

Příručka pro sadu *artus*[®] CMV TM PCR



24 (katalogové č. 4503163)



96 (katalogové č. 4503165)

In vitro diagnostikum pro kvantitativní stanovení

Pro použití se systémy *ABI PRISM*[®] 7000, 7700 a 7900HT Sequence Detection System

Prosinec 2014 – verze 1



4503163, 4503165



1046905CS



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NĚMECKO

R3

MAT

1046905CS



Sample & Assay Technologies

QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN je vedoucím poskytovatelem inovativních technologií přípravy vzorků a analýz, které umožňují izolaci a detekci obsahu jakéhokoliv biologického vzorku. Naše pokročilé, vysoce kvalitní produkty a služby Vám zajistí spolehlivý výsledek.

QIAGEN určuje standardy:

- v purifikaci DNA, RNA a proteinů
- v analýzách nukleových kyselin a proteinů
- ve výzkumu microRNA a RNAi
- v automatizaci technologií pro přípravu vzorků a jejich analýz.

Naší misí je umožnit Vám dosáhnout vynikajících výsledků a technických úspěchů. Více informací naleznete na stránkách www.qiagen.com.

Obsah

1. Obsah	4
2. Skladování	4
3. Další potřebné vybavení	4
4. Všeobecná preventivní opatření	5
5. Informace o původcích	5
6. Princip PCR s hodnocením v reálném čase	5
7. Popis výrobku	5
8. Protokol	5
8.1 Preanalytika: Odběr, skladování a přeprava vzorků	5
8.1.1 Odběr vzorků	6
8.1.2 Skladování	6
8.1.3 Přeprava vzorků	6
8.1.4 Rušivé látky	6
8.2 Izolace DNA	6
8.3 Interní kontrola	7
8.4 Kvantifikace	7
8.5 Příprava PCR	8
8.6 Programování <i>ABI PRISM SDS</i>	12
8.6.1 Programování <i>ABI PRISM 7000 SDS</i>	12
8.6.2 Programování <i>ABI PRISM 7700 SDS</i>	14
8.6.3 Programování <i>ABI PRISM 7900HT SDS</i>	17
9. Analýza dat	21
10. Odstraňování poruch	23
11. Specifikace	24
11.1 Analytická senzitivita	24
11.2 Specificita	25
11.3 Přesnost	26
11.4 Robustnost	27
11.5 Reprodukovatelnost	27
11.6 Diagnostické hodnocení	27
12. Zvláštní pokyny pro použití produktu	28
13. Bezpečnostní informace	28
14. Kontrola kvality	28
15. Literatura	28
16. Vysvětlení symbolů	29

Sada artus CMV TM PCR

Pro použití se systémy *ABI PRISM 7000*, *7700* a *7900HT Sequence Detection System* ke kvantitativnímu průkazu DNA viru CMV z EDTA plazmy.

Upozornění: Sadu *artus CMV TM PCR* nelze použít ve spojení se systémem *GeneAmp® 5700 SDS* ani s formátem destiček s 384 jamkami systému *ABI PRISM 7900HT SDS*.

1. Obsah

	Označení a obsah	Kat. čís. 4503163 24 reakcí	Kat. čís. 4503165 96 reakcí
Modrá	<i>CMV TM Master</i>	2 x 12 reakcí	8 x 12 reakcí
Žlutá	<i>CMV LC/RG/TM Mg-Sol[†]</i>	1 x 600 µl	1 x 600 µl
Červená	<i>CMV LC/RG/TM QS 1[†]</i> (1 x 10 ⁵ kopií/µl)	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Červená	<i>CMV LC/RG/TM QS 2[†]</i> (1 x 10 ³ kopií/µl)	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Červená	<i>CMV LC/RG/TM QS 3[†]</i> (1 x 10 ² kopií/µl)	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Červená	<i>CMV LC/RG/TM QS 4[†]</i> (1 x 10 ¹ kopií/µl)	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Zelená	<i>CMV TM IC[‡]</i>	1 x 1000 µl	2 x 1000 µl
Bílá	Voda (v kvalitě vhodné pro PCR)	1 x 1000 µl	1 x 1000 µl

[‡] QS = Kvantifikační standard
IC = Interní kontrola
Mg-Sol = Roztok hořčiku

2. Skladování

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

3. Další potřebné vybavení

- Laboratorní rukavice bez pudru
- Sada k izolaci DNA (viz **8.2 Izolace DNA**)
- Pipety (nastavitelné)
- Sterilní pipetovací špičky s filtrem
- Vortex mixer
- Stolní centrifuga s rotorem pro 2 ml zkumavky
- Centrifuga s rotorem pro mikrodestičky (volitelné)
- 96jamková reakční destička/zkumavky pro optická měření s odpovídajícími optickými uzavíracími prostředky* (viz **8.5 Příprava PCR**)
- 96jamkový dvojdílný přídržný rám k použití s optickými reakčními zkumavkami (*96 Well Tray/Retainer Set*, kat. č. 403 081, Applied Biosystems), viz **8.5 Příprava PCR**
- Kompresní podložka pro použití s optickými lepicími foliemi (*Optical Cover Compression Pads*, kat. č. 4 312 639, Applied Biosystems), viz **8.5 Příprava PCR**
- Aplikátor k uzavření reakčních destiček při použití optických lepicích folií (*Adhesive Seal Applicator Kit*, kat. č. 4 333 183, Applied Biosystems)
- *ABI PRISM 7000* (software verze 1.0.1), *7700* (software verze 1.9.1) nebo *7900HT SDS* (software verze 2.1)

* Použití reakčních zkumavek s vypouklými víčky k optickým měřením je přípustné pouze pro *ABI PRISM 7700 SDS* a vyžaduje změnu nastavení doby osvětlení (viz **8.6.2 Programování ABI PRISM 7700 SDS**, 8.6.2.5 Důležitá přídatná nastavení).

Upozornění: Při uvedení přístrojů do provozu je bezpodmínečně nutná jsoucí platná kalibrace barviv (*Pure Spectra Component File*) a pozadí (*Background Component File*).

4. Všeobecná preventivní opatření

Uživatel by měl dbát na následující:

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

5. Informace o původcích

Lidský cytomegalovirus (CMV) se vyskytuje v krvi, tkáních a téměř ve všech sekrečních tekutinách infikovaných osob. K přenosu viru může dojít perorálně, pohlavním stykem, krevní transfuzí nebo při transplantaci orgánů, dále nitroděložně nebo perinatálně. CMV často vede k asymptomatické infekci, po které virus v těle celoživotně přetrvává. Pokud se u dospívajících nebo dospělých vyskytnou příznaky, jsou podobné příznakům mononukleózy s horečkou, slabé hepatitidy a celkové indispozice. Těžký průběh infekce CMV byl pozorován zejména u pacientů infikovaných nitroděložně a u imunodeficientních pacientů.

6. Princip PCR s hodnocením v reálném čase

Při diagnostikování pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) se amplifikují specifické oblasti genomu původce. Detekce amplifikátu probíhá při PCR v reálném čase pomocí fluorescenčních barviv. Barviva jsou zpravidla vázána na oligonukleotidové sondy, které vytvářejí specifickou vazbu s amplifikátem. Detekce intenzity fluorescence v průběhu PCR v reálném čase umožňuje průkaz a kvantifikaci kumulujícího se produktu, aniž by bylo nutné po PCR znovu otevírat reakční zkumavky (Mackay, 2004).

7. Popis výrobku

Sada *artus* CMV TM PCR je systém k přímému použití pro průkaz DNA viru CMV pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) v přístrojích *ABI PRISM 7000*, *7700* a *7900HT Sequence Detection System*. *CMV RG/TM Master* obsahuje reagenty a enzymy pro specifickou amplifikaci úseku 105 bp genomu viru CMV. Detekce amplifikátu se provádí měřením fluorescence FAM™ v systému *ABI PRISM SDS*. Kromě toho sada *artus* CMV TM PCR obsahuje druhý heterologní amplifikační systém pro průkaz potenciální inhibice PCR. Tento systém je detekován jako *Interní kontrola (IC)* na základě měření fluorescence VIC®/JOE™. Limit detekce analytické CMV PCR (viz **11.1 Analytická senzitivita**) přitom není negativně ovlivněn. Spolu s produktem se dodávají externí pozitivní kontroly (*CMV LC/RG/TM QS 1–4*), pomocí nichž lze určit množství původce ve vzorku. Další informace naleznete v části **8.4 Kvantifikace**.

Upozornění: Teplotní profil pro detekci cytomegaloviru pomocí sady *artus* CMV TM PCR odpovídá teplotnímu profilu sady *artus* EBV TM PCR a *artus* HSV-1/2 TM PCR. Reakce PCR pro tyto systémy *artus* je proto možné provádět a analyzovat v jednom běhu. Vezměte v úvahu doporučení týkající se analýzy PCR uvedené v kapitole **8.4 Kvantifikace** a **9. Analýza dat**.

8. Protokol

8.1 Preanalytika: Odběr, skladování a přeprava vzorků

Upozornění: Se všemi vzorky se musí zacházet jako s potenciálně infekčními.

Upozornění: Dosud známé údaje prokazují EDTA nebo citrátovou plazmu jako nejvhodnější vzorek pro průkaz CMV. Doporučujeme tedy používat tyto materiály se sadou *artus* CMV TM PCR.

Validace sady *artus* CMV TM PCR byla provedena pomocí vzorků lidské EDTA plazmy. Jiné vzorky nejsou validovány. Pro přípravu vzorků používejte pouze doporučené sady k izolaci nukleových kyselin (viz **8.2 Izolace DNA**).

Je nezbytné dodržovat následující předpisy pro odběr, skladování a přepravu.

8.1.1 Odběr vzorků

Každý odběr krve je podmíněn narušením krevních cest (tepny, žíly, kapiláry). Používat se smí pouze nezávadný a sterilní materiál. Pro odběr krve by měly být k dispozici odpovídající jednorázové pomůcky. K punkci žíly by se neměly používat příliš jemné kapilární jehly. Odběr žilní krve by měl být proveden na vhodných místech v oblasti loketní jamky, předloktí nebo na hřbetu ruky. Krev odebírejte do standardních odběrových zkumavek (červený uzávěr, Sarstedt nebo ekvivalentní zkumavky jiných výrobců). Odeberte 5-10 ml EDTA krve. Zkumavky by měly být bezprostředně po odběru promíchány opakovaným obracením (8x, netřepat).

Upozornění: Vzorky pacientů, kterým byl podán heparin, se nesmí používat (viz **8.1.4 Rušivé látky**).

8.1.2 Skladování

Plná krev by měla být během šesti hodin rozdělena na plazmu a buněčné elementy centrifugací při 800–1600 x *g* po dobu 20 minut. Oddělená plazma musí být převedena do sterilní polypropylenové zkumavky. Výkonost testu může být opakovaným zmrazováním nebo delším skladováním vzorků narušena.

8.1.3 Přeprava vzorků

Vzorky by měly být přepravovány zásadně v nerozbitných transportních nádobách, aby se zabránilo eventuálnímu nebezpečí infekce při úniku vzorku. Vzorky musí být zaslány podle platných místních a státních předpisů pro přepravu látek vyvolávajících nákazu.*

Přeprava nesmí trvat déle než šest hodin. Skladování na místě odběru se nedoporučuje. Transport poštou je možný, musí se však dbát na zákonné předpisy. Doporučujeme přepravu kurýrem. Krevní vzorky by měly být zasílány chlazené (+2 až +8 °C) a oddělená plazma hluboce zmrazená (-20°C).

8.1.4 Rušivé látky

Zvýšené hodnoty bilirubinu ($\geq 4,5$ mg/dl) a lipidů (≥ 1100 mg/dl) stejně jako hemolytické vzorky analytický systém CMV neovlivňují. Heparin narušuje PCR. Vzorky, které byly odebrány do zkumavek obsahujících heparin jako antikoagulant, nesmí být použity. Stejně tak se nesmí používat vzorky heparinovaných osob.

8.2 Izolace DNA

K izolaci DNA CMV doporučujeme následující izolační sadu:

Materiál vzorku	Sada k izolaci nukleových kyselin	Katalogové číslo	Výrobce	Nosičová RNA
EDTA plazma	QIAamp® DSP Virus Kit (50)	60704	QIAGEN	obsažena

- Použití **nosičové RNA** je rozhodující pro účinnost izolace a následně i výtěžek DNA/RNA. Pro větší stabilitu nosičové RNA dodávané spolu se sadou QIAamp DSP Virus se držte pokynů pro manipulaci a skladování nosičové RNA (viz kapitola o přípravě reagentů a pufrů „Preparing reagents and buffers“ v příručce *QIAamp DSP Virus Kit Handbook*).
- Izolační sada obsahuje promývací pufr s obsahem **etanolu**. Bezpodmínečně zajistěte, aby byla před elucí provedena dodatečná centrifugace (tři minuty, 13 000 ot/min), která odstraní zbytky etanolu. Zabrání tak možným inhibicím PCR.

* International Air Transport Association (IATA; Mezinárodní asociace leteckých dopravců). Dangerous Goods Regulations (předpisy pro přepravu nebezpečného nákladu), 41. vydání, 2000.704.

Důležité: *Interní kontrolu* sady *artus* CMV TM PCR lze vložit přímo do izolace. Dbejte na to, aby byl při izolaci zpracován také jeden negativní vzorek plazmy. Odpovídající signál *Interní kontroly* je základem pro vyhodnocení izolace (viz **8.3 Interní kontrola**).

8.3 Interní kontrola

Interní kontrola (CMV TM IC) je součástí produktu. Máte tak možnost kontrolovat **jak izolaci DNA, tak také možnou inhibici PCR** (viz Obr. 1). Pro tuto aplikaci přidejte k izolaci *Interní kontrolu* v poměru 0,1 µl na 1 µl elučního objemu. Používáte-li sadu QIAamp DSP Virus a DNA eluujete například v 60 µl pufru AE, je nutné přidat 6 µl *Interní kontroly*. Množství použité *Interní kontroly* závisí **výhradně** na elučním objemu.

Interní kontrola a nosičová RNA (viz **8.2 Izolace DNA**) by se měly přidávat pouze

- ke směsi lyzačního pufru a vzorku nebo
- přímo do lyzačního pufru.

Interní kontrola se nesmí přidávat přímo ke vzorku. Upozorňujeme, že při přidávání k lyzačnímu pufru musíte směs *Interní kontroly* a lyzačního pufru / nosičové RNA připravit vždy čerstvou a ihned použít (skladování směsi při pokojové teplotě nebo v lednici může již po několika hodinách vést k selhání *Interní kontroly* a nižší účinnosti izolace). *Interní kontrolu* ani nosičovou RNA **nepřidávejte** přímo ke vzorku.

Aby byla izolace hodnocena jako úspěšná, hodnota Ct *Interní kontroly* negativního vzorku plazmy zpracovaného při izolaci (sada QIAamp DSP Virus) v systému *ABI PRISM 7000*, *7700* a *7900HT SDS* musí dosahovat $Ct = 27 \pm 3$ (*prahová hodnota* pro *ABI PRISM 7000*: 0,1, pro *ABI PRISM 7700* a *7900HT SDS*: 0,2). Uvedená variabilita je podmíněna přístrojovou variabilitou a variabilitou izolace. Větší odchylka poukazuje na problémy s izolací. V tomto případě musí být izolace přezkoušena a popřípadě nově validována. Pokud se vyskytnou další otázky nebo problémy, kontaktujte prosím naši technickou podporu.

Volitelně lze *Interní kontrolu* použít **výhradně ke kontrole možné inhibice PCR** (viz Obr. 2). V tomto případě přidejte 2 µl *Interní kontroly* a 5 µl roztoku *CMV LC/RG/TM MgSol* na jednu reakci přímo do 25 µl směsi *CMV TM Master*. Na každou reakci PCR použijte 30 µl směsi Master Mix (viz postup výše) a přidejte 20 µl izolátu. Pokud připravujete jeden běh PCR pro více vzorků, zvyšte množství směsi *CMV TM Master*, *CMV LC/RG/TM Mg-Sol* a *Interní kontroly* podle počtu vzorků (viz **8.5 Příprava PCR**).

8.4 Kvantifikace

S *Kvantifikačními standardy* (*CMV LC/RG/TM QS 1–4*) dodávanými spolu s produktem se zachází stejně jako s již izolovanými vzorky a přidávají se ve stejném objemu (20 µl). Standardní křivku v systému *ABI PRISM Sequence Detection System* vytvoříte tak, že použijete všechny čtyři *Kvantifikační standardy* a definujete je jako standardy při zadání odpovídajících koncentrací (viz **8.6 Programování ABI PRISM SDS**). Import standardních křivek z předchozích běhů není se softwarem *ABI PRISM 7000*, *7700* a *7900HT SDS* možný.

Pokud jste do běhu PCR integrovali více než jeden systém *artus* pro detekci herpetických virů, analýzu těchto odlišných systémů pomocí odpovídajících *Kvantifikačních standardů* proveďte odděleně.

Upozornění: Aby byla zaručena přesná kvantifikace, důrazně doporučujeme doplnit směs Master Mix určenou pro *Kvantifikační standardy* odpovídajícím množstvím *Interní kontroly*. Pro každý *Kvantifikační standard* (*CMV LC/RG/TM QS 1 – CMV LC/RG/TM QS 4*) proto přidejte 2 µl *Interní kontroly* a 5 µl *CMV LC/RG/TM Mg-Sol* přímo do 25 µl směsi *CMV TM Master* (schématický přehled viz Obr. 2). Toto pipetovací schéma platí obecně pro *Kvantifikační standardy* CMV bez ohledu na to, kolik jich bylo použito.

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

$$\text{Výsledek (kopie/ml)} = \text{výsledek (kopie/µl)} \times \text{eluční objem (µl)}$$

* Při přípravě analýzy PCR se zvýšení objemu způsobené přidáním *Interní kontroly* nezohledňuje. Senzitivita detekčního systému není ovlivněna.

objem vzorku (ml)

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

Důležité: Na stránkách www.giagen.com/Products/ByLabFocus/MDX jsou k dispozici pokyny pro kvantitativní analýzu systémů *artus* v přístrojích *ABI PRISM 7000 SDS* (**Technical Note for quantitation on the *ABI PRISM 7000 SDS***).

8.5 Příprava PCR

Připravte pro plánované reakce potřebný počet reakčních zkumavek, případně 96jamkovou reakční destičku. Doporučené prostředky jsou uvedeny v následující tabulce:

Položka	Popis	Katalogové číslo	Výrobce	Přídržné rámy	Kompresní podložka
96jamková reakční destička	96-Well Optical Reaction Plate	4 306 737	Applied Biosystems	ne	–
Optické lepicí folie	Optical Adhesive Covers (Optické lepicí folie)	4 311 971	Applied Biosystems	–	ano
Optické zkumavky	<i>ABI PRISM</i> Optical Tubes, 8 Tubes/Strip (optické zkumavky <i>ABI PRISM</i> , 8 zkumavek/strip)	4 316 567	Applied Biosystems	ano	–
Optické zkumavky	MicroAmp [®] Optical Tubes (optické zkumavky MicroAmp [®])	N8010933	Applied Biosystems	ano	–
Optická víčka (plochá)	<i>ABI PRISM</i> Optical Caps, 8 Caps/Strip (optická víčka <i>ABI PRISM</i> , 8 víček/strip)	4 323 032	Applied Biosystems	–	ne

Upozornění: Použití reakčních zkumavek s vypouklými víčky k optickým měřením je přípustné pouze pro *ABI PRISM 7700 SDS* a vyžaduje změnu nastavení doby osvitů (viz **8.6.2 Programování *ABI PRISM 7700 SDS***, **8.6.2.5 Důležitá přidavná nastavení**).

Při přípravě PCR dbejte na to, aby byl společně s každým během PCR proveden alespoň jeden *Kvantifikační standard* a jedna negativní kontrola (*voda v kvalitě vhodné pro PCR*). Standardní křivku vytvoříte u každého běhu PCR pomocí všech *Kvantifikačních standardů* (*CMV LC/RG/TM QS 1–4*) dodávaných spolu s produktem.

Upozornění: Pro vytvoření standardní křivky důrazně doporučujeme doplnit směs Master Mix určenou pro *Kvantifikační standardy* odpovídajícím množstvím *Interní kontroly* (viz **8.4 Kvantifikace**). Před každým použitím musí být všechny reagenty zcela rozmrazeny, promíchány (opakovaným náběrem pipetou a vypuštěním pipety nebo rychlým protřepáním ve vortexu) a krátce centrifugovány.

Chcete-li pomocí *Interní kontroly sledovat jak izolaci DNA, tak možnou inhibici PCR*, interní kontrola musí být předem přidána k izolaci (viz **8.3 Interní kontrola**). V tomto případě použijte následující schéma pipetování (viz také schématický přehled na Obr. 1):

* Při použití dvojitých přídržných rámu je nutné zkumavky při vkládání a při vyjímání otevřít. K zamezení tím zapříčiněných kontaminací používejte výhradně dolní díl přídržného rámu.

	Počet vzorků	1	12
1. Příprava směsi Master Mix	CMV TM Master	25 µl	300 µl
	CMV LC/RG/TM Mg-Sol	5 µl	60 µl
	CMV TM IC	0 µl	0 µl
	Celkový objem	30 µl	360 µl
2. Příprava reakce PCR	Master Mix	30 µl	po 30 µl
	Vzorek	20 µl	po 20 µl
	Celkový objem	50 µl	po 50 µl

Chcete-li *Interní kontrolu* použít **výhradně ke kontrole inhibice PCR**, je třeba ji přidat přímo do směsi *CMV TM Master*. V tomto případě použijte následující pipetovací schéma (schématický přehled viz Obr. 2):

	Počet vzorků	1	12
1. Příprava směsi Master Mix	CMV TM Master	25 µl	300 µl
	CMV LC/RG/TM Mg-Sol	5 µl	60 µl
	CMV TM IC	2 µl	24 µl
	Celkový objem	32 µl*	384 µl
2. Příprava reakce PCR	Master Mix	30 µl	po 30 µl
	Vzorek/CMV LC/RG/TM QS 1–4	20 µl	po 20 µl
	Celkový objem	50 µl	po 50 µl

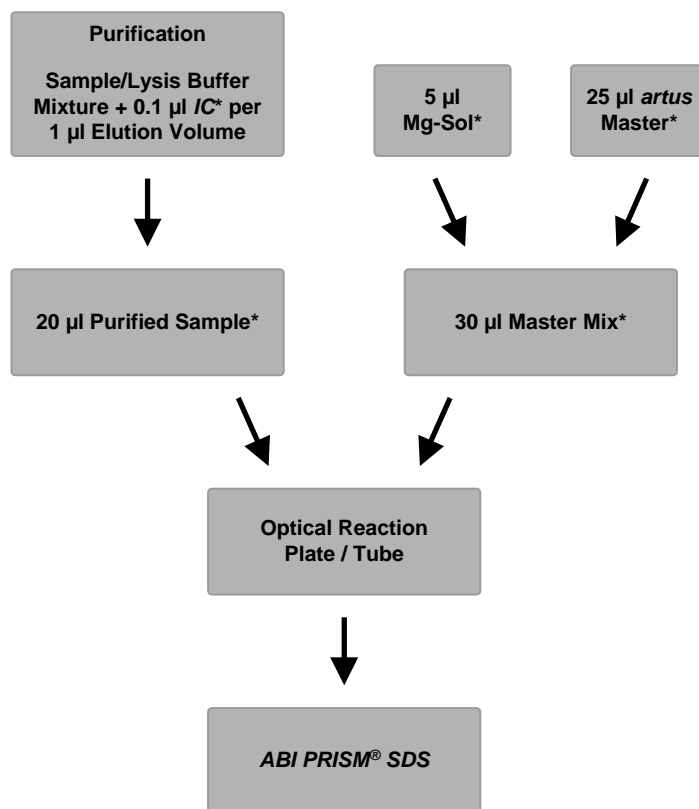
Do každé potřebné reakční zkumavky nebo jamky na 96jamkové reakční destičce odměřte pipetou 30 µl směsi Master Mix. Následně přidejte 20 µl eluátu z izolace DNA. Dbejte na to, aby byly oba roztoky dobře promíchány opakovaným náběrem pipetou a jejím vypuštěním. Zkumavky uzavřete příslušnými víčky. Pokud používáte 96jamkovou reakční destičku, uzavřete ji pomocí optických lepicích fólií (*Optical Adhesive Covers*). Pro shromáždění vkládaného objemu na dně zkumavek nebo jamek centrifugujte zkumavky (v držáku určeném pro zkumavky PCR), případně 96jamkovou reakční destičku v centrifuze vybavené rotorem pro mikrodestičky po dobu 30 sekund při 1780 x g (4000 ot/min). Pokud takovou centrifugu nemáte k dispozici, dbejte při přípravě reakcí PCR na to, aby byly Master Mix a objem vzorku pipetovány na dno zkumavek popř. reakčních jednotek (well). Reakční směsi skladujte při teplotě +4 °C, dokud nebude přístroj *ABI PRISM SDS* naprogramován (viz **8.6 Programování ABI PRISM SDS**) a pak je přeneste do přístroje.

Upozornění:

- Při použití optických reakčních zkumavek v kombinaci s optickými víčky vkládejte do přístroje (*ABI PRISM 7000, 7700 a 7900HT SDS*) vždy přídržný rám (*96Well Tray/Retainer Set*). Při použití dvojitých přídržných rámu je nutné zkumavky při vkládání a vyjímání otevřít. K zamezení tím zapříčiněných kontaminací používejte výhradně dolní díl přídržného rámu.
- Použití 96jamkových optických reakčních destiček v kombinaci s optickými lepicími foliemi vyžaduje zakrytí kompresní podložkou (*Optical Cover Compression Pads*).

* Při přípravě analýzy PCR se zvýšení objemu způsobené přidáním *Interní kontroly* nezohledňuje. Senzitivita detekčního systému není ovlivněna.

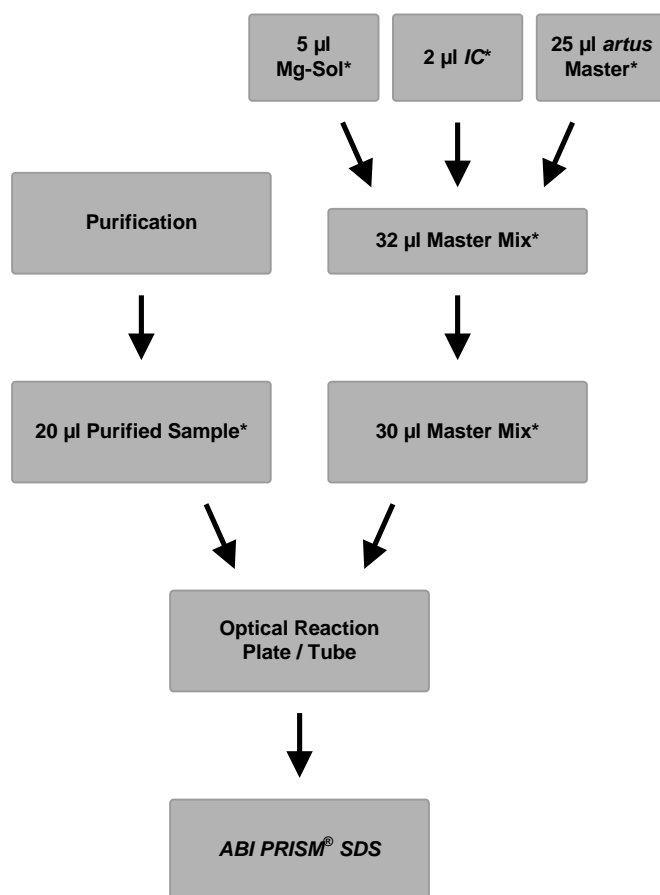
Přidání *Interní kontroly* k izolaci



Obr. 1: Schéma pracovního postupu kontroly purifikačního procesu a inhibice PCR.

*Ujistěte se, že roztoky jsou dokonale rozmrazené, dobře promíchané a krátce odstředěné.

Přidání *Interní kontroly* do směsi *artus Master*



Obr. 2: Schéma pracovního postupu kontroly inhibice PCR.

*Ujistěte se, že roztoky jsou dokonale rozmrazené, dobře promíchané a krátce odstředěné.

8.6 Programování ABI PRISM SDS

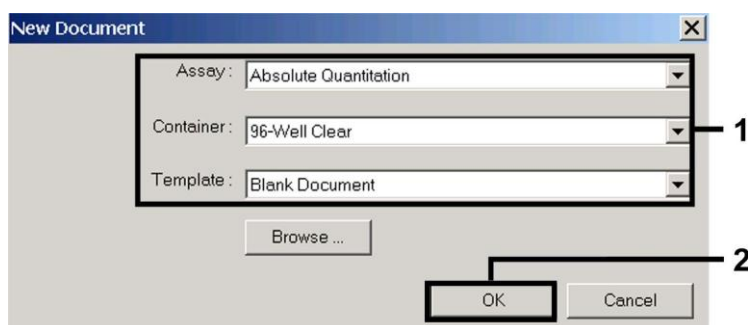
Software *ABI PRISM 7000*, *7700* a *7900HT Sequence Detection Systems (SDS)* potřebuje před spuštěním běhu PCR dodatečné informace. Postupy při programování přístrojů se od sebe významně odlišují, proto jsou v následujícím textu uvedeny v samostatných kapitolách.

8.6.1 Programování ABI PRISM 7000 SDS

K detekci CMV DNA vytvořte na přístroji *ABI PRISM 7000 SDS* profil podle následujících šesti kroků (8.6.1.1 – 8.6.1.6). Veškeré údaje se vztahují k verzi softwaru *ABI PRISM 7000 SDS 1.0.1*. Podrobnosti o programování *ABI PRISM 7000 SDS* si prosím prostudujte v *Uživatelské příručce k ABI PRISM 7000 SDS*. Pro lepší přehled jsou potřebná nastavení na obrázcích zvýrazněna černými rámečky.

8.6.1.1 Předvolená nastavení při vytváření nového běhu PCR

V systému *ABI PRISM 7000 SDS* vyberte v nabídce *File* (Soubor) položku *New* a zvolte pro nový dokument následující základní nastavení (viz Obr. 3). Dříve uložená šablona (*SDS Template* [*.sdf]) je k dispozici v seznamu *Template* nebo volbou funkce *Browse* (viz 8.6.1.5 *Uložení běhu PCR*). Předvolená nastavení potvrďte (*OK*).



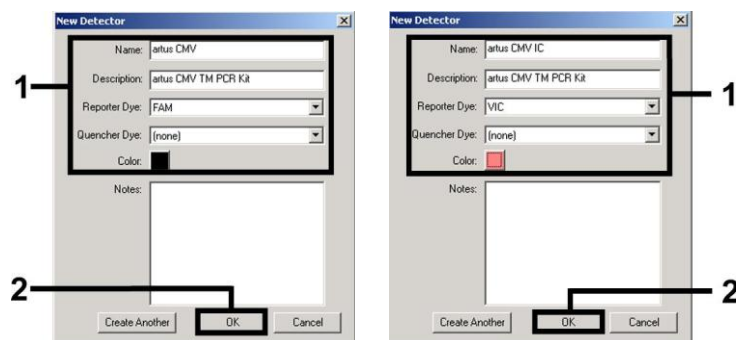
Obr. 3: Předvolená nastavení při vytváření nového běhu PCR (*New Document* (Nový dokument)).

8.6.1.2 Vytvoření/volba detektorů

V nabídce *Tools* (Nástroje) v podnabídce *Detector Manager* (Správce detektorů) přiřadte souboru odpovídající barviva detektoru. K průkazu CMV DNA a *Interní kontroly* pomocí sady *artus CMV TM PCR* je nutné definovat reporter/quencher (reportér/zhášec) uvedené v následující tabulce:

Průkaz	Reporter (Reportér)	Quencher
CMV DNA	FAM	none (žádný)
Interní kontrola (CMV TM IC)	VIC	none (žádný)

Tyto detektory vytvoříte tak, že vyberete pod položkou *File* (dole vlevo od *Detector Manager*) možnost *New*.

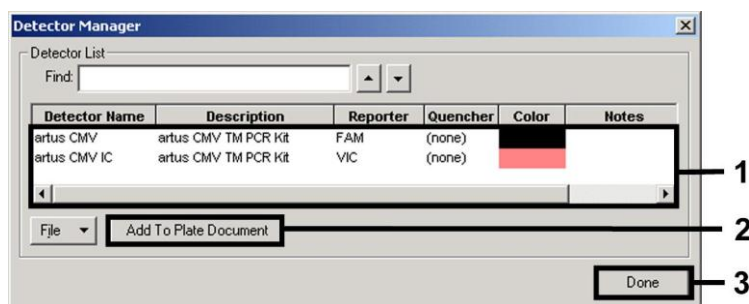


Obr. 4: Vytvoření detektoru specifického pro CMV (*Detector Manager*).

Obr. 5: Vytvoření detektoru specifického pro IC (*Detector Manager*).

V okně, které se zobrazí, definujte pro průkaz CMV DNA kombinaci reporter/quencher **FAM/none**, pro průkaz *Interní kontroly* zvolte kombinaci **VIC/none** (jak ukazuje Obr. 4 a Obr. 5). Potvrzením údajů (*OK*) se vrátíte zpět do *Detector Manager*. Právě

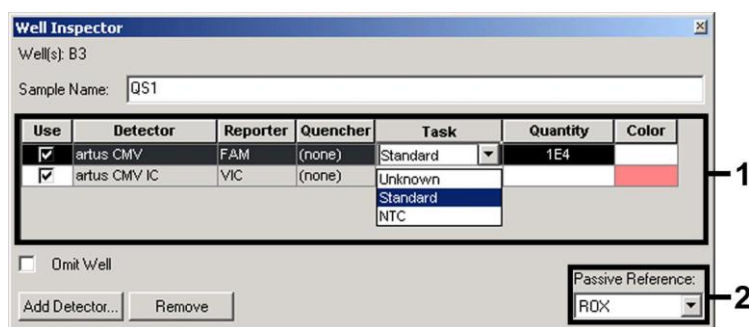
vytvořené detektory označte a každý výběr klepnutím na volbu *Add to Plate Document* (Přidat do dokumentu k destičce) přeneste do *Well Inspector* (Kontrola jamek) (viz Obr. 6). Zavřete okno (*Done*).



Obr. 6: Výběr detektorů (*Detector Manager*).

8.6.1.3 Přřazení potřebných informací k pozicím destiček

Pokud nyní v nabídce *View* (Zobrazit) otevřete položku *Well Inspector*, naleznete tam detektory zvolené podle pokynů v kapitole 8.6.1.2 (viz Obr. 7).



Obr. 7: Přřazení potřebných informací k pozicím destiček (*Well Inspector*).

Označte pozice destiček, které jsou vyhrazené pro průkaz CMV DNA. Aktivujte volbu *Use* u obou detektorů, čímž vybrané detektory přiřadíte k označeným pozicím. Objeví se zatržítka. Pro pojmenování jednotlivých reakčních směsí zvolte odpovídající pozici na destičce a zadejte název do položky *Sample Name*. Přitom pamatujte na to, že směsi se stejným *Sample Name* a stejným přiřazením detektorů bude software považovat za replikáty a zprůměruje je s ohledem na jejich kvantifikované množství původce. Pak vyberte pro každý typ vzorku odpovídající funkci (*Task*) podle následující tabulky:

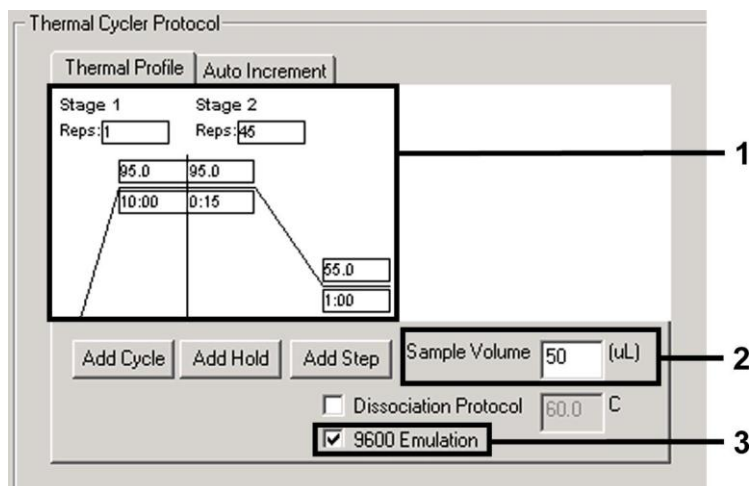
Typ vzorku	Funkce (<i>Task</i>)	Koncentrace (<i>Quantity</i>)	Reportér (<i>Reporter</i>)	Quencher
Vzorek	Unknown (Neznámá)	–	FAM	none (žádný)
Beztemplátová kontrola	NTC	–	FAM	none (žádný)
standard	standard	viz 1. . Obsah	FAM	none (žádný)

Standardní křivku vytvořte u každého běhu PCR pomocí všech *Kvantifikačních standardů* (*CMV LC/RG/TM QS 1–4*) dodávaných spolu s produktem, přičemž zadáte odpovídající koncentrace (viz 1. **Obsah**). Dbejte na to, že pro běh PCR se sadou *artus CMV TM PCR* musí být **ROX™** nastaven jako pasivní reference (*Passive Reference*). Rovnoměrné rozložení barviva ROX na všechny směsi PCR jedné šarže na základě promíchání *CMV TM Master* zaručuje rozpoznání a přepočítání variací „tube-to-tube“ (fluorescenční rozdíly mezi různými směsmi PCR) pomocí *Sequence Detection Software* (normalizace).

8.6.1.4 Vytvoření teplotního profilu

K zadání teplotního profilu přepněte software z režimu *Setup* (Nastavení) do režimu *Instrument* (Přístroj). Podle Obr. 8 zadejte platný teplotní profil pro detekci CMV DNA. Krok 50°C uložený v předvoleném nastavení odstraníte tak, že jej označíte levým

tláčítkem myši, přičemž přidržíte stisknuté tlačítko Shift, a následně jej vymažete tlačítkem Backspace. Zkontrolujte, zda je objem reakce nastaven na 50 µl. Volba *9600 Emulation* by měla být aktivována. Předvolená nastavení *Auto Incrementu* zůstávají nezměněna (*Auto Increment*: 0,0 °C, 0,0 sekund).



Obr. 8: Vytvoření teplotního profilu.

8.6.1.5 Uložení běhu PCR

Na tomto místě můžete uvedená nastavení (*Setup*) uložit jako masku, abyste je později mohli použít ve změněném nebo nezměněném stavu. Uložíte-li nastavení jako *SDS Template* (*.sdt) v adresáři *Template Directory* (místní disk [C:]\\Program Files\\ABI PRISM 7000\\Templates, zavedeného Applied Biosystems), můžete tento soubor zvolit přímo z rozbalovací nabídky *Template* (Šablona) v okně *New Document* (Nový dokument). Předlohy uložené v jiných adresářích musí být otevřeny pomocí funkce *Browse*. Před spuštěním běhu PCR dbejte prosím na to, abyste jej znovu uložili jako *SDS Document* (*.sds). Tím zajistíte ukládání dat nahromaděných v průběhu PCR.

8.6.1.6 Spuštění běhu PCR

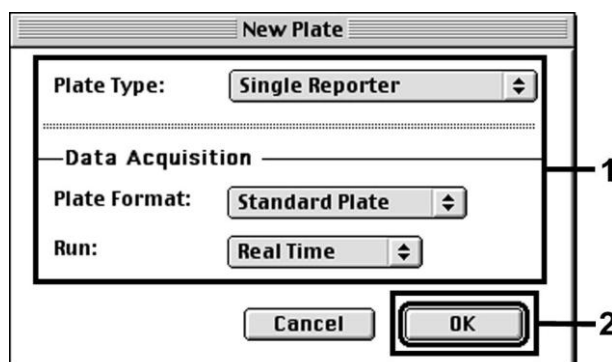
Běh PCR spusťte volbou *Start* v položce nabídky *Instrument* nebo volbou pole *Start* v režimu *Instrument*.

8.6.2 Programování ABI PRISM 7700 SDS

K detekci CMV DNA vytvořte na přístroji *ABI PRISM 7700 SDS* profil podle následujících sedmi kroků (8.6.2.1 – 8.6.2.7). Veškeré údaje se vztahují k verzi softwaru *ABI PRISM 7700 SDS* 1.9.1. Podrobnosti o programování *ABI PRISM 7700 SDS* si prosím prostudujte v Uživatelské příručce k *ABI PRISM 7700 SDS*. Pro lepší přehled jsou potřebná nastavení na obrázcích zvýrazněna černými rámečky.

8.6.2.1 Předvolená nastavení při vytváření nového běhu PCR

V systému *ABI PRISM 7700 SDS* vyberte v nabídce *File* položku *New Plate* a naprogramujte pro nový dokument následující základní nastavení (viz Obr. 9). Nastavení potvrďte (*OK*).



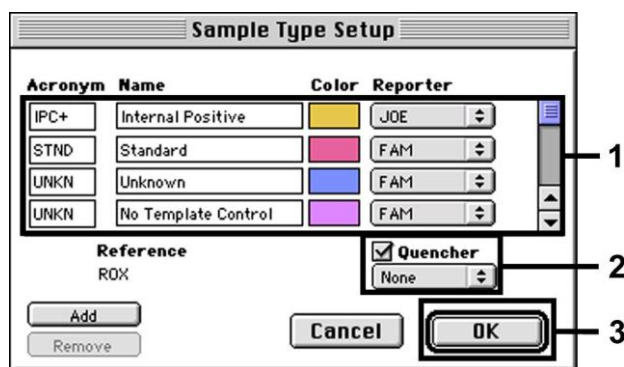
Obr. 9: Předvolená nastavení při vytváření nového běhu PCR (*New Plate*).

8.6.2.2 Volba fluorescenčního barviva a přiřazení typu vzorku

Pomocí položky *Sample Type Setup* (režim *Setup: Sample Type/Sample Type Setup*) přiřadíte dokumentu odpovídající barviva detektoru a odpovídající typ vzorku. K průkazu CMV DNA a *Interní kontroly* pomocí sady *artus CMV TM PCR* je nutné definovat reporter/quencher (reportér/zhášec) uvedené v následující tabulce:

Průkaz	Reporter (Reportér)	Quencher
CMV DNA	FAM	none (žádný)
<i>Interní kontrola (CMV TM IC)</i>	JOE	none (žádný)

Pro měření CMV DNA pomocí sady *artus CMV TM PCR* vyberte podle tabulky barvivo reportéru **FAM**. To platí pro standardy (STND), vzorky (UNKN) a pro beztemplátové kontroly (UNKN). K měření *Interní kontroly* (IPC+) definujte jako reportér **JOE**. Jako quencher nastavte **none**. Přiřazení barviv a typů vzorků v okně *Sample Type Setup* (Nastavení typu vzorku) je zobrazeno na Obr. 10.



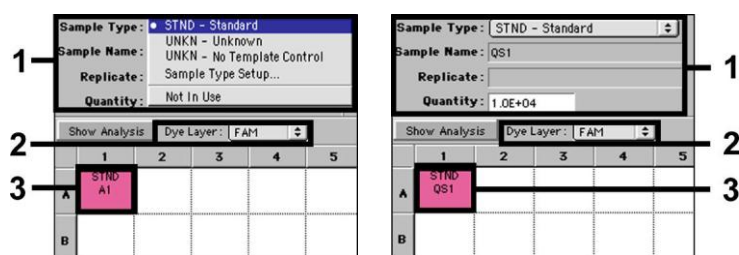
Obr. 10: Volba fluorescenčních barviv a přiřazení typu vzorku (*Sample Type Setup*).

Přiřazení typu vzorku k odpovídající funkci (*Acronym*) se provádí podle následující tabulky:

Typ vzorku	Funkce (Acronym)	Koncentrace (Quantity)	Reporter (Reportér)	Quencher
Vzorek	UNKN	–	FAM	none (žádný)
Beztemplátová kontrola	UNKN	–	FAM	none (žádný)
standard	STND	viz 1. Obsah	FAM	none (žádný)

8.6.2.3 Přiřazení potřebných informací k pozicím destiček

Pro přiřazení detektorů a typů vzorků k jednotlivým pozicím destiček zvolte odpovídající pole. Pak otevřete v režimu *Setup* dialogové okno *Dye Layer* a přiřadíte příslušný reporter. Aktivujete-li vyskakovací nabídku *Sample Type*, tak v zobrazeném seznamu znovu naleznete typy vzorků přiřazené reportéru v *Sample Type Setup* (viz Obr. 11). Vyberte vhodný typ vzorku (viz tabulka v 8.6.2.2) a určete pomocí *Dye Layer* a nabídky *Sample Type* přiřazení ke zbývajícím pozicím destičky. V poli *Sample Name* lze každému vzorku přiřadit jméno. Pole definovaná jako *Replicate* (zadání názvu kontrolního vzorku do kolonky *Replicate*) zprůměruje software vzhledem k jejich kvantifikovanému množství původce a vypočítá jejich standardní odchylku.

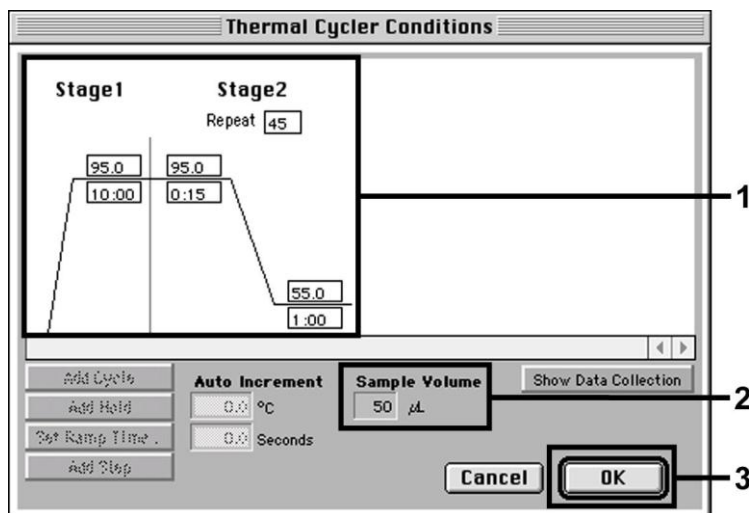


Obr. 11/12: Přiřazení potřebných informací k pozicím destiček.

Standardní křivku vytvoříte u každého běhu PCR pomocí všech *Kvantifikačních standardů (CMV LC/RG/TM QS 1–4)* dodávaných spolu s produktem, přičemž zadáte odpovídající koncentrace (viz 1. . **Obsah**; viz Obr. 12). To je však možné pouze tehdy, jestliže pozice obsazené standardy byly předem jako takové definovány pomocí nabídky *Sample Type*.

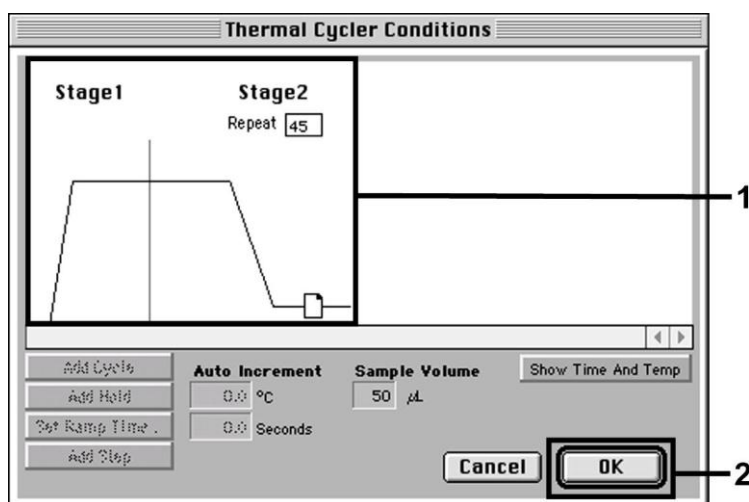
8.6.2.4 Vytvoření teplotního profilu

K zadání teplotního profilu přepněte na nabídku *Thermal Cycler Conditions* (Podmínky termocykléru) v režimu *Setup*. Podle Obr. 13 zadejte platný teplotní profil pro detekci CMV DNA. Zkontrolujte, zda je objem reakce nastaven na 50 µl. Předvolená nastavení časů *Ramp* a *Auto Increment* zůstávají nezměněna (*Ramp Time*: 0:00, *Auto Increment*: 0,0 °C, 0,0 sekund).



Obr. 13: Vytvoření teplotního profilu.

Kromě toho se v nabídce *Thermal Cycler Conditions* nachází volba *Show Data Collection*. Výběrem této možnosti se dostanete do okna zobrazeného na Obr. 14. Každá teplota *Ramp* a *Plateau* je opatřena symbolem sběru dat (*Data Collection Icon*), který znázorňuje přijetí dat v tomto určitém okamžiku běhu. Klepnutím odstráňte všechny symboly až na symbol temperovacího kroku *Annealing (Stage2/Step2)*, čímž vyloučíte zbytečná fluorescenční měření. Tak udržíte celkovou dobu běhu a množství dat co nejnižší.



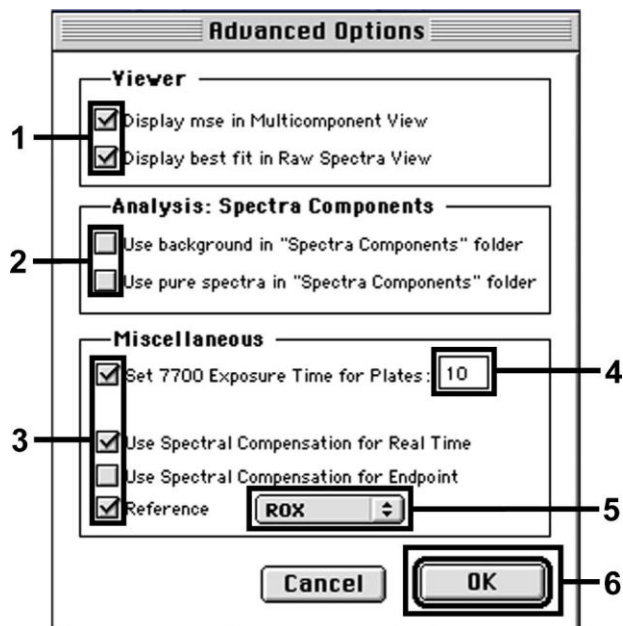
Obr. 14: Sběr dat (Data Collection).

8.6.2.5 Důležitá přídavná nastavení

K nastavení doby osvětlení (vybuzení fluorescenčního barviva) a také pro volbu souborů *Pure Spectra* a *Background* přejděte z režimu *Setup* na režim *Analysis*. V nabídce *Instrument* v podnabídce *Diagnostics* zvolte nyní aktivovanou položku *Advanced Options* (další možnosti). Proveďte nastavení podle Obr. 15. Deaktivací volitelné funkce *Spectra Components (Analysis)* (komponenty spektra (analýza)) se při novém vyhodnocování již analyzovaných běhů automaticky použijí aktuální kalibrační

data, která byla do souboru *Spectra Components* uložena ve chvíli vytváření dat. Pro analýzu starších běhů za použití nově načtených *Spectra Components* aktivujte prosím obě tato pole. Dbejte na to, že pro běh PCR se sadou *artus CMV TM PCR* musí být **ROX** nastaven jako pasivní reference (*Reference*). Rovnoměrné rozložení barviva ROX na všechny reakční směsi PCR jedné šarže na základě promíchání *CMV TM Master* zaručuje rozpoznání a přepočítání variací „tube-to-tube“ (fluorescenční rozdíly mezi různými reakčními směsmi PCR) pomocí *Sequence Detection Software* (normalizace).

Upozornění: Doba osvětlení (*Exposure Time*) při použití 96jamkových reakčních destiček pro optická měření ve spojení s optickými lepicími fóliemi (*Optical Adhesive Covers*) nebo optickými reakčními zkumavkami s plochými víčky je deset milisekund. Používáte-li **optické zkumavky s vypouklými víčky**, nastavte tento časový údaj na 25 milisekund.



Obr. 15: Důležitá přídavná nastavení (*Advanced Options*).

8.6.2.6 Uložení běhu PCR

Na tomto místě můžete uvedená nastavení (*Setup*) uložit jako masku, abyste je později mohli použít ve změněném nebo nezměněném stavu. Proto uložte tento soubor ve *Stationary File Format*. Před spuštěním aktuálně programovaného běhu PCR pamatujte na to, že jej musíte znovu uložit ve *Normal File Format*. Tím zajistíte uložení dat nahromaděných v průběhu PCR.

8.6.2.7 Spuštění běhu PCR

Běh PCR spusťte volbou *Run* v položce nabídky *Instrument* nebo polem *Run* v režimu *Analysis*.

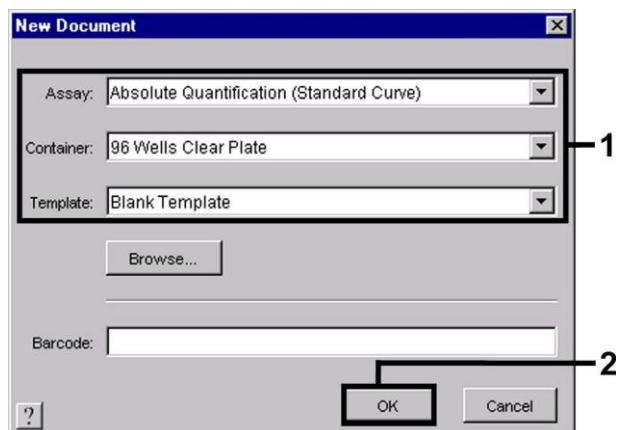
8.6.3 Programování *ABI PRISM 7900HT SDS*

K detekci CMV DNA vytvořte na přístroji *ABI PRISM 7900HT SDS* profil podle následujících šesti kroků (8.6.3.1 – 8.6.3.6). Veškeré údaje se vztahují na verzi softwaru *ABI PRISM 7900HT SDS 2.1*. Podrobnosti o programování *ABI PRISM 7900HT SDS* si prosím prostudujte v *Uživatelské příručce k ABI PRISM 7900HT SDS*. Pro lepší přehled jsou potřebná nastavení na obrázcích zvýrazněna černými rámečky.

8.6.3.1 Předvolená nastavení při vytváření nového běhu PCR

V systému *ABI PRISM 7900HT SDS* vyberte v nabídce *File* položku *New* a naprogramujte pro nový dokument následující základní nastavení (viz Obr. 16). Dříve uložená šablona (*ABI PRISM SDS Template Document [*.sdfl]*) je k dispozici v seznamu *Template* nebo pomocí funkce *Browse* (procházet; viz 8.6.3.5 Uložení běhu PCR). Nastavení potvrďte (*OK*).

Upozornění: Sadu *artus CMV TM PCR* nelze použít ve spojení s formátem destiček s 384 jamkami systému *ABI PRISM 7900HT SDS*.



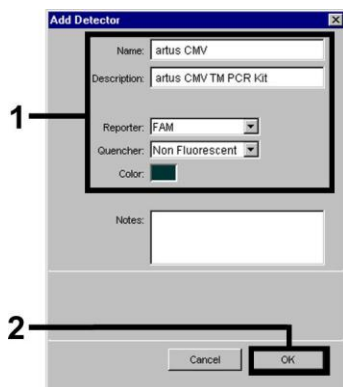
Obr. 16: Předvolená nastavení při vytváření nového běhu PCR (*New Document*).

8.6.3.2 Vytvoření/volba detektorů

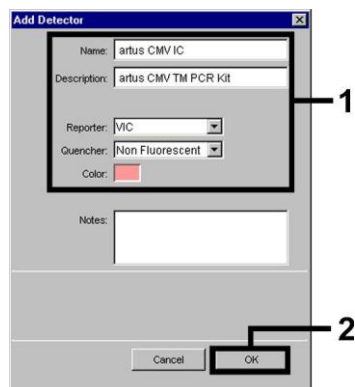
V nabídce *Tools* v podnabídce *Detector Manager* (případně výběrem funkce *Add Detector* (Přidat detektor) v režimu *Setup*), přiřadíte souboru odpovídající barviva detektoru. K průkazu *CMV DNA* a *Interní kontroly* pomocí sady *artus CMV TM PCR* je nutné definovat reporter/quencher (reportér/zhášec) uvedené v následující tabulce:

Průkaz	Reporter (Reportér)	Quencher
CMV DNA	FAM	Nefluorescenční
Interní kontrola (<i>CMV TM IC</i>)	VIC	Nefluorescenční

Tyto detektory vytvoříte tak, že v položce *Detector Manager* vyberete vlevo dole lokalizovanou možnost *New*.

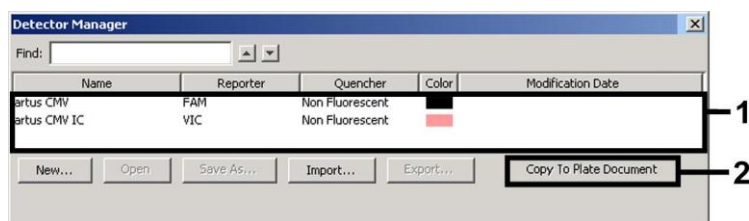


Obr. 17: Vytvoření detektoru specifického pro CMV (*Detector Manager*).



Obr. 18: Vytvoření detektoru specifického pro IC (*Detector Manager*).

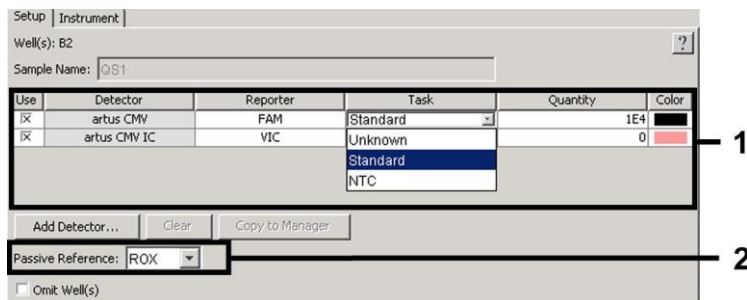
V okně, které se zobrazí, definujte pro průkaz *CMV DNA* kombinaci reporter/quencher (reportér/zhášec) **FAM/Nefluorescenční**, pro průkaz *Interní kontroly* zvolte kombinaci **VIC/Nefluorescenční** (jak ukazuje Obr. 17 a Obr. 18). Potvrzením údajů (*OK*) se vrátíte zpět do *Detector Manager*. Právě vytvořené detektory označte a každý výběr klepnutím na volbu *Copy to Plate Document* (Zkopírovat do dokumentu k destičce) přeneste do režimu *Setup* (viz Obr. 19). Zavřete okno (*Done*).



Obr. 19: Výběr detektorů (*Detector Manager*).

8.6.3.3 Přiřazení potřebných informací k pozicím destiček

Po zavření okna *Detector Manager (Done)* detektory zvolené podle pokynů v kapitole 8.6.3.2 naleznete seřazené v tabulce v režimu *Setup* (viz Obr. 20).



Obr. 20: Přiřazení potřebných informací k pozicím destiček.

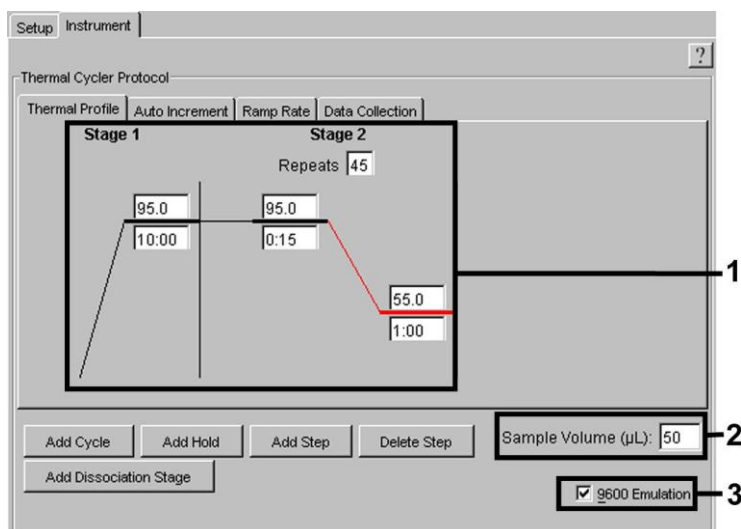
Označte pozice destiček, které jsou vyhrazené pro průkaz CMV DNA. Aktivujte volbu *Use* u obou detektorů, čímž vybrané detektory přiřadíte k označeným pozicím. Objeví se křížek. Pro pojmenování jednotlivých reakčních směsí zvolte odpovídající pozici na destičce a zadejte název do položky *Sample Name*. Přitom pamatujte na to, že směsi se stejným *Sample Name* a stejným přiřazením detektorů bude software považovat za replikáty a zprůměruje je s ohledem na jejich kvantifikované množství původce. Pak vyberte pro každý typ vzorku odpovídající funkci (*Task*) podle následující tabulky:

Typ vzorku	Funkce (<i>Task</i>)	Koncentrace (<i>Quantity</i>)	Reporter (Reportér)	Quencher
Vzorek	Unknown (Neznámá)	–	FAM	Nefluorescenční
Beztemplátová kontrola	NTC	–	FAM	Nefluorescenční
standard	standard	viz 1. . Obsah	FAM	Nefluorescenční

Standardní křivku vytvořte u každého běhu PCR pomocí všech *Kvantifikačních standardů (CMV LC/RG/TM QS 1–4)* dodávaných spolu s produktem, přičemž zadáte odpovídající koncentrace (viz 1. **. Obsah**). Dbejte na to, že pro běh PCR se sadou *artus CMV TM PCR* musí být **ROX** nastaven jako pasivní reference (*Passive Reference*). Rovnoměrné rozložení barviva ROX na všechny směsi PCR jedné šarže na základě promíchání *CMV TM Master* zaručuje rozpoznání a přepočítání variací „tube-to-tube“ (fluorescenční rozdíly mezi různými směsmi PCR) pomocí *Sequence Detection Software* (normalizace).

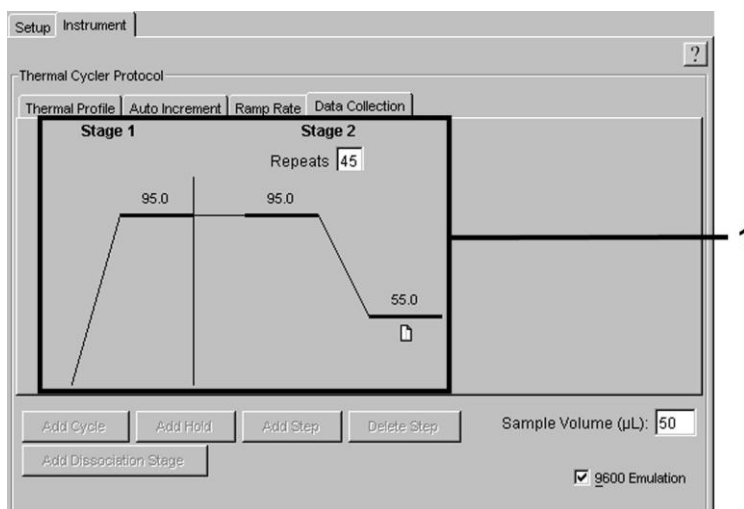
8.6.3.4 Vytvoření teplotního profilu

K zadání teplotního profilu přepněte software z režimu *Setup* do režimu *Instrument*. Podle Obr. 21 zadejte pro detekci CMV DNA platný teplotní profil. Zkontrolujte, zda je objem reakce nastaven na 50 µl. Volba *9600 Emulation* by měla být aktivována, předvolená nastavení času *Ramp Time* a *Auto Increment* zůstávají nezměněna (*Ramp Time*: 0:00, *Auto Increment*: 0,0 °C, 0,0 sekund).



Obr. 21: Vytvoření teplotního profilu.

Kromě toho se v režimu *Instrument* nachází volba *Data Collection*. Výběrem této možnosti se dostanete do okna zobrazeného na Obr. 22. Každá teplota *Ramp* a *Plateau* je opatřena jedním symbolem sběru dat (*Data Collection Icon*), který znázorňuje přijetí dat v tomto určitém okamžiku běhu. Odstraňte všechny symboly až na symbol temperovacího kroku *Annealing* (*Stage2/Step2*), čímž vyloučíte zbytečná fluorescenční měření. Tak udržíte celkovou dobu běhu a množství dat co nejnižší.



Obr. 22: Sběr dat (Data Collection).

8.6.3.5 Uložení běhu PCR

Na tomto místě můžete uvedená nastavení (*Setup*) uložit jako masku, abyste je později mohli použít ve změněném nebo nezměněném stavu. Uložíte-li nastavení jako *ABI PRISM SDS Template Document (*.sdt)* v adresáři *Template Directory* ([D:]Program Files\Applied Biosystems\SDS 2.1\Templates, zavedeném Applied Biosystems), můžete tento soubor zvolit přímo ze seznamu *Template* (Šablona) v okně *New Document* (Nový dokument). Předlohy uložené v jiných adresářích musí být otevřeny pomocí funkce *Browse*. Před spuštěním aktuálního běhu PCR dbejte prosím na to, abyste jej znovu uložili jako *ABI PRISM SDS Document (*.sds)*. Tím zajistíte ukládání dat nahromaděných v průběhu PCR.

8.6.3.6 Spuštění běhu PCR

Běh PCR spustíte volbou *Start* v položce nabídky *Instrument*.

9. Analýza dat

Při uvedení přístroje do provozu je bezpodmínečně nutná jsoucí platná kalibrace barviv (**Pure Spectra Component File**) a pozadí (**Background Component File**). Tyto kalibrační soubory slouží následujícím způsobem pro přesný výpočet výsledků:

Veškeré přístrojem podmíněné rušivé signály, které ovlivňují měření, jsou eliminovány programem *Sequence Detection Software* přístrojů *ABI PRISM Sequence Detection Systems* za pomoci *Background Component File*.

Navíc se u vícebarevných analýz vyskytují mezi emisními spektry jednotlivých fluorescenčních barviv interference. Software *ABI PRISM SDS* kompenzuje tyto interference přepočítáním pomocí spektrálních dat jednotlivých barviv uložených v *Pure Spectra Component File*. Přiřazení fluorescenčních dat shromážděných v průběhu PCR v celém měřitelném spektru k naprogramovaným detektorům provádí software také pomocí souboru *Pure Spectra Component*. Následně se zjištěná fluorescenční data jednotlivých barviv vydělí hodnotou signálu pasivní reference (ROX) pro přepočítání variací „tube-to-tube“ (fluorescenční rozdíly mezi různými reakčními směsmi PCR). Tímto způsobem normalizované signály lze vyhodnotit pomocí *Amplification Plot*.

Kalibrační soubory použité při vyhodnocení běhu PCR jsou automaticky zajištěny při ukládání dat. Pokud nejsou instalovány žádné **kalibrační soubory**, vytvořte tyto soubory podle pokynů v *Uživatelské příručce / Manuálu k ABI PRISM SDS*.

Pokud do běhu PCR integrujete více než jeden systém *artus*™ PCR (**dbejte na teplotní profil**), analyzujte tyto testovací systémy odděleně. Vzorky s totožným označením (*Sample Name*) a přiřazením detektoru identifikuje *ABI PRISM 7000* a *7900HT SDS Software* automaticky jako replikáty a zprůměruje je s ohledem na kvantifikované množství původce.

Při analýze kvantitativních běhů se držte pokynů uvedených v kapitole **8.4 Kvantifikace** a v dokumentu **Technical Note for quantitation on the ABI PRISM 7000 SDS**, který je k dispozici na stránkách www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

Pokud jste do běhu PCR integrovali více než jeden systém *artus* pro detekci herpetických virů, analýzu těchto odlišných systémů pomocí odpovídajících *Kvantifikačních standardů* proveďte odděleně. Obdobně zvolte pozice vzorků určených k analýze.

Mohou se objevit následující výsledky:

1. Je detekován fluorescenční signál FAM.

Výsledek analýzy je pozitivní: Vzorek obsahuje CMV DNA.

V tomto případě je detekce fluorescenčního signálu VIC/JOE (*Interní kontrola*) podružná, protože vysoké výchozí koncentrace CMV DNA (pozitivní fluorescenční signál FAM) mohou vést k redukovanému až chybějícímu fluorescenčnímu signálu *Interní kontroly* (kompetice).

2. Není detekován žádný fluorescenční signál FAM. Současně se objevuje z *Interní kontroly* fluorescenční signál VIC/JOE.

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

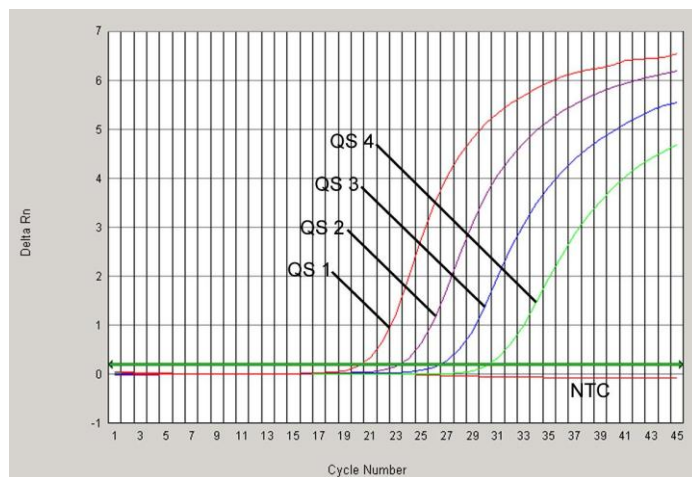
Při negativní CMV PCR vylučuje detekovaný signál *Interní kontroly* možnost inhibice PCR.

3. Není detekován ani fluorescenční signál FAM, ani fluorescenční signál VIC/JOE.

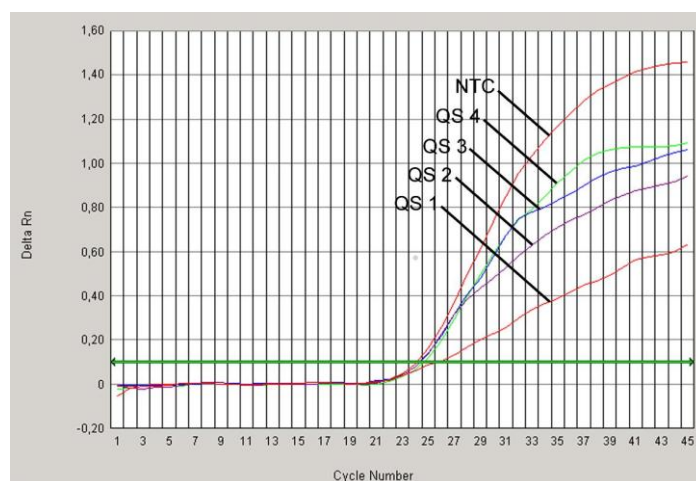
Není možné učinit diagnostický závěr.

Pokyny týkající se příčin chyb a jejich řešení najdete v kapitole **10**. **Odstraňování poruch.**

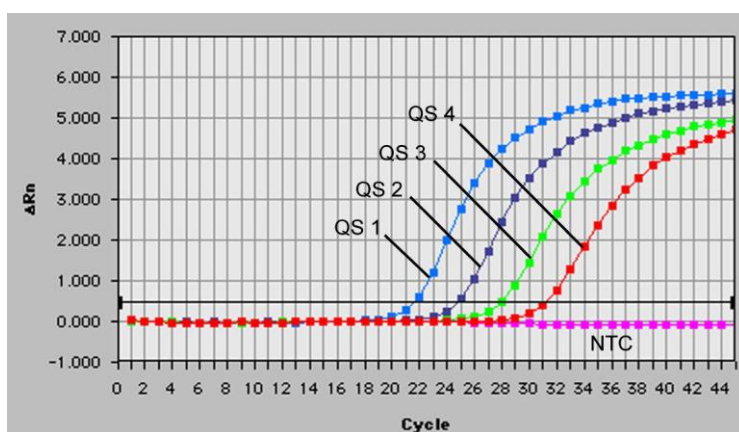
Příklady pozitivních a negativních reakcí PCR jsou uvedeny na obrázcích 23/24 (**ABI PRISM 7000 SDS**), 25/26 (**ABI PRISM 7700 SDS**) a 27/28 (**ABI PRISM 7900HT SDS**).



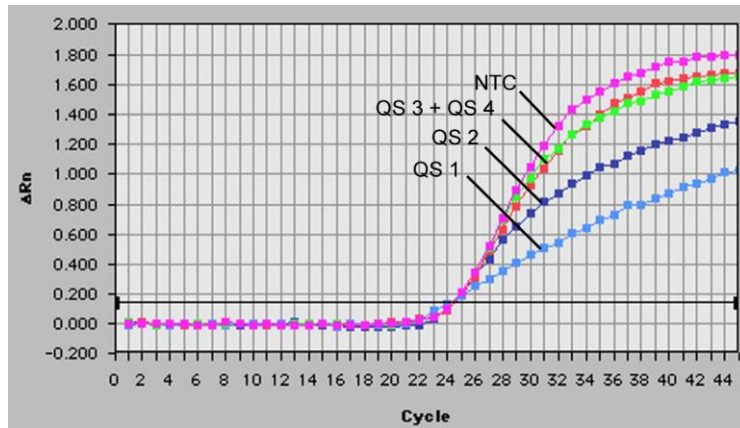
Obr. 23: Průkaz Kvantifikačních standardů (CMV LC/RG/TM QS 1–4) detekcí fluorescenčního signálu FAM (**ABI PRISM 7000 SDS**). NTC: bezteplátová kontrola (negativní kontrola).



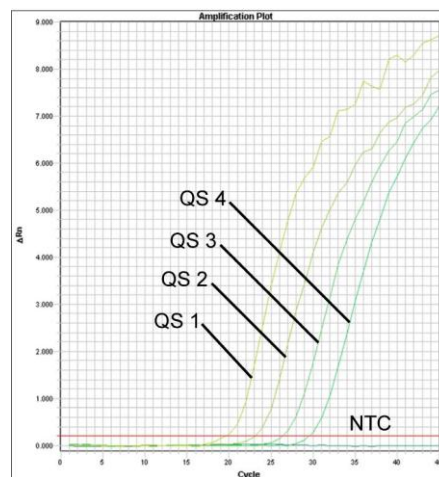
Obr. 24: Průkaz Interní kontroly (IC) detekcí fluorescenčního signálu VIC (**ABI PRISM 7000 SDS**) při současné amplifikaci Kvantifikačních standardů (CMV LC/RG/TM QS 1–4). NTC: bezteplátová kontrola (negativní kontrola).



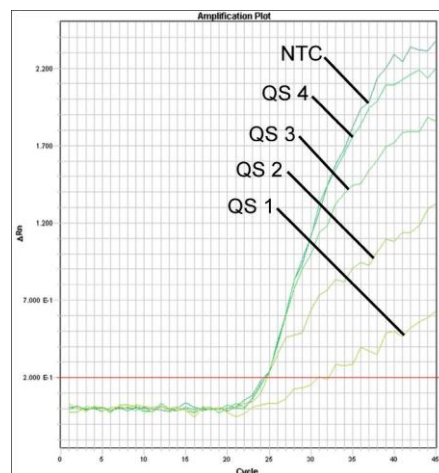
Obr. 25: Průkaz Kvantifikačních standardů (CMV LC/RG/TM QS 1–4) detekcí fluorescenčního signálu FAM (**ABI PRISM 7700 SDS**). NTC: bezteplátová kontrola (negativní kontrola).



Obr. 26: Průkaz *Interní kontroly (IC)* detekcí fluorescenčního signálu JOE (**ABI PRISM 7700 SDS**) při současné amplifikaci *Kvantifikačních standardů (CMV LC/RG/TM QS 1–4)*. NTC: beztemplátová kontrola (negativní kontrola).



Obr. 27: Průkaz *Kvantifikačních standardů (CMV LC/RG/TM QS 1–4)* detekcí fluorescenčního signálu FAM (**ABI PRISM 7900HT SDS**). NTC: beztemplátová kontrola (negativní kontrola).



Obr. 28: Průkaz *Interní kontroly (IC)* detekcí fluorescenčního signálu VIC (**ABI PRISM 7900HT SDS**) při současné amplifikaci *Kvantifikačních standardů (CMV LC/RG/TM QS 1–4)*. NTC: beztemplátová kontrola (negativní kontrola).

10. Odstraňování poruch

Žádný fluorescenční signál FAM při pozitivních kontrolách (**CMV LC/RG/TM QS 1–4**):

- Volba barviva detektoru při analýze dat PCR neodpovídá protokolu.

- K analýze dat zvolte barvivo detektoru FAM pro analytickou CMV PCR a barvivo detektoru VIC/JOE pro PCR *Interní kontroly*.
- Nastavení uvedená v položce *Options* k vyhodnocení získaných dat (*Extension Phase Data Extraction*) se neshodují s nastaveními *Data Collection* (pro *ABI PRISM 7700 SDS* viz **8.6.2.4 Vytvoření teplotního profilu**, pro *ABI PRISM 7900HT SDS* viz **8.6.3.4 Vytvoření teplotního profilu**).
 - Analyzujte běh PCR s opraveným nastavením a zopakujte vyhodnocení (*Analysis*).
- Naprogramování teplotního profilu *ABI PRISM Sequence Detection Systems* je chybné.
 - Porovnejte teplotní profil s údaji protokolu (viz **8.6 Programování ABI PRISM SDS**).
- PCR reakce byla chybně sestavena.
 - Porovnejte svůj pracovní postup s pipetovacím schématem (viz **8.5 Příprava PCR**), případně PCR zopakujte.
- Podmínky uchování jednoho nebo více komponentů sady neodpovídají pokynům uvedeným v kapitole **2. . kladování** nebo je sada *artus CMV TM PCR* prošlá.
 - Prosím zkontrolujte jak podmínky skladování, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.

Slabý nebo chybějící signál *Interní kontroly* negativního vzorku plazmy zpracovaného při izolaci (sada QIAamp DSP Virus) (fluorescenční signál VIC/JOE; odchylka větší než $Ct = 27 \pm 3$; prahová hodnota *ABI PRISM 7000*: 0,1, pro *ABI PRISM 7700* a *7900HT SDS*: 0,2) při současné nepřítomnosti fluorescenčního signálu FAM u specifické CMV PCR:

- Podmínky PCR neodpovídají protokolu.
 - Zkontrolujte podmínky PCR (viz výše) a popř. PCR zopakujte s opraveným nastavením.
- Došlo k inhibici PCR.
 - Ujistěte se, že používáte doporučený postup izolace (viz **8.2 Izolace DNA**) a držte se přesně předpisů výrobce.
 - Přesvědčte se, že byla během izolace DNA před elucí provedena doporučená dodatečná centrifugace, aby byly odstraněny veškeré zbytky etanolu (viz **8.2 Izolace DNA**).
- Během izolace došlo k úbytku DNA.
 - Pokud byla k izolaci přidána *Interní kontrola*, nepřítomnost signálu *Interní kontroly* může znamenat úbytek DNA během izolace. Ujistěte se, že používáte doporučenou izolační metodu (viz **8.2 Izolace DNA**), a držte se přesně pokynů výrobce.
- Podmínky uchování jednoho nebo více komponentů sady neodpovídají pokynům uvedeným v kapitole **2. . kladování** nebo je sada *artus CMV TM PCR* prošlá.
 - Zkontrolujte jak podmínky uchování, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek sady) a použijte popř. sadu novou.

Fluorescenční signál FAM analytické PCR při negativních kontrolách:

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

Máte-li další otázky nebo problémy, kontaktujte prosím naše Technické služby.

11. Specifikace

11.1 Analytická senzitivita

Pro validaci sady *artus CMV TM PCR* byl určen jak analytický limit detekce, tak analytický limit detekce s přihlédnutím k izolaci (limit senzitivity). Analytický limit detekce s ohledem na izolaci byl určen na základě CMV pozitivních klinických vzorků s využitím konkrétní metody izolace. Analytický limit detekce byl naproti tomu determinován na základě CMV DNA známé koncentrace, bez klinických vzorků a nezávisle na zvolené metodě izolace.

Pro určení **analytické senzitivity** sady *artus* CMV TM PCR byla vytvořena řada ředění genomové CMV DNA od 10 do nominálně 0,00316 kopie CMV/μl. Ta byla následně analyzována za použití sady *artus* CMV TM PCR na přístroji *ABI PRISM 7000*, *7700* a *7900HT Sequence Detection System*. Experimenty byly pro každý přístroj provedeny ve třech různých dnech formou osminásobných určení. Výsledky byly zjištěny probitovou analýzou.

Limit detekce (p = 0,05)	
<i>ABI PRISM 7000 SDS</i>	0,20 kopie/μl
<i>ABI PRISM 7700 SDS</i>	0,20 kopie/μl
<i>ABI PRISM 7900HT SDS</i>	0,17 kopie/μl

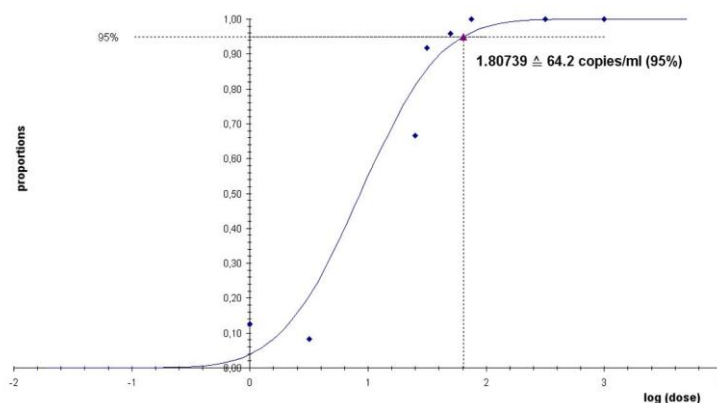
To znamená, že je s 95% pravděpodobností detekováno 0,20 kopie/μl (*ABI PRISM 7000 SDS*), 0,20 kopie/μl (*ABI PRISM 7700 SDS*) a 0,17 kopie/μl (*ABI PRISM 7900HT SDS*).

Analytická senzitivita s ohledem na izolaci (sada QIAamp DSP Virus) sady *artus* CMV TM PCR byla určena řadou ředění z materiálu viru CMV od 1 000 do nominálně 0,316 kopie CMV/ml v klinických vzorcích plazmy. Tyto vzorky byly podrobeny izolaci DNA pomocí QIAamp DSP Virus Kit (extrakční objem: 0,5 ml, eluční objem: 70 μl). Jednotlivé fáze ředění z celkových osmi byly analyzovány ve třech různých dnech formou osminásobných určení za užití sady *artus* CMV TM PCR na přístroji *ABI PRISM 7000*, *7700* a *7900HT SDS*. Výsledky byly zjištěny probitovou analýzou a jsou uvedeny v následující tabulce:

Limit detekce (p = 0,05) s ohledem na izolaci	
<i>ABI PRISM 7000 SDS</i>	64,2 kopie/ml
<i>ABI PRISM 7700 SDS</i>	100,5 kopie/ml
<i>ABI PRISM 7900HT SDS</i>	53,5 kopie/ml

Grafické zobrazení pro systém *ABI PRISM 7000 SDS* ukazuje Obr. 29. Analytický limit detekce s ohledem na izolaci sady *artus* CMV TM PCR je 64,2 kopie/ml (p = 0,05). To znamená, že bude s 95 % pravděpodobností detekováno 64,2 kopie/ml.

Probitová analýza: Cytomegalovirus (ABI PRISM 7000 SDS)



Obr. 29: Analytická senzitivita s ohledem na izolaci (sada QIAamp DSP Virus) sady *artus* CMV TM PCR (*ABI PRISM 7000 SDS*).

11.2 Specifická

Specifická sady *artus* CMV TM PCR je v první řadě zaručena výběrem primerů a sond, jakož i volbou přísných reakčních podmínek. Primery a sondy byly na základě sekvenční analýzy přezkoušeny na eventuální homologie se všemi sekvencemi publikovanými v genových bankách. Tím byla zajištěna detekovatelnost všech relevantních kmenů.

Specifická byla navíc validována pomocí 100 různých CMV negativních vzorků plazmy, které spolu s CMV specifickými primery a sondami obsaženými ve směsi *CMV TM Master* negenerovaly žádný signál.

K určení specifické sady *artus* CMV TM PCR byla kontrolní skupina uvedená v následující tabulce (viz Tabulka 1) testována na křížovou reaktivitu. Žádný z testovaných původců nebyl reaktivní. Při smíšených infekcích se nevyskytly žádné křížové reaktivity.

Tabulka 1: Testování specifity diagnostické sady pomocí potenciálně křížově reaktivních patogenů.

Kontrolní skupina	CMV (FAM)	Interní kontrola (VIC)
Lidský herpesvirus 1 (Herpes simplex virus 1)	–	+
Lidský herpesvirus 2 (Herpes simplex virus 2)	–	+
Lidský herpesvirus 3 (Varicella zoster virus)	–	+
Lidský herpesvirus 4 (virus Epsteina a Barrové)	–	+
Lidský herpesvirus 6A	–	+
Lidský herpesvirus 6B	–	+
Lidský herpesvirus 7	–	+
Lidský herpesvirus 8 (herpesvirus asociovaný s Kaposiho sarkomem)	–	+
Virus hepatitidy A	–	+
Virus hepatitidy B	–	+
Virus hepatitidy C	–	+
Virus lidské imunodeficiency 1	–	+
Lidský virus leukémie T-buněk 1	–	+
Lidský virus leukémie T-buněk 2	–	+
Virus západonilské horečky	–	+
Enterovirus	–	+
Parvovirus B19	–	+

11.3 Přesnost

Údaje o přesnosti sady *artus* CMV TM PCR, které byly získány s využitím *ABI PRISM 7000 SDS*, umožňují určit celkovou variabilitu testovacího systému. Tato celková variabilita se skládá z **intraassay variability** (variabilita výsledků vzorků stejné koncentrace v rámci jednoho pokusu), z **interassay variability** (variabilita výsledků rozboru generovaných na různých přístrojích stejného typu a provedených různými osobami v jedné laboratoři) a z **interbatch variability** (variabilita výsledků rozboru za užití různých šarží). Přitom byla vždy vypočítána standardní odchylka, variance a koeficient variace jak pro specifickou PCR původce, tak i pro PCR *Interní kontroly*.

Údaje o přesnosti byly pro sadu *artus* CMV TM PCR stanoveny na základě *Kvantifikačního standardu* s nejnižší koncentrací (QS 4; 10 kopií/μl). Experimenty byly provedeny v osmi replikátech. Údaje o přesnosti byly vypočítány na základě Ct hodnot amplifikačních křivek (Ct: prahový cyklus (*threshold cycle*), viz Tabulka 2). Pomocí odpovídajících Ct hodnot byly navíc určeny údaje o přesnosti pro kvantitativní výsledky v kopiích/μl (viz Tabulka 3). Na základě těchto výsledků činí celkový statistický rozptyl libovolného vzorku uvedené koncentrace 1,06 % (Ct), resp. 12,93 % (konc.), pro průkaz *Interní kontroly* 1,14 % (Ct). Tyto hodnoty se zakládají na souhrnu všech dílčích hodnot zjištěných variabilit.

Tabulka 2: Údaje o přesnosti na základě hodnot Ct.

	Směrodatná odchylka	Variance	Koeficient variace [%]
Variabilita v rámci jednoho pokusu: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	0,10	0,01	0,33
Variabilita v rámci jednoho pokusu: <i>Interní kontrola</i>	0,12	0,01	0,50
Variabilita mezi různými pokusy: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	0,21	0,04	0,67
Variabilita mezi různými pokusy: <i>Interní kontrola</i>	0,30	0,09	1,23
Variabilita mezi různými šaržemi: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	0,32	0,10	1,01
Variabilita mezi různými šaržemi: <i>Interní kontrola</i>	0,26	0,07	1,05

Celková variabilita: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	0,33	0,11	1,06
Celková variabilita: <i>Interní kontrola</i>	0,28	0,08	1,14

Tabulka 3: Údaje o přesnosti na základě kvantitativních hodnot (v kopiích/μl).

	Směrodatná odchylka	Variance	Koeficient variance [%]
Variabilita v rámci jednoho pokusu: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	0,72	0,52	7,20
Variabilita mezi různými pokusy: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	1,25	1,57	12,45
Variabilita mezi různými šaržemi: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	1,53	2,33	15,10
Celková variabilita: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	1,30	1,70	12,93

11.4 Robustnost

Přezkoušení robustnosti slouží k stanovení celkové četnosti chyb sady *artus CMV TM PCR*. 100 CMV negativních vzorků plazmy bylo smíseno s DNA viru CMV na konečnou koncentraci 170 kopií/μl (přibližně trojnásobná koncentrace analytického limitu senzitivity). Po izolaci pomocí sady QIAamp DSP Virus (viz **8.2 Izolace DNA**) byly tyto vzorky analyzovány s využitím sady *artus CMV TM PCR*. Četnost chyb pro CMV činila u všech vzorků 0 %. Robustnost *Interní kontroly* byla dodatečně přezkoušena izolací a analýzou 100 CMV negativních vzorků plazmy. Robustnost sady *artus CMV TM PCR* činí tedy ≥ 99 %.

11.5 Reprodukovatelnost

Údaje o reprodukovatelnosti jsou požívány za účelem pravidelného hodnocení výkonnosti sady *artus CMV TM PCR Kit* a výkonnostního srovnání s ostatními produkty. Tyto údaje jsou získávány na základě účasti v uznávaných programech pro výkonnostní hodnocení.

11.6 Diagnostické hodnocení

Sada *artus CMV TM PCR* byla hodnocena v jedné studii. Při srovnání sady *artus CMV TM PCR* se sadou COBAS[®] AMPLICOR[®] CMV MONITOR[®] Test bylo retrospektivně a prospektivně analyzováno 154 klinických vzorků EDTA plazmy. Všechny vzorky byly předběžně v rámci rutinní diagnostiky testovány s pozitivním, resp. negativním nálezem pomocí sady COBAS AMPLICOR CMV MONITOR.

Vzorky určené pro testování sady *artus CMV TM PCR* byly po přidání *Interní kontroly* (součást sady *artus CMV TM PCR*) izolovány pomocí sady QIAamp DSP Virus. Následně byla provedena jejich analýza s využitím systému *ABI PRISM 7000 SDS*. Vzorky určené pro sadu COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test byly izolovány a testovány podle pokynů výrobce uvedených v příbalových informacích.

Všech 11 vzorků, jejichž analýza s využitím sady COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test byla pozitivní, vyšlo pozitivních i při testu pomocí sady *artus CMV TM PCR*. Celkem 125 vzorků bylo negativních jak s využitím sady COBAS AMPLICOR CMV MONITOR, tak *artus CMV TM PCR*. 18 výsledků se neshodovalo. Výsledky jsou znázorněny v Tabulka 4.

Tabulka 4: Výsledky srovnávací validační studie.

		COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test		
		+	-	Celkem
sada <i>artus</i> <i>CMV TM PCR</i>	+	11	18	29
	-	0	125	125

Použijeme-li výsledky sady COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test jako referenci, diagnostická senzitivita všech vzorků sady *artus* CMV TM PCR činí 100 % a diagnostická specifická 87,4 %.

Další analýza 18 diskrepantních vzorků potvrdila výsledky sady *artus* PCR. Lze tudíž předpokládat, že diskrepance je podmíněna vyšší senzitivitou sady *artus* CMV TM PCR.

12. Zvláštní pokyny pro použití produktu

- Všechny reagentie se smí používat výhradně pro diagnostiku in vitro.
- Produkt by měli používat pouze pracovníci, kteří jsou speciálně poučeni a vyškoleni v metodice diagnostiky in vitro.
- Přesné dodržování protokolu je bezpodmínečně nutné k dosažení optimálních výsledků PCR.
- Dbejte na konec doby použitelnosti uvedený na balení a na štítcích jednotlivých komponent. Nepoužívejte reagentie s prošlou trvanlivostí.
- V ojedinělých případech mohou mutace ve vysoce konzervovaných oblastech virového genomu, které jsou pokryty primery a/nebo sondami soupravy, vést k nedostatečné kvantifikaci nebo k selhání detekce přítomnosti viru. Validita a účinnost testu jsou pravidelně kontrolovány.

13. Bezpečnostní informace

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v odpovídajících bezpečnostních listech (BL). Bezpečnostní listy jsou k dispozici online v pohodlném a kompaktním formátu PDF na stránkách www.qiagen.com/safety, kde můžete nalézt, zobrazit a vytisknout BL pro každou sadu QIAGEN® a pro každou komponentu těchto sad.

Odpad ze vzorků a rozborů likvidujte podle místních bezpečnostních předpisů.















14. Kontrola kvality

V souladu se systémem komplexního managementu jakosti společnosti QIAGEN byla každá šarže sady *artus* CMV TM PCR testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zaručena jednotná kvalita produktu.

15. Literatura

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.

16. Vysvětlení symbolů

	Použijte do
	Číslo šarže
	Výrobce
	Katalogové číslo
	Číslo materiálu
	Příručka
	Prostředek zdravotnické techniky pro in vitro diagnostiku
	Díly
	Obsahuje
	Počet
	Mezinárodní číslo obchodní položky GTIN
 <N>	Obsahuje reagentie dostačující pro <N> testů
	Teplotní rozmezí
	Další informace viz návod k použití
QS	<i>Kvantifikační standard</i>
IC	<i>Interní kontrola</i>
Mg-Sol	<i>Roztok hořčíku</i>

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)

1046905CS 148051759

