

artus[®] Borrelia LC PCR Kit

Manuál



24 (Katalogové čís. 4551063)



96 (Katalogové čís. 4551065)

In vitro diagnostikum pro kvantitativní stanovení

Pro použití s přístrojem

LightCycler[®] 1.1/1.2/1.5 a LightCycler[®] 2.0

Březen 2015 – Verze 1



4551063, 4551065



1050871CS



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NĚMECKO

R3

MAT

1050871CS



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN je vedoucím poskytovatelem inovativních technologií pro přípravu vzorků a jejich rozboru, které umožňují izolaci a analýzu jakéhokoliv biologického vzorku. Naše vysoce kvalitní produkty a služby Vám zajišťují úspěšný výsledek.

QIAGEN určuje standardy pro:

- purifikaci DNA, RNA a proteinů
- rozbor nukleových kyselin a proteinů
- microRNA výzkum a RNAi
- automatizaci technologií pro přípravu vzorků a jejich rozboru

Poskytujeme Vám nejnovější technologie, abyste rychle a spolehlivě dosáhli nejlepších výsledků. Více informací naleznete na www.qiagen.com.

Obsah

1. Obsah	5
2. Skladování.....	5
3. Další potřebné vybavení	6
4. Všeobecná preventivní opatření	6
5. Informace o původcích	6
6. Princip PCR s hodnocením v reálném čase	7
7. Popis produktu	7
8. Protokol	8
8.1 Izolace DNA	8
8.2 Interní kontrola	9
8.3 Kvantifikace	10
8.4 Příprava PCR	12
8.5 Programování přístrojů <i>LightCycler</i>	16
8.5.1 Programování přístroje <i>LightCycler 1.1/1.2/1.5</i>	16
8.5.2 Programování přístroje <i>LightCycler 2.0</i>	18
9. Vyhodnocení	21
9.1 Vyhodnocení PCR dat přístroje <i>LightCycler 1.1/1.2/1.5</i>	21
9.2 Vyhodnocení PCR dat přístroje <i>LightCycler 2.0</i>	24
10. Řešení problémů	28
11. Specifikace	30
11.1 Analytická senzitivita	30
11.1.1 Přístroj <i>LightCycler 1.1/1.2/1.5</i>	30
11.1.2 Přístroj <i>LightCycler 2.0</i>	31
11.2 Specifická	32

11.3	Přesnost.....	33
11.4	Robustnost.....	34
11.5	Reprodukovatelnost.....	35
11.6	Diagnostické hodnocení	35
12.	Zvláštní pokyny pro použití produktu	35
13.	Varování a bezpečnostní opatření	35
14.	Kontrola kvality	35
15.	Literatura	36
16.	Vysvětlení symbolů	37

artus Borrelia LC PCR Kit

Pro použití s přístrojem *LightCycler 1.1/1.2/1.5* nebo *LightCycler 2.0*.

1. Obsah

	Označení a obsah	Kat. čís. 4551063 24 reakcí	Kat. čís. 4551065 96 reakcí
Modrá	<i>Borrelia LC Master</i>	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
Červená	<i>Borrelia LC QS 1st</i> 3 x 10 ⁴ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Červená	<i>Borrelia LC QS 2nd</i> 3 x 10 ³ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Červená	<i>Borrelia LC QS 3rd</i> 3 x 10 ² cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Červená	<i>Borrelia LC QS 4th</i> 3 x 10 ¹ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Zelená	<i>Borrelia LC ICst</i>	1 x 1 000 μl	2 x 1 000 μl
Bílá	<i>Water (PCR grade)</i>	1 x 1 000 μl	1 x 1 000 μl

▪ QS = Kvantifikační standard
IC = Interní kontrola

2. Skladování

Komponenty *artus Borrelia LC PCR Kit* se skladují při -15 °C až -30 °C a jsou stabilní do data použitelnosti uvedeného na štítku. Zabraňte opakovanému rozmrazení a zmrazení (> 2 x), snižuje se tím senzitivita. Při nepravidelném používání by proto měly být reagenty alikvotovány. V případě, že je nutné komponenty skladovat při teplotě +4°C, skladujte je takto maximálně po dobu pěti hodin.

3. Další potřebné vybavení

- Laboratorní rukavice bez pudru
- DNA-izolační souprava (viz **8.1 Izolace DNA**)
- Pipety (nastavitelné)
- Sterilní pipetovací špičky s filtrem
- Vortex mixer
- Stolní centrifuga s rotorem pro 2 ml zkumavky
- *Color Compensation Set* (Roche Diagnostics, kat. č. 2 158 850) k vytvoření souboru *Crosstalk Color Compensation* u přístroje *LightCycler 1.1/1.2/1.5*
- *LightCycler Multicolor Demo Set* (kat. č. 03 624 854 001) pro přístroj *LightCycler 2.0*
- *LightCycler* kapiláry (20 µl)
- *LightCycler* Cooling Block
- Přístroj *LightCycler 1.1/1.2/1.5* (software verze 3.5) nebo *LightCycler 2.0* (software verze 4.0)
- *LightCycler* Capping Tool

4. Všeobecná preventivní opatření

Uživatel by měl dbát na následující:

- Používejte sterilní pipetovací špičky s filtrem.
- Skladujte, izolujte a přidávejte pozitivní materiál (vzorky, kontroly, amplifikáty) do reakce na jiném místě než ostatní reagenty.
- Všechny komponenty před počátkem testu úplně rozmrazte při pokojové teplotě.
- Následně komponenty řádně promíchejte a krátce centrifugujte.
- Pracujte plynule na ledu nebo v *LightCycler* Cooling Block.

5. Informace o původcích

Borrelia burgdorferi je původcem s celosvětovým rozšířením, který je přenášen klíštětem a může způsobit lymeskou borreliózu. Raná stádia

onemocnění se mohou spontánně sama vyléčit, avšak stejně tak mohou vyústit v chronickou infekci s persistencí původce. Po několika dnech až týdnech po infikování se směrem od vstupního místa do okolí vytvoří vystouplé zarudnutí kůže, erythema migrans. V sekundárním stádiu je postižena především kůže, centrální a periferní nervstvo, srdce a pohybová soustava. Chronický obraz nemoci (terciární lymeská borrelióza) se projeví po třech měsících až několika letech po infikování a vyznačuje se hlavně acrodermatitis chronica atrophicans a revmatickými obtížemi v podobě kloubních zánětů s výpotkem.

6. Princip PCR s hodnocením v reálném čase

Při diagnostice pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) se amplifikují specifické oblasti genomu původce. Detekce probíhá při PCR v reálném čase pomocí fluorescenčních barviv. Barviva jsou zpravidla vázaná na oligonukleotidové sondy, které se specificky vážou na PCR amplifikát. Detekce intenzity fluorescence v průběhu PCR v reálném čase umožňuje průkaz a kvantifikaci produktů, aniž by bylo nutné po PCR znovu otevírat testovací kapičky (Mackay, 2004).

7. Popis produktu

artus Borrelia LC PCR Kit je systém k přímému použití pro průkaz *Borrelia* DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) v přístroji *LightCycler*. *Borrelia LC Master* obsahuje reagentie a enzymy pro specifickou amplifikaci 102 bp dlouhého úseku genomu *Borrelia* a také pro bezprostřední detekci amplifikátu pomocí přístroje *LightCycler 1.1/1.2/1.5* popř. *LightCycler 2.0*. Kromě toho obsahuje *artus Borrelia LC PCR Kit* druhý heterologní amplifikační systém pro průkaz potenciální PCR inhibice.

Produkt PCR	Volba fluorescenčních kanálů	
	<i>LightCycler 1.1/1.2/1.5</i>	<i>LightCycler 2.0</i>
<i>Borrelia</i>	F1	530
<i>Borrelia LC IC</i>	F2	610

Amplifikace a detekce této *Interní kontroly (IC)* nemají negativní vliv na limit detekce analytické *Borrelia* PCR (viz **11.1 Analytická senzitivita**). Spolu s produktem se dodávají externí pozitivní kontroly (*Borrelia* LC QS 1 - 4), s jejichž pomocí lze určit množství původce ve vzorku. Prostudujte si prosím oddíl **8.3 Kvantifikace**.

8. Protokol

8.1 Izolace DNA

DNA-izolační soupravy nabízejí různí výrobci. V závislosti na protokolu zvoleného výrobce použijte dané množství vzorku a proveďte izolaci DNA podle návodu. Doporučujeme následující izolační soupravy*:

Vzorek	Izolační souprava	Katalogové číslo	Výrobce	Nosič RNA
kožní biopsie, synoviální tekutina, likvor, krev, klišťata, kultura	QIAamp DNA Mini Kit (50)	51 304	QIAGEN	neobsažen

- Užití **nosiče RNA** má rozhodující význam pro efektivitu izolace a tím pro výtěžek DNA/RNA. Pokud použitá izolační souprava neobsahuje žádný nosič RNA, povšimněte si prosím, že je při izolaci nukleových kyselin z nebuněčných tělesných tekutin resp. materiálů s malým obsahem DNA/RNA (např. likvor) důrazně doporučeno přidat nosič RNA (RNA homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, kat. čís. 27-4110-01). Prosím postupujte následujícím způsobem:
 - a) Resuspendujte lyofilizovaný nosič RNA v elučním pufru (nepoužívejte lyzační pufr) izolační soupravy (např. AE pufr soupravy QIAamp DNA Mini Kit) a ředěním vytvořte roztok o koncentraci 1 µg/µl. Rozdělte tento roztok nosiče RNA na počet alikvotů odpovídající Vaším požadavkům a skladujte je při -20°C. Zabraňte opakovanému rozmrazení (> 2 x) alikvotu nosiče RNA.

* Uvedené systémy se nacházejí ve validační fázi.

- b) Používejte 1 µg nosiče RNA na 100 µl lyzačního pufru. Je-li extrakčním protokolem stanoveno 200 µl lyzačního pufru na jeden vzorek, vložte 2 µl nosiče RNA (1 µg/µl) přímo do lyzačního pufru. Před začátkem každé izolace musí být podle následujícího pipetovacího schématu čerstvě vytvořena směs lyzačního pufru a nosiče RNA (popř. i *Interní kontroly*, viz **8.2 Interní kontrola**):

Počet vzorků	1	12
Lyzační pufr	např. 200 µl	např. 2 400 µl
Nosič RNA (1 µg/µl)	2 µl	24 µl
Celkový objem	202 µl	2 424 µl
Objem pro izolaci	200 µl	po 200 µl

- c) Tuto čerstvě vytvořenou směs lyzačního pufru a nosiče RNA vložte ihned do izolace. Skladování směsi není možné.
- Při izolaci využívající promývací pufr s obsahem **etanolu** bezpodmínečně zajistěte, aby byl před elucí proveden ještě jeden centrifugační krok (tři minuty, 13 000 ot/min) a tím se odstranily zbytky etanolu. Předejdete tak možným inhibicím PCR.
 - *artus Borrelia LC PCR Kit* není vhodný pro izolace na bázi **fenolu**.

Důležité: *Interní kontrolu* soupravy *artus VZV LC PCR Kit* lze vložit přímo do izolace (viz **8.2 Interní kontrola**).

8.2 Interní kontrola

Spolu s produktem se dodává *Interní kontrola (Borrelia LC IC)*. Máte tak možnost kontrolovat **jak izolaci DNA, tak také možnou inhibici PCR** (viz Obr. 1). Pro tuto aplikaci přidejte k izolaci *Interní kontrolu* v poměru 0,1 µl na 1 µl elučního objemu. Jestliže například používáte QIAamp DNA Mini Kit a eluujete DNA v 50 µl AE pufru, vložte 5 µl *Interní kontroly*. Množství vkládané *Interní kontroly* závisí **pouze** na elučním objemu. *Interní kontrola* a nosič RNA (viz **8.1 Izolace DNA**) by měly být přidávány pouze k

- směsi lyzačního pufru a vzorku nebo
- přímo k lyzačnímu pufru.

Interní kontrola nesmí být přidána přímo ke vzorku. Při přidání k lyzačnímu pufru se musí dbát na to, aby byla směs *Interní kontroly*, lyzačního pufru a nosiče RNA čerstvě připravena a ihned použita (skladování směsi při pokojové teplotě nebo v lednici může již po několika hodinách vést k vynechání *Interní kontroly* a ke snížení efektivity izolace). *Interní kontrolu* a nosič RNA **nepipetujte** přímo do vzorku.

Volitelně lze *Interní kontrolu* použít **výhradně ke kontrole možné inhibice PCR** (viz Obr. 2). V tomto případě přidejte 0,5 µl *Interní kontroly* na jednu testovací směs přímo do 15 µl *Borrelia LC Master*. Pro každou PCR reakci použijte 15 µl takto vytvořeného Master Mixu^{*} a přidejte následně 5 µl izolátu. Jestliže připravujete jeden běh pro více vzorků, zvyšte potřebná množství *Borrelia LC Master* a *Interní kontroly* podle počtu vzorků (viz **8.4 Příprava PCR**).

8.3 Kvantifikace

S *Kvantifikačními standardy* (*Borrelia LC QS 1 - 4*) dodávanými spolu s produktem se zachází stejně jako s již izolovanými vzorky a přidávají se ve stejném objemu (5 µl). Standardní křivku v přístroji *LightCycler* vytvoříte tak, že následujícím způsobem použijete všechny čtyři *Kvantifikační standardy* dodávané s produktem:

LightCycler 1.1/1.2/1.5

Definujte *Borrelia LC QS 1 - 4* v *Sample Loading Screen* jako standardy a zadejte uvedené koncentrace (viz *LightCycler Operator's Manual*, Version 3.5, Chapter B, 2.4. Sample Data Entry).

LightCycler 2.0

Pro definici standardů aktivujte prosím v menu okna *Samples* funkci *Analysis Type* a zvolte *Absolute Quantification*. Nyní můžete *Borrelia LC QS 1 - 4* definovat jako standardy a zadat odpovídající koncentrace (viz *LightCycler Operator's Manual*, Version 4.0, Chapter 2.2 Entering Sample Information).

Dbejte prosím na to, aby **nebyla** aktivována funkce *Enable Controls*. V opačném případě dochází k omezení volby možností analýzy při vyhodnocení dat (viz **9.2 Vyhodnocení PCR dat přístroje *LightCycler 2.0***).

Tuto standardní křivku lze použít také pro následné kvantifikace, pokud je během aktuálního běhu použit alespoň jeden standard **jedné** definované koncentrace. K tomu je zapotřebí dříve vytvořenou standardní křivku importovat (viz *LightCycler Operator's Manual*, Version 3.5, Chapter B, 4.2.5. Quantification with an External Standard Curve resp. Version 4.0, Chapter 4.2.2 Saving a Standard Curve). U této formy kvantifikace je však třeba zohlednit skutečnost, že v důsledku variability mezi PCR běhy může nastat odchylka ve výsledku.

Upozornění: *Kvantifikační standardy* jsou definovány jako kopie/μl. Pro přepočítání hodnot získaných pomocí standardní křivky na kopie/ml vzorku se používá následující vzorec:

$$\text{výsledek (kopie/ml)} = \frac{\text{výsledek (kopie/}\mu\text{l)} \times \text{eluční objem (}\mu\text{l)}}{\text{objem vzorku (ml)}}$$

Prosím povšimněte si, že se do výše uvedeného vzorce dosazuje zásadně **původní** objem vzorku. Toto se musí zohlednit, byl-li objem vzorku před izolací nukleových kyselin pozměněn (např. redukce objemu centrifugací nebo jeho zvýšení naplněním na objem požadovaný pro izolaci).

Důležité: Na www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX je k dispozici příručka pro zjednodušení kvantitativního vyhodnocení systémů *artus* na přístroji *LightCycler 1.1/1.2/1.5* nebo *LightCycler 2.0* (**Technical Note for quantitation on the *LightCycler 1.1/1.2/1.5* or *LightCycler 2.0* Instrument**).

* Zvýšení objemu podmíněné přidáním *Interní kontroly* je při přípravě PCR reakce opominuto. Senzitivita není omezena.

8.4 Příprava PCR

Ověřte, že je Cooling Block s uvnitř obsaženými adaptéry (příslušenství přístroje *LightCycler*) předem vychlazen přibližně na +4°C. Do adaptéru Cooling Blocku vložte takový počet kapilár *LightCycler*, který je potřebný pro plánovanou reakci. Dbejte na to, aby byl společně s každým během PCR proveden alespoň jeden *Kvantifikační standard* a jedna negativní kontrola (*Water, PCR grade*). Pro vytvoření standardní křivky použijte prosím u každého běhu PCR všechny spolu s produktem dodávané *Kvantifikační standardy (Borrelia LC QS 1 - 4)*. Všechny reagenty se musí před začátkem testu zcela rozmrazit při pokojové teplotě, musí být dobře promíchány (opakovaný náběh pipetou a vypuštění pipety nebo krátký vortex) a následně centrifugovány.

Chcete-li *Interní kontrolou* kontrolovat **jak izolaci DNA, tak možnou inhibici PCR**, musí být napřed *Interní kontrola* přidána k izolaci (viz **8.2 Interní kontrola**). V tomto případě používejte následující schéma pipetování (viz také schématický přehled na Obr. 1):

	Počet vzorků	1	12
1. Příprava Master Mixu	<i>Borrelia LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>Borrelia LC IC</i>	0 µl	0 µl
	celkový objem	15 µl	180 µl
2. Příprava PCR reakce	Master Mix	15 µl	po 15 µl
	vzorek	5 µl	po 5 µl
	celkový objem	20 µl	po 20 µl

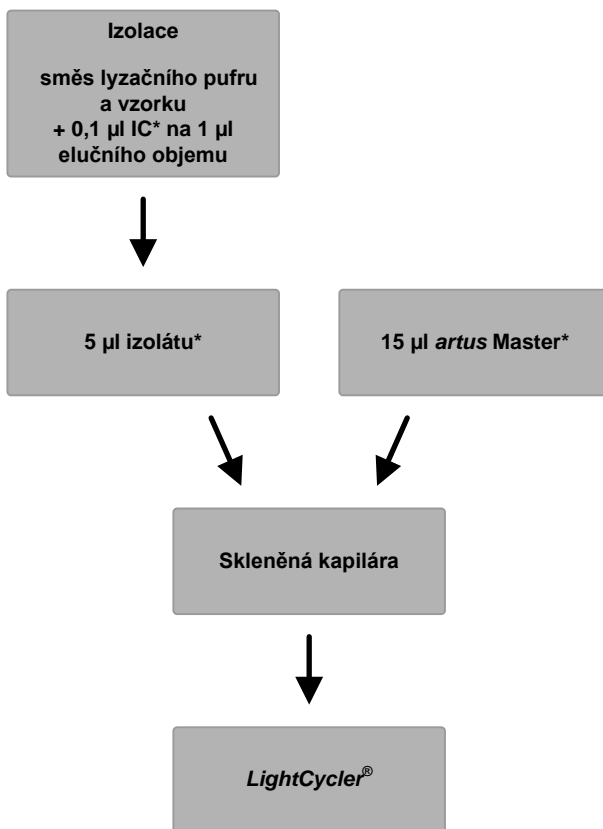
Jestliže chcete *Interní kontrolu* použít **výhradně ke kontrole PCR inhibice**, je třeba ji přidat přímo do *Borrelia LC Master*. V tomto případě používejte následující schéma pipetování (viz také schématický přehled na Obr. 2):

	Počet vzorků	1	12
1. Příprava Master Mixu	<i>Borrelia LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>Borrelia LC IC</i>	0,5 µl	6 µl
	celkový objem	15,5 µl*	186 µ
2. Příprava PCR reakce	Master Mix	15 µl	po 15 µl
	vzorek	5 µl	po 5 µl
	celkový objem	20 µl	po 20 µl

Do plastického zásobníku každé kapiláry pipetujte 15 µl Master Mixu. Následně přidejte 5 µl eluátu z izolace DNA. Podobně musíte přidat jako pozitivní kontrolu 5 µl alespoň jednoho *Kvantifikačního standardu* (*Borrelia LC QS 1 - 4*) a jako negativní kontrolu 5 µl vody (*Water, PCR grade*). Uzavřete kapiláry. Směs převedete z plastického zásobníku do kapiláry tak, že na stolní centrifuze centrifugujete adaptéry s uvnitř obsaženými kapilárami po dobu deseti sekund při maximálně 400 x g (2 000 ot/min).

* Zvýšení objemu podmíněně přidáním *Interní kontroly* je při přípravě PCR reakce opominuto. Senzitivita není omezena.

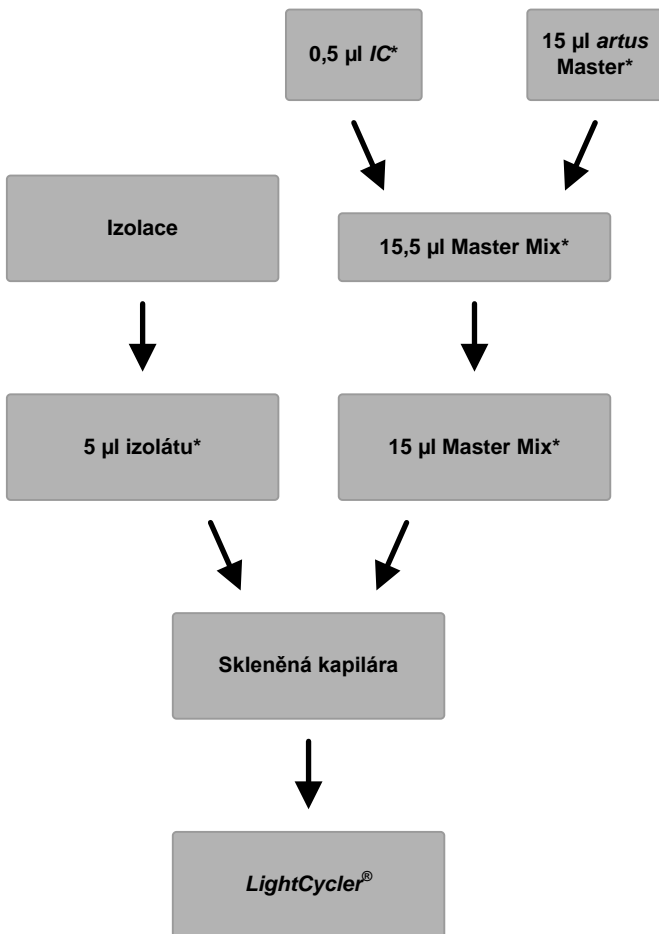
Přidání *Interní kontroly* k izolaci



Obr. 1: Schéma pracovního postupu pro kontrolu izolace a PCR inhibice.

* Při každém pipetovacím kroku je třeba bezpodmínečně dbát na to, aby byly používané roztoky dokonale roztáté, řádně promíchané a krátce centrifugované.

Přidání *Interní kontroly* k *artus* Master



Obr. 2: Schéma pracovního postupu pro kontrolu PCR inhibice.

* Při každém pipetovacím kroku je třeba bezpodmínečně dbát na to, aby byly používané roztoky dokonale roztáté, řádně promíchané a krátce centrifugované.

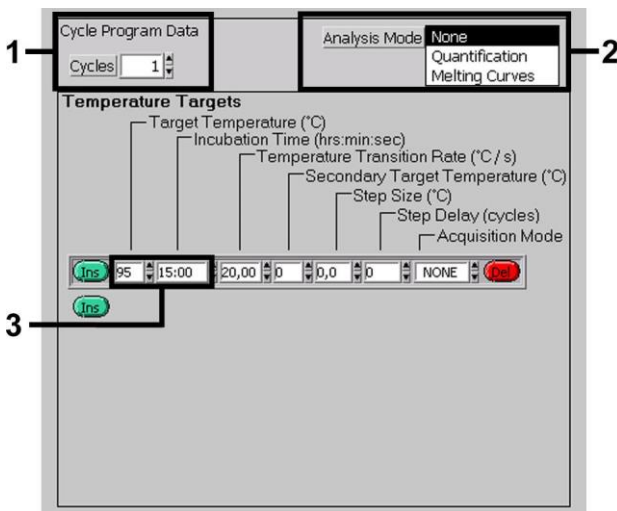
8.5 Programování přístrojů *LightCycler*

8.5.1 Programování přístroje *LightCycler 1.1/1.2/1.5*

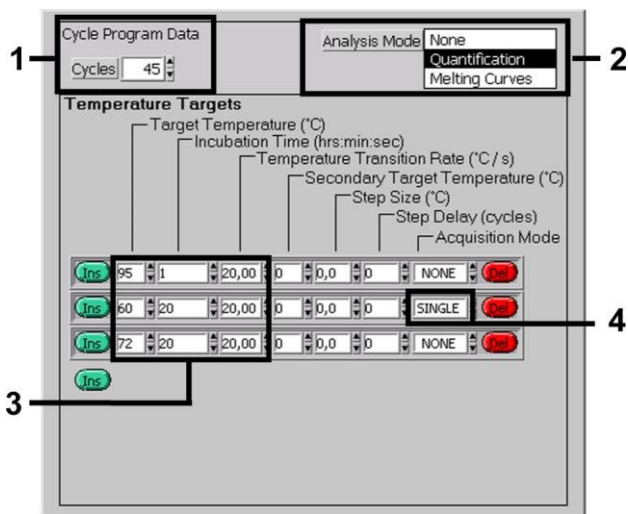
Pro detekci *Borrelia* DNA vytvořte na přístroji *LightCycler 1.1/1.2/1.5* teplotní profil následujícími třemi pracovními kroky (viz Obr. 3 - 5):

- | | | |
|----|-------------------------------------|--------|
| A. | Počáteční aktivace Hot Start enzymu | Obr. 3 |
| B. | Amplifikace DNA | Obr. 4 |
| C. | Chlazení | Obr. 5 |

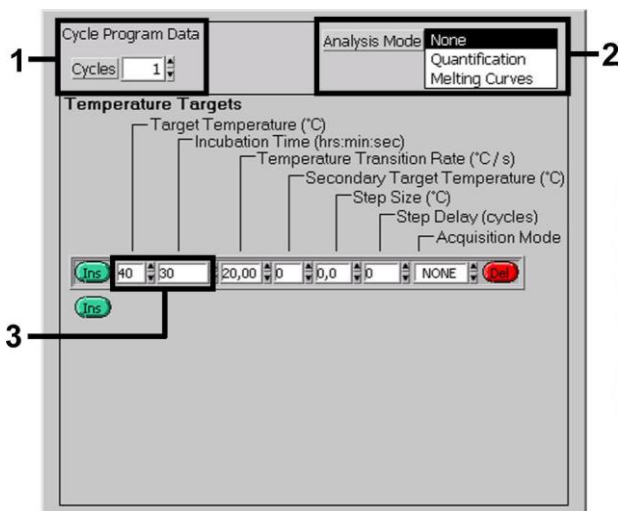
Dbejte zvláště na nastavení *Analysis Mode*, *Cycle Program Data* a *Temperature Targets*. Na obrázcích jsou tato nastavení zvýrazněna černými rámečky. Pokyny pro programování přístroje *LightCycler 1.1/1.2/1.5* naleznete v příručce *LightCycler Operator's Manual*.



Obr. 3: Počáteční aktivace Hot Start enzymu.



Obr. 4: Amplifikace DNA.



Obr. 5: Chlazení.

8.5.2 Programování přístroje *LightCycler 2.0*

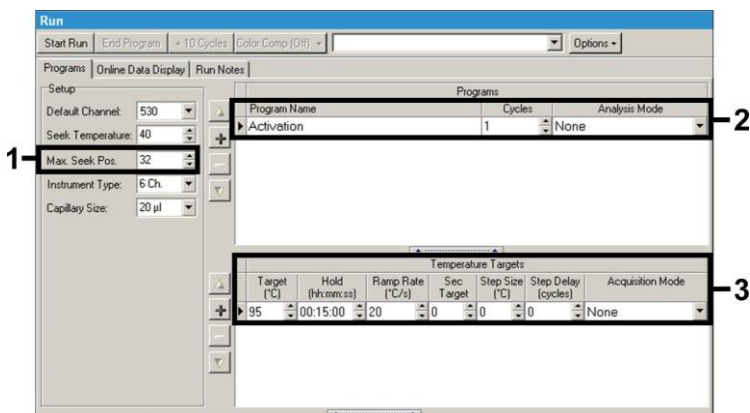
Pro programování běhu PCR pomocí přístroje *LightCycler 2.0* aktivujte prosím v menu volbu *New* a zvolte *LightCycler Experiment*.

Následně můžete k detekci *Borrelia* DNA vytvořit na přístroji *LightCycler 2.0* teplotní profil, který se skládá z následujících tří pracovních kroků (viz Obr. 6 - 8).

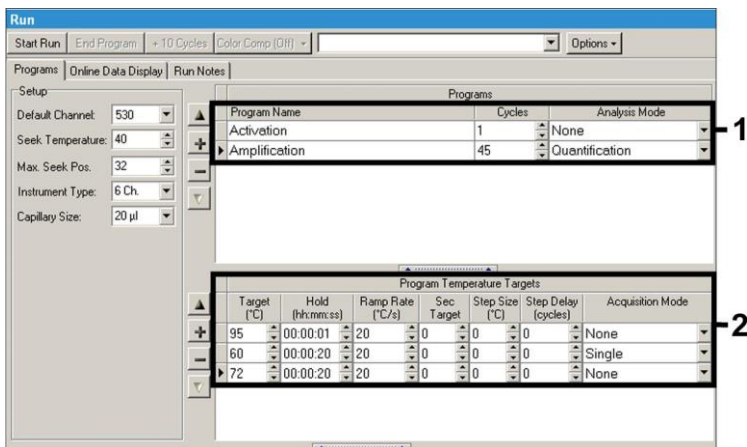
- | | | |
|----|-------------------------------------|--------|
| A. | Počáteční aktivace Hot Start enzymu | Obr. 6 |
| B. | Amplifikace DNA | Obr. 7 |
| C. | Chlazení | Obr. 8 |

Dbejte zvláště na nastavení, která jsou na obrázcích zvýrazněná černými rámečky. Pokyny pro programování přístroje *LightCycler 2.0* naleznete v příručce *LightCycler Operator's Manual*.

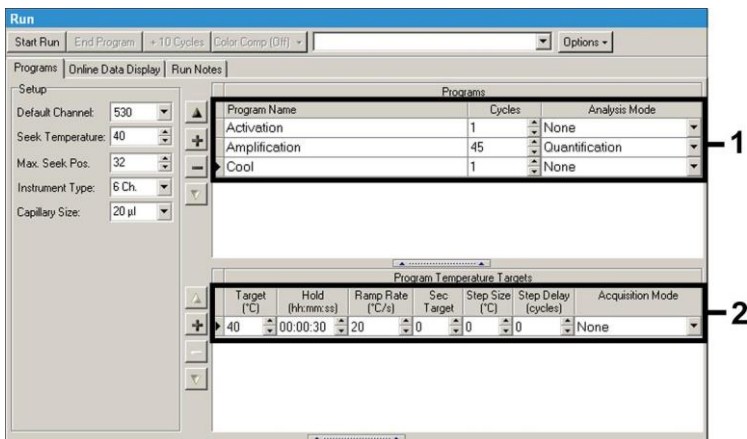
Dbejte prosím na to, abyste nejdříve zadali počet kapilár připravených pro tento PCR běh (*Max. Seek Pos.*, viz Obr. 6).



Obr. 6: Počáteční aktivace Hot Start enzymu.



Obr. 7: Amplifikace DNA.

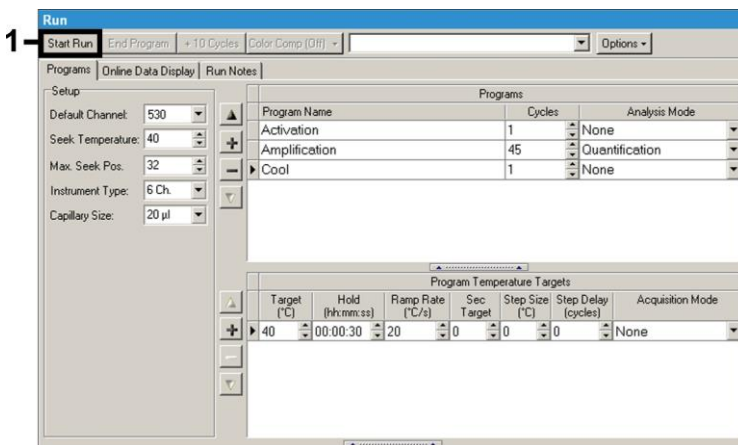


Obr. 8: Chlazení.

Pro zadání specifikací vzorku aktivujte prosím ikonu *Samples*.

- Nejprve zadejte do okna *Capillary View* celkový počet směrů PCR připravených pro běh PCR (*Sample Count*).
- Následně můžete pod *Sample Name* přiřadit vzorku jméno.

- Dále zvolte u *Selected Channels* fluorescenční kanál 530 pro detekci analytické *Borrelia* PCR a 610 pro průkaz PCR *Interní kontroly*.
- Pro definici standardů a přiřazení odpovídajících koncentrací zvolte prosím u *Analysis Type* volbu *Absolute Quantification* (viz **8.3 Kvantifikace**).
- Dbejte na to, aby **nebyla** aktivována funkce *Enable Controls*. V opačném případě dochází k omezení volby možností analýzy při vyhodnocení dat (modus *Fit Points* není k dispozici, viz **9.2 Vyhodnocení PCR dat přístroje LightCycler 2.0**). U *Target Name* můžete zvoleným fluorescenčním kanálům 530 a 610 přiřadit cílové sekvence, které mají být prokázány (*Borrelia* nebo *Interní kontrola*). Vyplnění sloupce *Target Name* lze ulehčit funkcí *Auto Copy...*. Definování *Target Name* pomáhá udržet lepší přehled, pro analýzu dat však není nezbytně nutné.
- Aby mohla být při analýze dat vytvořena standardní křivka, musí být *Kvantifikační standardy* definovány odpovídajícími koncentracemi. Zvolte tedy prosím *Standard* u *Sample Type* a zadejte odpovídající koncentrace u *Concentration*.
- Naprogramovaný teplotní profil lze uložit na pevném disku počítače, aby mohl být znovu použit pro další běhy. K tomuto kroku aktivujte funkci *Save As...* v menu *File*. V okně, které se otevře, zvolte v *Templates and Macros* submenu *Run Templates* a uložte zde data pod vhodným jménem.
- Běh PCR spustíte tak, že přejdete k ikonce *Run* a aktivujete funkci *Start Run* (viz Obr. 9). Po určení cílové složky pro ukládání dat se spustí program PCR.



Obr. 9: Start běhu PCR.

9. Vyhodnocení

9.1 Vyhodnocení PCR dat přístroje *LightCycler* 1.1/1.2/1.5

K analýze PCR dat získaných pomocí přístroje *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 doporučujeme používat *LightCycler* Software Version 3.5.

U vícebarevných analýz se mezi fluorimetrickými kanály vyskytují interference. Software přístroje *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 obsahuje soubor označený jako *Color Compensation File*, který tato záření kompenzuje. Tento soubor otevřete před, v průběhu nebo po skončení PCR aktivací přepínací plochy *Choose CCC File* resp. *Select CC Data*. Není-li instalován žádný soubor *Color Compensation File*, vytvořte soubor podle návodu v *LightCycler Operator's Manual*. Po aktivaci souboru *Color Compensation File* se ve fluorimetrických kanálech F1, F2 a F3 objeví oddělené signály. Pro analýzu výsledků PCR, které byly získány pomocí *artus Borrelia LC PCR Kit*, zvolte prosím pro analytickou *Borrelia* PCR pohledovou funkci F1 resp. F2 pro PCR *Interní kontroly*. Při analýze kvantitativních běhů dodržujte bezpodmínečně oddíl **8.3 Kvantifikace a Technical Note for quantitation on the *LightCycler***

1.1/1.2/1.5 or LightCycler 2.0 Instrument, která je k dispozici na www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

Může dojít k následujícím výsledkům:

1. Ve fluorimetrickém kanálu F1 je detekován signál.

Výsledek analýzy je pozitivní: Vzorek obsahuje *Borrelia* DNA.

V tomto případě je detekce signálu v kanálu F2 podružná, protože vysoké výchozí koncentrace *Borrelia* DNA (pozitivní signál v kanálu F1) mohou vést k redukovanému až chybějícímu fluorescenčnímu signálu *Interní kontroly* v kanálu F2 (kompetice).

2. Ve fluorimetrickém kanálu F1 není detekován žádný signál, nýbrž pouze v kanálu F2 (signál *Interní kontroly*).

Ve vzorku není prokazatelná žádná *Borrelia* DNA. Lze jej proto považovat za negativní.

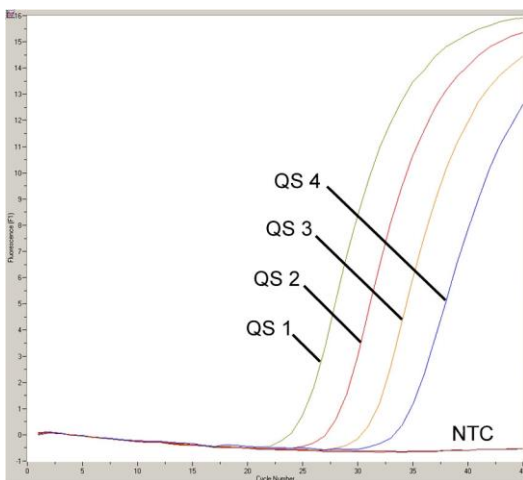
Při negativní *Borrelia* PCR vylučuje detekovaný signál *Interní kontroly* možnost inhibice PCR.

3. Signál není detekován ani v kanálu F1 ani v kanálu F2.

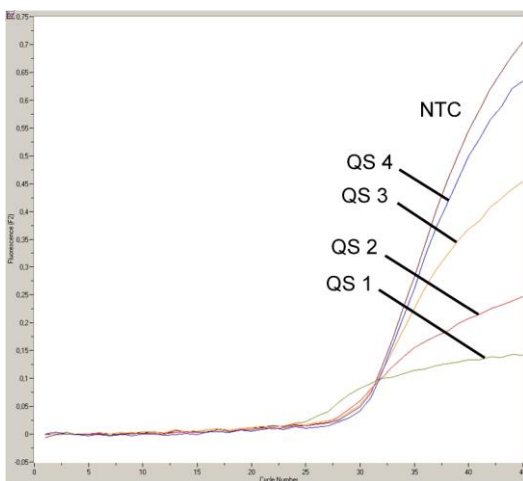
Není možné učinit diagnostický závěr.

Pokyny týkající se zdrojů chyb a jejich odstranění jsou uvedeny v kapitole **10. Řešení problémů**.

Příklady pozitivních a negativních PCR reakcí jsou uvedeny na Obr. 10 a Obr. 11.



Obr. 10: Průkaz *Kvantifikačních standardů (Borrelia LC QS 1 - 4)* ve fluorimetrickém kanálu F1 přístroje *LightCycler 1.1/1.2/1.5*. NTC: non-template control (negativní kontrola).



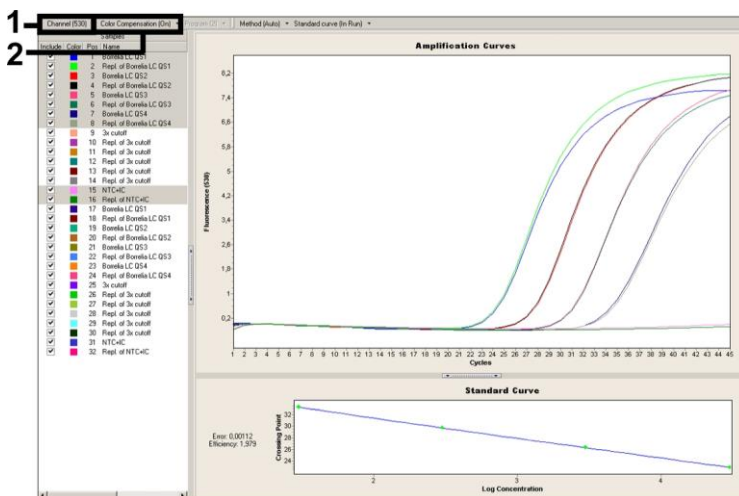
Obr. 11: Průkaz *Interní kontroly (IC)* ve fluorimetrickém kanálu F2 přístroje *LightCycler 1.1/1.2/1.5* při současné amplifikaci *Kvantifikačních standardů (Borrelia LC QS 1 - 4)*. NTC: non-template control (negativní kontrola).

9.2 Vyhodnocení PCR dat přístroje *LightCycler 2.0*

K analýze PCR dat získaných pomocí přístroje *LightCycler 2.0* používejte prosím *LightCycler Software Version 4.0*. Povězte si prosím také pokynů v *LightCycler 2.0 Instrument Operator's Manual Version 4.0*.

Při analýze PCR dat postupujte podle následujícího schématu (viz Obr. 12):

- V menu aktivujte funkci *Analysis* a zvolte volbu *Absolute Quantification*, jejíž pomocí by měla být principiálně analyzována všechna amplifikační data generovaná pomocí *artus LC PCR Kit*.
- *LightCycler Software Version 4.0* obsahuje soubor označený jako *Color Compensation File*, který kompenzuje interference signálů mezi fluorescenčními kanály. Tento soubor otevřete v průběhu nebo po skončení PCR běhu aktivací přepínací plochy *Color Comp (On/Off)* a následně *Select Color Compensation* (viz Obr. 12). Není-li soubor *Color Compensation File* instalován, vytvořte jej podle návodu v *LightCycler Operator's Manual*.
- Po aktivaci souboru *Color Compensation File* se v jednotlivých fluorescenčních kanálech objeví oddělené signály. Pro analýzu výsledků PCR, které byly získány pomocí *artus Borrelia LC PCR Kit*, zvolte prosím pro analytickou *Borrelia PCR* pohledovou funkci 530 resp. 610 pro PCR *Interní kontroly*.



Obr. 12: Aktivace *Color Compensation File* a volba fluorescenčního kanálu.

Při analýze kvantitativních běhů dále neopomeňte kapitolu **8.3 Kvantifikace** a **Technical Note for quantitation on the *LightCycler 1.1/1.2/1.5* or *LightCycler 2.0* Instrument** na www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

Po dokončeném nastavení možností analýzy se mohou vyskytnout následující výsledky:

4. Ve fluorescenčním kanálu 530 je detekován signál.

Výsledek analýzy je pozitivní: Vzorek obsahuje *Borrelia* DNA.

V tomto případě je detekce signálu v kanálu 610 podružná, protože vysoké výchozí koncentrace *Borrelia* DNA (pozitivní signál v kanálu 530) mohou vést k redukovanému až chybějícímu fluorescenčnímu signálu *Interní kontroly* v kanálu 610 (kompetice).

5. Ve fluorescenčním kanálu 530 není detekován žádný signál, nýbrž pouze v kanálu 610 (signál *Interní kontroly*).

Ve vzorku není prokazatelná žádná *Borrelia* DNA. Lze jej proto považovat za negativní.

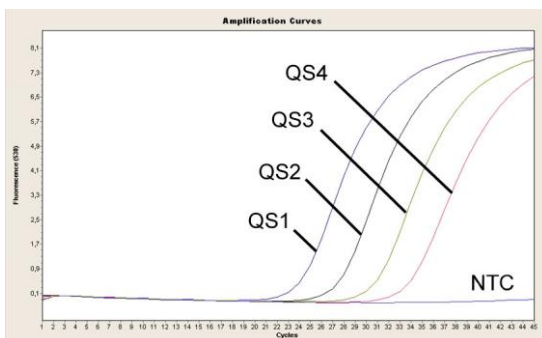
Při negativní *Borrelia* PCR vylučuje detekovaný signál *Interní kontroly* možnost inhibice PCR.

6. Signál není detekován ani v kanálu 530 ani v kanálu 610.

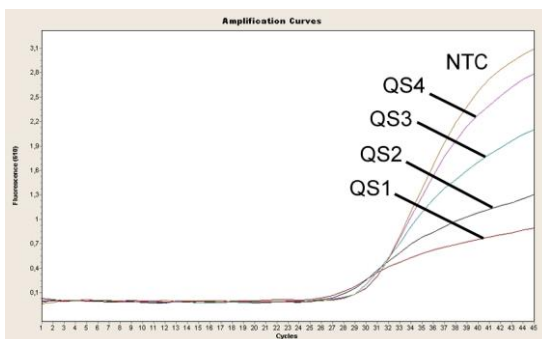
Není možné učinit diagnostický závěr.

Pokyny týkající se zdrojů chyb a jejich odstranění jsou uvedeny v kapitole **10. Řešení problémů.**

Příklady pozitivních a negativních PCR reakcí jsou znázorněny na Obr. 13 a Obr. 14.



Obr. 13: Průkaz Kvantifikačních standardů (*Borrelia LC QS 1 - 4*) ve fluorescenčním kanálu 530 přístroje *LightCycler 2.0*. NTC: non-template control (negativní kontrola).



Obr. 14: Průkaz Interní kontroly (IC) ve fluorescenčním kanálu 610 přístroje *LightCycler 2.0* při současné amplifikaci Kvantifikačních standardů (*Borrelia LC QS 1 - 4*). NTC: non-template control (negativní kontrola).

10. Řešení problémů

Žádný signál při pozitivních kontrolách (*Borrelia LC QS 1 - 4*) ve fluorescenčním kanálu F1 nebo 530:

- Volba fluorescenčního kanálu při analýze dat PCR neodpovídá protokolu.
 - K analýze dat zvolte fluorescenční kanál F1 popř. 530 pro analytickou *Borrelia* PCR a fluorescenční kanál F2 popř. 610 pro PCR *Interní kontroly*.
- Naprogramování teplotního profilu přístroje *LightCycler 1.1/1.2/1.5* resp. *LightCycler 2.0* je chybné.
 - Porovnejte teplotní profil s údaji protokolu (viz **8.5 Programování přístroje *LightCycler***).
- PCR reakce byla chybně sestavena.
 - Porovnejte Vaše pracovní kroky s pipetovacím schématem (viz **8.4 Příprava PCR**) a popř. PCR zopakujte.
- Podmínky skladování jednoho nebo více komponentů soupravy neodpovídají předpisům uvedeným v kapitole **2. Skladování** nebo byla překročena doba použitelnosti soupravy *artus Borrelia LC PCR Kit*.
 - Prosím zkontrolujte jak podmínky skladování, tak i dobu použitelnosti reagentů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.

Slabý nebo chybějící signál *Interní kontroly* ve fluorescenčním kanálu F2 popř. 610 při současné nepřítomnosti signálu v kanálu F1 popř. 530:

- Podmínky PCR neodpovídají protokolu.
 - Zkontrolujte podmínky PCR (viz výše) a popř. PCR zopakujte s opraveným nastavením.
- PCR byla inhibována.
 - Ujistěte se, že používáte námi doporučený postup izolace (viz **8.1 Izolace DNA**) a držte se přesně předpisů výrobce.
 - Přesvědčte se, že byl při izolaci DNA před elucí proveden dodatečný doporučený centrifugační krok k úplnému odstranění zbytků etanolu (viz **8.1 Izolace DNA**).
- Během izolace dochází k úbytku DNA.

- Byla-li k izolaci přidána *Interní kontrola*, může nepřítomnost signálu *Interní kontroly* znamenat úbytek DNA během izolace. Ujistěte se, že používáte námi doporučený postup izolace (viz **8.1 Izolace DNA**) a držte se přesně předpisů výrobce.
- Podmínky skladování jednoho nebo více komponentů soupravy neodpovídají předpisům uvedeným v kapitole **2. Skladování** nebo byla překročena doba použitelnosti soupravy *artus Borrelia LC PCR Kit*.
 - Prosím zkontrolujte jak podmínky skladování, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.

Signály při negativních kontrolách ve fluorescenčním kanálu F1 popř. 530 analytické PCR.

- Během přípravy PCR došlo ke kontaminaci.
 - Zopakujte PCR v replikátech s novými reagensy.
 - Uzavřete jednotlivé PCR zkumavky pokud možno ihned po vložení zkoumaného vzorku.
 - Pipetujte pozitivní kontroly zásadně jako poslední.
 - Ujistěte se, že jsou pracovní plochy a přístroje pravidelně dekontaminovány.
- Během izolace dochází ke kontaminaci.
 - Zopakujte izolaci a PCR zkoumaných vzorků za užití nových reagensů.
 - Ujistěte se, že jsou pracovní plochy a přístroje pravidelně dekontaminovány.

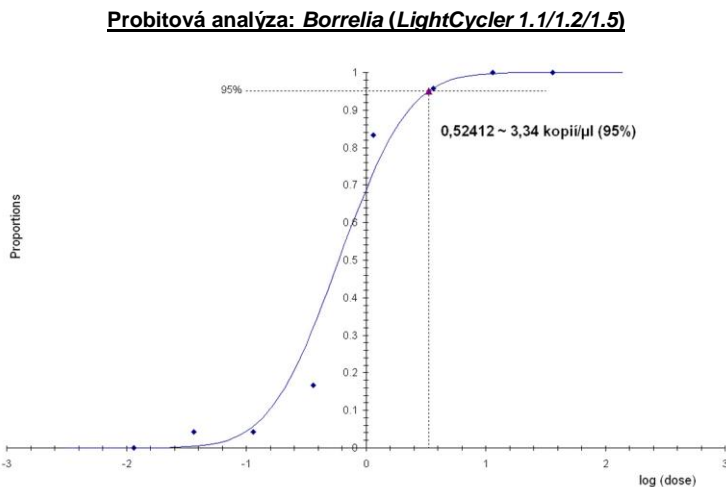
Pokud se vyskytnou další otázky nebo problémy, kontaktujte prosím naši technickou podporu.

11. Specifikace

11.1 Analytická senzitivita

11.1.1 Přístroj *LightCycler 1.1/1.2/1.5*

Pro zjištění analytické senzitivity *artus* Borrelia LC PCR Kit byla pomocí přístroje *LightCycler 1.1/1.2/1.5* vytvořena řada ředění genomické *B. burgdorferi* DNA (DSMZ 4681-30) od 36,5 do nominálně 0,0115 *Borrelia*-kopií/ μ l a analyzována pomocí *artus* Borrelia LC PCR Kit. Experimenty byly provedeny ve třech různých dnech formou osminásobných určení. Výsledek byl zjištěn pomocí probitové analýzy. Jeho grafické vyhodnocení je zobrazeno na Obr. 15. Limit detekce *artus* Borrelia LC PCR Kit ve spojení s *LightCycler 1.1/1.2/1.5* leží proto u 3,34 kopií/ μ l ($p = 0,05$). To znamená, že je s 95 % pravděpodobností detekováno 3,34 kopií/ μ l.

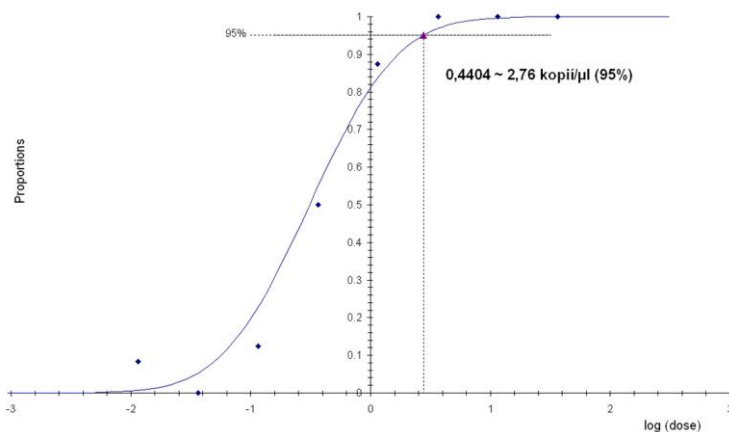


Obr. 15: Analytická senzitivita *artus* Borrelia LC PCR Kit ve spojení s *LightCycler 1.1/1.2/1.5*.

11.1.2 Příklad *LightCycler 2.0*

Pro zjištění analytické senzitivity *artus Borrelia LC PCR Kit* byla pomocí přístroje *LightCycler 2.0* vytvořena řada ředění genomické *B. burgdorferi* DNA (DSMZ 4681-30) od 36,5 do nominálně 0,0115 *Borrelia* kopií/μl a analyzována pomocí *artus Borrelia LC PCR Kit*. Experimenty byly provedeny ve třech různých dnech formou osminásobných určení. Výsledek byl zjištěn pomocí probitové analýzy. Jeho grafické vyhodnocení je zobrazeno na Obr. 15. Limit detekce *artus Borrelia LC PCR Kit* ve spojení s *LightCycler 1.1/1.2/1.5* leží proto u 2,76 kopií/μl ($p = 0,05$). To znamená, že je s 95 % pravděpodobností detekováno 2,76 kopií/μl.

Probitová analýza: *Borrelia* (*LightCycler 2.0*)



Obr. 16: Analytická senzitivita *artus Borrelia LC PCR Kit* ve spojení s *LightCycler 1.1/1.2/1.5*.

11.2 Specificita

Specificita *artus* Borrelia LC PCR Kit je v první řadě zaručena výběrem primerů a sond, jakož i volbou přísných reakčních podmínek. Primery a sondy byly na základě sekvenční analýzy přezkoušeny na eventuální homologie se všemi sekvencemi publikovanými v genových bankách. Tímto způsobem byla kontrolována také detekovatelnost všech druhů *Borrelia* (původce lymeské boreliózy a původce návratné horečky).

Validace specificity byla provedena na 32 různých *Borrelia* negativních likvorových vzorcích, které spolu s *Borrelia* specifickými primery a sondami obsaženými v *Borrelia LC Master* negenerovaly žádný signál.

Druhy uvedené v Tabulce 1 byly dodatečně potvrzeny pomocí PCR na přístroji *LightCycler*.

Tabulka 1: Testování specificity druhů *Borrelia*.

Druhy <i>Borrelia</i>	Zdroj	<i>Borrelia</i> (F1 nebo 530)	Interní kontrola (F2 nebo 610)
<i>B. burgdorferi</i>	DSMZ ^a	+	+
<i>B. garinii</i>	DSMZ ^a	+	+
<i>B. afzelii</i>	DSMZ ^a	+	+
<i>B. valaisiana</i> *	INSTAND ^a	+	+
<i>B. hermsii</i>	QIAGEN ^a	+	+

^aDSMZ: Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur, Braunschweig
INSTAND: INSTAND e. V., Düsseldorf
QIAGEN: QIAGEN GmbH, Hilden

K určení specificity *artus* Borrelia LC PCR Kit byla kontrolní skupina uvedená v Tabulce 2 testována na křížovou reaktivitu. Žádný z testovaných vzorků nebyl reaktivní.

* Patogenita *B. valaisiana* byla doložena několika studiemi (viz 15. Literatura).

Tabulka 2: Testování specifity diagnostické soupravy pomocí potenciálně křížově reaktivních vzorků.

Kontrolní skupina	<i>Borrelia</i> (F1)	Interní kontrola (F3/Back-F1)
<i>Treponema phagedenis</i>	–	+
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	–	+
<i>Chlamydia trachomatis</i>	–	+
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	–	+
<i>Bordetella pertussis</i>	–	+
<i>Escherichia coli</i> K12	–	+
<i>Salmonella typhi</i>	–	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	+
<i>Legionella pneumophila</i>	–	+
<i>Legionella longbeachae</i>	–	+
<i>Bacillus anthracis</i>	–	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	+
<i>Candida albicans</i>	–	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	–	+
Lidská genomická DNA	–	+

11.3 Přesnost

Údaje o přesnosti pro *artus Borrelia* LC PCR Kit byly stanoveny pomocí přístroje *LightCycler 1.1/1.2/1.5* a umožňují stanovení celkové variability testovacího systému. Tato celková variabilita se skládá z **Intra-Assay variability** (variabilita vzorků stejné koncentrace v rámci jednoho pokusu), z **Inter-Assay variability** (variabilita způsobená provedením experimentu různými osobami v jedné laboratoři a užitím různých přístrojů stejného typu) a z **Inter-Batch variability** (variabilita způsobená použitím různých šarží). Přitom byla vždy vypočítána standardní odchylka, variance a koeficient variace jak pro specifickou PCR původce, tak i pro PCR *Interní kontroly*.

Tyto údaje byly pro *artus Borrelia* LC PCR Kit stanoveny pomocí ředění genomické *B. burgdorferi* DNA (DSMZ 4681-30) s koncentrací 36,5 kopií/μl. Testy byly provedeny formou osminásobných určení. Vyhodnocení výsledků

bylo provedeno na základě Ct hodnot amplifikačních křivek (Ct: *threshold cycle*, viz Tabulka 3). Celková variabilita libovolného vzorku uvedené koncentrace činí tedy 0,94 % (Ct), pro průkaz *Interní kontrola* 1,68 % (Ct). Tyto hodnoty se zakládají na souhrnu všech dílčích hodnot zjištěných variabilit.

Tabulka 3: Údaje o přesnosti na základě Ct hodnot.

	Standardní odchylka	Variance	Koeficient variance [%]
Intra-Assay variabilita: <i>Borrelia</i> gDNA (36,5 kopií/μl)	0,20	0,04	0,59
Intra-Assay variabilita: <i>Interní kontrola</i>	0,09	0,01	0,29
Inter-Assay variabilita: <i>Borrelia</i> gDNA (36,5 kopií/μl)	0,23	0,06	0,69
Inter-Assay variabilita: <i>Interní kontrola</i>	0,39	0,15	1,28
Inter-Batch variabilita: <i>Borrelia</i> gDNA (36,5 kopií/μl)	0,31	0,10	0,92
Inter-Batch variabilita: <i>Interní kontrola</i>	0,62	0,38	2,04
Celková variabilita: <i>Borrelia</i> gDNA (36,5 kopií/μl)	0,32	0,10	0,94
Celková variabilita: <i>Interní kontrola</i>	0,51	0,26	1,68

11.4 Robustnost

Přezkoušení robustnosti slouží k stanovení celkové četnosti chyb *artus Borrelia LC PCR Kit*. Za tímto účelem bylo 32 *Borrelia* negativních likvorových vzorků smíšeno s 10 kopiemi/μl elučního objemu kontrolní *Borrelia* DNA (třínásobná koncentrace analytického limitu senzitivity), pomocí QIAamp DNA Mini Kit izolováno (viz **8.1 Izolace DNA**) a pomocí *artus Borrelia LC PCR Kit* analyzováno. Četnost chyb pro *Borrelia* činila u všech vzorků 0 %. Robustnost *Interní kontrola* byla dodatečně přezkoušena izolací a analýzou 32 *Borrelia* negativních likvorových vzorků. Celková četnost

chyb činila 0 %. Inhibice nebyly pozorovány. Robustnost *artus* Borrelia LC PCR Kit činí tedy ≥ 99 %.

11.5 Reprodukovatelnost

Údaje o reprodukovatelnosti jsou pořizovány za účelem pravidelného hodnocení výkonnosti *artus* Borrelia LC PCR Kit a výkonnostního srovnání s ostatními produkty. Tyto údaje jsou získávány na základě účastí na mezilaboratorních pokusech.

11.6 Diagnostické hodnocení

artus Borrelia LC PCR Kit je v současné době evaluován v několika studiích.

12. Zvláštní pokyny pro použití produktu

- Všechny reagentie se smí používat výhradně pro diagnostiku in vitro.
- Prostředek by měli používat pouze pracovníci, kteří jsou speciálně poučeni a vyškoleni v metodice diagnostiky in vitro.
- Přesné dodržování protokolu je bezpodmínečně nutné k dosažení optimálních výsledků PCR.
- Dbejte na konec doby použitelnosti uvedený na balení a na štítcích jednotlivých komponent. Nepoužívejte reagentie s prošlou trvanlivostí.

13. Varování a bezpečnostní opatření

Další informace jsou uvedeny v odpovídajících bezpečnostních listech (BL). Tyto listy jsou k dispozici v podobě kompaktního a snadno použitelného PDF souboru na www.qiagen.com/safety.

14. Kontrola kvality

V souladu se systémem managementu jakosti společnosti QIAGEN certifikovaným podle norem ISO 9001 a ISO 13485 byla každá šarže

artus Borrelia LC PCR Kit testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zaručena jednotná kvalita produktu.

15. Literatura

- (1) Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 - 212.
- (2) Rijpkema SG, Tazelaar DJ, Molkenboer MJ, Noordhoek GT, Plantinga G, Schouls LM, Schellekens JF. Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. Clin Microbiol Infect., 1997; 3 (1): 109 - 116.
- (3) Ryffel K et al. OspA heterogeneity of *Borrelia valaisiana* confirmed by phenotypic and genotypic analyses. BMC Infect Dis., 2003; 3 (1): 14.
- (4) Ryffel K et al. Scored antibody reactivity determined by immunoblotting shows an association between clinical manifestations and presence of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, and *B. valaisiana* in humans. J Clin Microbiology, 1999; 37 (12): 4086 - 4092.

16. Vysvětlení symbolů



Použitelné do



Číslo šarže



Výrobce



Katalogové číslo



Číslo materiálu



Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro



Ethanol



Mezinárodní číslo obchodní položky GTIN



Manuál



Obsah postačující pro <N> testů



Teplotní rozmezí

QS

Kvantifikační standard

IC

Interní kontrola

Tato stránka byla úmyslně ponechána prázdná

artus Borrelia LC PCR Kit

The purchase of this product allows the purchaser to use it for the performance of diagnostic services for human in vitro diagnostics. No general patent or other license of any kind other than this specific right of use from purchase is granted hereby.

Trademarks and Disclaimers

QIAGEN®, QIAamp®, artus®, (QIAGEN Group); LightCycler® (Roche Group).

Registered names, trademarks, etc. used in this document, even when not specifically marked as such, are not to be considered unprotected by law.

The artus Borrelia LC PCR Kit is a CE-marked diagnostic kit according to the European In Vitro Diagnostic Directive 98/79/EC. Not available in all countries.

The QIAamp DNA Mini Kit is intended for general laboratory use. No claim or representation is intended to provide information for the diagnosis, prevention, or treatment of a disease.

Limited License Agreement

Use of this product signifies the agreement of any purchaser or user of the artus Borrelia LC PCR Kit to the following terms:

1. The artus Borrelia LC PCR Kit may be used solely in accordance with the artus *Borrelia LC PCR Kit Handbook* and for use with components contained in the Kit only. QIAGEN grants no license under any of its intellectual property to use or incorporate the enclosed components of this Kit with any components not included within this Kit except as described in the artus *Borrelia LC PCR Kit Handbook* and additional protocols available at www.qiagen.com.
2. Other than expressly stated licenses, QIAGEN makes no warranty that this Kit and/or its use(s) do not infringe the rights of third-parties.
3. This Kit and its components are licensed for one-time use and may not be reused, refurbished, or resold.
4. QIAGEN specifically disclaims any other licenses, expressed or implied other than those expressly stated.
5. The purchaser and user of the Kit agree not to take or permit anyone else to take any steps that could lead to or facilitate any acts prohibited above. QIAGEN may enforce the prohibitions of this Limited License Agreement in any Court, and shall recover all its investigative and Court costs, including attorney fees, in any action to enforce this Limited License Agreement or any of its intellectual property rights relating to the Kit and/or its components.

For updated license terms, see www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 03-9840-9800 ■ 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

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

China ■ Orders 021-51345678 ■ Fax 021-51342500 ■ Technical 021-51345678

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 02-33430411 ■ Fax 02-33430426 ■ Technical 800-787980

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

Korea (South) ■ Orders 1544 7145 ■ Fax 1544 7146 ■ Technical 1544 7145

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

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

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

Singapore ■ Orders 65-67775366 ■ Fax 65-67785177 ■ Technical 65-67775366

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)

1050871CS 151018268



Sample & Assay Technologies