

Dicembre 2014

Manuale del kit *artus*[®] HBV RG PCR

 24 (cat. n. 4506263)
 96 (cat. n. 4506265)

Versione 1

IVD

Diagnostica quantitativa in vitro

Per l'uso con strumenti Rotor-Gene[®] Q

CE
0197

REF

4506263, 4506265

HB

1046920IT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

GERMANIA

R4

MAT

1046920IT



Sample & Assay Technologies

QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN è un fornitore leader nel settore delle tecnologie innovative per campioni e test che consentono di isolare e rilevare il contenuto di qualunque campione biologico. I nostri prodotti e i nostri servizi di alta qualità sono una garanzia di successo, dall'analisi del campione al risultato.

QIAGEN pone nuovi standard:

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

Il nostro obiettivo è il vostro successo. Per ulteriori informazioni, visitate il sito www.qiagen.com.

Indice	
Contenuto del kit	6
Simboli	6
Conservazione	7
Uso previsto	7
Limiti per l'uso del prodotto	7
Avvertenze e precauzioni	8
Controllo di qualità	8
Introduzione	9
Principio	9
Informazioni sull'agente patogeno	9
Caratteristiche delle prestazioni	10
Attrezzature e reagenti forniti dall'operatore	19
Note importanti	20
Precauzioni generali	20
Prelievo, conservazione e trasporto dei campioni	20
Estrazione del DNA	22
Controllo interno	22
Impostazione della soglia per l'analisi PCR	23
Quantificazione	23
Protocollo: PCR e analisi dei dati	25
Guida alla risoluzione dei problemi	35
Riferimenti citati	38
Informazioni per gli ordini	39

Contenuto del kit

artus HBV RG PCR Kit			(24)	(96)
N° di catalogo			4506263	4506265
N° di reazioni			24	96
Blu	HBV RG/TM Master		2 x 12 reazioni	8 x 12 reazioni
Rosso	HBV RG/TM QS 1* (1 x 10 ⁵ UI/μl)	QS	200 μl	200 μl
Rosso	HBV RG/TM QS 2* (1 x 10 ⁴ UI/μl)	QS	200 μl	200 μl
Rosso	HBV RG/TM QS 3* (1 x 10 ³ UI/μl)	QS	200 μl	200 μl
Rosso	HBV RG/TM QS 4* (1 x 10 ² UI/μl)	QS	200 μl	200 μl
Rosso	HBV RG/TM QS 5* (1 x 10 ¹ UI/μl)	QS	200 μl	200 μl
Verde	HBV RG/TM IC [†]	IC	1.000 μl	2 x 1.000 μl
Bianco	Acqua (grado PCR)		1.000 μl	1.000 μl
	Manuale		1	1

* Standard di quantificazione.

† Controllo interno.

Simboli



<N>

Contenuto sufficiente per <N> test



Data di scadenza



Dispositivo medico per diagnostica in vitro



Numero di catalogo



Numero di lotto



Numero di materiale

	Componenti
	Contiene
	Numero
	Codice GTIN
	Limite di temperatura
	Produttore
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Nota importante

Conservazione

I componenti del kit *artus* HBV RG PCR devono essere conservati ad una temperatura compresa tra -15°C e -30°C e sono stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Evitare di scongelarli e ricongelarli più di due volte, perché ciò potrebbe ridurre la sensibilità del test. Se si prevede un uso intermittente dei reagenti, congelarli in aliquote. La conservazione a $2-8^{\circ}\text{C}$ non deve superare un periodo di 5 ore.

Uso previsto

Il kit *artus* HBV RG PCR è un sistema in vitro per l'amplificazione degli acidi nucleici utilizzato per quantificare il DNA del virus dell'epatite B (HBV) nel plasma umano. Questo kit diagnostico utilizza la reazione a catena della polimerasi (PCR) ed è configurato per gli strumenti Rotor-Gene Q.

Limiti per l'uso del prodotto

L'uso di tutti i reagenti è riservato esclusivamente alla diagnostica in vitro.

L'utilizzo è consentito soltanto a personale dotato delle necessarie conoscenze e competenze in merito alle procedure della diagnostica in vitro.

Per ottenere risultati PCR ottimali è assolutamente necessario attenersi al protocollo.

Rispettare le date di scadenza dei singoli componenti, riportate sulla confezione e sulle etichette. Non utilizzare reagenti scaduti.

Sebbene accada raramente, eventuali mutazioni nelle regioni altamente conservate del genoma virale coperte dai primer e/o dalla sonda del kit possono essere causa di una sotto-quantificazione o perfino della mancata individuazione del virus. La validità e le prestazioni del kit vengono revisionate ad intervalli regolari.

Avvertenze e precauzioni

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per ulteriori informazioni, consultare le appropriate schede di sicurezza (SDS). Le schede SDS, nel pratico e compatto formato PDF, sono disponibili online all'indirizzo www.qiagen.com/safety. Qui è possibile trovare, visualizzare e stampare la scheda SDS per ciascun kit QIAGEN® e i relativi componenti.

Smaltire i campioni e i residui dei test secondo le locali disposizioni in materia di sicurezza.

Controllo di qualità

In conformità con il sistema di gestione per la qualità di QIAGEN certificato ISO ogni lotto del kit *artus* HBV RG PCR è stato testato in base a specifiche prestabilite per garantire la costante qualità del prodotto.

Introduzione

Il kit *artus* HBV RG PCR è un kit pronto all'uso per la rilevazione del DNA di HBV tramite reazione a catena della polimerasi (PCR) sugli strumenti Rotor-Gene Q. L'HBV RG/TM Master contiene reagenti ed enzimi per l'amplificazione specifica di una regione di 134 bp del genoma di HBV, nonché per la rilevazione immediata dell'amplicone specifico nel canale di fluorescenza Cycling Green del Rotor-Gene Q o Rotor-Gene 6000 oppure nel canale Cycling A.FAM™ del Rotor-Gene 3000.

Il kit *artus* HBV RG PCR contiene anche un secondo sistema di amplificazione eterologa per verificare una possibile inibizione della PCR. Questa viene rilevata come controllo interno (IC) nel canale di fluorescenza Cycling Yellow del Rotor-Gene Q o Rotor-Gene 6000 oppure nel canale A.JOE™ del Rotor-Gene 3000. In questo modo non viene ridotto il limite di rilevabilità analitica della PCR di HBV (vedi "Sensibilità analitica", pag. 10). Il kit comprende controlli positivi esterni (HBV RG/TM QS 1-5) che consentono di determinare la quantità del DNA virale. A tale proposito consultare il paragrafo "Quantificazione", pag. 23.

Principio

Per la diagnosi tramite reazione a catena della polimerasi (PCR) vengono amplificate specifiche regioni del genoma dell'agente patogeno. Per la real-time PCR la rilevazione richiede l'impiego di sostanze fluorescenti, di solito legate a sonde oligonucleotidiche, che si legano in modo specifico al prodotto di amplificazione. La rilevazione dell'intensità di fluorescenza durante la real-time PCR consente di identificare e quantificare il prodotto interessato senza dover riaprire le provette di reazione al termine della PCR.*

Informazioni sull'agente patogeno

Il virus dell'epatite B (HBV) è trasmesso prevalentemente tramite il sangue e i suoi derivati. È tuttavia possibile anche l'infezione per via sessuale, orale e perinatale. Dopo un malessere generale, con perdita dell'appetito, vomito e disturbi addominali, il 10-20% circa dei pazienti presenta febbre, esantema e problemi reumatici articolari e muscolari. Dopo 2-14 giorni si sviluppa un ittero che può essere accompagnato da prurito. Nell'1% circa di tutti i pazienti infettati insorge un'epatite fulminante, spesso con esito fatale. Il 5-10% dei pazienti sviluppa un'inflammatione epatica cronica, che può esitare in cirrosi epatica o in carcinoma epatocellulare primario.

* Mackay, I.M. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. **10**, 190.

Caratteristiche delle prestazioni

Sensibilità analitica

Per la convalida del kit *artus* HBV RG PCR sono stati determinati sia il limite di rilevabilità analitico, sia quello analitico considerando l'estrazione (limiti di sensibilità). Il limite di rilevabilità analitico considerando l'estrazione è stato determinato sulla base di campioni clinici HBV-positivi e tenendo conto della procedura di estrazione utilizzata. Il limite di rilevabilità analitico invece è stato determinato senza campioni clinici e indipendentemente dalla procedura di estrazione, ma in base allo standard ad una concentrazione nota.

Per determinare la sensibilità analitica del kit *artus* HBV RG PCR sono state effettuate serie di diluizioni da 10 al valore nominale di 0,0003 UI/ μ l di HBV e poi analizzate con il kit *artus* HBV RG PCR sugli strumenti Rotor-Gene. Le analisi sono state eseguite in 3 giorni diversi su 8 replicati. I risultati sono stati determinati mediante un'analisi probit. Il limite di rilevabilità analitica del kit *artus* HBV RG PCR in combinazione con il Rotor-Gene 3000 è pari a 0,02 UI/ μ l ($p = 0,05$). Ciò significa che la probabilità di rilevare 0,02 UI/ μ l è pari al 95%.

L'equivalenza fra il Rotor-Gene 3000 e il Rotor-Gene Q/6000 è stata dimostrata sulla base delle specifiche tecniche confermate dal confronto delle prestazioni analitiche. Sono state eseguite analisi probit in parallelo su entrambi i sistemi. Il limite di rilevabilità analitica sul Rotor-Gene Q/6000 sta entro l'intervallo di confidenza del Rotor-Gene 3000. Ne consegue che il kit *artus* HBV RG PCR può essere utilizzato per rilevare il DNA di HBV sul Rotor-Gene Q/6000 con analoga sensibilità.

La sensibilità analitica tenendo conto dell'estrazione (kit QIAamp® DSP Virus) del kit *artus* HBV RG PCR è stata determinata utilizzando una serie di diluizioni del 1° Standard Internazionale HBV (OMS) da 158 al valore nominale di 0,4 UI/ml di HBV, aggiunte a campioni clinici di plasma. Queste sono state sottoposte ad estrazione del DNA utilizzando il kit QIAamp DSP Virus (volume di estrazione: 0,5 ml, volume di eluizione: 26 μ l). Ciascuna delle 7 diluizioni è stata analizzata con il kit *artus* HBV RG PCR in 3 giorni diversi su 8 replicati. I risultati sono stati determinati mediante un'analisi probit. La Figura 1 illustra graficamente l'analisi probit. Il limite di rilevabilità analitica tenendo conto dell'estrazione del kit *artus* HBV RG PCR in combinazione con il Rotor-Gene 3000 è pari a 3,8 UI/ml ($p = 0,05$). Ciò significa che esiste una probabilità del 95% che vengano rilevati 3,8 UI/ml.

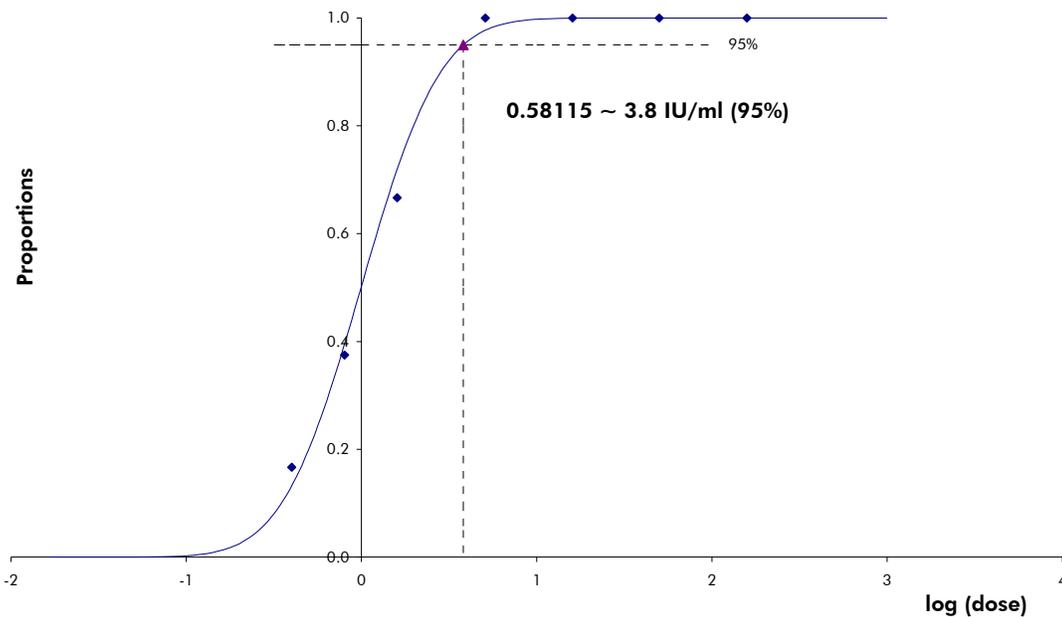


Figura 1. Analisi probit: HBV (Rotor-Gene 3000). Sensibilità analitica tenendo conto dell'estrazione (kit QIAamp DSP Virus, QIAGEN) del kit *artus* HBV RG PCR sul Rotor-Gene 3000.

Specificità

La specificità del kit *artus* HBV RG PCR viene garantita in primo luogo dalla scelta dei primer e delle sonde, nonché dalle condizioni stringenti di reazione. I primer e le sonde sono stati controllati per accertare eventuali omologie con tutte le sequenze pubblicate nelle banche genetiche mediante analisi comparativa delle sequenze. La rilevabilità di tutti i genotipi importanti è stata così assicurata da un allineamento del database e da una PCR eseguita sugli strumenti Rotor-Gene con i seguenti genotipi (vedi Tabella 1).

Tabella 1. Analisi della specificità di genotipi importanti

Virus	Genotipo	Origine	HBV (Cycling Green o A.FAM)	Controllo interno (Cycling Yellow o A. JOE)
HBV	A (USA)	Teragenix*	+	+
HBV	B (Indonesia)	Teragenix	+	+
HBV	C (Indonesia)	Teragenix	+	+
HBV	C (Venezuela)	Teragenix	+	+
HBV	D (USA)	Teragenix	+	+
HBV	E (Costa d'Avorio)	Teragenix	+	+
HBV	F (Venezuela)	Teragenix	+	+
HBV	G (USA)	Teragenix	+	+
HBV	H (Nicaragua)	Teragenix	+	+

* Teragenix Corporation, Florida, USA.

Per ulteriori analisi di specificità sono stati impiegati ceppi di HBV con differenze di sequenza note nella regione pre-core del genoma di HBV (HBV Pre-Core Mutant Panel, Teragenix, Florida, USA). Tutti i 9 ceppi mutanti pre-core di questo pool sono stati rilevati con il kit *artus* HBV RG PCR.

Inoltre, la specificità è stata convalidata con 100 diversi campioni di plasma HBV-negativi. Questi campioni non hanno generato segnali con i primer e le sonde di HBV inclusi nell'HBV RG/TM Master.

Una potenziale cross-reattività del kit *artus* HBV RG PCR è stata testata con il gruppo di controllo elencato nella Tabella 2 (pag. 13). Nessuno dei patogeni testati è risultato reattivo. Non sono state riscontrate cross-reattività con infezioni miste.

Intervallo lineare

Il range lineare (misurazione analitica) del kit *artus* HBV RG PCR è stato determinato analizzando una serie di diluizioni di uno standard di quantificazione per HBV con concentrazioni da 1×10^8 UI/ μ l fino a 1×10^{-2} UI/ μ l. La serie di diluizioni è stata prima calibrata contro il 1° Standard Internazionale HBV (OMS).

Ogni livello di diluizione è stato analizzato in replicati (n = 8 per concentrazioni $\geq 1 \times 10^0$ UI/ μ l; n = 16 per concentrazioni $< 1 \times 10^0$ UI/ μ l) con il kit *artus* HBV RG PCR sugli strumenti Rotor-Gene.

Tabella 2. Analisi della specificità del kit con patogeni potenzialmente cross-reattivi

Gruppo di controllo	HBV (Cycling Green o Cycling A.FAM)	Controllo interno (Cycling Yellow o Cycling A.JOE)
Herpesvirus umano 1 (virus dell'herpes simplex 1)	–	+
Herpesvirus umano 2 (virus dell'herpes simplex 2)	–	+
Herpesvirus umano 3 (virus della varicella-zoster)	–	+
Herpesvirus umano 4 (virus di Epstein-Barr)	–	+
Herpesvirus umano 5 (citomegalovirus)	–	+
Herpesvirus umano 6	–	+
Virus dell'immunodeficienza umana 1	–	+
Virus dell'epatite A	–	+
Virus dell'epatite C	–	+
Parvovirus B19	–	+
Virus della febbre gialla	–	+
Virus della leucemia dei linfociti T umana 1 e 2	–	+
Virus Coxsackie B3	–	+
Virus Dengue tipo 1–4	–	+
<i>Escherichia coli</i>	–	+

È stato determinato il range lineare del kit *artus* HBV RG PCR da concentrazioni di 0,02 UI/μl fino ad almeno 1 x 10⁸ UI/μl (Figura 2).

Ipotizzando che venga usato il kit QIAamp DSP Virus per l'estrazione del DNA, il kit *artus* HBV RG PCR copre un range lineare da 1,1 UI/ml ad almeno 4 x 10⁹ UI/ml.

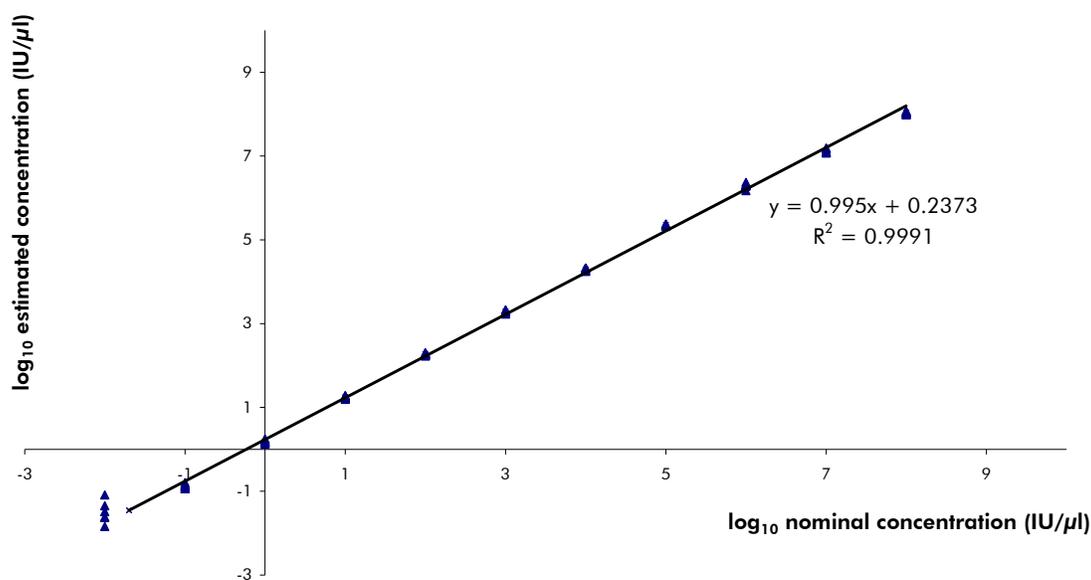


Figura 2. Range lineare del kit *artus* HBV RG PCR. Calcolo del range lineare. La linea retta è stata determinata mediante una regressione lineare del log₁₀ delle concentrazioni calcolate con il log₁₀ delle concentrazioni nominali. La figura mostra l'equazione della linea di regressione.

Precisione

I dati sulla precisione del kit *artus* HBV RG PCR consentono di determinare la varianza totale del sistema di analisi. La varianza totale è costituita dalla variabilità intra-assay (variabilità di risultati multipli di campioni con la stessa concentrazione all'interno di uno stesso esperimento), dalla variabilità inter-assay (variabilità di risultati multipli del test ottenuti su diversi strumenti dello stesso tipo da diversi operatori all'interno dello stesso laboratorio) e dalla variabilità inter-lotto (variabilità di risultati multipli del test ottenuti utilizzando diversi lotti). I dati ottenuti sono stati utilizzati per determinare la deviazione standard, la varianza e il coefficiente di variazione per il patogeno specifico e il controllo interno di PCR.

Questi dati sono stati ottenuti per il kit *artus* HBV RG PCR sulla base dello standard di quantificazione alla minore concentrazione (QS 5; 10 UI/μl). I test sono stati effettuati con 8 replicati. I dati sulla precisione sono stati calcolati

sulla base dei valori C_T delle curve di amplificazione (C_T : ciclo soglia, vedi Tabella 3, pag. 15). Inoltre, i dati sulla precisione per i risultati quantitativi in UI/ μ l sono stati stabiliti utilizzando i corrispondenti valori C_T (Tabella 4). Sulla base di questi risultati, lo scarto statistico generale di un dato campione alla concentrazione menzionata è pari a 1,29% (C_T) o 8,99% (concentrazione), e a 1,87% (C_T) per la rilevazione del controllo interno. Questi valori si basano sulla totalità dei singoli valori delle variabilità stabilite.

Tabella 3. Dati sulla precisione basati sui valori C_T

	Deviazione standard	Varianza	Coefficiente di variazione (%)
Variabilità intra-assay: HBV RG/TM QS 5	0,09	0,01	0,32
Variabilità intra-assay: Controllo interno	0,10	0,01	1,06
Variabilità inter-assay: HBV RG/TM QS 5	0,14	0,02	0,49
Variabilità inter-assay: Controllo interno	0,29	0,08	1,00
Variabilità inter-lotto: HBV RG/TM QS 5	0,38	0,15	1,39
Variabilità inter-lotto: Controllo interno	0,62	0,39	2,23
Varianza totale: HBV RG/TM QS 5	0,36	0,13	1,29
Varianza totale: Controllo interno	0,52	0,27	1,87

Tabella 4. Dati sulla precisione basati sui risultati quantitativi (in UI/ μ l).

	Deviazione standard	Varianza	Coefficiente di variazione (%)
Variabilità intra-assay: HBV RG/TM QS 5	0,93	0,87	9,28
Variabilità inter-assay: HBV RG/TM QS 5	0,79	0,63	7,92
Variabilità inter-lotto: HBV RG/TM QS 5	1,03	1,05	10,21
Varianza totale: HBV RG/TM QS 5	0,90	0,81	8,99

Robustezza

Il controllo della robustezza serve per determinare la percentuale totale di errore del kit *artus* HBV RG PCR. Per verificare la robustezza sono stati aggiunti a 100 campioni di plasma HBV-negativi 0,05 UI/ μ l di volume di eluizione di DNA controllo di HBV (all'incirca tre volte la concentrazione del limite di sensibilità analitica). Dopo l'estrazione con il kit QIAamp DSP Virus (vedi "Estrazione del DNA", pag. 22), questi campioni sono stati analizzati con il kit *artus* HBV RG PCR. Sul totale dei campioni la percentuale di errore per HBV era pari a 0%. La robustezza del controllo interno è stata ulteriormente verificata mediante estrazione ed analisi di 100 campioni di plasma HBV-negativi. La percentuale totale di errore era pari a 0%. Non sono state osservate inibizioni. Pertanto la robustezza del kit *artus* HBV RG PCR è risultata pari al $\geq 99\%$.

Riproducibilità

I dati di riproducibilità vengono rilevati per effettuare una valutazione continua delle prestazioni del kit *artus* HBV RG PCR e anche per un confronto con altri prodotti. Questi dati sono ottenuti dalla partecipazione a programmi di valutazione consolidati.

Valutazione diagnostica

In uno studio condotto presso 2 laboratori indipendenti, il kit *artus* HBV RG PCR è stato confrontato con il COBAS[®] TaqMan[®] HBV Assay. A tale scopo sono stati analizzati in modo retrospettivo e prospettico 287 campioni di plasma.

Il DNA di HBV necessario per il kit *artus* HBV RG PCR è stato estratto utilizzando il kit QIAamp DSP Virus e l'analisi è stata eseguita sullo strumento Rotor-Gene

3000. Per un test comparativo con il COBAS TaqMan HBV Assay, il DNA di HBV è stato estratto secondo le istruzioni del produttore come descritto nel foglietto illustrativo. I risultati ottenuti con il kit *artus* HBV RG PCR sono stati confrontati con quelli del COBAS TaqMan HBV Assay.

Rispetto ai risultati ottenuti con il test di riferimento COBAS TaqMan HBV Assay, con il kit *artus* HBV RG PCR è stata ottenuta una sensibilità diagnostica pari al 100% e una specificità diagnostica pari al 97% per la totalità dei campioni di plasma analizzati. Questi risultati sono riportati nella Tabella 5.

Tabella 5. Risultati dello studio di convalida comparativo

		COBAS TaqMan HBV Assay		
		+	-	Totale
Kit <i>artus</i> HBV RG PCR	+	186	3	189
	-	0	98	98

L'ulteriore analisi dei 3 campioni discordanti ha confermato i risultati del kit *artus* HBV RG PCR. Si può quindi ipotizzare che la discrepanza sia dovuta ad una maggiore sensibilità del kit *artus* HBV RG PCR.

La correlazione dei risultati quantitativi di entrambi i sistemi di analisi è stata analizzata con l'ausilio di una regressione lineare. I risultati di entrambi i kit sono messi a confronto nella Figura 3.

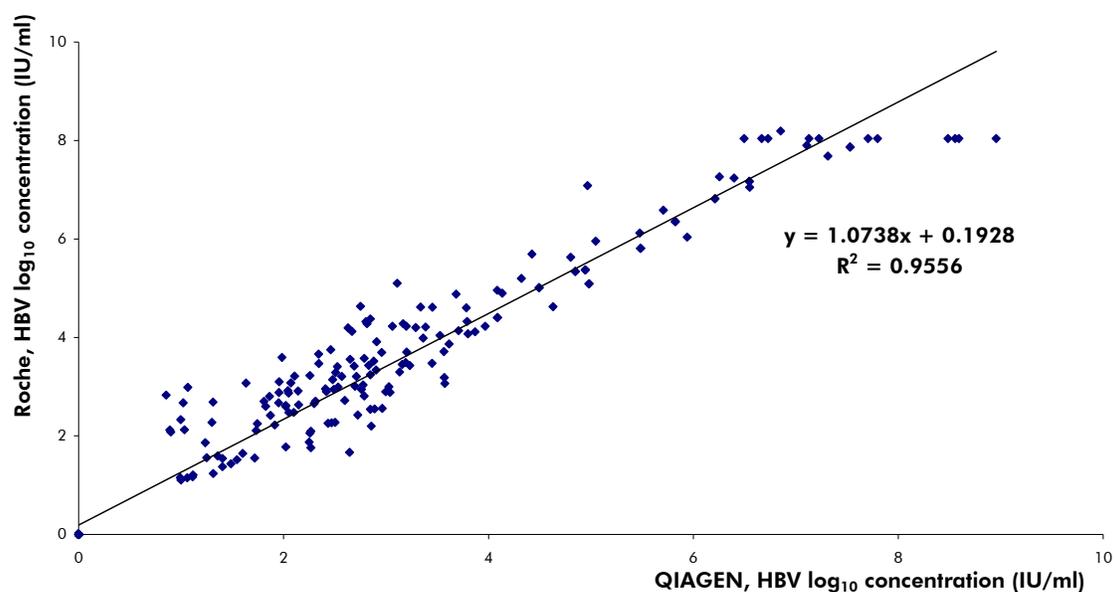


Figura 3. Confronto fra il COBAS TaqMan HBV Assay (Roche, HBV; con estrazione del campione utilizzando il sistema High Pure) e il kit *artus* HBV RG PCR (QIAGEN, HBV;

con estrazione del campione utilizzando il kit QIAamp DSP Virus). La correlazione dei risultati quantitativi di entrambi i sistemi di analisi (Tabella 5) è stata analizzata con l'ausilio di una regressione lineare. I risultati di entrambi i kit sono rappresentati su un diagramma XY (a dispersione) in scala log-log.

Attrezzature e reagenti forniti dall'operatore

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le rispettive schede tecniche di sicurezza (SDS), reperibili presso il fornitore.

- Kit di estrazione del DNA (vedere "Estrazione del DNA", pag. 22)
- Pipette (regolabili)*
- Puntali per pipette sterili con filtri
- Agitatore vortex*
- Centrifuga da banco* con rotore per provette di reazione da 2 ml
- Strumento Rotor-Gene Q o Rotor-Gene* con canali di fluorescenza per Cycling Green e Cycling Yellow oppure con canali di fluorescenza per Cycling A.FAM e Cycling A.JOE
- Software del Rotor-Gene Q versione 1.7.94 (software del Rotor-Gene 6000 versione 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94; software del Rotor-Gene 3000 versione 6.0.23) o superiore
- Provette e tappi per strisce, 0,1 ml, da usare con rotore a 72 pozzetti (cat. n. 981103 o 981106)
- In alternativa: provette PCR, 0,2 ml, da usare con rotore a 36 pozzetti (cat. n. 981005 o 981008)
- Blocco di raffreddamento (blocco di caricamento per 72 provette da 0,1 ml, cat. n. 9018901, o blocco di caricamento per 96 provette da 0,2 ml, cat. n. 9018905)

* Assicurarsi che gli strumenti siano stati revisionati e calibrati secondo le raccomandazioni del produttore.

Note importanti

Precauzioni generali

Chi utilizza il prodotto deve sempre attenersi a quanto segue:

- Utilizzare puntali con filtro sterili per pipette.
- Conservare ed estrarre i materiali positivi (campioni, controlli positivi e ampliconi) separatamente da tutti gli altri reagenti e aggiungerli alla miscela di reazione in un ambiente fisicamente separato.
- Prima dell'inizio del test scongelare tutti i componenti a temperatura ambiente (15-25°C).
- Una volta scongelati, miscelare i componenti (pipettandoli ripetutamente su e giù o in vortex a impulsi) e sottoporli a breve centrifugazione.
- Operare rapidamente tenendo i componenti in ghiaccio o nel blocco di raffreddamento (blocco di caricamento a 72/96 pozzetti).

Prelievo, conservazione e trasporto dei campioni

 Tutti i campioni devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo.

 Secondo alcuni studi attualmente in corso, il plasma trattato con EDTA o con citrato viene considerato il materiale campione più adatto alla rilevazione di HBV. Per questo motivo raccomandiamo l'impiego di questo tipo di campioni con il kit *artus* HBV RG PCR.

La convalida interna del kit *artus* HBV RG PCR è stata eseguita con plasma umano trattato con EDTA. Non sono stati convalidati altri materiali come campioni. Usare solo il kit di estrazione dell'acido nucleico raccomandato (vedi "Estrazione del DNA", pag. 22) per la preparazione dei campioni.

Utilizzando come campioni certi materiali, si dovranno osservare scrupolosamente alcune istruzioni particolari per il prelievo, il trasporto e la conservazione.

Prelievo dei campioni

Ogni prelievo di sangue causa lesioni ai vasi (arterie, vene, capillari). Utilizzare unicamente materiali innocui e sterili. Per il prelievo di sangue sono disponibili appositi materiali monouso. Non utilizzare aghi capillari troppo sottili per la puntura delle vene. Il prelievo di sangue venoso deve essere eseguito in punti appropriati, nella piega del gomito, nell'avambraccio o sul dorso della mano. Il sangue deve essere prelevato con provette standard per campioni (tappo rosso, Sarstedt o provette equivalenti di altra marca). Prelevare un volume di 5–10 ml

di sangue EDTA. Miscelare le provette capovolgendole più volte subito dopo la raccolta del campione (8 x, senza agitare).

i Non usare campioni di soggetti eparinizzati (vedi “Sostanze interferenti”, più sotto).

Conservazione dei campioni

Il sangue intero deve essere separato in plasma e componenti cellulari mediante centrifugazione per 20 minuti a 800–1600 x g entro 6 ore. Il plasma separato deve essere trasferito in provette in propilene sterili. La sensibilità del test può risultare ridotta se si congelano i campioni di routine o li si conserva per un lungo periodo. Il DNA incapsulato nel virus è stabile per alcuni giorni se conservato a 4°C, per alcune settimane se conservato a –20°C e addirittura per mesi e anni se conservato a –70°C.*

Trasporto dei campioni

In linea di principio, i campioni devono essere trasportati in un contenitore idoneo infrangibile. Si evita così il pericolo potenziale d’infezione dovuto a perdite. I campioni devono essere trasportati secondo le norme locali e nazionali per il trasporto di materiali patogeni.†

I campioni devono essere spediti entro 6 ore. Non si consiglia di conservare i campioni nello stesso luogo in cui sono stati prelevati. È possibile spedire i campioni per posta, secondo le norme legali per il trasporto di materiali patogeni. Si consiglia di effettuare il trasporto dei campioni per corriere. I campioni di sangue vanno spediti refrigerati (2–8°C) e il plasma separato surgelato (–15 / –30°C).

Sostanze interferenti

Valori elevati di bilirubina (≤ 15 mg/dl) e di lipidi (≤ 800 mg/dl) e campioni emolitici non influenzano il sistema. L’eparina (≥ 10 UI/ml) influisce sulla PCR. Non si devono utilizzare i campioni raccolti in provette contenenti eparina come anticoagulante. Non si devono utilizzare neppure i campioni di pazienti eparinizzati.

* Arbeitskreis Blut, V17 (09.1997), Gazzetta dell’ufficio federale della sanità 11/1997, p. 452–456.

† International Air Transport Association (IATA) (Associazione Internazionale per il Trasporto Aereo). Dangerous Goods Regulations (Regolamenti relativi alle merci pericolose).

Estrazione del DNA

Il kit QIAamp DSP Virus (QIAGEN, cat. n. 60704) è convalidato per l'estrazione del DNA virale da plasma umano da usare con il kit *artus* HBV RG PCR. Effettuare l'estrazione del DNA seguendo le istruzioni del manuale del kit QIAamp DSP Virus (*QIAamp DSP Virus Kit Handbook*).

i L'aggiunta di carrier RNA è di fondamentale importanza per l'efficacia dell'estrazione e, quindi, per la resa del DNA/RNA. Per ottenere una maggiore stabilità del carrier RNA in dotazione con il kit QIAamp DSP Virus seguire le indicazioni contenute nel manuale d'uso per la ricostituzione e la conservazione del carrier RNA ("Preparazione dei reagenti e dei tamponi").

i Il controllo interno del kit *artus* HBV RG PCR può essere utilizzato direttamente nella procedura di estrazione (vedi "Controllo interno", sotto). Accertarsi di aggiungere durante l'estrazione un campione negativo di plasma. Il segnale proveniente dal controllo interno costituisce la base per la valutazione dell'estrazione.

Controllo interno

Il kit include un controllo interno (HBV RG/TM IC), che permette all'utilizzatore sia di controllare la procedura di estrazione del DNA che di verificare una possibile inibizione della PCR. Per questa applicazione, aggiungere durante l'estrazione il controllo interno in un rapporto di 0,1 μ l per 1 μ l di volume di eluizione. Per esempio, se si utilizza il kit QIAamp DSP Virus, il DNA viene eluito in 60 μ l di tampone di eluizione (AVE). Inizialmente, si devono aggiungere quindi 6 μ l del controllo interno. La quantità di controllo interno impiegato dipende solo dal volume di eluizione.

i Il controllo interno e il carrier RNA (vedi "Estrazione del DNA", pag. 22) devono essere aggiunti esclusivamente alla miscela di tampone di lisi e di campione o direttamente al tampone di lisi.

Il controllo interno non deve essere aggiunto direttamente al campione. Se aggiunta al tampone di lisi, la miscela di controllo interno e di tampone di lisi/carrier RNA va usata immediatamente dopo la sua preparazione (la conservazione della miscela a temperatura ambiente o in frigo può portare già dopo poche ore ad un'anomalia del controllo interno e quindi ad una minore efficacia della procedura di estrazione).

i Non aggiungere il controllo interno e il carrier RNA direttamente al campione.

Si considera riuscita un'estrazione del DNA se il valore C_T del controllo interno di un campione di plasma negativo sottoposto ad estrazione (kit QIAamp DSP

Virus) è pari a 29 ± 3 (soglia: 0,03) utilizzando gli strumenti Rotor-Gene Q. La dispersione indicata è dovuta allo strumento e all'estrazione. Uno scarto maggiore indica problemi nell'estrazione. In questo caso il metodo di estrazione deve essere verificato ed eventualmente convalidato di nuovo. In caso di dubbi o problemi contattare il servizio di assistenza tecnica QIAGEN.

In via opzionale, il controllo interno può essere utilizzato esclusivamente per verificare una possibile inibizione della PCR. Per questa applicazione, aggiungere il controllo interno direttamente all'HBV RG/TM Master, come descritto nella fase 2b del protocollo (pag. 26).

Impostazione della soglia per l'analisi PCR

Le impostazioni ottimali di soglia per una data combinazione dello strumento Rotor-Gene Q e del kit *artus* RG PCR devono essere stabilite empiricamente provando ciascuna singola combinazione, dato che si tratta di un valore relativo che dipende dal flusso di lavoro diagnostico generale. Come punto di partenza si può fissare la soglia ad un valore preliminare di 0,04 per l'analisi della prima PCR, ma questo valore deve essere affinato in un'analisi comparativa dei successivi processi del flusso di lavoro. La soglia deve essere impostata manualmente appena sopra il segnale di background dei controlli negativi e dei campioni negativi. Il valore medio di soglia calcolato da questi esperimenti funzionerà molto probabilmente per la maggioranza dei processi futuri, ma l'utilizzatore dovrà ugualmente rivedere il valore di soglia prodotto ad intervalli regolari. Il valore di soglia sarà normalmente compreso nel range 0,03–0,05 e dovrà essere arrotondato a non più di tre cifre decimali.

Quantificazione

Gli standard di quantificazione in dotazione (HBV RG/TM QS 1–5) vengono trattati come campioni già purificati e se ne utilizza lo stesso volume (20 μ l). Per generare una curva standard sugli strumenti Rotor-Gene Q, tutti i 5 standard di quantificazione devono essere utilizzati e definiti nella finestra di dialogo "Edit Samples" (Modifica campioni) come standard con le concentrazioni specificate (vedi il manuale utente dello strumento).

i Gli standard di quantificazione sono definiti come UI/ μ l.* Per convertire in UI/ml di campione i valori ottenuti con l'aiuto della curva standard, utilizzare la formula seguente:

$$\text{Risultato (UI/ml)} = \frac{\text{Risultato (UI/\mu l)} \times \text{volume di eluizione (\mu l)}}{\text{Volume campione (ml)}}$$

In linea di principio, si deve immettere nell'equazione di cui sopra il volume iniziale del campione. Occorre tenere conto di ciò quando il volume del

campione è stato cambiato prima dell'estrazione dell'acido nucleico (per es. riducendo il volume mediante centrifugazione o aumentandolo con l'aggiunta al volume richiesto per l'estrazione).

* Lo standard è stato calibrato rispetto al 1° Standard Internazionale HBV (OMS).

Protocollo: PCR e analisi dei dati



Punti importanti prima di iniziare

- Prima di avviare la procedura, leggere “Note importanti”, pag 20–23.
- Dedicare il tempo necessario alla familiarizzazione con il Rotor-Gene Q prima di avviare il protocollo. Fare riferimento al manuale utente dello strumento.
- Accertarsi che in ogni PCR siano inclusi almeno uno standard di quantificazione e almeno un controllo negativo (acqua, grado PCR). Per generare una curva standard, utilizzare tutti i 5 standard di quantificazione forniti (HBV RG/TM QS 1–5) per ogni PCR.

Prima di iniziare

- Verificare che il blocco di raffreddamento (accessorio dello strumento Rotor-Gene Q) sia stato preraffreddato a 2–8°C.
- Prima di ogni utilizzo, tutti i reagenti devono essere scongelati completamente, miscelati (pipettandoli ripetutamente su e giù o agitandoli rapidamente su vortex) e centrifugati brevemente.

Procedura

- 1. Inserire il numero desiderato di provette PCR negli adattatori del blocco di raffreddamento.**
- 2. Se si usa il controllo interno per monitorare la procedura di estrazione del DNA e per verificare la possibile inibizione della PCR, seguire la fase 2a. Se si usa il controllo interno esclusivamente per controllare l’inibizione della PCR, seguire la fase 2b.**
 - 2a. Il controllo interno è già stato aggiunto all’ estrazione (vedi “Controllo interno”, pag. 22). In questo caso, preparare una miscela master secondo la Tabella 6.**

Tabella 6. Preparazione della miscela master (controllo interno usato per controllare l'estrazione del DNA e verificare l'inibizione della PCR)

Numero di campioni	1	12
HBV RG/TM Master	30 μ l	360 μ l
HBV RG/TM IC	0 μ l	0 μ l ciascuno
Volume totale	30 μl	360 μl ciascuno

2b. Il controllo interno deve essere aggiunto direttamente all'HBV RG/TM Master. In questo caso, preparare una miscela master secondo la Tabella 7.

La miscela di reazione contiene tipicamente tutti i componenti necessari per la PCR, ad eccezione del campione.

Tabella 7. Preparazione della miscela master (controllo interno usato esclusivamente per verificare l'inibizione della PCR)

Numero di campioni	1	12
HBV RG/TM Master	30 μ l	360 μ l
HBV RG/TM IC	2 μ l	24 μ l
Volume totale	32 μl*	384 μl*

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

3. Pipettare 30 μ L della miscela master in ogni provetta PCR. Aggiungere poi 20 μ l del campione di DNA eluito (vedi Tabella 8). A questo punto, occorre utilizzare 20 μ l di almeno uno degli standard di quantificazione (HBV RG/TM QS 1–5) come controllo positivo e 20 μ l di acqua (acqua, grado PCR) come controllo negativo.

Tabella 8. Preparazione della PCR

Numero di campioni	1	12
Miscela master	30 μ l	30 μ l ciascuno
Campione	20 μ l	20 μ l ciascuno
Volume totale	50 μl	50 μl ciascuno

4. **Chiudere le provette per PCR. Verificare che l'anello di bloccaggio (accessorio dello strumento Rotor-Gene) sia presente sopra il rotore per evitare l'apertura accidentale delle provette durante l'analisi.**
5. **Per rilevare il DNA di HBV creare un profilo termico come di seguito descritto.**

Impostazione dei parametri generali del test	Figure 4, 5, 6
Attivazione iniziale dell'enzima hot-start	Figura 7
Amplificazione del DNA	Figura 8
Regolazione della sensibilità del canale di fluorescenza	Figura 9
Avvio del processo	Figura 10

Tutte le specifiche fanno riferimento al software del Rotor-Gene Q versione 1.7.94, al software del Rotor-Gene 6000 versione 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94 e al software del Rotor-Gene 3000 versione 6.0.23. Per ulteriori informazioni sulla programmazione degli strumenti Rotor-Gene consultare il relativo manuale utente. Nelle figure queste impostazioni sono evidenziate da un riquadro nero in grassetto. Le immagini riportate riguardano gli strumenti Rotor-Gene Q. Se per il Rotor-Gene 3000 sono necessari valori diversi, tali differenze sono indicate nel testo stesso.

6. In primo luogo, aprire la finestra di dialogo "New Run Wizard" (Wizard nuovo processo) (Figura 4). Spuntare la casella "Locking Ring Attached" (Anello di bloccaggio collegato) e cliccare su "Next" (Avanti).

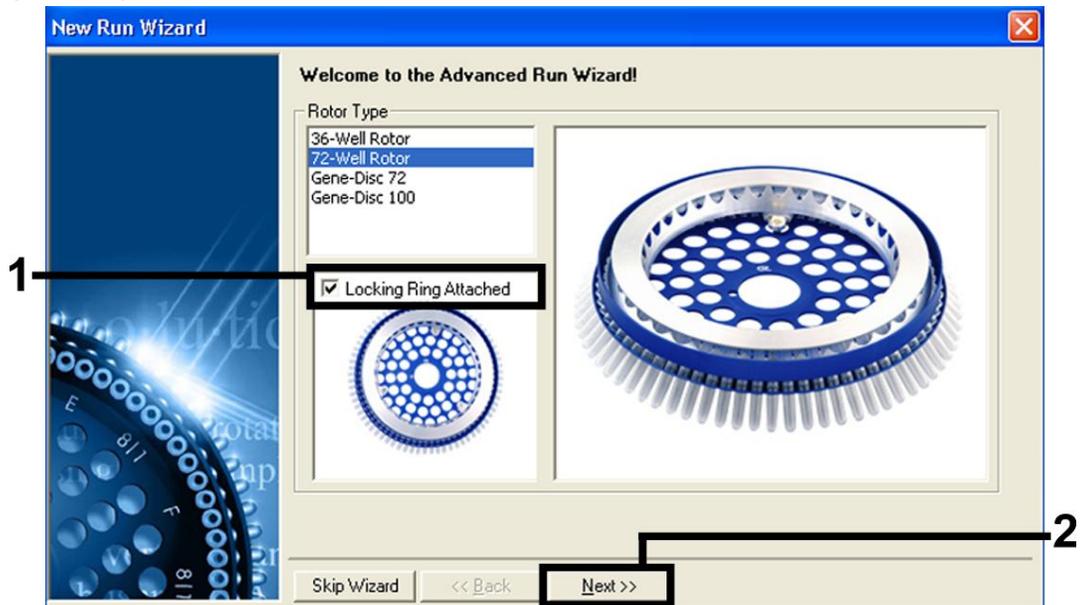


Figura 4. Finestra di dialogo "New Run Wizard".

7. Selezionare 50 per il volume di reazione PCR e cliccare su "Next" (Figura 5).

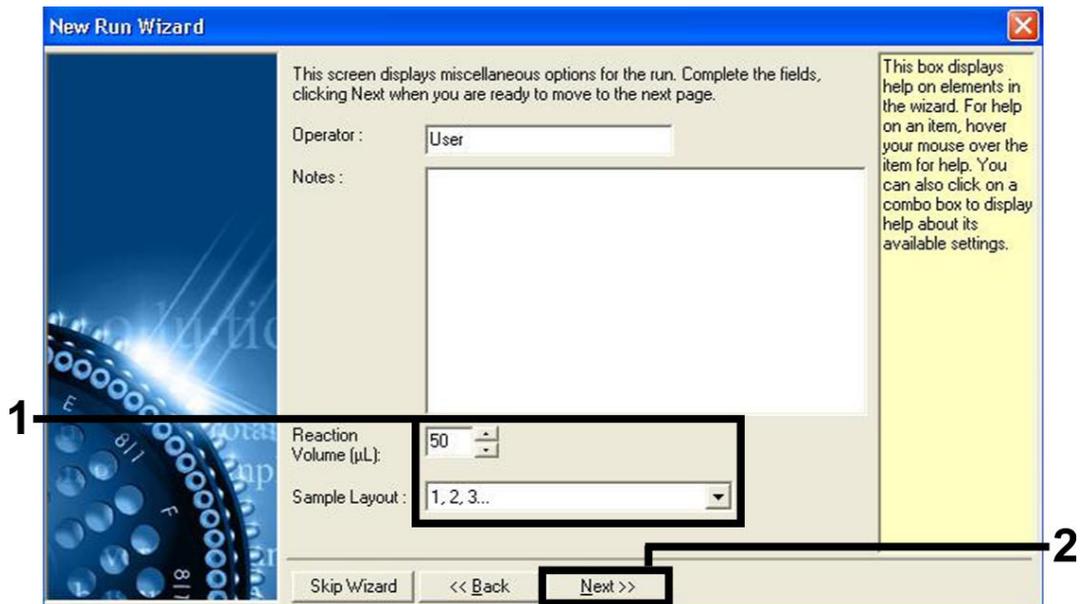


Figura 5. Impostazione dei parametri generali del test.

8. Cliccare sul pulsante “Edit Profile” (Modifica profilo) nella successiva finestra di dialogo “New Run Wizard” (Figura 6) e programmare il profilo termico, come illustrato nelle Figure 6-8.

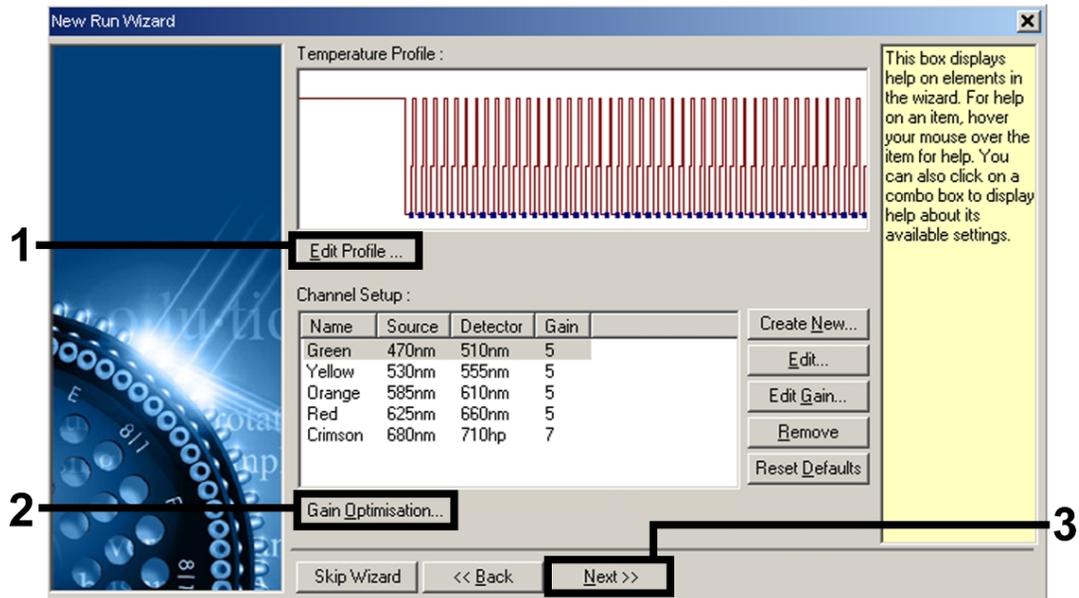


Figura 6. Modifica del profilo.

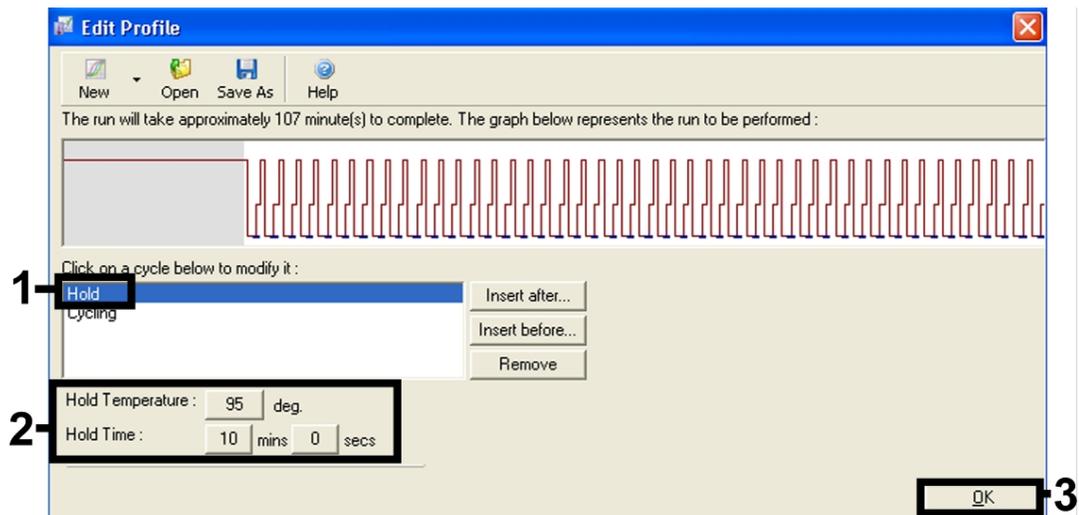


Figura 7. Attivazione iniziale dell’enzima hot-start.

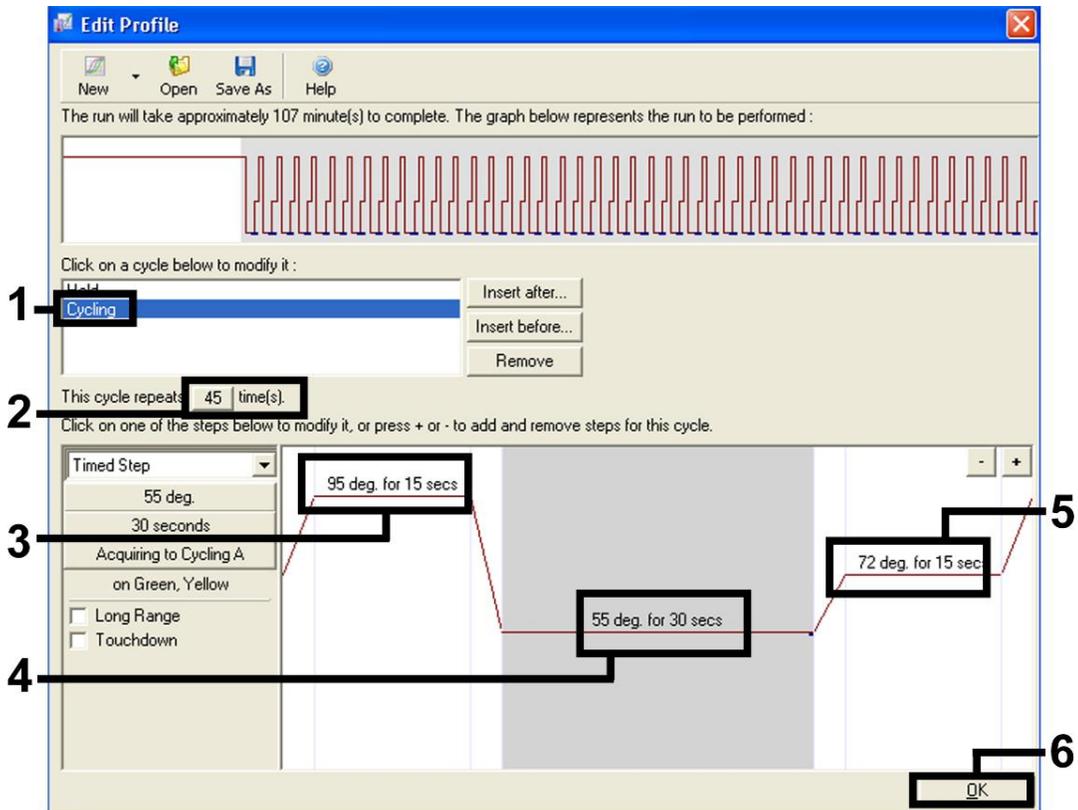


Figura 8. Amplificazione del DNA. Si noti che sul Rotor-Gene 3000 il software definisce i coloranti di fluorescenza come "FAM/Sybr" e "JOE".

9. Il range di rilevamento dei canali di fluorescenza deve essere determinato in base all'intensità della fluorescenza nelle provette PCR. Cliccare su "Gain Optimisation" (Ottimizzazione gain) nella finestra "New Run Wizard" (vedere Figura 6) per aprire la finestra di dialogo "Auto-Gain Optimisation Setup" (Setup ottimizzazione auto-gain). Impostare la temperatura di calibrazione su 55 per farla coincidere con la temperatura di annealing del programma di amplificazione (Figura 9).

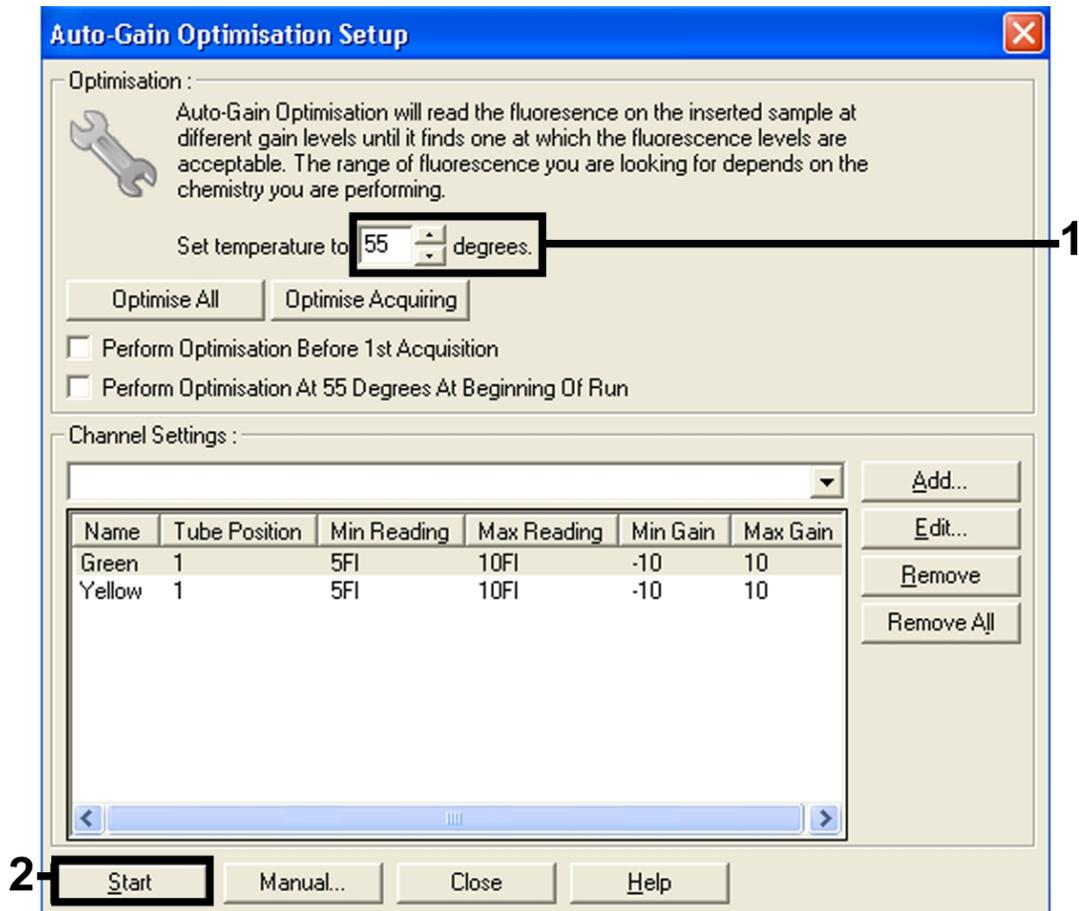


Figura 9. Regolazione della sensibilità dei canali di fluorescenza. Si noti che sul Rotor-Gene 3000 il software definisce i coloranti di fluorescenza come "FAM/Sybr" e "JOE".

10. I valori del gain determinati con la calibrazione del canale sono salvati automaticamente e sono elencati nell'ultima finestra del menu della procedura di programmazione (Figura 10). Cliccare su "Start Run" (Avvio processo).

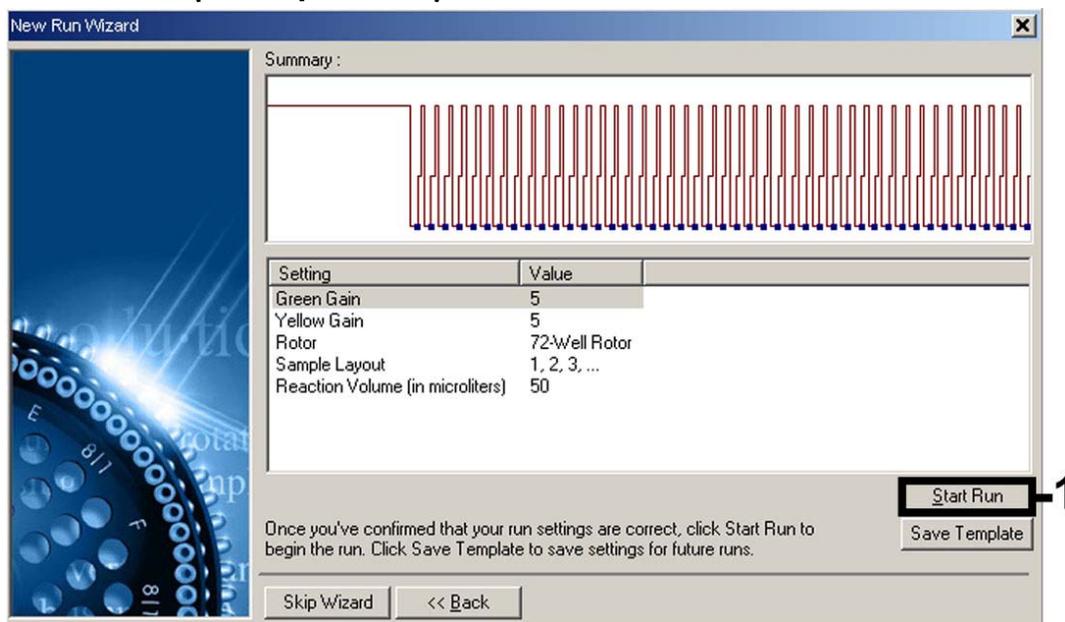


Figura 10. Avvio del processo. Si noti che sul Rotor-Gene 3000 il software definisce i coloranti di fluorescenza come "FAM/Sybr" e "JOE".

11. Terminato il processo, analizzare i dati. Sono possibili i seguenti risultati (11a, 11b e 11c).

Alcuni esempi di reazioni PCR positive e negative sono riportati nelle Figure 11 e 12.

11a. Viene rilevato un segnale nel canale di fluorescenza Cycling Green. Il risultato dell'analisi è positivo: il campione contiene DNA di HBV.

In questo caso, la rilevazione di un segnale nel canale Cycling Yellow è trascurabile, dal momento che alte concentrazioni iniziali di DNA di HBV (segnale positivo nel canale Cycling Green) possono portare ad un segnale di fluorescenza ridotto o assente nel canale Cycling Yellow (concorrenza).



Si noti che sul Rotor-Gene 3000 i rispettivi canali sono Cycling A.FAM per il segnale positivo e Cycling A.JOE per il controllo interno.

11b. Non viene rilevato nessun segnale nel canale di fluorescenza Cycling Green. Al tempo stesso viene rilevato un segnale dal controllo interno nel canale Cycling Yellow. Nel campione non è rilevabile DNA di HBV. Il risultato può essere considerato negativo.

In caso di PCR di HBV negativa, il segnale rilevato del controllo interno esclude la possibile inibizione della PCR.

i Si noti che sul Rotor-Gene 3000 i rispettivi canali sono Cycling A.JOE per il controllo interno e mancanza di segnale per Cycling A.FAM.

11c. Non si rileva nessun segnale nei canali Cycling Green o Cycling Yellow. Non si può trarre alcun risultato.

Si possono trovare informazioni sulle cause d'errore e relative soluzioni in "Guida alla risoluzione dei problemi", pag. 35.

i Si noti che sul Rotor-Gene 3000 i rispettivi canali sono Cycling A.FAM e Cycling A.JOE.

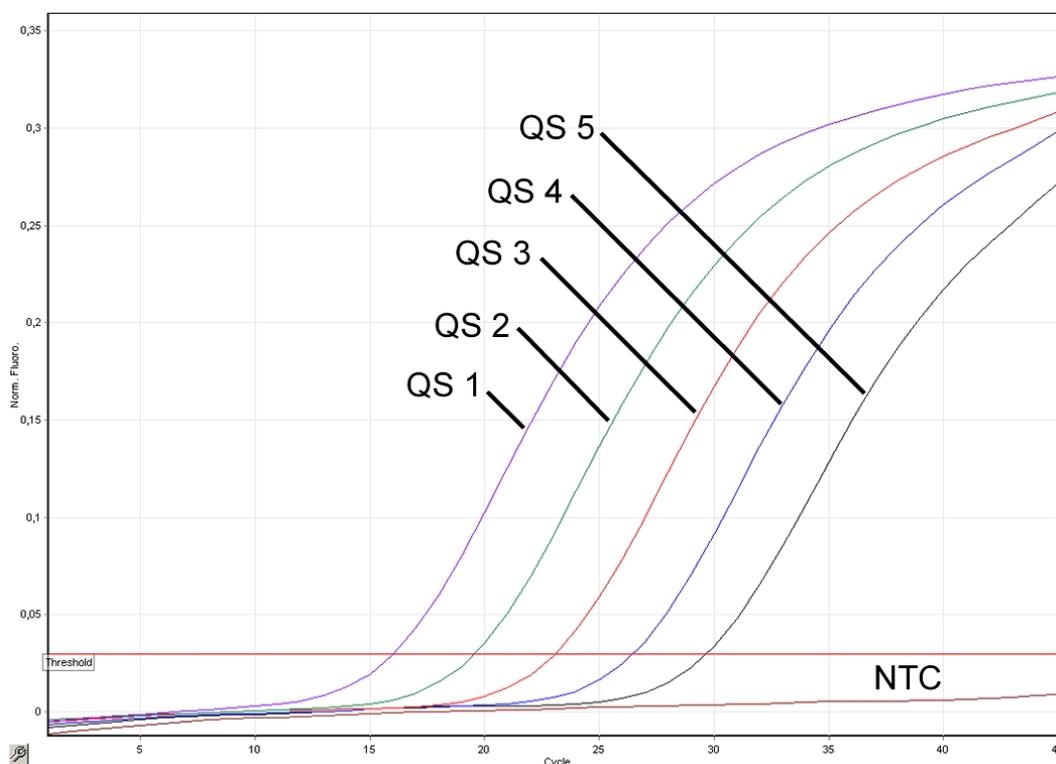


Figura 11. Rilevazione degli standard di quantificazione (HBV RG/TM QS 1-5) nel canale di fluorescenza Cycling Green. NTC: Controllo no template (controllo negativo).

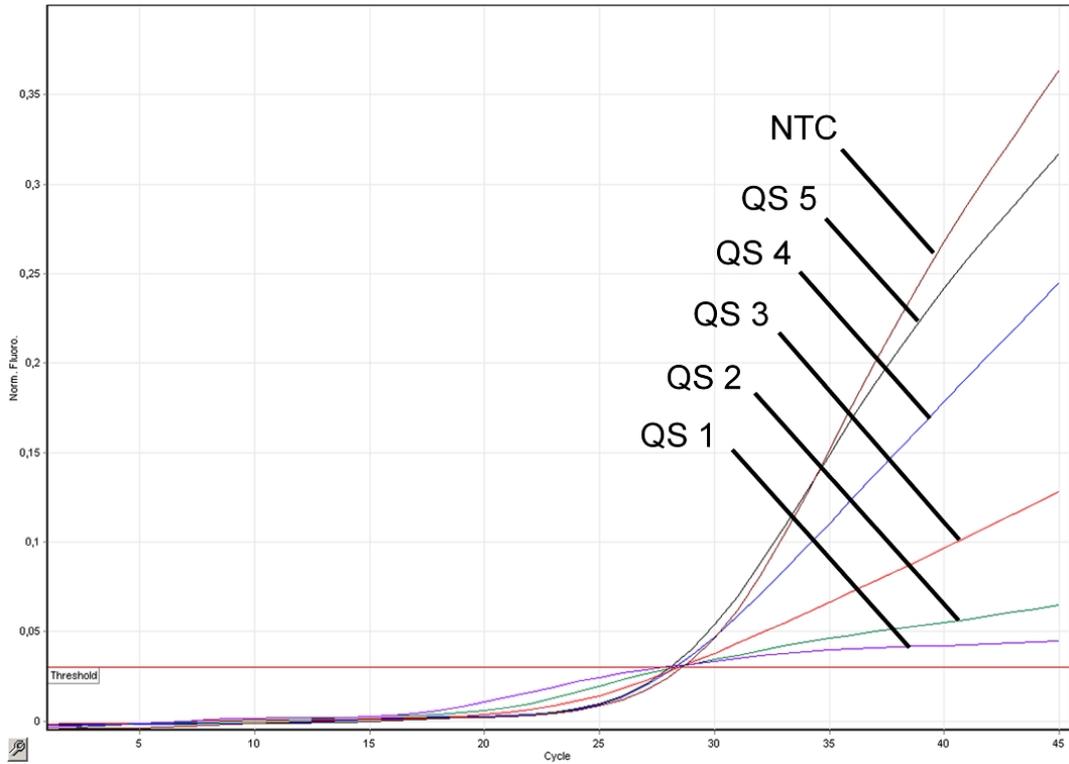


Figura 12. Rilevazione del controllo interno (IC) nel canale di fluorescenza Cycling Yellow con amplificazione contemporanea degli standard di quantificazione (HBV RG/TM QS 1–5). NTC: Controllo no template (controllo negativo).

Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per chiarire eventuali dubbi che possano presentarsi. Per maggiori informazioni, consultare anche la pagina relativa alle domande frequenti (FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Gli esperti del servizio di assistenza tecnica di QIAGEN sono sempre disponibili per rispondere a qualsiasi domanda riguardante informazioni e protocolli presentati in questo manuale o le tecnologie per campioni e analisi (per le informazioni sui contatti vedere il retro di copertina o visitare il sito www.qiagen.com).

Commenti e suggerimenti

Non viene rilevato nessun segnale con i controlli positivi (HBV RG/TM QS 1–5) nel canale di fluorescenza Cycling Green o Cycling A.FAM

- | | |
|--|---|
| a) Il canale di fluorescenza selezionato per l'analisi dei dati PCR non è conforme al protocollo |  Per l'analisi dei dati selezionare il canale di fluorescenza Cycling Green o Cycling A.FAM per la PCR analitica di HBV e il canale di fluorescenza Cycling Yellow o Cycling A.JOE per la PCR del controllo interno. |
| b) Programmazione non corretta del profilo termico dello strumento Rotor-Gene |  Confrontare il profilo termico con il protocollo. Vedere "Protocollo: PCR e analisi dei dati", pagina 25. |
| c) Configurazione non corretta della PCR |  Controllare le fasi operative eseguite con lo schema di pipettamento e ripetere la PCR se necessario. Vedere "Protocollo: PCR e analisi dei dati", pagina 25. |
| d) Le condizioni di conservazione per uno o più componenti del kit non corrispondevano alle istruzioni fornite in "Conservazione" (pag. 7) |  Controllare le condizioni di conservazione e la data di scadenza dei reagenti (vedere etichetta del kit) e utilizzare un nuovo kit se necessario. |
| e) Il kit <i>artus</i> HBV RG PCR è scaduto |  Controllare le condizioni di conservazione e la data di scadenza dei reagenti (vedere etichetta del kit) e utilizzare un nuovo kit se necessario. |

Commenti e suggerimenti

Segnale debole o assente del controllo interno di un campione di plasma negativo sottoposto ad estrazione con il kit QIAamp DSP Virus ($C_T = 29 \pm 3$; soglia, 0,03) nel canale di fluorescenza Cycling Yellow o Cycling A.JOE e assenza simultanea di segnale nel canale Cycling Green o Cycling A.FAM

- a) Le condizioni della PCR non sono conformi al protocollo  Verificare le condizioni della PCR (vedere sopra) e ripetere la PCR con impostazioni corrette, se necessario.
- b) La PCR è stata inibita  Verificare che sia stata usata la procedura di estrazione raccomandata e seguire scrupolosamente le istruzioni del produttore.
- c) DNA perso durante l'estrazione  Se all'estrazione era stato aggiunto il controllo interno, l'assenza di segnale del controllo interno può indicare la perdita del DNA durante l'estrazione. Verificare che sia stata usata la procedura di estrazione raccomandata (vedi "Estrazione del DNA", pag. 22) e seguire scrupolosamente le istruzioni del produttore.
- d) Le condizioni di conservazione per uno o più componenti del kit non corrispondevano alle istruzioni fornite in "Conservazione" (pag. 7)  Controllare le condizioni di conservazione e la data di scadenza dei reagenti (vedere etichetta del kit) e utilizzare un nuovo kit se necessario.
- e) Il kit *artus* HBV RG PCR è scaduto  Controllare le condizioni di conservazione e la data di scadenza dei reagenti (vedere etichetta del kit) e utilizzare un nuovo kit se necessario.

Commenti e suggerimenti

Segnali con i controlli negativi nel canale di fluorescenza Cycling Green o Cycling A.FAM della PCR analitica

- a) Si è verificata una contaminazione durante la preparazione della PCR
- ① Ripetere la PCR con nuovi reagenti in replicati.
 - ① Se possibile, chiudere le provette PCR subito dopo l'immissione del campione da testare.
 - ① Accertarsi di avere pipettato i controlli positivi per ultimi.
 - ① Verificare che l'area di lavoro e gli strumenti vengano decontaminati a intervalli regolari.
- b) Si è verificata una contaminazione durante l'estrazione
- ① Ripetere l'estrazione e la PCR del campione da testare utilizzando nuovi reagenti.
 - ① Verificare che l'area di lavoro e gli strumenti vengano decontaminati a intervalli regolari.

Riferimenti citati

QIAGEN possiede un'ampia banca dati online continuamente aggiornata con le pubblicazioni scientifiche riguardanti i prodotti QIAGEN. Le opzioni di ricerca specifiche consentono di trovare gli articoli necessari sia tramite parole chiave sia specificando l'applicazione, l'area di ricerca, il titolo, ecc.

Per un elenco bibliografico completo, visitare la base de datos bibliográfica en línea de QIAGEN all'indirizzo www.qiagen.com/RefDB/search.asp o contattare il servizio di assistenza tecnica QIAGEN o il distributore locale.

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Indice	Cat n°
<i>artus</i> HBV RG PCR Kit (24)	Per 24 reazioni: Master, 5 standard di quantificazione, controllo interno, acqua (grado PCR)	4506263
<i>artus</i> HBV RG PCR Kit (96)	Per 96 reazioni: Master, 5 standard di quantificazione, controllo interno, acqua (grado PCR)	4506265
Kit QIAamp DSP Virus — per l'estrazione degli acidi nucleici virali da plasma umano per analisi diagnostiche in vitro		
QIAamp DSP Virus Kit	Per 50 preparazioni: QIAamp MinElute® Spin Columns, tamponi, reagenti, provette, tubi di estensione e VacConnectors	60704
Rotor-Gene Q MDx — per l'analisi real-time PCR convalidata per l'uso diagnostico in vitro in applicazioni cliniche		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Termociclatore per real-time PCR a 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Termociclatore per real-time PCR a 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento non inclusi	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Termociclatore per PCR in tempo reale e analizzatore per fusione ad alta risoluzione a 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi) più canale HRM, notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento	9002033

Prodotto	Indice	Cat n°
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Termociclatore per PCR in tempo reale e analizzatore per fusione ad alta risoluzione a 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi) più canale HRM, notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e materiali, installazione e addestramento non inclusi	9002032
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Strumento per real-time PCR a 6 canali (blu, verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento	9002043
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Strumento per real-time PCR a 6 canali (blu, verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento non inclusi	9002042
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	Termociclatore per real-time PCR a 2 canali (verde, giallo), notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento	9002003
Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform	Termociclatore per real-time PCR e analizzatore per fusione ad alta risoluzione a 2 canali (verde, giallo) più canale HRM, notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento non inclusi	9002002
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	Termociclatore per real-time PCR e analizzatore per fusione ad alta risoluzione a 2 canali (verde, giallo) più canale HRM, notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento	9002013

Prodotto	Indice	Cat n°
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform	Termociclatore per real-time PCR e analizzatore per fusione ad alta risoluzione a 2 canali (verde, giallo) più canale HRM, notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento non inclusi	9002012
Rotor-Gene Q — per prestazioni eccezionali di real-time PCR		
Rotor-Gene Q 5plex System	Termociclatore per real-time PCR a 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Platform	Termociclatore per real-time PCR a 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento non inclusi	9001570
Rotor-Gene Q 5plex HRM System	Termociclatore per PCR in tempo reale e analizzatore per fusione ad alta risoluzione a 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi) più canale HRM, notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento	9001650
Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	Termociclatore per PCR in tempo reale e analizzatore per fusione ad alta risoluzione a 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi) più canale HRM, notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e materiali, installazione e addestramento non inclusi	9001580

Prodotto	Indice	Cat n°
Rotor-Gene Q 6plex System	Strumento per real-time PCR a 6 canali (blu, verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento	9001660
Rotor-Gene Q 6plex Platform	Strumento per real-time PCR a 6 canali (blu, verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento non inclusi	9001590
Rotor-Gene Q 2plex System	Termociclatore per real-time PCR a 2 canali (verde, giallo), notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento	9001620
Rotor-Gene Q 2plex Platform	Termociclatore per real-time PCR e analizzatore per fusione ad alta risoluzione a 2 canali (verde, giallo) più canale HRM, notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento non inclusi	9001550
Rotor-Gene Q 2plex HRM System	Termociclatore per real-time PCR e analizzatore per fusione ad alta risoluzione a 2 canali (verde, giallo) più canale HRM, notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento	9001630
Rotor-Gene Q 2plex HRM Platform	Termociclatore per real-time PCR e analizzatore per fusione ad alta risoluzione a 2 canali (verde, giallo) più canale HRM, notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento non inclusi	9001560

Prodotto	Indice	Cat n°
Accessori del Rotor-Gene Q		
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Blocco in alluminio per setup manuale della reazione con pipetta a un canale in 72 provette da 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Blocco in alluminio per setup manuale della reazione in una serie standard 8 x 12 con 96 provette da 0,2 ml	9018905
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250)	250 strisce di 4 provette e tappi per 1.000 reazioni	981103
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2500)	10 x 250 strisce di 4 provette e tappi per 10.000 reazioni	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1.000 provette a parete sottile per 1.000 reazioni	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 provette a parete sottile per 1000 reazioni	981008

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti, consultare il manuale del kit o il manuale utente QIAGEN. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili nel sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN o al proprio distributore locale.

L'acquisto di questo prodotto ne consente l'uso all'acquirente per l'esecuzione di servizi per la diagnostica umana in vitro. Con il presente non si concede nessun brevetto generico o licenza di altro tipo in aggiunta agli specifici diritti di utilizzo garantiti dall'acquisto.

Marchi commerciali: QIAGEN®, QIAamp®, artus®, MinElute®, Rotor-Gene® (Gruppo QIAGEN); COBAS®, TaqMan® (Gruppo Roche); FAM™, JOE™, SYBR® (Life Technologies Corporation).

Il kit *artus* HBV RG PCR e il kit QIAamp DSP Virus sono dispositivi di diagnostica contrassegnati CE secondo la direttiva europea 98/79/CE concernente i dispositivi medico-diagnostici in vitro. Non disponibile in tutti i paesi.

Contratto di Licenza Limitato

L'uso di questo prodotto implica l'accettazione, da parte dell'acquirente o dell'utente del kit *artus* HBV RG PCR, dei seguenti termini:

1. Il kit *artus* HBV RG PCR deve essere usato unicamente secondo le istruzioni contenute nel *manuale del kit artus HBV RG PCR* e in combinazione con i componenti contenuti nel kit stesso. QIAGEN non concede alcuna licenza, in relazione a qualunque proprietà intellettuale, per l'uso o l'aggiunta dei componenti del kit ad altri componenti non contenuti nel kit, ad eccezione di quanto descritto nel *manuale del kit artus HBV RG PCR* e nei protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com.
2. Se non espressamente dichiarato nelle licenze, QIAGEN non garantisce in alcun modo che questi kit e/o il relativo impiego non violino i diritti di terze parti.
3. Il presente kit ed i relativi componenti sono concessi in licenza per l'impiego monouso e non possono essere riutilizzati, ripristinati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del kit concordano nel non consentire a nessuno di intervenire o consentire ad altri di realizzare o contribuire a realizzare azioni proibite. QIAGEN può imporre presso qualunque tribunale i divieti del presente Contratto di Licenza Limitato, e recupererà tutte le spese di indagine e spese legali, comprese le parcelle degli avvocati, in qualunque azione per imporre il presente Contratto di Licenza Limitato o qualsiasi diritto di proprietà intellettuale correlato al kit e/o ai suoi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, consultare il sito www.qiagen.com.

© 2009-2014 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

