inmediatamente antes de empezar cada purificación siguiendo el siguiente esquema.

Número de muestras	1	12
Tampón de lisis	p.ej. 200 μl	p.ej. 2400 μl
Carrier de RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	2 μl	24 μl
Volumen total	202 μl	2424 μl
Volumen por purificación	200 μl	cada 200 μl

- c) Utilice la mezcla del tampón de lisis y carrier de ARN anteriormente preparada inmediatamente. El almacenamiento de la mezcla no es posible.
- La utilización de un **carrier de ARN** mejora la eficiencia de la purificación y por ello el rendimiento en la obtención de ADN/ARN. Para incrementar la estabilidad del carrier de ARN suministrado con el QIAamp UltraSens Virus Kit, le recomendamos que siga las instrucciones siguientes:
 - a. Resuspenda el carrier de ARN liofilizado antes de usar por primera vez el kit de purificación, en 310 μl del tampón de elución del kit escogido (concentración final 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, no en el tampón de lisis). Prepare el número de alícuotas necesarias de la solución de carrier de ARN así preparada y almacénelas a -20°C . Evite congelar y descongelar las alícuotas de carrier de ARN (más de dos veces).
 - b. Antes de empezar cada purificación, una mezcla de tampón de lisis y carrier de ARN (así como el *Control interno*, véase **8.2 Control interno**) debe prepararse inmediatamente antes de empezar cada purificación siguiendo el siguiente esquema.

Número de muestras	1	12
Tampón de lisis AC	800 μ l	9600 μ l
Carrier de RNA (1 μ g/ μ l)	5,6 μ l	67,2 μ l
Volumen total	805,6 μl	9667,2 μl
Volumen por purificación	800 μl	cada 800 μl

- c. Utilice la mezcla del tampón de lisis y carrier de ARN anteriormente preparada inmediatamente. El almacenamiento de la mezcla no es posible.
- Utilizando el **QIAamp UltraSens Virus Kit** se puede lograr una concentración de la muestra. Si la muestra no fuera suero o plasma, adicione como mínimo 50 % (v/v) de plasma humano negativo a la misma.
 - Si lleva a cabo la purificación con tampones de lavado que contienen **etanol**, asegúrese de que se realiza una centrifugación adicional (tres minutos, 13.000 rpm) previa a la elución para eliminar posibles restos de etanol. De este modo, se evitan posibles inhibiciones de la PCR.
 - El *artus* VZV LC PCR Kit no está indicado para métodos de purificación que utilizan **fenol**.

Nota importante para la utilización del EZ1 DSP Virus Kit:

- La utilización del **carrier de RNA** es importante para la eficiencia en la purificación y en consecuencia para el rendimiento de ADN/ARN. Por favor añada la cantidad de carrier de ARN apropiada para cada purificación siguiendo las instrucciones del *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*.

Importante: El *Control interno* de *artus* VZV LC PCR Kit puede añadirse directamente durante la purificación (véase **8.2 Control interno**).

8.2 Control interno

Se suministra un *Control interno* (VZV LC IC), con el que podrá analizar **tanto la purificación del ADN como una posible inhibición de la PCR** (véase la Fig. 1). En caso de utilizar el **EZ1 DSP Virus Kit** en la purificación, el *Control interno* debe ser añadido siguiendo las instrucciones del *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*. Usando el **QIAamp UltraSens Virus Kit** o el **QIAamp DNA Mini Kit**, añada el *Control interno* en una proporción de 0,1 μl por 1 μl de volumen final de elución durante la purificación. Por ejemplo usando el QIAamp DNA Mini Kit, el ADN se eluye en 50 μl de tampón AE. Por lo tanto, añada 5 μl del *Control interno*. La cantidad del *Control interno* añadida depende **exclusivamente** del volumen de elución. El *Control interno* y el carrier de ARN (véase **8.1 Purificación del ADN**) deben añadirse sólo

- a la mezcla de tampón de lisis y muestra o
- directamente al tampón de lisis.

El *Control interno* no debe añadirse directamente a la muestra. En caso de añadirlo al tampón de lisis, tenga en cuenta que la mezcla del *Control interno* y tampón de lisis/carrier de ARN debe prepararse y usarse inmediatamente (el almacenamiento de la mezcla a temperatura ambiente o refrigerada puede llevar después de unas horas, al deterioro del *Control interno* y a una reducción de la eficiencia de la purificación). **No** añada el *Control interno* y el carrier de ARN directamente a la muestra.

El *Control interno* también puede utilizarse **exclusivamente para el análisis de una posible inhibición de la PCR** (véase la Fig. 2). Para ello, añada por reacción 0,5 μl del *Control interno* directamente a 15 μl de la VZV LC Master. Utilice para cada reacción de la PCR 15 μl de la Master Mix* preparada y añada a continuación 5 μl de la muestra purificada. Si tiene que preparar una PCR con más muestras, aumente las cantidades necesarias de la VZV LC Master y del *Control interno* de acuerdo al número de muestras (véase **8.4 Preparación de la PCR**).

* El aumento de volumen condicionado por la adición del *Control interno* es irrelevante en la preparación de la reacción de PCR. La sensibilidad del sistema de detección no se ve perjudicada.

El *artus* EBV LC PCR Kit contiene el mismo *Control interno (IC)* que el *artus* CMV LC PCR Kit. El *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit contiene el mismo *Control interno* que el *artus* VZV LC PCR Kit.

8.3 Cuantificación

Los *Estándares de cuantificación* suministrados (VZV LC/TM QS 1 - 4) se tratan como muestras ya purificadas y se añaden en el mismo volumen que en el caso de las muestras (5 µl). Para elaborar una curva estándar en el sistema *LightCycler*, añada los cuatro *Estándares de cuantificación* suministrados como se muestra a continuación:

Sistemas *LightCycler* 1.1/1.2/1.5

Defina los VZV LC/TM QS 1 - 4 en el *Sample Loading Screen* como estándares e introduzca las concentraciones indicadas (véase *LightCycler Operator's Manual*, Version 3.5, Chapter B, 2.4. Sample Data Entry).

Sistema *LightCycler* 2.0

Para definir los estándares, por favor seleccione la función *Analysis Type* en el menú de la ventana *Samples* y seleccione *Absolute Quantification*. Ahora pueden definirse los VZV LC/TM QS 1 - 4 como estándares e introducir la concentración correspondiente a cada estándar (véase *LightCycler Operator's Manual*, Version 4.0, Chapter 2.2 Entering Sample Information). Asegúrese de que la opción *Enable Controls* **no** está activada. De otro modo la selección de opciones en el análisis de los datos queda restringida (véase **9.2 Análisis de datos de la PCR con el sistema *LightCycler* 2.0**).

Podrá utilizar esta curva estándar también para las cuantificaciones posteriores, si incluye como mínimo, un estándar de **una** concentración definida durante la serie actual. Para ello, es necesario importar la curva estándar elaborada previamente (véase *LightCycler Operator's Manual*, Version 3.5, Chapter B, 4.2.5. Quantification with an External Standard Curve o Version 4.0, Chapter 4.2.2 Saving a Standard Curve). No obstante, con este modo de cuantificación, debe tenerse siempre en cuenta que se pueden presentar diferencias en los resultados a causa de la variabilidad entre las diferentes series de PCR.

Si tuviera que integrar más de un sistema Herpes-artus en la serie, no olvide analizarlos por separado de los Estándares de cuantificación correspondientes.

Atención: Los Estándares de cuantificación se definen como copias/ μ l. Para la conversión de los valores determinados mediante la curva estándar en copias/ml de muestra inicial, debe utilizarse la siguiente fórmula:

$$\text{Resultado (copias/ml)} = \frac{\text{resultado (copias/\mu l)} \times \text{volumen de elución (\mu l)}}{\text{volumen de la muestra (ml)}}$$

Tenga en cuenta que el volumen inicial de la muestra debe añadirse a la fórmula anterior. Esto debe considerarse cuando el volumen de la muestra ha cambiado antes de realizarse la purificación de los ácidos nucleicos (por ejemplo, cuando se reduce tras la centrifugación o cuando se aumenta para conseguir el volumen requerido para la purificación).

Importante: Para simplificar el análisis cuantitativo de los sistemas *artus* en los sistemas *LightCycler 1.1/1.2/1.5* o *LightCycler 2.0* tiene a su disposición una guía (**Technical Note for quantitation on the *LightCycler 1.1/1.2/1.5* or *LightCycler 2.0* Instrument**) en www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

8.4 Preparación de la PCR

Asegúrese de que el bloque de refrigeración con los adaptadores incluidos (accesorios del sistema *LightCycler*) se enfríe previamente a unos +4°C. Coloque el número necesario de capilares *LightCycler* para las reacciones que vaya a realizar en los adaptadores del bloque de refrigeración. Asegúrese de que, en cada serie de reacciones de PCR, se incluya al menos un *Estándar de cuantificación*, así como un control negativo (*Water, PCR grade*). Para la elaboración de una curva estándar, utilice para cada serie de reacciones de PCR todos los *Estándares de cuantificación* suministrados (*VZV LC/TM QS 1 - 4*). Todos los reactivos deben descongelarse completamente a temperatura ambiente antes de iniciar el ensayo, también deben ser mezclados a conciencia (para ello pipetee la mezcla arriba y abajo

varias veces o agite brevemente con el vortex). A continuación centrifugue brevemente.

Si desea analizar tanto la purificación del ADN como una posible inhibición de la PCR mediante el *Control interno*, éste debe ser añadido durante la purificación (véase **8.2 Control interno**). En ese caso, utilice el siguiente esquema de pipeteo (véase también el cuadro esquemático de la Fig. 1):

		Número de muestras	
		1	12
1. Preparación de la Master Mix	VZV LC Master	15 µl	180 µl
	VZV LC IC	0 µl	0 µl
	Volumen total	15 µl	180 µl
2. Preparación de la PCR	Master Mix	15 µl	cada 15 µl
	Muestra	5 µl	cada 5 µl
	Volumen total	20 µl	cada 20 µl

Si desea emplear el *Control interno* exclusivamente para analizar una posible inhibición de la PCR, debe añadirlo directamente a la VZV LC Master. En ese caso, utilice el siguiente esquema de pipeteo (véase también el cuadro esquemático de la Fig. 2):

		Número de muestras	
		1	12
1. Preparación de la Master Mix	VZV LC Master	15 µl	180 µl
	VZV LC IC	0,5 µl	6 µl
	Volumen total	15,5 µl*	186 µl*
2. Preparación de la PCR	Master Mix	15 µl*	cada 15 µl*
	Muestra	5 µl	cada 5 µl
	Volumen total	20 µl	cada 20 µl

Introduzca 15 µl de la Master Mix en el depósito de plástico de cada capilar. A continuación, añada 5 µl de la purificación del ADN. Se debe utilizar como control positivo 5 µl de al menos uno de los *Estándares de cuantificación*

* El aumento de volumen condicionado por la adición del *Control interno* es irrelevante en la preparación de la reacción de PCR. La sensibilidad del sistema de detección no se ve perjudicada.

(VZV LC/TM QS 1 - 4) y como control negativo 5 μ l de agua (*Water, PCR grade*). Cierre los capilares. Para transferir la preparación del depósito de plástico a los capilares, centrifugue el adaptador con los capilares en una centrífuga de mesa durante diez segundos a un máximo de 400 x g (2.000 rpm).

Adición del *Control interno* a la purificación

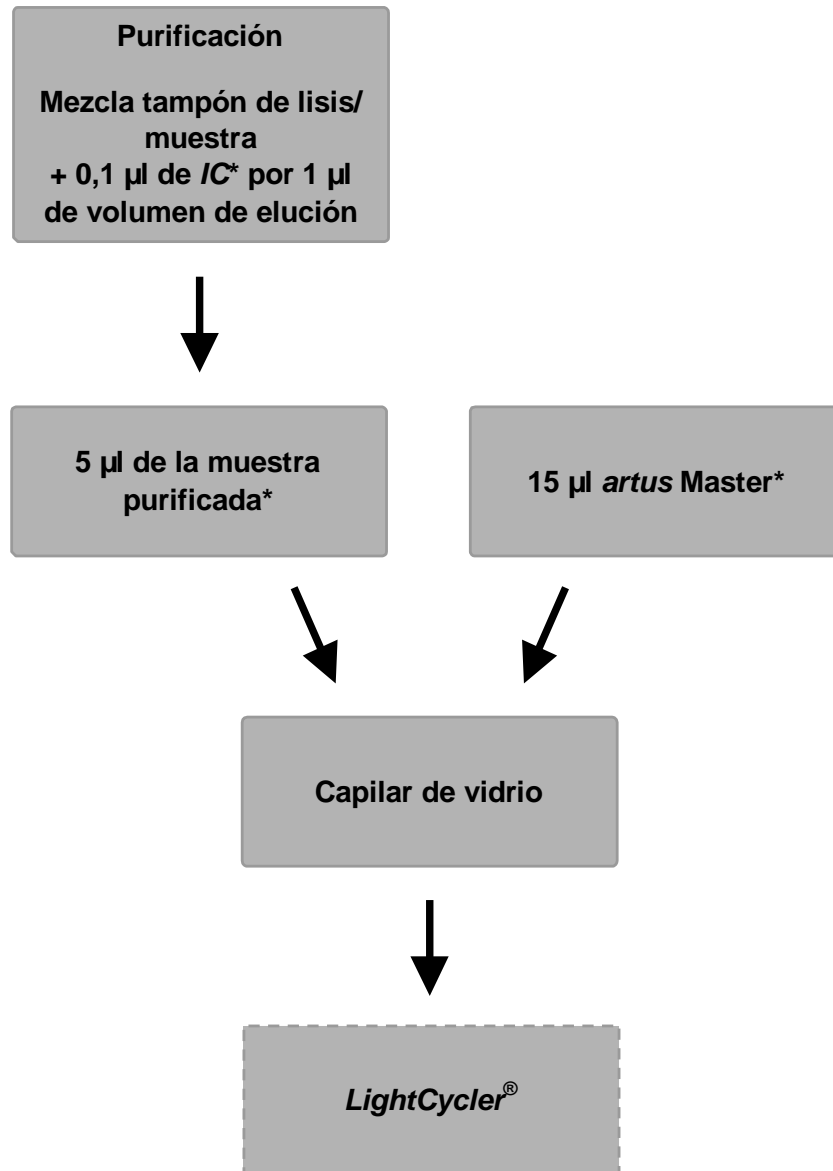


Fig. 1: Esquema de trabajo para el análisis de la purificación y la inhibición de la PCR.

* Con cada pipeteo, es imprescindible que compruebe que las soluciones utilizadas se encuentren completamente descongeladas, bien mezcladas y que hayan sido centrifugadas brevemente.

Adición del Control interno a la artus Master

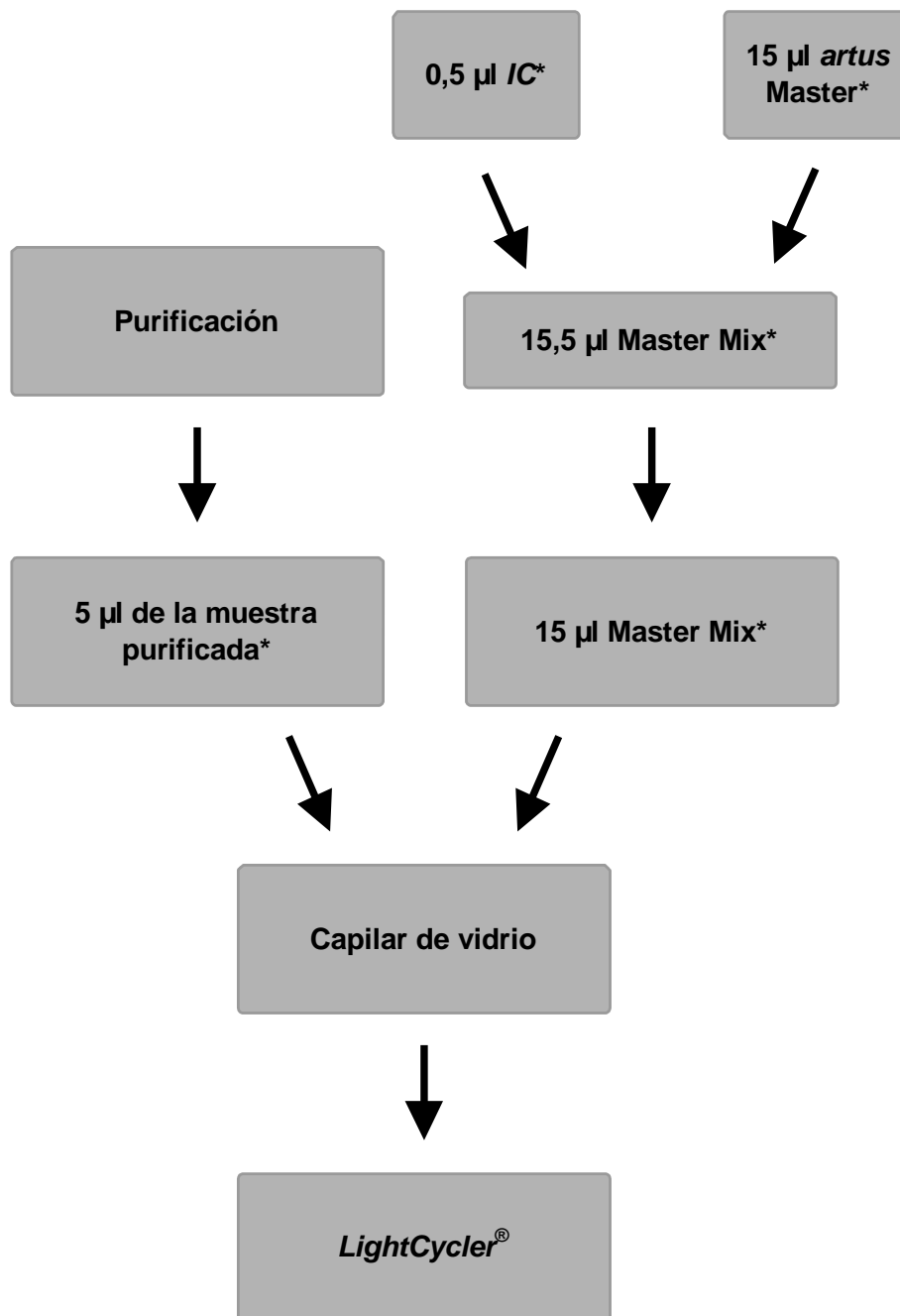


Fig. 2: Esquema de trabajo para el análisis de la inhibición de la PCR.

*

Con cada pipeteo, es imprescindible que compruebe que las soluciones utilizadas se encuentren completamente descongeladas, bien mezcladas y que hayan sido centrifugadas brevemente.

8.5 Programación de los sistemas *LightCycler*

8.5.1 Programación de los sistemas *LightCycler* 1.1/1.2/1.5

Para la detección del ADN del VZV cree un perfil de temperatura en los sistemas *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 con estos cinco pasos según las Fig. 3 - 7.

- | | | |
|----|---|--------|
| A. | Activación inicial de la enzima Hot Start | Fig. 3 |
| B. | Paso TouchDown | Fig. 4 |
| C. | Amplificación del ADN | Fig. 5 |
| D. | Curva de <i>melting</i> (opcional) | Fig. 6 |
| E. | Refrigeración | Fig. 7 |

Preste especial atención a los ajustes *Analysis Mode*, *Cycle Program Data* y *Temperature Targets*. En las figuras, estos ajustes aparecen resaltados mediante un cuadro en negrita. Encontrará más información acerca de la programación de los sistemas *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 en el *LightCycler Operator's Manual*. La programación del paso D. curva de *melting* es **opcional**. Es necesario exclusivamente para diferenciar entre HSV-1 y HSV-2 en caso de emplear simultáneamente el *artus* VZV LC PCR Kit.

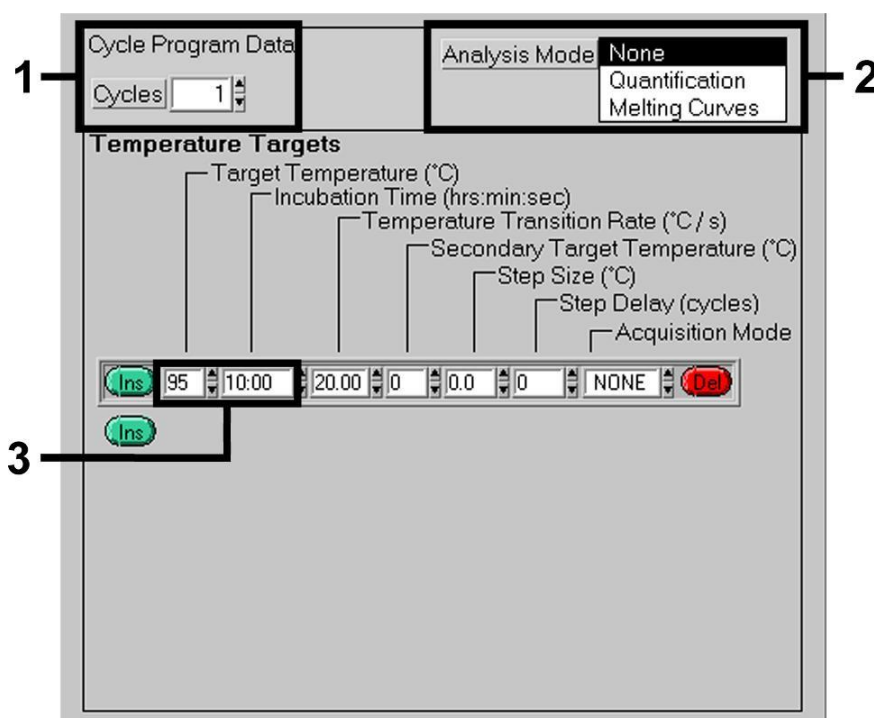


Fig. 3: Activación inicial de la enzima Hot Start.

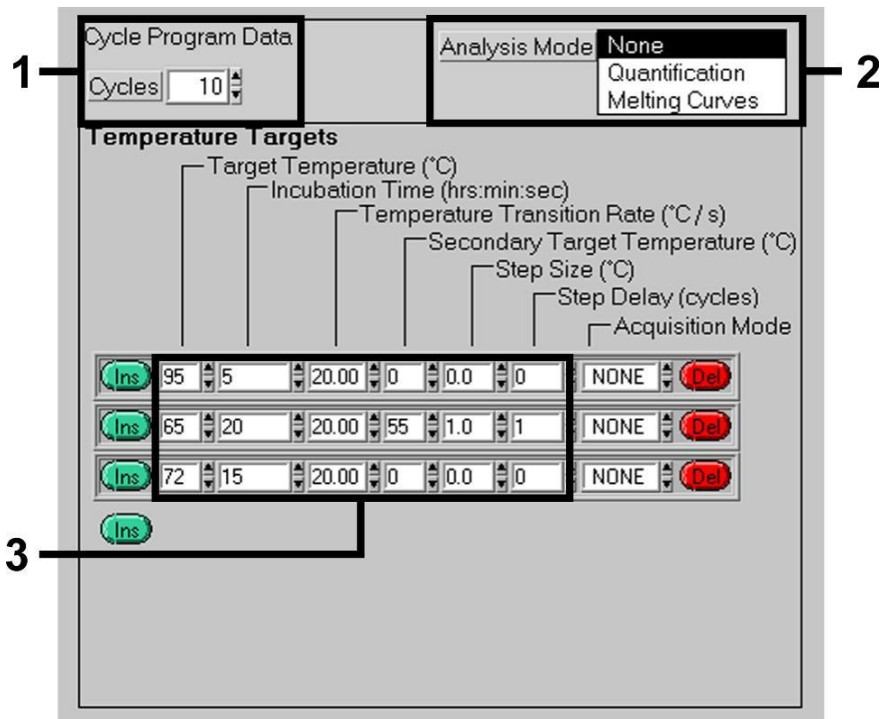


Fig. 4: Paso Touch Down.

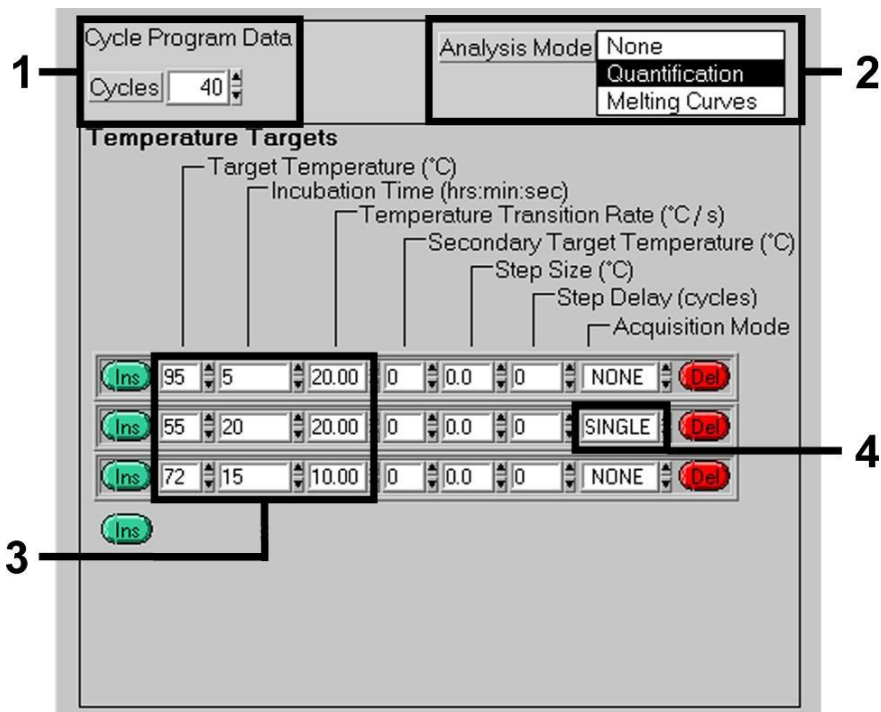


Fig. 5: Amplificación del ADN.

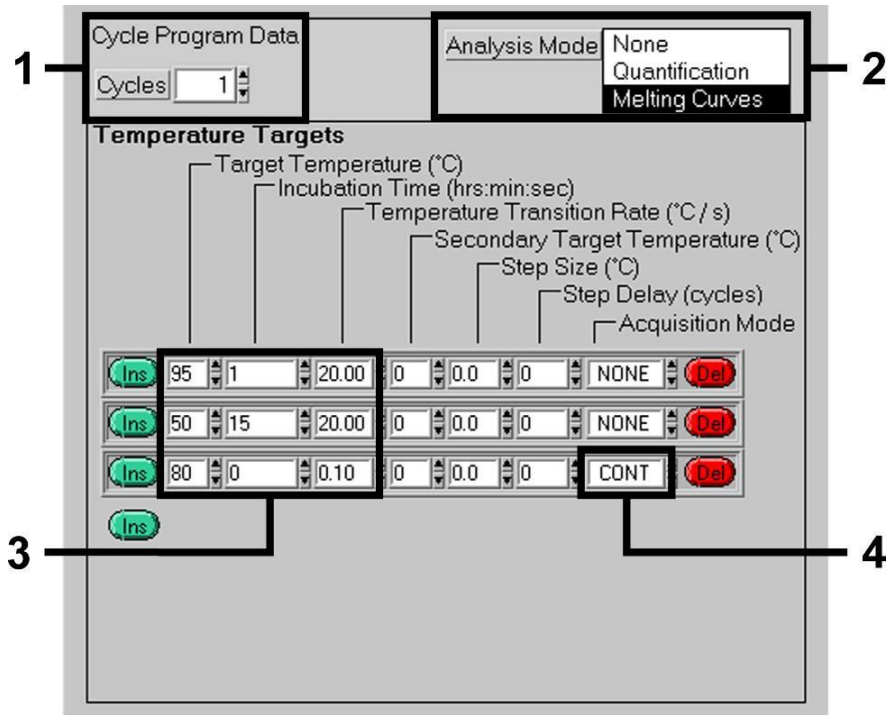


Fig. 6: Curva de melting.

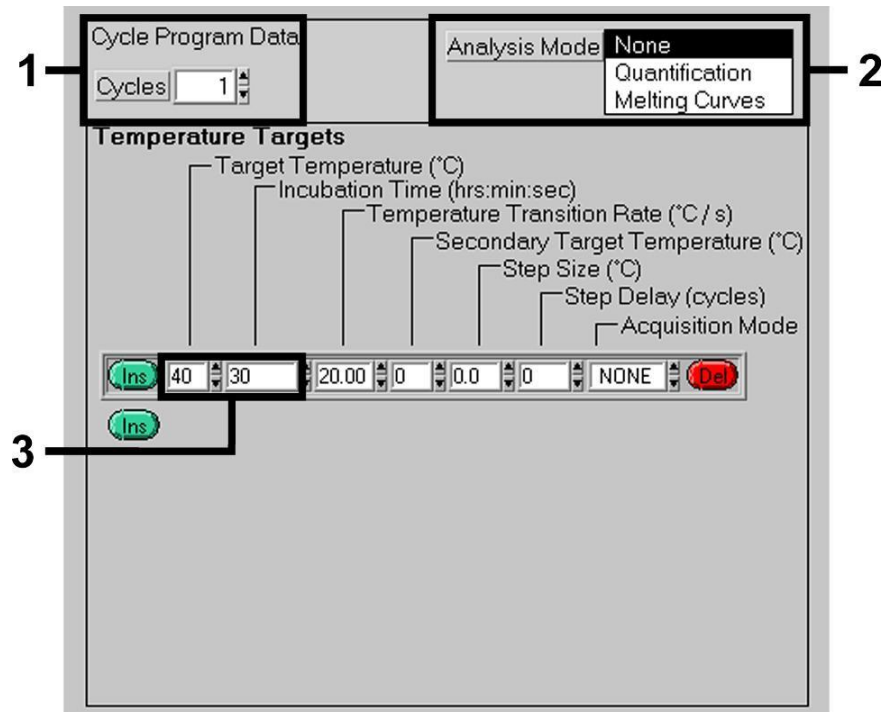


Fig. 7: Refrigeración.

8.5.2 Programación del sistema *LightCycler 2.0*

Para programar un ensayo de PCR con el sistema *LightCycler 2.0*, por favor active la opción *New* en el menú principal y seleccione *LightCycler Experiment*.

A continuación, para la detección del ADN de VZV cree un perfil de temperatura en su sistema *LightCycler 2.0* acorde con los pasos siguientes (véase Tabla 1).

- A. Activación inicial de la enzima Hot Start
- B. Paso Touch Down
- C. Amplificación del ADN
- D. Curva de *melting* (**opcional**)
- E. Refrigeración

La programación del paso D curva de *melting* es **opcional**. Es necesario exclusivamente para diferenciar entre HSV-1 y HSV-2 en caso de emplear simultáneamente el *artus VZV LC PCR Kit*.

Asegúrese de introducir previamente el número de capilares para el ensayo de PCR (*Max. Seek Pos*, véase Fig. 8).

Tabla 1: Creación del perfil de temperatura.

Program	Target [°C]	Hold [hh:mm:ss]	Ramp Rate [°C/s]	Sec Target	Step Size [°C]	Step Delay [cycles]	Acq. Mode	Cycles	Analysis Mode
Activación	95	00:10:00	20	0	0	0	None	1	None
Paso 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		
Amplificación del ADN	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		
Curva de <i>melting</i>	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.		
Refrigeración	40	00:00:30	20	0	0	0	None	1	None

Para introducir las especificaciones de cada muestra, por favor active el botón *Samples* .

- En la ventana *Capillary View* introduzca primero el número total de muestras en el ensayo de PCR (*Sample Count*).
- Ahora puede asignar nombres a cada una de las muestras bajo la opción *Sample Name*.
- Bajo *Selected Channels*, seleccione los canales de fluorescencia 530 para la detección de la PCR analítica de VZV y 705 para la detección del *Control interno*.
- Para definir los estándares y asignar las concentraciones correspondientes, por favor seleccione la opción *Absolute Quantification* bajo la opción *Analysis Type* (véase **8.3 Cuantificación**).
- Asegúrese de que la opción *Enable Controls* no está activada. De otro modo la selección de opciones en el análisis de datos queda restringida (no se dispone de la opción *Fit Points*, véase **9.2 Análisis de datos de la PCR con el sistema LightCycler 2.0**). Bajo la opción *Target Name* se puede asignar la categoría de cada muestra a analizar (VZV o *Control interno*) a un determinado canal de fluorescencia seleccionado 530 y 705. Para facilitar la introducción de los datos en la columna *Target Name* puede usarse la función *Auto Copy...* La opción *Target Name* ayuda a tener una mejor visión general del ensayo pero no es estrictamente necesaria para el análisis de los datos.
- Para generar una curva estándar para el análisis de datos, los *Estándares de cuantificación* deben definirse con su concentración correspondiente. Por lo tanto seleccione por favor *Standard* bajo la opción *Sample Type* e introduzca la concentración correspondiente para cada estándar en la opción *Concentration*.
- La programación del perfil de temperatura puede grabarse en el disco duro del ordenador y así poder utilizarlo en ensayos posteriores. Para ello, active la función *Save As....* bajo el menú *File*, tras lo cual aparece una nueva ventana. Por favor seleccione bajo *Templates and Macros*, el submenú *Run Templates* y salve los datos bajo un nombre concreto.

- Para empezar el ensayo de PCR, seleccione la opción *Run* y active la función *Start Run* (véase la Fig. 8). El programa de PCR empezará tras haber especificado donde se guardarán los datos.

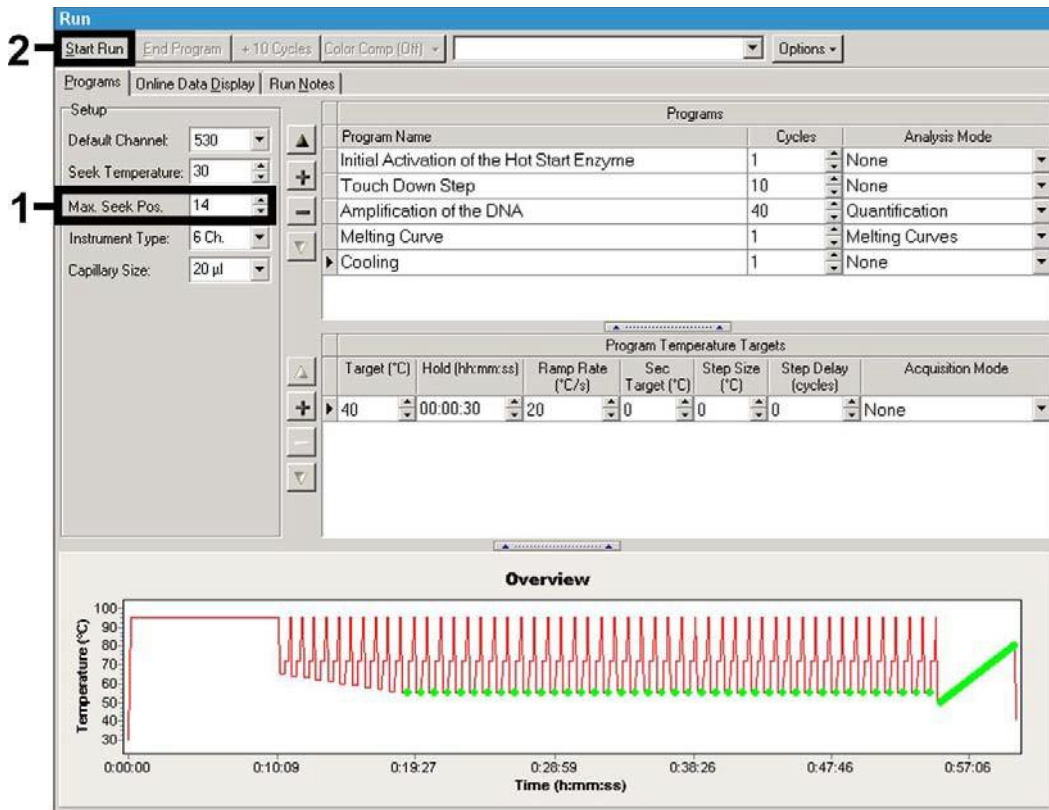


Fig. 8: Comienzo del ensayo de PCR.

9. Análisis

9.1 Análisis de los datos de la PCR con los sistemas LightCycler 1.1/1.2/1.5

Para el análisis de los datos de la PCR recogidos con los sistemas *LightCycler 1.1/1.2/1.5*, recomendamos el uso del *LightCycler Software Version 3.5*.

Durante los análisis con diferentes fluorocromos se producen interferencias entre los canales del fluorímetro. El software de los sistemas *LightCycler*[®] 1.1/1.2/1.5 contiene un archivo llamado *Color Compensation File* para compensar estas interferencias. Abra este archivo en el transcurso o al final de la reacción de PCR activando *Choose CCC File* o pulsando *Select CC Data*. Si no se encuentra instalado ningún *Color Compensation File*, créelo usted mismo, pero por favor siguiendo las instrucciones del *LightCycler Operator's Manual*. Después de la activación del *Color Compensation File* aparecen en los canales fluorimétricos F1, F2 y F3 señales separadas. Para el análisis del resultado de la PCR usando el *artus VZV LC PCR Kit* seleccione por favor F1/F2 para la PCR del VZV y en el caso del análisis de la PCR del *Control interno*, F3/Back-F1. Para el análisis de series cuantitativas preste atención a la sección **8.3 Cuantificación**, así como a la **Technical Note for quantitation on the *LightCycler 1.1/1.2/1.5* Instrument** en www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

Si tuviera que integrar más de un sistema *Herpes-artus* en la serie, preste atención, analice las muestras de VZV por separado. Seleccione para ello las posiciones correspondientes del rotor para el análisis de los datos.

Pueden obtenerse los siguientes resultados:

1. Se detecta una señal en el canal fluorimétrico F1/F2.

El resultado del análisis es positivo: La muestra contiene ADN del VZV.

En este caso, la detección de la señal en el canal F3/Back-F1 es irrelevante, ya que elevadas concentraciones del ADN del VZV (señal positiva en el canal F1/F2) pueden conducir a la reducción o ausencia de la señal fluorescente del *Control interno* (en el canal F3/Back-F1). Esto se debe a fenómenos de competencia.

2. En el canal fluorimétrico F1/F2 no se detecta ninguna señal, sólo en el canal F3/Back-F1 (señal del *Control interno*).

En la muestra no se detecta ADN del VZV, por lo que puede considerarse negativa.

En el caso de una PCR negativa del VZV, la señal del *Control interno* detectada excluye la posibilidad de una inhibición de la PCR.

3. No se detecta señal ni en el canal F1/F2 ni en el canal F3/Back-F1.

No es posible realizar el diagnóstico.

Encontrará más información relativa a las causas y soluciones de los problemas en **10. Solución de problemas.**

En las Fig. 9 y Fig. 10 se muestran ejemplos de reacciones positivas y negativas de la PCR.

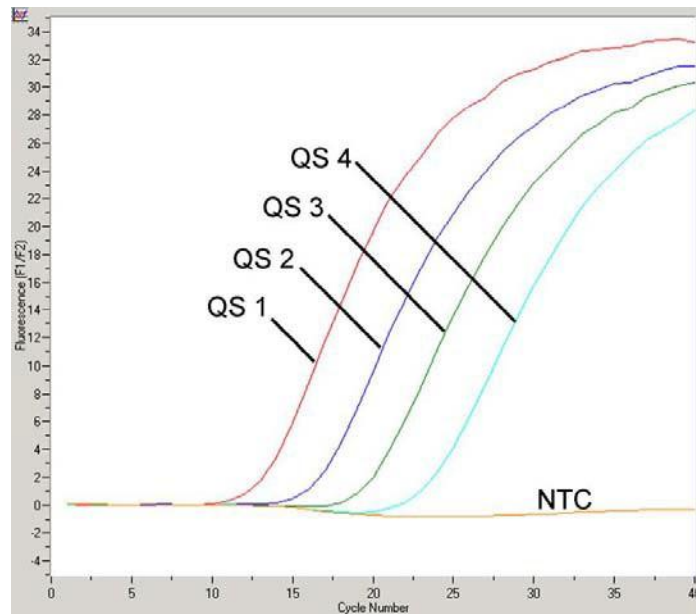


Fig. 9: Detección de los Estándares de cuantificación (VZV LC/TM QS 1 - 4) en el canal fluorimétrico F1/F2 de los sistemas *LightCycler 1.1/1.2/1.5*. NTC: non-template control (control negativo).

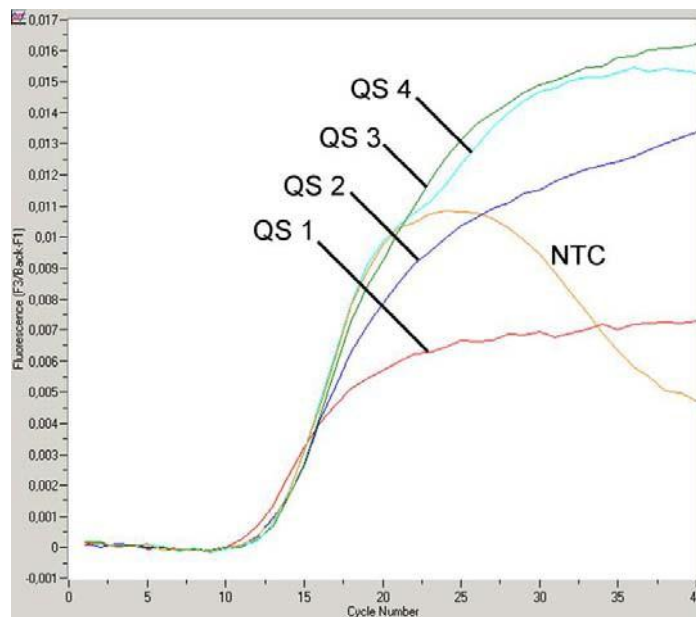


Fig. 10: Detección del Control interno (IC) en el canal fluorimétrico F3/Back-F1 de los sistemas *LightCycler 1.1/1.2/1.5* con amplificación simultánea de los Estándares de cuantificación (VZV LC/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (control negativo). Debido a la limitada compensación de las interferencias pueden producirse superposiciones de las señales del Control interno en F3 por las señales positivas en F1. Por este motivo, no es posible el análisis de las señales del Control interno (F3) para muestras altamente positivas y para los controles.

9.2 Análisis de los datos de la PCR con el sistema LightCycler 2.0

Para el análisis de los datos de la PCR recogidos con el sistema *LightCycler 2.0*, utilice por favor el *LightCycler Software Version 4.0*. Por favor tenga en cuenta las especificaciones señaladas en el *LightCycler 2.0 Instrument Operator's Manual Version 4.0*.

Para el análisis de los datos de la PCR, por favor proceda como se muestra a continuación (véase la Fig. 11):

- Active por favor la función *Analysis* en el menú principal y seleccione la opción *Absolute Quantification*. Como norma general, todos los datos de la amplificación de ácidos nucleicos generados con los *artus LC PCR Kit* deben ser analizados con esta función.
- El *LightCycler Software Version 4.0* contiene un archivo denominado *Color Compensation File* que compensa las interferencias que se producen entre los canales de fluorescencia. Abra este archivo durante o después del ensayo de PCR activando la opción *Color Comp (On/Off)* y a continuación el botón *Select Color Compensation* (véase la Fig. 11). Si no se encuentra instalado ningún *Color Compensation File*, créelo usted mismo, pero por favor siguiendo las instrucciones del *LightCycler Operator's Manual*.
- Después de la activación del *Color Compensation File* aparecen en los canales de fluorescencia señales separadas. Para el análisis del resultado de la PCR usando el *artus VZV LC PCR Kit* seleccione por favor 530/640 para la PCR analítica de VZV y en el caso del análisis de la PCR del *Control interno*, 705/Back 530.

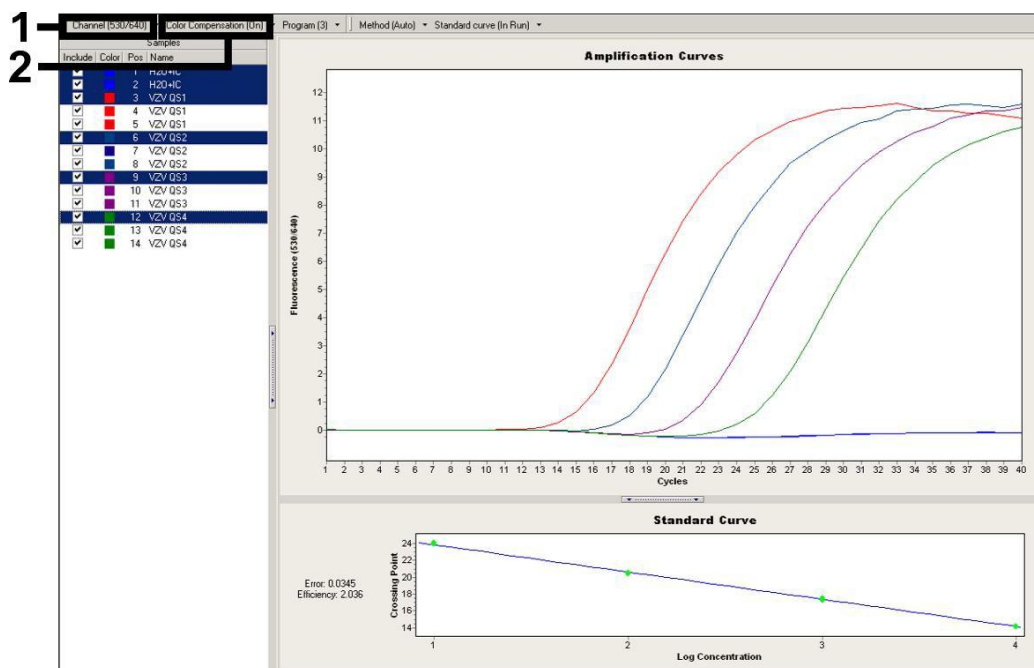


Fig. 11: Activación del *Color Compensation File* y selección del canal de fluorescencia.

Para el análisis de series cuantitativas preste atención a la sección **8.3 Cuantificación**, así como a la **Technical Note for quantitation on the LightCycler 1.1/1.2/1.5 or LightCycler 2.0 Instrument** en www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

Una vez realizados los ajustes necesarios, es posible obtener los siguientes resultados:

1. Se detecta una señal en el canal de fluorescencia 530/640.

El resultado del análisis es positivo: La muestra contiene ADN del VZV.

En este caso, la detección de la señal en el canal 705/Back 530 es irrelevante, ya que elevadas concentraciones del ADN del VZV (señal positiva en el canal 530/640) pueden conducir a la reducción o ausencia de la señal fluorescente del *Control interno* (en el canal 705/Back 530). Esto se debe a fenómenos de competencia.

2. En el canal de fluorescencia 530/640 no se detecta ninguna señal, sino sólo en el canal 705/Back 530 (señal del *Control interno*).

En la muestra no se detecta ADN del VZV, por lo que puede considerarse negativa.

En el caso de una PCR negativa del VZV, la señal del *Control interno* detectada excluye la posibilidad de una inhibición de la PCR.

3. No se detecta señal en el canal 530/640 ni en el canal 705/Back 530.

No es posible realizar el diagnóstico.

Encontrará más información relativa a las causas y soluciones de los problemas en

10. Solución de problemas.

En las Fig. 12 y Fig. 13 se muestran ejemplos de reacciones positivas y negativas de la PCR.

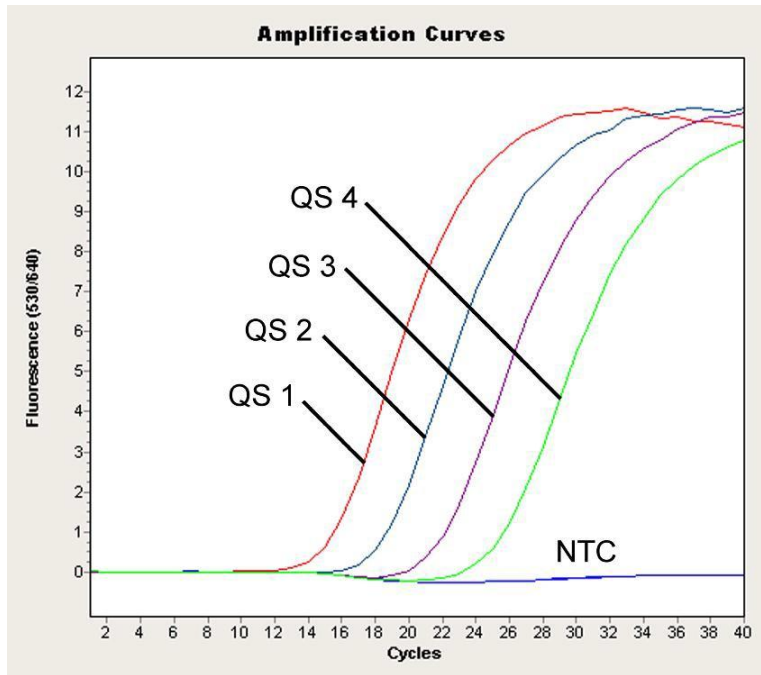


Fig. 12: Detección de los Estándares de cuantificación (VZV LC/TM QS 1 - 4) en el canal de fluorescencia 530/640 del sistema *LightCycler 2.0*. NTC: non-template control (control negativo).

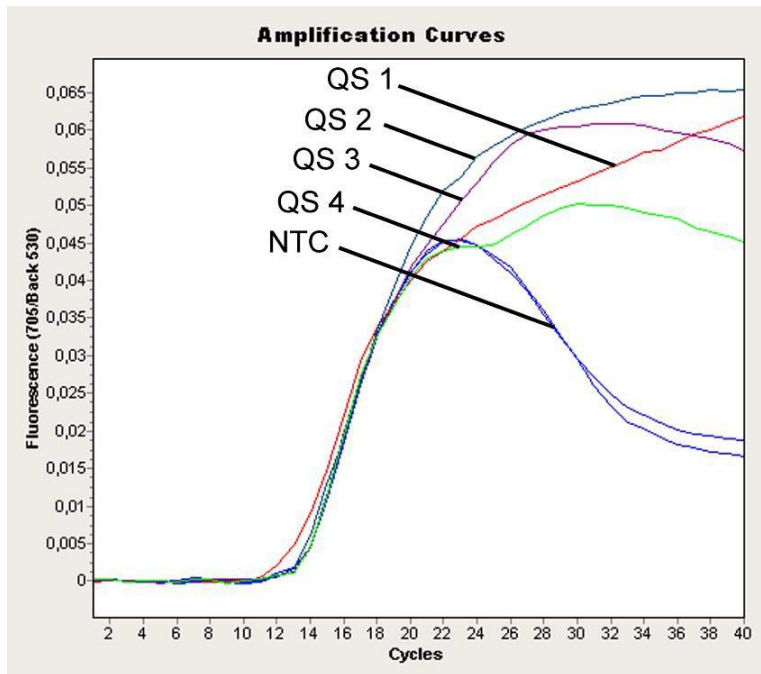


Fig. 13: Detección del Control interno (IC) en el canal de fluorescencia 705/Back 530 del sistema *LightCycler 2.0* con amplificación simultánea de los Estándares de cuantificación (VZV LC/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (control negativo).

10. Solución de problemas

Ausencia de señal en los controles positivos (VZV LC/TM QS 1 - 4) en el canal de fluorescencia F1/F2 ó 530/640:

- La selección de los canales de fluorescencia para el análisis de la PCR no se corresponde con el protocolo.
 - ❖ Seleccione el canal de fluorescencia F1/F2 ó 530/640 para el análisis de la PCR del VZV y el canal de fluorescencia F3/Back-F1 ó 705/Back 530 para la PCR del *Control interno*.
- La programación del perfil de temperatura en los sistemas *LightCycler 1.1/1.2/1.5* o *LightCycler 2.0* no se llevó a cabo correctamente.
 - ❖ Compruebe el perfil de temperatura de acuerdo a las instrucciones del protocolo (véase **8.5 Programación de los sistemas *LightCycler***).
- La preparación de la PCR no se llevó a cabo correctamente.
 - ❖ Compruebe el esquema de trabajo de acuerdo a las instrucciones del protocolo (véase **8.4 Preparación de la PCR**) y repita de nuevo la PCR si es necesario.
- No se tuvieron en cuenta las condiciones de almacenamiento de uno o más componentes del kit detalladas en **2. Almacenamiento** o el *artus VZV LC PCR Kit* ha caducado.
 - ❖ Por favor compruebe las condiciones de almacenamiento así como la fecha de caducidad de los componentes (compruebe la etiqueta del kit) y use un nuevo kit si es necesario.

Señal débil o ausente del *Control interno* en el canal de fluorescencia F3/Back-F1 ó 705/Back 530 con ausencia simultánea de señal en el canal F1/F2 ó 530/640:

- Las condiciones de la PCR no se ajustan al protocolo.
 - ❖ Compruebe las condiciones de la PCR (véase arriba) y repita la PCR si es necesario después de haber corregido los parámetros.
- La PCR experimentó una inhibición.

- ◆ Asegúrese de que está utilizando uno de los métodos de purificación recomendados (véase **8.1 Purificación del ADN**) y siga exactamente las instrucciones del fabricante.
- ◆ Asegúrese de que durante la purificación del ADN se ha realizado el paso adicional de centrifugación para eliminar los restos de etanol antes de realizar la elución (véase **8.1 Purificación del ADN**).
- Se producen pérdidas de ADN durante la purificación.
 - ◆ Si el *Control interno* se ha añadido durante la purificación, la falta de señal del *Control interno* puede indicar que se producen pérdidas de ADN durante la purificación. Asegúrese de que está utilizando uno de los métodos de purificación recomendados (véase **8.1 Purificación del ADN**) y siga exactamente las instrucciones del fabricante.
- No se tuvieron en cuenta las condiciones de almacenamiento de uno o más componentes del kit detalladas en **2. Almacenamiento** o el *artus VZV LC PCR Kit* ha caducado.
 - ◆ Por favor compruebe las condiciones de almacenamiento así como la fecha de caducidad (compruebe la etiqueta del kit) de los componentes y use un nuevo kit si es necesario.

Señales en los controles negativos de la PCR analítica en el canal de fluorescencia F1/F2 ó 530/640:

- Se produjo una contaminación durante la preparación de la PCR.
 - ◆
 - ◆ Cierre los capilares lo antes posible después de haber pipeteado las muestras a analizar.
 - ◆
 - ◆ Asegúrese de que tanto la zona como el material de trabajo se descontaminan regularmente.
- Se produjo una contaminación durante la purificación.
 - ◆ Repita de nuevo la purificación y la PCR de las muestras a analizar con componentes nuevos.
 - ◆ Asegúrese de que tanto la zona como el material de trabajo se descontaminan regularmente.

Para cualquier duda o consulta, póngase por favor en contacto con nuestro servicio técnico.

11. Especificaciones

11.1 Sensibilidad analítica

Para determinar la sensibilidad analítica del *artus* VZV LC PCR Kit en combinación con los sistemas *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 se realizaron diluciones seriadas de un estándar de 60 a nominal 0,019 copias equivalentes*/ μl del VZV y se analizaron con el *artus* VZV LC PCR Kit. Los ensayos se realizaron en tres días diferentes por octuplicado. Los resultados se determinaron mediante un análisis Probit cuyo análisis gráfico se muestra en la Fig. 14. El límite de detección del *artus* VZV LC PCR Kit en combinación con los sistemas *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 es de 0,8 copias/ μl ($p = 0,05$). Esto significa que hay un 95 % de posibilidades de que se detecten 0,8 copias/ μl .

Análisis Probit: Virus varicela zoster (*LightCycler*1.1/1.2/1.5)

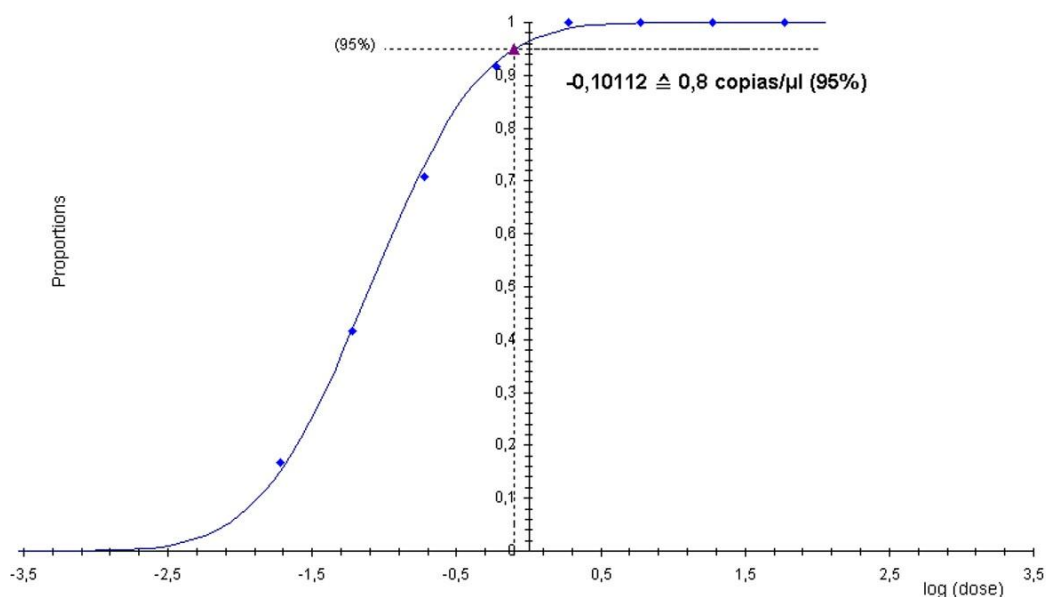


Fig. 14: Sensibilidad analítica del *artus* VZV LC PCR Kit en combinación con los sistemas *LightCycler* 1.1/1.2/1.5.

* El estándar que se utiliza en este caso es un producto de PCR clonado, cuya concentración se ha determinado por absorción y espectroscopia de fluorescencia.

11.2 Especificidad

La esmerada selección de los cebadores y las sondas junto con las más rigurosas condiciones de reacción garantizan la especificidad del *artus* VZV LC PCR Kit. Los cebadores y las sondas se controlaron mediante un análisis de comparación de secuencias en cuanto a posibles homologías con otras secuencias publicadas en diferentes bancos de datos. De este modo, se asegura también la detectabilidad de todos los subtipos y genotipos relevantes.

La especificidad fue evaluada con 30 muestras de líquido cefalorraquídeo distintas negativas para el VZV. Éstas no generaron ninguna señal con los cebadores ni con las sondas específicas del VZV incluidos en la *VZV LC Master*.

Para determinar la ausencia de reactividad cruzada del *artus* VZV LC PCR Kit con respecto a las especies íntimamente relacionadas, se llevó a cabo un análisis de las reacciones cruzadas de un grupo control, como se muestra en Tabla 1. Ninguno de los agentes patógenos sometidos a la prueba resultó reactivo.

Tabla 1: Análisis de la reactividad cruzada del kit con diferentes patógenos.

Grupo de control	VZV (F1/F2 ó 530/640)	Control interno (F3/Back-F1 ó 705/Back)
Herpesvirus humano tipo 1 (Virus Herpes simplex tipo 1)	-	+
Herpesvirus humano tipo 2 (Virus Herpes simplex tipo 2)	-	+
Herpesvirus humano tipo 4 (Virus Epstein-Barr)	-	+
Herpesvirus humano tipo 5 (Cytomegalovirus)	-	+
Herpesvirus humano tipo 6A	-	+
Herpesvirus humano tipo 6B	-	+
Herpesvirus humano tipo 7	-	+
Herpesvirus humano tipo 8 (Herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi)	-	+

11.3 Precisión

Los datos de precisión para el *artus* VZV LC PCR Kit se obtuvieron utilizando los sistemas *LightCycler 1.1/1.2/1.5* y permiten la determinación de la varianza total del ensayo. Esta varianza total consiste en la determinación de la **variabilidad intra-ensayo** (variabilidad entre muestras de igual concentración dentro de un ensayo), la **variabilidad inter-ensayo** (variabilidad interna del laboratorio debido al empleo por parte de distintas personas de distintos aparatos del mismo tipo) y la **variabilidad inter-lotes** (variabilidad debido a la utilización de distintos lotes). Los datos obtenidos se utilizan para calcular la desviación estándar, la varianza y el coeficiente de variación tanto para la PCR específica del patógeno como para la del *Control interno*.

Estos datos se determinaron para *artus* VZV LC PCR Kit utilizando el *Estándar de cuantificación* de menor concentración (QS 4; 10 copias/ μ l). Los análisis se realizaron por octuplicado. El análisis de los datos se realizó en base a los valores de Ct de las curvas de amplificación (Ct: *threshold cycle*, Tabla 2) y de los datos cuantitativos obtenidos en copias/ μ l (Tabla 3). Acorde con estos resultados, la dispersión total de una muestra cualquiera de concentración dada es 0,88 % (Ct) o 11,40 % (concentración). En el caso de la detección del *Control interno* es 1,26 % (Ct). Estos valores se basan en el conjunto de todos los valores individuales de las variabilidades determinadas.

Tabla 2: Datos de precisión basados en los valores de Ct.

	Desviación estándar	Varianza	Coefficiente de variabilidad [%]
Variabilidad intra-ensayo: VZV LC/TM QS 4	0,21	0,04	0,89
Variabilidad intra-ensayo: Control interno	0,04	0,00	0,33
Variabilidad inter-ensayo: VZV LC/TM QS 4	0,17	0,03	0,75
Variabilidad inter-ensayo: Control interno	0,09	0,01	0,69
Variabilidad inter-lotes: VZV LC/TM QS 4	0,21	0,04	0,89
Variabilidad inter-lotes: Control interno	0,15	0,02	1,16
Varianza total: VZV LC/TM QS 4	0,21	0,04	0,88
Varianza total: Control interno	0,16	0,03	1,26

Tabla 3: Datos de precisión basados en los valores cuantitativos (en copias/ μ l).

	Desviación estándar	Varianza	Coefficiente de variabilidad [%]
Variabilidad intra-ensayo: VZV LC/TM QS 4	1,33	1,77	13,19
Variabilidad inter-ensayo: VZV LC/TM QS 4	0,97	0,94	9,66
Variabilidad inter-lotes: VZV LC/TM QS 4	1,29	1,67	12,83
Varianza total: VZV LC/TM QS 4	1,15	1,32	11,40

11.4 Robustez

El análisis de la robustez permite la determinación de la tasa de error total del *artus* VZV LC PCR Kit. Para ello, 30 muestras de líquido cefalorraquídeo negativas para el VZV fueron mezcladas con 2,1 copias/ μ l por volumen de elución del ADN Control del VZV (tres veces la concentración del límite de sensibilidad). Tras la purificación usando QIAamp DNA Mini Kit (ver capítulo 8.1 Purificación del ADN) las muestras fueron analizadas con el *artus* VZV LC PCR Kit. Para todas las muestras del VZV la tasa de error fue del 0 %. La robustez del *Control interno* fue determinado adicionalmente mediante la purificación y el análisis de 30 muestras de LCR negativas para el VZV. La tasa de error total fue del 0 %. No se detectaron inhibiciones. Por lo tanto, la robustez del *artus* VZV LC PCR Kit es de ≥ 99 %.

11.5 Reproducibilidad

Los datos de la reproducibilidad sirven para una valorización regular del rendimiento del *artus* VZV LC PCR Kit, así como para su comparación con otros productos. Estos datos se obtienen mediante la participación en ensayos de intercomparación.

11.6 Evaluación diagnóstica

El *artus* VZV LC PCR Kit sigue siendo evaluado en diversos estudios.

12. Limitaciones en la utilización del producto

- Todos los reactivos deben utilizarse exclusivamente para el diagnóstico in vitro.
- El producto sólo debe ser utilizado por personal cualificado y con la formación necesaria para realizar diagnósticos in vitro (EN375).
- Es imprescindible cumplir con el protocolo para conseguir resultados de la PCR óptimos.
- Preste atención a las fechas de caducidad que aparecen en la caja y en las etiquetas de cada uno de los componentes. No utilice reactivos caducados.

13. Información de seguridad

Información de seguridad respecto al *artus* VZV LC PCR Kit puede encontrarla en la hoja de seguridad (safety data sheets, SDS). Puede descargar dicha hoja en cómodo formato PDF bajo la dirección www.qiagen.com/safety.

14. Control de calidad

En conformidad con la certificación ISO 9001 e ISO 13485 del sistema de gestión de la calidad de QIAGEN, cada lote del *artus* VZV LC PCR Kit fue testado respecto a especificaciones establecidas para garantizar la calidad constante del producto.

15. Bibliografía

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

16. Explicación de los símbolos



Fecha de caducidad



Número de lote



Fabricante



Número de catálogo



Número del manual de uso



Manual de uso



Dispositivo medico de diagnostic in vitro



Número mundial de artículo comercial



<N>

Contiene suficiente para <N> tests



Límite de temperatura

QS

Estándar de cuantificación

IC

Control interno

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



