

artus[®] HSV-1/2 RG PCR készlet kézikönyv



24 (katalógusszám: 4500263)



96 (katalógusszám: 4500265)

1-es verzió



Kvalitatív in vitro diagnosztika

Rotor-Gene[®] Q készülékekkel való használatra



REF

4500263, 4500265



1060171HU



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NÉMETORSZÁG

R2

MAT

1060171HU



QIAGEN Sample és Assay Technologies

A QIAGEN vezető szállító az innovatív mintafeldolgozási és vizsgálati technológiák terén, lehetővé téve bármely biológiai minta tartalmának izolálását és detektálását. Fejlett, magas minőségű termékeink és szolgáltatásaink sikereket biztosítanak ügyfeleinknek a mintától az eredményekig.

A QIAGEN meghatározó az alábbi területeken:


- DNS, RNS és fehérjék tisztítása
- Nukleinsav- és fehérjevizsgálatok
- mikro-RNS kutatás és RNSi
- Mintafeldolgozási és vizsgálati technológiák automatizálása

Küldetésünk, hogy lehetővé tegyünk Önnek sikereket és áttöréseket elérését. További információért látogassa meg weboldalunk: www.qiagen.com.

Tartalom

A készlet tartalma	4
Jelek	4
Tárolás	5
Alkalmazási terület	5
A termék használatának korlátjai	6
Technikai segítségnyújtás	6
Minőség-ellenőrzés	6
Figyelmeztetések és óvintézkedések	7
Bevezetés	8
Alapelvek	8
Pathogenitási információk	8
Teljesítményjellemzők	9
Analitikai érzékenység	9
Specifitás	10
Pontosság	13
Megbízhatóság	16
Reprodukálhatóság	16
A felhasználó által biztosítandó eszközök és reagensek	17
Fontos megjegyzések	18
Általános óvintézkedések	18
DNS-izolálás	18
Belső kontroll	19
Protokoll: PCR és adatelemzés	20
Hibaelhárítási útmutató	30
Hivatkozások	33
Rendelési információk	34

A készlet tartalma

artus HSV-1/2 RG PCR Kit		(24)	(96)
Katalógusszám		4500263	4500265
Reakciók száma		24	96
Kék	HSV-1/2 RG master	2 x 300 µl	8 x 300 µl
Sárga	HSV-1/2 RG Mg-Sol* Mg-Sol	600 µl	600 µl
Piros	HSV-1 RG PC [†] (100 kópia/µl)	200 µl	200 µl
Barna	HSV-2 RG PC [†] (100 kópia/µl)	200 µl	200 µl
Zöld	HSV-1/2 RG IC [‡] IC	1000 µl	2 x 1000 µl
Fehér	Water (PCR grade) (Víz (PCR-szintű))	1000 µl	1000 µl
	Kézikönyv 	1	1

* Magnézium-oldat

† Pozitív kontroll

‡ Belső kontroll

Jelek



<N>

<N> vizsgálat elvégzéséhez elegendő reagenst tartalmaz



Lejárat



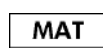
In vitro diagnosztikus orvosi eszköz



Katalógusszám




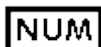





Tételszám



Anyagszám



Összetevők

	Tartalma
	Szám
	Globális kereskedelmi áruazonosító szám (GTIN)
	Hőmérséklet-korlátozás
	Jogi gyártó
	Lásd a kézikönyvben található információt
	Fontos megjegyzés

Tárolás

Az *artus* HSV-1/2 RG PCR készlet részegységeit -15 és -30°C közötti hőmérsékleten kell tárolni, ahol a címkén található lejáratí időig stabilak maradnak. Kerülni kell az ismételt (több, mint kétszeri) felolvasztást-lefagyasztást, mivel ez ronthatja a minőséget. Ha a reagenseket csak alkalomszerűen használja, aliquotolva fagyasztva tárolja. A $2-8^{\circ}\text{C}$ -on történő tárolás ne haladja meg az 5 órát.

Alkalmazási terület

Az *artus* HSV-1/2 RG PCR készlet egy valós idejű polimeráz láncreakción (PCR) alapuló vizsgálat a humán herpes simplex vírus 1 és 2 DNS-ének kimutatására és elkülönítésére Rotor-Gene Q készüléken a HSV-fertőzött alanyok liquormintáinak (CSF) EZ1[®] DSP Virus készlettel történt teljesen automatizált feldolgozása után.

 Az *artus* HSV-1/2 RG PCR készlet nem használható Rotor-Gene Q 2plex készülékekkel.

Az *artus* HSV-1/2 RG PCR készlet a klinikai jelekkel és a betegség prognózisának más laboratóriumi jeleivel együtt alkalmazandó.

A termék használatának korlátjai

Minden reagens kizárólag in vitro diagnosztikai célra használható.

Ezt a terméket kizárólag olyan személy használhatja, aki képzett és gyakorlott in vitro diagnosztikai eljárások (EN375) területén.

Az optimális PCR-eredmények eléréséhez a felhasználói kézikönyv pontos követése szükséges.

Figyelni kell a dobozon és minden összetevő címkéjén található lejári időkre. Ne használjon lejárt reagenseket.

Technikai segítségnyújtás

A QIAGEN vállalatnál büszkék vagyunk az általunk nyújtott műszaki segítségnyújtás elérhetőségére és minőségére. Műszaki szervizosztályainkon a minta-előkészítési és vizsgálati technológiákban, illetve a QIAGEN® termékek használatában kiterjedt gyakorlati és elméleti ismeretekkel rendelkező, tapasztalt tudományos szakemberek dolgoznak. Ha bármilyen kérdése merülne fel vagy nehézségei támadnak az *artus* HSV-1/2 RG PCR készlettel vagy általában valamilyen QIAGEN termékkel kapcsolatban, kérjük, bátran vegye fel a kapcsolatot velünk.

A QIAGEN felhasználók köre a legfőbb információforrás termékeink haladó szintű vagy speciális felhasználása tekintetében. Ez az információ segítség más tudományos szakemberek számára is éppúgy, mint a QIAGEN kutatói részére. Ezért arra bátorítjuk felhasználóinkat, hogy a termékek teljesítményével vagy új alkalmazásaival és technikáival kapcsolatos minden javaslatukat osszák meg velünk.

Műszaki segítségnyújtásért és további információkért kérjük, forduljon Műszaki ügyfélszolgálatunkhoz a www.qiagen.com/Support címen vagy hívja fel a QIAGEN egyik Műszaki szervizosztályát, illetve forduljon a helyi képviselőhöz (lásd hátsó borító vagy www.qiagen.com).

Minőség-ellenőrzés

A QIAGEN ISO-minősített minőség-ellenőrzési rendszerének megfelelően az *artus* HSV-1/2 RG PCR készlet minden egyes gyártási tételét leellenőrzik, hogy az megfelel-e az előírt paramétereknek, ezzel biztosítják a készlet egyenletes és kifogástalan minőségét.

Figyelmeztetések és óvintézkedések

Ha vegyszerekkel dolgozik, mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, eldobható kesztyűt és védőszemüveget. További információkért kérjük, olvassa el a megfelelő biztonsági adatlapokat (SDS). Ezek kényelmes és tömörített PDF formátumban megtalálhatók online a www.qiagen.com/safety címen, ahol megtalálhatja, megtekintheti és kinyomtathatja a biztonsági adatlapokat minden QIAGEN készlethez és a készletek elemeihez.

A mintákat és a vizsgálati hulladékokat a helyi biztonsági előírásoknak megfelelően kell ártalmatlanítani.

Bevezetés

Az *artus* HSV-1/2 RG PCR készlet egy használatra kész HSV-1 és HSV-2 DNS detekciós rendszer, mely polimeráz láncreakciót (PCR) használ RotorGene Q készülékeken. A HSV-1/2 RG master tartalmazza a reagenseket és az enzimeket a HSV-1 és HSV-2 genom 154 bázispár hosszú régiójának specifikus amplifikálásához, valamint a specifikus amplikon direkt kimutatásához a Rotor-Gene Q Cycling Green fluoreszcens csatornájában (forrás 470 nm, detektor 510 nm) illetve a Cycling Orange csatornájában (forrás 585 nm, detektor 610 nm).

Emellett az *artus* HSV-1/2 RG PCR készlet egy második heterológ amplifikációs rendszert is tartalmaz a PCR esetleges gátlásának kimutatására. Ezt belső kontrollként (IC) a Rotor-Gene Q Cycling Yellow fluoreszcens csatornája (forrás 530 nm, detektor 555 nm) detektálja. Az HSV-1/2 RG PCR detekciós határértéke (lásd „Analytical sensitivity”, 9. oldal) nem csökkentett. A készletben pozitív kontrollok (HSV-1 RG PC és HSV-2 RG PC) is találhatóak.

Alapelvek

A kórokozó kimutatása polimeráz láncreakcióval (PCR) történik, mely a kórokozó genom specifikus szakaszának amplifikációján alapszik. A valós idejű PCR esetében az amplifikált terméket fluoreszcens festék mutatja ki. A festék általában olyan oligonucleotidhoz van kapcsolva, mely specifikusan kötődik az amplifikált termékhez. A fluoreszcencia intenzitásának a PCR futtatása alatti (azaz valós idejű) követése lehetővé teszi a termék kimutatását és kvantifikálását anélkül, hogy a PCR-reakció végén ki kelljen nyitni a csöveket.*

Pathogenitási információk

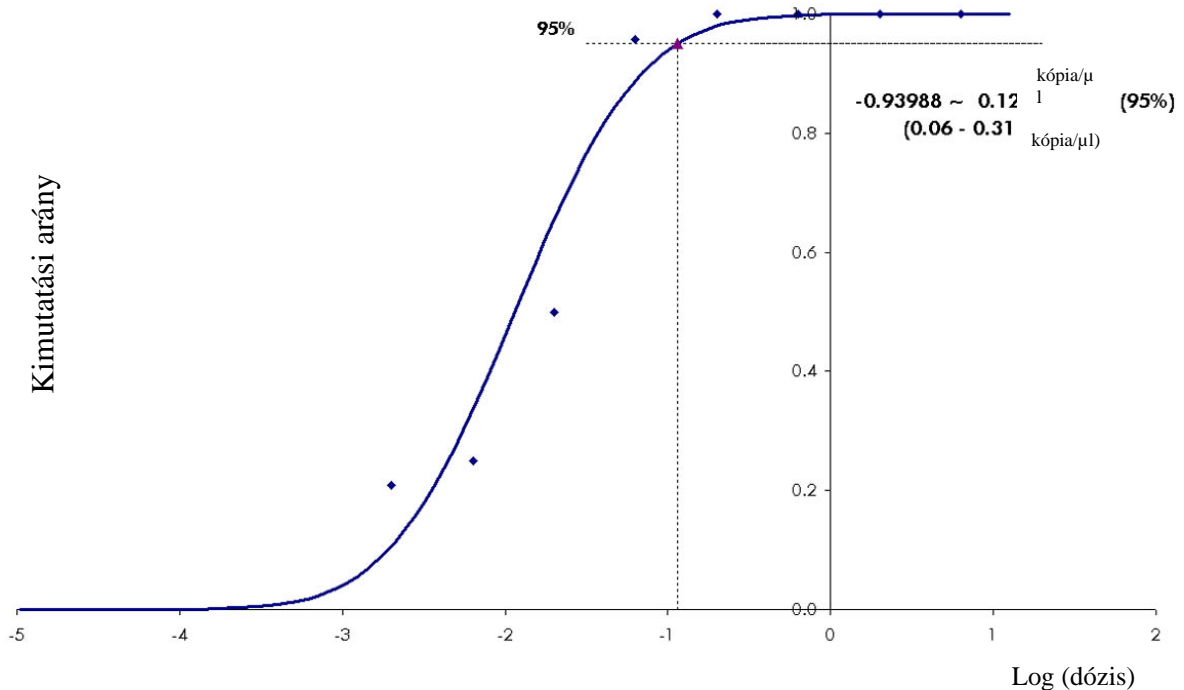
A herpes simplex vírus (HSV) sebfolyadékokban, nyálban, liquorban (CSF), és hüvelváladékokban található meg. A kórokozó elsősorban közvetlen érintkezéssel a léziókon keresztül, illetve szexuális úton, valamint a szülés közben terjed tovább. A HSV-pozitív esetek döntő részét a bőr vagy a nyálkahártyák sérülései jellemzik. A HSV-fertőzés lehet elsődleges (az esetek több, mint 90%-a tünetmentes) vagy visszatérő (másodlagos). Az elsődleges HSV-1 fertőzés többek között gingivostomatitis, eczema herpeticum, keratoconjunctivitis és encephalitis tüneteivel járhat; míg az elsődleges HSV-2 fertőzés többek között vulvovaginitis, meningitis és újszülöttek generalizált herpesze formájában jelenik meg. A másodlagos fertőzés elsődleges tünetei a bőrléziók az orrban, szájban és a genitáliák területén. A visszatérő fertőzés még súlyosabb formái a keratoconjunctivitis és a meningitis.

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

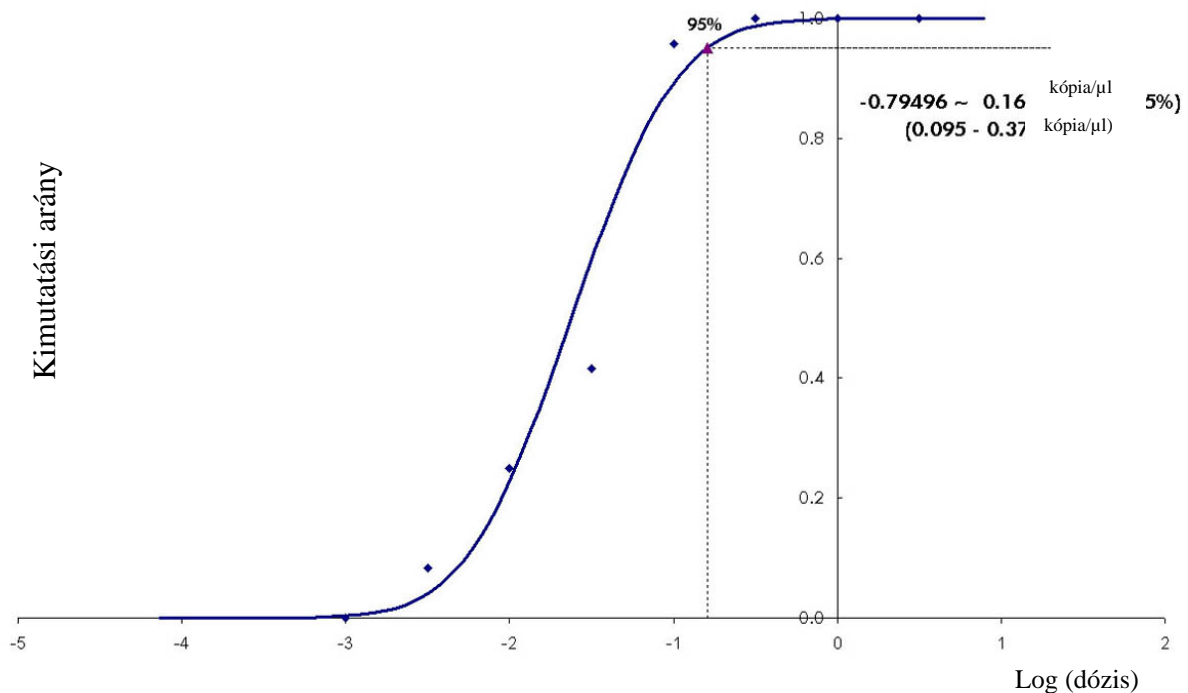
Teljesítményjellemzők

Analitikai érzékenység

Az *artus* HSV-1/2 RG PCR készlet analitikai érzékenységének meghatározásához Rotor-Gene Q/6000 készüléken egy 10 - 0,001 kópia/μl-nek megfelelő standard hígítási sort készítettek és vizsgálták meg *artus* HSV-1/2 RG PCR készlettel. A vizsgálatot 3 különböző napon 8 párhuzamos mintával végezték. Az eredményeket probit-elemzéssel határozták meg. Az *artus* HSV-1/2 RG PCR készlet analitikai kimutatási határa RotorGene Q/6000 készülékkel 0,12 kópia/μl ($p = 0,05$) HSV-1 esetében, míg 0,16 kópia/μl ($p = 0,05$) HSV-2 esetében. Ez azt jelenti, hogy 95% az esélye, hogy a 0,12 (HSV-1), illetve 0,16 (HSV-2) kópia/μl koncentrációjú minták detektálásra kerülnek. A HSV-1 probit-elemzése az 1. ábrán található below; a HSV-2 probit-elemzése a Figure 2. ábrán található.



1. ábra Probit-elemzés: HSV-1 (Rotor-Gene Q/6000). Az *artus* HSV-1/2 RG PCR készlet HSV-1 analitikai érzékenysége Rotor-Gene Q/6000 készülékkel.



2. ábra Probit-elemzés: HSV-2 (Rotor-Gene Q/6000). Az *artus* HSV-1/2 RG PCR készlet HSV-2 analitikai érzékenysége Rotor-Gene Q/6000 készülékkel

Specifititás

Az *artus* HSV-1/2 RG PCR készlet specifitása elsősorban és leginkább a primerek és próbák kiválasztásán, illetve a szigorúan meghatározott reakciófeltételeken alapul. A primerek és próbák a lehetséges homológiákra ellenőrzésre kerültek szekvencia-összehasonlítási elemzéssel minden génbankokban publikált szekvenciával szemben. A releváns genotípusok kimutathatóságát az adatbázissal történő egyezés, valamint a Rotor-Gene készüléken, az 1. táblázatban szereplő baktériumtörzsekkel végzett PCR-vizsgálatok biztosítják.

Emellett a specifitást 30 különböző HSV-1 és HSV-2 negatív liquormintán is validálták. Ezek nem adtak jelet a HSV-1/2 RG masterben található HSV-1 és HSV-2 specifikus primerekkel és próbákkal.

Az *artus* HSV-1/2 RG PCR készlet lehetséges keresztreaktivitása a 2. táblázatban található kontrollcsoporttal lett tesztelve. A tesztelt patogének egyike sem mutatott keresztreaktivitást.

1. táblázat A releváns genotípusok specificitásának ellenőrzése

Vírus	Törzs	Forrás	HSV-1 (Cycling Green)	HSV-2 (Cycling Orange)	Belső kontroll (Cycling Yellow)
HSV-1	HF	ATCC*	+	-	+
HSV-1	KOS	INSTAND†	+	-	+
HSV-1	MacIntyre	QCMD‡	+	-	+
HSV-2	HG-52	NCPV§	-	+	+
HSV-2	G	ATCC*	-	+	+
HSV-2	MS	QCMD‡	-	+	+

* ATCC American Type Culture Collection.

† INSTAND Society for Promotion of Quality Assurance in the Medical Laboratories.

‡ QCMD Quality Control for Molecular Diagnostics.

§ NCPV National Collection of Pathogenic Viruses.

2. táblázat A készlet specifitásának vizsgálata potenciális keresztreaktív pathogénekkal

Kontrollcsoport	HSV-1 (Cycling Green)	HSV-2 (Cycling Orange)	Belső kontroll (Cycling Yellow)
Humán herpeszvírus 3 (varicella-zoster vírus)	–	–	+
Humán herpeszvírus 4 (Epstein-Barr vírus)	–	–	+
Humán herpeszvírus 5 (cytomegalovírus)	–	–	+
Humán herpeszvírus 6A	–	–	+
Humán herpeszvírus 6B	–	–	+
Humán herpeszvírus 7	–	–	+
Humán herpeszvírus 8 (Kaposi-szarkómával kapcsolatos herpeszvírus)	–	–	+
Hepatitis-A vírus	–	–	+
Hepatitis-B vírus	–	–	+
Hepatitis-C vírus	–	–	+
Humán immunodeficiencia vírus (HIV)	–	–	+
Humán T-sejt leukémia vírus 1	–	–	+
Humán T-sejt leukémia vírus 2	–	–	+
Enterovírus	–	–	+
Parvovírus B19	–	–	+
Nyugat-Nílus vírus	–	–	+

Pontosság

A a vizsgálat teljes varianciájának meghatározásához az *artus* HSV-1/2 RG PCR készlet pontossági adatait Rotor-Gene készülék segítségével határozták meg. A teljes variabilitás három összetevője: a vizsgálaton belüli variabilitás (azon koncentrációjú minták egy kísérletben mért eredményeinek variabilitása), vizsgálatok közötti variabilitás (egy laboratóriumon belül különböző, de azonos típusú készüléken, több operator által végzett vizsgálatok eredményeinek variabilitása) és a gyártási tételek közötti variabilitás (különböző gyártási tételek felhasználásával végzett vizsgálatok eredményeinek variabilitása). A mért adatok alapján meghatározásra került a patogén-specifikus, illetve a kontroll PCR eredmények szórása, varianciája és variációs koefficiense.

Az *artus* HSV-1/2 RG PCR készlet pontossági adatait 10 kópia/ μ l koncentrációjú HSV-1 és HSV-2 DNS-mintával határozták meg. A vizsgálatot 8 párhuzamos mintával végezték. A pontossági adatokat az amplifikációs görbe C_T -értéke alapján határozták meg (C_T : küszöbciklus, lásd 3. és 4. táblázat). Ezen eredmények alapján a bármely, a fenti koncentrációjú adott minta átlagos statisztikai eloszlása: HSV-1: 1,82% (C_T), HSV-2: 0,67% (C_T), HSV-1 belső kontroll: 1,24% (C_T), HSV-2 belső kontroll: 1,58% (C_T). Eze az értékek a meghatározott variabilitás minden egyes értékén alapszanak.

3. táblázat Pontossági adatok HSV-1 esetében a C_T-értékek alapján

	C _T érték	Szórás	Variációs koefficiens (%)
Vizsgálaton belüli variabilitás: HSV-1 10 kópia/μl	30,46	0,25	0,81
Vizsgálaton belüli variabilitás: Belső kontroll	25,29	0,08	0,3
Vizsgálatok közötti variabilitás: HSV-1 10 kópia/μl	29,69	0,69	2,05
Vizsgálatok közötti variabilitás: Belső kontroll	24,97	0,31	1,25
Gyártási tételek közötti variabilitás: HSV-1 10 kópia/μl	29,95	0,40	1,35
Gyártási tételek közötti variabilitás: Belső kontroll	24,90	0,30	1,20
Teljes variancia: HSV-1 10 kópia/μl	29,91	0,55	1,82
Teljes variancia: Belső kontroll	24,99	0,31	1,24

4. táblázat Pontossági adatok HSV-2 esetében a C_T-értékek alapján

	C_T érték	Szórás	Variációs koefficiens (%)
Vizsgálaton belüli variabilitás: HSV-2 10 kópia/μl	29,85	0,15	0,50
Vizsgálaton belüli variabilitás: Belső kontroll	25,17	0,39	1,55
Vizsgálatok közötti variabilitás: HSV-2 10 kópia/μl	29,92	0,15	0,49
Vizsgálatok közötti variabilitás: Belső kontroll	25,11	0,41	1,63
Gyártási tételek közötti variabilitás: HSV-2 10 kópia/μl	29,80	0,23	0,79
Gyártási tételek közötti variabilitás: Belső kontroll	24,89	0,33	1,32
Teljes variancia: HSV-2 10 kópia/μl	29,88	0,20	0,67
Teljes variancia: Belső kontroll	25,07	0,40	1,58

Megbízhatóság

A megbízhatóság verifikálása lehetővé teszi az *artus* HSV-1/2 RG PCR készlet teljes hibaarányának meghatározását. Nagyon alacsony HSV-1 és HSV-2 vírustiterrek eléréséhez 30 db negatív liquormintához adtak 0,36 kópia/μl HSV-1 vagy 0,48 kópia/μl HSV-2 DNS-t (az analitikai érzékenységi határ háromszorosa). Az EZ1 DSP Virus készlettel végzett extrakció után a mintákat *artus* HSV-1/2 RG PCR készlet segítségével vizsgálták meg. Mind a 30 minta megfelelően az enyhe pozitívnak mutatkozott mindkét HSV típusra, a hibaarány 0% volt. Emellett a belső kontroll megbízhatóságát 30 db HSV-1 és HSV-2 negatív liquorminta tisztításával és vizsgálatával mérték fel. A PCR-reakció gátlását a minták nem mutatták, így a teljes hibaarány 0%. Ezek alapján az *artus* HSV-1/2 RG PCR készlet megbízhatósága $\geq 99\%$.

Reprodukálhatóság

A reprodukálhatósági adatok lehetővé teszik az *artus* HSV-1/2 RG PCR készlet teljesítmény-jellemzőinek rendszeres mérését, valamint más termékekkel történő hatékonysági összehasonlítást. Ezek az adatok laboratóriumi szakmai alkalmassági programokban történő részvételből származnak.

A felhasználó által biztosítandó eszközök és reagensek

Ha vegyszerekkel dolgozik, mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, eldobható kesztyűt és védőszemüveget. További információkért olvassa el az egyes termékek gyártójának biztonsági adatlapjait (SDS).

- DNS izoláló készlet (lásd „DNA isolation”, 18. oldal)
- Pipetták (állítható)*
- Steril, szűrős pipettahegyek
- Vortex keverő*
- Asztali centrifuga* 2 ml-es reakciócsöveknek megfelelő rotorral
- Rotor-Gene Q, vagy Rotor-Gene készülék*† Cycling Green, Cycling Orange és Cycling Yellow fluoreszcens csatornákkal.
- Rotor-Gene Q szoftver, 1.7.94 vagy magasabb verzió (Rotor-Gene 6000 szoftver, 1.7.65, vagy magasabb verzió)
- Strip-csövek és kupakok 0,1 ml-es, 72-lyukú rotorral használható (katalógusszám 981103 vagy 981106)
- Vagy: PCR-csövek, 0,2 ml-es, 36-lyukú rotorral használható (katalógusszám 981005 vagy 981008)
- Hűtőblokk (Bemérő blokk 72 x 0,1 ml cső, katalógusszám: 9018901, vagy Bemérő blokk 96 x 0,2 ml cső, katalógusszám:9018905)

* Ellenőrizze, hogy a műszerek a gyártó ajánlásai szerint rendszeresen lettek-e ellenőrizve és kalibrálva.

† Az *artus* HSV-1/2 RG PCR készlet nem használható Rotor-Gene Q 2plex készülékekkel.

Fontos megjegyzések

Általános óvintézkedések

Mindig tartsa szem előtt az alábbiakat:

- Használjon szűrős steril pipettákat.
- A pozitív anyagokat (minták, pozitív kontrollok és amplikonok) minden más reagenstől elkülönítve tárolja és dolgozza fel, és a reakciómixhez térben elkülönített helyen adja hozzá.
- A futtatás megkezdése előtt a minták hőmérsékletét szobahőmérsékletre (15–25 °C) kell hozni.
- Felolvadás után keverje meg (pipettázza többször fel és le, vagy röviden vortexelje), majd centrifugálja le a reagenseket.
- Dolgozzon gyorsan és tartsa a PCR reagenseket bemérés előtt jégen vagy a hűtőblokkban (72/96 lyukú blokk).

DNS-izolálás

Az EZ1 DSP Virus készlet (QIAGEN, katalógusszám. 62724*) validálva van virális DNS tisztítására humán liquorból az *artus* HSV-1/2 RG készlettel történő alkalmazásra. A virális DNS tisztítását a *EZ1 DSP Virus készlet kézikönyvben* leírtaknak megfelelően végezze el.

ⓘ Ne használja az *artus* HSV-1/2 RG PCR készletet fenol-alapú izolációs eljárásokkal.


ⓘ A hordozó RNS alkalmazása kritikus az extrakció hatékonysága és ennek következtében a DNS-hozam szempontjából. Adjon minden extrakcióhoz megfelelő mennyiségű hordozó RNS-t a *EZ1 DSP Virus készlet kézikönyvben* leírtaknak megfelelően.

ⓘ Az *artus* HSV-1/2 RG PCR készlet belső kontrollja közvetlenül a izolálási eljárás során adható hozzá (lásd „Belső kontroll”, below).

* Az EZ1 DSP Virus készlet a CE-IVD-jellel ellátott EASY*artus*[®] HSV-1/2 RG PCR készletként is elérhető, az *artus* HSV-1/2 RG PCR készlettel kombinálva (rendelési információkat lásd 34. oldal).

Belső kontroll

A készlet részét képezi a belső kontroll is (HSV-1/2 RG IC). Ez lehetővé teszi a DNS-izolálási eljárás kontrollálását és az esetleges PCR-gátlás ellenőrzését. Ilyen esetben a belső kontrollt az izolációhoz 0,1 µl per 1 µl elució térfogat mennyiségben kell hozzáadni. Például az EZ1 DSP Virus készlet használata esetén a DNS 60 µl AVE-pufferben kerül eluálásra. Ezért az eljárás elején 6 µl belső kontrollt kell hozzáadni.

 Ne adja a belső kontrollt és a hordozó RNS-t közvetlenül a mintához.

A belső kontroll opcionálisan kizárólag az esetleges PCR-gátlás ellenőrzésére is alkalmazható. Ilyen esetben a belső kontrollt közvetlenül a HSV-1/2 RG master és HSV-1/2 RG Mg-Sol keverékéhez is lehet adni, a protokoll 2b lépésének (21. oldal) megfelelően.

Protokoll: PCR és adatelemzés



Kezdés előtti fontos szempontok

- Az eljárás megkezdése előtt olvassa el a „Important Notes”pontot (18. oldal).
- Az eljárás indítása előtt hagyjon arra időt, hogy megismerje a Rotor-Gene Q készüléket. Lásd a készülék kézikönyvét.
- Figyeljen arra, hogy a PCR-eljárásban egy pozitív valamint egy negatív kontroll (PCR minőségű víz) is szerepeljen.

Kezdés előtti teendők

- Ellenőrizze, hogy a hűtőblokk (a Rotor-Gene Q készülék kiegészítője) 2–8°C-ra le van hűtve.
- Minden használat előtt az összes reagenst teljesen olvassza fel, ezután keverje meg (pipetázza többször fel és le, vagy röviden vortexelje), majd centrifugálja röviden.

Folyamat

- 1. Helyezze a szükséges mennyiségű PCR-csövet a hűtőblokk adaptereibe.**
 - 2. Ha belső kontrollt használ a DNS-izolálási eljárás kontrollálására és az esetleges PCR-gátlás ellenőrzésére, lépjen a 2a lépésre. Ha belső kontrollt csak az esetleges PCR-gátlás ellenőrzésére használ, lépjen a 2b lépésre. Használja a belső kontrollokat a 2b lépésnek megfelelően minden pozitív és negatív kontroll esetében.**
- 2a. A belső kontroll már az izolációhoz lett adva (lásd „Internal control”, 18. oldal). Ilyen esetben készítse el a master mixet a 5. táblázatnak megfelelően.**

A master mix, a mintát kivéve, a PCR-reakcióhoz szükséges összes összetevőt tartalmazza.

5. táblázat A master mix elkészítése (belső kontroll a DNS-izolálási eljárás kontrollálására és a PCR-gátlás ellenőrzésére)

Minták száma	1	12
HSV-1/2 RG master	25 µl	300 µl
HSV-1/2 RG Mg-Sol	5 µl	60 µl
HSV-1/2 RG IC	0 µl	0 µl
Teljes térfogat	30 µl	360 µl

2b. A belső kontrollt közvetlenül az HSV-1/2 RG master és HSV-1/2 RG Mg-Sol keverékéhez kell hozzáadni. Ilyen esetben készítse el a master mixet a 6. táblázatnak megfelelően.

A master mix, a mintát kivéve, a PCR-reakcióhoz szükséges összes összetevőt tartalmazza.

6. táblázat A master mix elkészítése (belső kontroll csak a PCR-gátlás ellenőrzésére)

Minták száma	1	12
HSV-1/2 RG master	25 µl	300 µl
HSV-1/2 RG Mg-Sol	5 µl	60 µl
HSV-1/2 RG IC	2 µl	24 µl
Teljes térfogat	32 µl*	384 µl*

* A belső kontroll hozzáadása okozta térfogat-növekedést a PCR előkészítése során figyelmen kívül lehet hagyni. A reakció érzékenységét ez nem befolyásolja.

3. Pipetázzon 30 µl master mixet minden egyes PCR-csőbe. Ezután adjon hozzá 20 µl-t az eluált minta DNS-ből (lásd 7. táblázat), majd ismételt fel-le pipetázással keverje össze. Pozitív kontrollként 20 µl -t HSV-1 RG PC-t és HSV-2 RG PC-t használjon, negatív kontrollként 20 µl vizet (víz, PCR-szintű).

7. táblázat A PCR-vizsgálat előkészítése

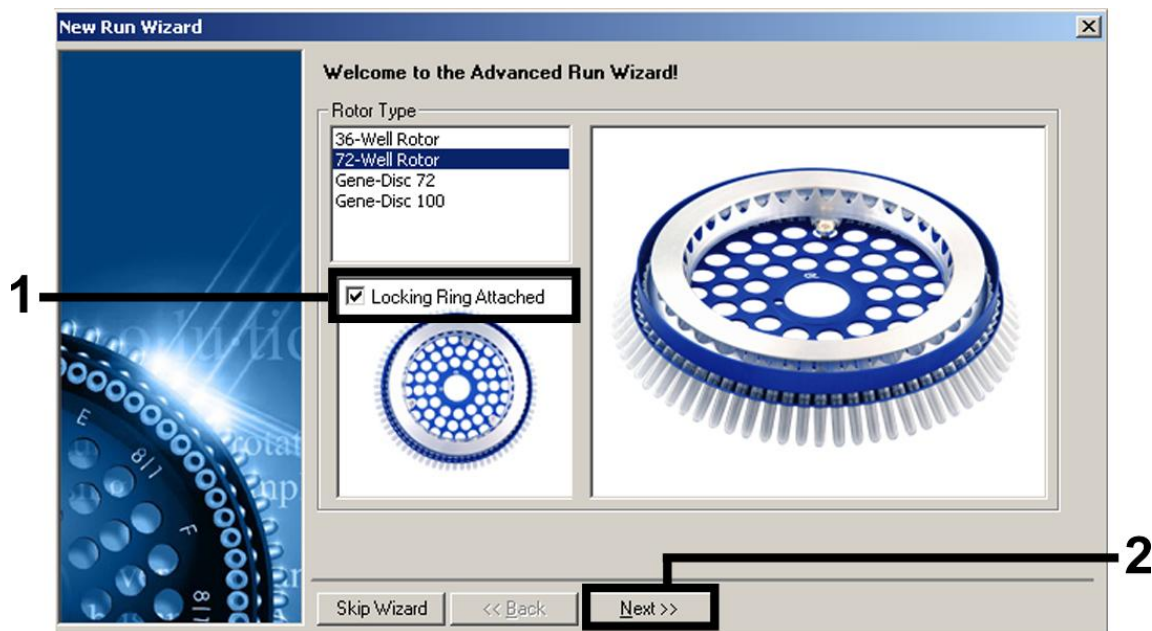
Minták száma	1	12
Master mix	30 µl	30 µl egyenként
Minta	20 µl	20 µl egyenként
Teljes térfogat	50 µl	50 µl egyenként

4. Zárja le a PCR-csöveket. Ellenőrizze, hogy a zárógyűrű (a Rotor-Gene készülék kiegészítője) a rotor tetején helyezkedik el, hogy megakadályozza a csövek véletlen kinyílását a futás során.
5. A HSV-1 vagy HSV-2 DNS kimutatásához hozzon létre egy hőmérséklet-profilt az alábbi lépéseknek megfelelően.

Az általános vizsgálati paraméterek beállítása	3,4,5. ábra
A hot-start enzim kezdeti aktiválása	6. ábra
A DNS amplifikálása	Figure 7
A fluoreszcens csatorna érzékenységének beállítása	8. ábra
A futtatás indítása	9. ábra

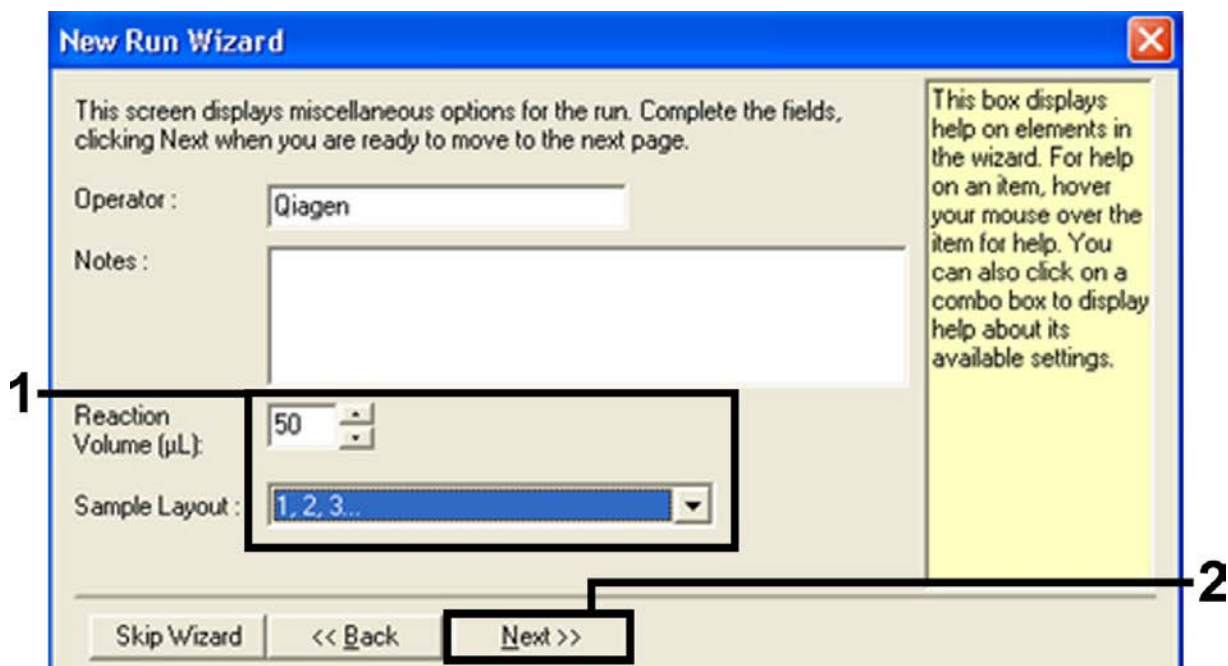
Minden specifikáció a Rotor-Gene Q szoftver, 1.7.94 vagy magasabb verziójára, a Rotor-Gene 6000 szoftver, 1.7.65 vagy magasabb verziójára vonatkozik. A Rotor-Gene készülékek programozásáról további információkat a készülék felhasználói kézikönyvében talál. Az ábrákon ezek a beállítások vastag fekete keretben találhatóak. Az ábrák a Rotor-Gene Q készülékekre vonatkoznak.

6. Először nyissa meg a „New Run Wizard” (Új futtatás varázsló) párbeszédablakot az „Advanced” (Továbbiak) verzióban (3. ábra). Jelölje meg a „Locking Ring Attached” (Zárógyűrű csatlakoztatva) négyzetet és kattintson a „Next” (Tovább) gombra.



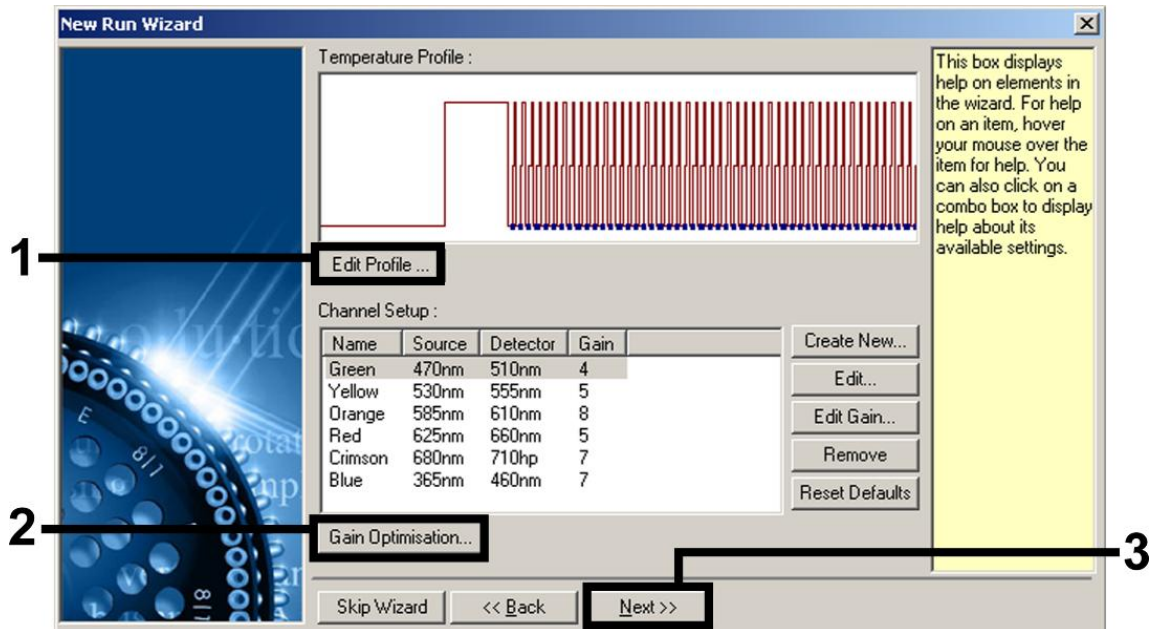
3. ábra „New Run Wizard” párbeszédablak

7. Válassza ki az 50 lehetőséget a PCR-reakció térfogatának és kattintson a „Next” gombra (4. ábra).

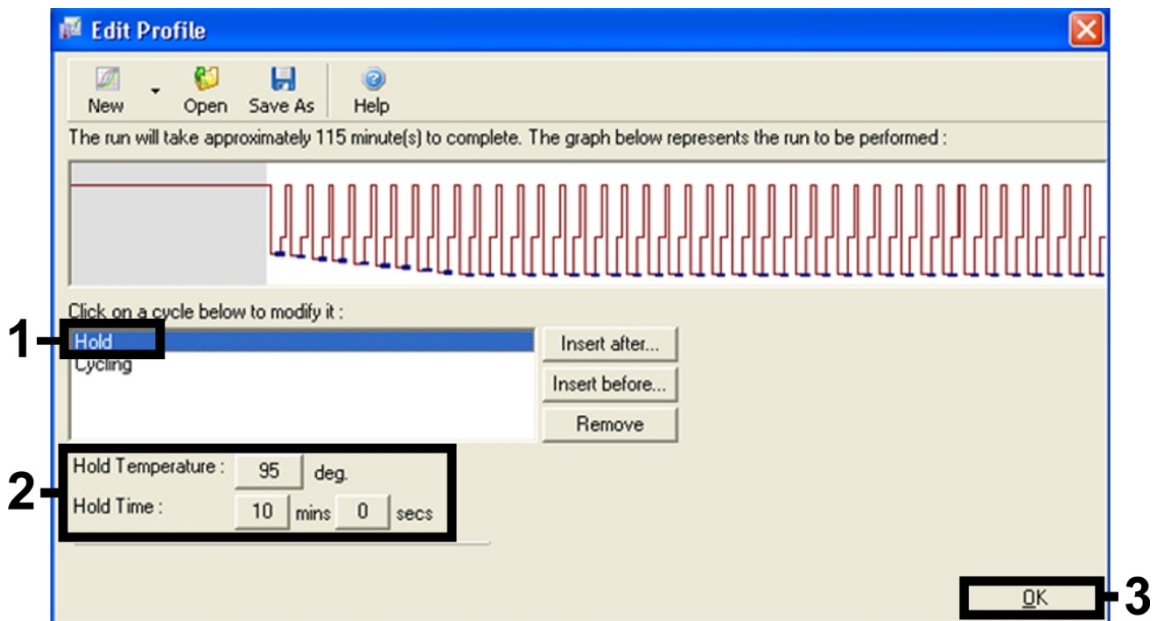


4. ábra Az általános vizsgálati paraméterek beállítása

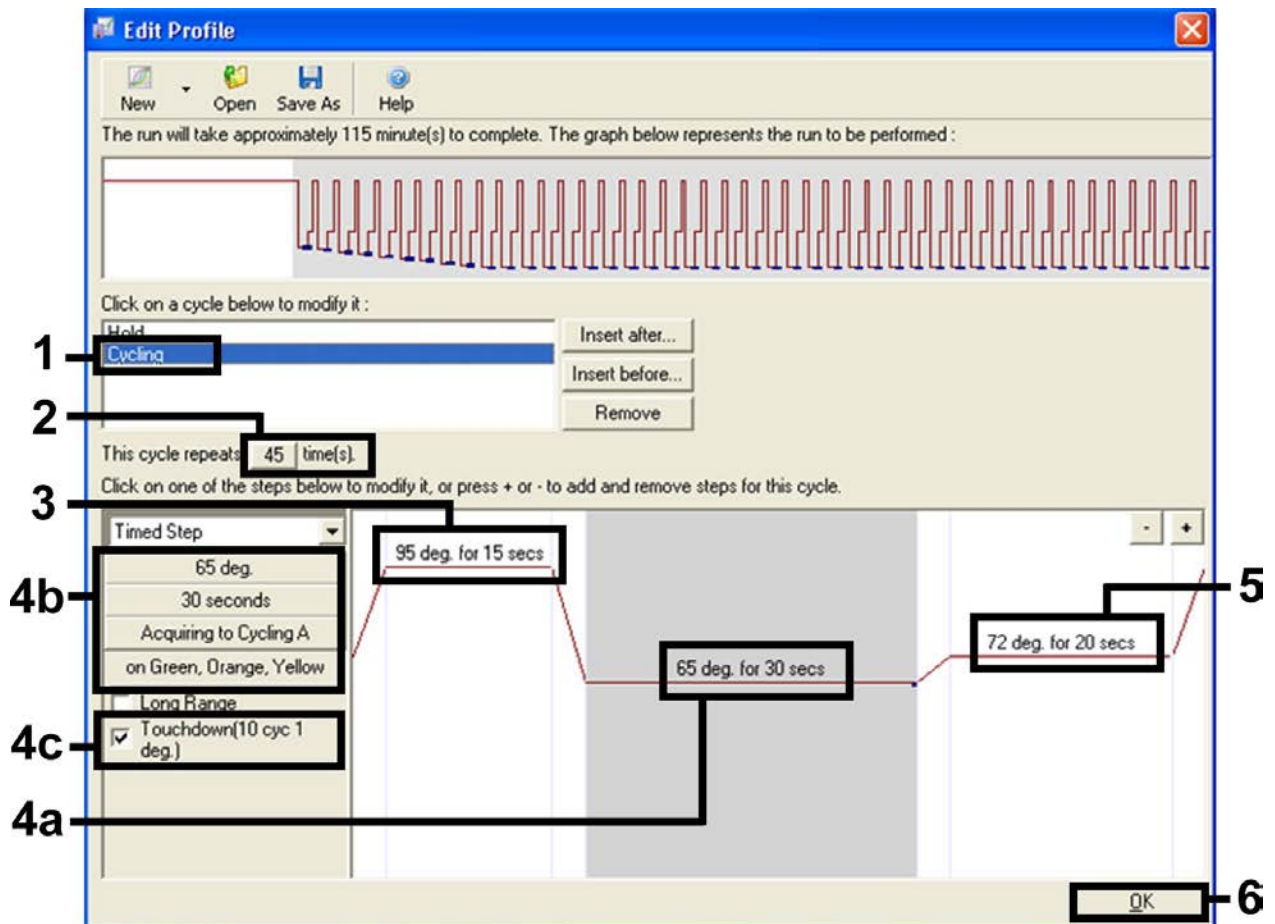
8. Kattintson az „Edit Profile” (Profil szerkesztése) gombra a következő „New Run Wizard” párbeszédablakban (5. ábra), és programozza be a hőmérsékletprofil a 6-7. ábrának megfelelően.



5. ábra A profil szerkesztése

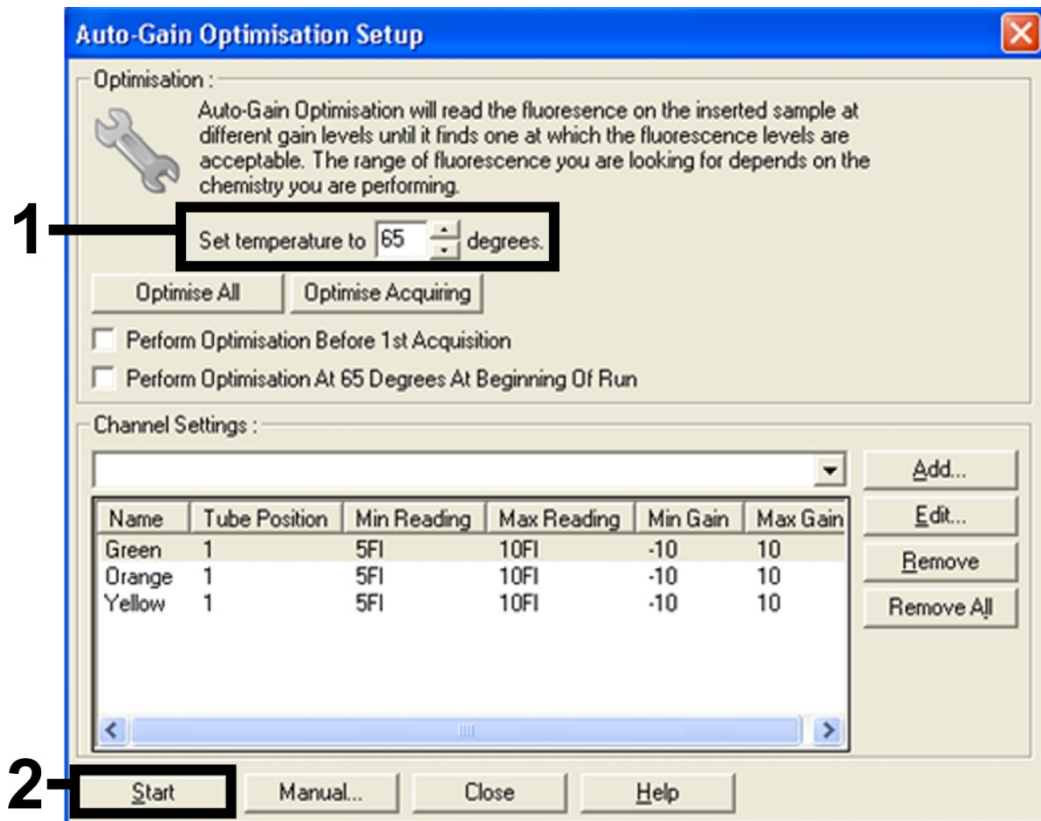


6. ábra A hot-start enzim kezdeti aktiválása



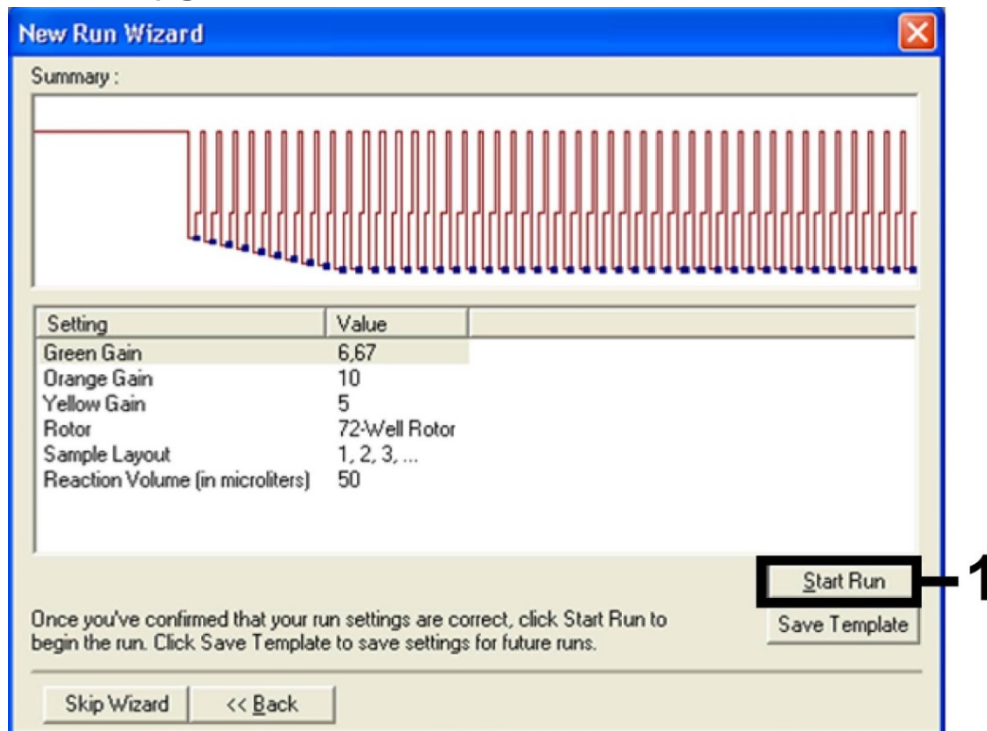
7. ábra A DNS amplifikálása. Ügyeljen arra, hogy az anneáláson belül 10 ciklusra aktiválja a touchdown funkciót.

9. A fluoreszcens csatornák érzékelési tartományát a PCR-csőekben található fluoreszcencia intenzitása alapján kell meghatározni. Kattintson az „Gain Optimisation” (Jel optimalizálás) gombra a „New Run Wizard” párbeszédablakban (2. ábra) az „Auto-Gain Optimisation Setup” (Automatikus jeloptimalizálás beállítása) (8. ábra) párbeszédablak megnyitásához. Állítsa a kalibrálási hőmérsékletet 65-re az amplifikációs program anneálási hőmérsékletének megfelelően (7. ábra, 4b ábra). Ellenőrizze, hogy mindhárom csatorna (Green, Orange és Yellow) „Auto-Gain Optimisation”-ra (Automatikus jeloptimalizálás) van állítva. (Keresse meg a csatornákat a „Channel Settings” (Csatorna beállítások) legördülő menüben és kattintson az „Add” (Hozzáad) lehetőségre.) Kattintson a „Start” (Start) gombra a jeloptimalizálás indításához. A kalibrálás végén kattintson az „Auto-Gain Optimisation Setup” párbeszédablak „Close” (Bezár) gombjára.



8. ábra A fluoreszcens csatorna érzékenységének beállítása

10. A csatornakalibrálás által szolgáltatott jelerősség-értékek automatikusan mentésre kerülnek és a programozási eljárás utolsó menüablakában is megjelennek (9. ábra). Kattintson a „Start Run” (Futtatás start) gombra.



9. ábra A futtatás indítása

11. A futtatás befejeztével elemezze az adatokat. Az alábbi eredmények lehetségesek (11a, 11b, 11c, 11d, 11e és 11f).

A pozitív és negatív PCR-reakciók példái a Figure 10, 11. és 12. ábrán találhatóak.

11a. A Cycling Green fluoreszcens csatorna jelet érzékel. A mérés eredménye pozitív: a minta HSV-1 DNS-t tartalmaz.

Ilyen esetben a Cycling Yellow fluoreszcens csatorna jelétől el lehet tekinteni, mivel az HSV-1 DNS kezdeti magas koncentrációja (pozitív jel a Cycling Green fluoreszcens csatornában) a jel csökkenéséhez vagy hiányához vezethet a Cycling Yellow fluoreszcens csatornában (kompetíció).

11b. A Cycling Green fluoreszcens csatornában jel nem található. Ezzel párhuzamosan a belső kontroll jele megjelenik a Cycling Yellow fluoreszcens csatornában.

A mintában HSV-1 DNS nem volt kimutatható. A minta negatívnak tekinthető.

A negatív HSV-1 PCR esetén a belső kontroll érzékelt jele zárja ki a PCR-reakció gátlásának lehetőségét.

11c. A Cycling Orange fluoreszcens csatorna jelet érzékel.

A mérés eredménye pozitív: a minta HSV-2 DNS-t tartalmaz.

Ilyen esetben a Cycling Yellow fluoreszcens csatorna jelétől el lehet tekinteni, mivel a HSV-2 DNS kezdeti magas koncentrációja (pozitív jel a Cycling Orange fluoreszcens csatornában) a jel csökkenéséhez vagy hiányához vezethet a Cycling Yellow fluoreszcens csatornában (kompetíció).

11d. A Cycling Orange fluoreszcens csatornában jel nem található. Ezzel párhuzamosan a belső kontroll jele megjelenik a Cycling Yellow fluoreszcens csatornában.

A mintában HSV-2 DNS nem volt kimutatható. A minta HSV-2 negatívnak tekinthető.

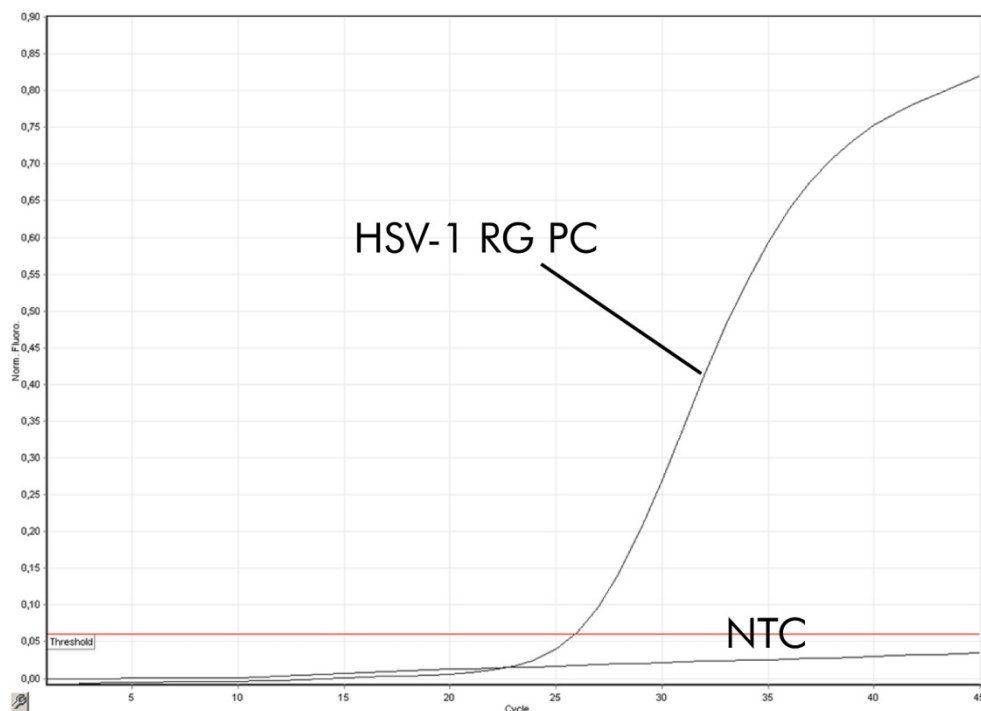
A negatív HSV-2 PCR esetén a belső kontroll érzékelt jele zárja ki a PCR-reakció gátlásának lehetőségét.

11e. A Cycling Green és a Cycling Orange fluoreszcens csatorna jelet érzékel. A mérés eredménye pozitív: a minta HSV-1 és HSV-2 DNS-t is tartalmaz.

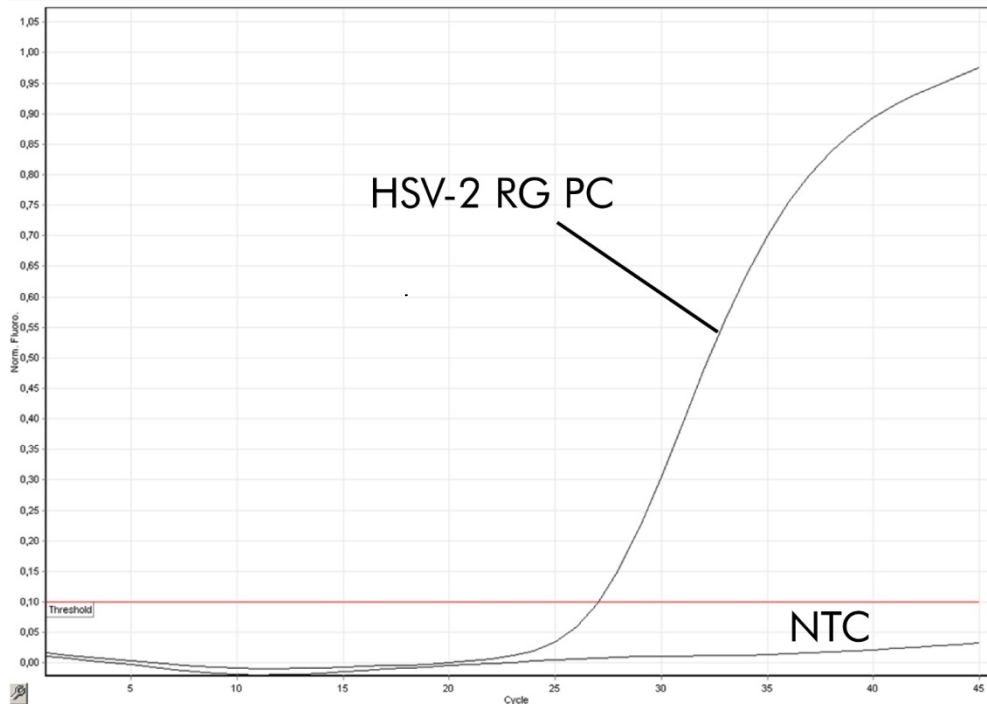
Ilyen esetben a Cycling Yellow fluoreszcens csatorna jelétől el lehet tekinteni, mivel az HSV-1 és HSV-2 DNS kezdeti magas koncentrációja (pozitív jel a Cycling Green és a Cycling Orange fluoreszcens csatornában) a jel csökkenéséhez vagy hiányához vezethet a Cycling Yellow fluoreszcens csatornában (kompetíció).

**11f. Nincs jel sem a Cycling Green, sem a Cycling Orange, sem a Cycling Yellow fluoreszcens csatornában.
Eredmény nem határozható meg.**

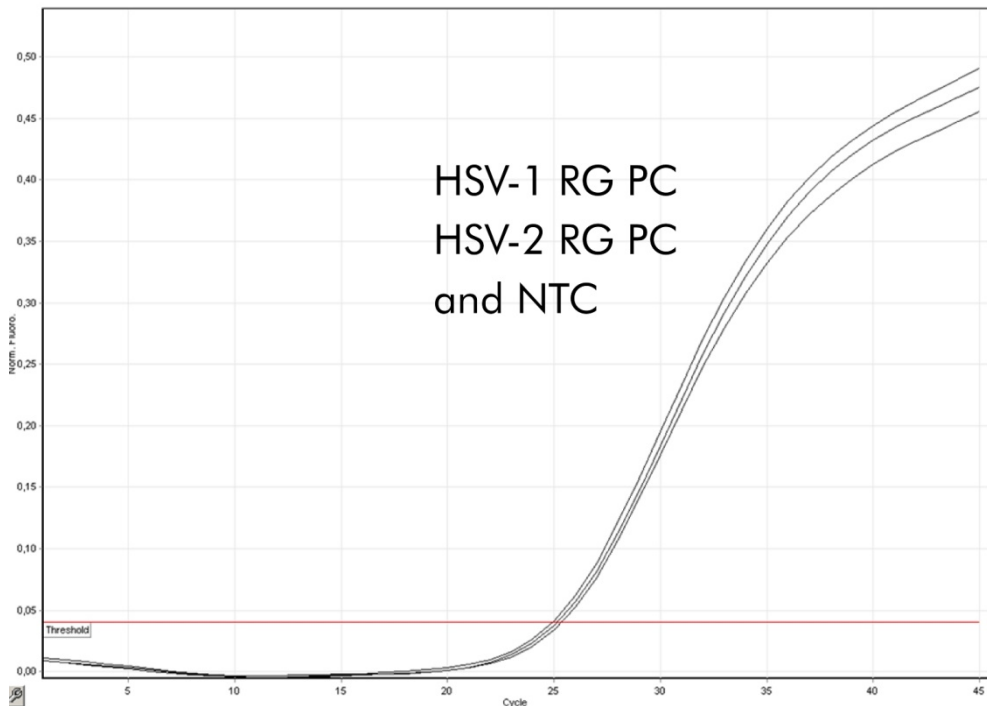
A hibák okai és megoldásuk módjai a „Troubleshooting Guide” fejezetben találhatóak (30. oldal).



10. ábra A HSV-1 pozitív kontrollok (HSV-1 RG PC) kimutatása a Cycling Green fluoreszcens csatornában. NTC: Templát nélküli kontroll (negatív kontroll)



11. ábra A HSV-2 pozitív kontrollok (HSV-2 RG PC) kimutatása a Cycling Orange fluoreszcens csatornában. NTC: Templát nélküli kontroll (negatív kontroll)








12. ábra A belső kontroll (IC) detekciója a Cycling Yellow fluoreszcens csatornában a pozitív kontrollok (HSV-1 RG PC és HSV-2 RG PC) amplifikációja mellett. NTC: Templát nélküli kontroll (negatív kontroll)

Hibaelhárítási útmutató

Az alábbi hibaelhárítási útmutató segítséget nyújthat a felmerülő problémák megoldásában. További információkért kérjük, olvassa el Műszaki ügyfélszolgálatunk Gyakran Ismételt Kérdéseit a következő címen: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. A QIAGEN technikai szolgálat kutató szakemberei is örömmel állnak rendelkezésére, ha bármilyen kérdése van akár ennek a kézikönyvnek a tartalmával és a benne szereplő protokollokkal kapcsolatban, akár a minta- és vizsgálati technológiákkal kapcsolatban (elérhetőség a kézikönyv hátlapján vagy a következő címen található: www.qiagen.com).






Megjegyzések és javaslatok

A pozitív kontrollok (HSV-1 RG PC és HSV-2 RG PC) nem adnak jelet a Cycling Green vagy Cycling Orange fluoreszcens csatornáknak.

- | | |
|---|---|
| a) A PCR-adatok elemzésére kiválasztott fluoreszcens csatorna nem felel meg a protokollnak |  Az adatelemzéshez válassza ki a Cycling Green és Cycling Orange fluoreszcens csatornát az analitikai HSV-1/2 PCR-hez, illetve a Cycling Yellow fluoreszcens csatornát a belső kontroll PCR-hez. |
| b) A Rotor-Gene készülék hőmérsékletprofiljának nem megfelelő programozása |  Hasonlítsa össze a hőmérsékletprofilját a protokollal. Lásd „Protocol: PCR and Data Analysis”, 20. oldal. |
| c) A PCR konfigurációja nem megfelelő |  Ellenőrizze a munkalépéseket a pipettázási séma alapján és szükség esetén ismétlje meg a PCR-t. Lásd „Protocol: PCR and Data Analysis”, 20. oldal. |
| d) A készlet egy vagy több részegysége esetében a tárolási körülmények nem feleltek meg a „Storage” fejezetben (5. oldal) találhatóaknak. |  Ellenőrizze a reagensek tárolási körülményeit és a lejáratási idejét (lásd a készlet címkéjét) és szükség esetén használjon új készletet. |
| e) Az <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR készlet lejárt |  Ellenőrizze a reagensek tárolási körülményeit és a lejáratási idejét (lásd a készlet címkéjét) és szükség esetén használjon új készletet. |

Megjegyzések és javaslatok

Az EZ1 DSP Virus készlettel tisztított negatív liquorminta belső kontrollja esetében gyenge jel, vagy nincs jel a Cycling Yellow csatornában és ezzel párhuzamosan nincs jel a Cycling Green és a Cycling Orange csatornában

- a) A PCR-paraméterek nem felelnek meg a protokollnak  Ellenőrizze a PCR-paramétereket (lásd fent) és szükség esetén ismételje meg a PCR-t a megfelelő beállításokkal.
- b) A PCR gátolva volt  Ellenőrizze, hogy a megfelelő izolálási protokollt alkalmazta és szorosan kövesse a gyártó utasításait.
- c) A DNS a kinyerés során elveszett  A belső kontroll jelének hiánya a DNS-nek az extrakció során történő elvesztését mutathatja. Ellenőrizze, hogy az ajánlott izolálási protokollt alkalmazta (lásd „DNA isolation”, 18. oldal), és szorosan kövesse a gyártó utasításait.
- d) A készlet egy vagy több részegysége esetében a tárolási körülmények nem feleltek meg a „Storage” fejezetben (5. oldal) találhatóaknak.  Ellenőrizze a reagensek tárolási körülményeit és a lejárat idejét (lásd a készlet címkéjét) és szükség esetén használjon új készletet.
- e) Az *artus* HSV-1/2 RG PCR készlet lejárt  Ellenőrizze a reagensek tárolási körülményeit és a lejárat idejét (lásd a készlet címkéjét) és szükség esetén használjon új készletet.

Megjegyzések és javaslatok

A negatív kontroll esetében jelek találhatóak az analitikai PCR Cycling Green vagy Cycling Orange fluoreszcens csatornájában.

- a) Kontamináció a PCR előkészítése során
- ① Ismétlje meg a PCR-t új reagensekkel.
 - ① Ha lehetséges, a PCR-csöveket közvetlenül a vizsgálandó minta hozzáadása után zárja le.
 - ① Ügyeljen arra, hogy a pozitív kontrollokat utolsóként pipettázza.
 - ① Ügyeljen arra, hogy a munkaterület és az eszközök rendszeresen dekontaminálásra kerüljenek.
- b) Kontamináció az extrakció során
- ① Ismétlje meg a mintán az extrakciót és a PCR-t új reagensekkel.
 - ① Ügyeljen arra, hogy a munkaterület és az eszközök rendszeresen dekontaminálásra kerüljenek.

Hivatkozások

A QIAGEN egy nagy és naprakész online adatbázist tart fent olyan publikációkból, melyek QIAGEN termékek használatán alapulnak. A kívánt cikk megtalálását elősegítik a sokrétű keresési lehetőségek (pl. egyszerű kulcsszó, vagy az alkalmazásra, a kutatási területre, a címre történő szűrés, stb.).

A hivatkozások teljes listáját lásd a QIAGEN online szakirodalmi adatbázisában a www.qiagen.com/RefDB/search.asp cím alatt, vagy vegye fel a kapcsolatot a QIAGEN technikai szolgálatával vagy a helyi képviselőjével.

Rendelési információk

Termék	Tartalom	Katalógusszám
<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (24)	24 reakcióra: Master, magnézium-oldat, 2 pozitív ontroll, belső kontroll, víz (PCR-szintű)	4500263
<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (96)	96 reakcióra: Master, magnézium-oldat, 2 pozitív ontroll, belső kontroll, víz (PCR-szintű)	4500265
EZ1 DSP Virus készlet — a virális nukleinsavak tisztításához humán liquormintából in viro diagnosztikai célra		
EZ1 DSP Virus Kit	48 virális nukleinsav preparáláshoz: Előtöltött reagenskazetták, eldobható hegytartók, eldobható szűrős hegyek, mintacsövek, eluáló csövek, pufferek, hordozó RNS	62724
EASY<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR készletek — teljesen CE-IVD-megfelelő integrált, automatizált mintatisztítás a kórokozó-kimutatás		
EASY <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit 1	48 virális nukleinsav preparáláshoz és 24 vizsgálathoz: 1 x EZ1 DSP Virus készlet, 1 x <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR készlet (24)	EA10023
EASY <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit 2	48 virális nukleinsav preparáláshoz és 48 vizsgálathoz: 1 x EZ1 DSP Virus készlet, 2 x <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR készlet (24)	EA10024
Rotor-Gene Q és kiegészítők		
Rotor-Gene Q 5plex HRM	Valós idejű PCR cycler és magas felbontású gél analízáló 5 csatornával (zöld, sárga, narancs, piros, karmazsin), magas felbontású gél csatorna, laptop, szoftver, kiegészítők, 1 éves szerviz- és alkatrészgarancia	Felvilágosítás kérése

Termék	Tartalom	Katalógusszám
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Alumíniumblokk a reakciók manuális összeállítására egycsatornás pipettával 72 db 0,1 ml-es csőbe	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Alumíniumblokk a reakciók manuális összeállítására standart 8 x 12-es elrendezésben 96 db 0,2 ml-es csőbe	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 strip 4 csővel és 4 kupakkal 1000 reakcióhoz	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strip 4 csővel és 4 kupakkal 10 000 reakcióhoz	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 vékonyfalú cső 1000 reakcióhoz	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 vékonyfalú cső 1000 reakcióhoz	981008

A naprakész licencinformációkat és a termékspecifikus jogi nyilatkozatokat lásd a megfelelő QIAGEN készlet kézikönyvében vagy felhasználói útmutatójában. A QIAGEN készletek kézikönyvei és felhasználói útmutatói elérhetők az alábbi címen: www.qiagen.com, vagy igényelhetők a QIAGEN Műszaki ügyfélszolgálatától, illetve a helyi forgalmazóktól.

Ez az oldal szándékosan lett üresen hagyva

Ez az oldal szándékosan lett üresen hagyva

Ez az oldal szándékosan lett üresen hagyva

Ezen termék megvásárlásával a vásárló jogot kap a terméknek humán in vitro diagnosztikai célra történő felhasználására. A vásárlás nem eredeztet a fentiekben túl semmilyen más licenstet vagy szabadalmat.

Védjegyek: QIAGEN[®], *artus*[®], EZ1[®], EASY*artus*[®], Rotor-Gene[®] (QIAGEN csoport).

Az *artus* HSV-1/2 RG PCR készlet az in vitro diagnosztikai orvostechnikai eszközökről szóló 98/79/EK direktíva alapján CE-jelöléssel rendelkezik. Nem minden országban elérhető.

Korlátozott licenz megállapodás

Ennek a terméknek a használatával bármely *artus* HSV-1/2 RG PCR készlet beszerzője és használója egyetért az alábbi feltételekkel:

1. Az *artus* HSV-1/2 RG PCR készlet kizárólag az *artus HSV-1/2 RG PCR készlet kézikönyv* alapján és csak a készletben található elemekkel együtt használható. A QIAGEN valamennyi szellemi tulajdonjoga alapján nem járul hozzá, hogy felhasználják és beleépítsék a készletben lévő elemeket a készletben nem megtalálható elemekkel, kivéve abban az esetben, ha az szerepel a az *artus HSV-1/2 QS-RGQ készlet kézikönyvben* vagy a www.qiagen.com honlapon található további protokollok valamelyikében.
2. A kifejezett licenccen kívül a QIAGEN nem vállal garanciát arra, hogy ez a készlet és/vagy ennek használata harmadik fél jogait nem sérti.
3. Ez a készlet és elemeinek licence csak egyszeri használatra érvényes, és nem szabad őket újrafelhasználni, felújítani vagy újraértékesíteni.
4. A QIAGEN egyértelműen elutasít minden olyan (kifejezett vagy hallgatólagosan beleértett) engedélyt, amelyet korábban nem nyilvánított ki.
5. Ezen készlet vevője és felhasználója elfogadja, hogy sem ő maga nem teszi és senki másnak sem engedélyez semmilyen lépést, amely a fenti pontok megszegéséhez vezet vagy azokat elősegíti. Ezen korlátozott licenc egyezményben foglalt korlátozásokat a QIAGEN bármely bíróságon keresztül érvényesítheti, továbbá a licenc megszegőjét a nyomozati és bírósági eljárás teljes költségének megtérítésére kötelezheti, beleértve az ügyvédi díjakat is olyan eljárásban, amelynek célja a korlátozott licenc, valamint a készletekhez és elemeihez kapcsolódó szellemi tulajdonjog betartatása.

A legújabb licenfeltételekről a www.qiagen.com oldalon tájékozódhat.

© 2009-2014 QIAGEN, minden jog fenntartva.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

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

China ■ Orders 800-988-0326 ■ Fax 800-988-0329 ■ Technical 800-988-0325

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-33430-4826 ■ Technical 800-787980

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

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 1544 7146 ■ Technical 1544 7145

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

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

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

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

Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax +65-68548184 ■ Technical 1800-742-4368

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

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

