SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

Produktinformation

- Forschungsprodukte & Biochemikalien
- Zellkultur & Verbrauchsmaterial
- Diagnostik & molekulare Diagnostik
- Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!
See the following pages for more information!

Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere Liefer- und Versandbedingungen

Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

mail@szabo-scandic.com

www.szabo-scandic.com

linkedin.com/company/szaboscandic

quanty HSV1 (gB gene)

REF: RT-18/1

Detection and quantification of the Herpes Simplex Virus 1 genome with *Real Time PCR*

INTRODUCTION AND PURPOSE OF USE

The quanty HSV1 system is a quantitative test that allows the DNA amplification and quantification, by means of *Real Time PCR*, of HSV1 genome.
The Procedure allows the detection of the DNA target by means a genomic amplification reaction.
The analysis of the results is made using a Real Time PCR analyzer (thermal cycler integrated with a system for fluorescence detection and a dedicated software).

CONTENT

The kit contains reagents enough to perform 48 amplification tests

	Quantity	Description
R1	3 x 220 µl	**Amplification mMix** dNTPs, Tris-HCl, KCl, $MgCl_2$, Taq Polymerase, *AmpErase* Uracil N-Glycosylase (*UNG)* Nuclease-free water, ROX (Blue Cap)
R2	3 x 130 µl	**HSV1 probes Mix** Upstream primer, downstream primer, Target probe (FAM), Internal control (β-globina) Probe (VIC) Nuclease-free water (Green Cap)
R3	3 x 35 µl	Cloned DNA corresponding to the gB-gene at the concentration of 10^5 copies/µl
R4	3 x 35 µl	Cloned DNA corresponding to the gB-gene at the concentration of 10^4 copies/µl
R5	3 x 35 µl	Cloned DNA corresponding to the gB-gene at the concentration of 10^3 copies/µl
R6	3 x 35 µl	Cloned DNA corresponding to the gB-gene at the concentration of 10^2 copies/µl
R7	3 x 100 µl	Inhibition control
R8	1 x 30 µl	**Negative Control (Yellow Cap)**

Instruction for use: **ST. RT18/1-ENG.0**

MATERIALS AND STRUMENTATION REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

Disposable latex powder-free gloves or similar material;
Bench microcentrifuge (12,000 - 14,000 rpm);
Micropipettes and Sterile tips with aerosol filter;
Vortex;
Plastic materials (microplate and optica adesive cover);
Heat block (only for extraction)
EZ1 Advanced XL DSP Virus Card. - Ref. 9018703 - QIAGEN.
ATL Buffer - Ref. 939016 - QIAGEN.

Reagents

The **quanty HSV1** kit was developed and validated to be used with the following extraction method:

Manual Extraction

Ref. 51304/51305
QIAmp DNA mini kit.
The kit allows the DNA extraction from tested samples. The kit contains reagents for 50/250 samples.(QIAGEN).

Automatic Extraction

Ref. 62724. EZ1 XL DSP Virus Kit
The kit allows the automatic viral DNA from Human samples.
The kit contains reagents for 48 samples. (QIAGEN)

Instruments

The **quanty HSV1** kit was developed and validated to be used with the following instruments:

Extraction System

Ref. 9001492. EZ1 Advanced XL.
Robotic Workstation for the automatic purification of the nucleic acids until 14 samples simultaneously (QIAGEN)

Real Time PCR

The **quanty HSV1** kit was developed and validated to be used with the following real time PCR instruments:

- *7500 Fast* from Lifetechnologies
- *Versant kPCR AD* from *Siemens or Stratagene MX3005P*
- *Rotor-Gene Q* MDx from QIAGEN
- *CFX96 Real Time PCR System* from *Bio-Rad*
- *LightCycler 480* from Roche

Please ensure that the instruments have been installed, calibrated, checked and maintained according to the manufacturer's instruction and raccommendations

SAMPLES AND STORAGE

The **quanty HSV1** system must be used with extracted DNA from the following biological samples: **Blood EDTA, CSF and Swab**

Collected material must be shipped and stored at +2 - +8°C. Store the samples at -20°C if not used within 3 days.

PRECAUTIONS USE

This kit is for in *vitro* diagnostic (IVD), for professional use only and not for in vivo use.
After reconstitution, the amplification master mix must be used in one time (16 reactions). Repeat thawing and freezing of reagents (more than twice) should be avoided, as this might affect the performance of the assay. The reagents should be frozen in aliquots, if they are to be used intermittently.
At all times follow Good Laboratory Practice (GLP) guidelines.
Wear protective clothing such as laboratory coats and disposable gloves while assaying samples.
Avoid any contact between hands and eyes or nose during specimens collection and testing.
Handle and dispose all used materials into appropriate bio-hazard waste containers. It should be discarded according to local law.
Keep separated the extraction and the reagents preparation.
Never pipette solutions by mouth.
Avoid the air bubbles during the master mix dispensing. Eliminate them before starting amplification.
Wash hands carefully after handling samples and reagents.
Do not mix reagents from different lots.
It is not infectious and hazardous for the health (see Material Safety data Sheet – MSDS).
Do not eat, drink or smoke in the area where specimens and kit reagents are handled.
Read carefully the instructions notice before using this test.
Do not use beyond the expiration date which appears on the package label.
Do not use a test from a damaged protective wrapper.

LIMIT OF THE METHOD

The extreme sensitivity of gene amplification may cause false positives due to cross-contamination between samples and controls. Therefore, you should:

- physically separate all the products and reagents used for amplification reactions from those used for other reactions, as well as from post-amplification products;
- use tips with filters to prevent cross-contamination between samples;
- use disposable gloves and change them frequently;
- carefully open test tubes to prevent aerosol formation;
- close every test tube before opening another one.

The proper functioning of the amplification mix depends on the correct collection, correct transportation, correct storage and correct preparation of a biological sample.
As with any diagnostic device, the results obtained with this product must be interpreted taking in consideration all the clinical data and other laboratory tests done on the patient.
A negative result obtained with this product suggests that the DNA of HSV1 was not detected in DNA extracted from the sample, but it may also HSV1 DNA at a lower titre than the detection limit for the product (detection limit for the product, see paragraph on Performance Characteristics); in this case the result would be a false negative.
As with any diagnostic device, with this product there is a residual risk of obtaining invalid, false positives or false negatives results.

STORAGE AND STABILITY

Store the product ***quanty HSV1*** (gB gene) at –20°C..
The ***quanty HSV1*** kit is shipped on dry ice. The kit components should be frozen. An intact and well stored product has a stability of 12 months from the date of production. Do not use beyond the expiration date which appears on the package label.
Repeat thawing and freezing of reagents (more than twice) should be avoided, as this might affect the performance of the assay. The reagents should be frozen in aliquots, if they are to be used intermittently.

ANALYTICAL PROCEDURE

Manual Extraction

Ref. 51304/51305 - QIAmp DNA mini kit. (QIAGEN).

Procedure to Whole blood

Follow the instructions inside the kit *QIAmp DNA mini kit*.
Elute the sample in 50 µl of buffer AE

Procedure to, CSF and Swab

Follow the instructions inside the kit *QIAmp DNA Mini Kit*.
After the lysis step at 56°C, add 5 µl of Inhibition Control to the samples.
Follow the instructions inside the kit
Elute the sample in 50 µl of buffer AE

Automatic Extraction

Ref. 62724 - EZ1 XL DSP Virus Kit su strumento *EZ1 Advanced XL.*

Procedure to Whole Blood

Follow the instructions inside the kit *EZ1 XL DSP Virus Kit.*
Volume of sample to be used:

Whole blood [µl]	*ATL [µl]*	*Final volume Samples [µl]*
200	*200*	*400*

Preparation of the Carrier

Solve completely the lyophilize RNA carrier in elution buffer (AVE), from 310 µl, split in aliquots and store to –20 ± 5°C. Not thawing and freezing the aliquots more than 2 times.
For each analyzed sample, dilute 3,6 µl of a original solution include the RNA Carrier in total volume of 60 µl using elution buffer (AVE)
Follow the instructions inside the kit *EZ1 XL DSP Virus Kit.*
Select the protocol starting from 400 µl of samples with the elution of 60 µl.

Procedure to, Liquor and Swab

Follow the instructions inside the kit *EZ1 XL DSP Virus Kit*.
Volume of sample to be used: 200µl

Preparation of the Carrier and the Internal Control (Inhibition Control).

Solve completely the lyophilize RNA carrier in elution buffer (AVE), from 310 µl, split in aliquots and store to –20 ± 5°C. Not thawing and freezing the aliquots more than 2 times.
For each analyzed sample, dilute 3,6 µl of a original solution include the RNA Carrier and 5 µl of *Inhibition Control* in total volume of 60 µl using elution buffer (AVE)

Follow the instructions inside the kit *EZ1 XL DSP Virus Kit*.
Select the protocol starting from 200 µl of samples with the elution of 60 µl.

SOFTWARE SETTING

Lifetechnologies 7500 fast

Turn the instrument and the computer on and open the control software. Click on "**Advance Setup**": by default the sofware will shows the page "**experiment properties**". Write in the "**experiment name**" the file name, choose the type of instrument (**7500 or 7500fast),** the type of reaction (**quantitation standard curve),** the type of used reagent (**Taqman®Reagents**) and the reaction time of analysis (**Standard ≈ 2 hours to complete a run**).
Open the page named "**page setup"** (sheet **Define Target and Samples**).
In the window **Define Targets** set:

Target	Reporter	Quencer
HSV1 probe:	FAM	NFQ-MGB
IC (β-globin) **probe:**	VIC	TAMRA

Set the samples' name in the window "**Define Samples**".
In the same page "**plate setup**" select the sheet "**Assign Target and Samples**". On the screen you will see the microplate draft.
Select an area of the plate where the controls will be placed: select wells of the plate and set both targets (HSV1 and β-globin). Select "**Assign target to selected wells**" in the blank, the "**task Standard (S)**" for HSV1 target and set the controls' concentration.
Choose an area in the plate where negative control will be placed: select "**Assign target to selected wells**" in the blank, the "**task Negative (N)**" for the HSV1 target.
Select an area of the plate where samples will be placed: select the wells and set both targets (HSV1 and β-globin). Link every well to a sample, through the window "**Assign samples to selected wells**".
For each sample, select in the blank "**Assign targets to selected wells**" the "**task UnKnown (U)**" for the HSV1 target.
Set ROX as passive reference, using it as normalizer of detecting fluorescence.
Open "**Run Method**" (sheet **Graphic View**) and set the right thermal cycling:

cycles	denaturation	annealing/extension
1	50° C 2 min	
1	95°C 10 min	
45	95° C 15 sec	60° C 1 min

In the window "**Reaction volume plate per well**" set a volume of 25 µl.
After preparing the plate, and correctly inserting it in the instrument, press the button "**Start Run**".

Versant kPCR AD or Stratagene MX3005P

Turn the instrument on and wait until both green lamps have fixed light, turn on the computer and start the control software. In the main screen will appear the window "**New Experiment Options**": select "**Experiment type": quantitative PCR (Multiple Standard).**
Turn the lamp on 20 minutes before doing a new experiment. For turning the lamp on, click on the icon of the lamp in the tool bar or select "**Lamp On**" from the menu **"Instruments".**
Verify the right setting of the gain of the fluorescent reporters: in the menu of settings, choose: **"Instrument"** and then **"Filter set gain setting"**.

Reporter	Gain
FAM	4
HEX	4
ROX	1

Click on button **"setup"** in the tool bar and choose "**Plate Setup".**
Sign the wells corresponding to calibrators. Define the calibrator's positions in right menu, setting:

Well type:	Collect Fluorescent Data:	Reference Dye:	Replicate Symbol:
Standard	FAM/HEX/ROX	ROX	None

Clicking on every single well, the window "**well information**" will appear: choose the name of the calibrator.
In the window "**Select Quantity**", set the concentrations of the 4 calibrators, following the instructions indicated in the paragraph **Interpretation of the results**.
Sign the wells correspondent to Negative control. Define the NTC positions in right menu, setting:

Well type:	Collect Fluorescent Data:	Reference Dye:	Replicate Symbol:
NTC	FAM/HEX/ROX	ROX	None

Clicking on every single well, the window "**well information**" will appear: set NTC as the name.
Sign the wells correspondent to the Samples. Define the samples positions in right menu, setting:

Well type:	Collect Fluorescent Data:	Reference Dye:	Replicate Symbol:
UnKnown	FAM/HEX/ROX	ROX	None

Clicking on every single well, the window "**well information**" will appear: set the name or the code of the sample.
It's possible, indeed, set near the name of fluorescent reporter the name of analyzed targets:

FAM	HEX
HSV1	β-Globin

In the tool bar choose the sheet **"Thermal Profile Setup"** and set the correct thermal cycle:

cycles	denaturation	annealing/extension
1	50° C 2 min	
1	95°C 10 min	
45	95° C 15 sec	60° C 1 min

After preparing the plate and inserting it in the instrument, press the button "**Run**", selecting the sheet Thermal profile status and check the correctness of thermal profile.
Select the box **Turn Lamp Off** at the end of execution. Push the button Start: the software will ask you to indicate the name of saved file. The analysis will start.

Rotor-Gene Q MDx

The experiments can be **set using the Quick Start Wizard or the** Advanced Wizard, which appears when the software is started.
Select the wizard "**Advanced**". As a first step, select the model "**Two Step Reaction**" with a double click in the "**New Run**".
In the next window, select the type of rotor installed on the instrument from the list that appears. Check the "**Locking Ring Attached**", check the checkbox and then click "**Next**".
Enter the name of the operator and the reaction volume of 25 µl, and then click "**Next**".
In the next window click on "**edit profile**". Set the following thermal cycle:

cycles	denaturation	annealing/extension
1	50° C 2 min	
1	95°C 10 min	
45	95° C 15 sec	60° C 1 min

Select the annealing / extension from the thermal profile and click on "**Acquiring A to cycling**."
In the next window, select yellow from the available channels and add it to acquiring channel along with the green channel and click "**OK**". In the next window click on "**OK**" and then click "**Next**".
Click on "Edit Gain" button and set the following values for each channel:

Reporter	Gain
Green	5
Yellow	5

To begin the course, click on the button "**Start Run**". You can save the model before you begin your run by clicking on "**Save Template**".
After clicking on the button "**Start R**un" window appears "**Save As**". The stroke can be saved in the desired position by the user.
Once the run started, the window "**Edit Samples**" allows you to set the name of samples and controls in the positions in which they were loaded on the instrument.
Select the locations where they were positioned the controls of known concentration and designate them as HSV1 Standard. Clicking on the box next to "**Type**" correspondent, in the dropdown menu "**Samples**" you can select the type of sample being analyzed. Select "**Standards**". Enter the concentrations of the controls.
Select the location where you placed the Negative Control and name it as Negative Control. Clicking on the box next to "**Type**" correspondent, in the dropdown menu "**Samples**" you can select the type of sample being analyzed. Select "**Negative Controls**"
Select the location of each sample and enter the name or code of the patient. Clicking on the box next to "**Type**" correspondent, in the dropdown menu "**Samples**" you can select the type of sample being analyzed. Select "**UnKnown**"
At the end of the operation click "**OK**" in the "**edit samples**" and wait until the end of the race for the analysis (see "**Interpretation of Results**").

CFX96 Real Time PCR System

Turn the instrument and the computer on and start the control software. In the principal screen will appear the window "**Startup wizard**": select "**CFX96"** and press **"ok".** In the next window push "**create new**" and set the thermal protocol and the reaction volume (25µl):

cycles	denaturation	annealing/extension
1	50° C 2 min	
1	95°C 10 min	
45	95° C 15 sec	60° C 1 min

Save the protocol and click the next button. The software will open in default the sheet "**plate**". Click "**create new**", select **"Fluorophores button"** to choose fluorophores (FAM and VIC). Select the locations where they were positioned the controls of known concentration and choose the **"Sample Type" Standards.** Click "**Load**" check boxes to load fluorophores and Type or select Target Name. In the box "**laod concentration"** set the concentrations of the 4 calibrators, following the instructions indicated in the paragraph **Analysis of the results**.
Select the location where you placed the Negative Control. Choose the **"Sample Type" NTC.** Click "**Load**" check boxes to load fluorophores and Type or select Target Name
Select the location of each sample and enter the name or code of the patient. Choose the **"Sample Type" Unknown.** Click "**Load**" check boxes to load fluorophores and Type or select Target Name
Save the plate clicking the next button and start the experiment

LightCycler 480

Turn the instrument and the computer on and start the control software. In the principal screen, on "**Experiment Creation**" select the "**Plate type**" and push the "**New experiment**" button. The window "experiment" appears. On the "Run protocol" sheet set: Thermal protocol, Reaction volume (25µl) and Detection format (**dual colour hydrolysis probe**).

cycles	denaturation	annealing/extension
1	50° C 2 min	
1	95°C 10 min	
45	95° C 15 sec	60° C 1 min

Push the "**Subset editor**" button and in this window, select an area of the plate where controls and samples will be placed.
Push the "**Sample editor**" button. Select the correct workflow (Step1: **Abs quantification**), choose the samples Subset created in the step before and insert the name for each well. Choose the correct type for each well: Positive CTR, Negative CTR or Unknown sample.

Push again the "**experiment button**", insert the plate in the instrument and push "**start run**".

PREPARATION OF THE REACTIONS:

Defrost a tube of **Amplification mMix**;
Defrost a tube of **HSV1 probes Mix;**
Mix carefully by vortex **210µl** of **Amplification mMix** and **126µl** of **HSV1 probes Mix** (the mix as produced is enough to prepare **16 reactions** of amplification: **4 positive controls, 1 negative control and 11 samples**).
Distribute, in the amplification plate, **20µl** of just reconstituted mix in chosen positions as already set on the instrument software.
Distribute, in the negative control position, **5 µl** of solution taken by the negative control vial.
Distribute, in chosen position for each sample, **5 µl** of corresponding sample.
Distribute, in chosen positions for the positive controls, **5µl** of **10^2 copies/µl** solution**, 10^3 copies/µl** solution**, 10^4 copies/µl** solution **and 10^5 copies/µl** solution.
Seal up accurately the plate using an optichal adesive film and verify that there aren't air bubbles in the mix, to avoid the amplification interferences.
For the Rotor-Gene Q, seal each tube with the appropriate cap. The air bubbles presence is not influently; the rotor centrifugal force will allow automatic deletion.
Transfer the plate in the instrument and push the button "**Start Run**".

QUANTITATIVE ANALYSIS

Lifetechnologies 7500 Fast

At the end of the PCR run, the software automatically opens the "**Analysis**" window in the "**Amplification plot**" sheet on the menu on the left.
Select the wells corresponding to the positive control, negative control and samples for analysis.
Select in the "**Option**" window inside the "**Target**" pop-up menu the **HSV1 target**. Check the correct setting of the threshold.
Select in the "**Option**" window inside the "**Target**" pop-up menu the **IC Control target**. Check the correct setting of the threshold.
The analysis of the results is made selecting from the menu in the left the page **"Analysis"**. From the page "**Standard Curve**", maintaining open the sheet "**view well plate**" in the right side of the software select the wells containing the points of the curve and verify the parameters described in the paragraph "**Interpretation of the Results**" (coefficient of correlation, slope ecc…).
From the page "**Amplification Plot**" verify the amplification plot for every single sample.
Opening the sheet "**view well table**" in the right side of the software it is possible to verify the data obtained from experiments: Threshold Cycles, emitted fluorescence and the target quantification expressed in copies/reaction or copies/ml, depending on the settings of the calibration curve.
Clicking from the menu file and selecting the box export, the window "**export properties**" will open. Indicate the file name, select the position to save it (**Browse**) and click on button
"Start export". In this way the software will permit to save a excel file with all the data corresponding to selected experiment.

Versant kPCR AD or Stratagene MX3005P

Click on button "**Analysis**" in the toolbar. The software will open in default the sheet "**Analysis Term Setting**". Activate the buttons FAM and HEX in the lower part of the screen and select testing samples.
Click on sheet "**results**"; the software will open in default the page "**Amplification plot**". Check the correct setting of the threshold in the specific window "**Threshold fluorescence**", in the menu on the right of the screen.
Selecting the box "**Standard Curve**" from menu "**Area to Analyze**" it's possible to visualize the data related to the calibration curve and verify the parameters described in paragraph "**Interpretation of Results**" (coefficient of correlation, slope ecc…). Selecting the box **Text report**" from menu "**Area to Analyze**" in the right side of the screen it's possible to verify the data obtained from the experiments: Threshold Cycles, emitted Fluorescences and the target quantification expressed in copies/reaction o copies/ml depending on the settings of the calibration curve.
From the window **Text Report** it's possible to export the results obtained clicking **file, export** on main menu.

Rotor-gene Q MDX

At the end of the PCR run open the "**Analysis**" window. Select the "**Quantification**" sheet and click on "**cycling A (green)".**
Select from the menu **"Dynamic Tube"** and subsequently **"Slope correct"**.
Check the correct setting of the threshold in the space provided "**CT calculation – Threshold"**.

Open the "**Analysis**" window. Select the "**Quantification**" sheet and click on "**cycling A (yellow)".**
Select from the menu **"Dynamic Tube"** and subsequently **"Slope correct"**.
Check the correct setting of the threshold in the space provided "**CT calculation – Threshold"**.

Also in this case, you can print a report of the analysis by clicking on the **"Report"** window and selecting the file in the first **Quantification cycling A (green)** and then the file **cycling A (yellow).**

CFX96 Real Time PCR System

At the end of the PCR, select the "**quantitation**" sheet. On the top of the screen, select "**settings**" from the menu and choose "**Baseline Threshold…**" .
You can export the report pushing the paper block figure on the top of the screen.

LightCycler 480

When the run is completed select analysis and choose the correct kind of analysis you want: "**Abs Quant/Fit Points**". Choose the samples subset you want to analyze. Select the "**NoiseBand**" sheet, under the plot you can choose "**NoiseBand (Fluoresc.)**"; and move the line of the NoisBand on the plot with the mouse of your PC. Repeat this action for each fluorophore using the "**Filter comb"** button.
Clicking the sheet "**Analysis**" you can set the threshold choosing the option "Threshold(manual).

After setting parameters push the "**Calculate**" button. Repeat this action for each fluorophore

INTERPRETATION OF RESULTS

Through Real Time PCR reaction, it is possible to give the DNA quantification of HSV1 DNA, with the correct settings of positive controls values, that compose the calibration curve. This setting must consider all the dilutions and the passages that the sample has to be undergone during extraction and amplification steps.
The system can take over from 100.000.000 to about 10 copies of DNA a reaction.
The Ct values obtained from the amplification of 4 controls of known titre are used by the software for the calculation of the calibration curve from which the unknown samples are interpolated.
A proper functioning of the amplification mix can be verified analyzing these parameters:

Parameter	Ref
RTS conc. 10^5 copies/µl (FAM)	Ct ≤ 25
Correlation Coefficient	0.990 ≤ r^2 ≤ 1
Slope	-3,6 ≤ Slope ≤-3.2
PCR efficiency	90 ≤ efficiency ≤ 100

If the RTS amplification reaction at a concentration of 10^5 copies produces a Ct > 25 or undetermined the session can't be considered valid and must be repeated.
Verify that the correlation coefficient value (r^2), the slope or the reaction efficiency fit to the limited indicated in the above table or do not deviate much from them, which represent the ideal range for a proper PCR reaction.
By correctly setting the standards concentration as a function of the extraction system you can get the quantization of the sample directly in copies / ml:

		Manual Extr. Ref. 51304/51305 (QIAGEN)	Automatic Extr. Ref. 62724 (QIAGEN)	Alternative extract
	RTS 1	25.000.000 copies	30.000.000 copies	500.000 copies
	RTS 2	2.500.000 copies	3.000.000 copies	50.000 copies
	RTS 3	250.000 copies	300.000 copies	5.000 copies
	RTS 4	25.000 copies	30.000 copies	500 copies

When alternative systems are used sample concentration expressed in copies/ml will be obtained using the formula:

$$copie/ml = \frac{1000}{Ve} \times \frac{Ev}{Ea} \times C_{reaz}$$

where:
- **Ve:** extracted sample Volume expressed in µl
- **Ev:** eluted sample Volume during extraction step expressed in µl
- **Ea:** extracted sample volume used for amplification expressed in µl
- **C_{reaz}:** copies provided by the instrument.

As with any diagnostic device, the results obtained with this product must be interpreted taking in consideration all the clinical data and the other laboratory tests done on the patient.
As with any diagnostic device, with this product there is a residual risk of obtaining invalid, false positives or false negatives results.
The use of positive and negative controls in each amplification session allow to verify the correct functioning of the amplification mix and the absence of any contamination.
In the amplification reaction of each sample, the Ct values for the internal control (β-globine) specific probe are used to validate the analysis session, from extraction process until detection step.
A good extraction performances presents internal control (β-globin) threshold cycle between 22 and 25.
Be sure that emitted fluorescence from internal control amplification has not a Ct > 28 or undetermined. If a sample shows an undetermined HSV1 DNA and an internal control Ct >28, this means that there have been problems in the extraction stage or in the amplification stage; therefore the sample could be a false negative.
Repeat the sample.
It can be considered valid the samples with a Ct > 28 for the internal control, and a high concentration of HSV1 DNA. In this case, the competitive nature of PCR reaction can hide or disadvantage the internal control amplification.

Detector FAM	Detector VIC/Hex	PCR Run	Sample
Ct undetermined	Ct > 28 or undetermined	Not Valid	repeat
Ct undetermined	Ct < 28	Valid	Negative
High Ct	Ct < 28	Valid	Positive
Low Ct	Ct > 28 or undetermined	Valid	HighPositive

PERFORMANCES

Analytical sensitivity:

It is considered as analytical sensitivity the highest dilution (title) to which a positive sample can be diluted without the system losing the ability to detect with a positivity rate of ≥ 95%. The analytical sensitivity of the system was assessed by analyzing plasmid DNA, quantified by spectrophotometric analysis, containing the genomic regions of interest (glycoprotein B-gene) of the protozoan in serial dilutions.
The analytical sensitivity of **quanty HSV1** is determined by Probit analysis.

	Copies/ul	95% confidence interval
PROBIT ANALYSIS	1,63 cps/ul	Inf. 0,680 cps/ul Sup. 13,835 cps/ul

Clinical sensitivity:

It is considered as clinical sensitivity the ability to detect true positive samples in the totality of the samples screened as positive. The analysis was made on HSV1 positive samples and the test was performed following the method recommendations. Positive samples were confirmed with an other CE approved method available on the market.

Obtained results show a clinical sensitivity of 100%.

Traceability versus NIBSC controls material

The used standard (NIBSC code 08/224-xxx, CE Marked Material Human Herpes Virus 1 for NAT) to control the NIBSC does not associate a quantity. Verification is purely for assay specificity and cross-contamination between HSV1 and HSV2..

QIAmp DNA mini kit. (QIAGEN)

MANUALE EXTRACTION	HSV1	HSV-2
7500 Fast	Positive	Negative
Versant kPCR o Stratagene	Positive	Negative
Rotorgene-Q	Positive	Negative
CFX 96	Positive	Negative
Light Cycler	Positive	Negative

QCMD 2015 Herpes Simplex Virus (DNA) Programme EQA Panel Challenge 1

Herpes Simplex Virus was checked versus *QCMD 2015 Herpes Simplex Virus (DNA) Programme EQA Panel Challenge 1*

QCMD 2015 Herpes Simplex Virus (DNA) Programme EQA Panel Challenge 2

Herpes Simplex Virus was checked versus *QCMD 2015 Herpes Simplex Virus (DNA) Programme EQA Panel Challenge 2*

Linearity/Proportionality

System linearity is valued analyzing plasmidic DNA (pTZ-HSV1-RT), quantified by spectrophotometric analysis, containing the genomic regions of interest (glycoprotein B-gene) of the virus in serial dilutions (1:10) from 100.000.000 copies to 10 copies of DNA in 5µl of extracted material added in the amplification reaction.
The evaluation is performed analyzing 10 calibration curves, that showed these parameters:

RTS conc. 10^5 copie (FAM)	Ct ≤ 25	Medium Ct 22,44
Correlation Coefficient	0.990 ≤ r^2 ≤ 1	Medium r^2 0,999
Slope	-3,6 ≤ Slope ≤-3.2	Medium slope -3,540
PCR efficiency	90 ≤ Efficienza≤ 100	Medium Eff 92%

Reproducibility and Repeatability:

The reproducibility and repeatability of the system are valued analyizing 3 dilutions of plasmidic DNA containing the gB-gene of interest for HSV1 quantified by spectrophotometric analysis (pTZ-HSV1-RT) and 1 negative control (negative DNA). For each session 5 replicates are made for 3 different sessions, made by different workers, with 3 different lots.

Hypothetical value	Lot	N° ripetitions	Med. Reveal. Conc.	Inaccuracy %
100.000 copie	L0	60	533375	7%
100.000 copie	L1	60	542610	9%
100.000 copie	L2	60	495965	5%
1.000 copie	L0	60	4867	9%
1.000 copie	L1	60	5154	13%
1.000 copie	L2	60	4597	8%
10 copie	L0	60	46	13%
10 copie	L1	60	53	7%
10 copie	L2	60	46	18%

The medium inaccuracy % is 10%.

Diagnostic Specificity:

For the purposes of this evaluation is considered as diagnostic specificity the skill of the method of determining real negative samples. The diagnostic specificity of the system is valued analyzing human genomic samples tested and confirmed as negative with another disposable system.

Obtained results show a diagnostic specificity of 100%.

Analytical Specificity:

Test's specificity was guaranteed by the use of specific primers for HSV1.The alignment of the choose regions for specific primers' hybridization for HSV1 with available sequences of the gB-gene present in database, demonstrated: their conservation, the absence of significative mutations and the complete specificity for the analyzed target.

Cross-Reactivity:

To check the cross-reactivity of the assay, samples tested as positive for other parasites were analyzed following the method instructions.

Positive sample	7500 Fast	KVersant MX3005P	Rotorg-Q	CFX96	Light Cycler
CMV	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie
VZV	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie
EBV	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie
HHV-6	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie
HHV-8	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie
HSV-2	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie

INTERFERENCES

Verify that in the DNA extracted from the sample there is no contamination from mucoproteins and haemoglobin, to exclude possible inhibition of PCR reaction. The interference due to contaminants can be detected through a spectrophotometric analysis, verifying the ratio between the absorbance readings at 260 nm (maximum absorbtion of Nucleic Acids) and 280 nm (maximum absorbtion of Proteins). A pure DNA should have a ratio of approximately 1.8.

QUALITY CONTROL

It is recommended to include in each analytical run, as quality control of every extraction, amplification and detection step, an already tested negative and positive sample, or a reference material with known concentration
In accordance with the Clonit srl ISO EN 13485 Certified quality Management System, each lot of quanty HSV1 is tested against predetermined specification to ensure consistent product quality.

BIBLIOGRAPHY

Mazyar Ziyaeyan, Abdolvahab Alborzi, Afshin Borhani Haghighi, Marziyeh Jamalidoust, Mahsa Moeini, Bahman Pourabbas. ***"Diagnosis and quantitative detection of HSV DNA in samples from patients with suspected herpes simplex encephalitis***". Infect Dis 2011;15(3):211-214 Elsevier Editora Ltda

S Sugita, N Shimizu, K Watanabe, M Mizukami, T Morio,3 Y Sugamoto, M Mochizuki1. ***"Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis"***. Br J Ophthalmol 2008;92:928–932.

TECHNICAL ASSISTANCE

For any question and support please contact our Technical support:

e-mail: info@clonit.it
phone: +39 02 56814413

IVD	*In vitro* diagnostic device
	Read the instruction's manual
	Range of temperature
	Use within (dd/mm/yyyy: year-month)
LOT	Lot (xxxx)
REF	Code
	Manufacturer
Σ	Contains sufficient for <n> tests

EDMA code: 15040340
CND: W0105040311

The ***quanty HSV1*** kit is CE marked diagnostic kit according to the European *in vitro* diagnostic directive 98/79/CE.

CLONIT S.r.l.
Headquarter: Via Varese 20 – 20121 Milano
Production Site: Via B. Quaranta 57 - 20139 Milano
Tel. + 39. (0)2.56814413 fax. +39. (0)2.56814515
www.clonit.it - info@clonit.it

CE IVD
for *in vitro* diagnostic use

ST. RT18/1-ENG.0
Revision 28th December 2015

quanty HSV1 (gB gene)

REF: RT-18/1

Rilevazione e quantificazione del genoma di Herpes Simplex Virus 1 mediante *Real Time PCR*

INTRODUZIONE E DESTINAZIONE D'USO

Il prodotto **quanty HSV1** è un saggio quantitativo che consente la rilevazione e la quantificazione, mediante metodica *Real Time PCR*, del genoma di Herpes Simplex Virus 1 correttamente estratti da campioni biologici.
La procedura prevede il rilevamento del DNA target di interesse mediante una reazione di amplificazione genomica in micropiastra. L'analisi dei risultati viene effettuata tramite uno strumento di Real Time PCR, composto da un thermal cycler provvisto di un sistema di rilevamento della fluorescenza.

COMPOSIZIONE

Il sistema contiene reagenti sufficienti per l'esecuzione di 48 test.

	Quantità	Descrizione
R1	3 x 220 µl	**Amplification mMix** dNTPs, Tris-HCl, KCl, $MgCl_2$, Taq Polymerase, *AmpErase* Uracil N-Glycosylase (*UNG*) Nuclease-free water,ROX (Tappo Blu)
R2	3 x 130 µl	**HSV1 probes Mix** Upstream primer, downstream primer, Target probe (FAM), Internal control (β-globina) Probe (VIC), Nuclease-free water (Tappo verde).
R3	3 x 35 µl	DNA clonato corrispondente alla regione gB-gene a titolo noto 10^5 copie/µl.
R4	3 x 35 µl	DNA clonato corrispondente alla regione gB-gene a titolo noto 10^4 copie/µl.
R5	3 x 35 µl	DNA clonato corrispondente alla regione gB-gene a titolo noto 10^3 copie/µl.
R6	3 x 35 µl	DNA clonato corrispondente alla regione gB-gene a titolo noto 10^2 copie/µl.
R7	3 x 100 µl	**Controllo di Inibizione**
R8	1 x 30 µl	**Controllo negativo** (Tappo giallo)

Istruzioni per l'uso: **ST. RT18/1-ITA.0**

MATERIALE E STRUMENTAZIONE NECESSARIA MA NON FORNITA

Guanti senza polvere monouso in lattice o simili;
Micropipette e puntali sterili con filtro incorporato per la prevenzione di aerosol;
Vortex;
Materiale plastico monouso sterile (Micropiastra e pellicole ottiche adesive);
Microcentrifuga da banco;
Termoblocco (solo per estrazione manuale)
EZ1 Advanced XL DSP Virus Card. - Ref. 9018703 - QIAGEN.
ATL Buffer - Ref. 939016 - QIAGEN.

Reagenti

Il kit **quanty HSV1** è stato sviluppato e validato per essere utilizzato con i seguenti metodi di estrazione:

Estrazione Manuale

Ref. 51304/51305
QIAmp DNA mini kit. Il Sistema consente l'estrazione del DNA dai campioni in esame. Il kit contiene reagenti utili per 50/250 estrazioni (QIAGEN).

Estrazione Automatica

Ref. 62724. EZ1 XL DSP Virus Kit - Il kit permette l'estrazione automatica del DNA virale da campioni umani. Il kit contiene reagenti utili per 48 estrazioni. (QIAGEN).

Strumentazione:

Sistema Estrazione
Ref. 9001492. EZ1 Advanced XL. Robotic Workstation per la purificazione automatica degli acidi nucleici fino a 14 campioni simultaneamente (QIAGEN).

Real Time PCR
Il kit **quanty HSV1** è stato sviluppato e validato per essere utilizzato con i seguenti stumenti di Real Time PCR:

- *7500 Fast* fornito da Lifetechnologies
- *Versant kPCR AD fornito da Siemens o Stratagene MX3005P*
- *Rotor-Gene Q* MDx fornito da QIAGEN
- *CFX96 Real Time PCR System fornito da Bio-Rad*
- *LightCycler 480 fornito da* Roche

Assicurarsi che gli strumenti siano stati correttamente installati, calibrati e controllati con la manutenzione tecnica appropriata in accordo con le istruzione del produttore.

CAMPIONI E CONSERVAZIONE

Il prodotto **quanty HSV1** è progettato per essere utilizzato con DNA estratto dai seguenti campioni biologici **Sangue intero EDTA, Tampone e CSF.**
I campioni raccolti devono essere trasportati e conservati a +2-+8°C ed utilizzati entro 3 giorni dalla data del prelievo. Conservare il campione a -20°C se utilizzato dopo 3 giorni.

PRECAUZIONI D'USO

Il kit è per un uso diagnostico *in vitro* (IVD), per uso professionale e non per uso in vivo.
Una volta ricostituita, la miscela di amplificazione deve essere utilizzata in un'unica sessione (16 reazioni). Il congelamento e scongelamento dei reagenti più di due volte dovrebbe essere evitati, in quanto questo potrebbe influire sulle prestazioni del test. I reagenti devono essere congelati in aliquote, se devono essere utilizzati in modo intermittente.
Gli utilizzatori devono seguire le norme "Good Laboratory Practice" (GLP).
Indossare abiti protettivi come camice di laboratorio e guanti monouso durante la manipolazione di campioni.
Evitare il contatto con tra le mani e occhi o naso durante la raccolta ed uso dei campioni.
La raccolta di tutti i materiali utilizzati deve essere fatto in appositi contenitori e lo smaltimento svolto in accordo con le leggi locali.
Disporre aree separate per l'estrazione e l'allestimento delle reazioni.
Non pipettare a bocca alcuna soluzione.
Evitare la formazione di aria nel depositare la miscela all'interno delle provette. Eliminare ogni bolla prima di procedere con l'amplificazione.
Lavare bene le mani dopo aver maneggiato i campioni ed i reagenti.
Non scambiare reagenti provenienti da lotti diversi.
Non è infettivo o pericoloso per la salute (vedi schede di sicurezza).
Non mangiare, bere o fumare dove i campioni ed i kit vengono utilizzati.
Leggere attentamente le istruzioni d'uso prima di utilizzare il test.
Non utilizzare oltre la data di scadenza riportata sulla scatola.
Non utilizzare il kit se l'involucro è danneggiato.

LIMITI DEL METODO ED AVVERTENZE

L'elevata sensibilità della metodica di amplificazione genica rende possibile l'insorgenza di falsi positivi, dovuti a contaminazioni crociate fra campioni e controlli. E' pertanto necessario attenersi alle seguenti indicazioni:

- separare fisicamente tutti i materiali e reagenti dedicati alla reazione di amplificazione da quelli utilizzati per altre metodiche e dai prodotti già amplificati
- utilizzare puntali con filtro per evitare contaminazioni crociate fra campioni
- cambiare frequentemente i guanti
- aprire le provette con cautela per prevenire la formazione di aerosol
- chiudere ogni provetta prima di aprirne un'altra

L'ottimale funzionamento della miscela di amplificazione dipende dalla corretta raccolta, dal corretto trasporto, dal corretto stoccaggio nonché da una corretta preparazione del campione biologico prelevato.
L'esito di un risultato negativo, ottenuto con questo prodotto, suggerisce che non è stata rilevata la presenza del DNA di HSV1 nel DNA estratto dal campione. Questo non esclude che il campione possa contenere HSV1 DNA, ma con titolo inferiore al limite di rivelazione del prodotto (limite di rilevamento per il prodotto, vedere paragrafo Caratteristiche prestazionali); in questo caso il risultato sarebbe un falso negativo.
I risultati ottenuti utilizzando il prodotto devono essere interpretati considerando tutti i dati clinici e laboratoristici legati al paziente.
Come per qualunque altro dispositivo diagnostico, esiste un rischio residuo di ottenere risultati non validi che non può essere eliminato o ridotto ulteriormente.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare il prodotto **quanty HSV1** a –20°C.
Quanty HSV1 viene spedito in ghiaccio secco. I componenti del kit dovrebbero arrivare congelati. Se uno o più componenti non sono congelati al ricevimento, o se i tubi sono stati compromessi durante il trasporto, contattare Clonit srl per l'assistenza.
Il prodotto integro e correttamente conservato ha una stabilità di 12 mesi dalla data di produzione. Non utilizzare oltre la data di scadenza riportata sulla scatola.
Il congelamento e scongelamento dei reagenti più di due volte dovrebbe essere evitati, in quanto questo potrebbe influire sulle prestazioni del test. I reagenti devono essere congelati in aliquote, se devono essere utilizzati in modo intermittente.

PROCEDURA ANALITICA

Estrazione Manuale

Ref. 51304/51305 - QIAmp DNA mini kit. (QIAGEN).

Procedure da Sangue Intero
Seguire le istruzioni riportate nel kit *QIAmp DNA mini kit*. Eluire il campione 50 µl di buffer AE.

Procedure da Tampone e CSF
Seguire le istruzioni riportate nel kit *QIAmp DNA mini kit*.
Dopo la fase di lisi a 56°C, aggiungere 5 µl di Inhibition control.
Seguire le istruzioni riportate nel kit.
Eluire il campione 50 µl di buffer AE.

Estrazione Automatica

Ref. 62724 - EZ1 XL DSP Virus Kit su strumento *EZ1 Advanced XL*.

Procedure da Sangue Intero
Il presente protocollo è destinato al pretrattamento di campioni di sangue intero prima della purificazione degli acidi nucleici:

Sangue Intero [µl]	*ATL [µl]*	*Volume finale campioni [µl]*
200	*200*	*400*

Preparazione del Carrier.
Dissolvere completamente il carrier RNA (CARRIER) liofilizzato nel tampone di eluizione (AVE) da 310 µl, dividerlo in aliquote di dimensioni opportune e conservare a –20 ± 5°C. Non congelare–decongelare le aliquote più di 2 volte.

Per ogni campione elaborato, diluire 3,6 µl di una soluzione madre contenente il *carrier RNA (CARRIER)* in un volume totale di 60 µl utilizzando tampone di eluizione (AVE).

Seguire le istruzioni riportate nel manuale del kit *EZ1® DSP Virus*.
Selezionare il protocollo con volume iniziale di campione a 400 µl e volume di eluizione a 60 µl

Procedure da Tampone e Liquor
Seguire le istruzioni riportate nel manuale del kit *EZ1® DSP Virus*.
Utilizzare il seguente volume iniziale di campione: 200 µl

Preparazione del Carrier e del Controllo Interno (Inhibition Control).

Dissolvere completamente il carrier RNA (CARRIER) liofilizzato nel tampone di eluizione (AVE) da 310 µl, dividerlo in aliquote di dimensioni opportune e conservare a –20 ± 5°C. Non congelare–decongelare le aliquote più di 2 volte.

Per ogni campione elaborato, diluire 3,6 µl di una soluzione madre contenente il *carrier RNA (CARRIER)* e 5 µl di *Inhibition Control* in un volume totale di 60 µl utilizzando tampone di eluizione (AVE).

Seguire le istruzioni riportate nel manuale del kit *EZ1® DSP Virus*.
Selezionare il protocollo con volume iniziale di campione a 200 µl e volume di eluizione a 60 µl

IMPOSTAZIONI DEL SOFTWARE

Lifetechnologies 7500 Fast

Accendere lo strumento, il computer ed avviare il software di controllo. Dalla schermata principale del software cliccare sul bottone "**Advanced Setup**": di default il software vi mostra la pagina "**experiment properties**". Digitare nella finestra "**experiment name**" il nome con il quale verrà salvato l'esperimento. Scegliere il tipo di strumento che si utilizza (**7500 o 7500fast**), scegliere il tipo di esperimento (**quantitation-standard curve**), il tipo di reagenti utilizzati (**Taqman®reagents**) ed il tempo di reazione (**Standard ≈ 2 hours to complete a run**).
Aprire la pagina "**page setup**" (sheet **Define Target and Samples**).
Nella finestra "**Define Targets**" impostare:

Target	Reporter	Quencer
HSV1 probe:	FAM	NFQ-MGB
IC (β-globin) **probe:**	VIC	TAMRA

Nella finestra "**Define Samples**" impostare il nome dei campioni in analisi.
Sempre nella pagina "**plate setup**" selezionare lo sheet "**Assign Target and Samples**": comparirà nella vostra schermata la piastra schematizzata.
Scegliere una zona della piastra dove verranno posizionati i controlli: selezionare i pozzetti della piastra ed impostare entrambi i target (HSV1 e β-globina). Selezionare nello spazio "**Assign target to selected wells**" il "**task Standard (S)**" per il target HSV1 ed impostare le concentrazioni dei controlli.
Scegliere una zona della piastra dove verrà posizionato il controllo negativo: selezionare nello spazio "**Assign target to selected wells**" il "**task Negative (N)**" per il target HSV-1.
Scegliere una zona della piastra dove verranno posizionati i campioni: selezionare i pozzetti della piastra ed impostare entrambi i target (HSV1 e β-globina). Associare ad ogni pozzetto un campione in analisi mediante la finestra "**Assign samples to selected wells**".
Selezionare per ciascun campione nell'apposito spazio "**Assign targets to selected wells**" il "**task UnKnown (U)**" per il target HSV-1.
Impostare come passive reference, utilizzato come normalizzatore della fluorescenza rilevata, il ROX.
Aprire la pagina "**Run Method**" (sheet **Graphic View**) ed impostare il ciclo termico corretto:

cycles	denaturation	annealing/extension
1	50° C 2 min	
1	95°C 10 min	
45	95° C 15 sec	60° C 1 min

Nella finestra "**Reaction volume plate per well**" impostare il volume di 25 µl.
Non appena preparata la piastra, e dopo averla correttamente inserita nello strumento, premere il pulsante "**Start Run**".

Versant kPCR AD o Stratagene MX3005P

Accendere lo strumento ed attendere che le due lampade verdi abbiano luce fissa, accendere il computer ed avviare il software di controllo. Nella schermata principale del software apparirà la finestra di dialogo "**New Experiment Options**": selezionare "**Experiment type: quantitative PCR (Multiple Standard)".**
Accendere la lampada almeno 20 minuti prima di eseguire un nuovo esperimento. Per accendere la lampada cliccare sull'icona lampada dalla barra degli strumenti o selezionare "**Lamp On**" dal menù "**Strumenti**".
Verificare la corretta impostazione dei guadagni dei reporter fluorescenti: nel menù di impostazione scegliere **"Instrument"** e quindi **"Filter set gain setting"**.

Reporter	Gain
FAM	4
HEX	4
ROX	1

Cliccare sul pulsante **"setup"** nella barra degli strumenti e scegliere lo sheet "**Plate Setup".**
Contrassegnare i pozzetti corrispondenti ai calibratori. Definire le posizioni del calibratore nel menù di destra impostando:

Well type:	Collect Fluorescent Data:	Reference Dye:	Replicate Symbol:
Standard	FAM/HEX/ROX	ROX	None

Cliccando su ogni singolo pozzetto apparirà la finestra di dialogo "**well information**" in cui sarà possibile impostare il nome del calibratore.
Nella finestra "**Select Quantity**" impostare le concentrazioni dei 4 calibratori seguendo le istruzioni indicate nel paragrafo **Analisi dei Risultati**.
Contrassegnare i pozzetti corrispondenti ai controlli negativi. Definire le posizioni del calibratore nel menù di destra impostando:

Well type:	Collect Fluorescent Data:	Reference Dye:	Replicate Symbol:
NTC	FAM/HEX/ROX	ROX	None

Cliccando su ogni singolo pozzetto apparirà la finestra di dialogo "**well information**" in cui sarà possibile impostare NTC come nome.
Contrassegnare i pozzetti corrispondenti ai campioni clinici. Definire le posizioni del calibratore nel menù di destra impostando:

Well type:	Collect Fluorescent Data:	Reference Dye:	Replicate Symbol:
UnKnown	FAM/HEX/ROX	ROX	None

Cliccando su ogni singolo pozzetto apparirà la finestra di dialogo "**well information**" in cui sarà possibile impostare il nome o il codice del campione clinico.
Selezionare i pozzetti in analisi e Impostare, accanto al nome dei fluorofori, il nome del target in analisi:

FAM	HEX
HSV1	β-Globin

Nella barra degli strumenti scegliere lo sheet **"Thermal Profile Setup",** impostare il ciclo termico corretto e la lettura della fluorescenza in fase di annealing/extension.

cycles	denaturation	annealing/extension
1	50° C 2 min	
1	95°C 10 min	
45	95° C 15 sec	60° C 1 min

Non appena preparata la piastra, e dopo averla correttamente inserita nello strumento, premere il pulsante "**Run**", selezionare lo sheet Thermal profile status e controllare la correttezza del profilo termico.
Selezionare la casella **Turn Lamp Off** alla fine dell'esecuzione nella finestra di dialogo. Premere il pulsante **start**: il software vi chiederà di indicare il nome con cui salvare il file e avvierà l'analisi.

Rotor Gene Q MDx

Nuovi esperimenti possono essere impostati utilizzando la procedura guidata di avvio rapido o la procedura guidata avanzata, che appare quando il software viene avviato.
Selezionare la procedura guidata "**Advanced**". Come primo passo, selezionare il modello "**Two Step Reaction**" con un doppio clic nella finestra "**New Run**".
Nella finestra successiva, selezionare il tipo di rotore montato sullo strumento dalla lista che appare. Controllare il "**Locking Ring Attached**", spuntare la casella di controllo e quindi fare clic su "**Avanti**".
Inserire il nome dell'operatore e il volume di reazione di 25 µl e fare clic su "**Avanti**".
Nella finestra successiva fare clic su "**edit profile**". Impostare ciclo termico seguente:

cycles	denaturation	annealing/extension
1	50° C 2 min	
1	95°C 10 min	
45	95° C 15 sec	60° C 1 min

Selezionare la fase di annealing/extension dal profilo termico e fare clic su "**Acquiring to cycling A**".
Nella finestra successiva, selezionare il giallo da **available channel** e aggiungerlo a **acquiring channel** insieme al canale verde e fare clic su "**ok**".
Cliccare sul pulsante "Edit Gain" ed impostare i seguenti valori per i due canali interessati:

Reporter	Gain
Green	5
Yellow	5

Nella finestra successiva fare clic su "**ok**" e poi su "**Avanti**".
Per avviare la corsa, fare clic sul pulsante "**Start Run**". E' anche possibile salvare il modello prima di iniziare la corsa facendo clic su "**Save Template**".
Dopo aver fatto clic sul pulsante "**Start Run**", viene visualizzata la finestra "**Save As**". La corsa può essere salvata nella posizione desiderata dall'utente.
Una volta che la corsa è iniziata, la finestra "**Edit Samples**" permette di impostare il nome di campioni e controlli nelle posizioni in cui sono stati caricati sullo strumento.
Selezionare le posizioni dove sono stati posizionati i controlli a concentrazione nota e nominarli come **HSV1 Standard**. Cliccando sulla casellina "**Type"** corrispondente, nel menu a tendina "**Samples"** è possibile selezionare il tipo di campione che si sta analizzando. Selezionare "**Standards". Inserire le concentrazioni dei controlli.**
Selezionare la posizione dove è stato posizionato il controllo Negativo e nominarla come **Negative Control**. Cliccando sulla casellina "**Type"** corrispondente, nel menu a tendina "**Samples"** è possibile selezionare il tipo di campione che si sta analizzando. Selezionare "**Negative Controls"**
Selezionare la posizione di ogni singolo campione ed inserire il nome o il codice del paziente. Cliccando sulla casellina "**Type"** corrispondente, nel menu a tendina "**Samples"** è possibile selezionare il tipo di campione che si sta analizzando. Selezionare "**UnKnown"**
Al termine delle operazione cliccare **"OK"** nella finestra **"edit samples"** e attendere il termine della corsa per l'analisi (vedi "Interpretazione dei risultati").

CFX 96 Real Time PCR System

Accendere lo strumento, accendere il computer ed avviare il software di controllo. Nella schermata principale del software apparirà "**Startup wizard**": selezionare "**CFX96"** e cliccare il bottone **"ok".** Nella schermata successiva premere "**create new**" ed impostare il protocollo termico ed I volumi di reazione (25µl):

cycles	denaturation	annealing/extension
1	50° C 2 min	
1	95°C 10 min	
45	95° C 15 sec	60° C 1 min

Salvare il protocollo termico e cliccare "**Next**". Il software aprirà automaticamente la pagina "**Plate**". Premere "**create new**", premere il bottone **"Fluorophores button"** per selezionare i fluorofori corretti (FAM and VIC)**.** Selezionare i pozzetti contenenti i controlli a concentrazione nota e scegliere dal menù a tendina **"Sample Type"**: **Standards.** Cliccare "**Load check boxes**" per caricare i fluorofori scelti e scrivere o selezionare il Nome del Target
Nella finestra "**laod concentration"** impostare le concentrazioni dei 4 calibratori seguendo le istruzioni indicate nel paragrafo **Interpretazione dei Risultati**.
Selezionare i pozzetti contenenti il controllo negativo e scegliere dal menù a tendina **"Sample Type": NTC.** Cliccare "**Load check boxes**" per caricare i fluorofori scelti e scrivere o selezionare il Nome del Target
Selezionare i pozzetti contenenti i campioni in esame e scegliere dal menù a tendina "Sample Type"**:** Unknown. **Cliccare "**Load check boxes**" per caricare i fluorofori scelti e scrivere o selezionare il Nome del Target. Salvare la piastra cliccando il pulsante "**Next**" e**,** on appena preparata la piastra ed averla correttamente inserita nello strumento, premere il pulsante "**Start Run**".

LightCycler 480

Accendere lo strumento, accendere il computer ed avviare il software di controllo. Nella schermata principale, selezionare "**Plate type**" da "**Experiment Creation**" e premere il bottone "**New experiment**". Viene visualizzata la finestra "**experiment**". Dalla schermata "Run protocol" impostare: Thermal protocol, Reaction volume (25µl) e Detection format (**dual colour hydrolysis probe**).

cycles	denaturation	annealing/extension
1	50° C 2 min	
1	95°C 10 min	
45	95° C 15 sec	60° C 1 min

Premere il pulsante "**Subset editor**" ed, in questa finestra, selezionare un'area della piastra dove verranno posizionati i controlli e i campioni.
Premere il pulsante "**Sample Editor**". Selezionare il flusso di lavoro corretto (Step1: quantificazione Abs), scegliere i campioni caricati nel **Subset editor** creato nella fase precedente ed inserire il nome corrispondente ad ogni pozzetto. Scegliere il tipo corretto di ogni pozzetto utilizzato: Standard/Calibratore, Controllo negativo o campione incognito. Premere di nuovo il tasto "**esperimento**", inserire la piastra nello strumento e premere "**start run**"

ALLESTIMENTO DELLE REAZIONI:

Scongelare una provetta di **Amplification mMix**;
Scongelare una provetta di **HSV1 probes Mix;**
Miscelare accuratamente, mediante vortex, **210 µl** di **Amplification mMix e 126 µl** di **HSV1 probes Mix** (la miscela cosi' prodotta e' sufficiente per l'esecuzione di **16 reazioni** di amplificazione: **4 controlli positivi, 1 controllo negativo ed 11 campioni**).
Dispensare, nella piastra di amplificazione, **20 µl della miscela appena ricostituita** nelle posizioni prescelte e gia' predisposte sul software dello strumento.
Dispensare, nella posizione del controllo negativo, **5 µl** di soluzione prelevata dalla vial **controllo negativo**.
Dispensare, nelle posizioni predefinite per ciascun campione, **5 µl** del **campione corrispondente**.
Dispensare, nelle posizioni predisposte per i controlli positivi, **5 µl** di soluzione **10^2 copie/µl, 10^3 copie/µl, 10^4 copie/µl e 10^5 copie/µl**.
Sigillare accuratamente la piastra mediante l'utilizzo di optichal adesive film e verificare che, nella miscela, non vi siano bolle d'aria che possano interferire con l'amplificazione.
Trasferire la piastra nello strumento e premere il pulsante "**Start Run**".

ANALISI QUANTITATIVA

Lifetechnologies 7500 Fast

Al termine della corsa di PCR, il software apre automaticamente la finestra "**Analysis**" nella sezione "**Amplification plot**" posta nel Menu a sinistra.
Selezionare dalla piastra i pozzetti corrispondenti ai controlli positivi, al controllo negativo ed ai campioni in analisi.
Selezionare nella finestra "**Option**" il Menu a tendina "**Target"** e impostare **HSV-1.** Controllare il corretto settaggio del threshold.
Selezionare nella finestra "**Option**" il Menu a tendina "**Target"** e impostare **IC Control**. Controllare il corretto settaggio del threshold
L'analisi dei risultati si gestisce selezionando nel menù a sinistra la pagina "**Analysis**". Dalla sottopagina "**Standard Curve**", mantenendo aperta nella parte destra del software lo sheet "**view well plate**",

selezionare i pozzetti contenenti i punti della curva e verificare i parametri descritti nel paragrafo "**Interpretazione dei Risultati**" (coefficiente di correlazione, slope ecc…).
Dalla sottopagina "**Amplification Plot**" verificare le curve di amplificazione di ogni singolo campione.
Aprendo lo sheet "**view well table**" nella parte destra del software è possibile verificare i dati ottenuti dagli esperimenti: Threshold Cycles, Fluorescenze emesse e ovviamente la Quantificazione del target espressa in copie/reazione o copie/ml in funzione di come è stata impostata la curva di calibrazione.
Cliccando dal menù **file** e selezionando il comando **export** si aprirà la finestra "**export properties**". Indicare il nome del file, selezionare la posizione in cui salvarlo (**Browse**) e cliccare il pulsante **"Start export"**.
In questo modo il software consentirà di salvare un file exel con tutti i dati relativi all'esperimento selezionato.

Versant kPCR AD o Stratagene MX3005P

Fare clic sul pulsante "**Analysis**" nella barra degli strumenti. Il software aprirà di default lo sheet "**Analysis Term Setting**". Attivare i pulsanti FAM e JOE/HEX nella parte inferiore dello schermo e selezionare i campioni in esame.
Selezionare dalla piastra i pozzetti corrispondenti ai controlli positivi, al controllo negativo ed ai campioni in analisi.
Cliccare lo sheet "**Results**"; il software aprirà di default la pagina "**Amplification plot**". Controllare il corretto settaggio del threshold nell'apposita finestra "**Threshold fluorescence**".
Spuntando la casella "**Standard Curve**" dal menù "**Area to Analyze**" è possibile visualizzare i dati inerenti alla curva di calibrazione verificandone i parametri descritti nel paragrafo "**Interpretazione dei Risultati**" (coefficiente di correlazione, slope ecc…). Spuntando la casella "**Text report**" dal menù "**Area to Analyze**" nella parte destra del software è possibile verificare i dati ottenuti dagli esperimenti: Threshold Cycles, Fluorescenze emesse e ovviamente la Quantificazione del target espressa in copie/reazione o copie/ml in funzione di come è stata impostata la curva di calibrazione.
Dalla finestra Text Report è possibile esportare i risultati ottenuti cliccando dal menù principale il comando **file, export.**

Rotor-gene Q MDX

Al termine della corsa di PCR aprire la finestra "**Analisys**". Selezionare lo sheet "**Quantification**" e fare doppio clic spuntando la voce "**cycling A (green)".**
Cliccare il tasto **"Dynamic Tube"** e successivamente **"Slope correct"**.
Controllare il corretto settaggio del threshold nell'apposito spazio **"CT calculation – Threshold"**.
Aprire nuovamente la finestra "**Analisys**". Selezionare lo sheet "**Quantification**" e fare doppio clic spuntando la voce "**cycling A (yellow)".**
Cliccare il tasto **"Dynamic Tube"** e successivamente **"Slope correct"**.
Controllare il corretto settaggio del threshold nell'apposito spazio **"CT calculation – Threshold"**.
Anche in questo caso è possibile stampare un report dell'analisi cliccando sulla finestra "Report" e selezionando nella sezione Quantification prima il file **cycling A (green)** e successivamente il file **cycling A (yellow).**

CFX96 Real Time PCR System

Alla fine della rezione di PCR, selezionare lo sheet "**quantitation**". Nella parte alta dello schermo, selezionare "**settings**" dal menù e scegliere "**Baseline Threshold…**".
È possibile esportare il report cliccando sulla figura block notes posta nella parte superiore dello schermo.

LightCycler 480

Al completamento della corsa,, selezionare analisi e scegliere il corretto tipo di analise che si desidera effettuare: "**Abs Quant/Fit Points**". Scegliere il "**samples subset**" che si desidera analizzare. Selezionare lo sheet "**NoiseBand**", sotto il grafico si può scegliere "NoiseBand (Fluoresc.)" e spostare la linea del NoisBand direttamente dal grafico. Ripetere questa azione per ogni fluoroforo con il pulsante "**Filter comb"**.
Cliccando il foglio " **Analysis** " è possibile impostare il valore del Threshold scegliendo l'opzione "**Threshold (manuale)**"
Dopo aver impostato i parametri di premere il tasto "**Calculate**". Ripetere questa azione per ogni fluoroforo.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Grazie alla reazione di Real Time PCR è possibile fornire la quantificazione del DNA di HSV1 mediante la corretta impostazione dei valori dei controlli positivi che costruiscono la curva di calibrazione. Tale impostazione deve considerare tutte le diluizioni ed i passaggi che il campione subisce durante le fasi d'estrazione e di amplificazione.
Il sistema è in grado di rilevare da 100.000.000 a circa 10 copie di DNA per reazione.
I valori dei Ct ottenuti dall'amplificazioni dei 4 controlli a titolo noto vengono utilizzati dal software per il calcolo della curva di calibrazione su cui vengono interpolati i campioni incogniti.
Un corretto funzionamento della miscela di amplificazione può essere verificato analizzando i seguenti parametri:

Parametro	Riferimento
RTS conc. 10^5 copie/µl (FAM)	Ct ≤ 25
Coefficiente di correlazione	0.990 ≤ r^2 ≤ 1
Slope	-3,6 ≤ Slope ≤-3.2
Efficienza di PCR	90 ≤ Efficienza ≤ 100

Se il risultato della reazione di amplificazione del RTS alla concentrazione di 10^5 copie produce un Ct > 25 o undetermined la sessione non può considerarsi valida e quindi deve essere ripetuta.
Verificare che i valori del coefficiente di correlazione (r^2), della slope, e quindi dell'efficienza di reazione, rientrino nei limiti indicati in tabella o comunque non si discostino di molto da essi, i quali rappresentano i range ideali per una corretta reazione di PCR.

Impostando correttamente le concentrazioni degli standard in funzione del sistema di estrazione è possibile ottenere la quantizzazione del campione direttamente in copie/ml:

		Estr. Manuale Ref. 51304/51305 (QIAGEN)	Estr. Automatica Ref. 62724 (QIAGEN)	Estrazione alternativa
	RTS 1	25.000.000 copie	30.000.000 copie	500.000 copie
	RTS 2	2.500.000 copie	3.000.000 copie	50.000 copie
	RTS 3	250.000 copie	300.000 copie	5.000 copie
	RTS 4	25.000 copie	30.000 copie	500 copie

Nel caso in cui vengano utilizzati sistemi di estrazione alternativi la concentrazione del campione espressa in copie/ml potrà essere ricavata utilizzando la formula seguente:

$$copie/ml = \frac{1000}{Ve} \times \frac{Ev}{Ea} \times Creaz$$

dove:
- **Ve:** Volume del campione estratto, espresso in µl
- **Ev:** Volume in cui il campione viene eluito durante la fase di estrazione, espresso in µl
- **Ea:** Volume di campione estratto utilizzato per l'amplificazione, espresso in µl
- **C_{reaz}:** copie fornite dallo strumento.

I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati considerando tutti i dati clinici e gli altri esami di laboratorio relativi al paziente.
L'utilizzo del controllo positivo e negativo all'interno di ogni sessione di amplificazione consente di verificare il corretto funzionamento della miscela e l'assenza di possibili contaminazioni.
Nelle reazioni di amplificazione di ciascun campione, i valori di Ct della sonda specifica per il controllo interno (β-globina) vengono utilizzati per convalidare la sessione d'analisi a partire dal processo di estrazione sino alla fase di detection.
Una buona estrazione mostra un controllo interno (β-globin) con Ct compreso tra 22 e 25.
Assicurarsi che la fluorescenza emessa dall'amplificazione del controllo interno non presenti un Ct > 28 o undetermined. Se un campione presenta Ct DNA undetermined e Ct del controllo interno > 28 significa che si sono verificati problemi nella fase di estrazione o nella fase di amplificazione e quindi il campione potrebbe essere un falso negativo. **Ripetere il campione**.
Possono essere considerati validi i campioni che presentano un Ct > 28, per quanto riguarda il controllo interno, ed una concentrazione di HSV1 DNA elevata. In questo caso, la natura competitiva della reazione di PCR può nascondere o sfavorire l'amplificazione del controllo interno.

Detector FAM	Detector VIC/HEX	Saggio	Campione
Ct undetermined	Ct > 28 o undetermined	Non valido	Da ripetere
Ct undetermined	Ct < 28	Valido	Negativo
Ct alto	Ct < 28	Valido	Positivo
Ct basso	Ct > 28 o undetermined	Valido	Forte Positivo

CARATTERISTICHE FUNZIONALI

Sensibilità analitica:

Ai fini della presente valutazione, viene considerata sensibilità analitica la maggiore diluizione (titolo) a cui un campione positivo può essere diluito senza che il sistema perda la capacità di rilevarlo come positivo con un rate ≥ 95%. La sensibilità analitica del sistema è stata valutata analizzando DNA plasmidico (pTZ-HSV-1-RT), quantificato mediante analisi spettrofotometrica, contenente la regione genomica di interesse (glycoprotein B-gene) dei due virus in diluizioni scalari.

	Copies/ul	95% Intervallo confidenza
ANALISI PROBIT	1,63 cps/ul	Inf. 0,680 cps/ul Sup. 13,835 cps/ul

Sensibilità clinica:

Ai fini della presente valutazione viene considerata sensibilità clinica la capacità di determinare veri positivi sulla totalità di campioni positivi screenati. L'analisi è stata effettuata su campioni positivi per HSV1 ed il test è stato eseguito seguendo le indicazioni riportate nella metodica. I campioni positivi sono stati confermati con un altro sistema marcato CE presente in commercio.

I risultati ottenuti mostrano una sensibilità diagnostica del 100%.

Tracciabilità verso materiale di controllo NIBSC

Lo standard utilizzato (NIBSC code 08/224-xxx, CE Marked Material Human Herpes Virus 1 for NAT) forniti dal National Institut of Biological Standards e Control (NIBSC) non sono a quantità nota. La verifica è puramente di specificità del saggio e di cross contaminazione tra HSV1 e HSV-2.

QIAmp DNA mini kit. (QIAGEN).

ESTRAZIONE MANUALE	HSV-1	HSV-2
7500 Fast	Positive	Negative
Versant kPCR o Stratagene	Positive	Negative
Rotorgene-Q	Positive	Negative
CFX 96	Positive	Negative
Light Cycler	Positive	Negative

QCMD 2015 *Herpes Simplex Virus (DNA)* Programme EQA Panel Challenge 1

Herpes Simplex Virus è stato valutato utilizzando il pannello *QCMD 2015 Herpes Simplex Virus (DNA) Programme EQA Panel Challenge 1*

QCMD 2015 Herpes Simplex Virus (DNA) Programme EQA Panel Challenge 2

Herpes Simplex Virus was checked versus *QCMD 2015 Herpes Simplex Virus (DNA) Programme EQA Panel Challenge 2*

Linearità/Proporzionalità

La linearità del sistema è stata valutata analizzando DNA plasmidico (pTZ-HSV-1-RT), quantificato mediante analisi spettrofotometrica, contenente la regione genomica di interesse (glycoprotein B-gene) del virus in diluizioni scalari (1:10) da 100.000.000 copie a 10 copie di DNA nei 5 µl di estratto aggiunto alla reazione di amplificazione.
La valutazione è stata effettuata analizzando 10 curve di calibrazione che hanno mostrato tutte i seguenti parametri:

RTS conc. 10^5 copie/µl (FAM)	Ct ≤ 25	Ct medio 22,44
Coefficiente di correlazione	0,990 ≤ r^2 ≤ 1	r^2 medio 0,999
Slope	-3,6 ≤ Slope ≤-3.2	slope. media -3,540
Efficienza di PCR	90 ≤ Efficienza ≤ 100	medium Eff 92%

Riproducibilità e Ripetibilità:

La Riproducibilità e la Ripetibilità del sistema sono state valutate analizzando 3 diluizioni di DNA plasmidico contenente la regione gB-gene di interesse di HSV1 e quantificata mediante analisi spettrofotometrica (pTZ-HSV-1-RT) ed 1 controllo negativo (DNA negativo). Vengono eseguiti 5 replicati per ogni sessione per 3 sessioni differenti eseguite da operatori differenti su 3 lotti diversi.

Concentrazione	Lot	N° ripetizioni	Conc. Media rilevata	Inaccuratezza %
100.000 copie	L0	60	533375	7%
100.000 copie	L1	60	542610	9%
100.000 copie	L2	60	495965	5%
1.000 copie	L0	60	4867	9%
1.000 copie	L1	60	5154	13%
1.000 copie	L2	60	4597	8%
10 copie	L0	60	46	13%
10 copie	L1	60	53	7%
10 copie	L2	60	46	18%

L'inaccuratezza % media risulta essere del 10%

Specificità Diagnostica:

Ai fini della presente valutazione viene considerata specificità diagnostica la capacità del metodo di determinare campioni veri negativi. La specificità diagnostica del sistema è stata valutata analizzando campioni genomici umani testati e confermati negativi con un altro sistema presente in commercio.

La specificità diagnostica risulta essere al 100%.

Specificità Analitica:

La specificità del test è garantita dall'utilizzo di primers specifici per la determinazione di HSV-1.
L'esame di allineamento delle regioni scelte per l'ibridazione dei primers specifici per HSV1 con le sequenze disponibili in banca dati della regione gB-gene ha dimostrato la loro conservazione, l'assenza di mutazioni significative e la completa specificità per il target analizzato.

Cross-Reattività:

L'esame di allineamento delle regioni scelte per l'ibridazione dei primers specifici per HSV1 con le sequenze disponibili in banca dati della regione gB-gene ha dimostrato la loro conservazione, l'assenza di mutazioni significative e la completa specificità per il target analizzato.
E' stata inoltre effettuata un'analisi su campioni positivi per altri virus erpetici ed il test è stato eseguito seguendo le indicazioni riportate nella metodica.

Campioni Positivi	7500 Fast	Kversant/ MX3005P	Rotorg-Q	CFX96	Light Cycler
CMV	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie
VZV	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie
EBV	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie
HHV-6	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie
HHV-8	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie
HSV-2	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie

INTERFERENZE

Verificare che nel DNA estratto dal campione di partenza non vi siano presenti mucoproteine ed emoglobina in modo da escludere eventuali inibizioni nella reazione di PCR. L'interferenza dovuta a contaminanti può essere evidenziata mediante l'analisi spettrofotometrica e rapporto dei dati ottenuti a 260 nm (Assorbimento massimo Acidi Nucleici) e 280 nm (Assorbimento massimo Proteine). Un DNA puro dovrebbe avere un rapporto di circa 1.8.

CONTROLLO QUALITA'

Si consiglia inoltre di inserire come controllo di qualità interno di ciascuna sessione di estrazione, amplificazione e rilevamento un campione negativo ed un campione positivo già testati in precedenza o materiale di riferimento a titolo noto.
In conformità con il sistema di gestione della qualità certificato ISO EN 13485 di Clonit srl, ogni lotto di **quanty HSV1** è stato testato contro specifiche predeterminate al fine di garantire una qualità costante del prodotto

BIBLIOGRAFIA

Mazyar Ziyaeyan, Abdolvahab Alborzi, Afshin Borhani Haghighi, Marziyeh Jamalidoust, Mahsa Moeini, Bahman Pourabbas. ***"Diagnosis and quantitative detection of HSV DNA in samples from patients with suspected herpes simplex encephalitis***". Infect Dis 2011;15(3):211-214 Elsevier Editora Ltda

S Sugita, N Shimizu, K Watanabe, M Mizukami, T Morio,3 Y Sugamoto, M Mochizuki1. ***"Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis"***. Br J Ophthalmol 2008;92:928–932.

ASSISTENZA TECNICA

Per ogni domanda o per assistenza contattare il nostro servizio tecnico:

e-mail: info@clonit.it
telefono: +39 02 56814413

IVD	Dispositivo *In vitro* diagnostico
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Intervallo di temperatura
	Utilizzare entro (aaaa/mm)
LOT	Lotto (xxxx)
REF	Codice prodotto
	Fabbricante
Σ	Contenuto sufficiente per "n" saggi

EDMA code: 15040340
CND: W0105040311

Il kit ***quanty HSV1*** è un kit diagnostico marcato CE in accordo con le direttive diagnostiche Europee 98/79/CE.

CLONIT S.r.l.
Sede Legale: Via Varese 20 – 20121 Milano
Sede Operativa: Via B. Quaranta 57 20139 Milano
Tel. + 39. (0)2.56814413 fax. +39. (0)2. 56814515
www.clonit.it - info@clonit.it

CE IVD
for *in vitro* diagnostic use

ST. RT18/1-ITA.0
Revisione del 28 Dicembre 2015