

Håndbog til *artus*[®] EBV RG PCR-kit



24 (katalognr. 4501263)



96 (katalognr. 4501265)

Version 1



Kvantitativ in vitro-diagnostik

Til brug sammen med Rotor-Gene[®] Q-instrumenter



4501263, 4501265



1046897DA



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

TYSKLAND

R5



1046897DA



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN er den førende leverandør af innovative prøve- og analyseteknologier, som gør det muligt at isolere og detektere indholdet af enhver biologisk prøve. Vores avancerede høj kvalitetsprodukter og -service garanterer succes fra prøve til resultat.

QIAGEN sætter standarder i:

- Oprensning af DNA, RNA og proteiner
- Nukleinsyre- og proteinanalyser
- mikroRNA-undersøgelser og RNAi
- Automatisering af prøve- og analyseteknologier

Det er vores mål sætte Dem i stand til at opnå enestående succes og gennembrud. Der findes flere oplysninger på www.qiagen.com.

Indhold

Tilslgtet anvendelse	6
Oversigt og forklaring	6
Patogeninformation	6
Funktionsprincip	6
Leverede materialer	7
Kittets indhold	7
Nødvendige materialer, der ikke er vedlagt	7
Advarsler og forholdsregler	8
Almene forsigtighedsregler	8
Opbevaring og håndtering af reagenser	9
Procedure	10
DNA-isolering	10
Intern kontrol	13
Protokol: PCR og dataanalyse	14
Fortolkning af resultater	20
Kvantificering	20
Resultater	21
Fejlfindingsvejledning	22
Kvalitetskontrol	25
Begrænsninger	25
Ydelsesegenskaber	25
Analysefølsomhed	25
Specificitet	26
Reproducerbarhed	27
Referencer	27
Symbols	28
Kontaktoplysninger	28
Bestillingsinformation	29

Tilsigtet anvendelse

artus EBV RG PCR-kittet er en in vitro nukleinsyre-amplifikationstest til kvantitering af Epstein-Barr-virus (EBV)-DNA i humant serum, CSF eller blodceller. Dette diagnostiske test-kit udnytter polymerasekædereaktionen (PCR) og er konfigureret til brug sammen med Rotor-Gene Q-instrumenter.

Oversigt og forklaring

artus EBV RG PCR-kittet er et brugsklart system til detektion af EBV-DNA ved hjælp af polymerasekædereaktion (PCR) på Rotor-Gene Q-instrumenter. EBV RG Master indeholder reagenser og enzymer til specifik amplifikation af en 97 bp region af EBV-genomet og til direkte detektion af det specifikke amplikon i fluorescenskanalen Cycling Green på Rotor-Gene Q Mdx, Rotor-Gene Q eller Rotor-Gene 6000 eller Cycling A.FAM™ på Rotor-Gene 3000.

Derudover indeholder *artus* EBV RG PCR-kittet et andet heterologt amplifikationssystem, som bruges til detektion af en eventuel PCR-inhibition. Denne detekteres som en intern kontrol (IC) i fluorescenskanalen Cycling Yellow på Rotor-Gene Q Mdx, Rotor-Gene Q eller Rotor-Gene 6000 eller Cycling A.JOE™ på Rotor-Gene 3000. Detektionsgrænsen for den analytiske EBV PCR (se "Analysefølsomhed", side 25) er ikke reduceret. Der leveres eksterne positive kontroller (EBV RG QS 1–4), der tillader bestemmelse af mængden af viralt DNA. For yderligere information, se "Kvantificering", side 20.

Patogeninformation

Overførsel af Epstein-Barr-virus (EBV) sker oralt, hovedsageligt via kontamineret sput. Generelt er infektion med EBV asymptomatisk, især ved smitte i barndommen. Det kliniske tegn på en akut infektion er infektiøs mononukleose forbundet med feber, træthed og angina samt inflammation af lymfekirtler og milt. Hos nogle patienter er disse symptomer kronisk tilbagevendende. Svære former for EBV-infektion kan ses hos patienter med immundefekt og personer med T-celle-defekter.


Funktionsprincip

Patogendetektion via polymerasekædereaktion (PCR) er baseret på amplifikation af specifikke områder af patogenets genom. Det amplificerede produkt detekteres i realtids-PCR via fluorescerende farver. Disse er i reglen knyttet til oligonucleotidprober, der bindes specifikt til det amplificerede produkt. Monitorering af fluorescensintensiteterne under PCR-kørslen (dvs. i realtid) muliggør detektion og kvantitering af det akkumulerede produkt, uden at man behøver genåbne reaktionsglassene efter PCR-kørslen.*

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

Leverede materialer

Kittets indhold

artus EBV RG PCR Kit			(24)	(96)
Katalognr.			4501263	4501265
Antal reaktioner			24	96
Blåt	EBV RG Master		2 x 12 reaktioner	8 x 12 reaktioner
Rødt	EBV RG QS 1* (5 x 10 ⁴ kopier/μl)	QS	200 μl	200 μl
Rødt	EBV RG QS 2* (5 x 10 ³ kopier/μl)	QS	200 μl	200 μl
Rødt	EBV RG QS 3* (5 x 10 ² kopier/μl)	QS	200 μl	200 μl
Rødt	EBV RG QS 4* (5 x 10 ¹ kopier/μl)	QS	200 μl	200 μl
Grønt	EBV RG IC [†]	IC	1000 μl	2 x 1000 μl
Hvidt	Vand (PCR kvalitet)		1000 μl	1000 μl
	Håndbog		1	1

* Kvantiteringsstandard.

† Intern kontrol.

Nødvendige materialer, der ikke er vedlagt

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, éngangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der findes mere information i de tilhørende sikkerhedsdatablade (material safety data sheets, SDSs), som kan fås hos den pågældende leverandør.

Reagenser

- DNA-isoleringskit (se "DNA-isolering", side 10)

Forbrugsartikler

- Sterile pipettespidser med filtre
- Striprør og hætter, 0,1 ml til brug med 72-brøndsrotor (katalognr. 981103 eller 981106)
- Alternativt: PCR-rør, 0,2 ml, til brug med 36-brøndsrotor (katalognr. 981005 eller 981008)

Udstyr

- Pipetter (justerbare)*
- Vortex-mixer*
- Bordcentrifuge* med rotor til 2 ml reagensglas
- Rotor-Gene Q Mdx-, Rotor-Gene Q- eller Rotor-Gene-instrument* med fluorescenskanaler til Cycling Green og Cycling Yellow eller med fluorescenskanaler til Cycling A.FAM og Cycling A.JOE
- Rotor-Gene Q Mdx/Rotor-Gene Q-softwareversion 1.7.94 eller nyere (Rotor-Gene 6000 softwareversion 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94, Rotor-Gene 3000 softwareversion 6.0.23)
- Køleblok (påfyldningsblok 72 x 0,1 ml rør, katalognr. 9018901, eller påfyldningsblok 96 x 0,2 ml rør, katalognr. 9018905)

Advarsler og forholdsregler

Til in vitro-diagnostisk brug

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, éngangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der henvises til de relevante sikkerhedsdatablade (SDS) for yderligere information. De findes online i bekvemt og kompakt pdf-format på www.qiagen.com/safety, hvor sikkerhedsdatabladene til hvert QIAGEN®-kit og hver kitkomponent kan findes, læses og udskrives.

Kassér prøve- og analyseaffald i henhold til de lokale sikkerhedsbestemmelser.

Almene forsigtighedsregler

Følgende anvisninger skal altid overholdes af brugeren:

- Brug sterile pipettespidser med filtre.
- Positivt materiale (prøver, positive kontroller, amplifikater) skal opbevares og oprensnes adskilt fra de øvrige reagenser og tilsættes reaktionsblandingen i et separat rum.
- Optø alle komponenter grundigt ved stuetemperatur (15–25 °C), før en analyse påbegyndes.
- Når komponenterne er optøet, blandes de (ved at pipettere op og ned flere gange eller med en pulsvortexblanding) og centrifugeres kort.
- Arbejd hurtigt, og hold PCR-komponenterne på is eller i køleblokken (72/96-brønds påfyldningsblok).

* Sørg for, at instrumenterne regelmæssigt kontrolleres og kalibreres efter producentens anvisninger.

Opbevaring og håndtering af reagenser

Komponenterne i *artus* EBV RG PCR-kittet skal opbevares ved $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ og er stabile indtil den udløbsdato, der er angivet på etiketten. Gentagne optøninger og genfrysninger (>2 x) bør undgås, da det kan reducere analysens følsomhed. Ved uregelmæssig brug skal reagenserne derfor aliquoteres. Må ikke opbevares ved $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ i mere end fem timer.

Procedure

DNA-isolering

Kittene fra QIAGEN, som er vist i tabel 1, er valideret til viral DNA-oprensning fra de angivne prøvetyper fra mennesker til brug med *artus* EBV RG PCR-kittet. Udfør den virale DNA-oprensning i henhold til anvisningerne i kithåndbøgerne.

Tabel 1. Oprensningskit valideret til brug med *artus* EBV RG PCR-kit

Prøvemateriale	Prøvestørrelse	Nukleinsyre-isolationskit	Katalognummer (QIAGEN)	Carrier RNA
Serum, plasma, CSF	200 μ l	QIAamp [®] DNA Mini-kit (50)	51304	Eksklusive
Serum, plasma	1 ml	QIAamp UltraSens [®] Virus-kit (50)	53704	Inklusive
Blodceller	200 μ l	QIAamp DNA Blood Mini-kit (50)	51104	Eksklusive
Plasma	400 μ l	EZ1 [®] DSP Virus-kit (48)*	62724	Inklusive

* EZ1 DSP Virus-kittet fås også som CE-IVD-mærkede EASY*artus*[®] EBV RG PCR-kit kombineret med *artus* EBV RG PCR-kittet (se bestillinginformation på side 29).

Note: Blodindsamlingsrør coatet med antikoagulantia kan hæmme PCR. Disse inhibitorer elimineres ved brug af de ovenfor anførte isolationskit. Vi anbefaler at undgå hepariniseret blod.

Note: *artus* EBV RG PCR-kittet må ikke anvendes sammen med phenolbaserede isoleringsmetoder.

Anvendelse af QIAamp DNA Blood Mini-kit eller QIAamp DNA Mini-kit

Note: Anvendelsen af carrier-RNA er af afgørende betydning for oprensningens effektivitet og dermed for DNA-/RNA-udbyttet. Bemærk, at tilsætning af carrier (RNA-homopolymer Poly[rA], som ikke er inkluderet i QIAamp DNA Blood Mini-kittet eller QIAamp DNA Mini-kittet) anbefales kraftigt til oprensning af nukleinsyrer fra cellefrie kropsvæsker og materialer med små mængder DNA og RNA (f.eks. CSF). Klargør i så tilfælde carrier-RNA på følgende måde.

- Resuspender det lyofyliserede carrier-RNA (RNA Homopolymer Poly[rA], som ikke er inkluderet i QIAamp DNA Blood Mini-kittet eller QIAamp DNA Mini-kittet) ved hjælp af elueringsbufferen (brug ikke lysisbufferen) i oprensningskittet (Buffer AE i QIAamp DNA Mini-kittet og QIAamp DNA Blood Mini-kittet), og klargør en fortynding med en koncentration på 1 µg/µl. Opdel denne carrier-RNA-opløsning i flere alikvoter, der svarer til dine behov, og opbevar dem ved –15 °C til –30 °C. Undgå gentagen optøning (> 2 x) af en carrier-RNA-alikvot.
- Brug 1 µg bærer-RNA pr. 100 µl lysisbuffer. Hvis oprensningsprotokollen f.eks. foreslår 200 µl lysisbuffer, skal der tilsættes 2 µl carrier-RNA (1 µg/µl) direkte til lysisbufferen (Buffer AL fra QIAamp DNA Mini-kittet og QIAamp DNA Blood Mini-kittet). Før hver oprensning påbegyndes, skal der klargøres en blanding af lysisbuffer og bærer-RNA (og intern kontrol, hvor det er relevant, se "Intern kontrol", side 13) frisk i henhold til pipetteringsplanen i tabel 2.

Tabel 2. Pipetteringsplan for anvendelse af QIAamp DNA Blood Mini-kittet eller QIAamp DNA Mini-kittet

Antal prøver	1	12
Buffer AL (lysisbuffer)*	f.eks. 200 µl	f.eks. 2400 µl
Bærer-RNA (1 µg/µl)	2 µl	24 µl
Totalt volumen	202 µl	2424 µl
Volumen pr. ekstraktion	200 µl	for hver 200 µl*

* Indeholder guanidinhydrochlorid; se kithåndbogen for sikkerhedsoplysninger.

Note: Brug straks den frisk klargjorte blanding af lysisbuffer og carrier-RNA til oprensning. Det er ikke muligt at opbevare blandingen.

Note: Den interne kontrol til *artus* EBV RG PCR-kittet kan bruges direkte i isoleringsproceduren (se "Intern kontrol", side 13).

Note: Vi anbefaler på det kraftigste at udføre det anbefalede centrifugeringstrin 10 i protokollen (*QIAamp DNA Mini* og *Blood Mini Handbook*, Third Edition, april 2010, side 29 og 32) for at fjerne eventuel restethanol. Vi anbefaler, at centrifugeringstiden sættes op til 3 minutter.

Vi anbefaler at eluere DNA'et i 50 µl elueringsbuffer for at opnå størst mulig følsomhed for *artus* EBV RG PCR-kittet.

Anvendelse af QIAamp UltraSens Virus-kittet

Note: Anvendelsen af carrier-RNA er af afgørende betydning for oprensningens effektivitet og dermed for DNA-/RNA-udbyttet. Vi anbefaler følgende procedure, der afviger fra kithåndbogen, for at øge stabiliteten af den carrier-RNA, der leveres sammen med QIAamp UltraSens Virus-kittet.

- Resuspender det lyofyliserede carrier-RNA, før kittet bruges første gang, i 310 μl af den elueringsbuffer (Buffer AVE), der leveres sammen med kittet (endelig koncentration på 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ – brug ikke lysisbuffer). Opdel denne carrier-RNA-opløsning i flere alikvoter, der svarer til dine behov, og opbevar dem ved $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Undgå gentagen optøning ($> 2\text{ x}$) af en carrier-RNA-alikvot.
- Før hver oprensning påbegyndes, skal der klargøres en blanding af lysisbuffer og bærer-RNA (og intern kontrol, hvor det er relevant, se "Intern kontrol", side 13) frisk i henhold til pipetteringsplanen i tabel 3.

Tabel 3. Pipetteringsplan for anvendelse af QIAamp UltraSens Virus-kittet

Antal prøver	1	12
Buffer AC (lysisbuffer)*	800 μl	9600 μl
Bærer-RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	5,6 μl	67,2 μl
Totalt volumen	805,6 μl	9667,2 μl
Volumen pr. ekstraktion	800 μl	for hver 800 μl*

* Indeholder isopropanol; se kithåndbogen for sikkerhedsoplysninger.

Note: Brug straks den frisk klargjorte blanding af lysisbuffer og carrier-RNA til oprensning. Det er ikke muligt at opbevare blandingen.

Note: Den interne kontrol til *artus* EBV RG PCR-kittet kan bruges direkte i isoleringsproceduren (se "Intern kontrol", side 13).

Note: Vi anbefaler på det kraftigste at udføre det anbefalede centrifugeringstrin 14 i protokollen (*QIAamp UltraSens Virus Handbook*, april 2010, side 17) for at fjerne eventuel restethanol. Vi anbefaler, at centrifugeringstiden sættes op til 3 minutter.

Vi anbefaler at eluere DNA'et i 50 μl elueringsbuffer for at opnå størst mulig følsomhed for *artus* EBV RG PCR-kittet.

QIAamp UltraSens Virus-kittet gør det muligt at koncentrere prøven. Hvis der anvendes andet prøvemateriale end serum eller plasma, skal der tilsættes mindst 50 % (v/v) negativt humant plasma til prøven.

Anvendelse af EZ1 DSP Virus-kit

Note: Brugen af bærer-RNA er af afgørende betydning for oprensningens effektivitet og dermed for DNA-/RNA-udbyttet. Tilsæt den passende mængde bærer-RNA til hver oprensning efter anvisningerne i *Håndbog til EZ1 DSP Virus-kit*.

Note: Den interne kontrol til *artus EBV RG PCR-kittet* kan bruges direkte i isoleringsproceduren (se "Intern kontrol", nedenfor).

Note: Vi vil stærkt anbefale at bruge oprensede virale nukleinsyrer til PCR straks efter oprensning ved hjælp af EZ1 DSP Virus-kittet. Eluater kan alternativt opbevares i op til 3 dage ved 4 °C før PCR-analyse.

Intern kontrol

Der vedlægges en intern kontrol (EBV RG IC). Dette giver brugeren mulighed for både at kontrollere DNA-isoleringsproceduren og kontrollere for mulig PCR-hæmning. Når EZ1 DSP Virus-kittet anvendes til oprensning, skal den interne kontrol tilsættes ifølge anvisningerne i *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*. Når QIAamp UltraSens Virus-kittet, QIAamp DNA Blood Mini-kittet eller QIAamp DNA Mini-kittet anvendes, tilsættes den interne kontrol til isoleringen i et forhold, der svarer til 0,1 µl pr. 1 µl elueringsvolumen. Ved brug af QIAamp UltraSens Virus-kittet elueres DNA'et f.eks. i 50 µl Buffer AVE. Derfor bør 5 µl af den interne kontrol tilsættes initialt. Mængden af den anvendte interne kontrol er kun afhængig af elueringsvolumenet.

Note: Den interne kontrol og carrier-RNA (se "DNA-isolering", side 10) bør kun tilsættes blandingen af lysisbuffer og prøvemateriale eller direkte til lysisbufferen.

Den interne kontrol må ikke direkte tilsættes prøvematerialet. Ved tilsætningen til lysisbufferen skal der sørges for, at blandingen af den interne kontrol og lysisbuffer/carrier-RNA forberedes frisk og tilsættes med det samme (opbevaring af blandingen ved stuetemperatur eller i køleskabet kan allerede efter få timer føre til fravær af den interne kontrol og til en reduceret oprensningseffektivitet).

Note: Pipetter ikke den interne kontrol og carrier-RNA direkte i prøvematerialet.

Alternativt kan den interne kontrol anvendes udelukkende til kontrol af en mulig PCR-inhibition. Til denne anvendelse tilsættes den interne kontrol direkte til EBV RG Master som beskrevet i trin 2b i protokollen (side 15).

Protokol: PCR og dataanalyse

Vigtige anvisninger før start

- Brug tid på at blive fortrolig med Rotor-Gene Q-instrumentet, før protokollen startes. Se brugervejledningen til instrumentet.
- Sørg for, at mindst en kvantiteringsstandard og en negativ kontrol (vand, PCR-kvalitet) er med i hver PCR-kørsel. For at generere en standardkurve bruges alle 4 kvantiteringsstandarder, der medfølger (EBV RG QS 1–4) for hver PCR-kørsel.

Ting, der skal gøres før start

- Sørg for, at køleblokken (tilbehør til Rotor-Gene Q-instrumentet) er forkølet til 2–8°C.
- Alle reagenser skal, inden testen startes, optøs fuldstændigt ved stuetemperatur, blandes godt (gentagen pipettering eller kort vortexen) og centrifugeres kort.

Procedure

1. Anbring det ønskede antal PCR-rør i køleblokkens adaptere.
2. Hvis De anvender den interne kontrol til at monitorere oprensningen af DNA og til at kontrollere en eventuel inhibition af PCR, følges trin 2a. Hvis De kun anvender den interne kontrol til at kontrollere en inhibition af PCR, følges trin 2b.
- 2a. Den interne kontrol er allerede tilsat oprensningen (se "Intern kontrol", side 13). I dette tilfælde klargøres en Master Mix ifølge tabel 4.

Reaktionsblandingen indeholder typisk alle de komponenter, der skal anvendes til PCR, undtagen prøven.

Tabel 4. Klargøring af Master Mix (intern kontrol anvendes til at monitorere DNA-oprensning og kontrollere for hæmning af PCR)

Antal prøver	1	12
EBV RG Master	30 µl	360 µl
EBV RG IC	0 µl	0 µl
Totalt volumen	30 µl	360 µl

2b. Den interne kontrol skal tilsættes direkte til blandingen af EBV RG Master. I dette tilfælde klargøres en Master Mix ifølge tabel 5.

Reaktionsblandingen indeholder typisk alle de komponenter, der skal anvendes til PCR, undtagen prøven.

Tabel 5. Klargøring af Master Mix (intern kontrol anvendes kun til at kontrollere for hæmning af PCR)

Antal prøver	1	12
EBV RG Master	30 μ l	360 μ l
EBV RG IC	2 μ l	24 μ l
Totalt volumen	32 μl*	384 μl*

* Volumenforhøjelsen, som opstår på grund af den interne kontrol, er irrelevant. Sensitiviteten for detektionssystemet påvirkes ikke.

3. Pipetter 30 μ l af Master Mix i hvert PCR-rør. Tilsæt derefter 20 μ l af det eluerede prøve-DNA (se tabel 6). Der skal tilsvarende bruges 20 μ l af mindst én af kvantiteringsstandarderne (EBV RG QS 1–4) som positiv kontrol og 20 μ l vand (vand, PCR-kvalitet) som negativ kontrol.

Tabel 6. Opsætning af PCR-reaktion

Antal prøver	1	12
Master-blanding	30 μ l	for hver 30 μ l*
Prøve	20 μ l	for hver 20 μ l*
Totalt volumen	50 μl	for hver 50 μl*

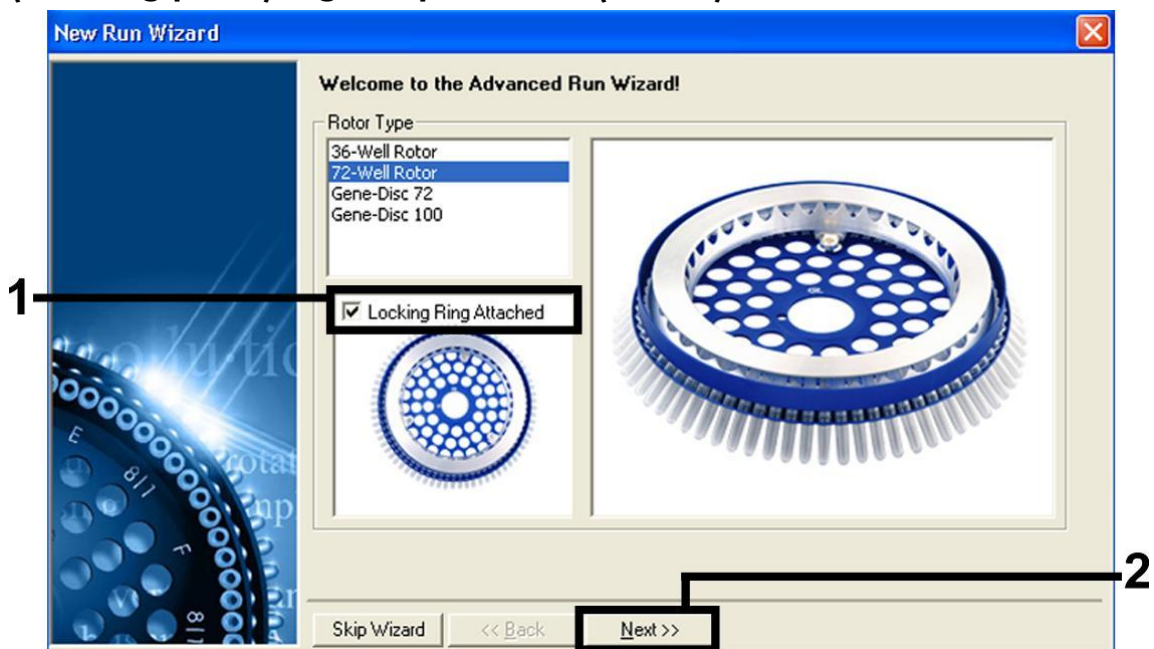
4. Luk PCR-rørene. Sørg for, at låseringen (tilbehør til Rotor-Gene-instrumentet) er placeret oven på rotoren for at forebygge utilsigtet åbning af rørene under kørslen.

5. For detektion af EBV DNA oprettes en temperaturprofil i henhold til de følgende trin.

Indstilling af generelle analyseparametre	Figur 1, 2, 3
Indledende aktivering af hot-start enzymet	Figur 4
Amplifikation af DNA'et (touchdown PCR)	Figur 5
Justering af fluorescenskanalens følsomhed	Figur 6
Start af kørsel	Figur 7

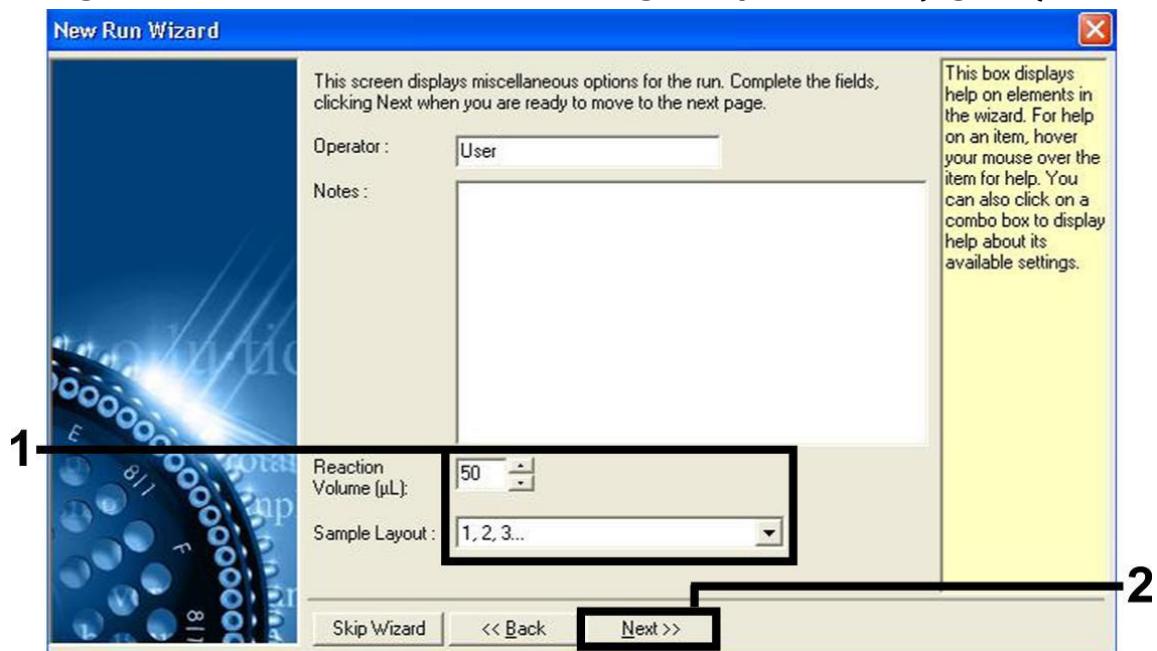
Alle specifikationer henviser til Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q softwareversion 1.7.94 (Rotor-Gene 6000 softwareversion 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94, Rotor-Gene 3000 softwareversion 6.0.23). Yderligere oplysninger om programmering af Rotor-Gene Q-instrumenter kan ses i instrumentets brugervejledning. I illustrationerne er disse illustrationer indrammet med en fed, sort streg. Der er illustrationer til Rotor-Gene Q-instrumenter. Når der skal anvendes andre værdier til Rotor-Gene 3000, er forskellene beskrevet i teksten.

6. Åbn først dialogboksen "New Run Wizard" (Hjælp til ny kørsel) (Figur 1). Marker afkrydsningsfeltet "Locking Ring Attached" (Låsering påsat), og klik på "Next" (Næste).



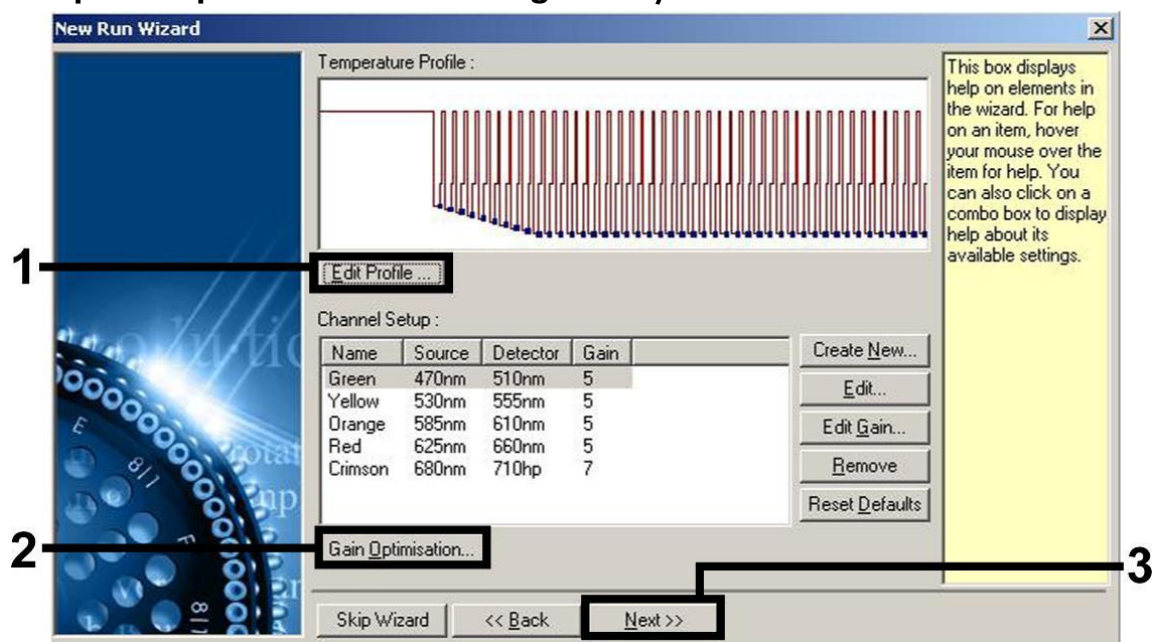
Figur 1. Dialogboksen "New Run Wizard".

7. Vælg 50 for PCR-reaktionsvolumen, og klik på "Next" (figur 2).

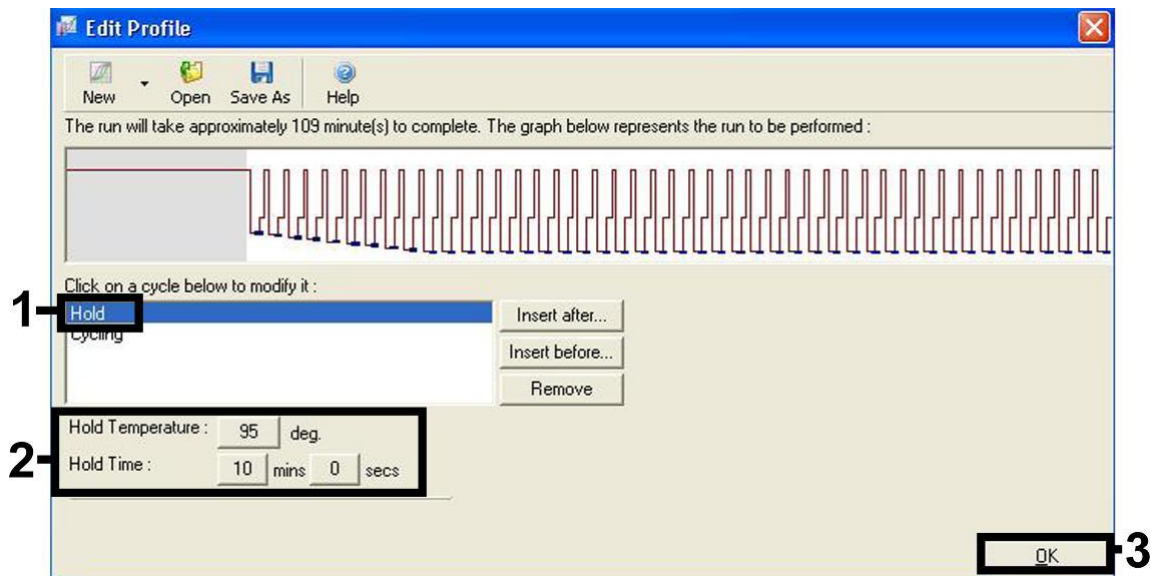


Figur 2. Indstilling af generelle analyseparametre.

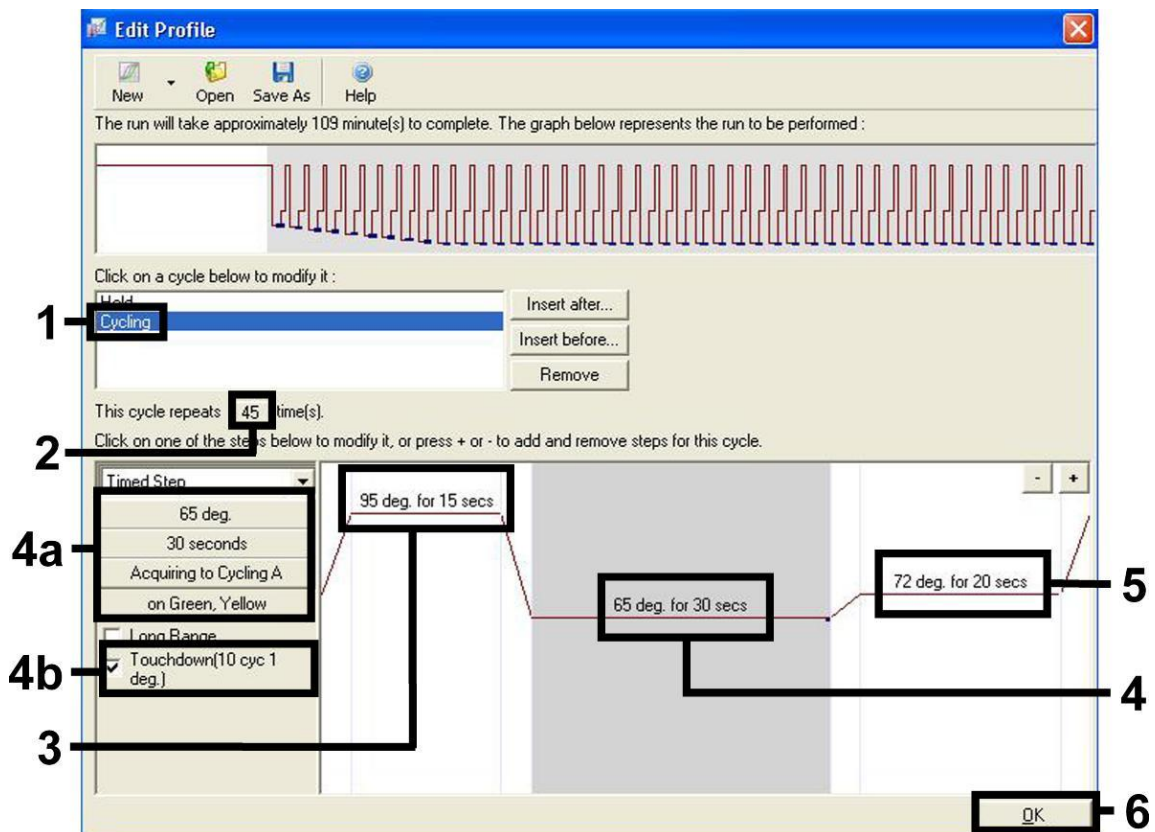
8. Klik på knappen "Edit Profile" (Regiger profil) i den næste dialogboks "New Run Wizard" (Figur 3) og programmer temperaturprofilen som vist i Figur 3-5).



Figur 3. Redigering af profilen.



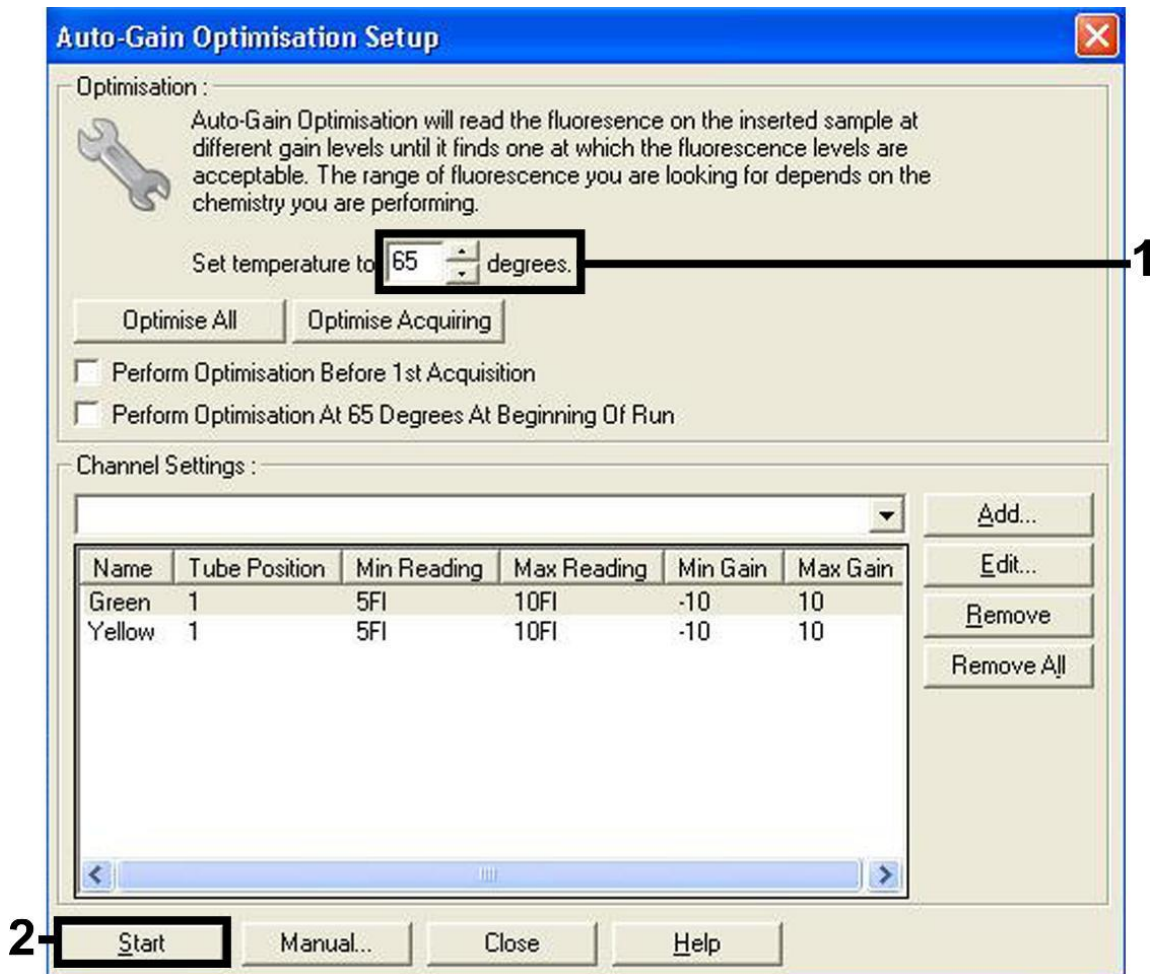
Figur 4. Indledende aktivering af hot-start enzymet.



Figur 5. Amplifikation af DNA'et. Sørg for at aktivere touchdown-funktionen for 10 cyklusser i hærddningstrinnet. Bemærk, at softwaren på Rotor-Gene 3000 vil definere fluorescensfarver som "FAM/Sybr, JOE".

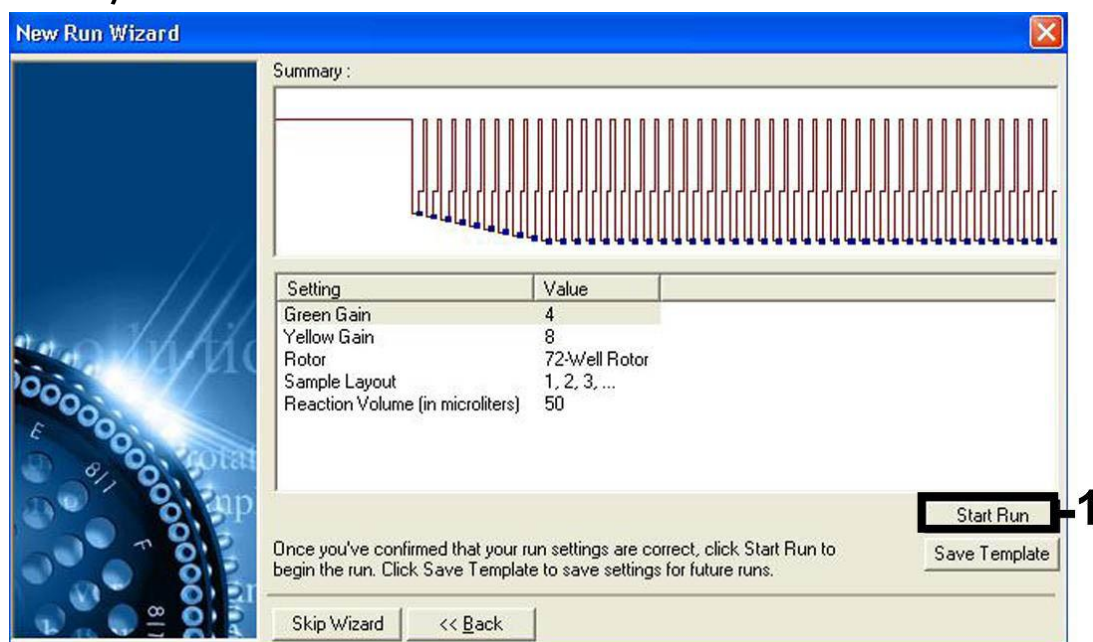
9. **Detektionsområdet for fluorescenskanalerne skal bestemmes i henhold til fluorescensintensiteterne i PCR-rørene. Klik på "Gain-Optimisation" (Gain-optimering) i dialogboksen "New Run Wizard" (se figur 3) for at åbne dialogboksen "Auto-Gain Optimisation Setup" (Opsætning af automatisk gain-optimering). Indstil**

kalibreringstemperaturen til 65 for at matche
amplifikationsprogrammets afhærdningstemperatur (Figur 6).



Figur 6. Justering af fluorescenskanalens følsomhed. Bemærk, at softwaren på Rotor-Gene 3000 vil definere fluorescensfarver som "FAM/Sybr" og "JOE".

10. Gain-værdierne, der bestemmes af kanalkalibreringen, gemmes automatisk og angives i det sidste menuvindue i programmeringsproceduren (figur 7). Klik på "Start Run" (Start kørsel).



Figur 7. Start kørslen. Bemærk, at softwaren på Rotor-Gene 3000 vil definere fluorescensfarver som "FAM/Sybr" og "JOE".

Fortolkning af resultater

Kvantificering

De vedlagte kvantiteringsstandarder (EBV RG QS 1–4) behandles som en allerede oprenset prøve og anvendes i samme volumen (20 μ l). For at generere en standardkurve på Rotor-Gene Q-instrumenter bør alle 4 kvantiteringsstandarder bruges og defineres i dialogboksen "Edit Samples" (Rediger prøver) som standarder med de specificerede koncentrationer (se instrumentets brugervejledning).

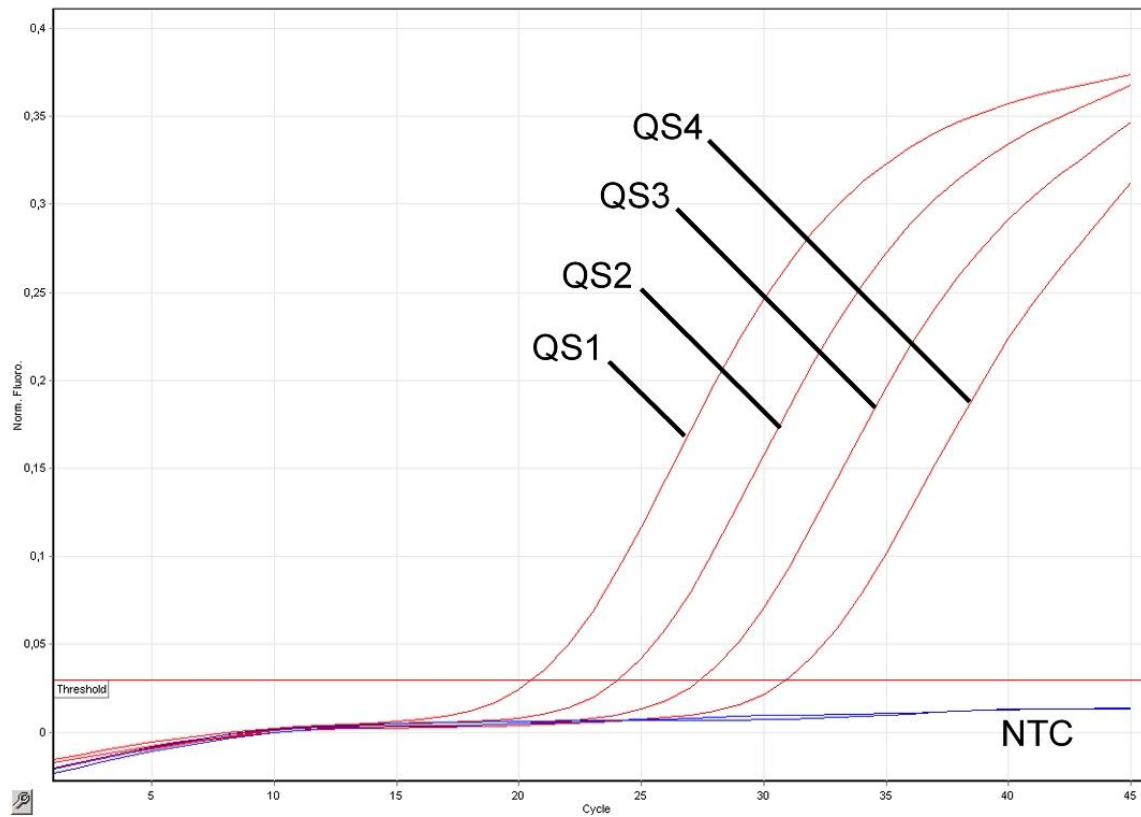
Note: Kvantiteringsstandarderne defineres som kopier/ μ l. Følgende formel skal anvendes til at omregne de værdier, som er bestemt ved hjælp af standardkurven, til kopier/ml prøvemateriale:

$$\text{Resultat (kopier/ml)} = \frac{\text{Resultat (kopier/}\mu\text{l)} \times \text{elueringsvolumen (}\mu\text{l)}}{\text{Prøvevolumen (ml)}}$$

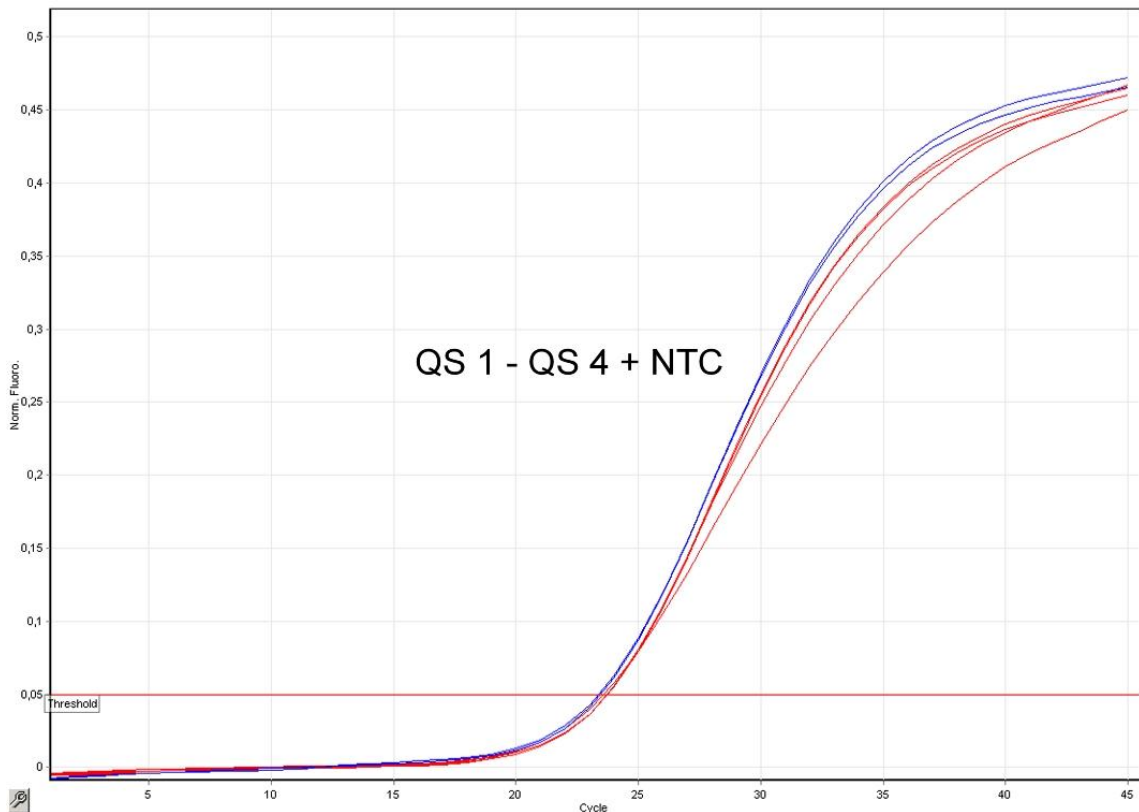
Det initiale prøvevolumen skal altid indsættes i ovenstående formel. Det skal tages i betragtning, når prøvevolumen ændres før nukleinsyreekstraktionen (f.eks. reduktion af volumenet ved centrifugering eller øgning af volumenet ved tilsætte det nødvendige volumen til isolationen).

Resultater

Eksempler på positive og negative PCR-reaktions er givet i Figur 8 og Figur 9.



Figur 8. Detektion af kvantiteringsstandarderne (EBV RG QS 1–4) i fluorescenskanalen Cycling Green. NTC: Ingen skabelonkontrol (negativ kontrol).



Figur 9. Detektion af den interne kontrol (IC) i fluorescenskanalen Cycling Yellow med samtidig amplifikation af kvantiteringsstandarderne (EBV RG QS 1–4). NTC: Ingen skabelonkontrol (negativ kontrol).

Der er detekteret et signal i fluorescenskanalen Cycling Green. Analysens resultat er positivt: prøven indeholder EBV DNA.

I så tilfælde er detektion af et signal i kanalen Cycling Yellow unødvendigt, idet høje initiale koncentrationer af EBV DNA (positivt signal i Cycling Green-kanalen) kan medføre reduceret eller manglende fluorescenssignal af den interne kontrol i Cycling Yellow-kanalen (konkurrence).

Note: De relevante kanaler på Rotor-Gene 3000 er Cycling A.FAM for det positive signal og Cycling A.JOE for den interne kontrol.

Der er ikke detekteret noget signal i fluorescenskanalen Cycling Green. Samtidig vises et signal fra den interne kontrol i Cycling Yellow-kanalen. Intet EBV DNA kan detekteres i prøven. Den kan således betragtes som negativ.

I tilfælde af en negativ EBV PCR udelukker det detekterede signal af den interne kontrol muligheden for PCR-hæmning.

Note: De relevante kanaler på Rotor-Gene 3000 er Cycling A.JOE for den interne kontrol og intet signal for Cycling A.FAM.

Intet signal detekteret i Cycling Green eller Cycling Yellow-kanalerne. Der kan ikke udledes noget resultat.

Information vedrørende fejlkilder og deres løsning kan findes i "Fejlfindingsvejledning", side 22.

Note: De relevante kanaler på Rotor-Gene 3000 er Cycling A.FAM og Cycling A.JOE.

Fejlfindingsvejledning

I denne fejlfindingsvejledning kan der findes brugbare henvisninger, som kan hjælpe ved løsningen af eventuelle problemer. Der findes desuden flere informationer på siden "Frequently Asked Questions" [Hyppigt stillede spørgsmål] hos vores tekniske supportcenter:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Derudover svarer personalet fra QIAGENS tekniske service gerne på spørgsmål vedrørende informationen og protokollerne i denne håndbog eller prøve- og analyseteknologier (kontaktinformation: se bagsiden, eller besøg www.qiagen.com).

Kommentarer og forslag

Kommentarer og forslag

Intet signal ved positive kontroller (EBV RG QS 1–4) i fluorescenskanalen Cycling Green eller Cycling A.FAM

- | | |
|--|---|
| a) Den valgte fluorescenskanal for PCR-dataanalyse stemmer ikke overens med protokollen | Ved dataanalyse vælges fluorescenskanalen Cycling Green eller Cycling A.FAM til analytisk EBV PCR og fluorescenskanalen Cycling Yellow eller Cycling A.JOE til den interne kontrol PCR. |
| b) Ukorrekt programmering af temperaturprofilen for Rotor-Gene-instrument | Sammenlign temperaturprofilen med protokollen. Se "Protokol: PCR og dataanalyse", side 14. |
| c) Ukorrekt konfiguration af PCR | Kontrollér Deres arbejdsstrin ved hjælp af pipetteringsskemaet, og gentag i givet fald PCR'en. Se "Protokol: PCR og dataanalyse", side 14. |
| d) Opbevaringsbetingelserne for en eller flere kitkomponenter var ikke i overensstemmelse med de instruktioner, der er angivet i "Opbevaring og håndtering af reagenser", (side 9) | Kontroller opbevaringsbetingelserne og reagensernes udløbsdato (se kitmærkaten), og brug om nødvendigt et nyt kit. |
| e) <i>artus</i> EBV RG PCR-kit er udløbet | Kontroller opbevaringsbetingelserne og reagensernes udløbsdato (se kitmærkaten), og brug om nødvendigt et nyt kit. |

Svagt eller intet signal fra den interne kontrol i fluorimeterkanalen Cycling Yellow eller Cycling A.JOE og samtidigt fravær af signal i kanalen Cycling Green eller Cycling A.FAM

- | | |
|---|---|
| a) PCR-betingelserne stemmer ikke overens med protokollen | Kontroller PCR-betingelserne (se ovenfor), og gentag om nødvendigt PCR med korrigerede indstillinger. |
|---|---|

Kommentarer og forslag

- b) PCR blev hæmmet
- Sørg for, at De bruger den anbefalede isoleringsmetode og følger producentens vejledning nøje.
- Når QIAamp DNA Mini-kittet, QIAamp DNA Blood Mini-kittet eller QIAamp UltraSens Virus-kittet anvendes, skal det tilsikres, at det anbefalede ekstra centrifugeringstrin er udført under DNA-isolationen før eluering for at fjerne evt. rester af ethanol (se "DNA-isolering", side 10 og 12).
- c) DNA gik tabt under ekstraktionen
- Hvis den interne kontrol er tilsat til ekstraktionen, kan et manglende signal fra den interne kontrol være tegn på tab af DNA under ekstraktionen. Sørg for, at De bruger den anbefalede isoleringsmetode (se "DNA-isolering", side 10) og følger producentens vejledning nøje.
- d)
- Opbevaringsbetingelserne for en eller flere kitkomponenter var ikke i overensstemmelse med de instruktioner, der er angivet i "Opbevaring og håndtering af reagenser", (side 9)
- Kontroller opbevaringsbetingelserne og reagensernes udløbsdato (se kitmærkaten), og brug om nødvendigt et nyt kit.
- e) *artus* EBV RG PCR-kit er udløbet
- Kontroller opbevaringsbetingelserne og reagensernes udløbsdato (se kitmærkaten), og brug om nødvendigt et nyt kit.

Signaler med de negative kontroller i fluorescenskanalen Cycling Green eller Cycling A.FAM eller i den analytiske PCR

- a) Kontamination under klargøring af PCR
- Gentag PCR med de nye reagenser i replika.
- Luk om muligt PCR-rørene umiddelbart efter tilsætning af den prøve, der skal testes.
- Positiv-kontrollerne skal pipetteres til sidst.
- Sørg for at arbejdsbordene og apparaterne regelmæssigt dekontamineres.

Kommentarer og forslag

- | | |
|--|--|
| b) Der forekom kontamination under ekstraktion | Gentag ekstraktion og PCR for den prøve, der skal testes, med nye reagenser.

Sørg for at arbejdsbordene og apparaterne regelmæssigt dekontamineres. |
|--|--|

Kvalitetskontrol

I overensstemmelse med QIAGENs ISO-certificerede kvalitetsstyringssystem testes hvert lot af *artus* EBV RG PCR-kit efter fastlagte specifikationer for at sikre en ensartet produktkvalitet.

Begrænsninger

Alle reagenser kan kun anvendes til in vitro-diagnostik.

Produktet må kun anvendes af personale, som er specielt instrueret og uddannet i in vitro-diagnostiske procedurer.

Det er nødvendigt nøje at følge brugervejledningen for at opnå optimale PCR-resultater.

Bemærk nøje udløbsdatoerne, der er trykt på æsken og etiketterne til alle komponenter. Brug aldrig for gamle komponenter.

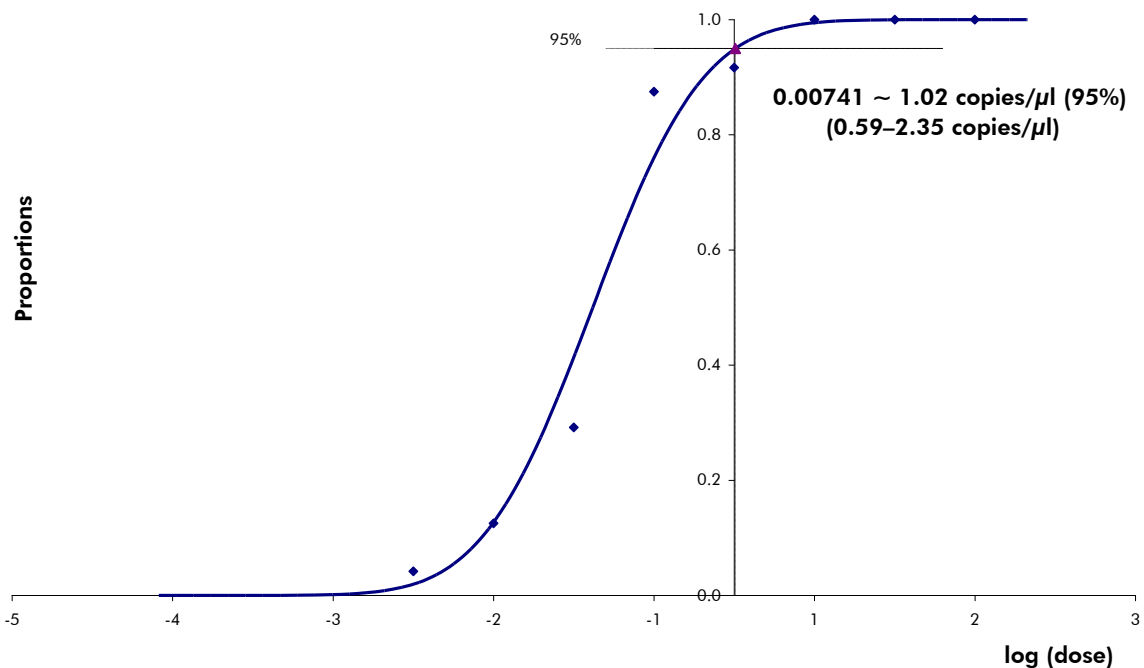
Selv om det er sjældent, kan mutationer i de stærkt konserverede områder af det virale genom, der dækkes af kittets primere og/eller probe, resultere i underkvantitering eller manglende evne til at detektere tilstedeværelsen af virusset i disse tilfælde. Analysedesignets gyldighed og ydeevne revideres med jævne mellemrum.

Ydelsesegenskaber

Analysefølsomhed

Til bestemmelsen af den analytiske sensitivitet for *artus* EBV RG PCR-kittet blev der udarbejdet en standardfortyndingsrække af 31,6 til 0,01 og fra 100 til nominelt 0,03 EBV-kopiækvivalenter/ μ l. Disse blev derefter analyseret ved hjælp af *artus* EBV RG PCR-kittet på henholdsvis Rotor-Gene 6000 og Rotor-Gene 3000. Testene blev gennemført på 3 forskellige dage med 8 replikater. Resultaterne blev udarbejdet ved hjælp af en probit-analyse. En grafisk illustration af probitanalysen på Rotor-Gene 6000 er vist i figur 10. Den analytiske detektionsgrænse for *artus* EBV RG PCR-kittet i kombination med Rotor-Gene Q MDx/Q/6000 og Rotor-Gene 3000 er henholdsvis

1,02 kopier/ μl ($p = 0,05$) og 3,8 kopier/ μl ($p = 0,05$). Det vil sige, at der er 95 % sandsynlighed for, at 1,02 kopier/ μl eller 3,8 kopier/ μl vil blive detekteret.



Figur 10. Probit-analyse: EBV (Rotor-Gene 6000). Analytisk sensitivitet for *artus* EBV RG PCR-kittet på Rotor-Gene 6000.

Specificitet

Specificiteten for *artus* EBV RG PCR-kittet sikres først og fremmest gennem udvalget af primere og prober samt ved valget af stringente reaktionsbetingelser. Primere og prober blev kontrolleret for mulige homologier med alle sekvenser, der er publiceret i genbanker efter sekvenssammenligningsanalyse. Detekterbarheden for alle relevante genotyper er således blevet sikret.

Desuden blev specificiteten valideret med 6 forskellige EBV-negative serumprøver. Disse genererede ikke nogen signaler med EBV-specifikke primere og prober, som indgår i EBV RG Master.

En potentiel krydsreaktivitet i *artus* EBV RG PCR-kittet blev testet med den kontrolgruppe, der er angivet i tabel 7. Ingen af de testede smitstoffer var reaktive.

Tabel 7. Testning af kittets specificitet med potentielt krydsreaktive patogener

Kontrolgruppe	EBV (Cycling Green eller Cycling A.FAM)	Intern kontrol (Cycling Yellow eller A. JOE)
Humant herpesvirus 1 (herpes simplex-virus 1)	–	+
Humant herpesvirus 2 (herpes simplex-virus 2)	–	+
Humant herpesvirus 3 (varicella-zoster-virus)	–	+
Humant herpesvirus 5 (cytomegalovirus)	–	+
Human T-celleleukæmi-virus 1	–	+
Human T-celleleukæmi-virus 2	–	+

Reproducerbarhed

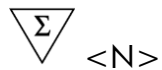
Dataene for reproducerbarheden registreres for at kunne foretage en regelmæssig vurdering af effekten af *artus* EBV RG PCR-kittet samt for en sammenligning med effekten af andre produkter. Disse data indhentes ved deltagelse i standardiserede præstationsprogrammer.

Referencer

QIAGEN vedligeholder en stor, ajourført onlinedatabase med videnskabelige publikationer, hvor QIAGENS produkter er anvendt. De avancerede søgefunktioner gør det muligt at finde de artikler, du har brug for, enten med en simpel nøgleordssøgning eller ved at angive applikation, forskningsområde, titel osv.

En fuldstændig referenceliste kan fås ved at besøge QIAGENS referencedatabase online på www.qiagen.com/RefDB/search.asp eller kontakte QIAGENS tekniske service eller den lokale forhandler.

Symbols



Indeholder tilstrækkelige reagenser til <N> tests



Anvendes inden



In vitro-diagnostisk medicinsk produkt



Katalognummer



Lot-nummer



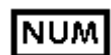
Materialenummer



Komponenter



Indeholder



Nummer



Globalt handelsvarenummer



Temperaturbegrænsning



Producent



Læs brugsvejledningen

Kontaktoplysninger

For teknisk bistand og yderligere information henvises til vores tekniske supportcenter på www.qiagen.com/Support, eller du kan henvende dig til en af QIAGENS tekniske serviceafdelinger eller lokale forhandlere (se bagsiden eller besøg www.qiagen.com).

Bestillingsinformation

Produkt	Indhold	Kat. nr.
<i>artus</i> EBV RG PCR Kit (24)	Til 24 reaktioner: Master, 4 kvantiteringsstandarder, intern kontrol, vand (PCR-kvalitet)	4501263
<i>artus</i> EBV RG PCR Kit (96)	Til 96 reaktioner: Master, 4 kvantiteringsstandarder, intern kontrol, vand (PCR-kvalitet)	4501265
EASYartus EBV RG PCR-kit – til integreret automatiseret prøveoprensning og patogendetektion fuldt i henhold til CE-IVD		
EASYartus EBV RG PCR Kit 1	Til 48 virale nukleinsyreklargøringer og 24 analyser: 1 x EZ1 DSP Virus-kit, 1 x <i>artus</i> EBV RG PCR-kit (24)	EA10123
EASYartus EBV RG PCR Kit 2	Til 48 virale nukleinsyreklargøringer og 48 analyser: 1 x EZ1 DSP Virus-kit, 2 x <i>artus</i> EBV RG PCR-kit (24)	EA10124
EZ1 DSP Virus-kit – til automatiseret, samtidig oprensning af viralt DNA og RNA fra 1–14 serum-, plasma- eller CSF-prøver		
EZ1 DSP Virus Kit (48)	Til 48 virale nukleinsyreklargøringer: Fyldte reagensbeholdere, engangs filterspidsholdere, engangs filterspidser, prøverør, elutionsrør, buffere, bærer-RNA	62724
QIAamp DNA Mini-kit — til oprensning af genom- og virus-DNA fra væv og andre prøver		
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Til 50 DNA-fremstillinger: 50 QIAamp Mini-spinspalter, QIAGEN Proteinase K, reagenser, buffere, indsamlingsrør (2 ml)	51304
QIAamp UltraSens Virus-kit – til koncentration og isolation af viralt DNA og RNA fra serum og plasma		
QIAamp UltraSens Virus Kit (50)	Til 50 virale nukleinsyreklargøringer: 50 QIAamp Mini-spinspalter, Proteinase K, carrier-RNA, indsamlingsrør (2 ml), buffere	53704

Produkt	Indhold	Kat. nr.
QIAamp DNA Blood Mini-kit — til oprensning af op til 12 µg genom-, mitokondrie- eller virus-DNA fra blod og relaterede kropsvæsker		
QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	Til 50 DNA-minifremstillinger: 50 QIAamp Mini-spinspalter, QIAGEN Protease, reagenser, buffere, indsamlingsrør (2 ml)	51104
Rotor-Gene Q MDx og tilbehør		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Realtids-PCR-cycler med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, violet), bærbar computer, software, tilbehør: Inklusive 1 års garanti på reservedele og arbejds løn. Installation og uddannelse ikke inkluderet	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Realtids-PCR-cycler med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, violet), bærbar computer, software, tilbehør: Inklusive 1 års garanti på reservedele og arbejds løn, installation og uddannelse	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Realtids-PCR-cycler og højopløselig smelteanalysator med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, violet) plus HRM-kanal, bærbar computer, software, tilbehør: Inklusive 1 års garanti på reservedele og arbejds løn. Installation og uddannelse ikke inkluderet	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Realtids-PCR-cycler og højopløselig smelteanalysator med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, violet) plus HRM-kanal, bærbar computer, software, tilbehør: Inklusive 1 års garanti på reservedele og arbejds løn, installation og uddannelse	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Realtids-PCR-instrument med 6 kanaler (blå, grøn, gul, orange, rød, violet), inkl. bærbar computer, software, tilbehør: Inklusive 1 års garanti på reservedele og arbejds løn. Installation og uddannelse ikke inkluderet	9002042

Produkt	Indhold	Kat. nr.
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Realtids-PCR-instrument med 6 kanaler (blå, grøn, gul, orange, rød, violet), inkl. bærbar computer, software, tilbehør: Inklusive 1 års garanti på reservedele og arbejds løn, installation og uddannelse	9002043
Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform	Realtids-PCR-cycler med 2 kanaler (grøn, gul), bærbar computer, software, tilbehør: inklusive 1 års garanti på reservedele og arbejds løn, installation og uddannelse ikke inkluderet	9002002
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	Realtids-PCR-cycler med 2 kanaler (grøn, gul), bærbar computer, software, tilbehør: inklusive 1 års garanti på reservedele og arbejds løn, installation og uddannelse	9002003
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform	Realtids-PCR-cycler og Højopløselig smelteanalysator med 2 kanaler (grøn, gul) plus HRM-kanal, bærbar computer, software, tilbehør, inkluderer 1 års garanti på reservedele og arbejds løn, installation og uddannelse ikke inkluderet	9002012
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	Realtids-PCR-cycler og Højopløselig smelteanalysator med 2 kanaler (grøn, gul) plus HRM-kanal, bærbar computer, software, tilbehør, inkluderer 1 års garanti på reservedele og arbejds løn, installation og uddannelse	9002013
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminiumsblok til manuel opsætning af reaktion med en etkanalspipette i 72 x 0,1 ml rør	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Aluminiumsblok til manuel opsætning af reaktion i et standard 8 x 12-array med 96 x 0,2 ml rør	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 strips a 4 rør og hætter til 1000 reaktioner	981103

Produkt	Indhold	Kat. nr.
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strips a 4 rør óg hætter til 10.000 reaktioner	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 tyndvæggede rør til 1000 reaktioner	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 tyndvæggede rør til 10.000 reaktioner	981008

For opdateret licensinformation og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser henvises til den aktuelle QIAGEN-kit-håndbog eller -brugervejledning. QIAGEN kit-håndbøger og brugervejledninger kan findes på www.qiagen.com eller kan rekvireres fra QIAGENs tekniske serviceafdeling eller den lokale leverandør.

Ved købet af dette produkt erhverver brugeren tilladelse til at bruge det til udførelse af diagnostiske serviceydelser til human in vitro-diagnostik. Derved gives intet generelt patent eller nogen anden tilladelse af nogen art ud over denne specifikke brugsret.

Varemærker: QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, EASY*artus*®, EZ1®, Rotor-Gene®, UltraSens® (QIAGEN Group), FAM™, JOE™ (Life Technologies), SYBR® (Molecular Probes, Inc.).

Aftale om begrænset licens

Brug af dette produkt betyder, at enhver køber eller bruger af *artus* EBV RG PCR-kittet accepterer følgende vilkår:

1. *Artus EBV RG PCR-kittet må kun bruges i overensstemmelse med artus EBV RG PCR-kit-håndbogen, og kun med de komponenter, der følger med kittet.* QIAGEN giver ingen licens, under nogen intellektuel ejendomsret, til at bruge eller inkorporere komponenterne i dette kit med komponenter, der ikke er inkluderet i dette kit, undtagen som beskrevet i *artus EBV RG PCR-kit-håndbogen* og yderligere protokoller, som er tilgængelige på www.qiagen.com.
2. Ud over de udtrykkeligt givne licenser giver QIAGEN ingen garanti for, at dette kit og/eller brugen af det ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
3. Dette kit og dets komponenter er under licens til engangsbrug og må ikke genbruges, gendannes eller videresælges.
4. QIAGEN afviser specifikt alle andre licenser, udtrykte eller underforståede, end dem, der udtrykkeligt er angivet.
5. Køberen og brugeren af kittet indvilliger i ikke at tage, eller lade andre tage, skridt, der kunne føre til, eller fremme, handlinger, der forbydes ovenfor. QIAGEN kan håndhæve forbuddene i denne begrænsede licensaftale i enhver ret, og vil inddrive alle undersøgelses- og retsomsomkostninger, herunder advokatsalærer, i ethvert søgsmål for at håndhæve denne begrænsede licensaftale samt alle deres intellektuelle ejendomsrettigheder i forbindelse med kittet og/eller komponenterne deri.

For opdaterede licensbetingelser henvises der til www.qiagen.com.

© 2009-2014 QIAGEN, alle rettigheder forbeholdes.

www.qiagen.com

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

