

artus[®] MTHFR LC PCR Kit

Manual de Instruções



24 (Catálogo Nr. 4621063)



96 (Catálogo Nr. 4621065)

Diagnóstico in vitro qualitativo

Para utilização com o equipamento *LightCycler*[®]

Junho de 2007 – Versão 1



4621063, 4621065



1046979PT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R1

MAT

1046979PT

artus MTHFR LC PCR Kit

Marcas registradas e indicações jurídicas

QIAGEN[®], QIAamp[®], *artus*[®] (Grupo QIAGEN); *LightCycler*[®] (Roche Diagnostics).

Nomes registrados, marcas registradas, etc. usados neste documento não podem ser considerados como desprotegidos legalmente, mesmo que não estejam especificamente sinalizados como tal.

O *artus* MTHFR LC PCR Kit é um kit de diagnóstico sinalizado com CE de acordo com as Diretrizes Europeias 98/79/CE sobre diagnóstico in vitro. Não está disponível em todos os países.

Os kits QIAamp são para o uso geral em laboratório. As indicações ou as representações do produto não foram elaboradas para fornecer informações sobre a diagnose, a prevenção ou a terapia de uma doença.

A aquisição de kits de PCR *artus* contém uma licença limitada para o uso dos mesmos na execução do processo de reacção em cadeia da polimerase (PCR) em diagnósticos in vitro humanos e veterinários em conjunção com um ciclador térmico, cujo uso na execução automática do processo de PCR é coberto pela taxa de licença inicial, ou por pagamento à Applied Biosystems ou por aquisição de um ciclador térmico autorizado. O processo de PCR é protegido pelos respectivos direitos nacionais de protecção de patentes dos E.U.A. número: 5.219.727 e 5.322.770 e 5.210.015 e 5.176.995 e 6.040.166 e 6.197.563 e 5.994.056 e 6.171.785 e 5.487.972 e 5.804.375 e 5.407.800 e 5.310.652 e 5.994.056; Propriedade da Firma Hoffmann-La Roche Ltda.

© 2007 QIAGEN, todos os direitos reservados.

Índice

1. Conteúdo.....	4
2. Conservação	4
3. Materiais e aparelhos necessários adicionalmente	4
4. Medidas gerais de segurança.....	5
5. Informações básicas	5
6. Princípio do processo do teste.....	6
7. Descrição do produto.....	7
8. Protocolo.....	7
8.1 Isolamento de ADN	7
8.2 Preparação da PCR	8
8.3 Programação do equipamento <i>LightCycler</i> [®]	11
9. Análise dos dados	14
10. Resolução de problemas	17
11. Especificações.....	18
11.1 Sensibilidade analítica.....	18
11.2 Especificidade analítica.....	18
11.3 Sensibilidade e especificidade diagnósticas	18
12. Indicações especiais sobre a utilização do produto.	19
13. Informações de segurança	19
14. Controlo de qualidade.....	19
15. Referência bibliográfica	20
16. Descrição dos símbolos.....	21

artus[®] MTHFR LC PCR Kit

Para utilização com o equipamento *LightCycler[®]*.

1. Conteúdo

	Legenda e conteúdo	N° Art. 4621063 24 reacções	N° Art. 4621065 96 reacções
Azul	<i>MTHFR LC Master</i>	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
Vermelho	<i>MTHFR LC Control</i>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Branco	<i>Water (PCR grade)</i>	1 x 1.000 µl	1 x 1.000 µl

2. Conservação

Os componentes do *artus* MTHFR LC PCR Kit são conservados a -20°C e devem ser utilizados antes do fim da data de validade indicada no rótulo. A repetida descongelação e congelação (> 2 x) deve ser evitada, pois, devido a isto, a sensibilidade pode ser reduzida. No caso de utilização irregular os reagentes devem, por isso, ser divididos em alíquotas. Se houver a necessidade de conservar os componentes a +4°C, não se deve ultrapassar um período de cinco horas.

3. Materiais e aparelhos necessários adicionalmente

- Luvas de laboratório isentas de pó
- Kit de isolamento de ADN (ver capítulo **8.1 Isolamento de ADN**)
- Pipetas (reguláveis)
- Pontas de pipetas estéreis com filtros
- Misturador vórtex
- Centrífuga de bancada com rotor para tubos de reacção de 2 ml
- *Color Compensation Set* (Roche Diagnostics, Cat. N°: 2 158 850) para a criação de um arquivo *Crosstalk Color Compensation*

- Capilares *LightCycler*[®] (20 µl)
- *LightCycler*[®] Cooling Block
- Equipamento *LightCycler*[®]
- *LightCycler*[®] Capping Tool

4. Medidas gerais de segurança

O utilizador deve ter sempre em atenção o seguinte:

- Utilizar pontas de pipetas estéreis com filtros.
- Armazenar, purificar e acrescentar à reacção os materiais positivos (amostras, controlos, produtos de amplificação) separados fisicamente dos restantes reagentes.
- Antes de iniciar o teste, descongelar totalmente todos os componentes à temperatura ambiente.
- Em seguida, misturar completamente e centrifugar brevemente os componentes.
- Trabalhar rapidamente em gelo ou no *LightCycler*[®] Cooling Block.

5. Informações básicas

A actividade enzimática pode ser influenciada pela idade, sexo, alimentação, co-medicação e, principalmente, por fatores genéticos. Sabe-se que pacientes que não apresentam ou que apresentam uma actividade da enzima Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR) muito reduzida e que estão sob terapêutica com Metotrexato têm um risco maior de sofrerem efeitos colaterais (como por exemplo: graves alterações do hemograma, mucosite, excesso de homocisteína no sangue). O Metotrexato é um antagonista do ácido fólico que é, entre outros, utilizado na terapêutica de artrite reumatóide e de tumores. A análise do gene da MTHFR permite uma avaliação dos riscos de efeitos colaterais da terapêutica causados por fatores genéticos. Portadores de uma variação do gene da MTHFR podem ser, antes do início da terapêutica, detectados e eventualmente tratados com uma terapêutica alternativa ou com uma significativa redução da dose.

A actividade enzimática da Metilenotetrahidrofolato Redutase é determinada, além de outros fatores, através de variações no gene da MTHFR. Variações genéticas podem provocar, por exemplo, uma troca de aminoácidos. A conformação modificada da enzima interfere em sua actividade. As variações genéticas mais comuns no gene da MTHFR afectam os nucleotídeos nt 667 e nt 1298. Na literatura, são descritas outras variações que, entretanto, só foram observadas poucas vezes ou somente em uma população.

A enzima MTHFR é uma das principais componentes do metabolismo do ácido fólico. A consequência de uma actividade reduzida da enzima é a influência da síntese de metionina partindo da homocisteína. O aumento de homocisteína pode provocar diferentes doenças (trombose, arterioesclerose). Por isso, a existência de uma variação genética no gene da MTHFR significa um alto risco para o surgimento destas doenças.

A determinação do genótipo pode ajudar na optimização da terapêutica individual medicamentosa e na baixa de custos (estadia mais longa no hospital, etc.), causados por efeitos colaterais não desejados, ou diagnosticar cedo o surgimento do risco de um excesso de homocisteína no sangue, causados por fatores genéticos.

6. Princípio do processo do teste

No diagnóstico por meio de reacção de polimerização em cadeia (PCR) são amplificadas regiões específicas do genoma humano. A detecção do material amplificado efectua-se com a ajuda de corantes fluorescentes na PCR em Tempo Real. Estes estão acoplados geralmente a sondas oligonucleotídicas, que se ligam especificamente ao material amplificado pela PCR. A análise da curva de dissociação, logo após a amplificação pela PCR, possibilita a identificação e a discriminação de variações do gene. Como não tem que se voltar a abrir os tubos das amostras depois de concluída a PCR, o risco de contaminação é reduzido significativamente (Mackay, 2004).

7. Descrição do produto

A existência de uma variação no gene da MTHFR com relevância clínica é determinada com o *artus* MTHFR LC PCR Kit de forma simples, rápida e segura. Esta análise possibilita uma avaliação dos riscos de efeitos induzidos pela terapêutica, por exemplo através do tratamento com Metotrexato.

A análise é feita com base na detecção de uma variação no gene da MTHFR, com a ajuda do equipamento *LightCycler*[®]. Os reagentes contém iniciadores (primers) para a amplificação de uma região do gene MTHFR humano, assim como sondas marcadas com corantes fluorescentes para a detecção de variação genética nas posições dos nucleotídeos nt 667C>T e nt 1298A>C. Além disto, é fornecido um controlo positivo em um ensaio à parte, como controlo da reacção.

Como o teste é baseado na amplificação do genoma de ADN humano, os sinais de fluorescência, na parte da curva de dissociação, devem ser reconhecidos independente da existência de uma variação nos alelos. Se este não for o caso, é um indício de uma extracção ineficiente do ADN ou de uma inibição da PCR. Por isso um *Controlo interno* adicional neste teste genético não é necessário.

Atenção: Os sinais da análise da curva de dissociação são decisivos para a avaliação. Na maioria dos casos de utilização do *artus* MTHFR LC PCR Kit, não se observa uma amplificação quantitativa durante o ensaio do *LightCycler*[®]. Isto não influencia negativamente a análise da curva de dissociação.

8. Protocolo

8.1 Isolamento de ADN

Os kits de isolamento de ADN do sangue podem ser fornecidos por diversos fabricantes. Em função do protocolo do fabricante seleccionado, recolha o volume de amostra indicado para a purificação e efectue o isolamento de

ADN conforme as instruções do fabricante. Os seguintes kits de isolamento são recomendados:

Material de Amostra	Kit de Purificação	Número de Catálogo	Fabricante
Sangue	QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	51 104	QIAGEN

- O *artus* MTHFR LC PCR Kit não deverá ser utilizado em conjunto com procedimentos de purificação que utilizam **fenol** como base.
- Nas purificações com tampões de lavagem que contêm **etanol**, efectuar sempre, antes da eluição, uma centrifugação adicional (três minutos, 13.000 rpm) para a eliminação dos resíduos de etanol. Isto evita possíveis inibições da PCR.

8.2 Preparação da PCR

Certifique-se de que o Cooling Block com o adaptador nele contido (acessório do equipamento *LightCycler*[®]) tenha sido pré-refrigerado a aproximadamente +4°C. Coloque para as reacções planeadas a quantidade necessária de capilares *LightCycler*[®] no adaptador do Cooling Block. Todos os reagentes devem ser totalmente descongelados à temperatura ambiente, bem misturados (pipetando para cima e para baixo várias vezes ou misturando brevemente no vórtex) e em seguida centrifugados, antes do início do teste.

Deve-se considerar, para todos os ensaios, um controlo positivo (*MTHFR LC Control*) e um controlo negativo (*Water, PCR grade*) contidos no *artus* MTHFR LC PCR Kit.

Para a preparação das reacções de PCR, utilize o seguinte esquema de pipetagem (ver também o esquema reproduzido na Fig. 1):

	Quantidade de Amostras	
	1	
Preparação da Reacção de PCR	<i>MTHFR LC Master</i>	18 µl
	Amostra	2 µl
	Volume Total	20 µl

Pipete para o reservatório de plástico de cada capilar 18 µl da *MTHFR LC Master*. Em seguida, adicione 2 µl de eluído do isolamento de ADN. De forma correspondente, devem ser adicionados, como controlo positivo, 2 µl de *MTHFR LC Control* e, como controlo negativo, 2 µl de água (*Water, PCR grade*). Tape os capilares. Para deslocar o volume preparado do reservatório de plástico para dentro dos capilares, centrifugue os adaptadores e os capilares nele contidos numa centrífuga de bancada durante dez segundos, no máximo a 400 x g (2.000 rpm).

Atenção: Para evitar contaminações, utilize o *LightCycler*[®] Capping Tool ao colocar a tampa nos capilares.

Preparação da PCR

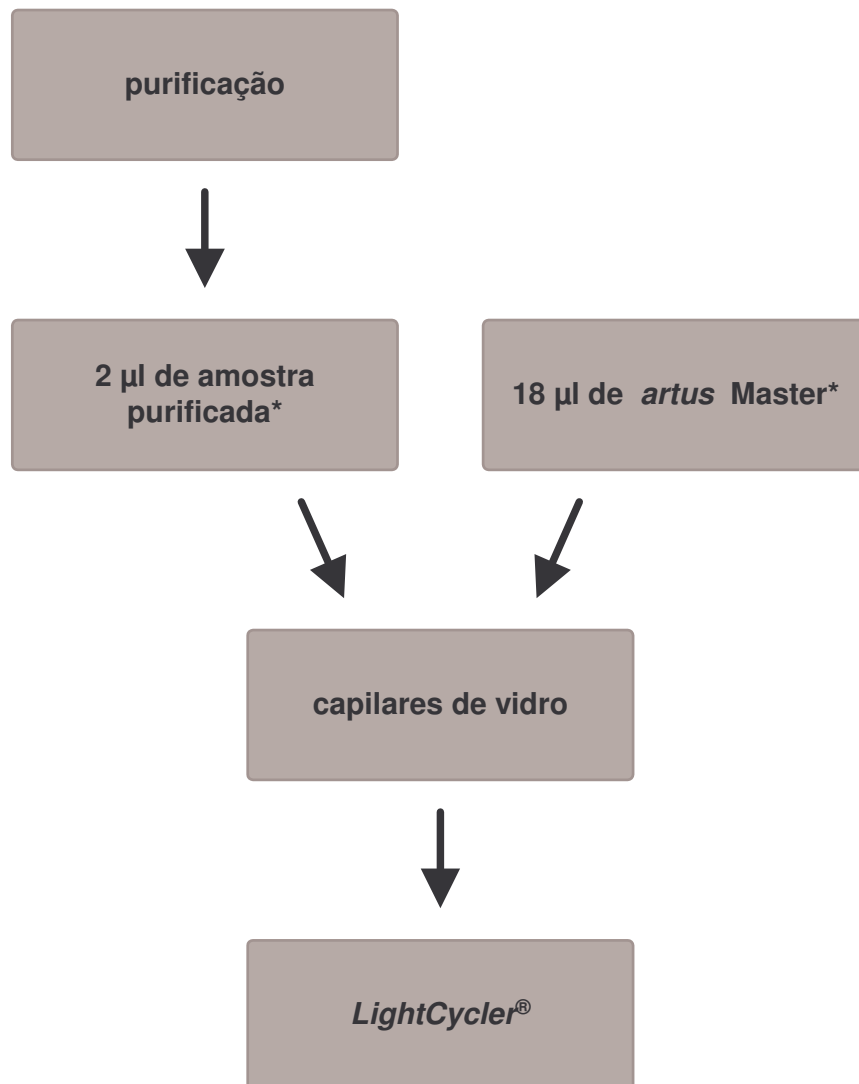


Fig. 1: Fluxo esquemático da operação.

* Em cada passo de pipetagem, certifique-se, sempre, de que as soluções a serem utilizadas tenham sido totalmente descongeladas, bem misturadas e brevemente centrifugadas.

8.3 Programação do equipamento *LightCycler*[®]

Para a detecção da variação genética no gene da MTHFR crie no seu equipamento *LightCycler*[®] um perfil de temperatura com os seguintes cinco passos (conforme as Fig. 2 a 6).

- | | | |
|----|---------------------------------------|--------|
| A. | Activação inicial da enzima Hot Start | Fig. 2 |
| B. | Passo Touch Down | Fig. 3 |
| C. | Amplificação do ADN | Fig. 4 |
| D. | Curva de dissociação | Fig. 5 |
| E. | Refrigeração | Fig. 6 |

Tenha especial atenção às configurações *Analysis Mode*, *Cycle Program Data* e *Temperature Targets*. Estas configurações estão destacadas nas figuras com caixa a negro. As indicações sobre a programação do equipamento *LightCycler*[®] encontram-se no *LightCycler Operator's Manual*.

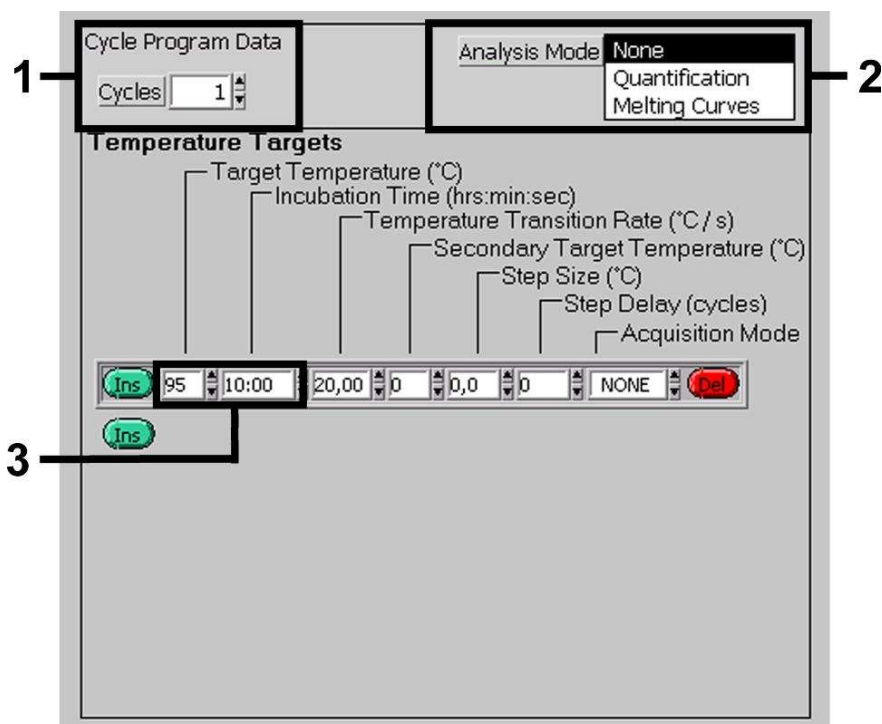


Fig. 2: Activação inicial da enzima Hot Start.

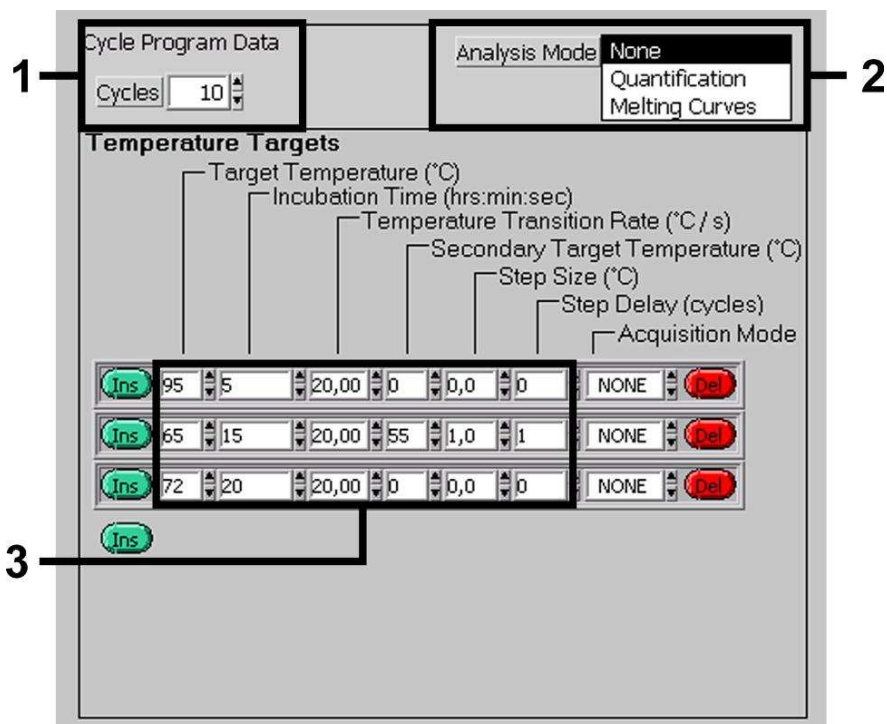


Fig. 3: Passo Touch Down.

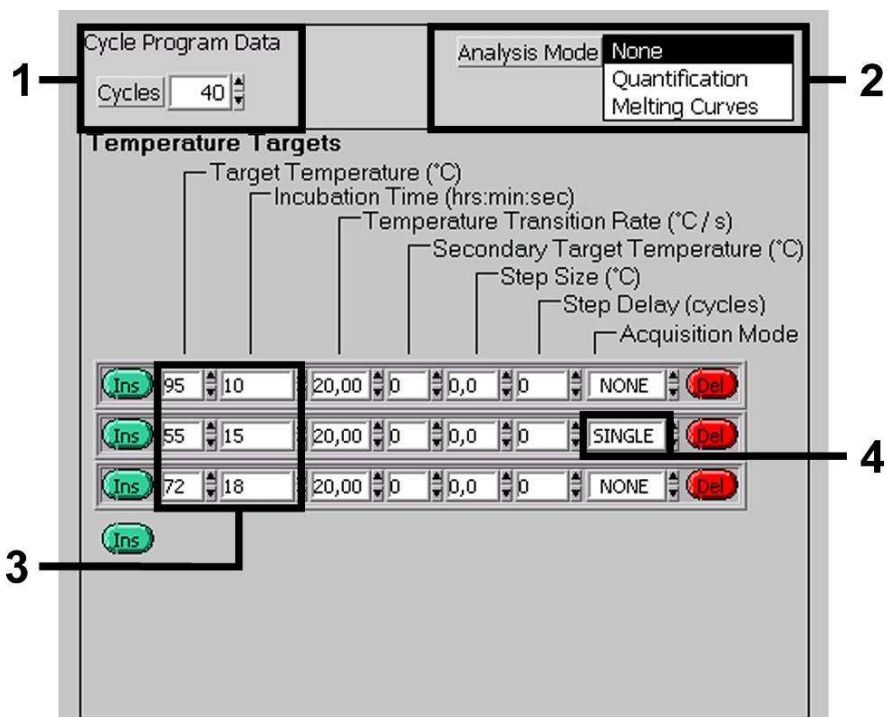


Fig. 4: Amplificação do ADN.

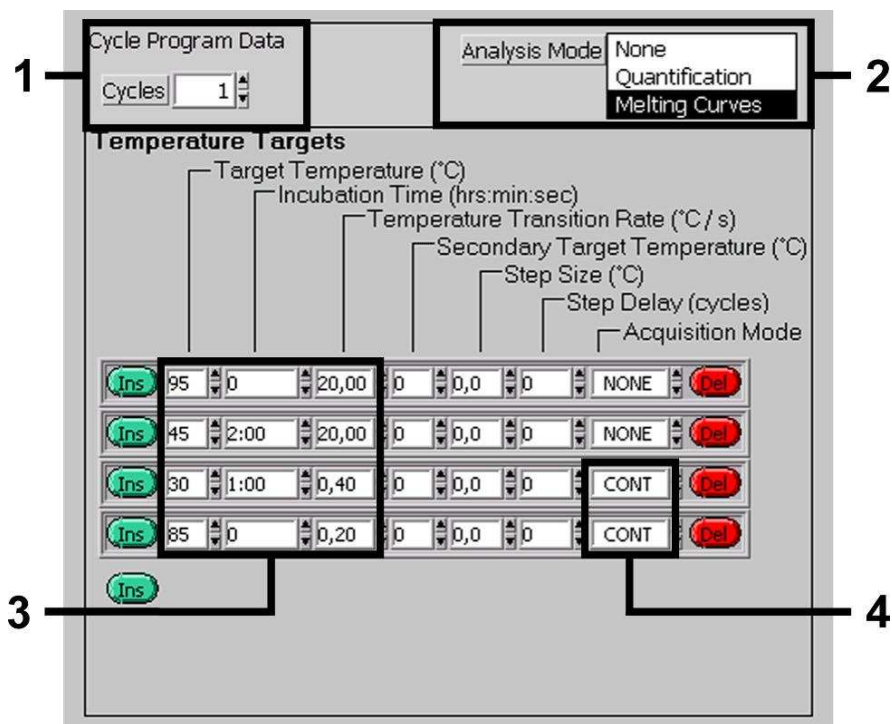


Fig. 5: Curva de dissociação.

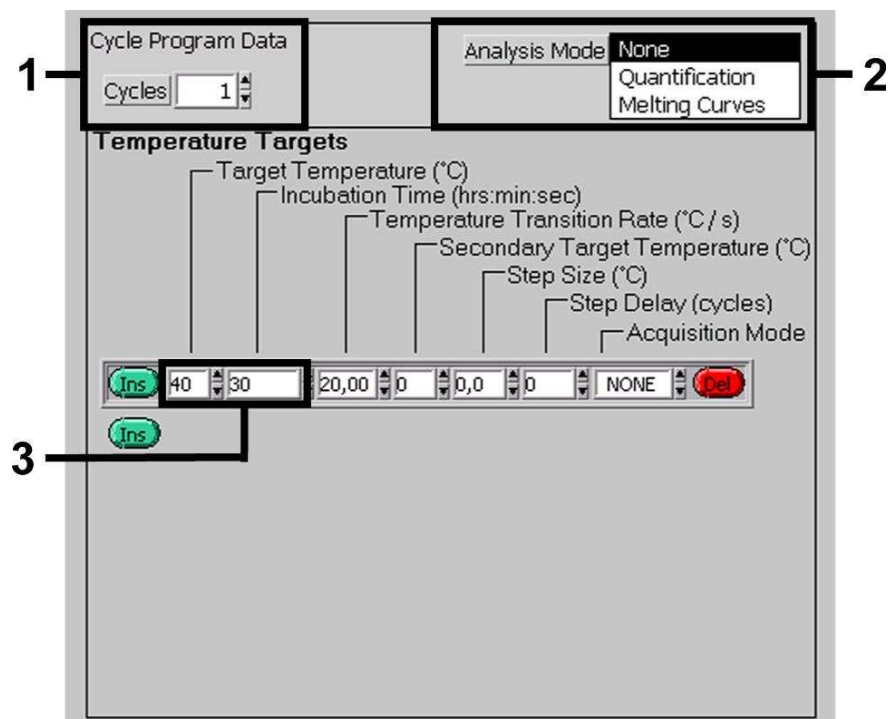


Fig. 6: Refrigeração.

9. Análise dos dados

Nas análises multi-canal ocorrem interferências entre os canais de fluorescência. O software do equipamento *LightCycler*[®] contém um arquivo indicado como *Color Compensation File* que compensa estas interferências. Abra este arquivo antes, durante o ensaio de PCR ou logo a seguir, através da activação do botão *Choose CCC File* ou *Select CC Data*. Se não estiver instalado nenhum *Color Compensation File*, crie o arquivo levando em consideração as instruções do *LightCycler Operator's Manual*. Após activação do *Color Compensation File* aparece nos canais de fluorescência F1, F2 e F3 sinais separados. Para a análise dos resultados da PCR, que foram obtidos com o *artus* MTHFR LC PCR Kit, seleccione as funções de perspectiva F2/Back-F1 e F3/Back-F1 para a PCR analítica da MTHFR. Na maioria dos casos de utilização do *artus* MTHFR LC PCR Kit, não se observa uma amplificação quantitativa durante o ensaio do *LightCycler*[®].

As componentes do *artus* MTHFR LC PCR Kit servem para a detecção de duas variações genéticas (alelo selvagem = wt, variação = var) nas posições do nucleotídeo nt 677 e nt 1298 no gene da MTHFR. A determinação das variações genéticas é feita com a ajuda do programa *Melting Curve*. No fluorograma, os pontos de dissociação indicam, nas temperaturas listadas na tabela seguinte (ver Tabela 1), a existência do alelo selvagem ou variações genéticas. Nas heterozigotias, a curva apresenta dois pontos máximos.

Tabela 1: Pontos de dissociação do alelo selvagem (wt) ou das variações genéticas (var).

nt	Canal F2		nt	Canal F3	
	wt	var		wt	var
677	62°C	53°C	1298	46°C	57°C

Ter em atenção que o ponto de dissociação pode variar em $\pm 2^\circ\text{C}$ da temperatura indicada. Para melhor representação do fluorograma recomenda-se, muitas vezes, desligar o *Digital Filter*.

As próximas figuras (Fig. 7 e Fig. 8) representam o fluorograma da detecção do polimorfismo nas posições do nucleotídeo nt 677 e nt 1298 em alelo

selvagem homozigoto, assim como o heterozigoto ou homozigoto da variação.

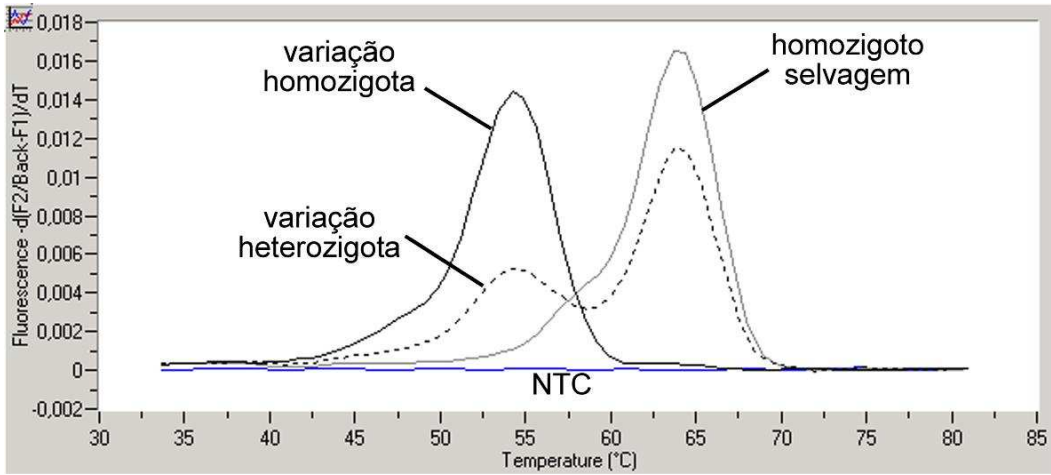


Fig. 7: Fluorograma da detecção da troca de nucleotídeo nt 677 com ajuda do *MTHFR LC PCR Kit* no canal de fluorescência F2/Back-F1. NTC: non-template control (controlo negativo).

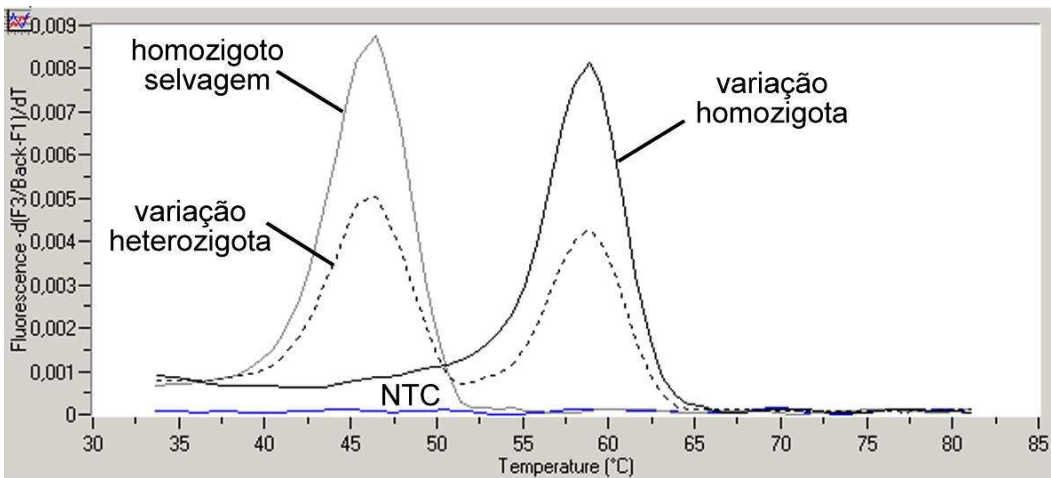


Fig. 8: Fluorograma da detecção da troca de nucleotídeo nt 1298 com ajuda do *MTHFR LC PCR Kit* no canal de fluorescência F3/Back-F1. NTC: non-template control (controlo negativo).

A determinação do genótipo é possível através da combinação das variações dos alelos. Nisto, ter em atenção que, na existência de duas variações heterozigóticas, estas podem estar juntas no mesmo alelo ou também em dois alelos diferentes. Até hoje, não foi descrito na literatura, nenhum caso das duas variações acopladas em forma homozigótica. Em todo caso, pode-se esperar uma redução da actividade enzimática MTHFR existindo no mínimo uma variação genética.

Uma actividade normal da enzima é esperada em portadores de dois alelos selvagens, contando que nenhum outro factor não genético influencie a actividade enzimática. Uma actividade enzimática limitada é esperada em portadores de no mínimo um alelo modificado geneticamente (MTHFR wt677/var677, wt1298/var1298). O risco de efeitos colaterais causados por factores genéticos aumenta se os dois alelos forem afectados.

Dos alelos anteriormente descritos, resultam diferentes genótipos possíveis. Estes estão listados na Tabela 2.

Tabela 2: Influencia do genótipo na actividade enzimática.

Genótipo homozigoto tipo selvagem	Genótipo variante heterozigoto	Genótipo variante homozigoto
MTHFR wt 677/wt 677 wt 1298/wt 1298	MTHFR wt 677/var 677 wt 1298/wt 1298	MTHFR var 677/var 677 wt 1298/wt 1298
	MTHFR wt 677/wt 677 wt 1298/var 1298	MTHFR wt 677/wt 677 var 1298/var 1298
	MTHFR wt 677/var 677 wt 1298/var 1298	
actividade enzimática normal	actividade enzimática reduzida	

Os controlos positivos (*MTHFR LC Control*), fornecidos com o *artus MTHFR LC PCR Kit*, indicam o estado do alelo heterozigoto (ver Fig. 7 e Fig. 8).

10. Resolução de problemas

Ausência de sinal no controlo positivo (*MTHFR LC Control*) ou nas amostras no canal de fluorescência F2/Back-F1 ou F3/Back-F1:

- A programação do perfil de temperatura do equipamento *LightCycler*[®] estava incorrecta.
 - Compare o perfil de temperatura com as indicações do protocolo (ver capítulo **8.3 Programação do equipamento *LightCycler*[®]**).
- Composição incorrecta da reacção de PCR.
 - Reveja os passos com ajuda do esquema de pipetagem (ver capítulo **8.2 Preparação da PCR**) e se for o caso, repita a PCR.
- As condições de conservação para um ou mais componentes do kit não corresponderam às instruções do *artus MTHFR LC PCR Kit* indicadas no capítulo **2. Conservação** ou a data de validade foi excedida.
 - Por favor, reveja tanto as condições de conservação como também a data de validade (ver etiqueta no kit) dos reagentes e, se for o caso, utilize um novo kit.
- A PCR foi inibida.
 - Certifique-se de que seja utilizado um dos nossos procedimentos de purificação recomendados (ver capítulo **8.1 Isolamento de ADN**) e, seja fiel às instruções do fabricante.
 - Certifique-se que seja efectuado o passo recomendado da centrifugação adicional, para completa eliminação de resíduos de etanol antes da eluição na purificação do ADN (ver capítulo **8.1 Isolamento de ADN**).
- Ocorreram perdas de ADN por causa da purificação.
 - Certifique-se de que seja utilizado um dos nossos procedimentos de purificação recomendados (ver capítulo **8.1 Isolamento de ADN**) e, seja fiel às instruções do fabricante.

Ponto máximo da curva de fluorescência enfraquecido:

- Misture os componentes cuidadosamente antes de sua utilização.
- Verifique as condições de amplificação.
- Pré-refrigere o Cooling Block com o adaptador nele contido a +4 °C.

→ Refrigere todos os componentes da reação durante a pipetagem.

Se houver dúvidas ou problemas, por favor contacte o nosso suporte técnico.

11. Especificações

11.1 Sensibilidade analítica

O *artus* MTHFR LC PCR Kit é utilizado para a detecção da constituição genética individual relativa a variação genética nt 677 e nt 1298 no gene humano da MTHFR com ajuda da tecnologia *LightCycler*[®]. ADN genómico humano foi purificado de amostras de sangue, quantificado espectrofotometricamente e diluído em etapas de diluição em série. Um mínimo de 0,12 ng de ADN genómico (20 cópias) por PCR (equivalente entre 0,005 e 0,02 µl de sangue, conforme o doador de sangue e purificação) é suficiente para a detecção das variações genéticas.

11.2 Especificidade analítica

A especificidade do *artus* MTHFR LC PCR Kit é, em primeiro lugar, garantida através da selecção dos iniciadores (primers) e das sondas, assim como da selecção de condições de reacção optimizadas. Os iniciadores (primers) e as sondas foram verificados mediante uma análise de comparação de sequência quanto a eventuais homologias com todas as sequências publicadas em bancos de genes. Além disto, a especificidade para a detecção deste polimorfismo genético através da sequenciação de cada variação de alelo e por fim a comparação das sequências é garantida em bancos internacionais de dados.

11.3 Sensibilidade e especificidade diagnósticas

Mediante 300 amostras de ADN foi, através da utilização dos componentes do kit, provada a frequência do polimorfismo na população caucasiana, assim como havia sido declarada na Botto & Yang (2000).

12. Indicações especiais sobre a utilização do produto

- Todos os reagentes devem ser utilizados exclusivamente para o diagnóstico in vitro.
- A utilização deve ser efectuada por funcionários que tenham sido especialmente formados e instruídos nos processos de diagnóstico in vitro (EN375).
- A observância exata do protocolo é impreterivelmente necessária para se otimizar o resultado da PCR
- Ter em atenção a data de validade indicada na embalagem e nas etiquetas de cada componente. Não utilizar reagentes com prazo de validade expirado.

13. Informações de segurança

As informações de segurança do *artus* MTHFR LC PCR Kit podem ser obtidas nas Páginas de Material de Segurança (material safety data sheets, MSDS). Elas podem ser obtidas de na forma de informações PDF compactas e fáceis de utilizar em www.qiagen.com/support/msds.aspx.

14. Controlo de qualidade

De acordo com o Sistema de Administração de Qualidade certificado pelos ISO 9001 e ISO 13485 da QIAGEN, cada lote dos *artus* MTHFR LC PCR Kits foi testado de acordo com as especificações anteriormente apresentadas a fim de garantir a qualidade do produto.

15. Referência bibliográfica

- (1) Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2000 May 1; 151 (9): 862 - 877.
- (2) Junker R, Nowak-Göötli U, Fobker M. The methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and other genetic causes of hyperhomocysteinemia in venous thrombosis. *J Lab Med.* 2001; 25 (7/8): 239 - 253.
- (3) Kang SS, Wong PW, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet.* 1991 Mar; 48 (3): 536 - 545.
- (4) Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10 (3): 190 - 212.
- (5) Toffoli G, Veronesi A, Boiocchi M, Crivellari D. MTHFR gene polymorphism and severe toxicity during adjuvant treatment of early breast cancer with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil (CMF). *Ann Oncol.* 2000 Mar; 11 (3): 373 - 374.

16. Descrição dos símbolos



Prazo de Validade



Número do Lote



Fabricante



Referência de Catálogo



Número do material



Manual de instruções



Produto médico diagnosticado in vitro



Conteúdo é suficiente para <N> testes



Limites de Temperatura

Austria ■ **QIAGEN Vertriebs GmbH** ■ Löwengasse 47/6 ■ 1030 Wien

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

Canada ■ **QIAGEN Inc.** ■ 2800 Argentia Road ■ Unit 7 ■ Mississauga ■ Ontario ■ L5N 8L2

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

France ■ **QIAGEN S.A.** ■ 3 avenue du Canada ■ LP 809 ■ 91974 COURTABOEUF CEDEX

Orders 01-60-920-920 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930

Germany ■ **QIAGEN GmbH** ■ QIAGEN Strasse 1 ■ 40724 Hilden

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

Italy ■ **QIAGEN S.p.A.** ■ Via Grosio, 10/10 ■ 20151 Milano

Orders 02-33430-411 ■ Fax 02-33430-426 ■ Technical 800-787980

Japan ■ **QIAGEN K.K.** ■ Forefront Tower II ■ 13-1, Kachidoki 3 Chome ■ Chuo-ku, Tokyo 104-0054

Telephone 03-5547-0811 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-5547-0811

Switzerland ■ **QIAGEN AG** ■ Garstligweg 8 ■ 8634 Hombrechtikon

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

USA ■ **QIAGEN Inc.** ■ 27220 Turnberry Lane ■ Valencia ■ CA 91355

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

1046979PT 127132193