

# Príručka pre súpravu *artus*<sup>®</sup> BK Virus RG PCR Kit



24 (katalógové č. 4514263)



96 (katalógové č. 4514265)

Verzia 1



Kvantitatívna in vitro diagnostika

Na použitie s prístrojmi Rotor-Gene<sup>®</sup> Q



4514263, 4514265



1056823SK



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden. NEMECKO

R4

MAT

1056823SK



## **Technológie pre vzorky a testy QIAGEN**

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 microRNA 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](http://www.qiagen.com).

# Obsah

<b>Účel použitia</b>	<b>4</b>
<b>Súhrn a vysvetlenie</b>	<b>4</b>
Informácie o patogéne	4
Princíp postupu	5
<b>Dodávané materiály</b>	<b>5</b>
Obsah súpravy	5
<b>Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú</b>	<b>6</b>
<b>Varovania a preventívne opatrenia</b>	<b>6</b>
Preventívne opatrenia	7
<b>Skladovanie a manipulácia s reagensiami</b>	<b>7</b>
<b>Postup</b>	<b>8</b>
Izolovanie DNA	8
Interný kontrolný roztok	8
Protokol: PCR a analýza údajov	10
<b>Interpretácia výsledkov</b>	<b>16</b>
Kvantifikácia	16
Výsledky	17
Sprievodca riešením problémov	18
<b>Kontrola kvality</b>	<b>20</b>
<b>Obmedzenia</b>	<b>20</b>
<b>Charakteristiky účinnosti</b>	<b>21</b>
Analytická senzitivita	21
Špecificita	21
Presnosť	23
Robustnosť	24
Reprodukovateľnosť	25
Diagnostické vyhodnotenie	25
<b>Referenčná literatúra</b>	<b>25</b>
<b>Symboly</b>	<b>25</b>
<b>Kontaktné informácie</b>	<b>26</b>
<b>Informácie o objednávaní</b>	<b>27</b>

## Účel použitia

Súprava *artus* BK Virus PCR Kit je amplifikačný test nukleovej kyseliny používaný in vitro na kvantitatívne vyjadrenie DNA vírusu BK v ľudskej plazme alebo moči. Táto súprava diagnostického testu využíva polymerázovú reťazovú reakcie (Polymerase Chain Reaction, PCR) a je nakonfigurovaná na použitie s prístrojmi Rotor-Gene Q.

**Poznámka:** Súprava *artus* BK Virus RG PCR Kit sa nemôže používať s prístrojmi Rotor-Gene Q 2plex.

## Súhrn a vysvetlenie

Súprava *artus* BK Virus RG PCR Kit sa skladá zo systému pripraveného na použitie na detegovanie DNA vírusu BK pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) na prístrojoch Rotor-Gene Q Instruments. BK Virus RG Master obsahuje reagenty a enzýmy na špecifickú amplifikáciu regiónu 274 bp vírusu BK a na priamu detekciu špecifického amplikónu vo fluorescenčnom kanáli Cycling Green prístroja Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q alebo Rotor-Gene 6000.

Okrem toho obsahuje súprava *artus* BK Virus RG PCR Kit druhý heterológny amplifikačný systém na identifikovanie možnej inhibície PCR. Tá sa deteguje ako interný kontrolný roztok (IKR) vo fluorescenčnom kanáli Cycling Orange prístroja Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q alebo Rotor-Gene 6000. Detekčný limit analytickej BK Virus PCR (pozri „Analytická senzitivita“, strana 21) sa neznižuje. Dodávajú sa externé pozitívne kontrolné roztoky (RG QS 1–4 vírusu BK), ktoré umožňujú zistenie množstva vírusovej DNA. Ďalšie informácie nájdete v časti „Interpretácia výsledkov“, strana 16.

## Informácie o patogéne

Vírus BK (BKV) je DNA vírus, ktorý patrí k polyomavírusom. K primárnej infekcii dochádza hlavne v detstve a zvyčajne je asymptomatická. Seroprevalencia u dospelých je do 90 %. Po primárnej infekcii zostáva BKV v bunkách obličiek a môže sa reaktivovať pri stavoch imunodeficiencie, ako je napríklad transplantácia.

Infekciu BKV je možné spojiť s tubulointersticiálnou nefritídou a zúžením močovodu u príjemcov transplantátu obličky, ako aj hemoragickou cystitídou u príjemcov transplantátu kostnej drene. Zistila sa aj súvislosť so vzormi ochorenia pri vaskulopatii, pneumonitíde, encefalitíde, retinitíde a dokonca multiorgánovom zlyhávaní.


Neustála replikácia BKV na vysokej úrovni je typickou charakteristikou nefropatie spojennej s polyomavírusom (PAN) u pacientov s transplantovanou obličkou. Klinicky relevantné infekcie sa väčšinou vyskytujú u imunosuprimovaných jednotlivcov.

## Princíp postupu

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.\*

## Dodávané materiály

### Obsah súpravy

<i>artus BK Virus RG PCR Kit</i>		(24)	(96)
Katalógové č.		4514263	4514265
Počet reakcií		24	96
Modrý	BK Virus RG Master	2 x 12 reakcií	8 x 12 reakcií
Yellow	BK Virus RG Mg-Sol <sup>†</sup>	<b>Mg-Sol</b> 400 µl	400 µl
Red	BK Virus RG QS 1 <sup>‡</sup> (1 x 10 <sup>4</sup> kópií/µl)	<b>QS</b> 200 µl	200 µl
Red	BK Virus RG QS2 <sup>‡</sup> (1 x 10 <sup>3</sup> kópií/µl)	<b>QS</b> 200 µl	200 µl
Red	BK Virus RG QS3 <sup>‡</sup> (1 x 10 <sup>2</sup> kópií/µl)	<b>QS</b> 200 µl	200 µl
Red	BK Virus RG QS4 <sup>‡</sup> (1 x 10 <sup>1</sup> kópií/µl)	<b>QS</b> 200 µl	200 µl
Green	BK Virus RG IC <sup>§</sup>	<b>IC</b> 1000 µl	2 x 1000 µl
Biela	Voda (stupeň PCR)	1000 µl	1000 µl
	Príručka	 1	1

<sup>†</sup> Roztok magnézia.

<sup>‡</sup> Kvantifikačný štandard.

<sup>§</sup> Interný kontrolný roztok.

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

## Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú

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.

### Reagencie

- Súprava na izoláciu DNA (pozri „Izolovanie DNA“, strana 8)

### Spotrebný materiál

- Sterilné špičky pipiet s filtrami
- 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)

### Zariadenie

- Pipety (nastaviteľné)\*
- Vírivý mixér\*
- Stolná centrifúga\* s rotorom na reakčné skúmavky s objemom 2 ml
- Prístroj Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q alebo Rotor-Gene Instrument\*\*† s fluorescenčnými kanálmi pre farbivá Cycling Green a Cycling Orange
- Verzia softvéru 1.7.94 alebo vyššia prístroja Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q (verzia softvéru 1.7.65 prístroja Rotor-Gene 6000)
- 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)

## Varovania a preventívne opatrenia

Na diagnostické použitie in vitro

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](http://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.

\* Overté, či boli prístroje skontrolované a kalibrované podľa odporúčaní výrobcu.

† Súprava *artus* BK Virus RG PCR Kit sa nemôže používať s prístrojmi Rotor-Gene Q 2plex.

## 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).

## Skladovanie a manipulácia s reagensiami

Komponenty súpravy *artus* BK Virus 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 reagensie nepoužívajú nepretržite, mali by sa zamraziť v alikvótach. Skladovanie pri teplote 2 – 8 °C by nemalo byť dlhšie ako 5 hodín.

# Postup

## Izolovanie DNA

Súprava EZ1 DSP Virus Kit (QIAGEN, kat. č. 62724)\* sa validuje na purifikáciu vírusovej nukleovej kyseliny z ľudskej plazmy alebo moču na použitie so súpravou *artus* BK Virus RG PCR Kit. Purifikáciu vírusovej DNA vykonajte podľa pokynov v *príručke k súprave EZ1 DSP Virus Kit* so štandardnou veľkosťou vzorky 400  $\mu$ l.

**Poznámka:** Súprava *artus* BK Virus RG PCR Kit by sa nemala používať s izolačnými metódami na báze fenolu.

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

**Poznámka:** Interný kontrolný roztok súpravy *artus* BK Virus RG PCR Kit sa môže použiť priamo počas procesu izolácie (pozri „Interný kontrolný roztok“ strana 8).

**Poznámka:** Dôrazne odporúčame použiť purifikované vírusové nukleové kyseliny na PCR ihneď po extrakcii pomocou súpravy EZ1 DSP Virus Kit. Prípadne je možné eluáty pred PCR analýzou uskladniť na 3 dni pri teplote 4 °C.

## Interný kontrolný roztok

Dodáva sa interný kontrolný roztok (BK Virus 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  $\mu$ l na 1  $\mu$ l elučného objemu. Napríklad pomocou súpravy EZ1 DSP Virus Kit, ak sa virálne nukleové kyseliny eluujú v 60  $\mu$ l elučného pufru (AVE), potom by sa na začiatku malo pridať 6  $\mu$ l interného kontrolného roztoku.

**Poznámka:** Interný kontrolný roztok a nosná RNA (potri „Izolovanie DNA“, strana 8) by sa mali pridať len do zmesi pufru lýzy a materiálu vzorky alebo priamo do pufru lýzy.

Interný kontrolný roztok sa nesmie pridať priamo do materiálu vzorky. Po pridaní do pufru lýzy nezabudnite, že je potrebné pripraviť čerstvú zmes interného kontrolného roztoku a pufru nosnej RNA lýzy, ktorá sa musí okamžite použiť (skladovanie zmesi pri izbovej teplote alebo v mrazničke aj keď len na niekoľko hodín môže viesť ku chybe interného kontrolného roztoku a zníženej efektívnosti extrakcie).

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

\* Súprava EZ1 DSP Virus Kit je k dispozícii aj ako súprava EASY*artus*<sup>®</sup> BK Virus RG PCR Kits s označením CE-IVD v kombinácii so súpravou *artus* BK Virus RG PCR Kit (pozri stranu 27 s informáciami o objednávaní).



Interný kontrolný roztok sa môže voliteľne použiť výhradne na kontrolu možnej inhibície PCR. V prípade tohto použitia pridajte interný kontrolný roztok priamo do zmesi BK Virus RG Master a BK Virus RG Mg-Sol podľa popisu v kroku 2b protokolu (strana 11).

## Protokol: PCR a analýza údajov

### Dôležité body pred začatím činnosti

- 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 aspoň jeden kvantitatívny štandard, ako aj jednu negatívny kontrolný roztok (voda, stupeň PCR). Na vygenerovanie štandardnej krivky použijete všetkých 4 dodaných kvantitatívnych štandardov (BK Virus RG QS 1 – 4) pre každý cyklus 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.
- 2a. Interný kontrolný roztok už bola pridaná do izolácie (pozri „Interný kontrolný roztok“, strana 8). V tomto prípade pripravte hlavnú zmes podľa Tabuľka 1.

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

**Tabuľka 1. Príprava hlavnej zmesi (interný kontrolný roztok použitý na monitorovanie izolácie DNA a na kontrolu inhibície PCR)**

Počet vzoriek	1	12
BK Virus RG Master	7 $\mu$ l	84 $\mu$ l
BK Virus RG Mg-Sol	3 $\mu$ l	36 $\mu$ l
BK Virus RG IC	0 $\mu$ l	0 $\mu$ l
<b>Celkový objem</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>	<b>120 <math>\mu</math>l</b>

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

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

**Tabuľka 2. Príprava hlavnej zmesi (interný kontrolný roztok použitý len na kontrolu inhibície PCR)**

Počet vzoriek	1	12
BK Virus RG Master	7 $\mu$ l	84 $\mu$ l
BK Virus RG Mg-Sol	3 $\mu$ l	36 $\mu$ l
BK Virus RG IC	1,5 $\mu$ l	18 $\mu$ l
<b>Celkový objem</b>	<b>11,5 <math>\mu</math>l*</b>	<b>138 <math>\mu</math>l*</b>

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

- 3. Napipetujte 10  $\mu$ l hlavnej zmesi do každej PCR skúmavky. Potom pridajte 15  $\mu$ l eluovanej DNA vzorky (pozri Tabuľka 3). Zodpovedajúco sa musí použiť 15  $\mu$ l z aspoň jedného kvantitatívneho štandardu (BK Virus RG QS 1 – 4) ako pozitívny kontrolný roztok a 15  $\mu$ l vody (voda, stupeň PCR) ako negatívny kontrolný roztok.**

**Tabuľka 3. Príprava PCR testu**

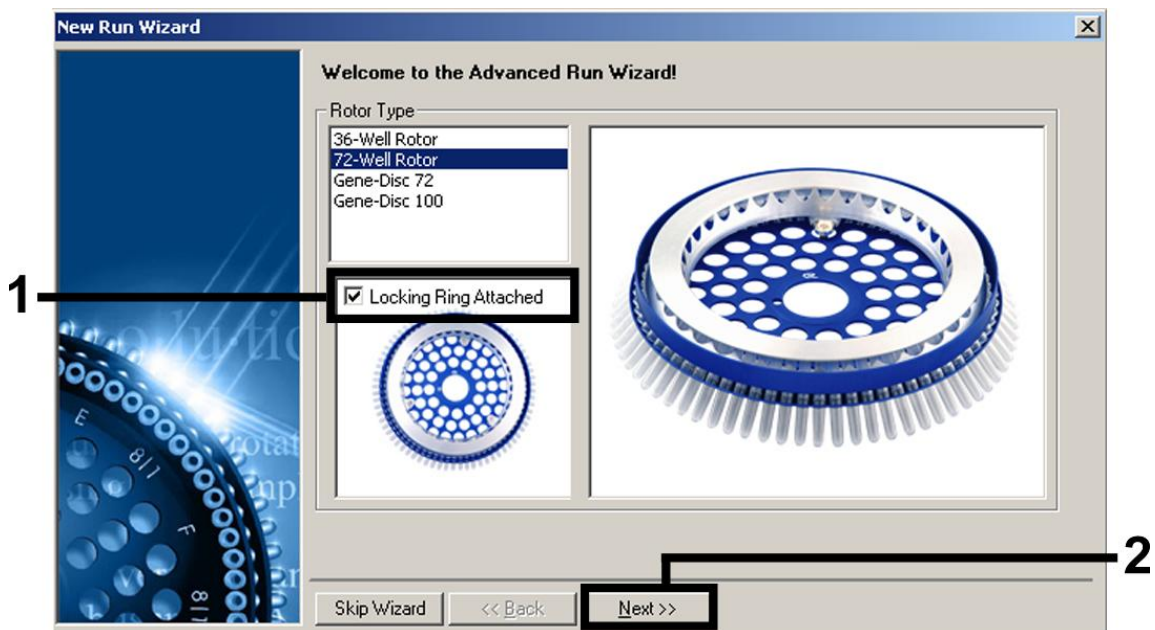
Počet vzoriek	1	12
Hlavná zmes	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l každá
Vzorka	15 $\mu$ l	15 $\mu$ l každá
<b>Celkový objem</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>	<b>25 <math>\mu</math>l každá</b>

- 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 BK vytvorte teplotný profil podľa nasledujúcich krokov.**

Nastavenie všeobecných parametrov testu	Obrázky 1, 2, 3
Prvotná aktivácia enzýmu hot-start	Obrázok 4
Amplifikácia DNA	Obrázok 5
Nastavenie citlivosti fluorescenčného kanála	Obrázok 6
Spustenie cyklu	Obrázok 7

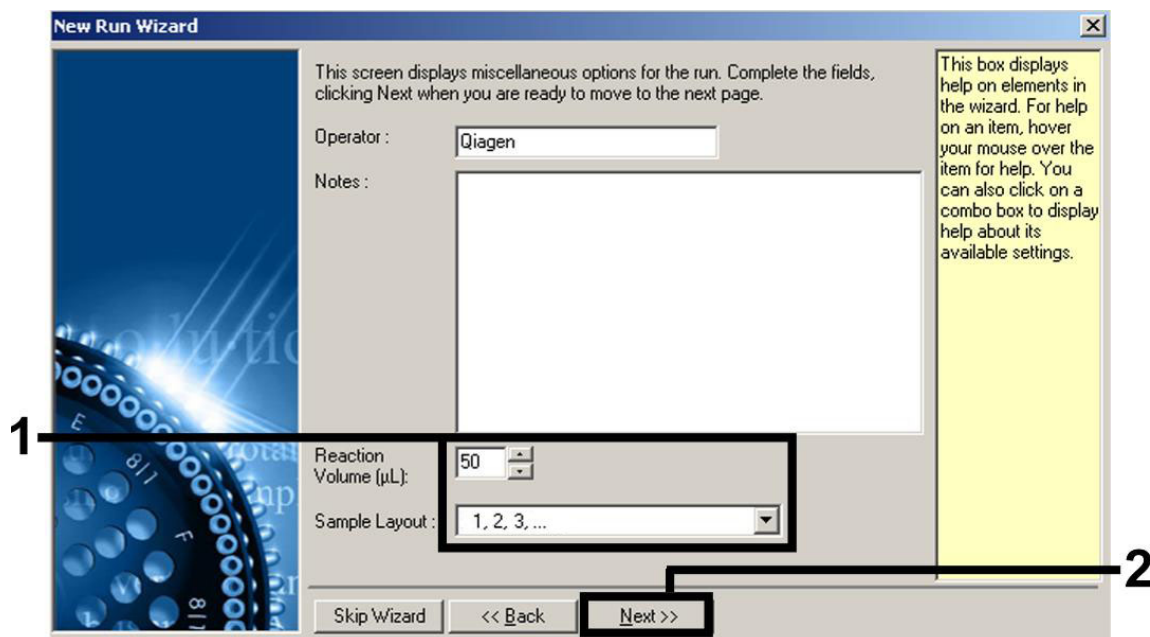
Všetky špecifikácie odkazujú na verziu softvéru 1.7.94 prístroja Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q a verzie softvéru 1.7.65 prístroja Rotor-Gene 6000. Ďalšie informácie o programovaní prístrojov Rotor-Gene nájdete v používateľskej príručke prístroja. Na ilustráciách sú tieto nastavenia softvéru orámované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

6. Najprv otvorte dialógové okno „New Run Wizard“ (Sprievodca novým cyklom) (Obrázok 1). Skontrolujte pole „Locking Ring Attached“ (Tesniaci krúžok pripevnený) a kliknite na „Next“ (Ďalej).



Obrázok 1. Dialógové okno „New Run Wizard“ (Sprievodca novým cyklom).

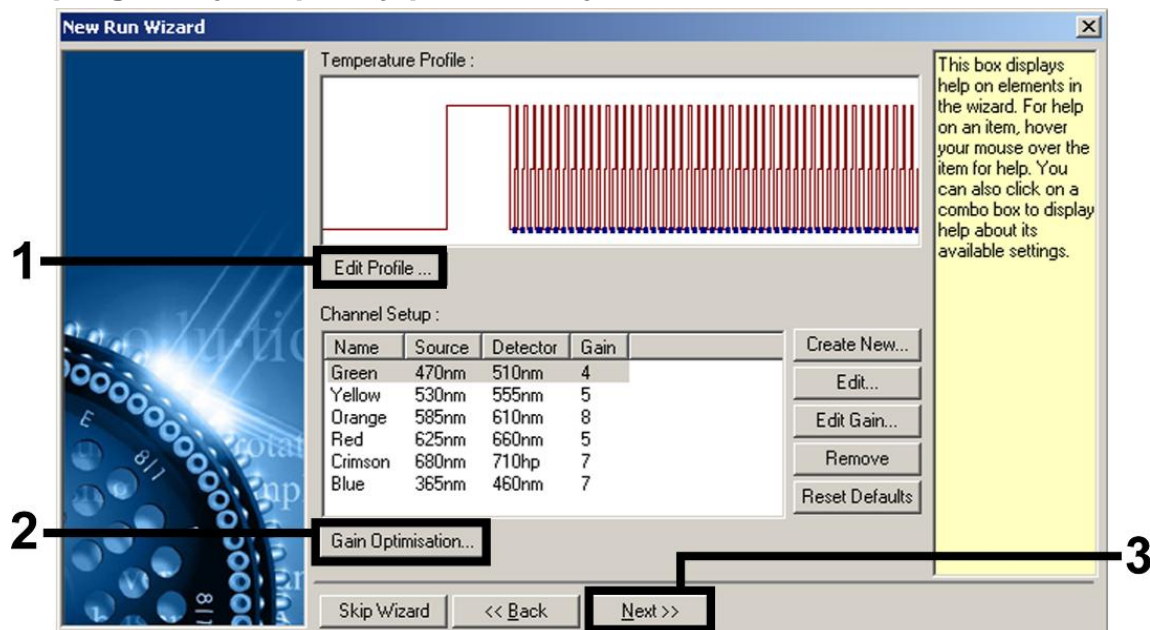
7. Vyberte hodnotu 50 pre PCR reakčný objem a kliknite na „Next“ (Ďalej) (Obrázok 2).



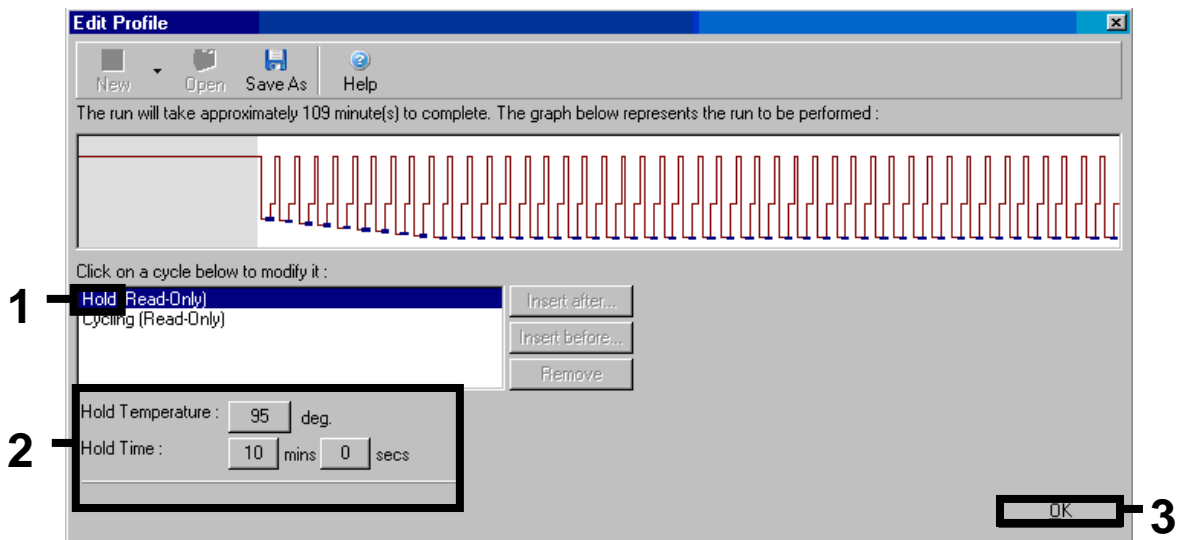
Obrázok 2. Nastavenie všeobecných parametrov testu.

**Poznámka:** Aj keď je objem fyzikálnej reakcie 25  $\mu\text{l}$ , vyberte ako objem reakcie 50 v softvéri Rotor-Gene.

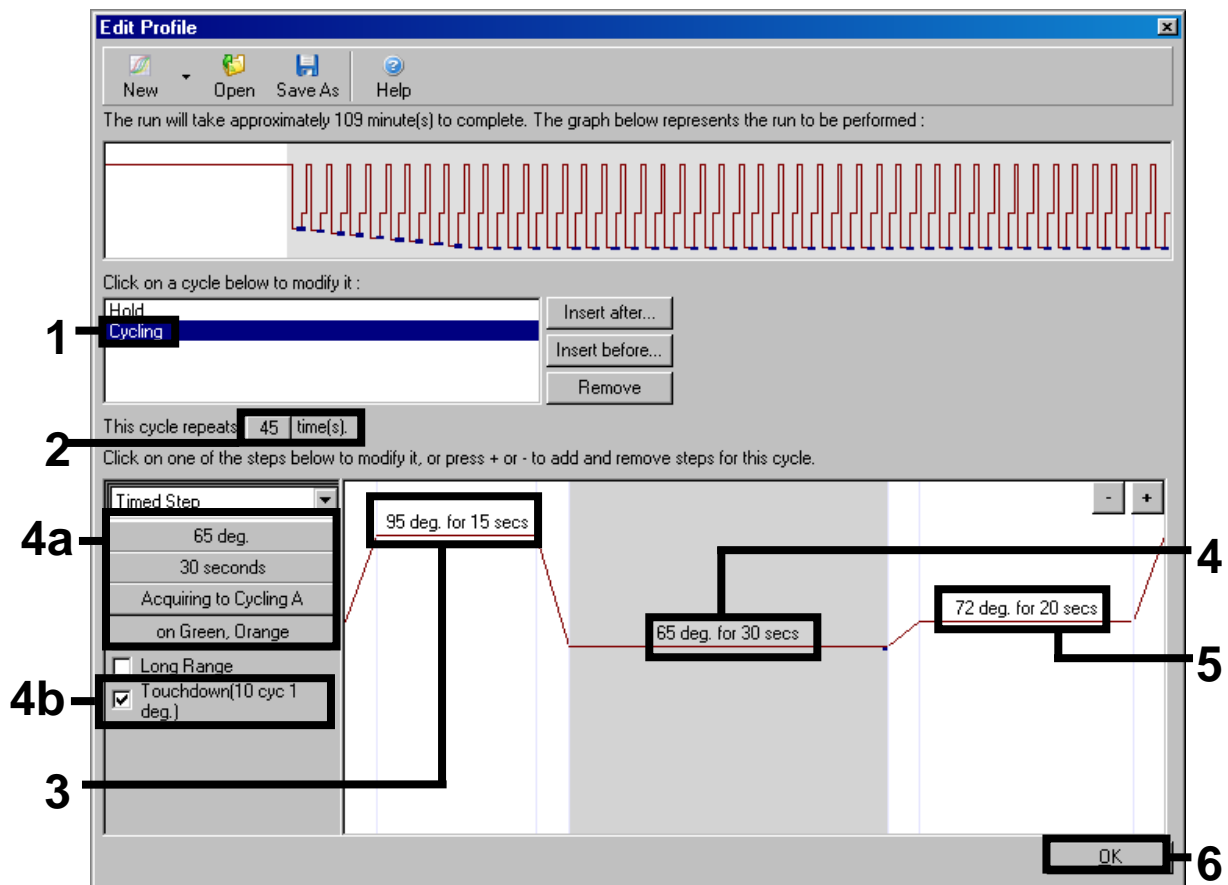
8. Kliknite na tlačidlo „Edit Profile“ (Upraviť profil) v dialógovom okne „New Run Wizard“ (Sprievodca novým cyklom) (Obrázok 3) a naprogramujte teplotný profil, ako je zobrazené na obrázkoch 3 – 5.



Obrázok 3. Úprava profilu.

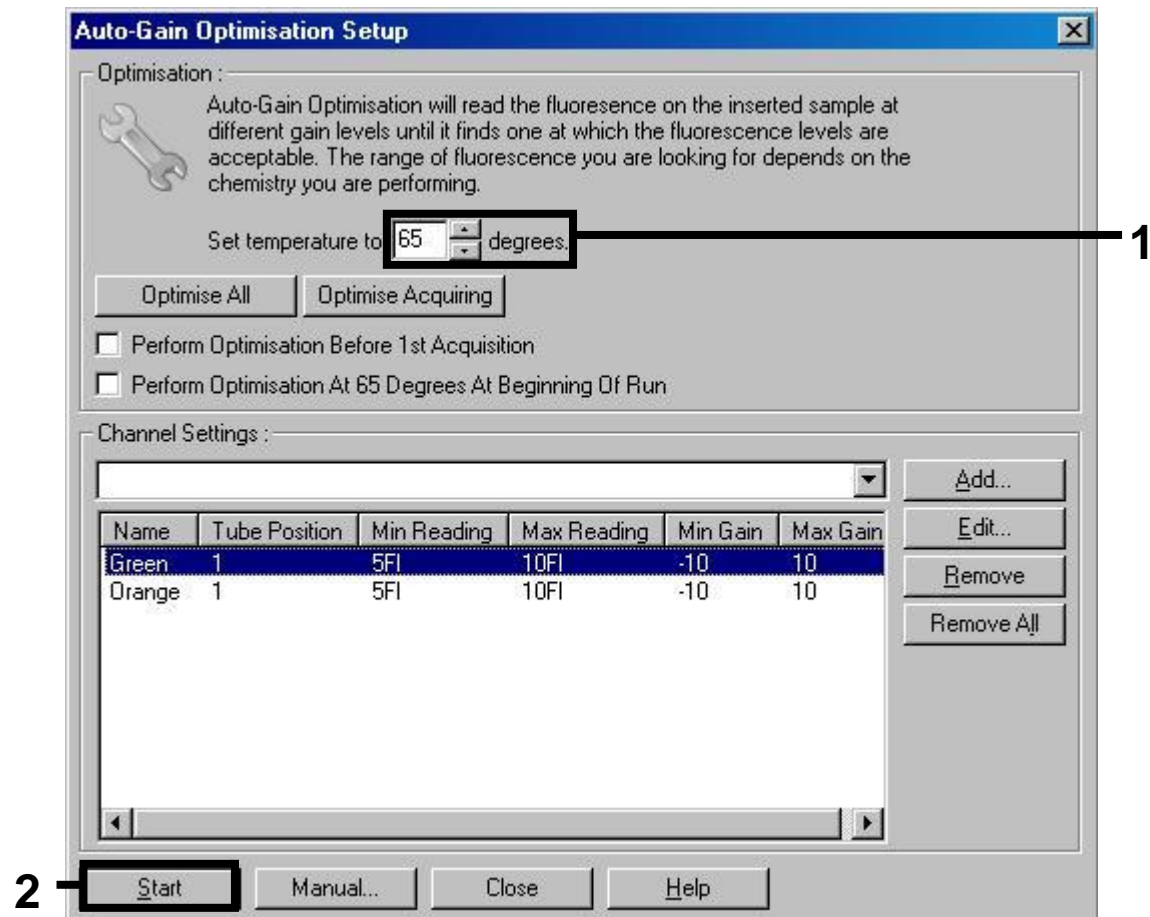


Obrázok 4. Prvotná aktivácia enzýmu hot-start.



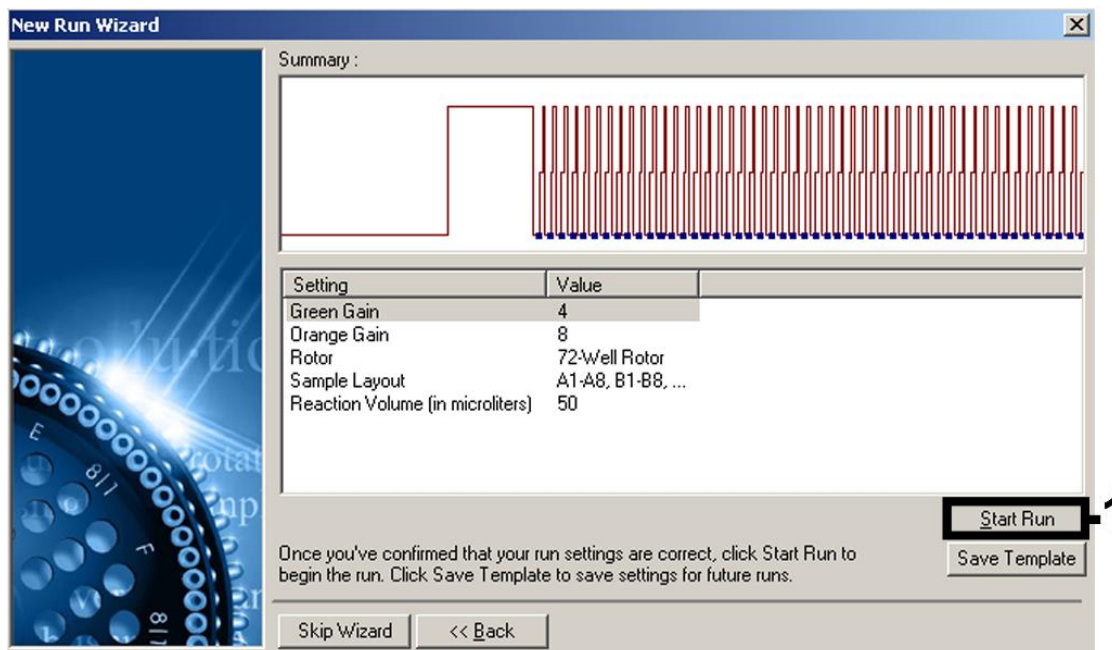
Obrázok 5. Amplifikácia DNA. Nezabudnite aktivovať funkciu dosadnutia pre 10 cyklov v temperovacom kroku.

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 Obrázok 3) otvoríte dialógové okno „Auto-Gain Optimisation Setup“ (Nastavenie automatickej optimalizácie výťažku). Kalibračnú teplotu nastavte na hodnotu 65, aby sa zhodovala s teplotou temperovania amplifikačného programu (Obrure 6).



Obrázok 6. Nastavenie citlivosti fluorescenčného kanála.

10. Hodnoty navýšenia stanovené kalibráciou kanálov sa automaticky uložia a sú uvedené v poslednom okne ponuky postupu programovania (Obrázok 7). Kliknite na „Start Run“ (Spustiť cyklus).



Obrázok 7. Spustenie cyklu.

## Interpretácia výsledkov

### Kvantifikácia

Priložené kvantitatívne štandardy (BK Virus RG QS 1 – 4) sa považujú za predtým purifikované vzorky a použije sa rovnaký objem vzorky (15  $\mu\text{l}$ ). Na vygenerovanie štandardnej krivky na prístrojoch Rotor-Gene Q by sa mali použiť všetky 4 kvantitatívne štandardy, ktoré by sa mali definovať v dialógovom poli „Edit Samples“ (Upraviť vzorky) ako normy s konkrétnymi koncentráciami (pozri používateľskú príručku prístroja).

**Poznámka:** Kvantitatívne štandardy sú definované ako kópie/ $\mu\text{l}$ . Táto rovnica sa musí použiť na premenu hodnôt stanovených pomocou štandardnej krivky do kópie/ml materiálu vzorky:

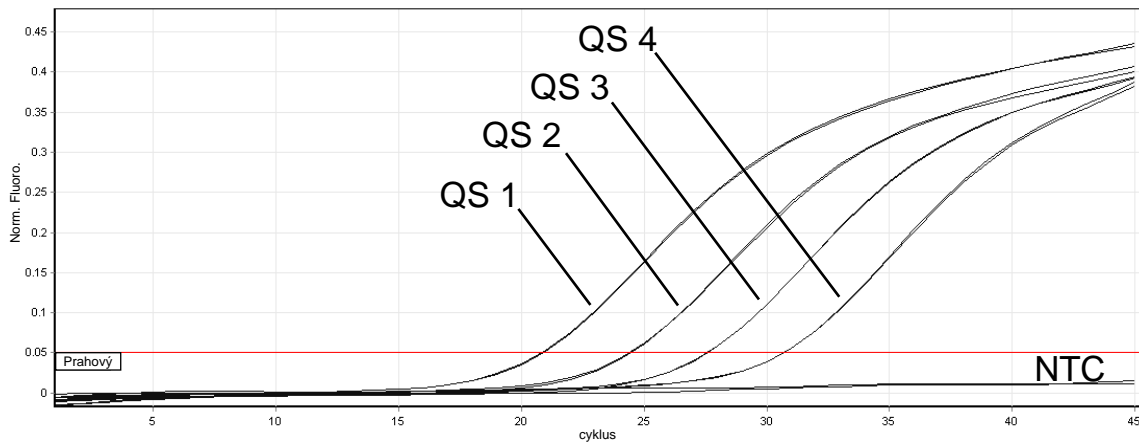
$$\text{výsledok (kópie/ml)} = \frac{\text{výsledok (kópie}/\mu\text{l}) \times \text{elučný objem } (\mu\text{l})}{\text{objem vzorky (ml)}}$$

Z princípu by sa mal pôvodný objem vzorky zadať do vyššie uvedenej rovnice. Toto je potrebné zvážiť, ak sa objem vzorky pred extrakciou nukleovej kyseliny zmenil (napr. zníženie objemu v centrifúge alebo zvýšenie objemu pridaním objemu potrebného na izolovanie).

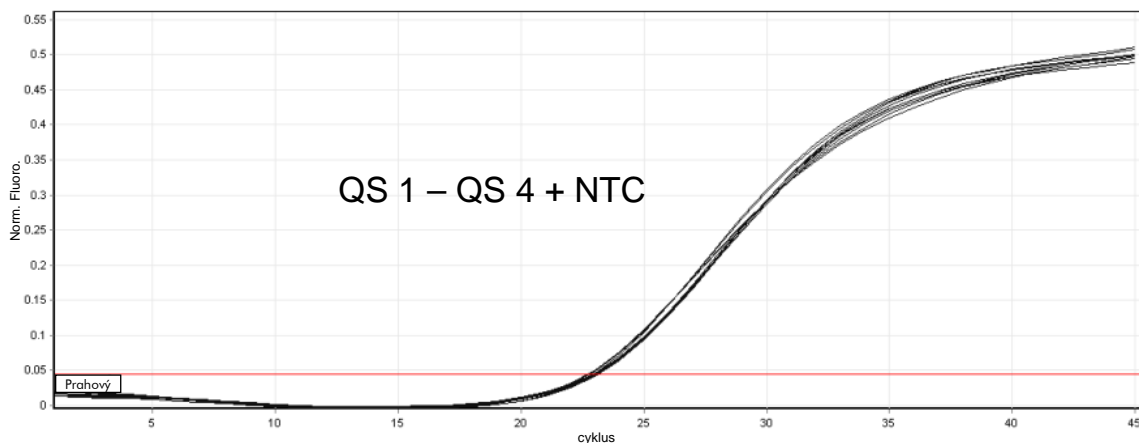


## Výsledky

Príklady pozitívnych a negatívnych PCR reakcií sú uvedené na obrázku Obrázok 8 a Obrázok 9.



**Obrázok 8. Detekcia kvantitatívnych štandardov (BK Virus RG QS 1 – 4) vo fluorescenčnom kanáli Cycling Green. NTC: Beztemplátový kontrolný roztok (negatívny kontrolný roztok).**



**Obrázok 9. Detekcia interného kontrolného roztoku (IKR) vo fluorescenčnom kanáli Cycling Orange so súčasou amplifikáciou kvantitatívnych štandardov (BK Virus RG QS 1 – 4). NTC: Beztemplátový kontrolný roztok (negatívny kontrolný roztok).**

**Vo fluorescenčnom kanáli farbiva Cycling Green sa zistí signál. Výsledok analýzy je pozitívny: vzorka obsahuje DNA vírusu BK.**

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

**Vo fluorescenčnom kanáli Cycling Green sa nedeteguje žiadny signál. Zároveň sa signál z interného kontrolného roztoku objaví v kanáli Cycling Orange.**

**Vo vzorke nie je možné detegovať žiadnu DNA vírusu BK. Môže sa považovať za negatívnu.**

V prípade negatívneho testu BK Virus PCR vylučuje detegovaný signál interného kontrolného roztoku možnosť inhibície PCR.

**V kanáli Cycling Green alebo Cycling Orange sa nezistil žiadny signál. Nie je možné vyvodit' žiadny výsledok.**

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

## **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](http://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](http://www.qiagen.com)).

### **Komentáre a návrhy**

---

#### **Žiadny signál s pozitívnymi kontrolnými roztokmi (BK Virus RG QS 1 – 4) vo fluorescenčnom kanáli Cycling Green**

- |   |   |
|---|---|
| a) Vybraný fluorescenčný kanál na analýzu PCR údajov nie je v súlade s protokolom | Na analýzu údajov vyberte fluorescenčný kanál Cycling Green na analytický test BK Virus PCR a fluorescenčný kanál Cycling Orange pre PCR interného kontrolného roztoku. |
| b) Nesprávne naprogramovanie teplotného profilu prístroja Rotor-Gene              | Porovnajete teplotný profil s protokolom. Pozri časť „Protokol: PCR a analýza údajov“, strana 10.   |
| 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 10.                 |

## Komentáre a návrhy

---

- d) Podmienky skladovania jedného alebo viacerých komponentov súpravy nespĺňajú pokyny uvedené v časti „Skladovanie a manipulácia s reagensiami“ (strana 7) Skontrolujte podmienky skladovania a dátum expirácie (pozri štítok súpravy) reagensí a v prípade potreby použite novú súpravu.
- e) Súprava *artus* BK Virus RG PCR Kit exspirovala Skontrolujte podmienky skladovania a dátum expirácie (pozri štítok súpravy) reagensí a v prípade potreby použite novú súpravu.

### **Slabý alebo žiadny signál interného kontrolného roztoku negatívnej vzorky plazmy alebo moču, ktorá bola vystavená purifikácii pomocou súpravy *artus* BK Virus RG PCR Kit vo fluorescenčnom kanáli Cycling Orange a súčasná absencia signálu v kanáli Cycling Green**

- 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 8) a postupujte presne podľa pokynov výrobcu.
- d) Podmienky skladovania jedného alebo viacerých komponentov súpravy nespĺňajú pokyny uvedené v časti „Skladovanie a manipulácia s reagensiami“ (strana 7) Skontrolujte podmienky skladovania a dátum expirácie (pozri štítok súpravy) reagensí a v prípade potreby použite novú súpravu.
- e) Súprava *artus* BK Virus RG PCR Kit exspirovala Skontrolujte podmienky skladovania a dátum expirácie (pozri štítok súpravy) reagensí a v prípade potreby použite novú súpravu.

## Komentáre a návrhy

---

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

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

## Kontrola kvality

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

## Obmedzenia

Tento výrobok používa personál, ktorý absolvoval špeciálne školenie ohľadom diagnostických postupov *in vitro*.

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

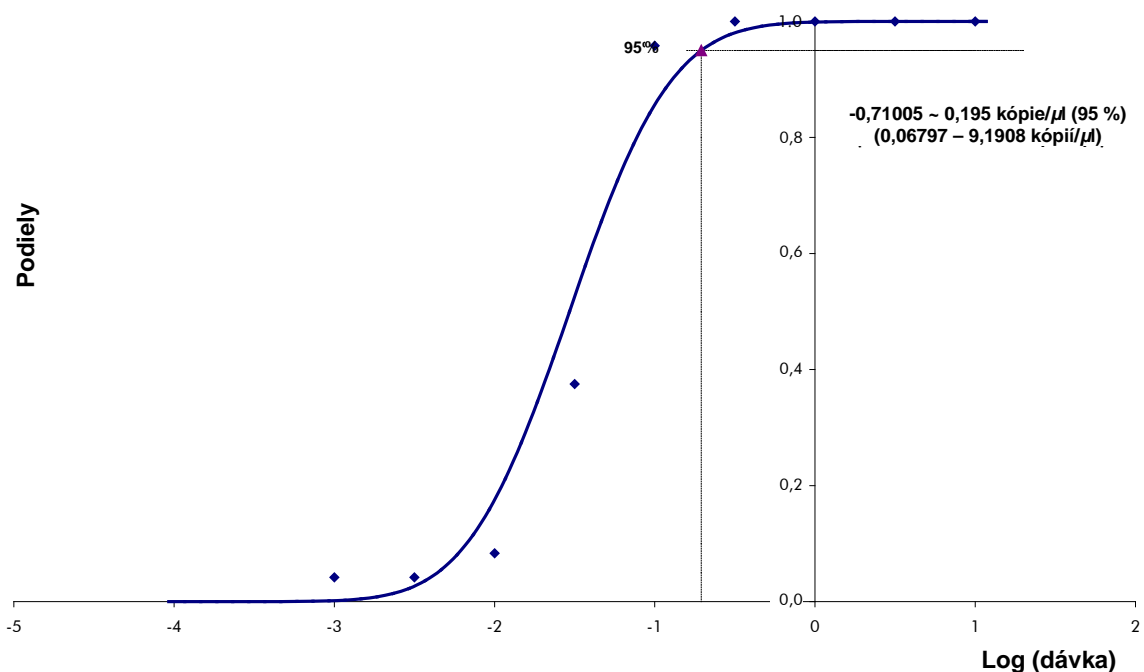
Pozornosť by sa mala venovať dátumu expirácie vytlačeným na škatuli a štítkoch všetkých komponentov. Nepoužívajte exspirované komponenty.

Aj keď je to zriedkavé, môže dôjsť v prípade mutácií vo vysoko zakonzervovaných častiach vírusového genómu, ktorý pokrývajú priméry súpravy a/alebo sonda k stanoveniu malého množstva alebo k zlyhaniu detegovania prítomnosti vírusu. Validita a účinnosť dizajnu testu sa v pravidelných intervaloch revidujú.

# Charakteristiky účinnosti

## Analytická senzitivita

Na určenie analytickej senzitivity súpravy *artus* BK Virus RG PCR Kit sa pripravili štandardné série riadenia z 10 na 0,001 ekvivalentov kópie/ $\mu$ l a analyzovali sa v prístroji Rotor-Gene 6000 v kombinácii so súpravou *artus* BK Virus RG PCR Kit. Testovanie sa uskutočnilo počas 3 rôznych dní na 8 kópiách. Výsledky sa určili pomocou probit analýzy. Grafická ilustrácia analýzy probit pre na prístroji Rotor-Gene 6000 je zobrazená v Obrázok 10. Analytický detekčný limit súpravy *artus* BK Virus RG PCR Kit. v kombinácii s nástrojom Rotor-Gene Q MDx/Q/6000 je 0,195 kópie/ $\mu$ l ( $p = 0,05$ ). To znamená, že existuje pravdepodobnosť 95 %, že dôjde k detekcii 0,195 kópie/ $\mu$ l.



**Obrázok 10. Probit analýza: BK Virus (Rotor-Gene 6000).** Analytická senzitivita súpravy *artus* BK Virus RG PCR Kit na prístroji Rotor-Gene 6000.

## Špecifická

Špecifická súpravy *artus* BK Virus 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. Detegovateľnosť všetkých relevantných kmeňov bola preto zaistená pomocou zoradenia databázy a cyklu PCR na nástrojoch Rotor-Gene Instruments s týmito kmeňmi (pozri Tabuľka 4).

**Tabuľka 4. Testovanie špecificity relevantných kmeňov**

Vírus	Kmeň	Zdroj	Vírus BK (Cycling Green)	Interný kontrolný roztok (Cycling Orange)
Vírus BK	Dunlop	ATCC*	+	+
Vírus BK	Gardner	ATCC	+	+
Vírus BK	AB269822	Geneart	+	+
Vírus BK	S72390	Geneart	+	+

\* Kolekcia kultúr amerického typu.

Okrem toho sa špecificita overila pomocou 30 rôznych negatívnych vzoriek plazmy na vírus BK. Nedošlo u nich k vygenerovaniu žiadnych signálov s primérmí a sondami špecifickými pre vírus BK, ktoré sú zahrnuté v BK Virus RG Master.

Potenciálna krížová reaktivita súpravy *artus* BK Virus RG PCR Kit sa testovala pomocou kontrolnej skupiny uvedenej v Tabuľka 5. Žiadny z testovaných patogénov nebol reaktívny. U zmiešaných infekcií sa neobjavili žiadne krížové reaktivity.

**Tabuľka 5. Testovanie špecificity súpravy s potenciálne krížovo reaktívnymi patogénmi**

Kontrolná skupina	Vírus BK (Cycling Green)	Interný kontrolný roztok (Cycling Orange)
Cytomegalovírus	–	+
Vírus Epstein-Barrovej	–	+
Ľudský herpetický vírus 1 (vírus herpes simplex 1)	–	+
Ľudský herpetický vírus 2 (vírus herpes simplex 2)	–	+
Ľudský herpetický vírus 3 (vírus varicella-zoster)	–	+
Ľudský herpetický vírus 6	–	+
Vírus JC	–	+
Simian vírus 40	–	+
<i>Candida albicans</i>	–	+

## Presnosť

Údaje o presnosti súpravy *artus* BK Virus 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 testu *artus* BK Virus RG PCR sa zozbierali pomocou kvantitatívnej normy najnižšej koncentrácie (QS 4;  $1 \times 10^1$  kópií/ $\mu$ 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 6). Na základe týchto výsledkov je celkové štatistické rozšírenie danej vzorky s uvedenou koncentráciou na zistenie interného kontrolného roztoku 2,11% ( $C_T$ ) a 3,59% ( $C_T$ ). Tieto hodnoty sú založené na súhrne všetkých jednotlivých hodnôt stanovených rozptylov.

**Tabuľka 6. Údaje o presnosti na základe hodnôt C<sub>T</sub>**

	Hodnota C <sub>T</sub>	Štandardná odchýlka	Koeficient rozptylu (%)
Rozptyl v rámci testu: BK Virus RG QS 4	29,45	0,17	0,56
Rozptyl v rámci testu: Interný kontrolný roztok	24,31	0,12	0,49
Rozptyl medzi testami: BK Virus RG QS 4	29,42	0,25	0,85
Rozptyl medzi testami: Interný kontrolný roztok	23,30	0,77	3,30
Rozptyl medzi dávkami: BK Virus RG QS 4	30,31	0,64	2,10
Rozptyl medzi dávkami: Interný kontrolný roztok	22,53	0,40	1,78
Celkový rozptyl: BK Virus RG QS 4	29,80	0,63	2,11
Celkový rozptyl: Interný kontrolný roztok	23,12	0,83	3,59

## Robustnosť

Overenie robustnosti umožňuje stanovenie celkovej miery zlyhania súpravy *artus* BK Virus RG PCR Kit. Do 30 vzoriek negatívnych na vírus BK sa pridalo 1 kópia/ $\mu$ l objemu eluátu DNA vírusu BK (približne päťnásobná koncentrácia analytickej hranice senzitivity). Po extrakcii pomocou súpravy EZ1<sup>®</sup> DSP Virus Kit (pozri časť „Izolovanie DNA“, strana 8) sa tieto vzorky analyzovali pomocou súpravy *artus* BK Virus RG PCR Kit. Pre všetkých 30 vzoriek bola miera zlyhania 0 %. Okrem toho sa pomocou purifikácie a analýzy 30 vzoriek negatívnych na prítomnosť vírusu BK vyhodnotila masívnosť interného kontrolného roztoku. Celková miera zlyhania bola 0 %. Inhibície neboli spozorované. Robustnosť súpravy *artus* BK Virus RG PCR Kit je  $\geq 99$  %.



## Reprodukovateľnosť

Údaje o reprodukovateľnosti umožňujú pravidelné zhodnotenie účinnosti súpravy *artus* BK Virus RG PCR Kit ako aj porovnanie efektívnosti s ostatnými výrobkami. Tieto údaje boli získané počas účasti v uznávaných odborných programoch.

## Diagnostické vyhodnotenie

Súprava *artus* BK Virus RG PCR Kit je momentálne predmetom radu hodnotiacich štúdií.

## 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](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp), prípadne kontaktujte technické služby spoločnosti QIAGEN alebo svojho miestneho distribútora.

## Symboly



Obsahuje reagenty postačujúce pre <N> testov



Použite do



Zdravotnícke diagnostické zariadenie na použitie v podmienkach in vitro



Katalógové číslo



Číslo šarže



Číslo materiálu



Komponenty



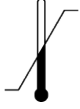
Obsahuje



Číslo



Identifikátor GTIN (Global Trade Item Number)



Teplotné obmedzenia



Výrobca



Prečítajte si návod na použitie

## Kontaktné informácie

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

## Informácie o objednávaní

Produkt	Obsah	Kat. č.
<i>artus</i> BK Virus RG PCR Kit (24)	Pre 24 reakcií: Zmes master, 4 kvantitatívne štandardy, interný kontrolný roztok, roztok magnézia, voda (stupeň PCR)	4514263
<i>artus</i> BK Virus RG PCR Kit (96)	Pre 96 reakcií: Zmes master, 4 kvantitatívne štandardy, interný kontrolný roztok, roztok magnézia, voda (stupeň PCR)	4514265
<b>Súpravy EASY<i>artus</i> BK Virus RG PCR Kits – na integrovanú automatizovanú purifikáciu vzorky v úplnom súlade s CE-IVD a detekciu patogénov</b>		
<i>EASYartus</i> BK Virus RG PCR Kit 1	Na prípravu 48 virálnych nukleových kyselín a 24 testov: 1 x súprava EZ1 DSP Virus Kit, 1 x súprava <i>artus</i> BK Virus RG PCR Kit (24)	EA11423
<i>EASYartus</i> BK Virus RG PCR Kit 2	Na prípravu 48 virálnych nukleových kyselín a 48 testov: 1 x súprava EZ1 DSP Virus Kit, 2 x súprava <i>artus</i> BK Virus RG PCR Kit (24)	EA11424
<b>Súprava EZ1 DSP Virus Kit – na automatickú súčasnú purifikáciu virálnej DNA a RNA z 1 – 14 vzoriek ľudskej plazmy, séra alebo MMM</b>		
EZ1 DSP Virus Kit (48)	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
<b>Rotor-Gene Q MDx a príslušenstvo</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Real-time PCR cyklovač s 5 kanálmi (zelený, žltý, oranžový, červený, karmínový), prenosný počítač, softvér, príslušenstvo: zahŕňa jednoročnú záruku na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie nie sú súčasťou balenia	9002022

<b>Produkt</b>	<b>Obsah</b>	<b>Kat. č.</b>
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Real-time PCR cyklovač s 5 kanálmi (zelený, žltý, oranžový, červený, karmínový), prenosný počítač, softvér, príslušenstvo: zahŕňa jednoročnú záruku na diely a prácu, inštaláciu a zaškolenie	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR cyklovač a vysokorozlišovací analyzátor kriviek topenia s 5 kanálmi (zelený, žltý, oranžový, červený, karmínový) plus kanál HRM, prenosný počítač, softvér, príslušenstvo: zahŕňa jednoročnú záruku na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie nie sú súčasťou balenia	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR cyklovač a vysokorozlišovací analyzátor kriviek topenia s 5 kanálmi (zelený, žltý, oranžový, červený, karmínový) plus kanál HRM, prenosný počítač, softvér, príslušenstvo: zahŕňa jednoročnú záruku na diely a prácu, inštaláciu a zaškolenie	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Real-time PCR prístroj so 6 kanálmi (modrý, zelený, žltý, oranžový, červený, karmínový) vrátane prenosného počítača, softvéru, príslušenstva: zahŕňa jednoročnú záruku na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie nie sú súčasťou balenia	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Real-time PCR cyklovač so 6 kanálmi (modrý, zelený, žltý, oranžový, červený, karmínový), vrátane prenosného počítača, softvéru, príslušenstva: zahŕňa jednoročnú záruku na diely a prácu, inštaláciu a zaškolenie	9002043
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

<b>Produkt</b>	<b>Obsah</b>	<b>Kat. č.</b>
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 10 000 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](http://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

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*®, *EASYartus*®, *EZ1*®, *Rotor-Gene*® (QIAGEN Group).

#### **Obmedzená licenčná zmluva**

Použitie tohto produktu predstavuje súhlas kupujúceho alebo používateľa súpravy *artus BK Virus RG PCR Kit* s nasledovnými podmienkami:

1. Súprava *artus BK Virus RG PCR Kit* môže byť použitá výlučne v súlade s príručkou k súprave *artus BK Virus RG PCR Kit* iba s komponentmi obsiahnutými v tejto súprave. Spoločnosť QIAGEN neudeluje 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 BK Virus RG PCR Kit* a v ďalších protokoloch, ktoré sú dostupné na adrese [www.qiagen.com](http://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](http://www.qiagen.com).

© 2009 – 2014 QIAGEN, všetky práva vyhradené.

[www.qiagen.com](http://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)

