

# artus<sup>®</sup> MTHFR LC PCR Kit

## Manuale



24 (N. catalogo 4621063)



96 (N. catalogo 4621065)

Diagnostica qualitativa in vitro

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

Giugno 2007 – Versione 1



4621063, 4621065



1046979IT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R1

**MAT**

1046979IT

*artus* MTHFR LC PCR Kit

Marchi registrati e clausola di esclusione di responsabilità  
QIAGEN®, QIAamp®, *artus*® (Gruppo QIAGEN); *LightCycler*® (Roche Diagnostics).

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

L'*artus* MTHFR LC PCR Kit è un kit diagnostico contrassegnato CE secondo la Direttiva Europea per la diagnostica In Vitro 98/79/CE. Non disponibile in tutti i paesi.

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

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

© 2007 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

## Indice

<b>1. Contenuto.....</b>	<b>4</b>
<b>2. Conservazione .....</b>	<b>4</b>
<b>3. Materiali e dispositivi aggiuntivi richiesti.....</b>	<b>4</b>
<b>4. Precauzioni generali.....</b>	<b>5</b>
<b>5. Informazioni preliminari .....</b>	<b>5</b>
<b>6. Principio della procedura del test .....</b>	<b>6</b>
<b>7. Descrizione del prodotto.....</b>	<b>7</b>
<b>8. Protocollo.....</b>	<b>8</b>
8.1 Estrazione del DNA.....	8
8.2 Preparazione della PCR.....	8
8.3 Programmazione dello strumento <i>LightCycler</i> <sup>®</sup> .....	11
<b>9. Analisi dei dati .....</b>	<b>14</b>
<b>10. Risoluzione dei problemi .....</b>	<b>17</b>
<b>11. Specifiche.....</b>	<b>18</b>
11.1 Sensibilità analitica.....	18
11.2 Specificità analitica.....	18
11.3 Sensibilità e specificità diagnostiche.....	19
<b>12. Avvertenze speciali per l'uso del prodotto .....</b>	<b>19</b>
<b>13. Informazioni di sicurezza .....</b>	<b>19</b>
<b>14. Controllo di qualità .....</b>	<b>19</b>
<b>15. Riferimento bibliografico .....</b>	<b>20</b>
<b>16. Spiegazione dei simboli .....</b>	<b>21</b>

# artus<sup>®</sup> MTHFR LC PCR Kit\*

Kit da utilizzare con lo strumento *LightCycler*<sup>®</sup>.

## 1. Contenuto

	Etichettatura e contenuto	Art. N. 4621063 24 reazioni	Art. N. 4621065 96 reazioni
<b>Blu</b>	<i>MTHFR LC Master</i>	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
<b>Rosso</b>	<i>MTHFR LC Control</i>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
<b>Bianco</b>	<i>Water (PCR grade)</i>	1 x 1.000 µl	1 x 1.000 µl

## 2. Conservazione

I componenti dell'*artus* MTHFR LC PCR Kit devono essere conservati a -20°C e possono essere utilizzati fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Evitare di scongelarli e congelarli più di due volte, poiché ciò potrebbe provocare una riduzione della sensibilità. In caso di utilizzo non regolare è necessario congelare aliquote dei reagenti. Qualora fosse necessario conservare i componenti a +4°C, non superare l'intervallo massimo di cinque ore.

## 3. Materiali e dispositivi aggiuntivi richiesti

- Guanti da laboratorio senza talco
- Kit di estrazione del DNA (vedi **8.1 Estrazione del DNA**)
- Pipette (regolabili)
- Puntali con filtro sterili per pipette
- Agitatore vortex
- Centrifuga da banco con rotore per provette di reazione da 2 ml

---

\* MTHFR = metilenetetraidrofolato reductasi.

- *Color Compensation Set* (Roche Diagnostics, cat. n. 2 158 850) per l'installazione di un file *Crosstalk Color Compensation*
- Capillari *LightCycler*<sup>®</sup> (20 µl)
- Cooling block *LightCycler*<sup>®</sup>
- Strumento *LightCycler*<sup>®</sup>
- Capping Tool *LightCycler*<sup>®</sup>

#### 4. Precauzioni generali

Chi utilizza il prodotto deve sempre attenersi a quanto segue:

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

#### 5. Informazioni preliminari

Oltre all'età, il sesso, l'alimentazione e l'interazione tra farmaci altri fattori, in particolare quelli genetici, possono influenzare l'attività enzimatica. E' noto che pazienti che a causa di modificazioni genetiche presentano un'attività alterata dell'enzima metilene-tetraidrofolato reduttasi (MTHFR), in presenza di una terapia con metotrexato, corrono un rischio maggiore di effetti collaterali (p.es. gravi modificazioni nel sangue, mucositi, iperomocistinememia). Il metotrexato è un antagonista dell'acido folico e viene utilizzato tra l'altro per la terapia dell'artrite reumatoide e per le malattie tumorali. Un controllo del gene MTHFR consente di verificare il rischio geneticamente determinato di effetti collaterali indotti dalla terapia. Prima dell'inizio di una terapia si può stabilire se il paziente è portatore di una variante genetica del gene MTHFR e

eventualmente si può ricorrere a una terapia alternativa o a un dosaggio decisamente ridotto.

L'attività enzimatica della metilene tetraidrofolato reduttasi viene determinata, tra l'altro, anche da modificazioni all'interno del gene MTHFR. Mutamenti genetici per esempio possono avere come conseguenza uno scambio degli aminoacidi. La modificazione che risulta nella conformazione dell'enzima ne influenza la sua attività. Le più frequenti varianti genetiche nel gene MTHFR riguardano i nucleotidi nt 677 e nt 1298. In letteratura vengono descritti altre varianti genetiche, che però sono state osservate raramente o solo una volta in una popolazione.

L'enzima MTHFR è un componente fondamentale nel metabolismo dell'acido folico. Una sua ridotta attività può avere delle conseguenze sulla sintesi della metionina a partire dalla omocisteina. Poiché un incremento di omocisteina può causare diverse malattie (trombosi, arteriosclerosi), la presenza di una variante genetica nel gene MTHFR vuol dire un rischio maggiore per la comparsa di tali malattie.

La genotipizzazione può aiutare a ottimizzare individualmente terapie mediche, ad abbassare i costi causati da effetti collaterali indesiderati (degenza ospedaliera prolungata, ecc.) e a riconoscere in tempo la comparsa di un rischio di iperomocisteinemia geneticamente condizionato.

## **6. Principio della procedura del test**

Nella diagnostica genetica per mezzo della reazione a catena della polimerasi (PCR) vengono amplificate specifiche regioni del genoma umano. Nella real-time PCR il rilevamento ha luogo con l'ausilio di sostanze fluorescenti, di solito associate a sonde oligonucleotidiche, che si legano specificatamente all'amplicone di PCR. L'analisi della curva di dissociazione subito dopo l'amplificazione della PCR rende possibile l'identificazione e la differenziazione delle varianti del gene. Poiché le provette non devono essere più aperte dopo la corsa di PCR, il rischio di contaminazione viene decisamente ridotto (Mackay, 2004).

## 7. Descrizione del prodotto

Con l'*artus* MTHFR LC PCR Kit è possibile analizzare facilmente, rapidamente e efficacemente il DNA umano per verificare la presenza di varianti geneticamente significative nel gene MTHFR. Questa analisi permette di valutare i rischi legati ad alcune terapie, per esempio durante il trattamento con metotrexato.

L'analisi viene eseguita rilevando le varianti genetiche all'interno del gene MTHFR con l'aiuto dello strumento *LightCycler*<sup>®</sup>. I reagenti contengono dei primer per l'amplificazione di regioni del gene umano MTHFR e delle sonde marcate con fluorocromi per la rilevazione di varianti genetiche nelle posizioni dei nucleotidi nt 677C>T e nt 1298A>C. Inoltre parallelamente in una reazione separata viene eseguito un controllo positivo come controllo della reazione.

Poiché il test si basa sull'amplificazione del DNA genomico umano, i segnali di fluorescenza nel tratto delle curve di dissociazione devono essere rilevabili indipendentemente dalla comparsa di una variante allelica. Se non è così, questo indica un'estrazione inefficace del DNA o un'inibizione della PCR. Per cui in questo test genetico un ulteriore controllo interno non è necessario.

**Attenzione:** decisivi per l'analisi dei dati sono i segnali della curva di dissociazione. Usando l'*artus* MTHFR LC PCR Kit nella maggior parte dei casi non è stata osservata un'amplificazione quantitativa durante la corsa del *LightCycler*<sup>®</sup>. Ciò comunque non influenza l'analisi della curva di dissociazione.

## 8. Protocollo

### 8.1 Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA dal sangue sono disponibili kit di diversi produttori. Attenendosi al protocollo del produttore prescelto utilizzare la quantità di campione indicata e eseguire l'estrazione del DNA conformemente alle istruzioni. Si raccomanda l'utilizzo del seguente kit d'estrazione:

Campione	Kit di estrazione	Numero di catalogo	Produttore
sangue	QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	51 104	QIAGEN

- L'*artus* MTHFR LC PCR Kit non deve essere utilizzato con procedure di estrazione del DNA basate su **fenolo**.
- Nelle procedure di estrazione del DNA che richiedono l'utilizzo di tamponi di lavaggio contenenti **etanolo**, assicurarsi di eseguire una fase di centrifugazione aggiuntiva (tre minuti, 13.000 rpm) prima dell'eluizione, onde rimuovere residui di etanolo. Ciò impedisce eventuali inibizioni della PCR.

### 8.2 Preparazione della PCR

Assicurarsi che il cooling block e i relativi adattatori (accessori dello strumento *LightCycler*<sup>®</sup>) vengano raffreddati a +4°C. Posizionare negli adattatori del cooling block il numero di capillari *LightCycler*<sup>®</sup> necessario per le reazioni desiderate. Prima dell'inizio del test tutti i reagenti devono essere scongelati completamente a temperatura ambiente, ben miscelati (pipettamento ripetuto o breve agitazione su vortex) e infine centrifugati.

Per ogni applicazione bisogna considerare un controllo positivo (*MTHFR LC Control*) e un controllo negativo (*Water, PCR grade*), entrambi contenuti nell'*artus* MTHFR LC PCR Kit.

Per la preparazione delle reazioni di PCR attenersi al seguente schema di pipettamento (vedi anche panoramica schematica, Fig. 1):

	Numero dei campioni	
<b>Preparazione reazione PCR</b>	<i>MTHFR LC Master</i>	18 $\mu$ l
	campione	2 $\mu$ l
	<b>volume totale</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

Nel serbatoio in plastica di ciascun capillare pipettare 18  $\mu$ l di *MTHFR LC Master*. Quindi aggiungere 2  $\mu$ l di DNA estratto. Analogamente è necessario utilizzare come controllo positivo 2  $\mu$ l di *MTHFR LC Control* e come controllo negativo 2  $\mu$ l di acqua (*Water, PCR grade*). Chiudere i capillari. Per trasferire il contenuto del serbatoio in plastica ai capillari, centrifugare gli adattatori e i relativi capillari in una centrifuga da banco per 10 secondi alla velocità massima di 400 x g (2.000 rpm).

**Attenzione:** porre il tappo sui capillari con il Capping Tool *LightCycler*<sup>®</sup> al fine di evitare delle contaminazioni.

## Preparazione della PCR

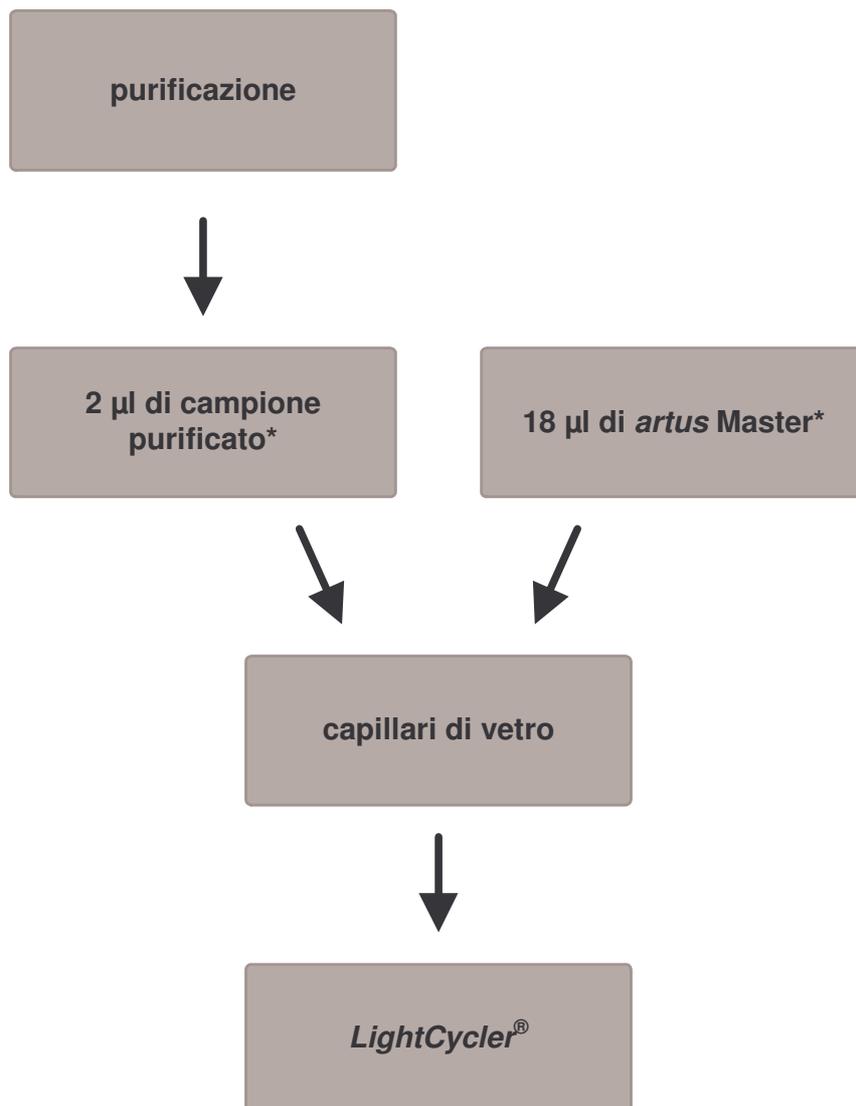


Fig. 1: Schema del ciclo di lavoro.

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

### 8.3 Programmazione dello strumento *LightCycler*<sup>®</sup>

Per rilevare le varianti genetiche nel gene MTHFR programmare sullo strumento *LightCycler*<sup>®</sup> un profilo di temperatura secondo le seguenti cinque fasi (vedi Fig. 2 - 6):

- |    |  |        |
|----|--|--------|
| A. | Attivazione iniziale dell'enzima Hot Start | Fig. 2 |
| B. | Touch Down                                 | Fig. 3 |
| C. | Amplificazione del DNA                     | Fig. 4 |
| D. | Curva di dissociazione                     | Fig. 5 |
| E. | Raffreddamento                             | Fig. 6 |

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

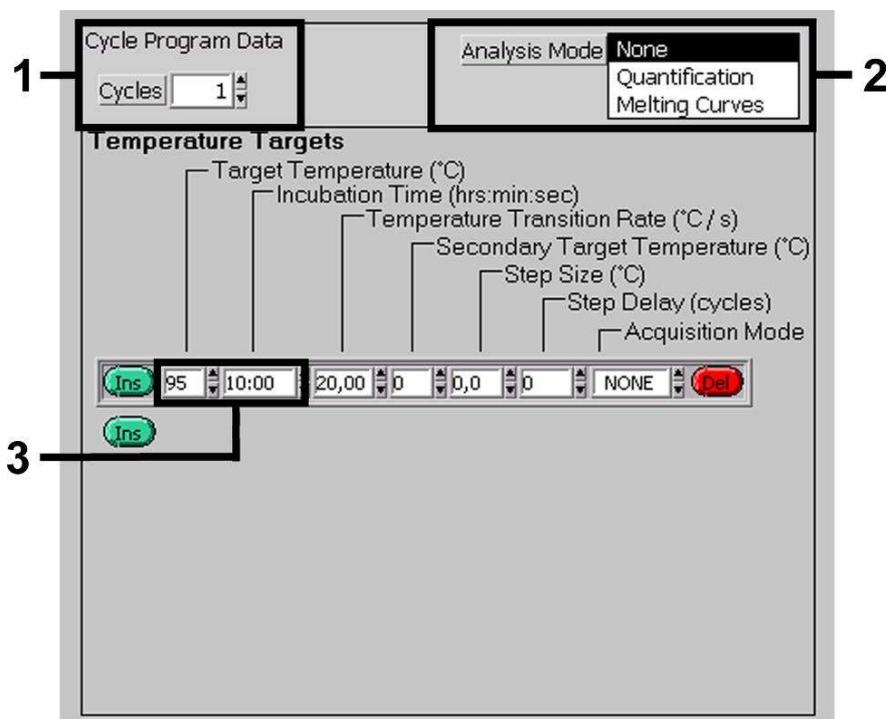


Fig. 2: Attivazione iniziale dell'enzima Hot Start.

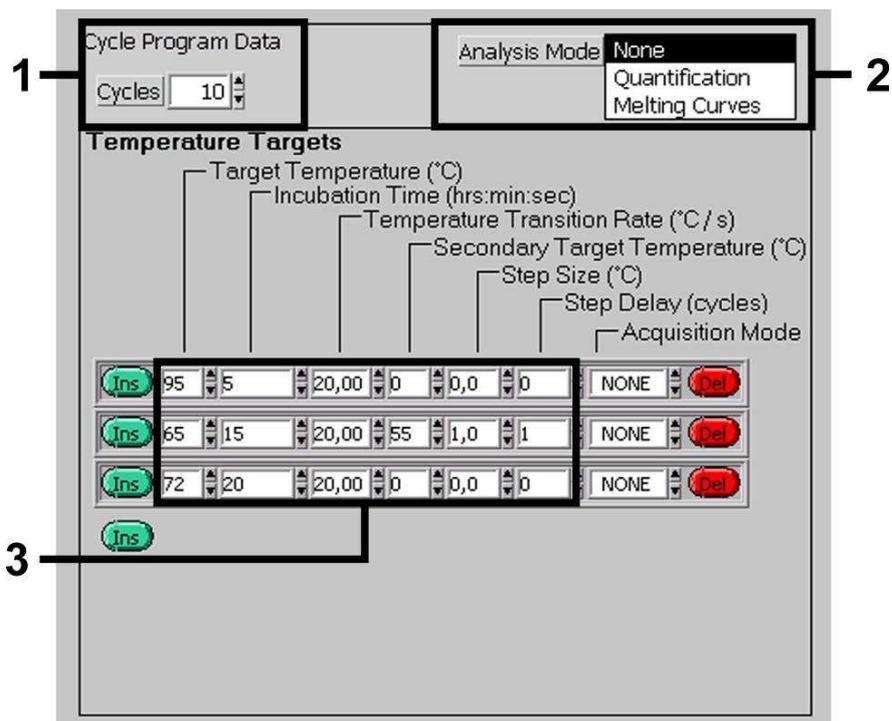


Fig. 3: Touch Down.

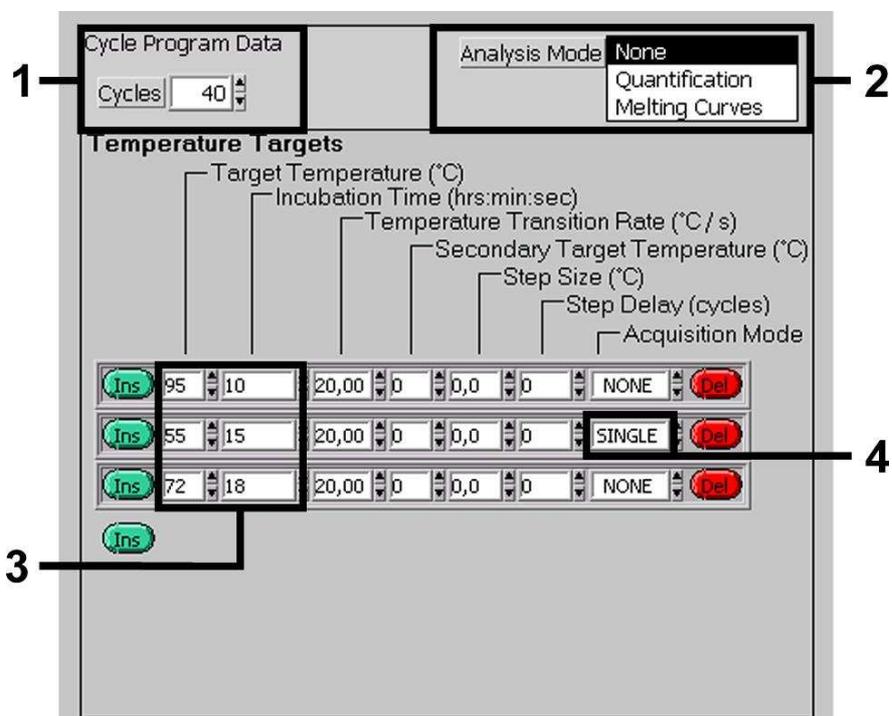


Fig. 4: Amplificazione del DNA.

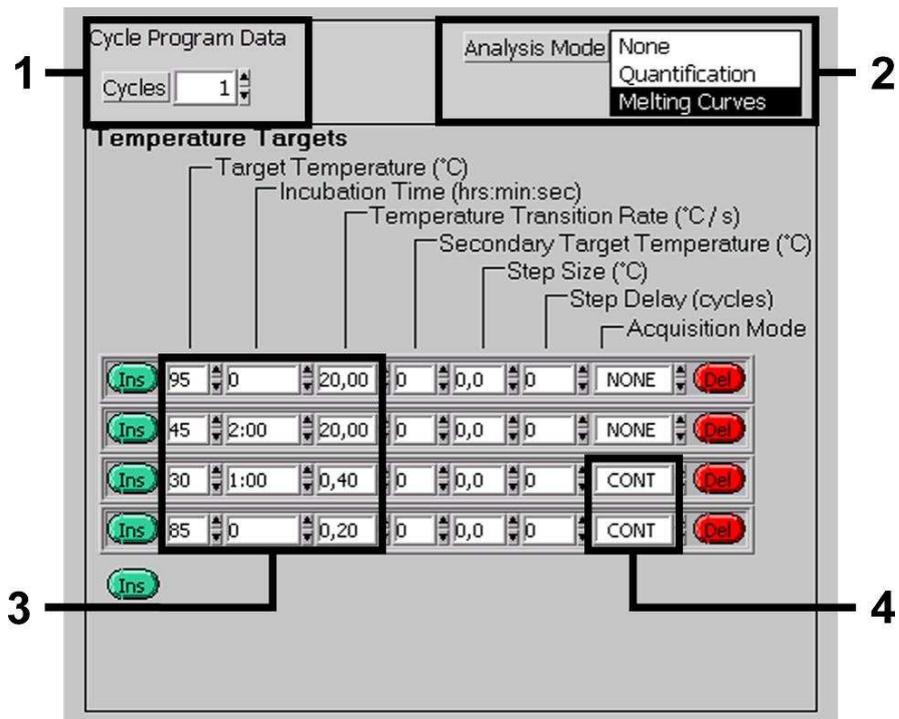


Fig. 5: Curva di dissociazione.

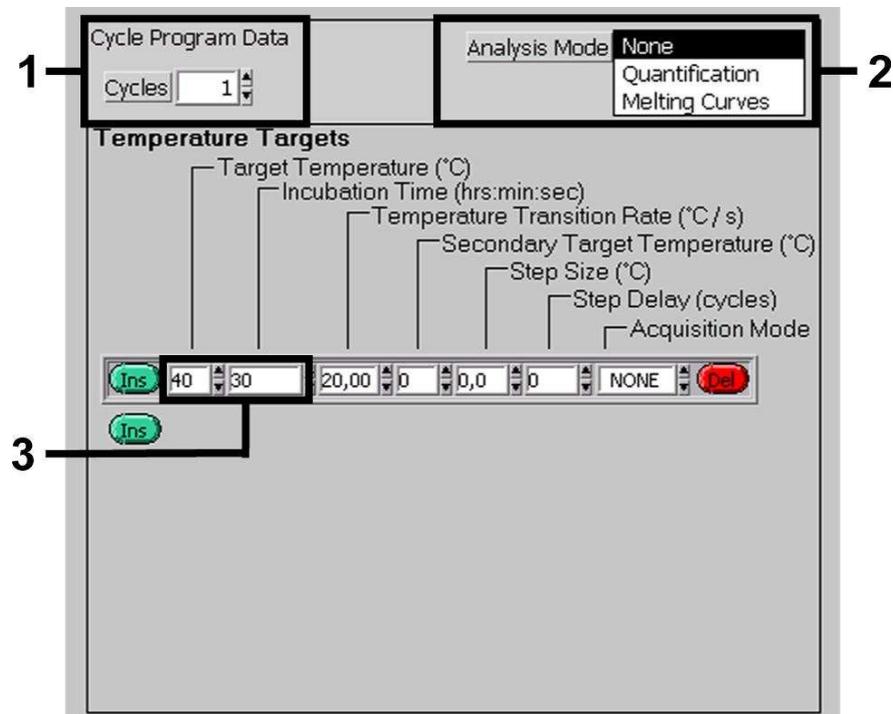


Fig. 6: Raffreddamento.

## 9. Analisi dei dati

Con le analisi Multicolor possono verificarsi interferenze tra i canali fluorimetrici. Il software dello strumento *LightCycler*<sup>®</sup> contiene un file denominato *Color Compensation File*, in grado di compensare queste interferenze. Aprire il file prima, durante o al termine della corsa di PCR, selezionando il pulsante *Choose CCC File* o *Select CC Data*. Se il *Color Compensation File* non è stato installato, procedere seguendo le indicazioni fornite in *LightCycler Operator's Manual*. Dopo l'attivazione del *Color Compensation File*, nei canali fluorimetrici F1, F2 e F3 compaiono segnali separati. Per l'analisi dei risultati della PCR ottenuti con l'*artus* MTHFR LC PCR Kit, scegliere la funzione F2/Back-F1 e F3/Back-F1 per la PCR di MTHFR. Usando l'*artus* MTHFR LC PCR Kit nella maggiorparte dei casi non è stata osservata un'amplificazione quantitativa durante la corsa del *LightCycler*<sup>®</sup>.

I componenti dell'*artus* MTHFR LC PCR Kit servono alla rilevazione di due varianti genetiche (tipo selvatico o *wild-type* = wt; variante = var) nelle posizioni dei nucleotidi nt 677 e nt 1298 nel gene MTHFR. Tali varianti genetiche possono essere determinate con l'aiuto del programma *Melting Curve*. Nel fluorogramma i punti di fusione alle temperature riportate nella tabella seguente (Tabella 1) indicano la presenza del *wild-type* o delle varianti genetiche. In presenza di eterozigoti la curva mostra due picchi.

Tabella 1: Punti di fusione del *wild-type* (wt) e delle varianti genetiche (var).

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

Tenere presente che i punti di fusione possono presentare degli scarti di  $\pm 2^\circ\text{C}$  dalla temperatura indicata. Per una migliore visuale nel fluorogramma, in molti casi è consigliabile spegnere il *Digital Filter*.

Le figure di seguito (Fig. 7 - 8) mostrano i fluorogrammi per la rilevazione di polimorfismi nelle posizioni dei nucleotidi nt 677 e nt 1298 sia in forma *wild-type* omozigote sia in forma di variante eterozigote e omozigote.

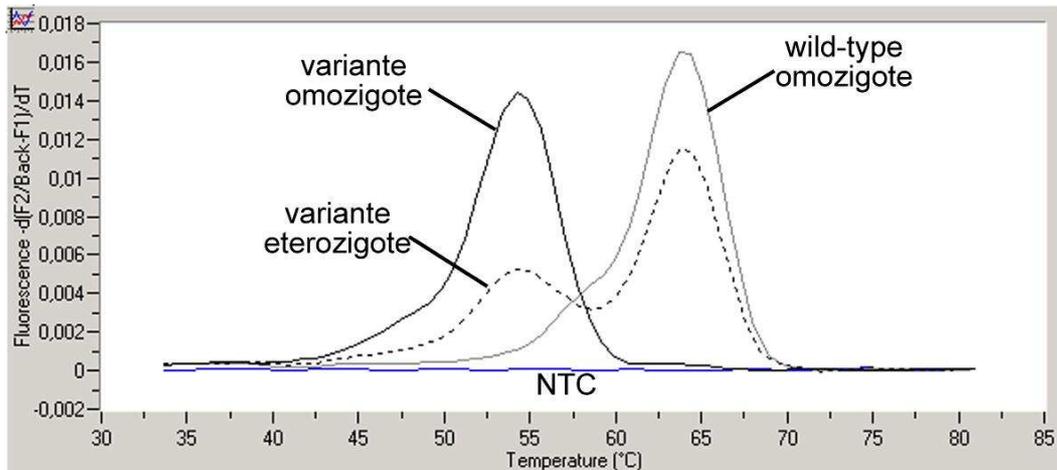


Fig. 7: Fluorogramma per la rilevazione dello scambio nucleotidico nt 677 con l'artus MTHFR LC PCR Kit nel canale fluorimetrico F2/Back-F1. NTC: non-template control (controllo negativo).

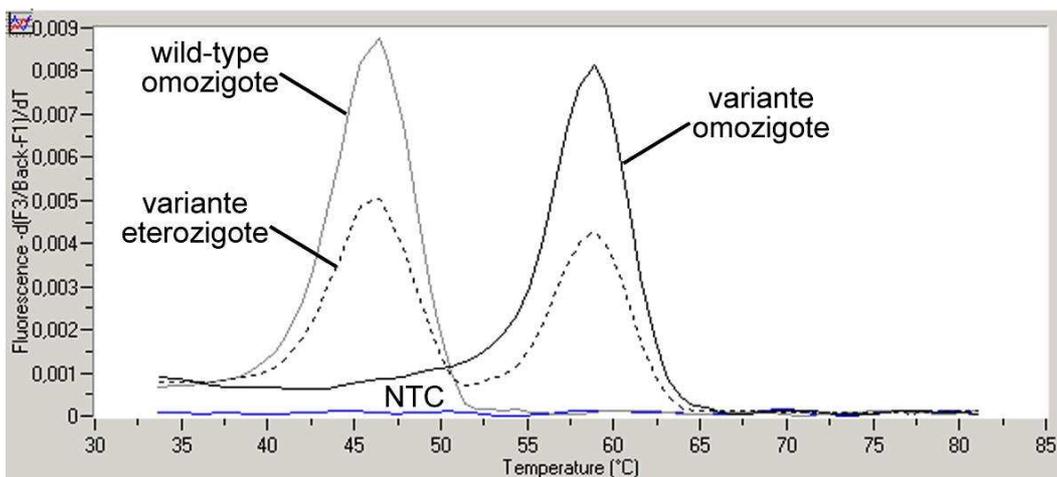


Fig. 8: Fluorogramma per la rilevazione dello scambio nucleotidico nt 1298 con l'artus MTHFR LC PCR Kit nel canale fluorimetrico F3/Back-F1. NTC: non-template control (controllo negativo).

E' possibile determinare il genotipo combinando le varianti alleliche. In questo caso notare che in presenza di due varianti eterozigoti esse possono essere insieme in un allele o anche in due alleli. Finora nella letteratura non è stato mai riferito della presenza combinata delle due varianti genetiche in forma omozigote. In ogni caso in presenza di almeno una delle varianti genetiche ci si può attendere una riduzione dell'attività enzimatica di MTHFR.

Ci si può aspettare una normale attività enzimatica in portatori di due alleli di *wild-type*, sempre premesso che nessun altro fattore non-genetico influenzi l'attività enzimatica. Un'attività enzimatica limitata si attende in tutti i portatori di almeno un allele geneticamente modificato (MTHFR wt677/var677, wt1298/var1298). Se sono interessati entrambi gli alleli aumenta il rischio di un effetto collaterale geneticamente condizionato.

Dagli alleli precedentemente descritti risultano diversi possibili genotipi, come elencati nella tabella seguente (Tabella 2).

Tabella 2: Influenza del genotipo sull'attività enzimatica.

<b>Genotipo <i>wild-type</i> omozigote</b>	<b>Genotipo variante eterozigote</b>	<b>Genotipo variante omozigote</b>
MTHFR wt677/wt677 wt1298/wt1298	MTHFR wt677/var677 wt1298/wt1298	MTHFR var677/var677 wt1298/wt1298
	MTHFR wt677/wt677 wt1298/var1298	MTHFR wt677/wt677 var1298/var1298
	MTHFR wt677/var677 wt1298/var1298	
<b>Normale attività enzimatica</b>	<b>Attività enzimatica ridotta</b>	

Il controllo positivo (*MTHFR LC Control*) contenuto nell'*artus* MTHFR LC PCR Kit rappresenta lo stato dell'allele eterozigote (vedi Fig. 7 e 8).

## 10. Risoluzione dei problemi

**Nessun segnale per i controlli positivi (*MTHFR LC Control*) o per i campioni nel canale fluorimetrico F2/Back-F1 o F3/Back-F1, rispettivamente:**

- Errata programmazione del profilo della temperatura dello strumento *LightCycler*<sup>®</sup>.
  - Confrontare il profilo della temperatura con quanto indicato nel protocollo (vedi **8.3 Programmazione dello strumento *LightCycler*<sup>®</sup>**).
- Errata preparazione della reazione PCR.
  - Con l'aiuto dello schema di pipettamento (vedi **8.2 Preparazione della PCR**) verificare nuovamente le fasi operative eseguite e eventualmente ripetere la PCR.
- Le condizioni per la conservazione di uno o più componenti del kit non corrispondono a quanto indicato in **2. Conservazione** o è stata superata la data di scadenza dell'*artus* MTHFR LC PCR Kit.
  - Verificare sia le condizioni di conservazione che la data di scadenza (vedi etichetta del kit) dei reagenti e utilizzare eventualmente un nuovo kit
- La PCR è stata inibita.
  - Assicurarsi di utilizzare una delle procedure di estrazione raccomandate (vedi **8.1 Estrazione del DNA**) e attenersi scrupolosamente alle indicazioni del produttore.
  - Accertarsi che durante l'estrazione del DNA e prima dell'eluizione sia stata eseguita l'ulteriore fase di centrifugazione consigliata per eliminare eventuali residui di etanolo (vedi **8.1 Estrazione del DNA**).
- C'è stata una perdita di DNA durante l'estrazione.
  - Assicurarsi di utilizzare una delle procedure di estrazione raccomandate (vedi **8.1 Estrazione del DNA**) e attenersi scrupolosamente alle indicazioni del produttore.

### **Picco di fluorescenza debole**

- Miscelare accuratamente i componenti prima del loro utilizzo.
- Controllare le condizioni dell'amplificazione.
- Preraffreddare il cooling block con i rispettivi adattatori a circa +4°C.
- Raffreddare tutti i reagenti durante il pipettamento.

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

## **11. Specifiche**

### **11.1 Sensibilità analitica**

L'*artus* MTHFR LC PCR Kit serve ad analizzare la costituzione individuale genetica riguardo alle varianti genetiche nt 677 e nt 1298 nel gene umano MTHFR, con l'ausilio della tecnologia *LightCycler*<sup>®</sup>. Il DNA genomico umano è stato purificato dai campioni di sangue, quantificato allo spettrofotometro e sono state eseguite delle diluizioni seriali. Un minimo di 0,12 ng di DNA genomico (20 copie) per PCR (corrispondente a 0,005 - 0,02 µl di sangue, a seconda del paziente e della purificazione) è sufficiente per la rilevazione delle varianti genetiche.

### **11.2 Specificità analitica**

La specificità dell'*artus* MTHFR LC PCR Kit viene garantita in primo luogo dalla scelta dei primer e delle sonde, nonché dalle condizioni stringenti della reazione di PCR. Primer e sonde sono stati controllati per mezzo di un'apposita analisi di confronto delle sequenze, onde verificare l'eventuale presenza di omologie con tutte le sequenze pubblicate nelle banche genomiche. In seguito la specificità per la rilevazione del polimorfismo genetico è stata assicurata sequenziando le singole varianti alleliche e confrontando di seguito le sequenze con le banche dati internazionali.

### **11.3 Sensibilità e specificità diagnostiche**

In base a 300 campioni di DNA e utilizzando i componenti del kit è stata confermata la frequenza di polimorfismi nella popolazione caucasica, come indicato in Botto & Yang (2.000).

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

- Tutti i reagenti devono essere impiegati esclusivamente per la diagnostica in vitro.
- L'utilizzo è consentito soltanto a personale dotato delle necessarie conoscenze e competenze in merito alle procedure della diagnostica in vitro (EN375).
- Per ottenere risultati PCR ottimali è assolutamente necessario attenersi al protocollo.
- Rispettare le date di scadenza dei singoli componenti, riportate sulla confezione e sulle etichette. Non utilizzare reagenti scaduti.

## **13. Informazioni di sicurezza**

Per le informazioni di sicurezza riguardanti l'*artus* MTHFR LC PCR Kit consultare la relativa scheda di sicurezza (material safety data sheet, MSDS), disponibile all'indirizzo [www.qiagen.com/support/msds.aspx](http://www.qiagen.com/support/msds.aspx) nel comodo e compatto formato PDF.

## **14. Controllo di qualità**

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

## 15. Riferimento bibliografico

- (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. Spiegazione dei simboli



Utilizzare entro



Codice del lotto



Fabbricante



Numero di catalogo



Numero di materiale



Manuale



Dispositivo medico per diagnostica in vitro



Contenuto sufficiente per <N> test



Limiti di 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)

1046979IT 127132193