

Príručka k súprave *artus*[®] HSV-1/2 RG PCR Kit



24 (katalógové č. 4500263)



96 (katalógové č. 4500265)

Verzia 1



Kvalitatívna in vitro diagnostika

Na použitie s prístrojmi Rotor-Gene[®] Q



4500263, 4500265



1060171EN



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NEMECKO

R2

MAT

1060171SK



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN je popredným poskytovateľom inovatívnych technológií vzoriek a testov, ktoré umožňujú izoláciu a detekciu obsahu akejkoľvek biologickej vzorky. Naše moderné, vysoko kvalitné produkty a služby zabezpečujú úspech od vzorky po výsledok.

QIAGEN stanovuje normy v:


- Purifikácii DNA, RNA a proteínov
- Testoch nukleových kyselín a proteínov
- Výskume mikroRNA a RNAi
- Automatizácii technológií vzoriek a testov

Naším poslaním je umožniť vám dosiahnuť vynikajúci úspech a prielomy. Viac informácií nájdete na stránke www.qiagen.com.

Obsah

Obsah súpravy	4
Symboly	4
Skladovanie	5
Účel použitia	5
Obmedzenia používania produktu	6
Technická pomoc	6
Kontrola kvality	6
Varovania a preventívne opatrenia	6
Úvod	7
Princíp	7
Informácie o patogéne	7
Charakteristiky účinnosti	8
Zariadenie a reagensie, ktoré dodá používateľ	14
Dôležité poznámky	15
Preventívne opatrenia	15
Izolovanie DNA	15
Interný kontrolný roztok	16
Protokol: PCR a analýza údajov	17
Sprievodca riešením problémov	28
Referenčná literatúra	31
Informácie o objednávaní	32

Obsah súpravy

Súprava <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit		(24)	(96)
Katalógové č.		4500263	4500265
Počet reakcií		24	96
Modrá	HSV-1/2 RG Master	2 x 300 µl	8 x 300 µl
Žltá	HSV-1/2 RG Mg-Sol* Mg-Sol	600 µl	600 µl
Červená	HSV-1 RG PC [†] (100 kópií/µl)	200 µl	200 µl
Hnedá	HSV-2 RG PC [†] (100 kópií/µl)	200 µl	200 µl
Zelená	HSV-1/2 RG IC [‡] IC	1000 µl	2 x 1000 µl
Biela	Voda (stupeň PCR)	1000 µl	1000 µl
	Príručka 	1	1

* Roztok magnézia.

† Pozitívny kontrolný roztok.

‡ Interný kontrolný roztok.

Symbols



Obsahuje reagenty pre <N> testov



Použite do



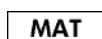
Zdravotnícke diagnostické zariadenie na použitie v podmienkach in vitro



Katalógové číslo










Číslo šarže



Číslo materiálu



Komponenty

	Obsahuje
	Číslo
	Identifikátor GTIN (Global Trade Item Number)
	Teplotné obmedzenia
	Výrobca
	Obráťte sa na údaje uvedené v príručke
	Dôležitá poznámka

Skladovanie

Komponenty súpravy *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit by sa mali skladovať pri teplote -15 °C až -30 °C a sú stabilné do dátumu expirácie, ktorý je uvedený na štítku. Nemalo by dôjsť k opakovanému rozmrazovaniu a zmrazovaniu (> 2 x), pretože tým sa môže znížiť senzitivita testu. Ak sa reagentie nepoužívajú nepretržite, mali by sa zamraziť v alikvótach. Skladovanie pri teplote 2 – 8 °C by nemalo byť dlhšie ako 5 hodín.

Účel použitia

Súprava *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit je test polymerázovej reťazovej reakcie (Polymerase Chain Reaction, PCR) v reálnom čase na detekciu a diskrimináciu DNA ľudského vírusu herpes simplex 1 a 2 v prístrojoch Rotor-Gene Q po úplne automatizovanej purifikácii vzoriek mozgovomiešneho moku (MMM) od jednotlivcov nakazených vírusom HSV pomocou súpravy EZ1[®] DSP Virus Kit.

 Súprava *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit sa nemôže používať s prístrojmi Rotor-Gene Q 2plex.

Súprava *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit je určená na použitie spolu s klinickým obrazom a ostatnými laboratórnymi markermi na prognostiku ochorenia.

Obmedzenia používania produktu

Všetky reagenty sa môžu použiť len pri diagnostike in vitro.

Tento výrobok používa personál, ktorý absolvoval špeciálne školenie ohľadom diagnostických postupov (EN375) in vitro.

Na dosiahnutie optimálnych výsledkov PCR je potrebné presne dodržiavať používateľskú príručku.

Pozornosť by sa mala venovať dátumu expirácie vytlačeným na škatuli a štítkoch všetkých komponentov. Nepoužívajte exspirované komponenty.

Technická pomoc

V spoločnosti QIAGEN sme hrdí na kvalitu a dostupnosť našej technickej podpory. Na našich oddeleniach technického servisu pracujú skúsení vedci s rozsiahlymi praktickými a teoretickými poznatkami v oblasti vzoriek a testovacích technológií a používania výrobkov od spoločnosti QIAGEN®. Ak máte nejaké otázky alebo ak ste narazili na akékoľvek problémy súvisiace so súpravou *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit alebo s výrobkami spoločnosti QIAGEN všeobecne, bez váhania sa na nás obráťte.

Zákazníci QIAGEN sú hlavným zdrojom informácií týkajúcich sa pokročilých alebo špecializovaných použití našich výrobkov. Tieto informácie sú užitočné pre iných vedcov, ako aj pre výskumných pracovníkov spoločnosti QIAGEN. Preto vám odporúčame, aby ste nás kontaktovali, ak máte akékoľvek návrhy týkajúce sa výkonnosti výrobku alebo nových aplikácií a techník.

Technickú pomoc a ďalšie informácie získate v centre technickej podpory na adrese www.qiagen.com/Support alebo kontaktujte niektoré z oddelení technickej podpory spoločnosti QIAGEN (pozrite zadnú stranu alebo navštívte lokalitu www.qiagen.com).

Kontrola kvality

V súlade so certifikovaným systémom riadenia kvality QIAGEN ISO je každá šarža súpravy *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit testovaná na základe vopred určených špecifikácií, aby bola zaistená konzistentná kvalita produktu.

Varovania a preventívne opatrenia

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Ďalšie informácie nájdete v príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ). Tieto materiály sú k dispozícii on-line v praktickom a kompaktnom formáte PDF na adrese www.qiagen.com/safety, kde môžete vyhľadať, zobrazíť a vytlačiť KBÚ pre každú súpravu QIAGEN a jej súčasti.

Odpad vzoriek a testov likvidujte podľa miestnych bezpečnostných predpisov.

Úvod

Súprava *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit sa skladá zo systému pripraveného na použitie na detegovanie DNA HSV-1 a HSV-2 pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (Polymerase Chain Reaction, PCR) na prístrojoch Rotor-Gene Q. HSV-1/2 RG Master obsahuje reagensie a enzýmy na špecifickú amplifikáciu regiónu 154 bp genómov HSV-1 a HSV-2 a na priamu detekciu špecifického amplikónu vo fluorescenčnom kanáli Cycling Green (zdroj 470 nm, detektor 510 nm) a Cycling Orange (zdroj 585 nm, detektor 610 nm) prístrojov Rotor-Gene Q.

Okrem toho obsahuje súprava *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit druhý heterológny amplifikačný systém na identifikovanie možnej inhibície PCR. Tá sa deteguje ako interný kontrolný roztok (IKR) vo fluorescenčnom kanáli Cycling Yellow (zdroj 530 nm, detektor 555 nm) prístrojov Rotor-Gene Q. Detekčný limit analytickej HSV-1/2 RG PCR (pozri „Analytická senzitivita“, strana 8) sa nezníži. Dodávajú sa externé pozitívne kontrolné roztoky (HSV-1 RG PC a HSV-2 RG PC).

Princíp

Detekcia patogénov pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (Polymerase Chain Reaction, PCR) je založená na amplifikácii špecifických regiónov genómu patogénu. Pri real-time PCR sa amplifikovaný produkt deteguje prostredníctvom fluorescenčných farbív. Tie sú zvyčajne spojené so sondami oligonukleotidov, ktoré sa špecificky viažu na amplifikovaný produkt. Monitorovanie intenzity fluorescencie počas PCR cyklu (t. j. v reálnom čase) umožňuje detekciu a vyčíslenie akumulujúceho sa produktu bez nutnosti opätovného otvorenia reakčných skúmaviek po PCR cykle.*

Informácie o patogéne

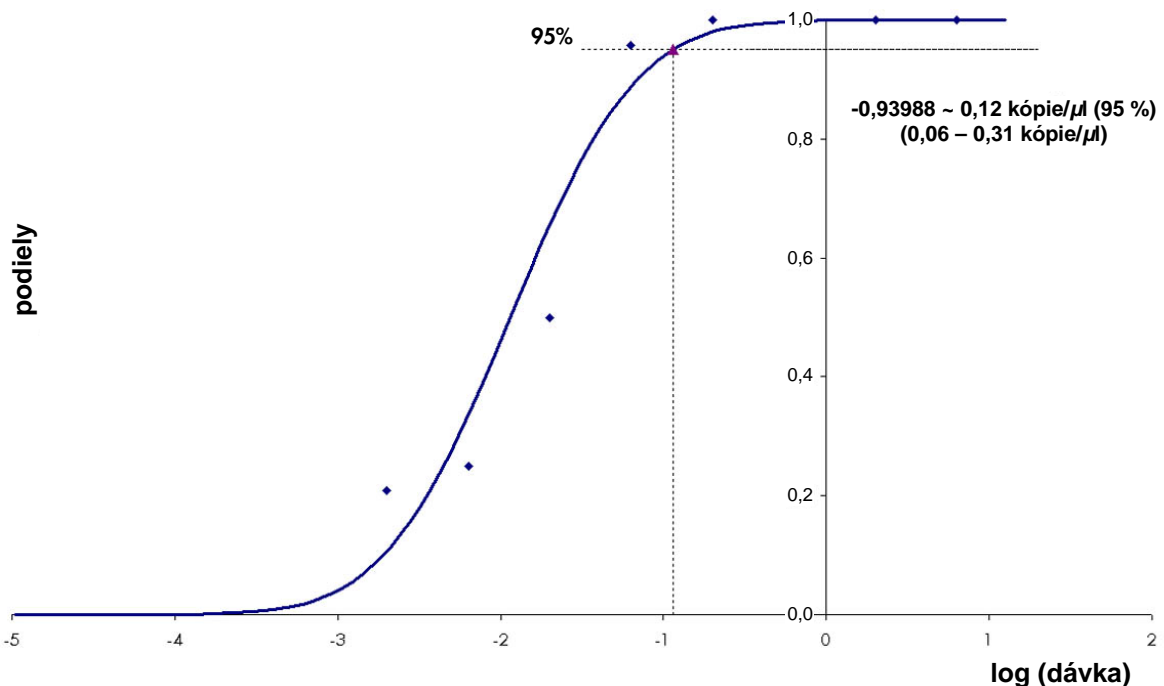
Vírus herpes simplex (HSV) sa nachádza v tekutinách v léziách, slinách, mozgomiešnom moku (MMM) a vaginálnych sekrétoch. Prenáša sa najmä priamym kontaktom s léziami a sexuálnym stykom, ako aj perinatálne. Lézie na pokožke a sliznice v ústach a na genitáliách charakterizujú väčšinu pozitívnych prípadov nákazy HSV. Infekcia HSV môže byť buď primárna (> 90 % týchto prípadov je asymptomatických) alebo recidivujúca (sekundárna). Primárna infekcia vírusom HSV-1 môže okrem iného viesť ku gingivostomatitíde, herpetickému ekzému, keratokonjunktivitíde a encefalitíde; primárna infekcia vírusom HSV-2 zapríčiňuje okrem iného vulvovaginitídu, meningitídu a generalizovaný herpes u novorodencov. Primárne symptómy sekundárnej infekcie sú rany na sliznici nosa, úst a v oblasti genitálií. Vážnejšie sú recidivujúce formy keratokonjunktivitídy a meningitídy.

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

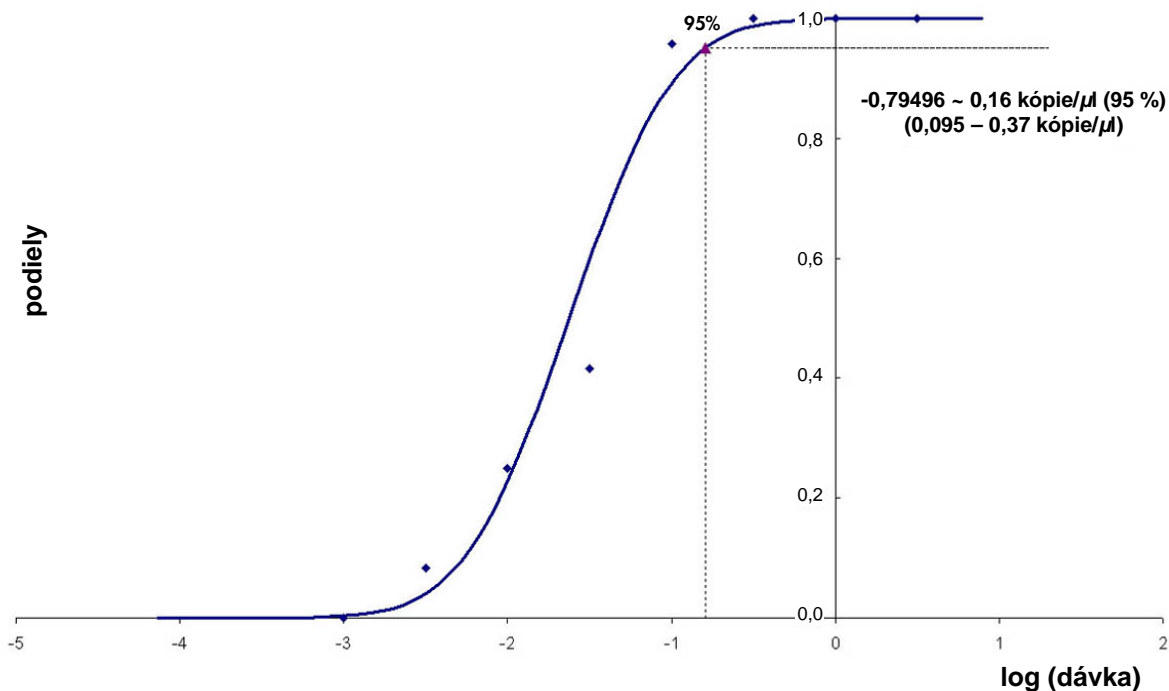
Charakteristiky účinnosti

Analytická senzitivita

Na určenie analytickej senzitivity súpravy *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit sa pripravili štandardné série riadenia z 10 na 0,001 kópie/ μ l a analyzovali sa v prístroji Rotor-Gene Q/6000 v kombinácii so súpravou *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit. Testovanie sa uskutočnilo počas 3 rôznych dní na 8 kópiách. Výsledky sa určili pomocou probit analýzy. Analytický detekčný limit súpravy *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit v kombinácii s prístrojom Rotor-Gene Q/6000 je konzistentne 0,12 kópie/ μ l ($p = 0,05$) pre vírus HSV-1 a 0,16 kópie/ μ l ($p = 0,05$) pre vírus HSV-2. To znamená, že existuje pravdepodobnosť 95 %, že dôjde k detekcii 0,12 kópie/ μ l DNA vírusu HSV-1 alebo 0,16 kópie/ μ l DNA vírusu HSV-2. Grafická ilustrácia analýzy probit pre vírus HSV-1 je zobrazené na Obrázok 1 nižšie; nákres analýzy probit pre vírus HSV-2 je zobrazený na Obrázok 2.



Obrázok 1. Probit analýza: HSV-1 (Rotor-Gene Q/6000). Analytická senzitivita na vírus HSV-1 súpravy *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit v prístroji Rotor-GeneQ/6000.



Obrázok 2. Probit analýza: HSV-2 (Rotor-Gene Q/6000). Analytická senzitivita na vírus HSV-2 súpravy *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit v prístroji Rotor-Gene Q/6000.

Špecificita

Špecificita súpravy *artus* HSV-1/2 PCR Kit sa zabezpečí predovšetkým výberom primérov a sond, ako aj výberom prísnych podmienok reakcie. U primérov a sond sa skontrolovali prípadné homológie pre všetky sekvencie uvedené v génovej banke pomocou sekvenčnej porovnávacej analýzy. Detekovateľnosť všetkých relevantných genotypov bola preto zaistená pomocou zoradenia databázy a cyklu PCR na prístrojoch Rotor-Gene s týmito kmeňmi (pozri Tabuľka 1).

Okrem toho sa špecificita overila pomocou 30 rôznych HSV-1 a HSV-2 negatívnych vzoriek MMM. Nedošlo u nich k vygenerovaniu žiadnych signálov s priméromi a sondami špecifickými pre HSV-1 a HSV-2, ktoré sú zahrnuté v HSV-1/2 RG Master.

Potenciálna krížová reaktivita súpravy *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit sa testovala pomocou kontrolnej skupiny uvedenej v Tabuľka 2. Žiadny z testovaných patogénov nebol reaktívny.

Tabuľka 1. Testovanie špecificity relevantných genotypov

Vírus	Kmeň	Zdroj	HSV-1 (Cycling Green)	HSV-2 (Cycling Orange)	Interný kontrolný roztok (Cycling Yellow)
HSV-1	HF	ATCC*	+	-	+
HSV-1	KOS	INSTAND†	+	-	+
HSV-1	MacIntyre	QCMD‡	+	-	+
HSV-2	HG-52	NCPV§	-	+	+
HSV-2	G	ATCC*	-	+	+
HSV-2	MS	QCMD‡	-	+	+

* ATCC kolekcia kultúr amerického typu.

† INSTAND Spoločnosť na podporu zaistenia kvality v zdravotníckych laboratóriách.

‡ QCMD kontrola kvality pre molekulárnu diagnostiku.

§ NCPV národná kolekcia patogénnych vírusov.

Tabuľka 2. Testovanie špecificity súpravy s potenciálne krížovo reaktívnymi patogénmi

Kontrolná skupina	HSV-1 (Cycling Green)	HSV-2 (Cycling Orange)	Interný kontrolný roztok (Cycling Yellow)
Ľudský herpetický vírus 3 (vírus varicella-zoster)	–	–	+
Ľudský herpetický vírus 4 (vírus Eppstein-Barrovej)	–	–	+
Ľudský herpetický vírus 5 (cytomegalovírus)	–	–	+
Ľudský herpetický vírus 6A	–	–	+
Ľudský herpetický vírus 6B	–	–	+
Ľudský herpetický vírus 7	–	–	+
Ľudský herpetický vírus 8 (herpetický vírus spojený s Kaposiho sarkómom)	–	–	+
Vírus hepatitídy A	–	–	+
Vírus hepatitídy B	–	–	+
Vírus hepatitídy C	–	–	+
Vírus ľudskej imunodeficiencie (Human Immunodeficiency Virus – HIV)	–	–	+
Lymfotropný vírus T-buniek ľudí 1	–	–	+
Lymfotropný vírus T-buniek ľudí 2	–	–	+
Enterovírus	–	–	+
Parvovírus B19	–	–	+
Západonílsky vírus	–	–	+

Presnosť

Údaje o presnosti súpravy *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit sa zbierali pomocou prístrojov Rotor-Gene a umožňujú určenie celkového rozptylu testu. Celkový rozptyl sa skladá z rozptylu v rámci testu (rozptyl niekoľkých výsledkov vzoriek s rovnakou koncentráciou v rámci jedného experimentu), rozptylu medzi testami (rozptyl viacerých výsledkov testu, ktoré vygenerovali rôzni operátori v jednom laboratóriu na rôznych prístrojoch rovnakého typu) a rozptylu medzi dávkami (rozptyl viacerých výsledkov testu pomocou rôznych dávok). Získané údaje sa použili na určenie štandardnej odchýlky, rozptylu a koeficientu rozptylu pre konkrétny patogén a interný kontrolný roztok PCR.

Údaje o presnosti súpravy *artus* HSV-1/2 RG PCR sa zbierali pomocou DNA HSV-1 a HSV-2 s koncentráciou 10 kópií/ μ l. Testovanie sa uskutočnilo s 8 kópiami. Údaje o presnosti sa vypočítali na základe hodnôt C_T amplifikačných kriviek (C_T : prahový cyklus, pozri Tabuľka 3 a Tabuľka 4). Na základe týchto výsledkov je celkové štatistické rozšírenie danej vzorky s uvedenou koncentráciou 1,82% (C_T) pre vírus HSV-1, 0,67 % (C_T) pre vírus HSV-2 a 1,24 % (C_T) a 1,58 % (C_T) na zistenie interného kontrolného roztoku v tomto poradí. Tieto hodnoty sú založené na súhrne všetkých jednotlivých hodnôt stanoveného rozptylu.

Tabuľka 3. Údaje o presnosti pre vírus HSV-1 na základe hodnôt C_T

	Hodnota C_T	Štandardná odchýlka	Koeficient rozptylu (%)
Rozptyl v rámci testu: HSV-1 10 kópií/ μ l	30,46	0,25	0,81
Rozptyl v rámci testu: Interný kontrolný roztok	25,29	0,08	0,3
Rozptyl medzi testami: HSV-1 10 kópií/ μ l	29,69	0,69	2,05
Rozptyl medzi testami: Interný kontrolný roztok	24,97	0,31	1,25
Rozptyl medzi dávkami: HSV-1 10 kópií/ μ l	29,95	0,40	1,35
Rozptyl medzi dávkami: Interný kontrolný roztok	24,90	0,30	1,20
Celkový rozptyl: HSV-1 10 kópií/ μ l	29,91	0,55	1,82
Celkový rozptyl: Interný kontrolný roztok	24,99	0,31	1,24

Tabuľka 4. Údaje o presnosti pre vírus HSV-2 na základe hodnôt C_T

	Hodnota C _T	Štandardná odchýlka	Koeficient rozptylu (%)
Rozptyl v rámci testu: HSV-2 10 kópií/μl	29,85	0,15	0,50
Rozptyl v rámci testu: Interný kontrolný roztok	25,17	0,39	1,55
Rozptyl medzi testami: HSV-2 10 kópií/μl	29,92	0,15	0,49
Rozptyl medzi testami: Interný kontrolný roztok	25,11	0,41	1,63
Rozptyl medzi dávkami: HSV-2 10 kópií/μl	29,80	0,23	0,79
Rozptyl medzi dávkami: Interný kontrolný roztok	24,89	0,33	1,32
Celkový rozptyl: HSV-2 10 kópií/μl	29,88	0,20	0,67
Celkový rozptyl: Interný kontrolný roztok	25,07	0,40	1,58

Robustnosť

Overenie robustnosti umožňuje stanovenie celkovej miery zlyhania súpravy *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit. Na získanie veľmi nízkych titrov vírusu HSV-1 a HSV-2, sa do 30 negatívnych vzoriek MMM pridal elučný objem 0,36 kópie/μl DNA vírusu HSV-1 alebo elučný objem 0,48 kópie/μl DNA vírusu HSV-2 DNA (trojnásobná koncentrácia limitu analytickej senzitivity). Po extrakcii pomocou súpravy EZ1 DSP Virus Kit, sa tieto vzorky analyzovali pomocou súpravy *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit. Všetkých 30 vzoriek sa vyhodnotilo správne ako slabo pozitívne pre každý typ HSV s výslednou mierou zlyhania 0 %. Okrem toho sa pomocou purifikácie a analýzy 30 vzoriek MMM negatívnych na vírusy HSV-1 a HSV-2 vyhodnotila masívnosť interného kontrolného roztoku. Nezistila sa žiadna inhibícia PCR, čoho výsledkom bola celková miera zlyhania 0 %. Robustnosť súpravy *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit je ≥99 %.

Reprodukovateľnosť

Údaje o reprodukovateľnosti umožňujú pravidelné zhodnotenie účinnosti súpravy *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit, ako aj porovnanie efektívnosti s ostatnými výrobkami. Tieto údaje boli získané počas účasti v uznávaných odborných programoch.

Zariadenie a reagensie, ktoré dodá používateľ

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Viac informácií nájdete na príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ), ktoré sú k dispozícii u dodávateľa produktov.

- Súprava na izoláciu DNA (pozri „Izolovanie DNA“, strana 15)
- Pipety (nastaviteľné)*
- Sterilné špičky pipiet s filtrami
- Vírivý mixér*
- Stolná centrifúga* s rotorom na reakčné skúmavky s objemom 2 ml
- Prístroj Rotor-Gene Q alebo Rotor-Gene*† s fluorescenčnými kanálmi pre farbivo Cycling Green, Cycling Orange a Cycling Yellow
- Verzia softvéru Rotor-Gene Q 1.7.94 a vyššia (verzia softvéru Rotor-Gene 6000 1.7.65 a vyššia)
- Skúmavky a uzávery Strip Tubes and Caps, 0.1 ml na použitie s rotorom 72-well rotor (kat. č. 981103 alebo 981106)
- Prípadne: Skúmavky PCR Tubes, 0.2 ml na použitie s rotorom 36-well rotor (kat. č. 981005 alebo 981008)
- Chladiaci blok (Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, kat. č. 9018901 alebo Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes, kat. č. 9018905)

* Zabezpečte, aby sa prístroje skontrolovali a nakalibrovali podľa odporúčaní výrobcu.

† Súprava *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit sa nemôže používať s prístrojmi Rotor-Gene Q 2plex.

Dôležité poznámky

Preventívne opatrenia

Používateľ by mal vždy dodržiavať tieto kroky:

- Používajte sterilné špičky pipiet s filtrami.
- Pozitívne materiály (vzorky, pozitívne kontrolné roztoky a amplikóny) skladujte a extrahujte oddelene od všetkých ostatných reagensí a pridávajte ich do reakčnej zmesi v oddelenom priestore.
- Pred začatím testu všetky komponenty dôkladne rozmrazte na izbovú teplotu (15 – 25 °C).
- Po rozmrazení komponenty zmiešajte (opakovaným pipetovaním hore a dole alebo pulzným vírivým miešaním) a krátko vložte do centrifúgy.
- Pracujte rýchlo a komponenty držte na ľade alebo v chladiacom bloku (72/96-jamkový zavádzací blok).

Izolovanie DNA

Súprava EZ1 DSP Virus Kit (QIAGEN, kat. č. 62724*) sa validuje na purifikáciu vírusovej DNA z ľudského MMM na použitie so súpravou *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit. Purifikáciu vírusovej DNA vykonajte v súlade s pokynmi v *príručke k súprave EZ1 DSP Virus Kit*.

ⓘ Súprava *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit by sa nemala používať s izolačnými metódami na báze fenolu.


ⓘ Použitie nosnej RNA je dôležité pre efektívnosť extrakcie a následne pre výťažok DNA. Pridajte vhodné množstvo nosnej RNA do každej extrakcie podľa pokynov v *príručke k súprave EZ1 DSP Virus Kit*.

ⓘ Interný kontrolný roztok súpravy *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit sa môže použiť priamo počas procesu izolácie (pozri „Interný kontrolný roztok“, nižšie).

* Súprava EZ1 DSP Virus Kit je k dispozícii aj ako súprava s označením CE-IVD EASY*artus*® HSV-1/2 RG PCR Kit v kombinácii so súpravou *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit (pozri stranu 32 s informáciami o objednávaní).

Interný kontrolný roztok

Dodáva sa interný kontrolný roztok (HSV-1/2 RG IC). Tá umožňuje používateľovi regulovať proces izolácie DNA aj skontrolovať možnú inhibíciu PCR. Na toto použitie pridajte interný kontrolný roztok do izolácie v pomere 0,1 µl na 1 µl elučného objemu. Napríklad pomocou súpravy EZ1 DSP Virus Kit sa DNA eluuje v 60 µl elučného pufra (AVE). Preto by sa na začiatku malo pridať 6 µl interného kontrolného roztoku.

 Nepridávajte interný kontrolný roztok a nosnú RNA priamo do materiálu vzorky.

Interný kontrolný roztok sa môže voliteľne použiť výhradne na kontrolu nožnej inhibície PCR. V prípade tohto použitia pridajte interný kontrolný roztok priamo do zmesi HSV-1/2 RG Master a HSV-1/2 RG Mg-Sol podľa popisu v krok 2b protokole (strana 18).

Protokol: PCR a analýza údajov

i Dôležité body pred začatím činnosti

- Pred začatím spracovania si prečítajte „Dôležité poznámky“, strana 15.
- Vyhradte si dostatok času a oboznámte sa s prístrojom Rotor-Gene Q pred začatím protokolu. Pozri používateľskú príručku prístroja.
- Uistite sa, že cyklus PCR zahŕňa pozitívne kontrolné roztoky a jeden negatívny kontrolný roztok (voda, stupeň PCR).

Postup, ktorý sa má vykonať pred začatím

- Uistite sa, že chladiaci blok (príslušenstvo prístroja Rotor-Gene Q) je vopred vychladený na 2 – 8 °C.
- Pred každým použitím sa musia všetky reagenty úplne rozmraziť, zmiešať (opakovaným pipetovaním nahor a nadol alebo rýchlym vortexovaním) a nakrátko centrifugovať.

Postup

1. Umiestnite želaný počet skúmaviek PCR do adaptérov chladiaceho bloku.
2. Ak používate interný kontrolný roztok na monitorovanie izolačného procesu DNA a na kontrolu možnej inhibície PCR, postupujte krokom 2a.

Ak používate interný kontrolný roztok len na kontrolu inhibície PCR, postupujte krokom 2b.

Interný kontrolný roztok použite podľa kroku 2b pre všetky pozitívne a negatívne kontrolné roztoky.

- 2a. Interný kontrolný roztok už bola pridaná do izolácie (pozri „Interný kontrolný roztok“, strana 15). V tomto prípade pripravte hlavnú zmes podľa Tabuľka 5.

Reakčná zmes zvyčajne obsahuje všetky komponenty potrebné na PCR okrem vzorky.

Tabuľka 5. Príprava hlavnej zmesi (interný kontrolný roztok použitý na monitorovanie izolácie DNA a na kontrolu inhibície PCR)

Počet vzoriek	1	12
HSV-1/2 RG Master	25 µl	300 µl
HSV-1/2 RG Mg-Sol	5 µl	60 µl
HSV-1/2 RG IC	0 µl	0 µl
Celkový objem	30 µl	360 µl

- 2b. Interný kontrolný roztok sa musí pridať priamo do zmesi HSV-1/2 RG Master a HSV-1/2 RG Mg-Sol. V tomto prípade pripravte hlavnú zmes podľa Tabuľka 6.**

Reakčná zmes zvyčajne obsahuje všetky komponenty potrebné na PCR okrem vzorky.

Tabuľka 6. Príprava hlavnej zmesi (interný kontrolný roztok použitý len na kontrolu inhibície PCR)

Počet vzoriek	1	12
HSV-1/2 RG Master	25 µl	300 µl
HSV-1/2 RG Mg-Sol	5 µl	60 µl
HSV-1/2 RG IC	2 µl	24 µl
Celkový objem	32 µl*	384 µl*

* Zväčšenie objemu spôsobené pridaním interného kontrolného roztoku sa pri príprave PCR testu zanedbá. Senzitivita detekčného systému sa tým nezníži.

- 3. Napipetujte 30 µl hlavnej zmesi do každej PCR skúmavky. Potom pridajte 20 µl eluovanej DNA vzorky (pozri Tabuľka 7) a zmes dobre pomiešajte opakovaným pipetovaním nahor a nadol. Zodpovedajúco sa musí použiť 20 µl HSV-1 RG PC a HSV-2 RG PC ako pozitívne kontrolné roztoky a 20 µl vody (voda, stupeň PCR) ako negatívny kontrolný roztok.**

Tabuľka 7. Príprava PCR testu

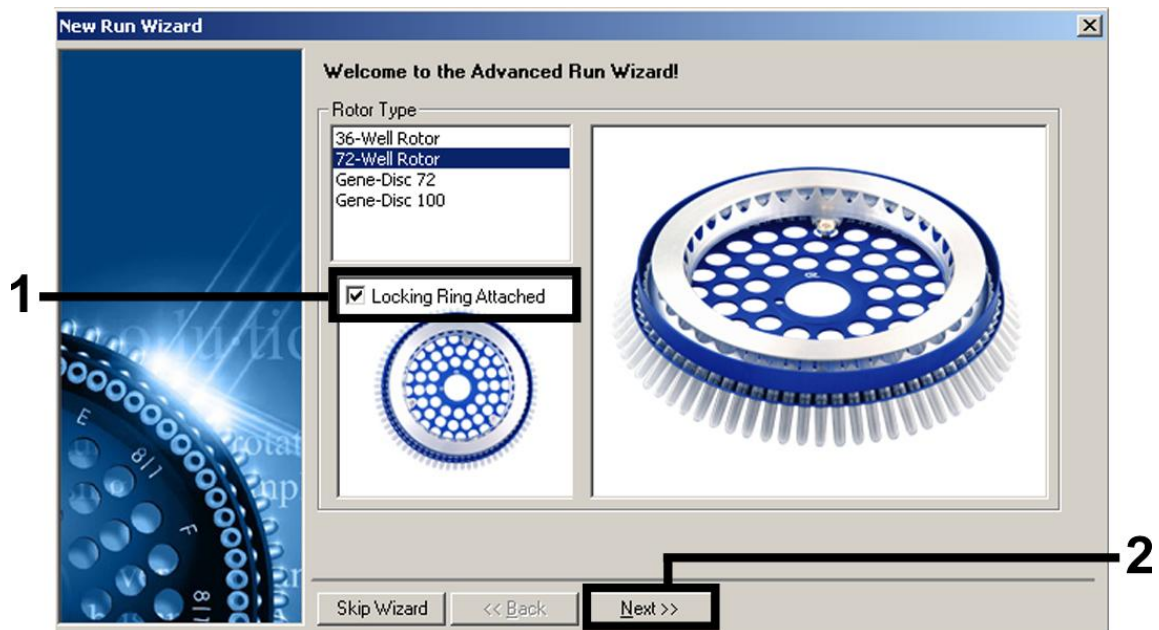
Počet vzoriek	1	12
Hlavná zmes	30 µl	30 µl každá
Vzorka	20 µl	20 µl každá
Celkový objem	50 µl	50 µl každá

4. **Zatvorte PCR skúmavky. Uistite sa, že poistný krúžok (príslušenstvo prístroja Rotor-Gene) je umiestnený na vrchu rotora, aby sa zabránilo náhodnému otvoreniu skúmaviek počas cyklu.**
5. **Na detekciu DNA vírusu HSV-1 alebo DNA vírusu HSV-2 vytvorte teplotný profil podľa nasledujúcich krokov.**

Nastavenie všeobecných parametrov testu	Obrázky 3, 4, 5
Prvotná aktivácia enzýmu hot-start	Obrázok 6
Amplifikácia DNA	Obrázok 7
Nastavenie citlivosti fluorescenčného kanála	Obrázok 8
Spustenie cyklu	Obrázok 9

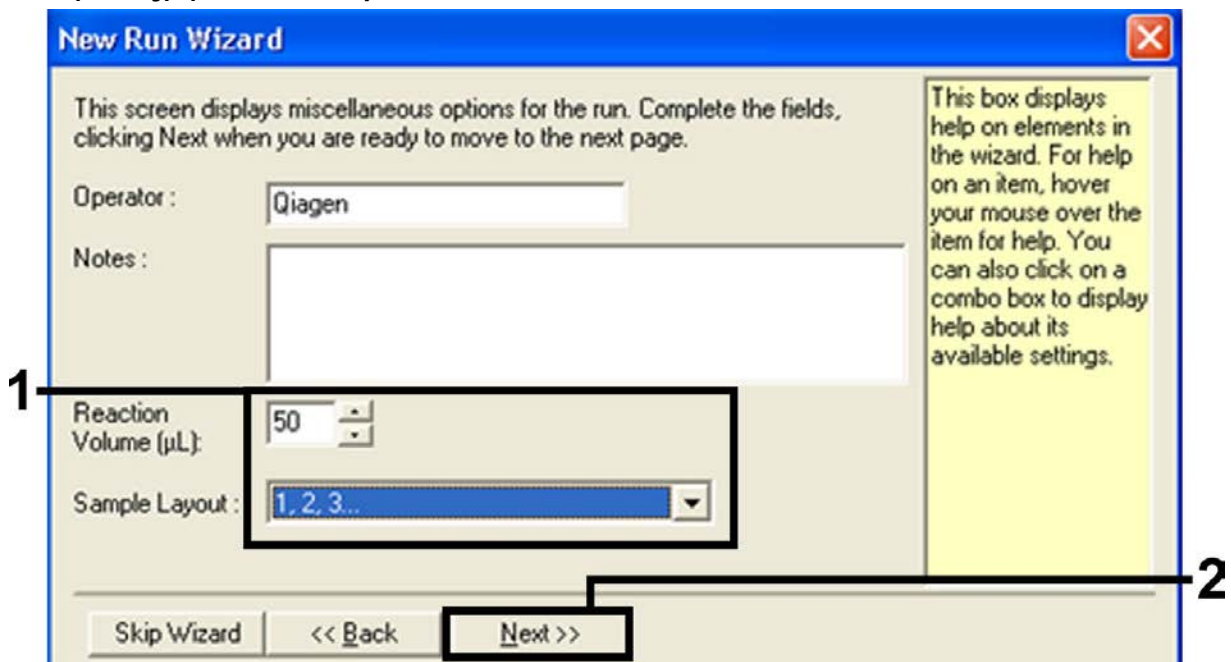
Všetky špecifikácie odkazujú na verzie softvéru Rotor-Gene Q 1.7.94 a vyššie, verzie softvéru Rotor-Gene 6000 1.7.65 a vyššie. Ďalšie informácie o programovaní prístrojov Rotor-Gene nájdete v používateľskej príručke prístroja. Na ilustráciách sú tieto nastavenia softvéru orámované čiernou tučnou farbou. Ilustrácie sú zahrnuté pre prístroje Rotor-Gene Q.

6. Najprv otvorte dialógové okno „New Run Wizard“ (Sprievodca novým cyklom) s verziou „Advanced“ (Pokročilý) (Obrázok 3). Skontrolujte pole „Locking Ring Attached“ (Tesniaci krúžok pripevnený) a kliknite na „Next“ (Ďalej).



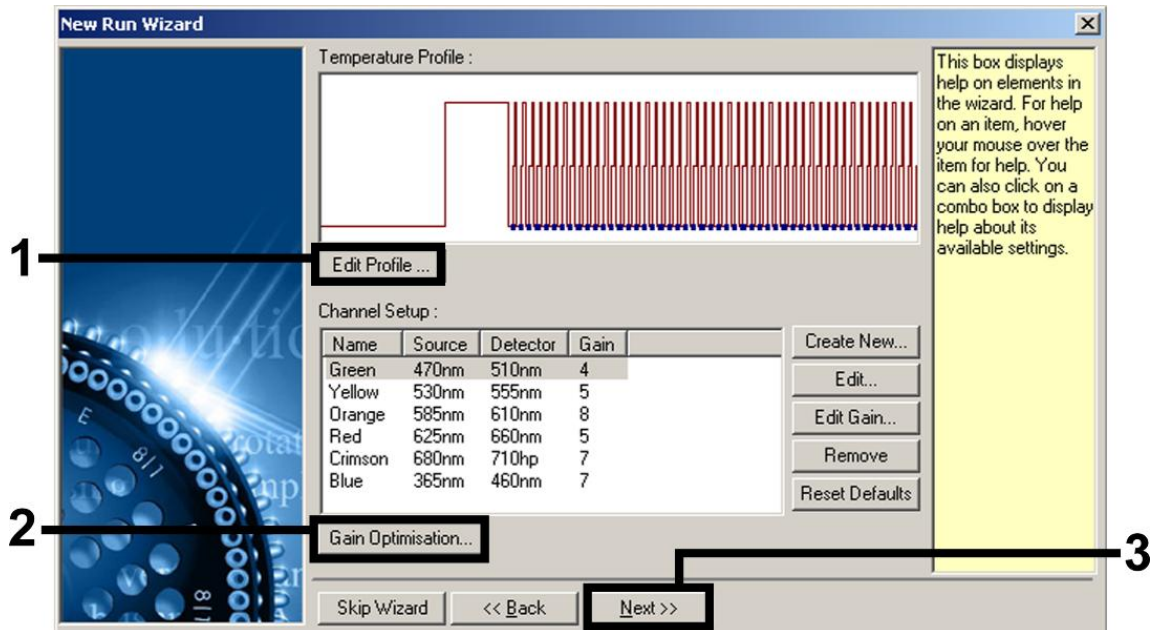
Obrázok 3. Dialógové okno „New Run Wizard“ (Sprievodca novým cyklom).

7. Vyberte hodnotu 50 pre PCR reakčný objem a kliknite na „Next“ (Ďalej) (Obrázok 4).

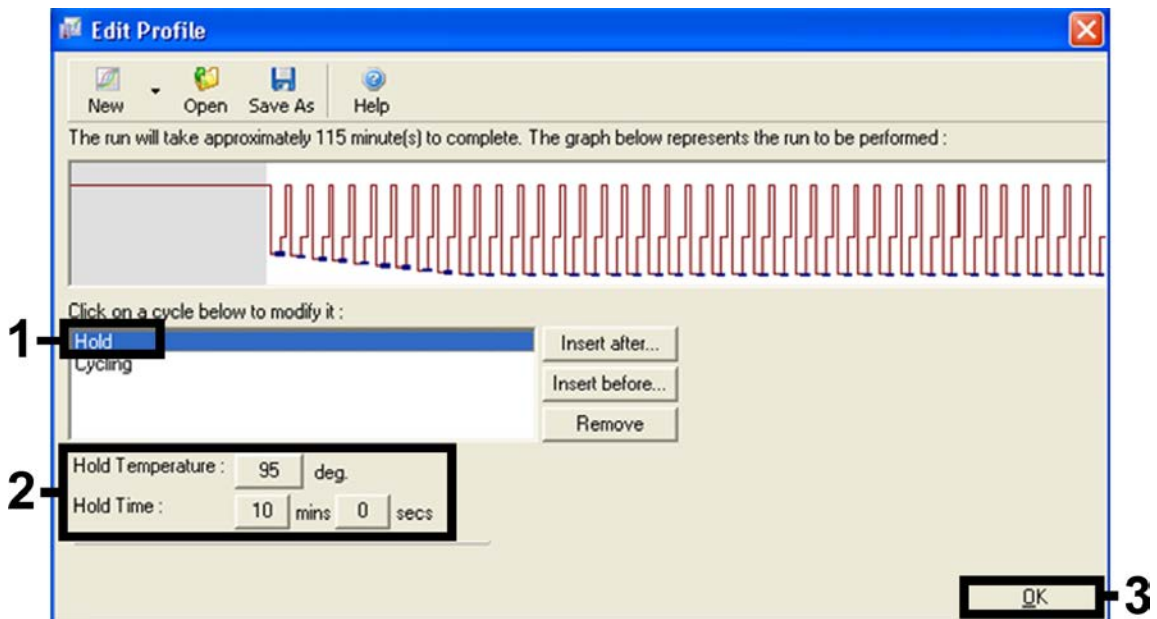


Obrázok 4. Nastavenie všeobecných parametrov testu.

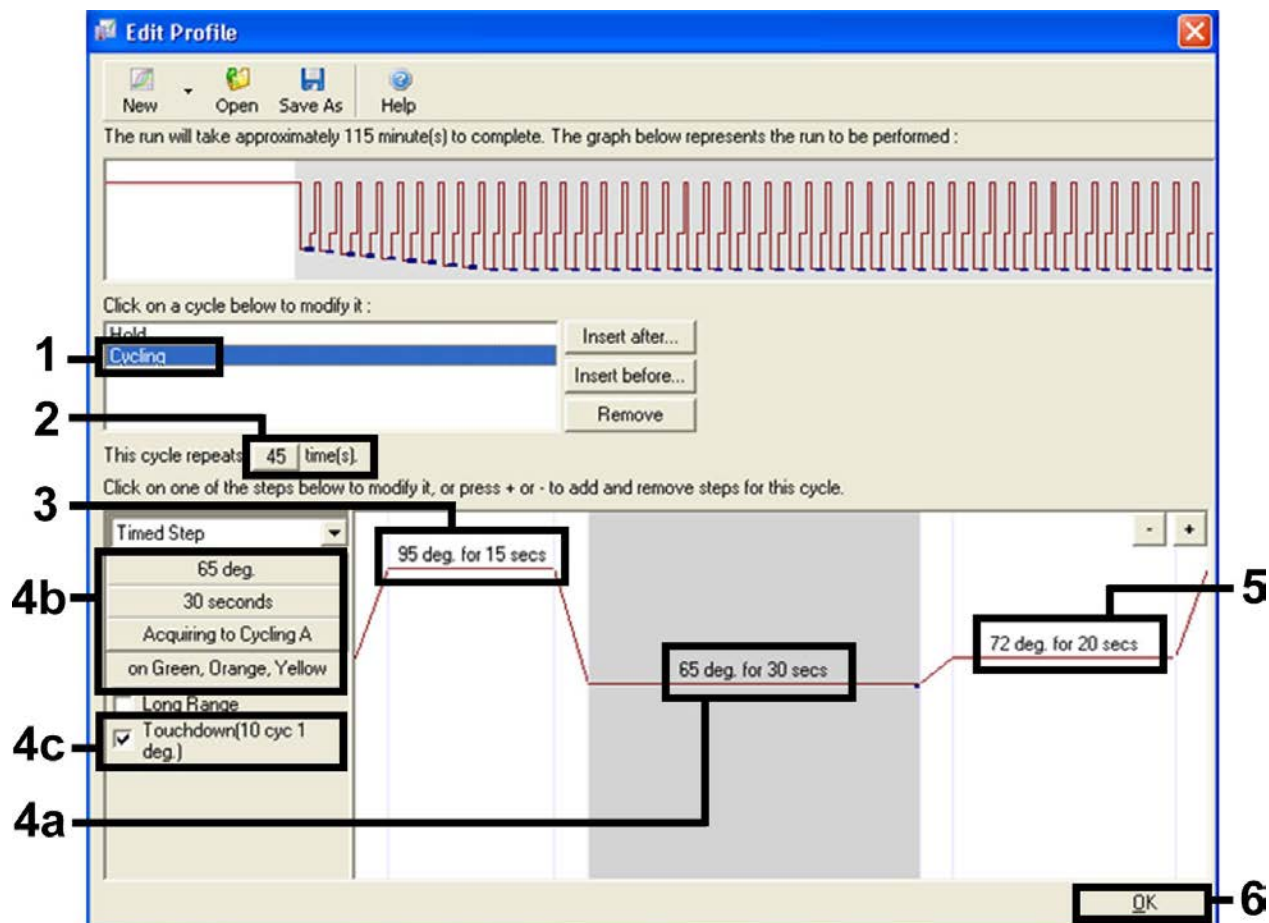
8. Kliknite na tlačidlo „Edit Profile“ (Upraviť profil) v dialógovom okne „New Run Wizard“ (Sprievodca novým cyklom) (Obrázok 5) a naprogramujte teplotný profil, ako je zobrazené na obrázkoch 6–7.



Obrázok 5. Úprava profilu.

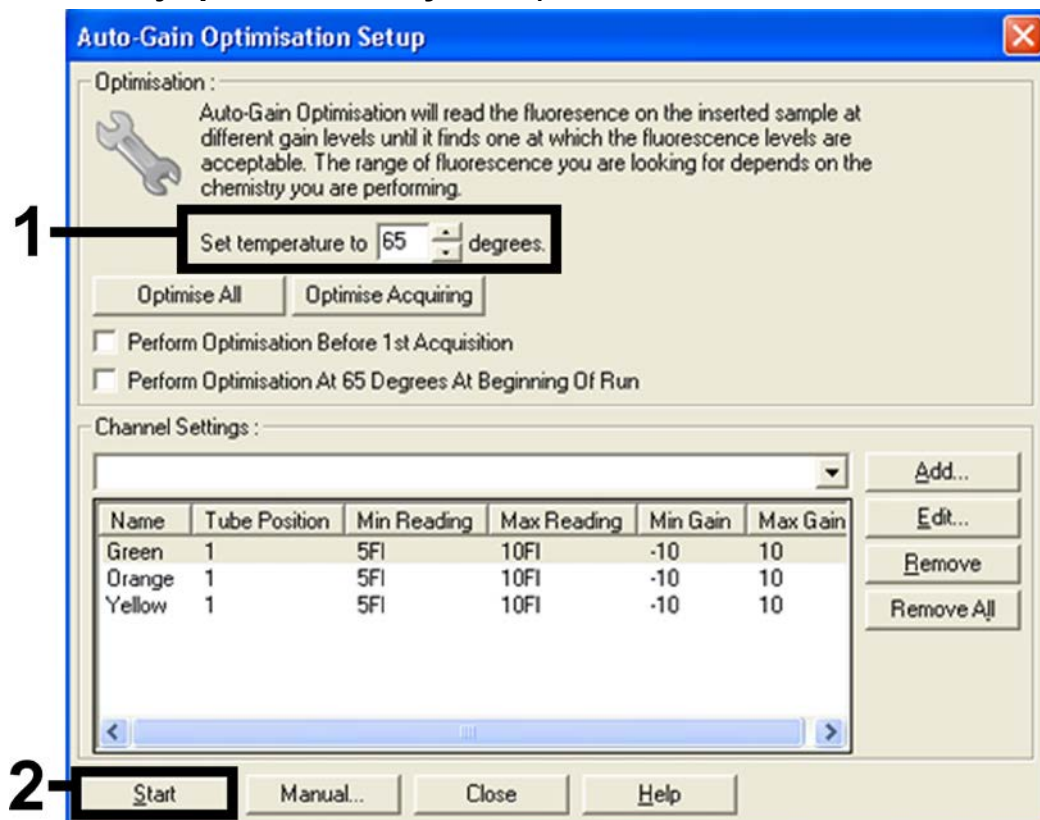


Obrázok 6. Prvotná aktivácia enzýmu hot-start.



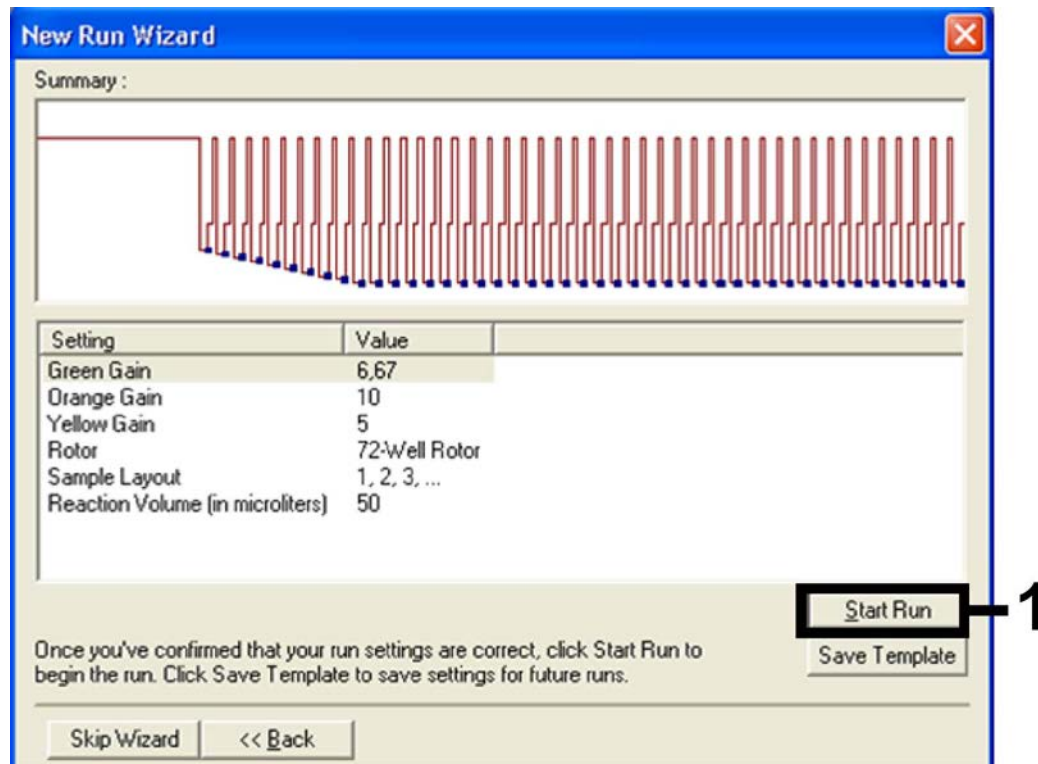
Obrázok 7. Amplifikácia DNA. Nezabudnite aktivovať funkciu dosadnutia pre 10 cyklov v temperovacom kroku.

9. Detekčný rozsah fluorescenčných kanálov sa musí určiť podľa intenzity fluorescence v skúmavkách PCR. Kliknutím na „Gain Optimisation“ (Získať optimalizáciu) v dialógovom okne „New Run Wizard“ (Sprievodca novým cyklom) (pozri krok 2) otvoríte dialógové okno „Auto-Gain Optimisation Setup“ (Nastavenie automatickej optimalizácie výťažku) (Obrázok 8). Kalibračnú teplotu nastavte na hodnotu 65, aby sa zhodovala s teplotou temperovania amplifikačného programu (Obrázok 7, krok 4b). Overte, či sú pre možnosť „Auto-Gain Optimisation“ (Nastavenie automatickej optimalizácie výťažku) zvolené všetky tri kanály (Green, Orange a Yellow). (Kanály nájdite v rozbaľovacej ponuke v časti „Channel Settings“ (Nastavenia kanálov) a potom kliknite na „Add“ (Pridať).) Kliknite na „Start“ (Spustiť) a začnite optimalizáciu výťažku. Po dokončení kalibrácie výťažku kliknite na „Close“ (Zatvoriť) v dialógovom okne „Auto-Gain Optimisation Setup“ (Nastavenie automatickej optimalizácie výťažku).



Obrázok 8. Nastavenie citlivosti fluorescenčného kanála.

10. Hodnoty navýšenia stanovené kalibráciou kanálov sa automaticky uložia a sú uvedené v poslednom okne ponuky postupu programovania (Obrázok 9). Kliknite na „Start Run“ (Spustiť cyklus).



Obrázok 9. Spustenie cyklu.

11. Po dokončení cyklu údaje zanalyzujte. Sú možné tieto výsledky (11a, 11b, 11c, 11d, 11e a 11f).

Príklady pozitívnych a negatívnych PCR reakcií sú uvedené na obrázku Obrázok 10, Obrázok 11 a Obrázok 12.

- 11a. Vo fluorescenčnom kanáli farbiva Cycling Green sa zistí signál. Výsledok analýzy je pozitívny: vzorka obsahuje DNA HSV-1.

V tomto prípade je detekcia signálu vo kanáli farbiva Cycling Yellow nahraditeľná, pretože vysoké prvotné koncentrácie DNA HSV-1 (pozitívny signál v kanáli Cycling Green) môžu viesť k zníženému alebo absentujúcemu fluorescenčnému signálu interného kontrolného roztoku v kanáli Cycling Yellow (konkurencia).

- 11b. Vo fluorescenčnom kanáli Cycling Green sa nedeteguje žiadny signál. Zároveň sa signál z interného kontrolného roztoku objaví v kanáli Cycling Yellow. Vo vzorke nie je možné detegovať žiadnu DNA HSV-1. Môže sa považovať za negatívnu.

V prípade negatívneho testu HSV-1 PCR vylučuje detegovaný signál interného kontrolného roztoku možnosť inhibície PCR.

11c. Vo fluorescenčnom kanáli farbiva Cycling Orange sa zistí signál. Výsledok analýzy je pozitívny: vzorka obsahuje DNA HSV-2.

V tomto prípade je detekcia signálu vo kanáli farbiva Cycling Yellow nahraditeľná, pretože vysoké prvotné koncentrácie DNA HSV-2 (pozitívny signál v kanáli Cycling Orange) môžu viesť k zníženému alebo absentujúcemu fluorescenčnému signálu interného kontrolného roztoku v kanáli Cycling Yellow (konkurencia).

11d. Vo fluorescenčnom kanáli Cycling Orange sa nedeteguje žiadny signál. Zároveň sa signál z interného kontrolného roztoku objaví v kanáli Cycling Yellow.

Vo vzorke nie je možné detegovať žiadnu DNA HSV-2. Môže sa považovať za HSV-2 negatívnu.

V prípade negatívneho testu HSV-2 PCR vylučuje detegovaný signál interného kontrolného roztoku možnosť inhibície PCR.

11e. V kanáli Cycling Green a Cycling Orange sa zistil signál.

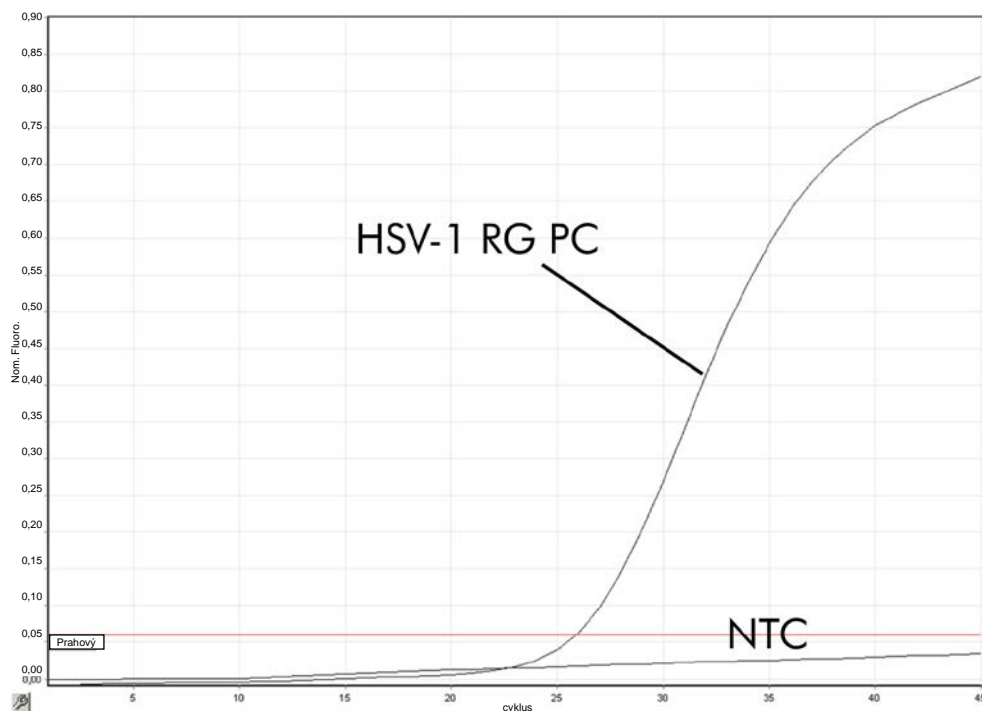
Výsledok analýzy je pozitívny: vzorka obsahuje DNA HSV-1, ako aj DNA HSV-2.

V tomto prípade je detekcia signálu vo kanáli farbiva Cycling Yellow nahraditeľná, pretože vysoké prvotné koncentrácie DNA HSV-1 aj HSV-2 (pozitívny signál v kanáloch Cycling Green a Cycling Orange) môžu viesť k zníženému alebo absentujúcemu fluorescenčnému signálu interného kontrolného roztoku v kanáli Cycling Yellow (konkurencia).

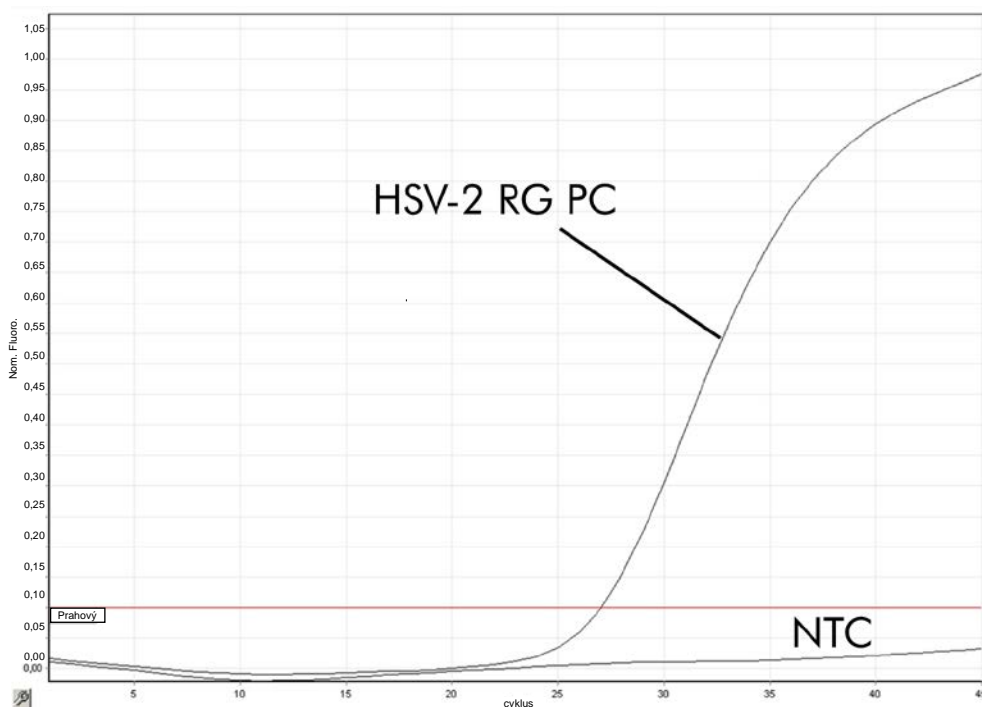
11f. V kanáli Cycling Green, Cycling Orange alebo Cycling Yellow sa nezistil žiadny signál.

Nie je možné vyvodit' žiadny výsledok.

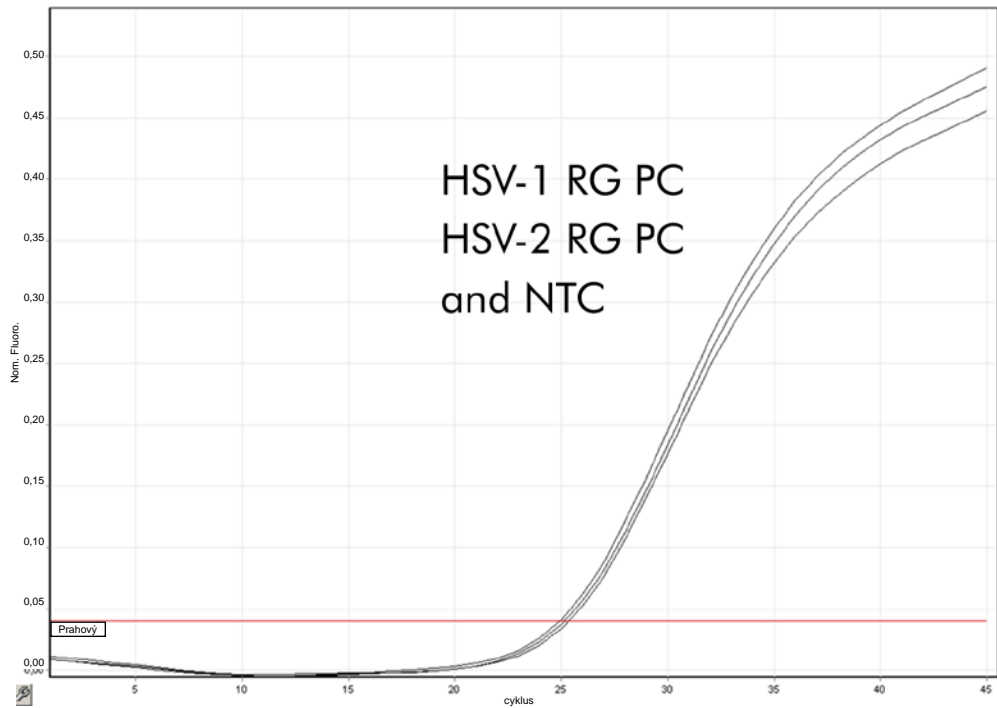
Informácie týkajúce sa zdrojov chýb a ich riešení nájdete v časti „Sprievodca riešením problémov“, strana 28.



Obrázok 10. Detekcia pozitívneho kontrolného roztoku HSV-1 (HSV-1 RG PC) vo fluorescenčnom kanáli Cycling Green. NTC: Beztemplátový kontrolný roztok (negatívny kontrolný roztok).



Obrázok 11. Detekcia pozitívneho kontrolného roztoku HSV-2 (HSV-2 RG PC) vo fluorescenčnom kanáli Cycling Orange. NTC: Beztemplátový kontrolný roztok (negatívny kontrolný roztok).








Obrázok 12. Detekcia interného kontrolného roztoku (IKR) vo fluorescenčnom kanáli Cycling Yellow so súčasťou amplifikáciou pozitívnych kontrolných roztokov (HSV-1 RG PC and HSV-2 RG PC). NTC: Beztemplátový kontrolný roztok (negatívny kontrolný roztok).

Sprievodca riešením problémov

Tento sprievodca riešením problémov môže byť užitočný pri riešení akýchkoľvek problémov, ktoré môžu nastať. Viac informácií nájdete aj na stránke Často kladené otázky v našom stredisku technickej podpory: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vedci v technických službách QIAGEN vám vždy radi zodpovedajú všetky otázky týkajúce sa informácií a protokolov v tejto príručke alebo technológií vzoriek a testov (kontaktné informácie nájdete na zadnej strane alebo na lokalite www.qiagen.com).






Komentáre a návrhy

Žiadny signál s pozitívnymi kontrolnými roztokmi (HSV-1 RG PC and HSV-2 RG PC) vo fluorescenčnom kanáli Cycling Green alebo Cycling Orange

- a) Vybraný fluorescenčný kanál na analýzu PCR údajov nie je v súlade s protokolom  Na analýzu údajov vyberte fluorescenčný kanál Cycling Green a Cycling Orange pre analytický test HSV-1/2 PCR a fluorescenčný kanál Cycling Yellow pre PCR interného kontrolného roztoku.
- b) Nesprávne naprogramovanie teplotného profilu prístroja Rotor-Gene  Porovnajte teplotný profil s protokolom. Pozri časť „Protokol: PCR a analýza údajov“, strana 17.
- c) Nesprávna konfigurácia PCR  Skontrolujte svoje pracovné kroky pomocou pipetovacej schémy a PCR v prípade potreby zopakujte. Pozri časť „Protokol: PCR a analýza údajov“, strana 17.
- d) Podmienky skladovania jedného alebo viacerých komponentov súpravy nespĺňajú pokyny uvedené v časti „Skladovanie“ (strana 5)  Skontrolujte podmienky skladovania a dátum expirácie (pozri štítok súpravy) reagensov a v prípade potreby použite novú súpravu.
- e) Súprava *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit exspirovala  Skontrolujte podmienky skladovania a dátum expirácie (pozri štítok súpravy) reagensov a v prípade potreby použite novú súpravu.

Komentáre a návrhy

Slabý alebo žiadny signál interného kontrolného roztoku negatívnej vzorky MMM, ktorá bola vystavená purifikácii pomocou súpravy EZ1 DSP Virus Kit vo fluorescenčnom kanáli Cycling Yellow a súčasná absencia signálu v kanáli Cycling Green alebo Cycling Orange

- a) Podmienky PCR nie sú v súlade s protokolom  Skontrolujte podmienky PCR (pozri vyššie) a v prípade potreby PCR zopakujte so správnymi nastaveniami.
- b) PCR bolo inhibované  Uistite sa, že použijete odporúčaný spôsob izolovania a postupujte presne podľa pokynov výrobcu.
- c) Počas extrakcie sa stratila DNA  Ak sa do extrakcie pridal interný kontrolný roztok, absentujúci signál interného kontrolného roztoku môže znamenať stratu DNA počas extrakcie. Uistite sa, že použijete odporúčaný spôsob izolovania (pozri časť „Izolovanie DNA“, strana 15) a postupujte presne podľa pokynov výrobcu.
- d) Podmienky skladovania jedného alebo viacerých komponentov súpravy nespĺňajú pokyny uvedené v časti „Skladovanie“ (strana 5)  Skontrolujte podmienky skladovania a dátum expirácie (pozri štítok súpravy) reagensov a v prípade potreby použite novú súpravu.
- e) Súprava *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit exspirovala  Skontrolujte podmienky skladovania a dátum expirácie (pozri štítok súpravy) reagensov a v prípade potreby použite novú súpravu.

Komentáre a návrhy

Signály s negatívnymi kontrolnými roztokmi vo fluorescenčnom kanáli Cycling Green alebo Cycling Orange analytickej PCR

- a) Počas prípravy PCR došlo ku kontaminácii
- ① Zopakujte PCR s novými reagensiami v kópiách.
 - ① Ak je to možné, zatvorte PCR skúmavky hneď po pridaní vzorky na testovanie.
 - ① Pozitívny kontrolný roztok napipetujte ako poslednú.
 - ① Zabezpečte, aby sa pracovný priestor a prístroje v pravidelných intervaloch dekontaminovali.
- b) Počas extrakcie došlo ku kontaminácii
- ① Zopakujte extrakciu a PCR vzorky na testovanie pomocou nových reagensí.
 - ① Zabezpečte, aby sa pracovný priestor a prístroje v pravidelných intervaloch dekontaminovali.

Referenčná literatúra

Spoločnosť QIAGEN vedie rozsiahlu aktuálnu on-line databázu vedeckých publikácií využívajúcich produkty QIAGEN. Komplexné možnosti vyhľadávania umožnia nájsť potrebné články, a to buď jednoduchým vyhľadávaním podľa kľúčových slov, alebo zadaním aplikácie, oblasti výskumu, názvu atď.

Úplný zoznam referenčnej literatúry nájdete v on-line Referenčnej databáze QIAGEN na stránke www.qiagen.com/RefDB/search.asp, prípadne kontaktujte technické služby spoločnosti QIAGEN alebo svojho miestneho distribútora.

Informácie o objednávaní

Produkt	Obsah	Kat. č.
<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (24)	Pre 24 reakcií: Zmes master, roztok Mg, 2 pozitívne kontrolné roztoky, interný kontrolný roztok, voda (stupeň PCR)	4500263
<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (96)	Pre 96 reakcií: Zmes master, roztok Mg, 2 pozitívne kontrolné roztoky, interný kontrolný roztok, voda (stupeň PCR)	4500265
Súprava EZ1 DSP Virus Kit – na purifikáciu vírusových nukleových kyselín z ľudského MMM na účely in vitro diagnostiky		
EZ1 DSP Virus Kit	Na prípravu 48 virálnych nukleových kyselín: Vopred naplnené reagenčné kazety, jednorazové držiaky špičiek, jednorazové filtračné špičky, skúmavky na vzorky, elučné skúmavky, pufre, nosná RNA	62724
Súpravy EASY<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kits – na integrovanú automatizovanú purifikáciu vzorky v úplnom súlade s CE-IVD a detekciu patogénov		
EASY <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit 1	Na prípravu 48 virálnych nukleových kyselín a 24 testov: 1 x súprava EZ1 DSP Virus Kit, 1 súprava x <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (24)	EA10023
EASY <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit 2	Na prípravu 48 virálnych nukleových kyselín a 48 testov: 1 x súprava EZ1 DSP Virus Kit, 2 súprava x <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (24)	EA10024
Rotor-Gene Q a príslušenstvo		
Rotor-Gene Q 5plex HRM	Real-time PCR cyklovač a vysokorozlišovací analyzátor kriviek topenia s 5 kanálmi (zelená, žltá, oranžová, červená, karmínová) plus kanál HRM, prenosný počítač, softvér, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu	Na otázku

Produkt	Obsah	Kat. č.
Loading Block 72 x 0,1 ml Tubes	Hliníkový blok na manuálnu prípravu reakcie s jednokanálovou pipetou do skúmaviek 72 x 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0,2 ml Tubes	Hliníkový blok na manuálnu prípravu reakcie v štandardnom teste 8 x 12 pomocou skúmaviek 96 x 0,2 ml	9018905
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250)	250 pášikov so 4 skúmavkami a uzávermi na 1000 reakcií	981103
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2500)	10 x 250 pášikov so 4 skúmavkami a uzávermi na 10 000 reakcií	981106
PCR Tubes, 0,2 ml (1000)	1000 tenkostenných skúmaviek na 1000 reakcií	981005
PCR Tubes, 0,2 ml (10000)	10 x 1000 tenkostenných skúmaviek na 1000 reakcií	981008

Aktuálne licenčné informácie a právne informácie týkajúce sa produktu nájdete v sprievodcovi alebo používateľskej príručke k súprave QIAGEN. Sprievodcov a používateľské príručky k súpravám QIAGEN nájdete na lokalite www.qiagen.com, alebo o ne môžete požiadať oddelenie technických služieb spoločnosti QIAGEN alebo svojho miestneho distribútora.

Táto strana je zámerne prázdna

Táto strana je zámerne prázdna

Nákup tohto výrobku umožňuje kupujúcemu používať výrobok na vykonávanie diagnostických krokov pre ľudskú in vitro diagnostiku. Týmto nie je priznaný žiadny všeobecný patent alebo iné oprávnenie žiadneho druhu ako toto konkrétne právo na používanie vyplývajúce z nákupu.

Ochranné známky: QIAGEN®, *artus*®, EZ1®, EASY*artus*®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group).

Súprava *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit a EZ1 DSP Virus Kit sú diagnostické súpravy s označením CE podľa smernice EÚ 98/79/ES o diagnostických medicínskych pomôckach in vitro. Nie sú dostupné vo všetkých krajinách.

Obmedzená licenčná zmluva

Použitie tohto produktu predstavuje súhlas kupujúceho alebo používateľa súpravy *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit s nasledovnými podmienkami:

1. Súprava *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit môže byť použitá výlučne v súlade s príručkou k súprave *artus HSV-1/2 RG PCR Kit* a iba s komponentmi obsiahnutými v tejto súprave. Spoločnosť QIAGEN neudeľuje žiadnu licenciu v rámci žiadneho zo svojich práv na ochranu duševného vlastníctva na používanie alebo spájanie komponentov tejto súpravy so žiadnymi komponentmi, ktoré netvoria súčasť tejto súpravy, s výnimkou ustanovení uvádzaných v príručke k súprave *artus HSV-1/2 RG PCR Kit* a v ďalších protokoloch, ktoré sú dostupné na adrese www.qiagen.com.
2. Iné než výslovne uvedené licencie – spoločnosť QIAGEN neposkytuje žiadnu záruku na to, že táto súprava a/alebo jej použitie neporuší práva tretích strán.
3. Táto súprava a jej komponenty sú licenčne poskytnuté na jednorazové použitie a nesmú sa opätovne používať, opravovať ani predávať.
4. Spoločnosť QIAGEN sa špecificky zrieka všetkých ostatných (výslovných alebo implicitných) licencií než tých, ktoré sú tu výslovne uvedené.
5. Kupujúci a používateľ tejto súpravy súhlasia s tým, že iným osobám neumožnia ani nepovolia vykonať žiadne kroky, ktoré by mohli viesť k akýmkoľvek činnostiam, ktoré sú zakázané vyššie, alebo k nim napomáhať. Spoločnosť QIAGEN môže uplatňovať príslušné zákazy uvádzané v tejto obmedzenej licenčnej zmluve pred akýmkoľvek súdom a bude požadovať všetky náklady na vyšetrovanie a súdne konania (vrátane nákladov na právne zastupovanie) pri každom takomto kroku s cieľom uplatniť ustanovenia tejto obmedzenej licenčnej zmluvy alebo práv duševného vlastníctva súvisiacich so súpravou a/alebo jej komponentmi.

Aktualizované licenčné podmienky nájdete na www.qiagen.com.

© 2009 – 2014 QIAGEN, všetky práva vyhradené.

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 55-11-5079-4000 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

China ■ Orders 800-988-0326 ■ Fax 800-988-0329 ■ 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

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 02-33430-4826 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7290 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 1544 7146 ■ Technical 1544 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 +65-68548184 ■ Technical 1800-742-4368

Spain ■ Orders +34-91-630-7050 ■ Fax +34-91-630-5145 ■ Technical +34-91-630-7050

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

