



artus[®] VZV RG PCR Kit Handbuch

 24 (Katalognr. 4502263)
 96 (Katalognr. 4502265)

Version 1



Quantitative In-vitro-Diagnostik

Zur Verwendung mit den Rotor-Gene[®] Q Thermocyclern



4502263, 4502265



1056824DE



QIAGEN GmbH, QIAGEN Straße 1, D-40724 Hilden

R4



1056824DE



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN ist der führende Anbieter innovativer Proben- und Testtechnologien zur Isolierung und zum Nachweis von Bestandteilen aus jeder biologischen Probe. Unsere technologisch und qualitativ hochwertigen Produkte und unser exzellenter Service garantieren Erfolg von der Probenvorbereitung bis zum Ergebnis.

QIAGEN setzt Standards bei:

- Aufreinigung von DNA, RNA und Proteinen
- Testsystemen für Nukleinsäuren und Proteine
- microRNA-Forschung und RNAi
- Automatisierung von Proben- und Testtechnologien

Wir stellen Ihnen die neuesten Technologien zur Verfügung, damit Sie schnell und sicher die besten Ergebnisse erzielen können. Weitere Informationen finden Sie im Internet unter www.qiagen.com.

Inhalt

Vorgesehener Verwendungszweck	6
Zusammenfassung und Erklärung	6
Informationen zu den Erregern	6
Verfahrensprinzip	7
Mitgelieferte Materialien	7
Kit-Inhalt	7
Erforderliche, nicht mitgelieferte Materialien	8
Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen	8
Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	9
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	9
Durchführung	9
DNA-Isolierung	9
Interne Kontrolle	10
Protokoll: PCR und Auswertung	11
Interpretation der Ergebnisse	18
Quantifizierung	18
Ergebnisse	19
Hilfe zur Fehlerbehebung	20
Qualitätskontrolle	23
Anwendungseinschränkungen	23
Leistungsmerkmale	23
Analytische Sensitivität	23
Spezifität	24
Präzision	26
Literatur	29
Symbole	29
Ansprechpartner	30
Bestellinformationen	31

Vorgesehener Verwendungszweck

Der *artus* VZV RG PCR Kit ist ein In-vitro-Test zur Quantifizierung der DNA des Varicella-Zoster-Virus (VZV) im Liquor cerebrospinalis des Menschen mittels Nukleinsäure-Amplifikation. Dieser diagnostische Testkit verwendet die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und wurde für die Verwendung mit den Rotor-Gene Q Thermocyclern konfiguriert.

Hinweis: Der *artus* VZV RG PCR Kit kann nicht mit Rotor-Gene Q 2plex Thermocyclern verwendet werden.

Zusammenfassung und Erklärung

Der *artus* VZV RG PCR Kit ist ein gebrauchsfertiges System für den Nachweis von VZV-DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf den Rotor-Gene Q Thermocyclern. Der VZV RG Master enthält die Reagenzien und Enzyme zur spezifischen Amplifikation eines 82 bp langen Abschnitts des VZV-Genoms sowie für die direkte Detektion dieses Amplifikats im Fluoreszenzkanal Cycling Green des Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q oder Rotor-Gene 6000 (Quelle 470 nm, Detektor 510 nm).

Zusätzlich enthält der *artus* VZV RG PCR Kit zum Nachweis einer möglichen PCR-Inhibition ein zweites heterologes Amplifikationssystem. Diese wird als interne Kontrolle (IC) im Fluoreszenzkanal Cycling Orange des Rotor-Gene Q oder Rotor-Gene 6000 nachgewiesen (Quelle 585 nm, Detektor 610 nm). Dabei wird die Nachweisgrenze der analytischen VZV-PCR (siehe „Analytische Sensitivität“ auf Seite 23) nicht beeinträchtigt. Externe Positivkontrollen (VZV RG QS 1 - 4) werden mitgeliefert, mit denen die Menge der viralen DNA bestimmt werden kann. Lesen Sie hierzu bitte den Abschnitt „Quantifizierung“ auf Seite 18.

Informationen zu den Erregern


Das Varicella-Zoster-Virus (VZV) ist ein DNA-Virus, das durch Tröpfcheninfektion oder durch direkten Kontakt von Mensch zu Mensch übertragen wird. Eine VZV-Infektion führt zu einer leicht erhöhten Körpertemperatur und einem mäßig beeinträchtigten Allgemeinzustand. Charakteristisch für die Krankheit sind ein vielgestaltiger Hautausschlag mit Quaddeln, Blasen und Krusten und starker Juckreiz (Windpocken). Schwere Verläufe einer VZV-Infektion werden häufig bei Patienten mit Immunsuppression beobachtet und können bei diesen zu gefährlichen Folgeerkrankungen wie Lungen- oder Gehirnentzündung führen. Nach der akuten Infektion verbleibt das Pathogen lebenslang in sensiblen Spinalganglien und Ganglien der Hirnnerven. Bei einer Schwächung des Immunsystems kann es dann zu einem Auftreten einer schwereren Zweiterkrankung kommen (z. B. Gürtelrose).

Verfahrensprinzip

Beim Nachweis von Pathogenen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden spezifische Bereiche aus dem Genom des Pathogens amplifiziert. Bei der Real-Time-PCR wird das entstandene Amplifikat mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen detektiert. Diese sind in der Regel an Oligonukleotid-Sonden gekoppelt, die spezifisch an das Amplifikat binden. Die Beobachtung des Verlaufs der Fluoreszenzintensitäten während der PCR (in Echtzeit, daher „Real-Time-PCR“) ermöglicht den Nachweis und die quantitative Bestimmung des sich anreichernden Produkts, ohne die Probenröhrchen nach der PCR wieder öffnen zu müssen.*

Mitgelieferte Materialien

Kit-Inhalt

artus VZV RG PCR Kit			(24)	(96)
Katalognr.			4502263	4502265
Anzahl der Reaktionen			24	96
Blau	VZV RG Master		2 x 12 Reaktionen	8 x 12 Reaktionen
Gelb	VZV RG Mg-Sol [†]	Mg-Sol	600 µl	600 µl
Rot	VZV RG QS 1 ‡ (1 x 10 ⁴ Kopien/µl)	QS	200 µl	200 µl
Rot	VZV RG QS 2 ‡ (1 x 10 ³ Kopien/µl)	QS	200 µl	200 µl
Rot	VZV RG QS 3 ‡ (1 x 10 ² Kopien/µl)	QS	200 µl	200 µl
Rot	VZV RG QS 4 ‡ (1 x 10 ¹ Kopien/µl)	QS	200 µl	200 µl
Grün	VZV RG IC [§]	IC	1.000 µl	2 x 1.000 µl
Weiß	Wasser (PCR-Qualität)		1.000 µl	1.000 µl
	Handbuch		1	1

[†] Magnesiumlösung.

[‡] Quantifizierungsstandard.

[§] Interne Kontrolle.

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

Erforderliche, nicht mitgelieferte Materialien

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDSs) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

Reagenzien

- DNA-Isolierungskit (siehe „DNA-Isolierung“ auf Seite 9)

Verbrauchsartikel

- sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Strip-Röhrchen und Deckel, 0,1 ml, zur Verwendung mit 72-well-Rotor (Kat.-Nr. 981103 oder 981106)
- Ersatzweise: PCR-Röhrchen, 0,2 ml, zur Verwendung mit 36-well-Rotor (Kat.-Nr. 981005 oder 981008)

Ausrüstung

- Pipetten (verstellbar)*
- Laborschüttler (Vortex)*
- Tischzentrifuge* mit Rotor für 2-ml-Reaktionsgefäße
- Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q oder Rotor-Gene Thermocycler*† mit Fluoreszenzkanälen für Cycling Green und Cycling Orange
- Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q Software-Version ab 1.7.94 (Rotor-Gene 6000 Software-Version 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94)
- Kühlblock (Ladeblock 72 x 0,1-ml-Röhrchen, Kat.-Nr. 9018901, oder Ladeblock 96 x 0,2-ml-Röhrchen, Kat.-Nr. 9018905)

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

Für in-vitro-diagnostische Anwendungen

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern entnehmen (safety data sheets, SDSs). In unserer Online-Sammlung der Sicherheitsdatenblätter unter www.qiagen.com/safety finden Sie zu jedem QIAGEN® Kit und zu jeder Kit-Komponente das jeweilige SDS als PDF-Datei, die Sie einsehen und ausdrucken können.

Entsorgen Sie Proben und Ansätze gemäß Ihren örtlichen Sicherheitsvorschriften.

* Stellen Sie sicher, dass die Geräte gemäß den Herstellerempfehlungen geprüft und kalibriert wurden.

† Der *artus* VZV RG PCR Kit kann nicht mit Rotor-Gene Q 2plex Thermocyclern verwendet werden.

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Folgendes sollte vom Anwender immer beachtet werden:

- Sterile Pipettenspitzen mit Filter verwenden.
- Positivmaterial (Proben, Positivkontrollen, Amplifikate) räumlich getrennt von den übrigen Reagenzien aufreinigen, lagern und zur Reaktion zusetzen.
- Alle Komponenten vor Assay-Beginn bei Raumtemperatur (15-25 °C) vollständig auftauen.
- Nach dem Auftauen die Komponenten durchmischen (durch Auf- und Abpipettieren oder stoßweises Mischen auf dem Laborschüttler [Vortex]) und dann kurz zentrifugieren.
- Arbeiten Sie zügig und halten Sie die Komponenten auf Eis oder im Kühlblock (72/96-well-Ladeblock).

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Die Komponenten des *artus* VZV RG PCR Kits sollten bei -15 bis -30°C gelagert werden – unter diesen Lagerbedingungen sind sie bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren (mehr als 2-mal) sollte vermieden werden, da dadurch die Sensitivität verringert werden kann. Bei unregelmäßigem Gebrauch sollten deshalb die Reagenzien aliquotiert werden. Die Reagenzien sollten nicht länger als 5 Stunden bei 2 bis 8 °C gelagert werden.

Durchführung

DNA-Isolierung

Der EZ1 DSP Virus Kit (QIAGEN, Kat.-Nr. 62724)* ist validiert für die Aufreinigung viraler Nukleinsäuren aus humanem Liquor mit dem *artus* VZV RG PCR Kit. Führen Sie die Aufreinigung viraler Nukleinsäuren nach den Anweisungen im *EZ1 DSP Virus Kit Handbook* mit einer Probe mit einem Anfangsvolumen von 200 µl aus.

Hinweis: Der *artus* VZV RG PCR Kit sollte nicht mit auf Phenol basierenden Aufreinigerungsverfahren verwendet werden.

Hinweis: Der Einsatz von Carrier-RNA ist für die Effizienz der Aufreinigung und damit für die DNA-/RNA-Ausbeute von entscheidender Bedeutung. Geben Sie

zu jeder Aufreinigung die geeignete Menge Carrier-RNA entsprechend den Anweisungen im *EZ1 DSP Virus Kit Handbook* hinzu.

Hinweis: Die interne Kontrolle des *artus VZV RG PCR Kits* kann bei der Aufreinigung direkt verwendet werden (siehe „Interne Kontrolle“ weiter unten).

Interne Kontrolle

Eine interne Kontrolle (VZV RG IC) wird mitgeliefert. Mit ihr kann sowohl das DNA-Isolierungsverfahren kontrolliert als auch die PCR auf mögliche Inhibition überprüft werden. Für diese Anwendung geben Sie die interne Kontrolle in einem Verhältnis von 0,1 µl pro 1 µl Elutionsvolumen zur Aufreinigung hinzu. Wenn beispielsweise mit dem *EZ1 DSP Virus Kit* die viralen Nukleinsäuren in 60 µl Elutionspuffer (AVE) eluiert sind, dann sollten anfänglich 6 µl der internen Kontrolle zugesetzt werden.

Hinweis: Die interne Kontrolle und Carrier-RNA (siehe „DNA-Isolierung“ auf Seite 9) dürfen nur zu der Mischung aus Lysepuffer und Probenmaterial oder direkt zum Lysepuffer zugesetzt werden.

Die interne Kontrolle darf nicht direkt zum Probenmaterial zugesetzt werden. Bei Zugabe zum Lysepuffer beachten Sie bitte, dass die Mischung aus interner Kontrolle und Lysepuffer–Carrier-RNA frisch angesetzt und sofort verwendet werden muss (Lagerung der Mischung bei Raumtemperatur oder gekühlt für nur wenige Stunden kann bereits zum Versagen der internen Kontrolle und zu einer Beeinträchtigung der Aufreinigungseffizienz führen).

Hinweis: Geben Sie die interne Kontrolle und die Carrier-RNA nicht direkt zum Probenmaterial hinzu.

Optional kann die interne Kontrolle ausschließlich zur Kontrolle einer möglichen PCR-Inhibition verwendet werden. Für diese Anwendung geben Sie die interne Kontrolle direkt zu der Mischung aus VZV RG Master und VZV RG Mg-Sol hinzu, wie in Arbeitsschritt 2b des Protokolls beschrieben (Seite 12).

* Der *EZ1 DSP Virus Kit* ist auch als CE-IVD-markierte *EASYartus® VZV RG PCR Kits* in Kombination mit dem *artus VZV RG PCR Kit* erhältlich (siehe Bestellinformationen auf Seite 31).

Protokoll: PCR und Auswertung

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Machen Sie sich vor Beginn des Protokolls mit dem Thermocycler Rotor-Gene Q vertraut. (Siehe Anwenderhandbuch des Geräts.)
- Achten Sie darauf, dass in jedem PCR-Lauf mindestens ein Quantifizierungsstandard und eine Negativkontrolle (Wasser, PCR-Qualität) mitgeführt werden. Zur Erstellung einer Standardkurve verwenden Sie bei jedem PCR-Lauf alle 4 mitgelieferten Quantifizierungsstandards (VZV RG QS 1 – 4).

Vor Beginn durchzuführende Arbeiten

- Achten Sie darauf, dass der Kühlblock (Zubehör zum Rotor-Gene Q Thermocycler) auf 2 bis 8 °C vorgekühlt ist.
- Alle Reagenzien sollten vor Testbeginn vollständig bei Raumtemperatur aufgetaut, gut durchmischt (mehrfaches Auf- und Abpipettieren oder kurzes Vortex-Mischen) und anschließend anzentrifugiert werden.

Verfahren

- 1. Setzen Sie die gewünschte Anzahl PCR-Röhrchen in die Adapter des Kühlblocks ein.**
- 2. Wenn Sie die interne Kontrolle verwenden, um das DNA-Aufreinigungsverfahren zu überwachen und eine mögliche PCR-Inhibition zu kontrollieren, folgen Sie Arbeitsschritt 2a. Wenn Sie die interne Kontrolle ausschließlich verwenden, um eine mögliche PCR-Inhibition zu kontrollieren, folgen Sie Arbeitsschritt 2b.**
 - 2a. Die interne Kontrolle wurde der Aufreinigung schon zugesetzt (siehe „Interne Kontrolle“ auf Seite 9). Setzen Sie in diesem Fall eine Master-Mischung nach Tabelle 1 an.**

Die Reaktionsmischung enthält typischerweise alle für die PCR benötigte Komponenten außer der Probe.

Tabelle 1. Ansetzen der Master-Mischung (interne Kontrolle wird zum Überwachen der DNA-Aufreinigung und zum Kontrollieren einer PCR-Inhibition verwendet)

Anzahl Proben	1	12
VZV RG Master	25,5 µl	306 µl
VZV RG Mg-Sol	4,5 µl	54 µl
VZV RG IC	0 µl	0 µl
Gesamtvolumen	30 µl	360 µl

- 2b. Die interne Kontrolle muss direkt zu der Mischung aus VZV RG Master und VZV RG Mg-Sol hinzugefügt werden. Setzen Sie in diesem Fall eine Master-Mischung nach Tabelle 2 an.**

Die Reaktionsmischung enthält typischerweise alle für die PCR benötigte Komponenten außer der Probe.

Tabelle 2. Ansetzen der Master-Mischung (interne Kontrolle wird ausschließlich zum Kontrollieren einer PCR-Inhibition verwendet)

Anzahl Proben	1	12
VZV RG Master	25,5 µl	306 µl
VZV RG Mg-Sol	4,5 µl	54 µl
VZV RG IC	2 µl	24 µl
Gesamtvolumen	32 µl*	384 µl*

* Die Volumenzunahme durch Zugabe der internen Kontrolle wird beim Ansetzen des PCR-Assays vernachlässigt. Die Sensitivität des Detektionssystems wird dadurch nicht beeinträchtigt.

- 3. Pipettieren Sie 30 µl der Master-Mischung in jedes PCR-Röhrchen. Geben Sie dann 20 µl eluierte Proben-DNA hinzu (siehe Tabelle 3). Dementsprechend müssen 20 µl mindestens eines der Quantifizierungsstandards (VZV RG QS 1 – 4) als eine Positivkontrolle und 20 µl Wasser (Wasser, PCR-Qualität) als eine Negativkontrolle verwendet werden.**

Tabelle 3. Ansetzen des PCR-Assays

Anzahl Proben	1	12
Master mix (Master-Mischung)	30 μ l	je 30 μ l
Probe	20 μ l	je 20 μ l
Gesamtvolumen	50 μl	je 50 μl

- 4. Verschließen Sie die PCR-Röhrchen. Setzen Sie unbedingt den Schließring (locking ring, Zubehör des Rotor-Gene) auf den Rotor, um ein unbeabsichtigtes Öffnen der Reaktionsgefäße während des Laufs zu verhindern.**
- 5. Erstellen Sie zum Nachweis der VZV-DNA ein Temperaturprofil gemäß den folgenden Arbeitsschritten.**

Einstellen allgemeiner Assay-Parameter	Abbildungen 1, 2, 3
Initiale Aktivierung des Hot-Start-Enzyms	Abbildung 4
Amplifikation der DNA	Abbildung 5
Einstellen der Sensitivität der Fluoreszenzkanäle	Abbildung 6
Starten des Laufs	Abbildung 7

Alle Angaben beziehen sich auf die Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q Software-Version 1.7.94 und Rotor--Gene 6000 Software-Versionen 1.7.65, 1.7.87 und 1.7.94. Einzelheiten zur Programmierung des Rotor-Gene Thermocyclers entnehmen Sie bitte dem Anwenderhandbuch des Geräts. Die jeweiligen Einstellungen sind in den Abbildungen durch schwarze Rahmen hervorgehoben. Die Abbildungen umfassen auch Rotor-Gene Q Thermocycler.

6. Öffnen Sie zunächst das Dialogfeld „New Run Wizard“ (Assistent für neuen Lauf) (Abb. 1). Markieren Sie das Kontrollkästchen „Locking Ring Attached“ (Schließring angebracht) und klicken Sie dann auf „Next“ (Weiter).

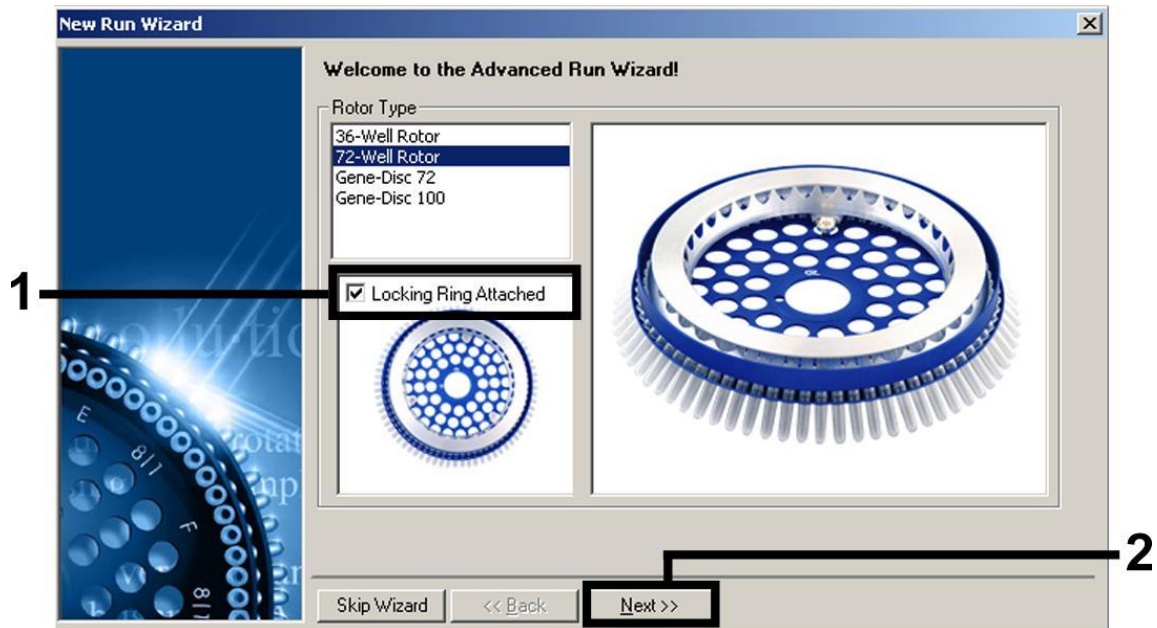


Abbildung 1. Das Dialogfeld „New Run Wizard“.

7. Wählen Sie als Volumen der PCR-Reaktion „50“ und klicken Sie auf „Next“ (Abb. 2).

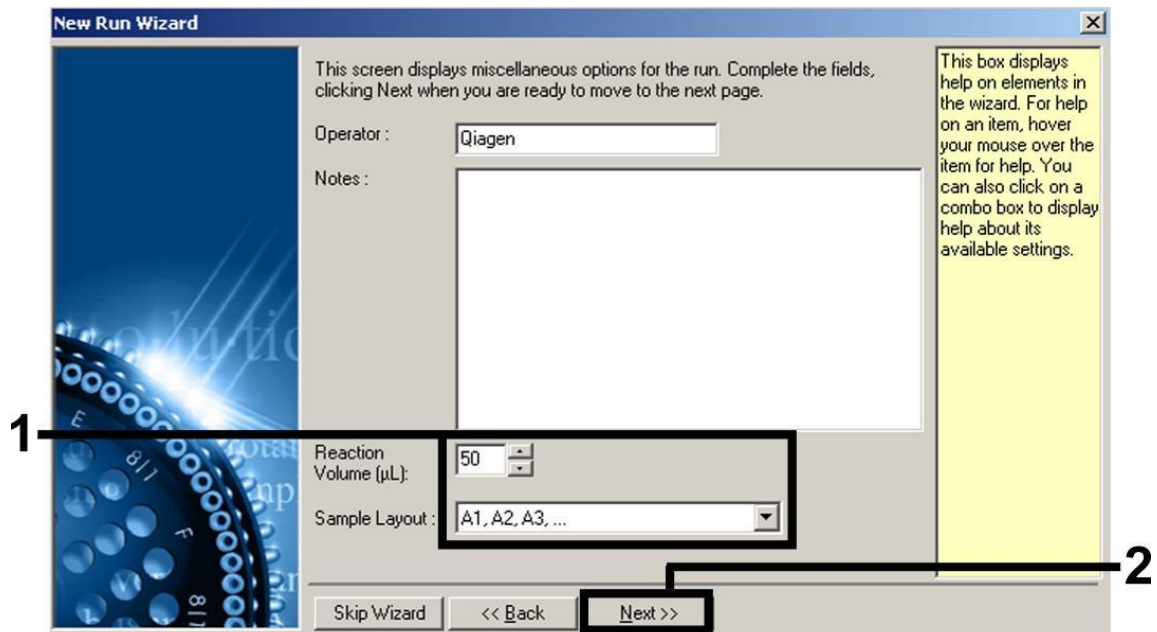


Abbildung 2. Einstellen allgemeiner Assay-Parameter.

8. Klicken Sie im nächsten Dialogfeld „New Run Wizard“ (Abb. 3) auf die Schaltfläche „Edit Profile“ (Profil bearbeiten) und programmieren Sie das Temperaturprofil wie in Abb. 3 bis 5 gezeigt.

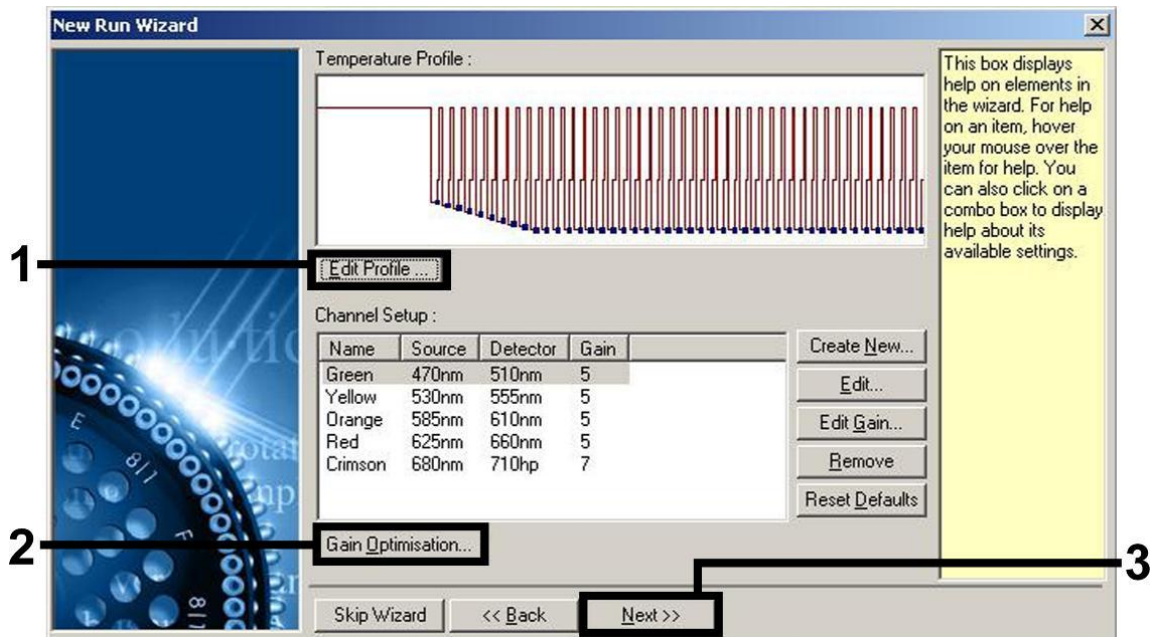


Abbildung 3. Bearbeiten des Profils.

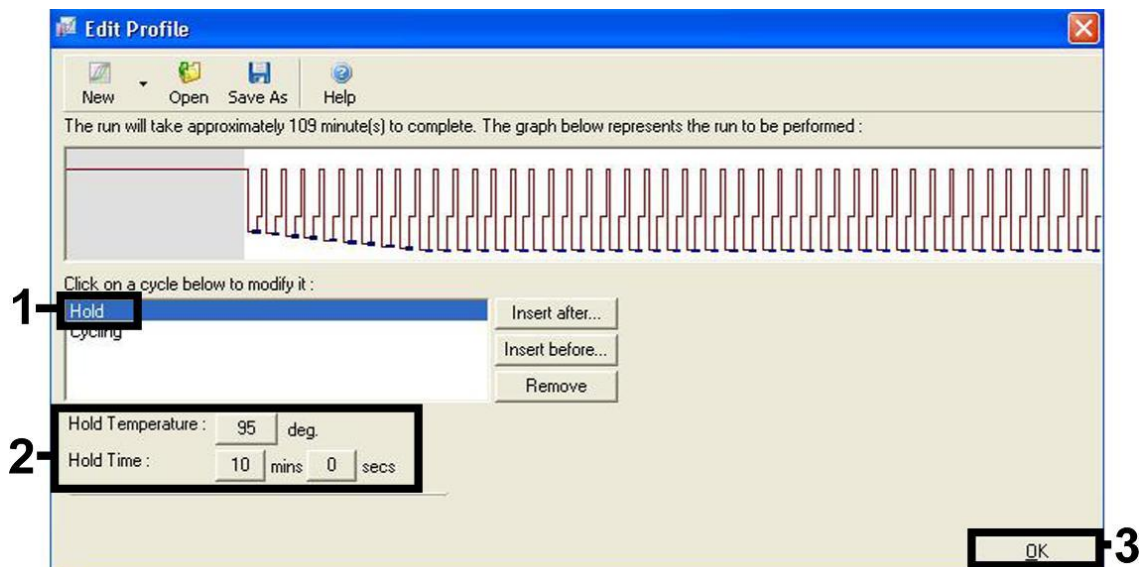


Abbildung 4. Initiale Aktivierung des Hot-Start-Enzyms.

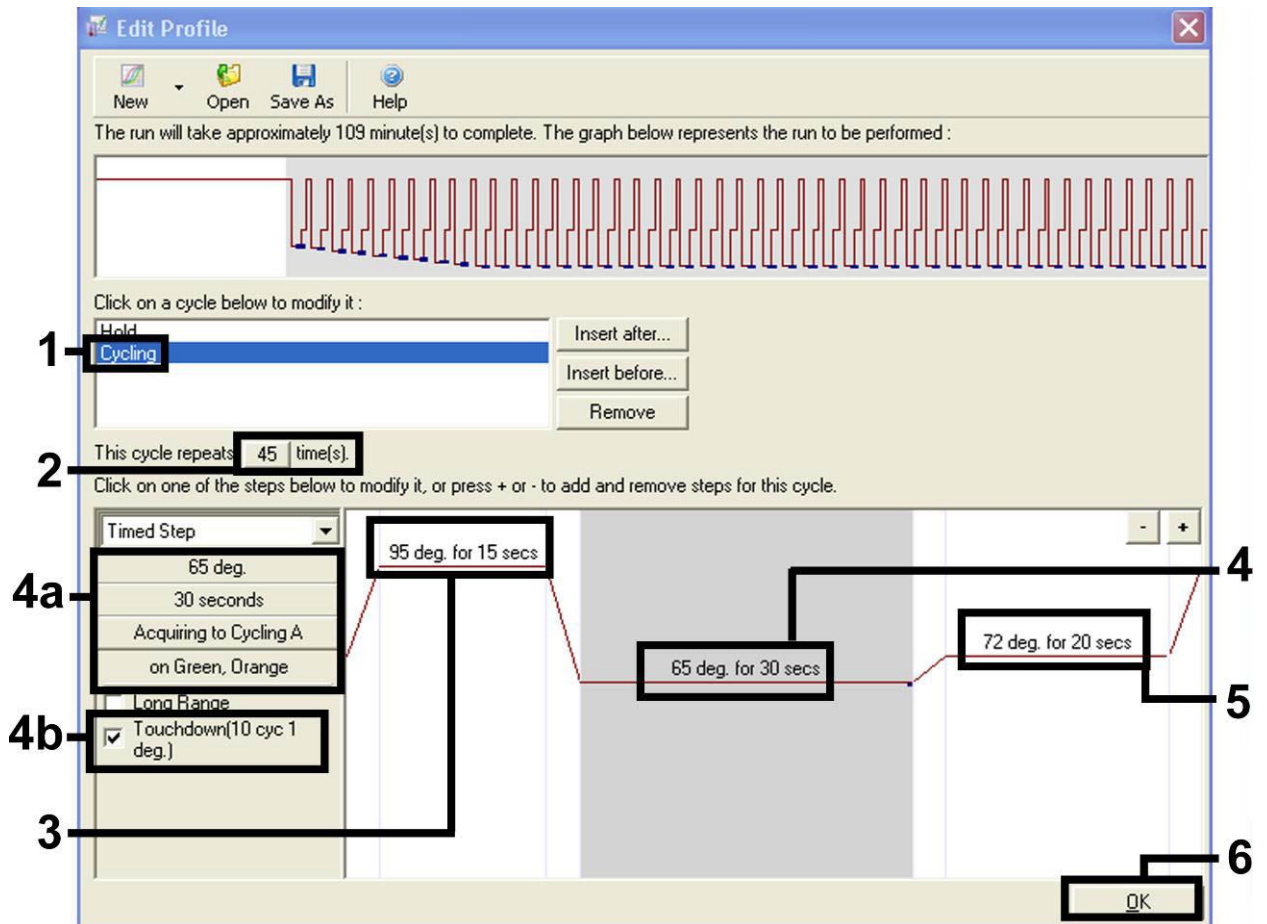


Abbildung 5. Amplifikation der DNA. Aktivieren Sie unbedingt die Touchdown-Funktion für 10 Zyklen im Annealing-Schritt.

9. Der Messbereich der Fluoreszenzkanäle muss auf die Fluoreszenzintensität in den PCR-Ansätzen abgestimmt werden. Klicken Sie im Dialogfeld „New Run Wizard“ auf „Gain Optimisation“ (Optimierung der Verstärkung), um das Dialogfeld (siehe Abb. 3) „Auto-Gain Optimisation Setup“ (Einrichten der Optimierung der automatischen Verstärkung) zu öffnen. Stellen Sie die Kalibrierungstemperatur auf „65“, damit sie der Annealing-Temperatur des Amplifikationsprogramms entspricht (Abb. 6).

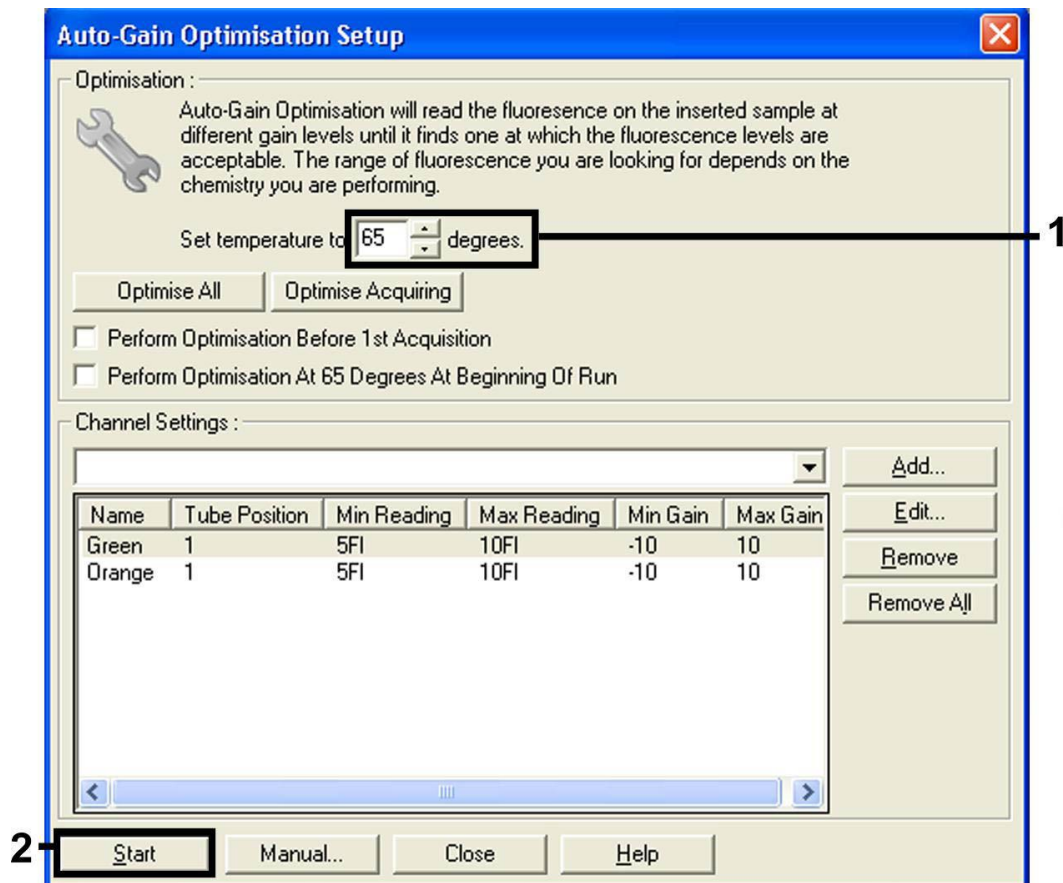


Abbildung 6. Einstellen der Sensitivität der Fluoreszenzkanäle.

10. Die bei der Kalibrierung der Kanäle ermittelten Verstärkungswerte werden automatisch gespeichert und im letzten Menüfenster des Programmierverfahrens aufgeführt (Abb. 7). Klicken Sie auf „Start Run“ (Lauf starten).

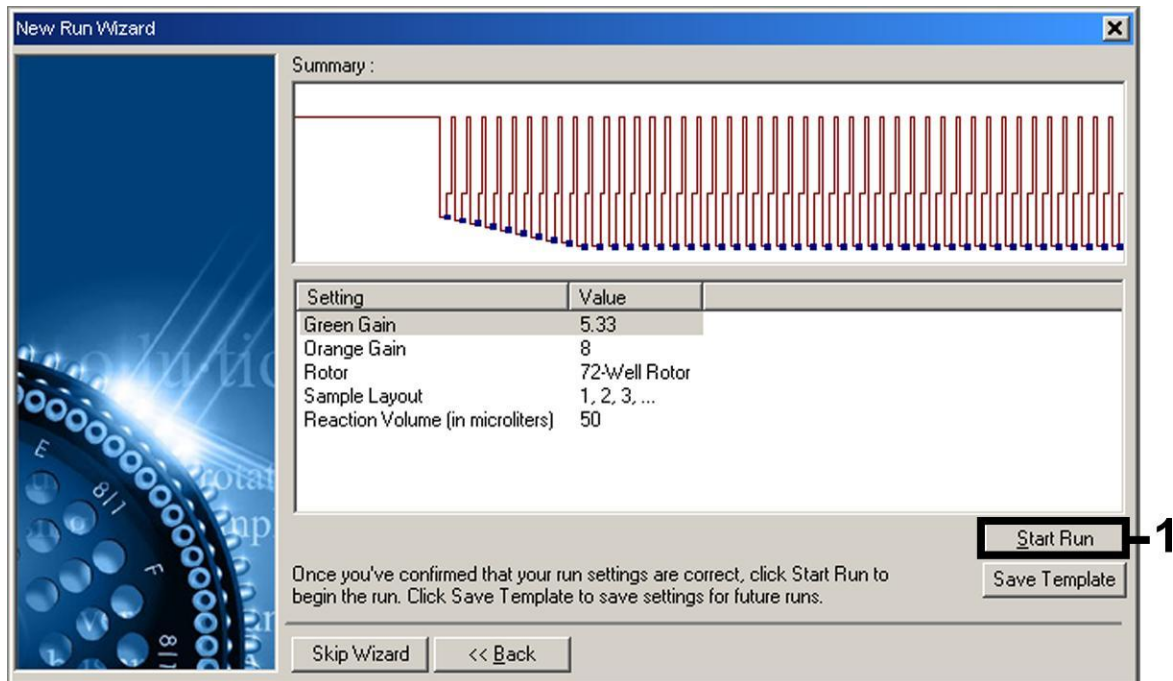


Abbildung 7. Starten des Laufs.

Interpretation der Ergebnisse

Quantifizierung

Die mitgelieferten Quantifizierungsstandards (VZV RG QS 1 – 4) werden wie eine bereits aufgereinigte Probe behandelt und im gleichen Volumen eingesetzt (20 µl). Um eine Standardkurve auf dem Rotor-Gene Q Thermocycler zu erstellen, setzen Sie bitte alle 4 Quantifizierungsstandards ein und definieren Sie diese im Dialogfeld „Edit Samples“ (Proben bearbeiten) als Standards mit den angegebenen Konzentrationen (siehe Gerätehandbuch).

Hinweis: Die Quantifizierungsstandards sind in Kopien/µl definiert. Zur Umrechnung der anhand der Standardkurve ermittelten Werte in Kopien/ml Probenmaterial muss die folgende Gleichung angewendet werden:

$$\text{Ergebnis (Kopien/ml)} = \frac{\text{Ergebnis (Kopien/}\mu\text{l)} \times \text{Elutionsvolumen (}\mu\text{l)}}{\text{Probenvolumen (ml)}}$$

Es sollte grundsätzlich das anfängliche Probenvolumen in die oben stehende Gleichung eingesetzt werden. Darauf ist zu achten, wenn das Probenvolumen vor der Nukleinsäure-Aufreinigung verändert wurde (z. B. Volumenreduktion

durch Zentrifugieren oder Volumenerhöhung durch Auffüllen auf das zur Isolierung erforderliche Volumen).

Ergebnisse

Beispiele für PCR-Reaktionen mit positiven und negativen Ergebnissen sind in Abb. 8 und Abb. 9 gezeigt.

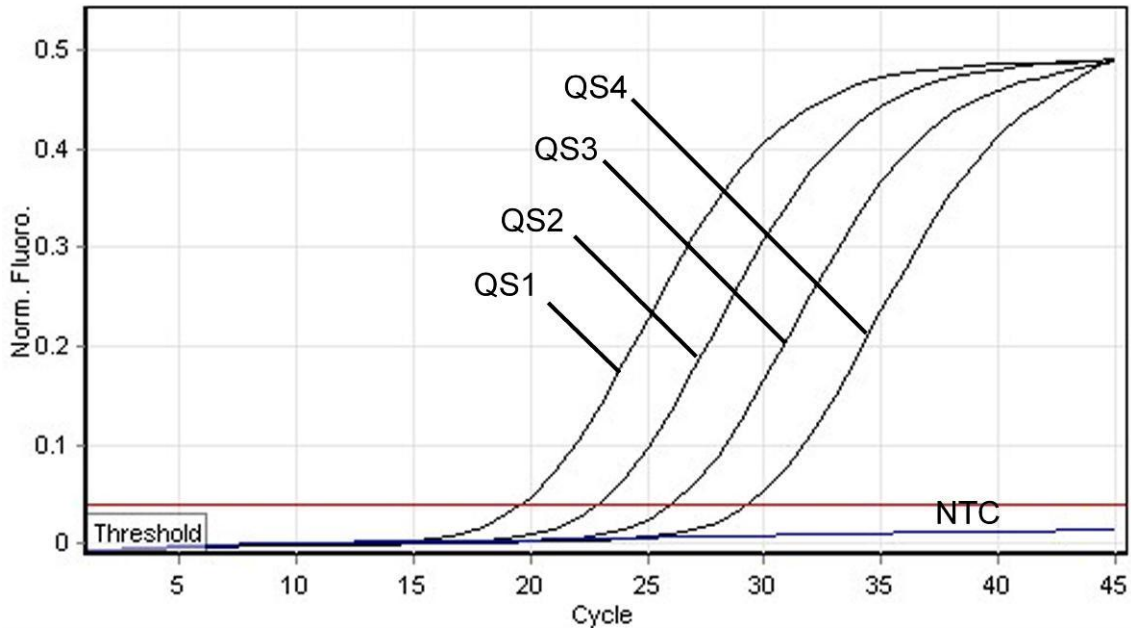


Abbildung 8. Nachweis der Quantifizierungsstandards (VZV RG QS 1 – 4) im Fluoreszenzkanal Cycling Green. NTC: No template control (Kontrolle ohne Template) (Negativkontrolle).

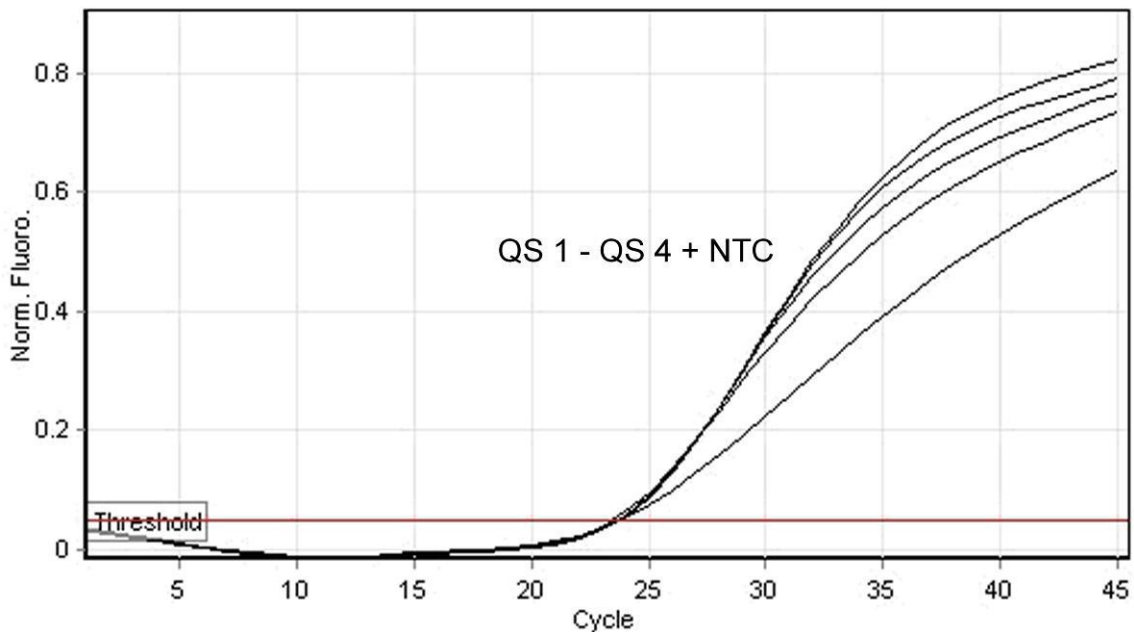


Abbildung 9. Detektion der internen Kontrolle (IC) im Fluoreszenzkanal Cycling Orange bei gleichzeitiger Amplifikation der Quantifizierungsstandards (VZV RG QS 1 - 4). NTC: Kontrolle ohne Template (Negativkontrolle).

**Im Fluoreszenzkanal Cycling Green wird ein Signal detektiert.
Das Ergebnis der Analyse ist positiv: Die Probe enthält VZV-DNA.**

In diesem Fall ist die Detektion eines Signals im Kanal Cycling Orange unmaßgeblich, da eine hohe Ausgangskonzentration von VZV-DNA (positives Signal im Kanal Cycling Green) zu einem abgeschwächten oder ausbleibenden Fluoreszenzsignal der internen Kontrolle im Kanal Cycling Orange führen kann (Kompetition).

**Im Fluoreszenzkanal Cycling Green wird kein Signal detektiert.
Gleichzeitig erscheint ein Signal von der internen Kontrolle im Kanal Cycling Orange.**

In der Probe ist keine VZV-DNA nachweisbar. Sie kann daher als negativ angesehen werden.

Bei negativer VZV-PCR schließt das detektierte Signal der internen Kontrolle die Möglichkeit aus, dass die PCR inhibiert wurde.

Weder im Kanal Cycling Green noch im Kanal Cycling Orange wird ein Signal detektiert.

Eine Aussage zum Ergebnis ist nicht möglich.

Informationen zu Fehlerquellen und deren Beseitigung finden Sie unter „Hilfe zur Fehlerbehebung“ auf Seite 20.

Hilfe zur Fehlerbehebung

In diesem Kapitel finden Sie nützliche Hinweise, die Ihnen bei der Lösung eventuell auftretender Probleme helfen können. Weitere Informationen finden Sie auch auf der Seite „Frequently Asked Questions“ unseres Support-Centers unter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Außerdem beantworten die Wissenschaftler des Technischen Service bei QIAGEN gerne Ihre Fragen zu den Angaben und dem Protokoll in diesem Handbuch sowie zu Probenvorbereitungs- und Testtechnologien allgemein (Möglichkeiten der Kontaktaufnahme finden Sie auf der Rückseite dieses Handbuchs und im Internet unter www.qiagen.com).

Kommentare und Vorschläge

Kein Signal bei den Positivkontrollen (VZV RG QS 1 - 4) im Fluoreszenzkanal Cycling Green

Kommentare und Vorschläge

- | | |
|--|--|
| a) Der ausgewählte Fluoreszenzkanal für die PCR-Datenanalyse entspricht nicht dem Protokoll | Wählen Sie bei der Datenanalyse den Fluoreszenzkanal Cycling Green für die analytische VZV-PCR und den Fluoreszenzkanal Cycling Orange für die PCR der internen Kontrolle aus. |
| b) Programmierung des Temperaturprofils für den Rotor-Gene Thermocycler ist nicht korrekt | Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit dem Protokoll. Siehe „Protokoll: PCR und Auswertung“ auf Seite 10. |
| c) Fehlerhafte Konfiguration der PCR | Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte mit Hilfe des Pipettierschemas und wiederholen Sie ggf. die PCR. Siehe „Protokoll: PCR und Auswertung“ auf Seite 10. |
| d) Die Lagerbedingungen einer oder mehrerer Komponenten des Kits entsprachen nicht den Anweisungen in „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ (Seite 9) | Überprüfen Sie sowohl die Lagerbedingungen als auch das Verfallsdatum der Reagenzien (s. Etikett des Kits) und verwenden Sie gegebenenfalls einen neuen Kit. |
| e) Das Verfallsdatum des <i>artus</i> VZV RG PCR Kits ist abgelaufen | Überprüfen Sie sowohl die Lagerbedingungen als auch das Verfallsdatum der Reagenzien (s. Etikett des Kits) und verwenden Sie gegebenenfalls einen neuen Kit. |

Schwaches oder ausbleibendes Signal der internen Kontrolle einer negativen Liquorprobe, die mit dem EZ1 DSP Virus Kit aufgereinigt wurde, im Fluoreszenzkanal Cycling Orange bei gleichzeitiger Abwesenheit eines Signals im Kanal Cycling Green

- | | |
|--|---|
| a) Die PCR-Bedingungen entsprechen nicht dem Protokoll | Überprüfen Sie die PCR-Bedingungen (siehe oben) und wiederholen Sie gegebenenfalls die PCR mit korrigierten Einstellungen. |
| b) Die PCR wurde inhibiert | Stellen Sie sicher, dass Sie das von uns empfohlene Aufreinigungsverfahren benutzen und halten Sie sich exakt an die Anweisungen des Herstellers. |

Kommentare und Vorschläge

- | | |
|--|---|
| c) DNA ging bei der Aufreinigung verloren | Wenn die interne Kontrolle bei der Aufreinigung zugegeben wurde, kann ein Ausbleiben des Signals der internen Kontrolle bedeuten, dass DNA während der Aufreinigung verloren ging. Verwenden Sie unbedingt das empfohlene Aufreinigungsverfahren (siehe „DNA-Isolierung“ auf Seite 9) und halten Sie sich exakt an die Anweisungen des Herstellers. |
| d) Die Lagerbedingungen einer oder mehrerer Komponenten des Kits entsprachen nicht den Anweisungen in „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ (Seite 9) | Überprüfen Sie sowohl die Lagerbedingungen als auch das Verfallsdatum der Reagenzien (s. Etikett des Kits) und verwenden Sie gegebenenfalls einen neuen Kit. |
| e) Das Verfallsdatum des <i>artus</i> VZV RG PCR Kits ist abgelaufen | Überprüfen Sie sowohl die Lagerbedingungen als auch das Verfallsdatum der Reagenzien (s. Etikett des Kits) und verwenden Sie gegebenenfalls einen neuen Kit. |

Signale bei den Negativkontrollen im Fluoreszenzkanal Cycling Green der analytischen PCR

- | | |
|---|---|
| a) Kontamination bei Vorbereitung der PCR | <p>Wiederholen Sie die PCR mit Replikaten mit noch unbenutzten Reagenzien.</p> <p>Verschließen Sie die einzelnen PCR-Gefäße nach Möglichkeit jeweils direkt nach Zugabe der zu untersuchenden Probe.</p> <p>Pipettieren Sie die Positivkontrollen grundsätzlich zuletzt.</p> <p>Achten Sie darauf, dass Arbeitsflächen und Geräte regelmäßig dekontaminiert werden.</p> |
| b) Kontamination bei der Aufreinigung | <p>Wiederholen Sie Aufreinigung und PCR der zu untersuchenden Proben unter Verwendung noch unbenutzter Reagenzien.</p> <p>Achten Sie darauf, dass Arbeitsflächen und Geräte regelmäßig dekontaminiert werden.</p> |

Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagementsystem von QIAGEN wird jede Charge des *artus* VZV RG PCR Kits nach festgelegten Prüfkriterien getestet, um eine einheitliche Produktqualität sicherzustellen.

Anwendungseinschränkungen

Die Anwendung des Produkts muss durch Personal erfolgen, das speziell in Verfahren unterrichtet und ausgebildet wurde, die unter Verwendung von In-vitro-Diagnostika durchgeführt werden.

Die genaue Einhaltung der Anweisungen des Benutzerhandbuchs ist erforderlich, um optimale PCR-Ergebnisse zu erhalten.

Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten sind zu beachten. Abgelaufene Reagenzien dürfen nicht benutzt werden.

Selten auftretende Mutationen innerhalb der von den Primern und/oder der Sonde des Kits abgedeckten hochkonservierten Bereichen des Virengenoms können, wenn sie vorliegen, zu einer Unterbestimmung führen oder dazu, dass die Anwesenheit des Virus nicht detektiert wird. Validität und Leistung des Tests werden regelmäßig überprüft, um bei Bedarf Veränderungen vornehmen zu können.

Leistungsmerkmale

Analytische Sensitivität

Zum Bestimmen der analytischen Sensitivität des *artus* VZV RG PCR Kits wurde eine Verdünnungsreihe genomischer VZV-DNA von 10 bis 0,001 Kopien/ μ l angesetzt und mit dem *artus* VZV RG PCR Kit auf dem Rotor-Gene 6000 Thermocycler analysiert. Die Untersuchungen wurden an drei verschiedenen Tagen in Form von Achtfach-Bestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mittels Probit-Analyse bestimmt. Abbildung 10 zeigt eine grafische Darstellung der Probit-Analyse auf dem Rotor-Gene 6000 Thermocycler. Die analytische Nachweisgrenze des *artus* VZV RG PCR Kits in Kombination mit dem Rotor-Gene Q MDx/Q/6000 Thermocycler beträgt 0,136 Kopien/ μ l ($p = 0,05$). Dies bedeutet, dass 0,136 Kopien/ μ l mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % nachgewiesen werden können.

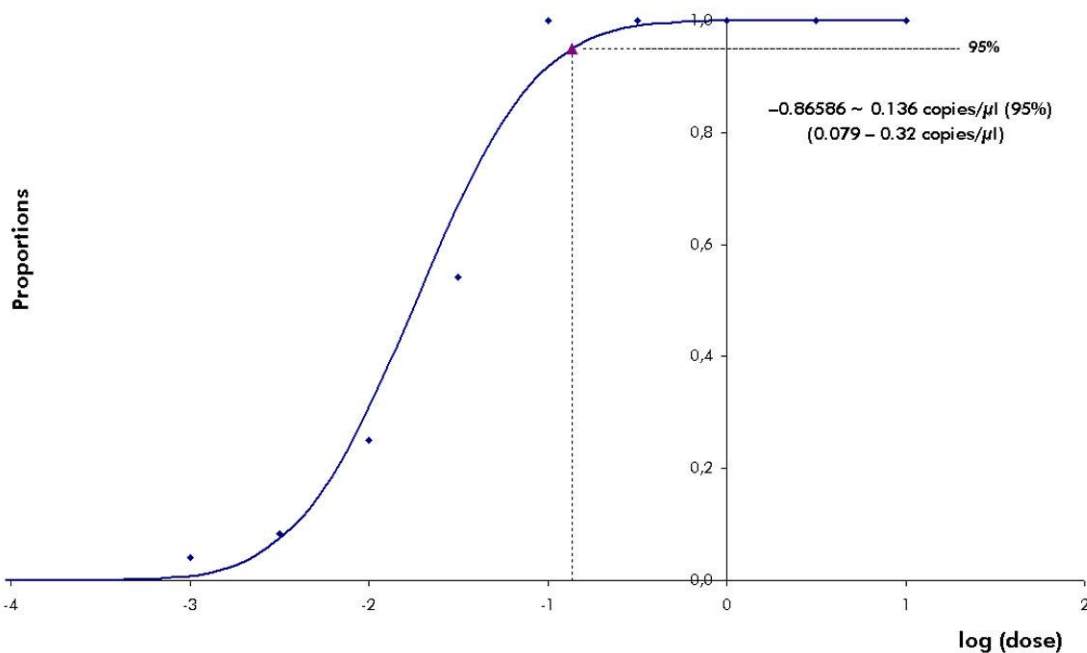


Abbildung 10. Probit-Analyse: VZV (Rotor-Gene 6000). Analytische Sensitivität des *artus* VZV RG PCR Kits auf dem Rotor-Gene 6000 Thermocycler.

Spezifität

Die Spezifität des *artus* VZV RG PCR Kits wird in erster Linie durch die Auswahl der Primer und Sonden sowie die Wahl stringenter Reaktionsbedingungen gewährleistet. Die Primer und Sonden sind anhand einer Sequenzvergleichsanalyse auf eventuelle Homologien zu allen in Genbanken publizierten Sequenzen überprüft worden. Die Nachweisbarkeit aller relevanten Genotypen ist dadurch sichergestellt.

Die Validierung der Spezifität erfolgte zudem an 30 verschiedenen VZV-negativen Liquorproben. Bei diesen wurde mit den im VZV RG Master enthaltenen VZV-spezifischen Primern und Sonden kein Signal erzeugt.

Für die Überprüfung einer potentiellen Kreuzreaktivität des *artus* VZV RG PCR Kits wurde die in Tabelle 4 aufgeführte Gruppe von Kontrollen untersucht. Bei keinem der getesteten Erreger trat eine Reaktion auf.

Tabelle 4. Spezifitätstest des Kits mit potenziell kreuzreaktiven Pathogenen

Kontrollgruppe	VZV (Cycling Green)	Interne Kontrolle (Cycling Orange)
Humanes Herpesvirus 1 (Herpes-simplex-Virus 1)	–	+
Humanes Herpesvirus 2 (Herpes-simplex-Virus 2)	–	+
Humanes Herpesvirus 4 (Epstein-Barr-Virus)	–	+
Humanes Herpesvirus 5 (Zytomegalievirus)	–	+
Humanes Herpesvirus 6A	–	+
Humanes Herpesvirus 6B	–	+
Humanes Herpesvirus 7	–	+
Humanes Herpesvirus 8 (Kaposi- Sarkom-assoziiertes Herpesvirus)	–	+
Hepatitis-A-Virus	–	+
Hepatitis-B-Virus	–	+
Hepatitis-C-Virus	–	+
Humanes Immundefizienz-Virus (HIV)	–	+
Humanes T-lymphotropes Virus 1	–	+
Humanes T-lymphotropes Virus 2	–	+
Enterovirus	–	+
Parvovirus B19	–	+
West-Nil-Virus	–	+

Präzision

Die Präzisionsdaten des *artus* VZV RG PCR Kits wurden mit Rotor-Gene Thermocyclern erhoben und ermöglichen die Bestimmung der Totalvarianz (Gesamtstreuung) des Testsystems. Diese Totalvarianz setzt sich zusammen aus der Intra-Assay-Variabilität (Streuung von Proben derselben Konzentration innerhalb eines Versuchsansatzes), der Inter-Assay-Variabilität (Streuung bei Anwendung durch verschiedene Personen innerhalb eines Labors unter Benutzung verschiedener Geräte gleichen Typs) und der Chargenvariabilität (Streuung bei Verwendung unterschiedlicher Chargen). Aus den erhaltenen Daten wurden jeweils die Standardabweichung, die Varianz und der Variationskoeffizient sowohl für die erregerspezifische PCR als auch für die PCR der internen Kontrolle berechnet.

Präzisionsdaten des *artus* VZV RG PCR Kits wurden anhand des Quantifizierungsstandards mit der geringsten Konzentration (QS 4; 10 Kopien/ μ l) ermittelt. Die Tests wurden in Form von Achtfach-Bestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse für die Präzision wurden anhand der C_T -Werte der Amplifikationskurven berechnet (C_T : threshold cycle, siehe Tabelle 5, Seite 27). Zusätzlich wurde auch die Präzision der quantitativen Werte in Kopien/ μ l mittels der entsprechenden C_T -Werte ermittelt (siehe Tabelle 6 auf Seite 28). Demnach beträgt die Gesamtstreuung einer beliebigen Probe der genannten Konzentration 0,45 % (C_T) bzw. 8,32 % (Konzentration) und für den Nachweis der internen Kontrolle 2,81 % (C_T). Diese Werte basieren auf der Gesamtheit aller Einzelwerte der ermittelten Variabilitäten.

Robustheit

Die Überprüfung der Robustheit dient der Ermittlung der Gesamtausfallrate des *artus* VZV RG PCR Kits. Hierzu wurden 30 VZV-negative Liquorproben mit je 0,4 Kopien/ μ l VZV-DNA (ca. dreifache Konzentration der analytischen Sensitivitätsgrenze) dotiert. Nach der Aufreinigung mit dem EZ1[®] DSP Virus Kit (siehe „DNA-Isolierung“ auf Seite 9) wurden diese Proben mit dem *artus* VZV RG PCR Kit analysiert. Die Ausfallrate betrug für die Gesamtheit der Proben 0 %. Die Robustheit der internen Kontrolle wurde zusätzlich durch die Aufreinigung und Analyse von 30 VZV-negativen Liquorproben überprüft. Die Gesamtausfallrate betrug 0 %. Inhibitionen wurden nicht beobachtet. Damit beträgt die Robustheit des *artus* VZV RG PCR Kits ≥ 99 %.

Reproduzierbarkeit

Die Daten zur Reproduzierbarkeit erlauben eine regelmäßige Leistungsbewertung des *artus* VZV RG PCR Kits sowie einen Effizienzvergleich mit anderen Produkten. Diese Daten werden durch die Teilnahme an etablierten Ringversuchsprogrammen erhoben.

Tabelle 5. Präzision auf Grundlage der C_T-Werte

	Standardabweichung	Varianz	Variationskoeffizient (%)
Intra-Assay-Variabilität: VZV QS 4	0,08	0,01	0,26
Intra-Assay-Variabilität: Interne Kontrolle	0,04	0,002	0,17
Inter-Assay-Variabilität: VZV QS 4	0,15	0,02	0,5
Inter-Assay-Variabilität: Interne Kontrolle	0,39	0,15	1,63
Chargenvariabilität: VZV QS 4	0,1	0,01	0,34
Chargenvariabilität: Interne Kontrolle	0,66	0,43	2,65
Totalvarianz: VZV QS 4	0,13	0,02	0,45
Totalvarianz: Interne Kontrolle	0,68	0,47	2,81

Tabelle 6. Präzisionsdaten auf Grundlage der quantitativen Ergebnisse (in Kopien/ μ l)

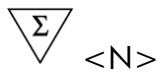
	Standardabweichung	Varianz	Variationskoeffizient (%)
Intra-Assay-Variabilität: VZV QS 4	0,5	0,25	5,46
Inter-Assay-Variabilität: VZV QS 4	0,85	0,72	8,72
Chargenvariabilität: VZV QS 4	0,75	0,56	7,67
Totalvarianz: VZV QS 4	0,81	0,66	8,32

Literatur

QIAGEN führt eine umfangreiche und aktuelle Online-Datenbank mit wissenschaftlichen Publikationen, in denen die Anwendung von QIAGEN Produkten beschrieben wird. Umfassende Suchoptionen ermöglichen Ihnen das Auffinden der für Sie interessanten Artikel durch eine einfache Stichwortsuche oder durch Eingabe von Anwendung, Forschungsgebiet, Titel usw.

Zugang zur vollständigen Literaturliste haben Sie online über die QIAGEN Reference Database unter www.qiagen.com/RefDB/search.asp. Alternativ können Sie sich an den Technischen Service bei QIAGEN oder an Ihren örtlichen Distributor wenden.

Symbole



Inhalt ausreichend für <N> Assays



Verfallsdatum



In-vitro-Diagnostikum



Katalognummer



Chargennummer



Materialnummer



Komponenten



Enthält



Anzahl



Internationale Artikelnummer



Zulässiger Temperaturbereich



Hersteller



Beachten Sie die Anwendungshinweise

Ansprechpartner

Technische Hinweise und weitere Informationen finden Sie in unserem Technical Support Center im Internet unter www.qiagen.com/Support. Sie können außerdem unseren Technischen Service anrufen oder sich an Ihren örtlichen Distributor wenden (siehe hintere Umschlagseite oder im Internet unter www.qiagen.com).

Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Katalognr.
<i>artus</i> VZV RG PCR Kit (24)	Für 24 Reaktionen: Master, 4 Quantifizierungsstandards, interne Kontrolle, Magnesium-Lösung, Wasser (PCR-Qualität)	4502263
<i>artus</i> VZV RG PCR Kit (96)	Für 96 Reaktionen: Master, 4 Quantifizierungsstandards, interne Kontrolle, Magnesium-Lösung, Wasser (PCR-Qualität)	4502265
EASYartus VZV RG PCR Kits — zur vollständig CE-IVD-konformen, integrierten und automatisierten Probenaufreinigung und Pathogendetektion		
EASYartus VZV RG PCR Kit 1	Für 48 Präparationen viraler Nukleinsäuren und 24 Assays: 1 x EZ1 DSP Virus Kit, 1 x <i>artus</i> VZV RG PCR Kit (24)	EA10223
EASYartus VZV RG PCR Kit 2	Für 48 Präparationen viraler Nukleinsäuren und 48 Assays: 1 x EZ1 DSP Virus Kit, 2 x <i>artus</i> VZV RG PCR Kit (24)	EA10224
EZ1 DSP Virus Kit — zur automatisierten gleichzeitigen Aufreinigung viraler DNA und RNA aus 1 bis 14 humanen Plasma-, Serum- oder Liquorproben		
EZ1 DSP Virus Kit (48)	Für 48 Präparationen viraler Nukleinsäuren: Vorgefüllte Reagenzienkartuschen, Einmal-Spitzenhalter, Einmal-Filterspitzen, Probenröhrchen, Elutionsröhrchen, Puffer, Carrier-RNA	62724
Rotor-Gene Q MDx und Zubehör		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Echtzeit-PCR-Cycler mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), Laptop-Computer, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, ohne Installation und Schulung	9002022

Produkt	Inhalt	Katalognr.
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Echtzeit-PCR-Cycler mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), Laptop-Computer, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation und Schulung	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Echtzeit-PCR-Cycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, ohne Installation und Schulung	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Echtzeit-PCR-Cycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation und Schulung	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Echtzeit-PCR-Thermocycler mit 6 Kanälen (blau, grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), umfasst Laptop-Computer, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, ohne Installation und Schulung	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Echtzeit-PCR-Thermocycler mit 6 Kanälen (blau, grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), umfasst Laptop-Computer, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation und Schulung	9002043
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminium-Block für manuelles Ansetzen der Reaktion mit einer Einkanal-Pipette in 72 x 0,1-ml-Röhrchen	9018901

Produkt	Inhalt	Katalognr.
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Aluminium-Block für manuelles Ansetzen der Reaktion in einem 8 x 12 Standard-Array mit 96 x 0,2-ml-Röhrchen	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 Streifen mit je 4 Röhrchen und Deckeln, für 1.000 Reaktionen	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 × 250 Streifen mit je 4 Röhrchen und Deckeln, für 10.000 Reaktionen	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1.000 dünnwandige Röhrchen für 1.000 Reaktionen	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1.000 dünnwandige Röhrchen für 10.000 Reaktionen	981008

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische rechtliche Hinweise finden Sie im Handbuch des jeweiligen QIAGEN-Kits. Handbücher und Gebrauchsanweisungen zu QIAGEN-Kits sind unter www.qiagen.com abrufbar oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder bei Ihrem örtlichen Distributor angefordert werden.

Notizen

Der Erwerb dieses Produkts berechtigt den Käufer zur Nutzung des Produkts in der humanmedizinischen In-vitro-Diagnostik. Eine allgemeine Patent- oder sonstige Lizenz, welche über vorgenanntes Nutzungsrecht des Käufers dieses Produkts hinausgeht, wird nicht gewährt.

Marken: QIAGEN®, artus®, EASYartus®, EZ1®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group).

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung

Mit Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Anwender des artus VZV RG PCR Kits die folgenden Bedingungen an:

1. Der artus VZV RG RCR Kit darf nur gemäß den Angaben im *artus VZV RG RCR Kit Handbuch* und mit den Komponenten, die im Kit geliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen Ihrer Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zum Kit gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zum Kit gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der im *artus VZV RG PCR Kit Handbuch* und in zusätzlichen, im Internet unter www.qiagen.com verfügbaren, Protokollen beschriebenen Anwendungen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieser Kit und/oder die mit ihm durchgeführten Anwendungen die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieser Kit und seine Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Kits stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen könnten oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder dessen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen können im Internet unter www.qiagen.com nachgelesen werden.

© 2009-2014 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

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)

