



Dezembro 2014

Manual do *artus*[®] EBV RG PCR Kit

 24 (ref. 4501263)
 96 (ref. 4501265)

Versão 1

IVD

Diagnóstico quantitativo in vitro

Para uso com Instrumentos Rotor-Gene[®] Q

CE

REF 4501263, 4501265

HB 1046897PTB

 QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

ALEMANHA

R5 **MAT** 1046897PTB



Sample & Assay Technologies

QIAGEN Sample and Assay Technologies

A QIAGEN é a principal fornecedora de tecnologias inovadoras de amostra e ensaio, permitindo o isolamento e a detecção de conteúdos de qualquer amostra biológica. Nossos avançados serviços e produtos de alta qualidade garantem o sucesso, desde a amostra até o resultado.

A QIAGEN é uma empresa de referência em matéria de:

- Purificação de DNA, RNA e proteínas
- Ensaio de ácidos nucleicos e proteínas
- Pesquisa em microRNA e RNAi
- Automação de tecnologias de amostra e ensaio

A nossa missão é possibilitar que você alcance sucesso notável e progressos. Para obter mais informações, acesse www.qiagen.com.

Conteúdo

Uso previsto	4
Resumo e explicação	4
Informações do agente patogênico	4
Princípio do procedimento	5
Materiais fornecidos	5
Conteúdo do kit	5
Materiais necessários, mas não fornecidos	7
Avisos e precauções	7
Precauções gerais	8
Armazenamento e manuseio de reagentes	8
Procedimento	9
Isolamento de DNA	9
Controle interno	13
Protocolo: PCR e análise de dados	14
Interpretação dos resultados	21
Quantificação	21
Resultados	22
Guia de resolução de falhas	24
Controle de qualidade	27
Limitações	27
Características de desempenho	28
Sensibilidade analítica	28
Especificidade	29
Reprodutibilidade	30
Referências	30
Símbolos	31
Informações de contato	31
Informações para pedidos	32

Uso previsto

O *artus* EBV RG PCR Kit é um teste de amplificação de ácido nucleico *in vitro* para a quantificação do DNA do vírus Epstein-Barr (EBV) em plasma, soro, LCR ou células sanguíneas humanas. Este kit de teste diagnóstico utiliza a reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction, PCR) e é configurado para uso com Instrumentos Rotor-Gene Q.

Resumo e explicação

O *artus* EBV RG PCR Kit é um sistema pronto para uso para a detecção de DNA do EBV usando reação em cadeia da polimerase (PCR) em Instrumentos Rotor-Gene Q. O EBV RG Master contém reagentes e enzimas para a amplificação específica de uma região de 97 bp do genoma do EBV, e para a detecção direta do amplicon específico no canal de fluorescência Cycling Green (Ciclagem verde) do Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q ou Rotor-Gene 6000, ou do Cycling A.FAM™ (Ciclagem A.FAM™) do Rotor-Gene 3000.

Além disso, o *artus* EBV RG PCR Kit contém um segundo sistema de amplificação heteróloga para identificar uma possível inibição da PCR. Isto é detectado como um controle interno (internal control, IC) no canal de fluorescência Cycling Yellow (Ciclagem amarela) do Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q ou Rotor-Gene 6000, ou do Cycling A.JOE™ (Ciclagem A.JOE™) do Rotor-Gene 3000. O limite de detecção da PCR analítica do EBV (consulte "Sensibilidade analítica", página 28) não é reduzido. São fornecidos controles externos positivos (EBV RG QS 1–4), que permitem a determinação da quantidade de DNA viral. Para obter mais informações, consulte "Quantificação", página 21.

Informações do agente patogênico

A transmissão do vírus Epstein-Barr (EBV) se dá por via oral, principalmente pela saliva contaminada. Em geral, a infecção pelo EBV, especialmente se for contraída na infância, é assintomática. O sinal clínico de uma infecção aguda é a mononucleose infecciosa associada a febre, cansaço e angina, bem como a inflamação dos linfonodos e do baço. Em alguns pacientes, esses sintomas reaparecem cronicamente. Em pacientes imunodeficientes e pessoas com disfunções das células T, podem se encontrar formas graves de infecção por EBV.

Princípio do procedimento

A detecção do agente patogênico pela reação em cadeia da polimerase (PCR) baseia-se na amplificação de regiões específicas do genoma do agente patogênico. Na PCR em tempo real, o produto amplificado é detectado por corantes fluorescentes. Eles estão geralmente aglutinados a sondas de oligonucleotídeos que se ligam especificamente ao produto amplificado. A monitorização das intensidades de fluorescência durante o ensaio de PCR (ou seja, em tempo real) permite a detecção e a quantificação do produto que se acumula, sem ter que reabrir os tubos de reação após o ensaio de PCR.*

Materiais fornecidos

Conteúdo do kit

<i>artus</i> EBV RG PCR Kit		(24)	(96)
Ref.		4501263	4501265
Número de reações		24	96
Azul	EBV RG Master	2 x 12 reações	8 x 12 reações
Vermelho	EBV RG QS 1* (5 x 10 ⁴ cópias/μl)	QS 200 μl	200 μl
Vermelho	EBV RG QS 2* (5 x 10 ³ cópias/μl)	QS 200 μl	200 μl
Vermelho	EBV RG QS 3* (5 x 10 ² cópias/μl)	QS 200 μl	200 μl
Vermelho	EBV RG QS 4* (5 x 10 ¹ cópias/μl)	QS 200 μl	200 μl
Verde	EBV RG IC†	IC 1000 μl	2 x 1000 μl
Branco	Water (PCR grade) (Água [grau PCR])	1000 μl	1000 μl

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

Manual		1	1
--------	--	---	---

* Padrão de quantificação.

† Controle interno.

Materiais necessários, mas não fornecidos

Ao trabalhar com produtos químicos, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (safety data sheets, SDSs) apropriadas, disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

Reagentes

- Kit de isolamento de DNA (consulte "Isolamento de DNA", página 9)

Produtos consumíveis

- Ponteiras de pipetas estéreis com filtros
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, para uso com rotor de 72 poços (ref. 981103 ou 981106)
- Como alternativa: PCR Tubes, 0.2 ml, para uso com rotor de 36 poços (ref. 981005 ou 981008)

Equipamento

- Pipetas (ajustáveis)*
- Agitador tipo vórtex*
- Centrífuga de bancada* com rotor para tubos de reação de 2 ml
- Instrumento Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q ou Rotor-Gene* com canais de fluorescência para Cycling Green (Ciclagem verde) e Cycling Yellow (Ciclagem amarela) ou com canais de fluorescência para Cycling A.FAM (Ciclagem A.FAM) e Cycling A.JOE (Ciclagem A.JOE)
- Software Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q versão 1.7.94 ou superior (software Rotor-Gene 6000 versão 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94; software Rotor-Gene 3000 versão 6.0.23)
- Bloco de resfriamento (Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, ref. 9018901 ou Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes, ref. 9018905)

Avisos e precauções

Para uso em diagnóstico in vitro

* Certifique-se de que os instrumentos foram verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

Ao trabalhar com produtos químicos, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (SDSs) aplicáveis. Elas estão disponíveis online em formato PDF (conveniente e compacto) em www.qiagen.com/safety, no qual é possível encontrar, visualizar e imprimir a SDS para cada kit da QIAGEN® e para cada componente do kit.

Descarte os resíduos da amostra e do ensaio de acordo com as regulamentações de segurança locais.

Precauções gerais

O usuário deve sempre prestar atenção no seguinte:

- Use ponteiras de pipetas estéreis com filtros.
- Armazene e extraia materiais positivos (amostras, controles positivos e amplicons) separadamente de todos os outros reagentes e adicione-os à mistura da reação em uma instalação separada.
- Descongele todos os componentes por completo à temperatura ambiente (15 a 25 °C) antes de iniciar o ensaio.
- Após o descongelamento, misture os componentes (pipetando repetidamente para cima e para baixo ou agitando em vórtex) e centrifugue brevemente.
- Trabalhe rapidamente e mantenha os componentes em gelo ou no bloco de resfriamento (bloco de carregamento de 72/96-poços).

Armazenamento e manuseio de reagentes

Os componentes do *artus* EBV RG PCR Kit devem ser armazenados entre -15 e -30 °C e estar estáveis até a data de validade impressa na etiqueta. Deve-se evitar repetir o processo de descongelamento e congelamento (>2 vezes), uma vez que pode reduzir a sensibilidade do ensaio. Se os reagentes se destinarem a ser usados apenas de forma intermitente, deverão ser congelados em alíquotas. A armazenagem a 2–8 °C não pode exceder um período de 5 horas.

Procedimento

Isolamento de DNA

Os kits da QIAGEN mostrados na Tabela 1 são validados para a purificação de DNA viral dos tipos de amostra humana indicados para uso com o *artus* EBV RG PCR Kit. Realize a purificação de DNA viral de acordo com as instruções nos manuais do kit.

Tabela 1. Kits de purificação validados para uso com o *artus* EBV RG PCR Kit

Material de amostra	Tamanho da amostra	Kit de isolamento de ácido nucleico	Referência (QIAGEN)	RNA transportador
Soro, plasma, LCR	200 µl	QIAamp® DNA Mini Kit (50)	51304	Não incluído
Soro, plasma	1 ml	QIAamp UltraSens® Virus Kit (50)	53704	Incluído
Células sanguíneas	200 µl	QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	51104	Não incluído
Plasma	400 µl	EZ1® DSP Virus Kit (48)*	62724	Incluído

* O EZ1 DSP Virus Kit também está disponível como kits EASYartus® EBV RG PCR com marcação CE-IVD, em conjunto com o *artus* EBV RG PCR Kit (consulte a página 32 para obter informações para pedidos).

Nota: Tubos de coleta de sangue revestidos com anticoagulantes podem inibir a PCR. No entanto, estes inibidores serão eliminados pelo uso dos kits de isolamento mencionados acima. Recomendamos evitar o uso de sangue com heparina.

Nota: O *artus* EBV RG PCR Kit não deve ser usado com métodos de isolamento com base de fenol.

Usando o QIAamp DNA Blood Mini Kit ou o QIAamp DNA Mini Kit

Nota: O uso de RNA transportador é fundamental para a eficiência da extração e, conseqüentemente, para o rendimento de DNA/RNA.

Note que a adição de transportador (Homopolímero RNA Poly[rA], não incluído no QIAamp DNA Blood Mini Kit ou no QIAamp DNA Mini Kit), é altamente recomendada para a extração dos ácidos nucleicos dos fluidos corporais acelulares e do material com pequenas quantidades de DNA e RNA (por exemplo, LCR). Nesses casos, preparar o RNA transportador da maneira apresentada a seguir.

- Fazer a ressuspensão do RNA transportador liofilizado (Homopolímero RNA Poly[rA], não incluído no QIAamp DNA Blood Mini Kit ou no QIAamp DNA Mini Kit) usando o tampão de eluição (não usar o tampão de lise) do kit de extração (Buffer AE do QIAamp DNA Mini Kit e do QIAamp DNA Blood Mini Kit), e preparar uma diluição com uma concentração de 1 µg/µl. Dividir essa solução de RNA transportador em um número de alíquotas suficiente para suas necessidades e armazená-las a -15 a -30 °C. Evitar descongelamentos repetidos (>2 vezes) de uma alíquota de RNA transportador.
- Use 1 µg de RNA transportador por 100 µl de tampão de lise. Por exemplo, se o protocolo de extração usar 200 µl de tampão de lise, adicione 2 µl de RNA transportador (1 µg/µl) diretamente no tampão de lise (Buffer AL do QIAamp DNA Mini Kit e do QIAamp DNA Blood Mini Kit). Antes do início de cada extração, uma mistura de tampão de lise e RNA transportador (e controle interno, onde aplicável, consulte "Controle interno", página 13) deve ser preparada recentemente, de acordo com o esquema de pipetagem apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Esquema de pipetagem para uso com o QIAamp DNA Blood Mini Kit ou o QIAamp DNA Mini Kit

Número de amostras	1	12
Buffer AL (tampão de lise)*	por ex., 200 µl	por ex., 2.400 µl
RNA transportador (1 µg/µl)	2 µl	24 µl
Volume total	202 µl	2424 µl
Volume por extração	200 µl	200 µl cada

* Contém cloridrato de guanidina; consulte o manual do kit para obter informações de segurança.

Nota: Use imediatamente a mistura de tampão de lise e RNA transportador preparada recentemente para extração. A armazenagem da mistura não é possível.

Nota: O controle interno do *artus* EBV RG PCR Kit pode ser usado diretamente no procedimento de isolamento (consulte "Controle interno", página 13).

Nota: Recomendamos fortemente realizar a etapa 10 de centrifugação recomendada no protocolo (*Manual do QIAamp DNA Mini e do Blood Mini [QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook]*, terceira edição, abril de 2010, páginas 29 e 32) para remover todo o etanol residual. Recomendamos aumentar o tempo dessa centrifugação para 3 minutos.

Recomendamos eluir o DNA em um tampão de eluição de 50 µl para obter a sensibilidade mais alta do *artus* EBV RG PCR Kit.

Usando o QIAamp UltraSens Virus Kit

Nota: O uso de RNA transportador é fundamental para a eficiência da extração e, conseqüentemente, para o rendimento de DNA/RNA. Para aumentar a estabilidade do RNA transportador fornecido com o QIAamp UltraSens Virus Kit, recomendamos o procedimento a seguir, que difere das instruções do manual do kit.

- Antes de usar o kit pela primeira vez, faça a ressuspensão do RNA transportador liofilizado em 310 µl do tampão de eluição (Buffer AVE) fornecido com o kit (concentração final de 1 µg/µl, não use o tampão de lise). Divida essa solução de RNA transportador em um número de alíquotas suficiente para suas necessidades e

armazene-as a -15 a -30 °C. Evite descongelamentos repetidos (>2 vezes) de uma alíquota de RNA transportador.

- Antes do início de cada extração, uma mistura de tampão de lise e RNA transportador (e controle interno, onde aplicável, consulte “Controle interno”, página 13) deve ser preparada recentemente, de acordo com o esquema de pipetagem apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Esquema de pipetagem para uso com o QIAamp UltraSens Virus Kit

Número de amostras	1	12
Buffer AC (tampão de lise)*	800 µl	9600 µl
RNA transportador (1 µg/µl)	5,6 µl	67,2 µl
Volume total	805,6 µl	9667,2 µl
Volume por extração	800 µl	800 µl cada

* Contém isopropanol; consulte o manual do kit para obter informações de segurança.

Nota: Use imediatamente a mistura de tampão de lise e RNA transportador preparada recentemente para extração. A armazenagem da mistura não é possível.

Nota: O controle interno do *artus* EBV RG PCR Kit pode ser usado diretamente no procedimento de isolamento (consulte “Controle interno”, página 13).

Nota: Recomendamos fortemente realizar a centrifugação adicional descrita na etapa 14 do protocolo (*Manual do QIAamp UltraSens Virus [QIAamp UltraSens Virus Handbook]*, abril de 2010, página 17) para remover todo o etanol residual. Recomendamos aumentar o tempo dessa centrifugação para 3 minutos.

Recomendamos eluir o DNA em um tampão de eluição de 50 µl para obter a sensibilidade mais alta do *artus* EBV RG PCR Kit.

O QIAamp UltraSens Virus Kit permite uma concentração de amostras. Se usar um material de amostra que não seja soro ou plasma, adicione pelo menos 50% (v/v) de plasma humano negativo à amostra.

Usando o EZ1 DSP Virus Kit

Nota: O uso de RNA transportador é fundamental para a eficiência da extração e, conseqüentemente, para o rendimento de DNA/RNA. Adicione a quantidade adequada de RNA transportador para cada extração seguindo as instruções do *Manual do EZ1 DSP Virus Kit (EZ1 DSP Virus Kit Handbook)*.

Nota: O controle interno do *artus* EBV RG PCR Kit pode ser usado diretamente no procedimento de isolamento (consulte "Controle interno" abaixo).

Nota: Recomendamos fortemente usar os ácidos nucleicos virais purificados para a PCR imediatamente após a extração usando o EZ1 DSP Virus Kit. Como alternativa, os eluatos podem ser armazenados por até 3 dias a 4 °C antes da análise de PCR.

Controle interno

Um controle interno (EBV RG IC) é fornecido com o produto. Isso permite que o usuário controle o procedimento de isolamento do DNA e verifique uma possível inibição da PCR. Usando o EZ1 DSP Virus Kit para extração, o controle interno deve ser adicionado de acordo com as instruções do *Manual do EZ1 DSP Virus Kit*. Usando o QIAamp UltraSens Virus Kit, o QIAamp DNA Blood Mini Kit ou o QIAamp DNA Mini Kit, adicione o controle interno ao isolamento em uma proporção de 0,1 µl por 1 µl de volume de eluição. Por exemplo, usando o QIAamp UltraSens Virus Kit, o DNA é eluído em 50 µl no Buffer AVE. Assim, deve ser adicionado inicialmente 5 µl de controle interno. A quantidade de controle interno usado depende somente do volume de eluição.

Nota: O controle interno e o RNA transportador (consulte "Isolamento de DNA", página 9) devem ser adicionados somente à mistura do tampão de lise e material de amostra ou diretamente no tampão de lise.

O controle interno não deve ser adicionado diretamente ao material de amostra. Se adicionado ao tampão de lise, observe que a mistura do controle interno e RNA transportador do tampão de lise deverá ser preparada recentemente e usada logo a seguir (o armazenamento da mistura em temperatura ambiente ou na geladeira por somente algumas horas pode levar à falha do controle interno e a uma menor eficiência da extração).

Nota: Não adicionar o controle interno e o RNA transportador diretamente no mesmo material de amostra.

Opcionalmente, o controle interno pode ser usado exclusivamente para verificar a possível inibição da PCR. Para esta aplicação, adicione o controle interno diretamente no EBV RG Master, conforme descrito na etapa 2b do protocolo (página 15).

Protocolo: PCR e análise de dados

Pontos importantes antes de começar

- Reserve um tempo para se familiarizar com o Instrumento Rotor-Gene Q antes de iniciar o protocolo. Consulte o manual do usuário do instrumento.
- Certifique-se de que pelo menos um padrão de quantificação, bem como um controle negativo (água, grau PCR) sejam incluídos por ensaio de PCR. Para gerar uma curva padrão, use os 4 padrões de quantificação fornecidos (EBV RG QS 1–4) para cada ensaio de PCR.

O que fazer antes de começar

- Certifique-se de que o bloco de resfriamento (acessório do Instrumento Rotor-Gene Q) esteja pré-resfriado a 2–8 °C.
- Antes de cada utilização, todos os reagentes precisam ser descongelados completamente, misturados (pipetando repetidamente para cima e para baixo ou agitando rapidamente em vórtex), e centrifugados brevemente.

Procedimento

1. Colocar o número desejado de tubos de PCR nos adaptadores do bloco de resfriamento.
2. Se você está usando o controle interno para monitorar o procedimento de isolamento do DNA e para verificar uma possível inibição da PCR, siga a etapa 2a. Se você está usando o controle interno exclusivamente para verificar a inibição da PCR, siga a etapa 2b.
- 2a. O controle interno já foi adicionado ao isolamento (consulte "Controle interno", página 13). Neste caso, prepare a mistura master de acordo com a Tabela 4.

Normalmente, a mistura da reação contém todos os componentes necessários para a PCR exceto a amostra.

Tabela 4. Preparação da mistura master (controle interno usado para monitorar o isolamento do DNA e para verificar a inibição da PCR)

Número de amostras	1	12
EBV RG Master	30 µl	360 µl
EBV RG IC	0 µl	0 µl
Volume total	30 µl	360 µl

2b. O controle interno deve ser adicionado diretamente à mistura do EBV RG Master. Neste caso, prepare a mistura master de acordo com a Tabela 5.

Normalmente, a mistura da reação contém todos os componentes necessários para a PCR exceto a amostra.

Tabela 5. Preparação da mistura master (controle interno usado exclusivamente para verificar a inibição da PCR)

Número de amostras	1	12
EBV RG Master	30 µl	360 µl
EBV RG IC	2 µl	24 µl
Volume total	32 µl*	384 µl*

* O aumento de volume causado pela adição do controle interno é negligenciado ao preparar o ensaio de PCR. A sensibilidade do sistema de detecção não é prejudicada.

3. Pipetar 30 µl da mistura master em cada tubo de PCR. Em seguida, adicionar 20 µl do DNA da amostra eluída (consulte Tabela 6). Da mesma forma, 20 µl de pelo menos um dos padrões de quantificação (EBV RG QS 1–4) devem ser usados como um controle positivo e 20 µl de água (água, grau PCR) como controle negativo.

Tabela 6. Preparo do ensaio de PCR

Número de amostras	1	12
Mistura master	30 µl	30 µl cada
Amostra	20 µl	20 µl cada
Volume total	50 µl	50 µl cada

4. Feche os tubos de PCR. Certifique-se de que o anel de travamento (acessório do Instrumento Rotor-Gene Q) esteja posicionado sobre o rotor para evitar a abertura acidental dos tubos durante o ensaio.
5. Para a detecção de DNA do EBV, crie um perfil de temperatura de acordo com as etapas a seguir.

Ajuste dos parâmetros gerais do ensaio	Figuras 1, 2, 3
Ativação inicial da enzima hot start	Figura 4
Amplificação do DNA (touchdown PCR)	Figura 5
Ajuste da sensibilidade do canal de fluorescência	Figura 6
Iniciando o ensaio	Figura 7

Todas as especificações referem-se ao software Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q versão 1.7.94, software Rotor-Gene 6000 versões 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94 e software Rotor-Gene 3000 versão 6.0.23. No manual do usuário do instrumento você encontra mais informações sobre a programação dos Instrumentos Rotor-Gene. Nas ilustrações, essas configurações são emolduradas em preto realçado. São incluídas ilustrações para os Instrumentos Rotor-Gene Q. Quando valores diferentes forem necessários para o Rotor-Gene 3000, essas diferenças serão descritas no texto.

6. Primeiro, abrir a caixa de diálogo “New Run Wizard” (assistente de novo ensaio) (Figura 1). Marcar a caixa “Locking Ring Attached” (anel de travamento conectado) e clicar em “Next” (próximo).

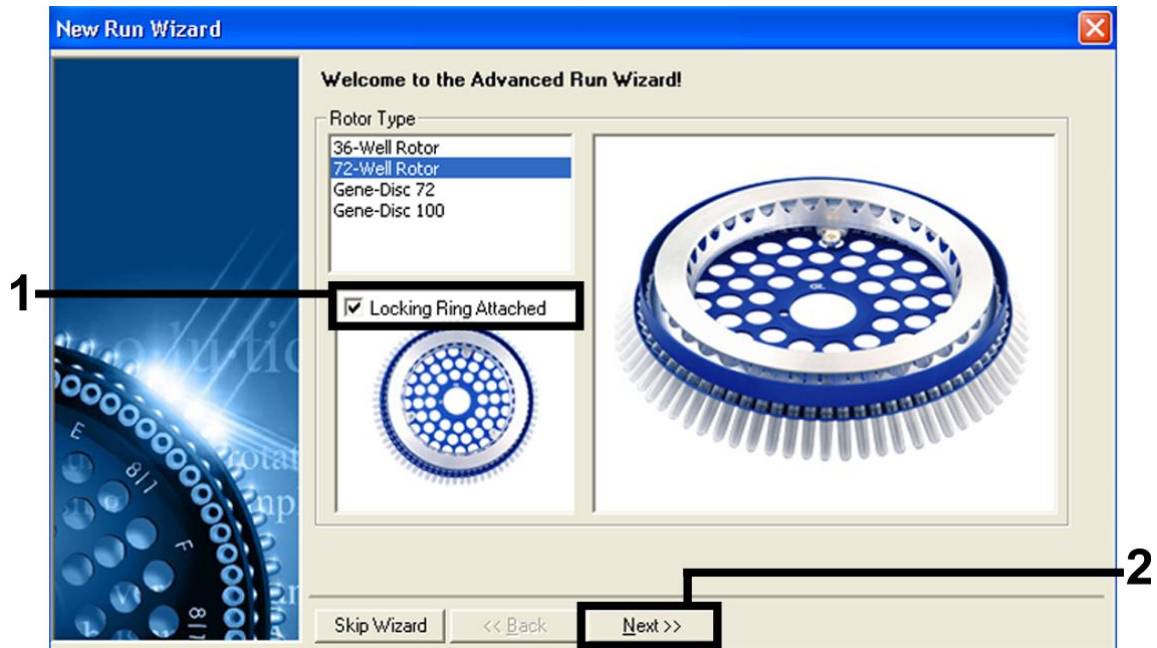


Figura 1. A caixa de diálogo “New Run Wizard” (assistente de novo ensaio).

7. Selecione 50 para o volume da reação de PCR e então clique em “Next” (próximo) (Figura 2).

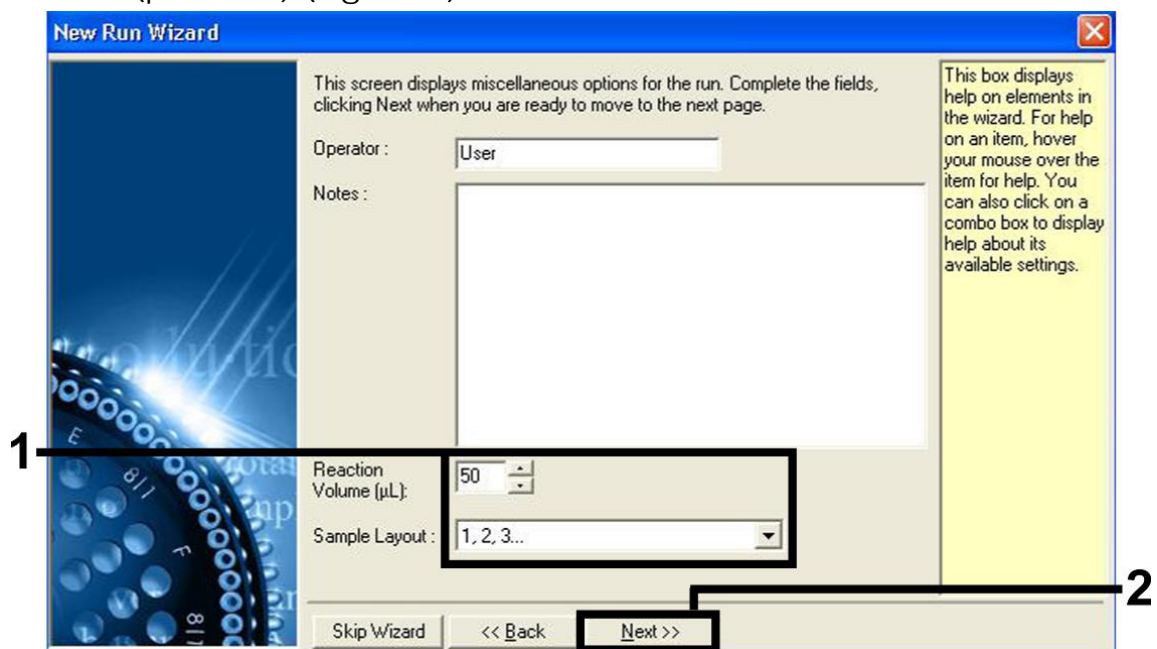


Figura 2. Ajuste dos parâmetros gerais do ensaio.

- Clicar no botão "Edit Profile" (editar perfil) na próxima caixa de diálogo "New Run Wizard" (assistente de novo ensaio) (Figura 3) e programar o perfil de temperatura como mostrado nas Figuras 3-5.

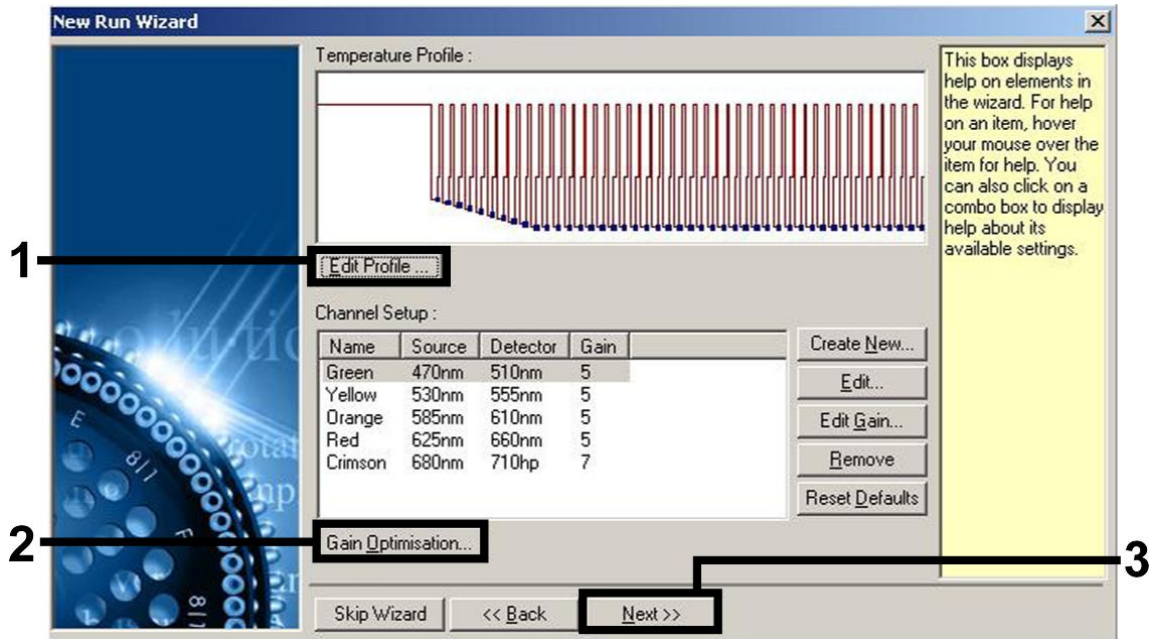


Figura 3. Editar o perfil.

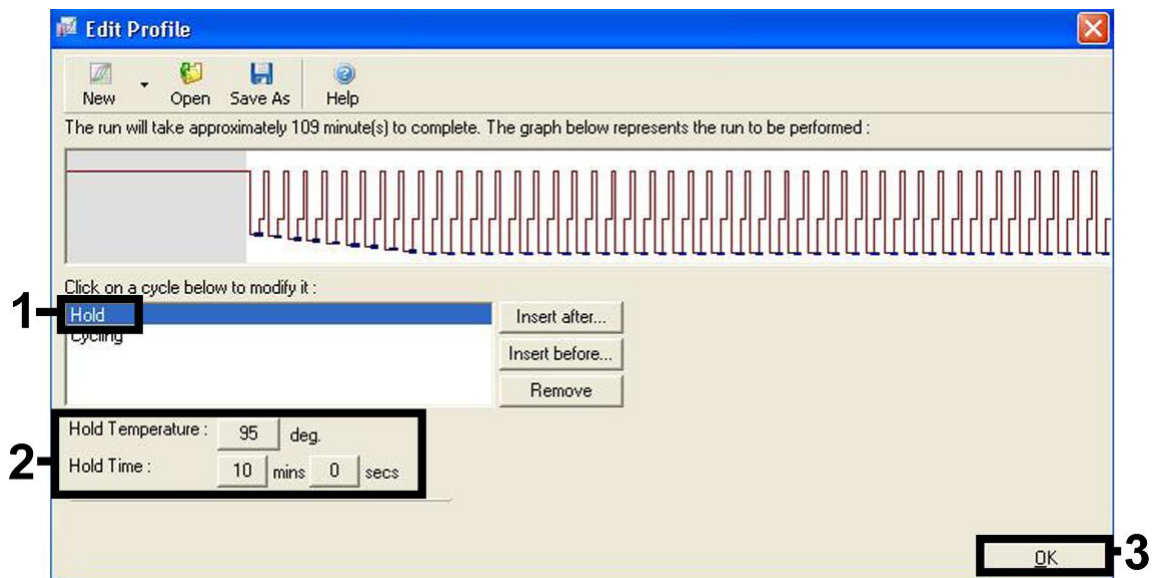


Figura 4. Ativação inicial da enzima hot start.

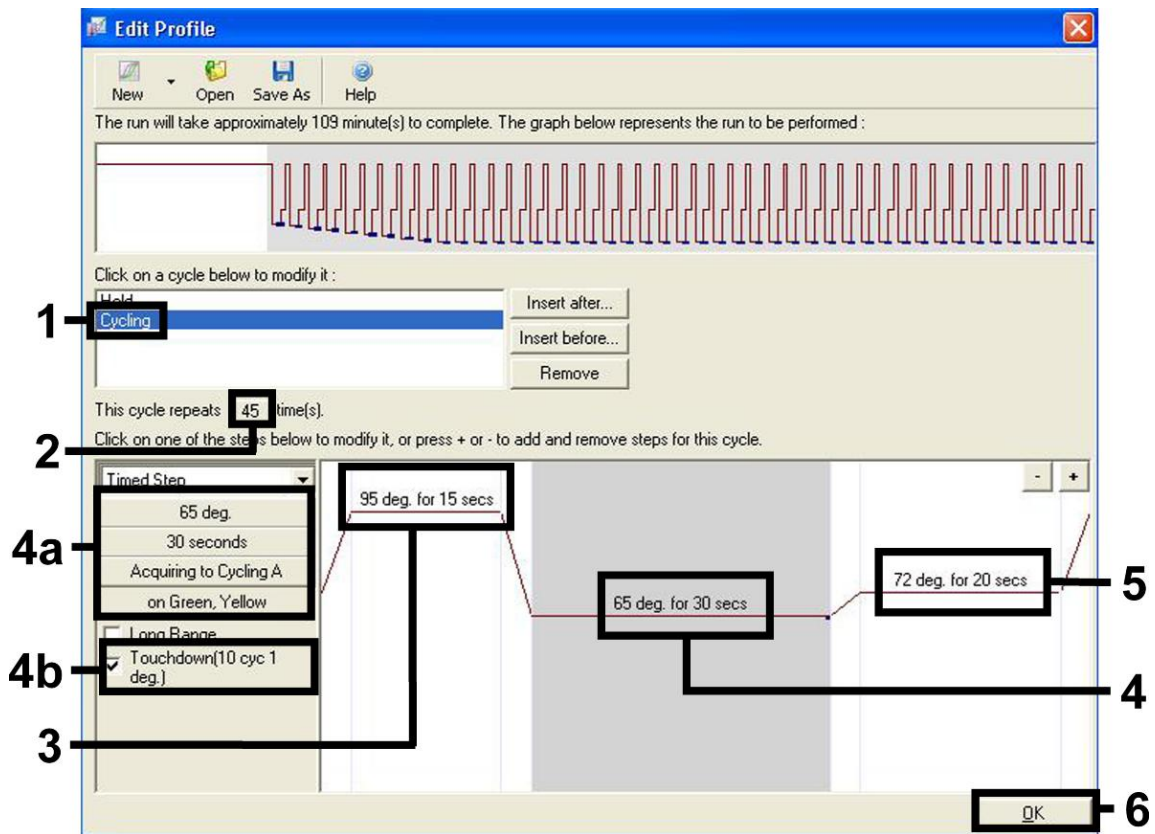


Figura 5. Amplificação do DNA. Certifique-se de ativar a função de touchdown para 10 ciclos na etapa de hibridização. Note que, no Rotor-Gene 3000, o software definirá os corantes fluorescentes como "FAM/Sybr, JOE".

9. A faixa de detecção dos canais de fluorescência tem que ser determinada de acordo com as intensidades de fluorescência nos tubos de PCR. Clicar em "Gain Optimisation" (otimização de ganho) na caixa de diálogo "New Run Wizard" (assistente de novo ensaio) (ver Figura 3) para abrir a caixa de diálogo "Auto-Gain Optimisation Setup" (configuração de otimização automática de ganho). Ajuste a temperatura de calibração para 65 para corresponder à temperatura de hibridização do programa de amplificação (Figura 6).

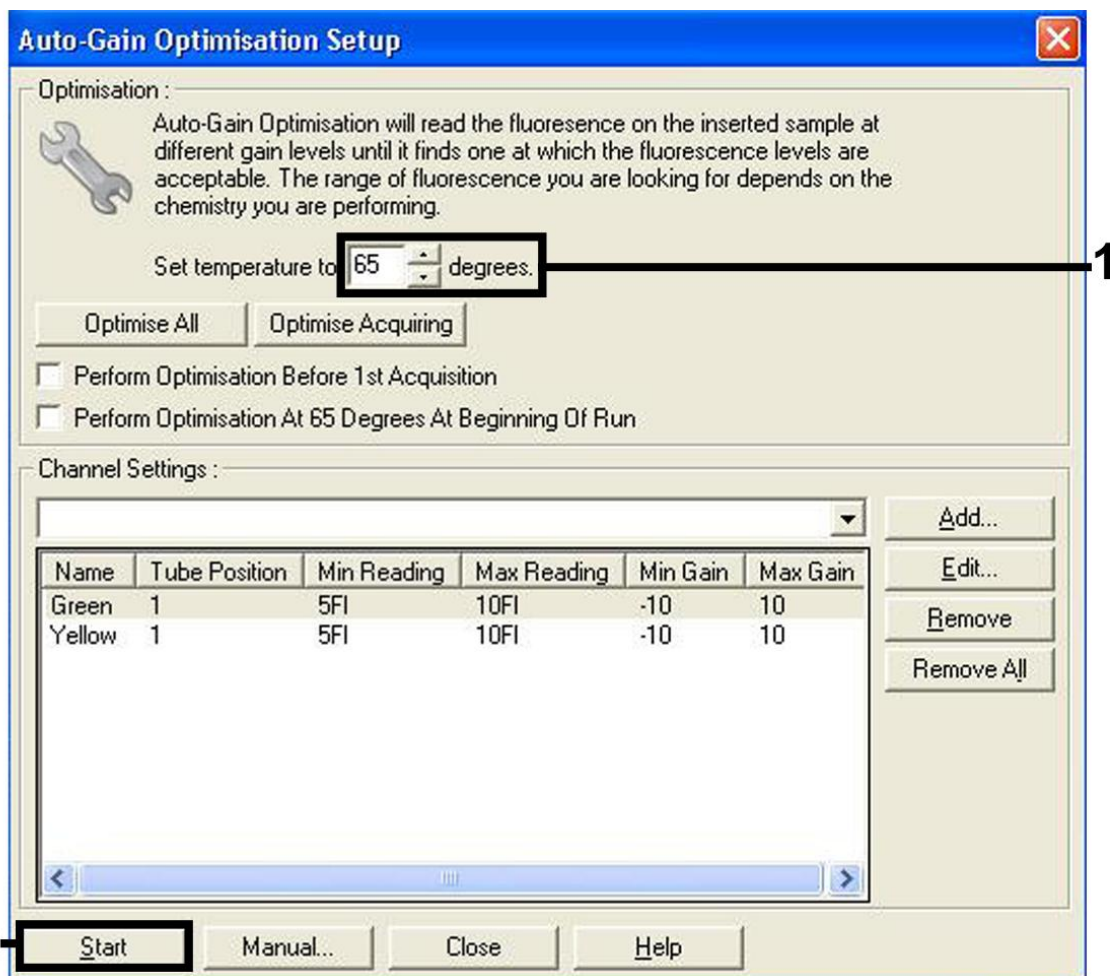


Figura 6. Ajuste da sensibilidade do canal de fluorescência. Note que, no Rotor-Gene 3000, o software definirá os corantes fluorescentes como "FAM/Sybr" e "JOE".

- Os valores de ganho determinados pela calibração do canal são salvos automaticamente e são enumerados na última janela do menu do procedimento de programação (Figura 7). Clique em "Start Run" (Iniciar ensaio).

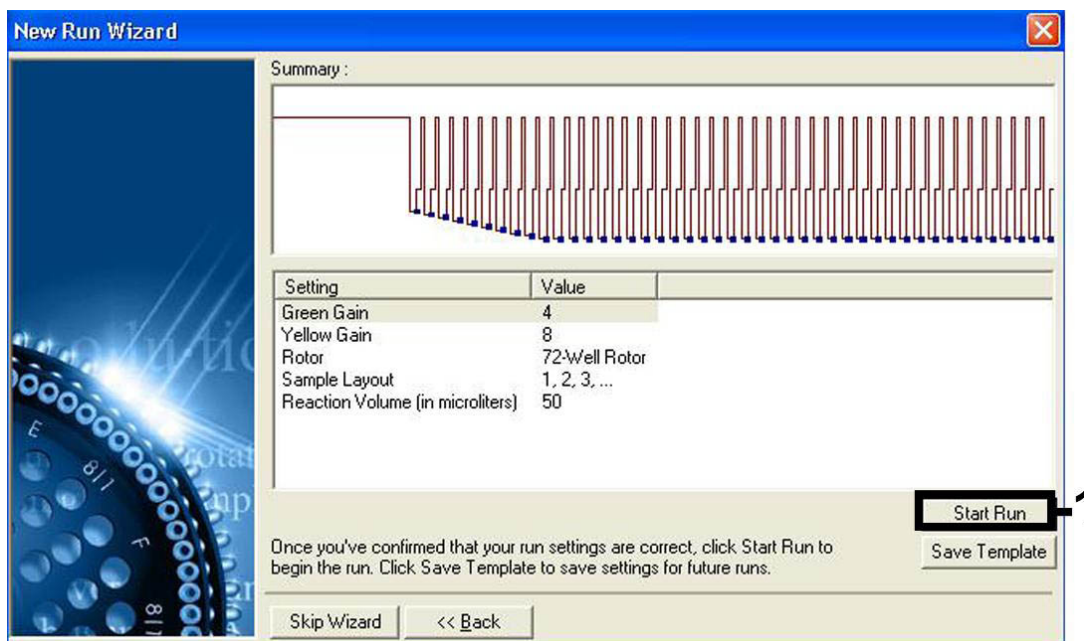


Figura 7. Iniciando o ensaio. Note que, no Rotor-Gene 3000, o software definirá os corantes fluorescentes como "FAM/Sybr" e "JOE".

Interpretação dos resultados

Quantificação

Os padrões de quantificação anexos (EBV RG QS 1–4) são tratados como amostras purificadas anteriormente e é usado o mesmo volume (20 µl). Para gerar uma curva padrão em Instrumentos Rotor-Gene Q, os 4 padrões de quantificação devem ser usados e definidos na caixa de diálogo "Edit Samples" (Editar amostras) como padrões com as concentrações especificadas (consulte o manual do usuário do instrumento).

Nota: Os padrões de quantificação são definidos como cópias/µl. A equação a seguir deve ser aplicada para a conversão dos valores determinados utilizando a curva padrão em cópias/ml do material de amostra:

$$\text{Resultado (cópias/ml)} = \frac{\text{Resultado (cópias/}\mu\text{l)} \times \text{volume de eluição (}\mu\text{l)}}{\text{Volume da amostra (ml)}}$$

Por uma questão de princípio, o volume de amostra inicial deve ser inserido na equação acima. Isso deve ser considerado quando o volume da amostra tiver sido alterado antes da extração do ácido nucleico (p. ex., diminuindo o volume por centrifugação ou aumentando o volume ao completar o volume necessário ao isolamento).

Resultados

Exemplos de reações de PCR positivas e negativas são apresentados na Figura 8 e na Figura 9.

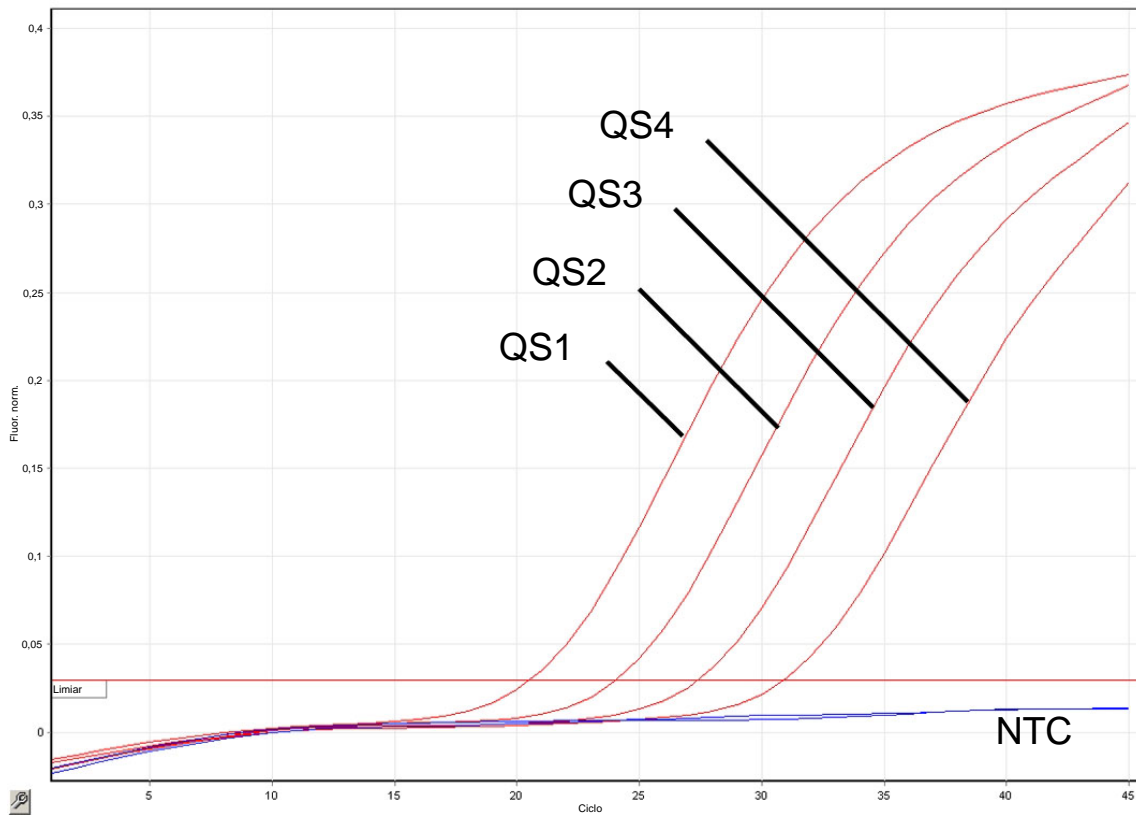


Figura 8. Detecção de padrões de quantificação (EBV RG QS 1–4) no canal de fluorescência Cycling Green (Ciclagem verde). NTC: No template control (Controle sem amostra) (controle negativo).

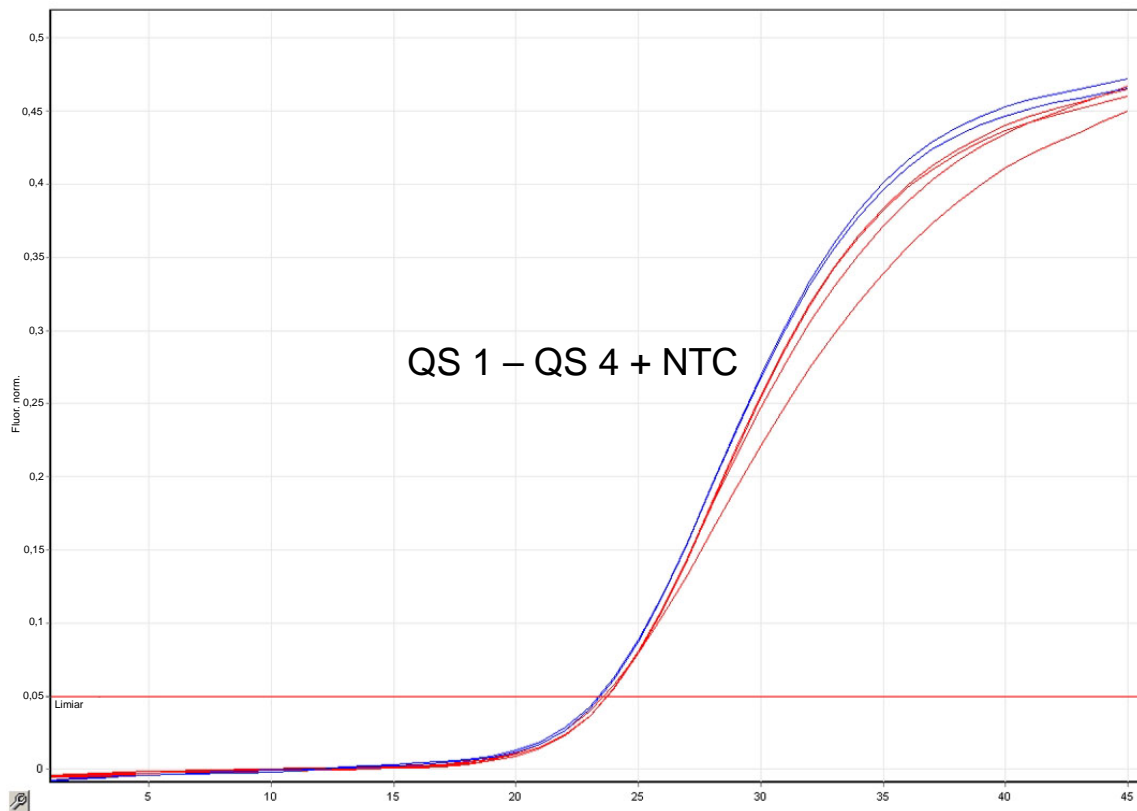


Figura 9. Detecção do controle interno (IC) no canal de fluorescência Cycling Yellow (Ciclagem amarela) com amplificação simultânea dos padrões de quantificação (EBV RG QS 1–4). NTC: (No template control) Controle sem amostra (controle negativo).

Um sinal é detectado no canal de fluorescência Cycling Green (Ciclagem verde).

O resultado da análise é positivo: a amostra contém DNA do EBV.

Neste caso, é dispensável a detecção de um sinal do canal Cycling Yellow (Ciclagem amarela), dado que as concentrações iniciais altas do DNA do EBV (sinal positivo no canal Cycling Green [Ciclagem verde]) podem levar a um sinal de fluorescência reduzido ou ausente do controle interno no canal Cycling Yellow (Ciclagem amarela) (concorrência).

Nota: No Rotor-Gene 3000, os canais relevantes são Cycling A.FAM (Ciclagem A.FAM) para o sinal positivo e Cycling A.JOE (Ciclagem A.JOE) para o controle interno.

No canal de fluorescência Cycling Green (Ciclagem verde), nenhum sinal é detectado. Ao mesmo tempo, um sinal do controle interno aparece no canal Cycling Yellow (Ciclagem amarela).

Na amostra, não é detectável DNA do EBV. Pode ser considerado negativo.

No caso de uma PCR negativa para EBV, o sinal detectado do controle interno descarta a possibilidade de inibição da PCR.

Nota: No Rotor-Gene 3000, os canais relevantes são Cycling A.JOE (Ciclagem A.JOE) para o controle interno e a ausência de um sinal para Cycling A.FAM (Ciclagem A.FAM).

Nenhum sinal é detectado no canal Cycling Green (Ciclagem verde) ou Cycling Yellow (Ciclagem amarela).

Nenhum resultado pode ser concluído.

Informações relativas às fontes de erros e suas soluções podem ser encontradas em "Guia de resolução de falhas", página 24.

Nota: No Rotor-Gene 3000, os canais relevantes são Cycling A.FAM (Ciclagem A.FAM) e Cycling A.JOE (Ciclagem A.JOE).

Guia de resolução de falhas

Este guia de resolução de falhas pode ser útil para resolver qualquer problema que possa surgir. Para obter mais informações, consulte também a página de Perguntas frequentes no nosso Centro de Suporte Técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Os cientistas da Assistência Técnica da QIAGEN estão sempre dispostos a responder a quaisquer questões sobre as informações e os protocolos contidos neste manual ou sobre as tecnologias de amostragem e ensaio (para obter informações de contato, veja a contracapa ou acesse www.qiagen.com).

Comentários e sugestões

Nenhum sinal com controles positivos (EBV RG QS 1–4) no canal de fluorescência Cycling Green (Ciclagem verde) ou Cycling A.FAM (Ciclagem A.FAM)

- | | |
|--|--|
| a) O canal de fluorescência selecionado para análise de dados de PCR não cumpre os requisitos do protocolo | Para análise de dados, selecionar o canal de fluorescência Cycling Green (Ciclagem verde) ou Cycling A.FAM (Ciclagem A.FAM) para a PCR analítica do EBV e o canal de fluorescência Cycling Yellow (Ciclagem amarela) ou Cycling A.JOE (Ciclagem A.JOE) para a PCR do controle interno. |
|--|--|

Comentários e sugestões

- | | |
|--|---|
| b) Programação incorreta do perfil de temperatura do Instrumento Rotor-Gene | Comparar o perfil de temperatura com o protocolo. Consulte "Protocolo: PCR e análise de dados", página 14. |
| c) Configuração incorreta da PCR | Verificar seus passos de trabalho com a ajuda do esquema de pipetagem e repetir a PCR, caso seja necessário. Consulte "Protocolo: PCR e análise de dados", página 14. |
| d) As condições de armazenamento para um ou mais componentes do kit não cumprem as instruções fornecidas em "Armazenamento e manuseio de reagentes" (página 8) | Verificar as condições de armazenamento e a data de validade (consulte a etiqueta do kit) dos reagentes e usar um novo kit, se necessário. |
| e) A data de validade do <i>artus</i> EBV RG PCR Kit expirou | Verificar as condições de armazenamento e a data de validade (consulte a etiqueta do kit) dos reagentes e usar um novo kit, se necessário. |

Ausência de sinal ou sinal fraco do controle interno no canal de fluorescência Cycling Yellow (Ciclagem amarela) ou Cycling A.JOE (Ciclagem A.JOE) e ausência simultânea de um sinal no canal Cycling Green (Ciclagem verde) ou Cycling A.FAM (Ciclagem A.FAM)

- | | |
|---|--|
| a) As condições da PCR não cumprem os requisitos do protocolo | Verificar as condições da PCR (ver acima) e repetir a PCR com as configurações corrigidas, caso seja necessário. |
|---|--|

Comentários e sugestões

- b) A PCR foi inibida
- Certificar-se de que é utilizado o método de isolamento recomendado e seguir atentamente as instruções do fabricante.
- Ao usar o QIAamp DNA Mini Kit, QIAamp DNA Blood Mini Kit ou QIAamp UltraSens Virus Kit, certifique-se de que durante o isolamento de DNA a etapa de centrifugação adicional tenha sido realizada antes da eluição para remover todo o etanol residual (consulte "Isolamento de DNA", páginas 10 e 11).
- c) DNA foi perdido durante a extração
- Se o controle interno tiver sido adicionado à extração, uma ausência de sinal de controle interno poderá indicar a perda de DNA durante a extração. Certificar-se de que é utilizado o método de isolamento recomendado (consulte "Isolamento de DNA", página 9) e seguir atentamente as instruções do fabricante.
- d) As condições de armazenamento para um ou mais componentes do kit não cumprem as instruções fornecidas em "Armazenamento e manuseio de reagentes" (página 8)
- Verificar as condições de armazenamento e a data de validade (consulte a etiqueta do kit) dos reagentes e usar um novo kit, se necessário.
- e) A data de validade do *artus* EBV RG PCR Kit expirou
- Verificar as condições de armazenamento e a data de validade (consulte a etiqueta do kit) dos reagentes e usar um novo kit, se necessário.

Sinais com controles negativos no canal de fluorescência Cycling Green (Ciclagem verde) ou Cycling A.FAM (Ciclagem A.FAM) da PCR analítica

- | | |
|--|---|
| a) Contaminação ocorrida durante a preparação da PCR | Repetir a PCR com novos reagentes nas réplicas.
Se possível, fechar os tubos de PCR diretamente após adicionar a amostra a ser testada.
Certificar-se de pipetar o controle positivo sempre por último.
Certifique-se de que o local de trabalho e os equipamentos sejam descontaminados regularmente. |
| b) Contaminação ocorrida durante a extração | Repetir a extração e a PCR da amostra a ser testada usando novos reagentes.
Certifique-se de que o local de trabalho e os equipamentos sejam descontaminados regularmente. |

Controle de qualidade

De acordo com o Sistema de Gerenciamento de Qualidade da QIAGEN, certificado pela ISO, cada lote do *artus* EBV RG PCR Kit é testado de acordo com as especificações predeterminadas para assegurar a consistência na qualidade do produto.

Limitações

Todos os reagentes devem ser usados exclusivamente em processos de diagnóstico *in vitro*.

O produto deve ser utilizado somente por pessoal devidamente instruído e treinado nos processos de diagnóstico *in vitro*.

Para resultados de PCR ótimos, é necessário que as instruções do manual do usuário sejam rigorosamente observadas.

Deve-se prestar atenção às datas de validade impressas na caixa e nas etiquetas de todos os componentes. Não utilizar componentes vencidos.

Embora rara, a ocorrência de mutações nas regiões altamente preservadas do genoma viral cobertas pelos primers e/ou sonda do kit pode resultar em subquantificação ou falha em detectar a presença de vírus nesses casos. A validade e o desempenho do ensaio são revistos regularmente.

Características de desempenho

Sensibilidade analítica

Para determinar a sensibilidade analítica do *artus* EBV RG PCR Kit, foi definida uma série de diluições, de 31,6 a 0,01 e de 100 ao valor nominal de 0,03 cópias de EBV equivalentes/ μ l e analisadas no Rotor-Gene 6000 e no Rotor-Gene 3000, respectivamente, em conjunto com o *artus* EBV RG PCR Kit. Os testes foram realizados em 3 dias diferentes em 8 réplicas. Os resultados foram determinados por uma análise probit. Uma ilustração gráfica da análise probit no Rotor-Gene 6000 é mostrada na Figura 10. Os limites de detecção do procedimento analítico do *artus* EBV RG PCR Kit em conjunto com o Rotor-Gene Q MDx/Q/6000 e o Rotor-Gene 3000 são 1,02 cópias/ μ l ($p = 0,05$) e 3,8 cópias/ μ l ($p = 0,05$), respectivamente. Isto significa que há 95% de probabilidade de 1,02 cópias/ μ l ou 3,8 cópias/ μ l serem detectadas.

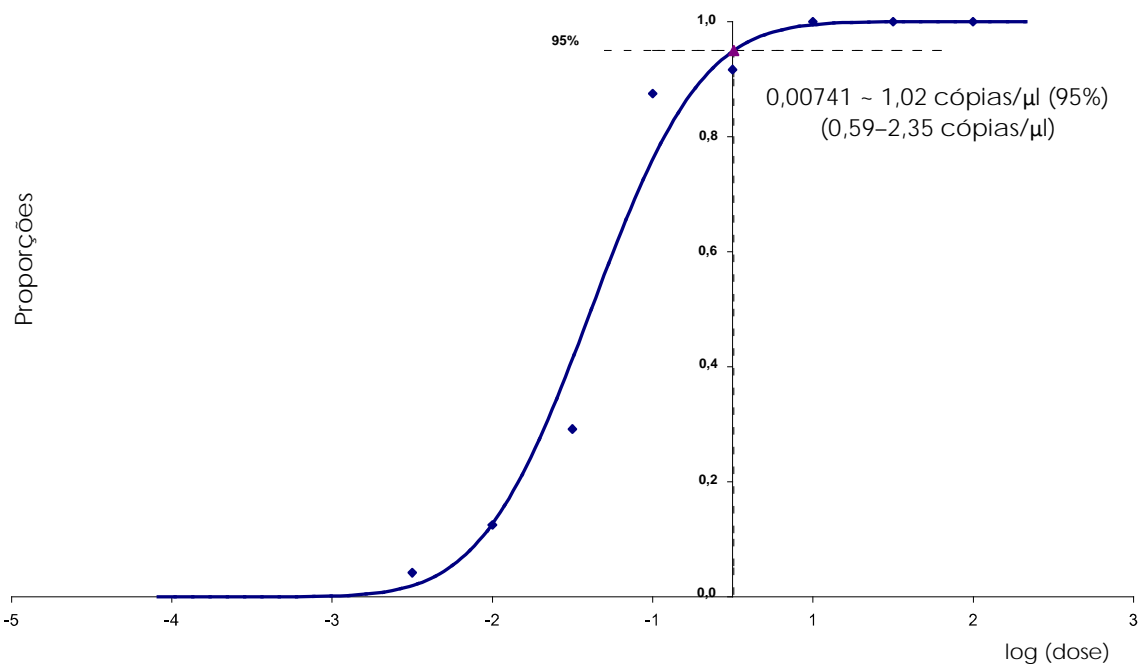


Figura 10. Análise probit: EBV (Rotor-Gene 6000). Sensibilidade analítica do *artus* EBV RG PCR Kit no Rotor-Gene 6000.

Especificidade

A especificidade do *artus* EBV RG PCR Kit é garantida primeiramente e acima de tudo pela seleção dos primers e sondas, bem como pela seleção de condições de reação rigorosas. Os primers e sondas foram verificados para possíveis homologias com todas as sequências publicadas nos bancos de genes por análise por comparação de sequências. Desse modo, a detectabilidade de todos os genótipos pertinentes foi garantida.

Adicionalmente, a especificidade foi validada com 6 diferentes amostras de soro negativas para o EBV. Essas amostras não geraram nenhum sinal com os primers e sondas específicos para o EBV, que são incluídos no EBV RG Master.

Uma possível reatividade cruzada do *artus* EBV RG PCR Kit foi testada usando o grupo-controle apresentado na Tabela 7. Nenhum dos agentes patogênicos testados foi reativo.

Tabela 7. Testagem da especificidade do kit com agentes patogênicos potencial para reação cruzada

Grupo-controle	EBV (Cycling Green [Ciclagem verde] ou Cycling A.FAM [Ciclagem A.FAM])	Controle interno (Cycling Yellow [Ciclagem amarela] ou Cycling A.JOE [Ciclagem A.FAM])
Herpes-vírus humano 1 (Herpes-vírus simples 1)	-	+
Herpes-vírus humano 2 (Herpes-vírus simples 2)	-	+
Herpes-vírus humano 3 (Vírus Varicela-zoster)	-	+
Herpes-vírus humano 5 (Citomegalovírus)	-	+
Vírus da leucemia humana de células T 1	-	+
Vírus da leucemia humana de células T 2	-	+

Reprodutibilidade

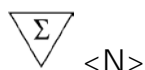
Os dados de reprodutibilidade permitem uma avaliação regular do desempenho do *artus* EBV RG PCR Kit, bem como uma comparação de eficiência com outros produtos. Esses dados foram obtidos pela participação nos programas de competência estabelecidos.

Referências

A QIAGEN mantém um vasto banco de dados online atualizado de publicações científicas que utilizam produtos QIAGEN. As opções de pesquisa avançada permitem localizar os artigos que você precisa, pesquisando por uma única palavra-chave ou especificando a aplicação, área de investigação, título, etc.

Para obter uma lista completa de referências, acesse o Banco de dados de referências online da QIAGEN em www.qiagen.com/RefDB/search.asp ou entre em contato com a Assistência Técnica da QIAGEN ou com seu distribuidor local.

Símbolos



Contém reagentes suficientes para <N> testes



Data de validade



Dispositivo médico de diagnóstico in vitro



Referência



Número de lote



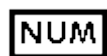
Número de material



Componentes



Contém



Número



Número global de item comercial



Limites de temperatura



Fabricante



Consulte as instruções de uso

Informações de contato

Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de suporte técnico em www.qiagen.com/Support ou contate um dos Departamentos da Assistência técnica ou distribuidores locais da QIAGEN (veja o verso do manual ou visite-nos em www.qiagen.com).

Informações para pedidos

Produto	Conteúdo	Ref.
<i>artus</i> EBV RG PCR Kit (24)	Para 24 reações: Master, 4 padrões de quantificação, controle interno, água (grau PCR)	4501263
<i>artus</i> EBV RG PCR Kit (96)	Para 96 reações: Master, 4 padrões de quantificação, controle interno, água (grau PCR)	4501265
Kits EASY <i>artus</i> EBV RG PCR — para purificação de amostras automatizadas integradas em conformidade com a CE-IVD e detecção do agente patogênico		
EASY <i>artus</i> EBV RG PCR Kit 1	Para 48 preparações de ácidos nucleicos virais e 24 ensaios: 1 x EZ1 DSP Virus Kit, 1 x <i>artus</i> EBV RG PCR Kit (24)	EA10123
EASY <i>artus</i> EBV RG PCR Kit 2	Para 48 preparações de ácidos nucleicos virais e 48 ensaios: 1 x EZ1 DSP Virus Kit, 2 x <i>artus</i> EBV RG PCR Kit (24)	EA10124
EZ1 DSP Virus Kit — para purificação simultânea e automatizada de DNA e RNA virais de 1–14 amostras de soro, plasma ou LCR		
EZ1 DSP Virus Kit (48)	Para 48 preparações de ácidos nucleicos virais: Cartuchos de reagentes previamente enchidos, suportes de ponteiras descartáveis, ponteiras com filtro descartáveis, tubos de amostra, tubos de eluição, tampões, RNA transportador	62724
QIAamp DNA Mini Kit — para purificação de DNA viral e genômico de tecidos e outras amostras		
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Para 50 preparações de DNA: 50 Colunas Spin QIAamp Mini, QIAGEN Proteinase K, Reagentes, Tampões, Tubos de coleta (2 ml)	51304

Produto	Conteúdo	Ref.
QIAamp UltraSens Virus Kit — para concentração e isolamento de DNA viral e RNA de soro e plasma		
QIAamp UltraSens Virus Kit (50)	Para 50 preparações de ácidos nucleicos virais: 50 Colunas Spin QIAamp Mini, Proteinase K, RNA transportador, Tubos de coleta (2 ml), Tampões	53704
QIAamp DNA Blood Mini Kit — para purificação de até 12 µg de DNA genômico, mitocondrial ou viral de sangue e fluidos corporais relacionados		
QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	Para 50 mini preparações de DNA: 50 Colunas Spin QIAamp Mini, QIAGEN Protease, Reagentes, Tampões, Tubos de coleta (2 ml)	51104
Rotor-Gene Q MDx e acessórios		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Termociclador de PCR em tempo real com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), computador laptop, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em componentes e mão de obra, instalação e treinamento não incluídos	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Termociclador de PCR em tempo real com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), computador laptop, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em componentes e mão de obra, instalação e treinamento	9002023

Produto	Conteúdo	Ref.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Termociclador de PCR em tempo real e analisador de fusão de alta resolução com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim) mais canal HRM, computador laptop, software e acessórios: inclui 1 ano de garantia para componentes e mão de obra; instalação e treinamento não incluídos	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Termociclador de PCR em tempo real e analisador de fusão de alta resolução com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim) mais canal HRM, computador laptop, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em componentes e mão de obra, instalação e treinamento	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Instrumento de PCR em tempo real com 6 canais (azul, verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), incluindo computador laptop, software, acessórios: 1 ano de garantia em componentes e mão de obra, instalação e treinamento não incluídos	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Instrumento de PCR em tempo real com 6 canais (azul, verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), incluindo computador laptop, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em componentes e mão de obra, instalação e treinamento	9002043

Produto	Conteúdo	Ref.
Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform	Termociclador de PCR em tempo real com 2 canais (verde, amarelo), computador laptop, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em componentes e mão de obra, instalação e treinamento não incluídos	9002002
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	Termociclador de PCR em tempo real com 2 canais (verde, amarelo), computador laptop, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em componentes e mão de obra, instalação e treinamento	9002003
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform	Termociclador de PCR em tempo real e analisador de fusão de alta resolução com 2 canais (verde, amarelo) mais canal HRM, computador laptop, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em componentes e mão de obra, instalação e treinamento não incluídos	9002012
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	Termociclador de PCR em tempo real e analisador de fusão de alta resolução com 2 canais (verde, amarelo) mais canal HRM, computador laptop, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em componentes e mão de obra, instalação e treinamento	9002013
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloco de alumínio para configuração da reação manual com pipeta de canal simples em 72 tubos de 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Bloco de alumínio para configuração da reação manual numa variedade padrão de 8 x 12 utilizando 96 tubos de 0,2 ml	9018905

Produto	Conteúdo	Ref.
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 tiras de 4 tubos e tampas para 1000 reações	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 tiras de 4 tubos e tampas para 10.000 reações	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 tubos de parede fina para 1000 reações	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 tubos de parede fina para 10.000 reações	981008

Para obter informações de licenciamento atualizadas e isenções de responsabilidade específicas do produto, consulte o manual do usuário ou o manual do kit QIAGEN correspondente. Os manuais do usuário e os manuais de kits QIAGEN estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser solicitados à Assistência Técnica da QIAGEN ou ao distribuidor local.

A aquisição deste produto permite ao comprador seu uso para efetuar serviços de diagnóstico em processos de diagnóstico humano in vitro. Não é aqui concedida patente geral ou outra licença de qualquer tipo além deste direito de utilização específico a partir da aquisição.

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

Acordo de licença limitada

O uso deste produto implica a aceitação por parte de qualquer comprador ou usuário do *artus* EBV RG PCR Kit dos termos seguintes:

1. O *artus* EBV RG PCR Kit poderá ser usado exclusivamente de acordo com o *Manual do EBV RG PCR Kit* e apenas com os componentes contidos no kit. A QIAGEN não concede qualquer licença ao abrigo da sua propriedade intelectual para usar ou incorporar os componentes deste kit com nenhum componente não incluído neste kit, exceto conforme descrito no *Manual do artus EBV RG PCR Kit* e nos protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com.
2. Com exceção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não fornece qualquer garantia de que este kit e/ou o(s) seu(s) uso(s) não infrinja(m) os direitos de terceiros.
3. Este kit e seus componentes são licenciados para uso único e não podem ser reutilizados, reconstruídos ou revendidos.
4. A QIAGEN especificamente renuncia a quaisquer outras licenças, declaradas ou implícitas, a não ser àquelas expressamente indicadas.
5. O comprador e o usuário do kit concordam em não tomar ou permitir que qualquer outra pessoa tome medidas que possam facilitar ou levar a qualquer um dos atos acima proibidos. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições deste Acordo de licença limitada em qualquer Tribunal e irá recuperar todos os seus custos de investigação e de Tribunal, incluindo honorários de advogados, em qualquer ação destinada a fazer cumprir este Acordo de licença limitada ou qualquer um de seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou seus componentes.

Para obter os termos de licença atualizados, acesse www.qiagen.com.

© 2009-2014 QIAGEN, todos os direitos reservados.

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)

