

Εγχειρίδιο ΚΙΤ *artus*[®] EBV RG PCR



24 (αρ. καταλόγου 4501263)



96 (αρ. καταλόγου 4501265)

Έκδοση 1



Ποσοτική in vitro διάγνωση

Για χρήση με όργανα Rotor-Gene[®] Q



4501263, 4501265



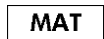
1046897EL



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

GERMANIA

R5



1046897EL



QIAGEN Sample and Assay Technologies

Η QIAGEN ηγείται στο χώρο πρωτοποριακών τεχνολογιών δειγμάτων και προσδιορισμών, παρέχοντας τη δυνατότητα απομόνωσης και ανίχνευσης των περιεχομένων οποιουδήποτε βιολογικού δείγματος. Τα προηγμένα, υψηλής ποιότητας προϊόντα και οι υπηρεσίες μας αποτελούν εγγύηση επιτυχίας - από το δείγμα έως το αποτέλεσμα.

Η QIAGEN θέτει πρότυπα:

- στον καθαρισμό DNA, RNA και πρωτεϊνών
- στους προσδιορισμούς νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών
- στην έρευνα microRNA και RNAi
- στην αυτοματοποίηση τεχνολογιών δειγμάτων και προσδιορισμών

Αποστολή μας είναι η διασφάλιση των δικών σας επιτυχιών και επιτευγμάτων. Για περισσότερες πληροφορίες, επισκεφθείτε μας στη διεύθυνση www.qiagen.com.

Περιεχόμενο

Προβλεπόμενη χρήση	6
Περίληψη και επεξήγηση	6
Πληροφορίες για τον παθογόνο μικροοργανισμό	6
Αρχές της διαδικασίας	6
Υλικά που παρέχονται	7
Περιεχόμενα του kit	7
Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται	7
Προειδοποιήσεις και Προφυλάξεις	8
Γενικές προφυλάξεις	8
Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων	9
Διαδικασία	10
Απομόνωση DNA	10
Εσωτερικός μάρτυρας	13
Πρωτόκολλο: PCR και ανάλυση δεδομένων	15
Ερμηνεία των αποτελεσμάτων	22
Ποσοτικοποίηση	22
Αποτελέσματα	23
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων	25
Ποιοτικός έλεγχος	27
Περιορισμοί	27
Χαρακτηριστικά απόδοσης	28
Αναλυτική ευαισθησία	28
Ειδικότητα	29
Επαναληψιμότητα	30
Βιβλιογραφία	30
Σύμβολα	31
Πληροφορίες επικοινωνίας	31
Πληροφορίες παραγγελίας	32

Προβλεπόμενη χρήση

Το kit *artus* EBV RG PCR είναι ένας in vitro έλεγχος ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων για την ποσοτικοποίηση DNA του ιού Epstein-Barr (EBV) σε ανθρώπινο πλάσμα, ορό, ENY, ή κύτταρα του αίματος. Αυτό το kit διαγνωστικού ελέγχου χρησιμοποιεί την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και είναι διαμορφωμένο για χρήση με τα όργανα Rotor-Gene Q.

Περίληψη και επεξήγηση

Το kit *artus* EBV RG PCR αποτελεί ένα έτοιμο για χρήση σύστημα για την ανίχνευση DNA του ιού EBV με χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) σε όργανα Rotor--Gene Q. Το EBV RG Master περιέχει αντιδραστήρια και ένζυμα για την ειδική ενίσχυση μίας περιοχής 97 bp του γονιδιώματος EBV και για την απευθείας ανίχνευση του ειδικού προϊόντος ενίσχυσης (αμπλικόνιο) στο κανάλι φθορισμού Cycling Green του Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q, ή Rotor-Gene 6000, ή Cycling A.FAM™ του Rotor-Gene 3000.

Επιπλέον, το kit *artus* EBV RG PCR περιλαμβάνει ακόμη ένα ετερόλογο σύστημα ενίσχυσης για τη διαπίστωση τυχόν αναστολής της PCR. Το σύστημα αυτό ανιχνεύεται ως εσωτερικός μάρτυρας (IC) στο κανάλι φθορισμού Cycling Yellow του Rotor--Gene Q MDx, Rotor-Gene Q, ή Rotor-Gene 6000, ή Cycling A.JOE™ του Rotor-Gene 3000. Το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης EBV PCR (βλέπε «Αναλυτική ευαισθησία», σελίδα 28) δεν μειώνεται. Παρέχονται εξωτερικοί θετικοί μάρτυρες (EBV RG QS 1–4), οι οποίοι καθιστούν δυνατό τον προσδιορισμό της ποσότητας του ιικού DNA. Για περισσότερες πληροφορίες, βλέπε «Ποσοτικοποίηση», σελίδα 22.

Πληροφορίες για τον παθογόνο μικροοργανισμό

Η μετάδοση του ιού Epstein-Barr (EBV) γίνεται κυρίως μέσω του στόματος με μολυσμένη σίελο. Σε γενικές γραμμές, η λοίμωξη από EBV, ειδικά σε περίπτωση προσβολής κατά την παιδική ηλικία, είναι ασυμπτωματική. Η κλινική ένδειξη οξείας λοίμωξης είναι η λοιμώδης μονοπυρήνωση που σχετίζεται με πυρετό, κόπωση και κυνάγχη, καθώς και φλεγμονή των λεμφαδένων και του σπληνός. Σε ορισμένους ασθενείς, αυτά τα συμπτώματα επανεμφανίζονται σε χρόνια βάση. Βαριές μορφές λοίμωξης από EBV συμβαίνουν σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς και άτομα με ανεπάρκειες των T κυττάρων.

Αρχές της διαδικασίας


Η ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) βασίζεται στην ενίσχυση ειδικών περιοχών του γονιδιώματος του παθογόνου μικροοργανισμού. Στην PCR πραγματικού χρόνου, το προϊόν της ενίσχυσης ανιχνεύεται με φθορίζουσες χρωστικές. Αυτές είναι συνήθως συνδεδεμένες με ανιχνευτές ολιγονουκλεοτιδίων που

προσδένονται ειδικά στο ενισχυμένο προϊόν. Η παρακολούθηση των εντάσεων φθορισμού κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης της PCR (δηλ. σε πραγματικό χρόνο) επιτρέπει την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση του συσσωρευόμενου προϊόντος χωρίς να χρειάζεται να ανοιχτούν ξανά τα σωληνάρια αντίδρασης μετά το πέρας της εκτέλεσης PCR.*

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

Υλικά που παρέχονται

Περιεχόμενα του ΚΙΤ

artus EBV RG PCR Kit			(24)	(96)
Αρ. καταλόγου			4501263	4501265
Αριθμός αντιδράσεων			24	96
Μπλε	EBV RG Master		2 x 12 αντιδράσεις	8 x 12 αντιδράσεις
Κόκκινο	EBV RG QS 1* (5 x 10 ⁴ αντίγραφα/μl)	QS	200 μl	200 μl
Κόκκινο	EBV RG QS 2* (5 x 10 ³ αντίγραφα/μl)	QS	200 μl	200 μl
Κόκκινο	EBV RG QS 3* (5 x 10 ² αντίγραφα/μl)	QS	200 μl	200 μl
Κόκκινο	EBV RG QS 4* (5 x 10 ¹ αντίγραφα/μl)	QS	200 μl	200 μl
Πράσινο	EBV RG IC [†]	IC	1.000 μl	2 x 1.000 μl
Λευκό	Νερό (βαθμού PCR)		1.000 μl	1.000 μl
	Εγχειρίδιο		1	1

* Πρότυπο ποσοτικοποίησης.

† Εσωτερικός μάρτυρας.

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

Όταν εργάζεστε με χημικά θα πρέπει πάντοτε να φοράτε προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφαλείας (SDS), τα οποία και είναι διαθέσιμα από τον προμηθευτή του προϊόντος.

Αντιδραστήρια

- Κιτ απομόνωσης DNA (βλέπε «Απομόνωση DNA», σελίδα 10)

Αναλώσιμα

- Στείρα ρύγχη πιπέτας με φίλτρο
- Σωληνάρια και καπάκια ταινιών, 0,1 ml, για χρήση με στροφέα 72 φρεατίων (αριθμός καταλόγου 981103 ή 981106)
- Εναλλακτικά: PCR Tubes (Σωληνάρια PCR), 0,2 ml, για χρήση με στροφέα 36 φρεατίων (αριθμός καταλόγου 981005 ή 981008)

Εξοπλισμός

- Πιπέτες (ρυθμιζόμενες)*
- Αναδευτήρας τύπου vortex*
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος* με στροφέα για σωληνάρια αντίδρασης των 2 ml
- Όργανο Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q ή Rotor-Gene* με κανάλια φθορισμού για τα Cycling Green και Cycling Yellow ή με κανάλια φθορισμού για τα Cycling A.FAM και Cycling A.JOE
- Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q με έκδοση λογισμικού 1.7.94 ή υψηλότερη (Rotor-Gene 6000 με έκδοση λογισμικού 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94· Rotor-Gene 3000 με έκδοση λογισμικού 6.0.23)
- Τεμάχιο ψύξης (τεμάχιο φόρτωσης 72 σωληναρίων των 0,1 ml, αριθμός καταλόγου 9018901 ή τεμάχιο φόρτωσης 96 σωληναρίων των 0,2 ml, αριθμός καταλόγου 9018905)

Προειδοποιήσεις και Προφυλάξεις

Για διαγνωστική χρήση in vitro

Όταν εργάζεστε με χημικά θα πρέπει πάντοτε να φοράτε προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες παρακαλείστε να ανατρέξετε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφαλείας (SDS). Αυτά τα δελτία είναι διαθέσιμα online σε εύχρηστη μορφή PDF στη διεύθυνση www.qiagen.com/safety όπου και μπορείτε να βρείτε, να προβάλλετε και να εκτυπώσετε τα δελτία SDS για κάθε κιτ και συστατικό των κιτ της QIAGEN®.

Απορρίψτε τα απόβλητα δειγμάτων και προσδιορισμών σύμφωνα με τις εκάστοτε τοπικές διατάξεις ασφαλείας.

Γενικές προφυλάξεις

Ο χρήστης πρέπει πάντοτε να λαμβάνει υπόψη του τα ακόλουθα σημεία:

- Χρησιμοποιείτε στείρα ρύγχη πιπέτας με φίλτρο.
- Φυλάσσετε και λαμβάνετε θετικά υλικά (δείγματα, θετικούς μάρτυρες και προϊόντα πολλαπλασιασμού) χωριστά από όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια και προσθέτετέ τα στο μείγμα αντίδρασης σε χωρικά διαχωρισμένη εγκατάσταση.

* Βεβαιωθείτε πως τα όργανα έχουν ελεγχθεί και βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

- Αποψύχετε σχολαστικά όλα τα συστατικά σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) πριν από την έναρξη του προσδιορισμού.
- Μετά την απόψυξη, αναμίξτε τα συστατικά (πιέζοντας την πιπέτα επαναλαμβανόμενα προς τα επάνω και προς τα κάτω ή με παλμική ανάδευση (vortex)) και φυγοκεντρήστε σύντομα.
- Εργάζεστε γρήγορα και διατηρείτε τα συστατικά σε πάγο ή μέσα στο τεμάχιο ψύξης (τεμάχιο φόρτωσης 72/96 φρεατίων).

Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων

Τα συστατικά του kit *artus* EBV RG PCR θα πρέπει να φυλάσσονται στους -15°C έως

-30°C και είναι σταθερά έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα. Θα πρέπει να αποφεύγεται η επαναλαμβανόμενη απόψυξη και κατάψυξη (>2 φορές) διότι μπορεί να επιφέρει έκπτωση της ευαισθησίας του προσδιορισμού. Για το λόγο αυτό, εάν η χρήση δεν είναι τακτική, τα αντιδραστήρια θα πρέπει να καταψύχονται σε κλάσματα. Η φύλαξη στους 2–8°C δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις 5 ώρες.

Διαδικασία

Απομόνωση DNA

Τα kit της QIAGEN που παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 έχουν επικυρωθεί για τον καθαρισμό ιικού DNA από τους ενδεικνυόμενους τύπους ανθρώπινων δειγμάτων για χρήση με το kit *artus* EBV RG PCR. Εκτελέστε τον καθαρισμό του ιικού DNA σύμφωνα με τις οδηγίες στα εγχειρίδια των kit.

Πίνακας 1. Kit καθαρισμού επικυρωμένα για χρήση με το kit *artus* EBV RG PCR

Υλικό δειγμάτων	Όγκος δείγματος	Kit απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων	Αριθμός καταλόγου (QIAGEN)	Φορέας RNA
Ορός, πλάσμα, ENY	200 μl	QIAamp [®] DNA Mini Kit (Kit QIAamp [®] DNA Mini) (50)	51304	Δεν περιέχεται
Ορός, πλάσμα	1 ml	QIAamp UltraSens [®] Virus Kit (Kit QIAamp UltraSens [®] Virus) (50)	53704	Περιέχεται
Αιμοσφαίρια	200 μl	QIAamp DNA Blood Mini Kit (Kit QIAamp DNA Blood Mini) (50)	51104	Δεν περιέχεται
Πλάσμα	400 μl	EZ1 [®] DSP Virus Kit (Kit EZ1 [®] DSP Virus) (48)*	62724	Περιέχεται

* Το kit EZ1 DSP Virus είναι επίσης διαθέσιμο με τη μορφή των kit EASY*artus*[®] EBV RG PCR με σήμανση CE για IVD, σε συνδυασμό με το kit *artus* EBV RG PCR (βλέπε σελίδα 32 για πληροφορίες παραγγελίας).

Σημείωση: Σωληνάρια λήψης αίματος επικαλυμμένα με αντιπηκτικά μπορεί να αναστείλουν την PCR. Ωστόσο, αυτοί οι αναστολείς μπορούν να εξαλειφθούν από τη χρήση των kit απομόνωσης που παρατίθενται παραπάνω. Συνιστούμε να αποφεύγετε τη χρήση αίματος με ηπαρίνη.

Σημείωση: Η χρήση του kit *artus* EBV RG PCR δεν επιτρέπεται μαζί με μεθόδους απομόνωσης με βάση τη φαινόλη.

Χρήση του kit QIAamp DNA Blood Mini ή του kit QIAamp DNA Mini

Σημείωση: Η χρήση φορέα RNA είναι κρίσιμης σημασίας για την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης και επομένως για την απόδοση DNA/RNA. Παρακαλούμε σημειώστε ότι η προσθήκη του φορέα (RNA Homopolymer Poly[rA] (RNA-ομοπολυμερές πολυ[rA]), που δεν περιλαμβάνεται στο kit QIAamp DNA Blood Mini ή στο kit QIAamp DNA Mini) συνιστάται επισταμένως για την εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων από σωματικά υγρά ελεύθερα κυττάρων και υλικό με μικρές ποσότητες DNA και RNA (π.χ. ENY). Σε αυτές τις περιπτώσεις, προετοιμάστε το φορέα RNA ως εξής.

- Επανεναιωρήστε το λυοφιλοποιημένο φορέα RNA (RNA Homopolymer Poly[rA] (RNA-ομοπολυμερές πολυ[rA]), που δεν περιλαμβάνεται στο kit QIAamp DNA Blood Mini ή στο kit QIAamp DNA Mini) με χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (μη χρησιμοποιήσετε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης) του kit εκχύλισης (ρυθμιστικό διάλυμα AE του kit QIAamp DNA Mini και kit QIAamp DNA Blood Mini), και προετοιμάστε αραιώση με συγκέντρωση 1 µg/µl. Χωρίστε αυτό το διάλυμα φορέα RNA σε έναν αριθμό υποπολλαπλασίων επαρκών για τις ανάγκες σας και φυλάξτε τα στους -15°C έως -30°C. Αποφεύγετε την επαναλαμβανόμενη απόψυξη (>2 x) ενός υποπολλαπλασίου φορέα RNA.
- Χρησιμοποιήστε 1 µg φορέα RNA ανά 100 µl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης. Για παράδειγμα, εάν το πρωτόκολλο εκχύλισης χρησιμοποιεί 200 µl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης, προσθέστε 2 µl φορέα RNA (1 µg/µl) απευθείας στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (ρυθμιστικό διάλυμα AL του kit QIAamp DNA Mini και του kit QIAamp DNA Blood Mini). Πριν την έναρξη κάθε εκχύλισης, ένα μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και φορέα RNA (και εσωτερικού μάρτυρα, όπου εφαρμόζεται, βλέπε «Εσωτερικός μάρτυρας», σελίδα 13) θα πρέπει να παρασκευάζεται φρέσκο σύμφωνα με το σχήμα μεταφοράς με πιπέτα στον Πίνακα 2:

Πίνακας 2. Σχήμα μεταφοράς με πιπέτα για χρήση με το kit QIAamp DNA Blood Mini ή το kit QIAamp DNA Mini

Αριθμός δειγμάτων	1	12
Ρυθμιστικό διάλυμα AL (ρυθμιστικό διάλυμα λύσης)*	π.χ. 200 µl	π.χ. 2.400 µl
Φορέας RNA (1 µg/µl)	2 µl	24 µl
Συνολικός όγκος	202 µl	2.424 µl
Όγκος ανά εκχύλιση	200 µl	ανά 200 µl

* Περιέχει υδροχλωρική γουανιδίνη, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο του kit για πληροφορίες ασφάλειας.

Σημείωση: Χρησιμοποιείτε για την εκχύλιση φρέσκο παρασκευασμένο μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και φορέα RNA αμέσως μετά την παρασκευή του. Η φύλαξη του μείγματος δεν είναι δυνατή.

Σημείωση: Ο εσωτερικός μάρτυρας του kit *artus* EBV RG PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας στη διαδικασία απομόνωσης (βλέπε «Εσωτερικός μάρτυρας», σελίδα 13).

Σημείωση: Συνιστούμε επισταμένως να εκτελείτε το συνιστώμενο βήμα 10 φυγοκέντρησης στο πρωτόκολλο [εγχειρίδιο QIAamp DNA Mini και Blood Mini (*QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook*), τρίτη έκδοση, Απρίλιος 2010, σελίδες 29 και 32] για την απομάκρυνση των καταλοίπων αιθανόλης. Συνιστούμε την αύξηση του χρόνου αυτής της φυγοκέντρησης σε 3 λεπτά.

Συνιστούμε την έκλυση του DNA σε 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης για να λάβετε τη μέγιστη ευαισθησία του kit *artus* EBV RG PCR.

Χρήση του kit QIAamp UltraSens Virus

Σημείωση: Η χρήση φορέα RNA είναι κρίσιμης σημασίας για την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης και επομένως για την απόδοση DNA/RNA. Για να αυξήσετε τη σταθερότητα του φορέα RNA που παρέχεται με το kit QIAamp UltraSens Virus, συνιστούμε την ακόλουθη διαδικασία κατά παρέκκλιση του εγχειριδίου χρήστη του kit εκχύλισης, η οποία διαφέρει από τις οδηγίες στο εγχειρίδιο του kit.

- Πριν από την πρώτη χρήση του kit, επανεναιωρήστε το λυοφιλοποιημένο φορέα RNA σε 310 μl του ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης (ρυθμιστικό διάλυμα AVE) που παρέχεται με το kit (τελική συγκέντρωση 1 μg/μl, μη χρησιμοποιείτε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης). Χωρίστε αυτό το διάλυμα φορέα RNA σε έναν αριθμό υποπολλαπλασίων επαρκών για τις ανάγκες σας και φυλάξτε τα στους -15°C έως -30°C. Αποφεύγετε την επαναλαμβανόμενη απόψυξη (>2 x) ενός υποπολλαπλασίου φορέα RNA.
- Πριν την έναρξη κάθε εκχύλισης, ένα μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και φορέα RNA (και εσωτερικού μάρτυρα, όπου εφαρμόζεται, βλέπε «Εσωτερικός μάρτυρας», σελίδα 13) θα πρέπει να παρασκευάζεται φρέσκο σύμφωνα με το σχήμα μεταφοράς με πιπέτα στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Σχήμα μεταφοράς με πιπέτα για χρήση με το kit QIAamp UltraSens Virus

Αριθμός δειγμάτων	1	12
Ρυθμιστικό διάλυμα AC (ρυθμιστικό διάλυμα λύσης)*	800 μl	9.600 μl
Φορέας RNA (1 μg/μl)	5,6 μl	67,2 μl

Συνολικός όγκος	805,6 μl	9.667,2 μl
Όγκος ανά εκχύλιση	800 μl	ανά 800 μl

* Περιέχει ισοπροπανόλη, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο του kit για πληροφορίες ασφάλειας.

Σημείωση: Χρησιμοποιείτε για την εκχύλιση φρέσκο παρασκευασμένο μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και φορέα RNA αμέσως μετά την παρασκευή του. Η φύλαξη του μείγματος δεν είναι δυνατή.

Σημείωση: Ο εσωτερικός μάρτυρας του kit *artus* EBV RG PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας στη διαδικασία απομόνωσης (βλέπε «Εσωτερικός μάρτυρας», σελίδα 13).

Σημείωση: Συνιστούμε επισταμένως να εκτελείτε την πρόσθετη φυγοκέντρηση που περιγράφεται στο βήμα 14 του πρωτοκόλλου [εγχειρίδιο QIAamp UltraSens Virus (*QIAamp UltraSens Virus Handbook*), Απρίλιος 2010, σελίδα 17] για την απομάκρυνση των καταλοίπων αιθανόλης. Συνιστούμε την αύξηση του χρόνου αυτής της φυγοκέντρησης σε 3 λεπτά.

Συνιστούμε την έκλυση του DNA σε 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης για να λάβετε τη μέγιστη ευαισθησία του kit *artus* EBV RG PCR.

Το kit QIAamp UltraSens Virus επιτρέπει τη συμπύκνωση του δείγματος. Εάν χρησιμοποιείτε υλικό δείγματος άλλο από ορό ή πλάσμα, προσθέστε τουλάχιστον 50% (v/v) αρνητικού ανθρώπινου πλάσματος στο δείγμα.

Χρήση του kit EZ1 DSP Virus

Σημείωση: Η χρήση φορέα RNA είναι κρίσιμης σημασίας για την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης και επομένως για την απόδοση DNA/RNA. Προσθέστε την κατάλληλη ποσότητα φορέα RNA σε κάθε εκχύλιση ακολουθώντας τις οδηγίες στο εγχειρίδιο kit EZ1 DSP Virus (*EZ1 DSP Virus Kit Handbook*).

Σημείωση: Ο εσωτερικός μάρτυρας του kit *artus* EBV RG PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας στη διαδικασία απομόνωσης (βλέπε «Εσωτερικός μάρτυρας», παρακάτω).

Σημείωση: Συνιστούμε επισταμένως τη χρήση των κεκαθαμένων νουκλεϊκών οξέων για PCR αμέσως μετά την εκχύλιση με χρήση του kit EZ1 DSP Virus. Εναλλακτικά, τα εκλούσματα μπορούν να φυλαχθούν για έως 3 ημέρες στους 4°C πριν από την ανάλυση PCR.

Εσωτερικός μάρτυρας

Παρέχεται ένας εσωτερικός μάρτυρας (EBV RG IC). Με τη βοήθειά του, ο χρήστης παρακολουθεί τη διαδικασία απομόνωσης DNA και ελέγχει τυχόν αναστολή της PCR. Με τη χρήση του kit EZ1 DSP Virus για εκχύλιση, πρέπει να προστεθεί ο εσωτερικός μάρτυρας σύμφωνα με τις οδηγίες στο εγχειρίδιο kit EZ1 DSP Virus (*EZ1 DSP Virus Kit Handbook*). Με τη χρήση του kit

QIAamp UltraSens Virus, του QIAamp DNA Blood Mini, ή του QIAamp DNA Mini, προσθέστε τον εσωτερικό μάρτυρα στην απομόνωση σε αναλογία 0,1 μl ανά 1 μl όγκου έκλουσης. Για παράδειγμα, με χρήση του kit QIAamp UltraSens Virus, το DNA εκλύεται σε 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος AVE. Επομένως, αρχικά θα πρέπει να προστεθούν 5 μl του εσωτερικού μάρτυρα. Η ποσότητα του εσωτερικού μάρτυρα που χρησιμοποιείται εξαρτάται μόνο από τον όγκο έκλουσης.

Σημείωση: Ο εσωτερικός μάρτυρας και ο φορέας RNA (βλέπε «Απομόνωση DNA», σελίδα 10) πρέπει να προστίθενται μόνο στο μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και υλικού δείγματος ή απευθείας στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης.

Ο εσωτερικός μάρτυρας δεν πρέπει να προστίθεται στο υλικό δείγματος απευθείας. Εάν προστεθεί στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης, παρακαλούμε σημειώστε ότι το μείγμα εσωτερικού μάρτυρα και ρυθμιστικού διαλύματος λύσης–φορέα RNA πρέπει να παρασκευάζεται φρέσκο και να χρησιμοποιείται αμέσως (η φύλαξη του μείγματος σε θερμοκρασία δωματίου ή στο ψυγείο για μόνο μερικές ώρες μπορεί να οδηγήσει σε αποτυχία του εσωτερικού μάρτυρα και μειωμένη αποτελεσματικότητα εκχύλισης).

Σημείωση: Μην προσθέτετε τον εσωτερικό μάρτυρα και το φορέα RNA απευθείας στο υλικό του δείγματος.

Προαιρετικά, ο εσωτερικός μάρτυρας μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά για τον έλεγχο τυχόν αναστολής της PCR. Για αυτήν την εφαρμογή, προσθέστε τον εσωτερικό μάρτυρα απευθείας στο EBV RG Master, όπως περιγράφεται στο βήμα 2β του πρωτοκόλλου (σελίδα 16).

Πρωτόκολλο: PCR και ανάλυση δεδομένων

Σημαντικές υποδείξεις πριν από την έναρξη

- Αφιερώστε χρόνο για να εξοικειωθείτε με το όργανο Rotor-Gene Q προτού ξεκινήσετε το πρωτόκολλο. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του οργάνου.
- Βεβαιωθείτε ότι τουλάχιστον ένα πρότυπο ποσοτικοποίησης καθώς και ένας αρνητικός μάρτυρας (νερό, βαθμού PCR) συμπεριλαμβάνονται ανά εκτέλεση PCR. Για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιήστε και τα 4 παρεχόμενα πρότυπα ποσοτικοποίησης (EBV RG QS 1–4) για κάθε εκτέλεση PCR.

Απαραίτητες ενέργειες πριν από την έναρξη

- Βεβαιωθείτε ότι το τεμάχιο ψύξης (προαιρετικό εξάρτημα του οργάνου Rotor-Gene Q) έχει προψυχθεί στους 2–8°C.
- Πριν από κάθε χρήση, όλα τα αντιδραστήρια θα πρέπει να αποψύχονται πλήρως, να αναμειγνύονται (με επαναλαμβανόμενη πίεση προς τα επάνω και προς τα κάτω της πιπέτας ή με ταχεία ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex) και να φυγοκεντρούνται σύντομα.

Διαδικασία

1. Τοποθετήστε τον επιθυμητό αριθμό σωληναρίων PCR στους προσαρμογείς του τεμαχίου ψύξης.
 2. Εάν χρησιμοποιείτε τον εσωτερικό μάρτυρα για την παρακολούθηση της διαδικασίας απομόνωσης DNA και τον έλεγχο ως προς τυχόν αναστολή της PCR, ακολουθήστε το βήμα 2α. Εάν χρησιμοποιείτε τον εσωτερικό μάρτυρα αποκλειστικά για τον έλεγχο αναστολής της PCR, ακολουθήστε το βήμα 2β.
- 2α. Ο εσωτερικός μάρτυρας έχει ήδη προστεθεί στην απομόνωση (βλέπε «Εσωτερικός μάρτυρας», σελίδα 13). Σε αυτήν την περίπτωση, προετοιμάστε ένα μείγμα master, σύμφωνα με τον Πίνακα 4.**

Το μείγμα αντίδρασης περιέχει τυπικά όλα τα συστατικά που απαιτούνται για την PCR, εκτός από το δείγμα.

Πίνακας 4. Προετοιμασία του μείγματος master (ο εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της απομόνωσης DNA και τον έλεγχο της αναστολής PCR)

Αριθμός δειγμάτων	1	12
EBV RG Master	30 μl	360 μl
EBV RG IC	0 μl	0 μl
Συνολικός όγκος	30 μl	360 μl

- 2β. Ο εσωτερικός μάρτυρας πρέπει να προστίθεται απευθείας στο μείγμα του EBV RG Master. Σε αυτήν την περίπτωση, προετοιμάστε ένα μείγμα master, σύμφωνα με τον Πίνακα 5.**

Το μείγμα αντίδρασης περιέχει τυπικά όλα τα συστατικά που απαιτούνται για την PCR, εκτός από το δείγμα.

Πίνακας 5. Προετοιμασία του μείγματος master (ο εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιείται αποκλειστικά για τον έλεγχο της αναστολής PCR)

Αριθμός δειγμάτων	1	12
EBV RG Master	30 μl	360 μl
EBV RG IC	2 μl	24 μl
Συνολικός όγκος	32 μl*	384 μl*

* Η αύξηση του όγκου λόγω της προσθήκης του εσωτερικού μάρτυρα δεν λαμβάνεται υπόψη κατά την προετοιμασία του προσδιορισμού PCR. Η ευαισθησία του συστήματος ανίχνευσης δεν επηρεάζεται.

- 3. Διανείμετε με πιπέτα 30 μl του μείγματος master σε κάθε σωληνάριο PCR. Στη συνέχεια προσθέστε 20 μl του εκλουσμένου DNA δείγματος (βλέπε Πίνακα 6). Αντίστοιχα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν 20 μl τουλάχιστον ενός από τα πρότυπα ποσοτικοποίησης (EBV RG QS 1–4) ως θετικός μάρτυρας και 20 μl νερού (νερό, βαθμού PCR) ως αρνητικός μάρτυρας.**

Πίνακας 6. Προετοιμασία της αντίδρασης PCR

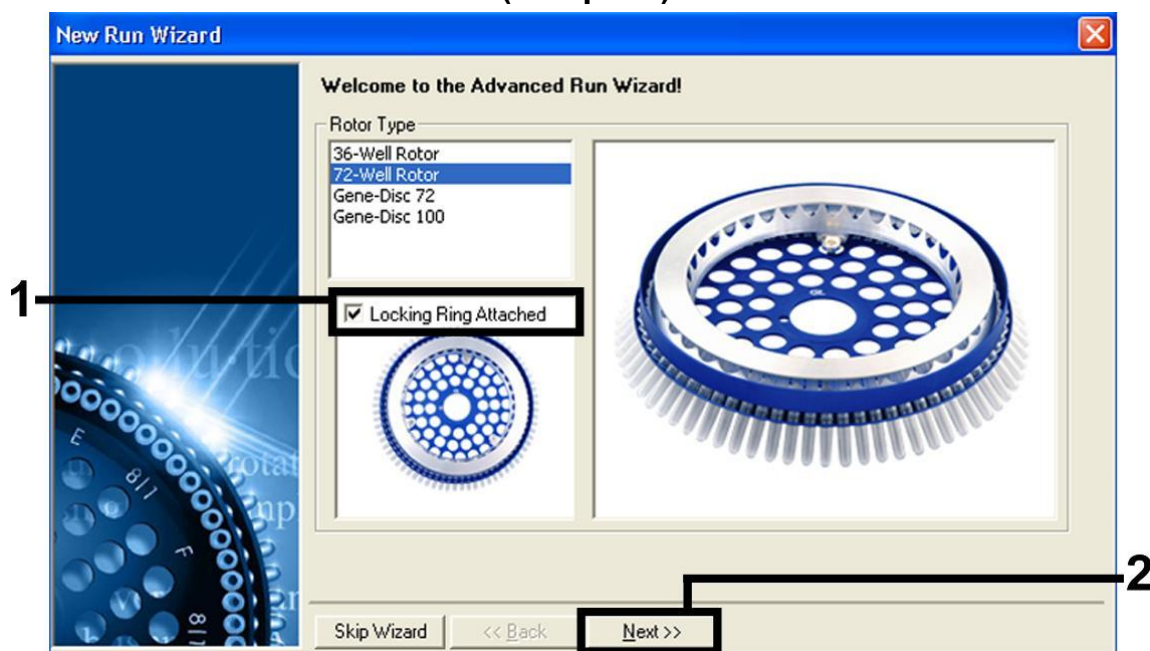
Αριθμός δειγμάτων	1	12
Μείγμα master	30 µl	ανά 30 µl
Δείγμα	20 µl	ανά 20 µl
Συνολικός όγκος	50 µl	ανά 50 µl

4. Κλείστε τα σωληνάρια PCR. Βεβαιωθείτε πως ο δακτύλιος ασφάλισης (προαιρετικό εξάρτημα του οργάνου Rotor-Gene) έχει τοποθετηθεί επάνω από το στροφέα για την αποτροπή του ακούσιου ανοίγματος των σωληναρίων κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης.
5. Για την ανίχνευση DNA από EBV, δημιουργήστε ένα θερμοκρασιακό προφίλ σύμφωνα με τα ακόλουθα βήματα.

Ρύθμιση των γενικών παραμέτρων του προσδιορισμού	Σχήματα 1, 2, 3
Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου hot-start	Σχήμα 4
Ενίσχυση του DNA (touchdown PCR)	Σχήμα 5
Προσαρμογή της ευαισθησίας του καναλιού φθορισμού	Σχήμα 6
Έναρξη της εκτέλεσης	Σχήμα 7

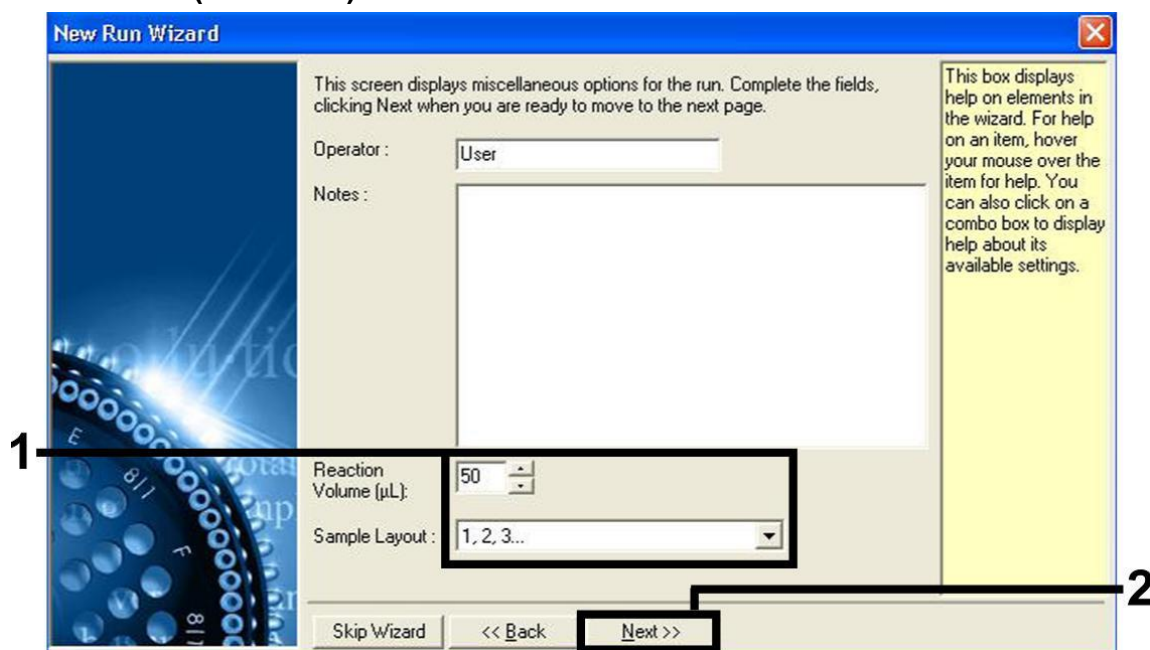
Όλες οι προδιαγραφές αναφέρονται στο Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q με έκδοση λογισμικού 1.7.94, Rotor-Gene 6000 με εκδόσεις λογισμικού 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94, και Rotor-Gene 3000 με έκδοση λογισμικού 6.0.23. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τον προγραμματισμό των οργάνων Rotor-Gene παρακαλείστε να ανατρέξετε στο εγχειρίδιο χρήσης του οργάνου. Στις απεικονίσεις, οι ρυθμίσεις αυτές πλαισιώνονται με έντονο μαύρο χρώμα. Περιλαμβάνονται απεικονίσεις για τα όργανα Rotor-Gene Q. Όπου απαιτούνται διαφορετικές τιμές για το Rotor-Gene 3000, αυτές οι διαφορές περιγράφονται στο κείμενο.

6. Ανοίξτε καταρχήν το πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard» (Οδηγός νέας εκτέλεσης) (Εικόνα 1). Επιλέξτε το πλαίσιο «Locking Ring Attached» (Προσαρτημένος δακτύλιος ασφάλισης) και κάντε κλικ στο «Next» (Επόμενο).



Εικόνα 1. Το πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard».

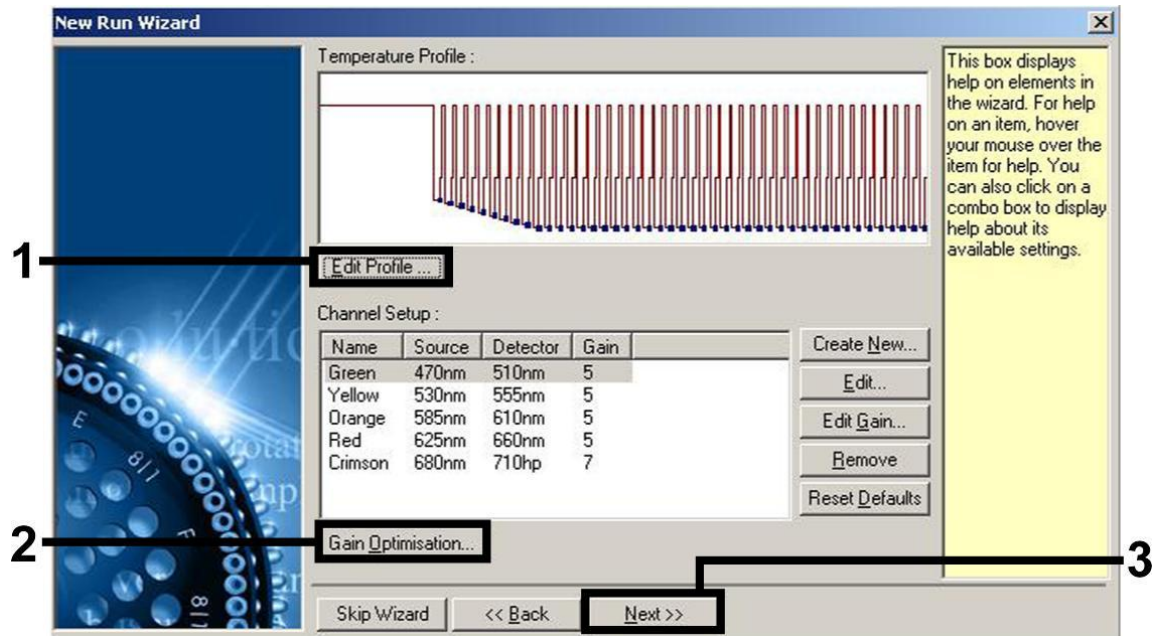
7. Επιλέξτε 50 ως τον όγκο αντίδρασης PCR και κάντε κλικ στο «Next» (Εικόνα 2).



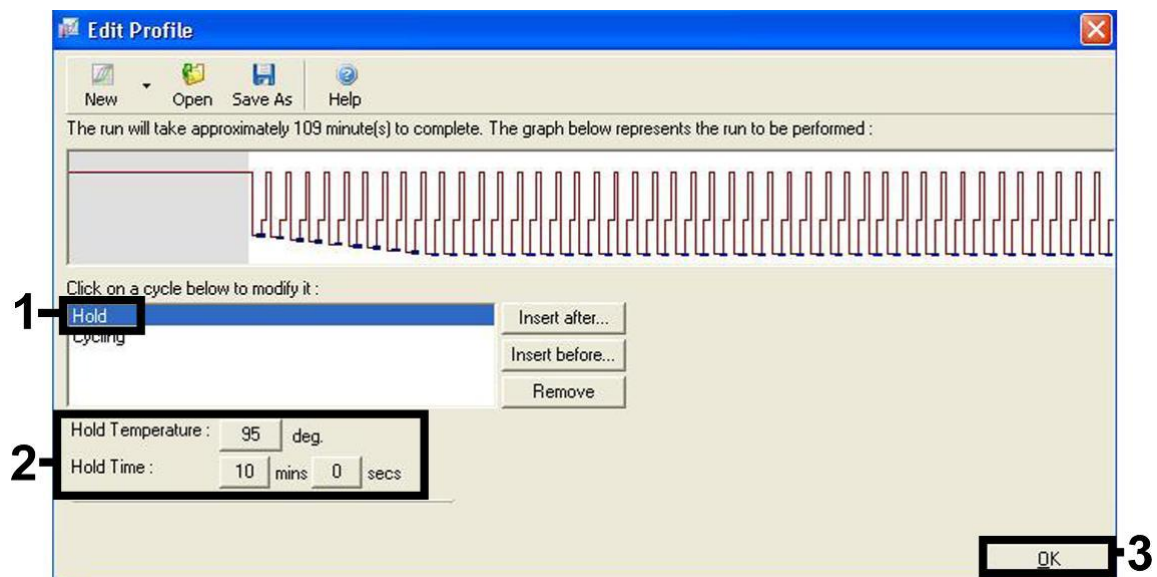
Εικόνα 2. Ρύθμιση των γενικών παραμέτρων του προσδιορισμού.

8. Κάντε κλικ στο κουμπί «Edit Profile» (Επεξεργασία προφίλ) στο ακόλουθο πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard» (Εικόνα 3) και

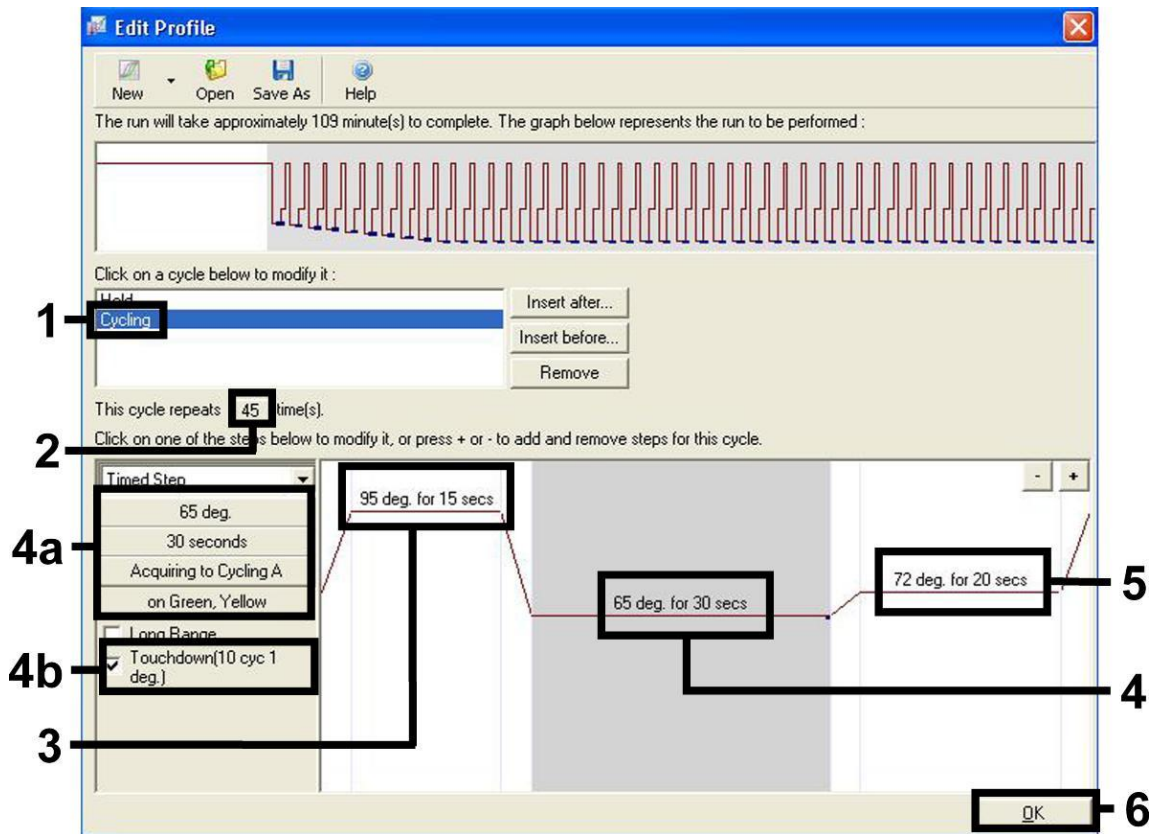
προγραμματίστε το θερμοκρασιακό προφίλ με τον τρόπο που φαίνεται στις Εικόνες 3-5.



Εικόνα 3. Επεξεργασία του προφίλ.

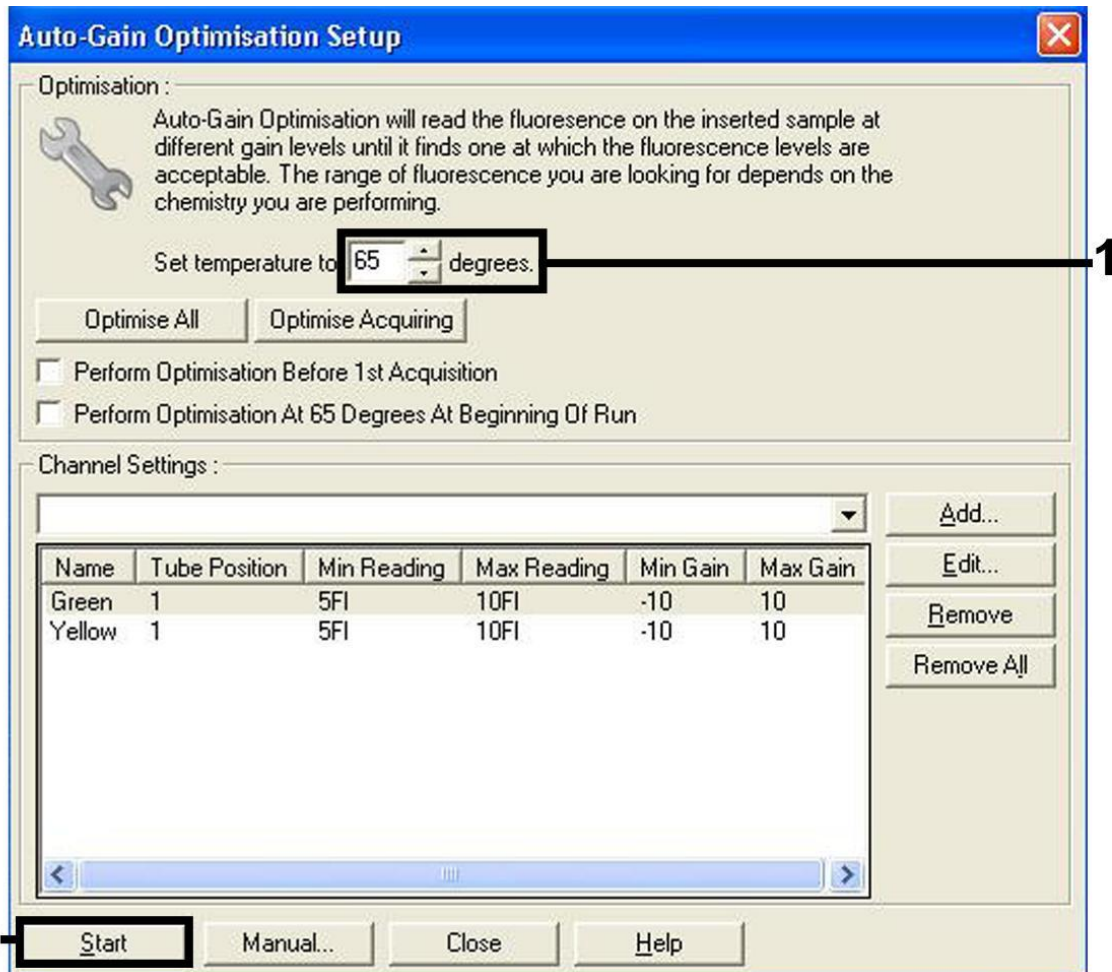


Εικόνα 4. Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου hot-start.



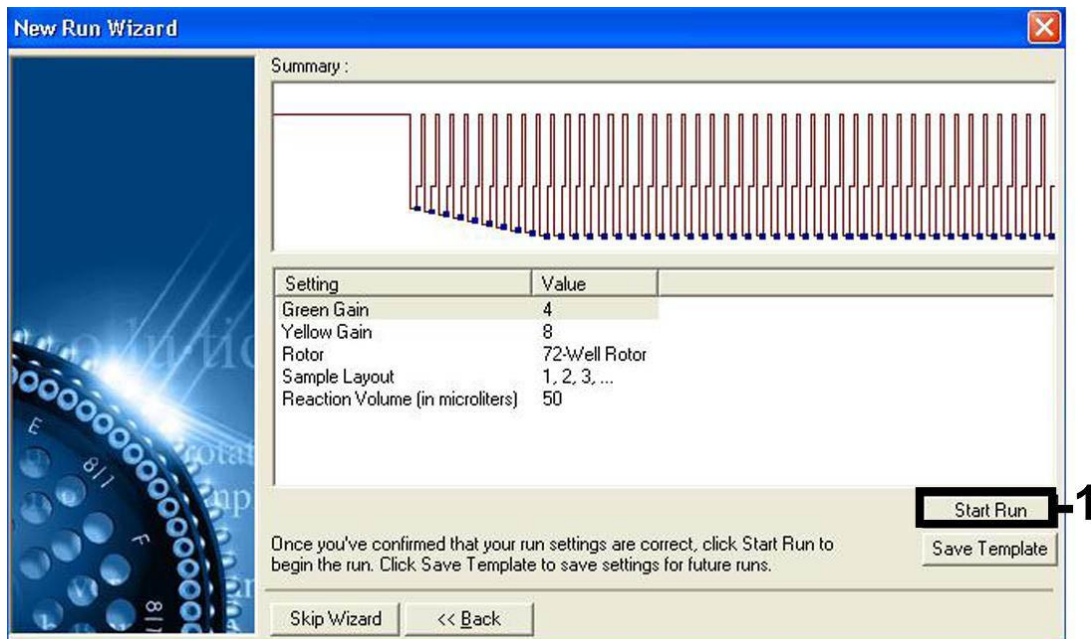
Εικόνα 5. Ενίσχυση του DNA. Βεβαιωθείτε πως έχετε ενεργοποιήσει τη λειτουργία touchdown για 10 κύκλους στο βήμα ANNEALING (Ανασύνδεσης). Σημειώστε ότι, στο Rotor-Gene 3000, το λογισμικό θα καθορίζει τις φθορίζουσες χρωστικές ως «FAM/Sybr, JOE».

9. Τό εύρος ανίχνευσης των καναλιών φθορισμού πρέπει να καθοριστεί σύμφωνα με τις εντάσεις φθορισμού στα σωληνάρια PCR. Κάντε κλικ στο «Gain Optimisation» (Βελτιστοποίηση απολαβής) στο πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard» (Βλέπε Εικόνα 3) για να ανοίξετε το πλαίσιο διαλόγου «Auto-Gain Optimisation Setup» (Ρύθμιση παραμέτρων αυτόματης βελτιστοποίησης απολαβής). Ρυθμίστε τη θερμοκρασία βαθμονόμησης στο 65 για να αντιστοιχεί στη θερμοκρασία ανασύνδεσης του προγράμματος ενίσχυσης (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Προσαρμογή της ευαισθησίας του καναλιού φθορισμού. Σημειώστε ότι, στο Rotor-Gene 3000, το λογισμικό θα καθορίζει τις φθορίζουσες χρωστικές ως «FAM/Sybr» και «JOE».

10. Οι τιμές απολαβής που καθορίζονται από τη βαθμονόμηση του καναλιού αποθηκεύονται αυτομάτως και παρατίθενται στο τελευταίο παράθυρο μενού της διαδικασίας προγραμματισμού (Εικόνα 7). Κάντε κλικ στο «Start Run» (Εκκίνηση εκτέλεσης).



Εικόνα 7. Έναρξη της εκτέλεσης. Σημειώστε ότι, στο Rotor-Gene 3000, το λογισμικό θα καθορίζει τις φθορίζουσες χρωστικές ως «FAM/Sybr» και «JOE».

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Ποσοτικοποίηση

Τα εσώκλειστα πρότυπα ποσοτικοποίησης (EBV RG QS 1–4) αντιμετωπίζονται ως προηγουμένως καθαρισμένα δείγματα και χρησιμοποιείται ο ίδιος όγκος (20 μl). Για να δημιουργήσετε μία πρότυπη καμπύλη σε όργανα Rotor-Gene Q θα πρέπει να χρησιμοποιήσετε και τα 4 πρότυπα ποσοτικοποίησης και να τα ορίσετε στο πλαίσιο διαλόγου «Edit Samples» (Επεξεργασία δειγμάτων) ως πρότυπα με τις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις (βλέπε εγχειρίδιο χρήσης του οργάνου).

Σημείωση: Τα πρότυπα ποσοτικοποίησης ορίζονται ως αντίγραφα/μl. Η παρακάτω εξίσωση πρέπει να χρησιμοποιηθεί για τη μετατροπή των τιμών που προσδιορίζονται με χρήση της πρότυπης καμπύλης σε αντίγραφα/ml του υλικού δείγματος:

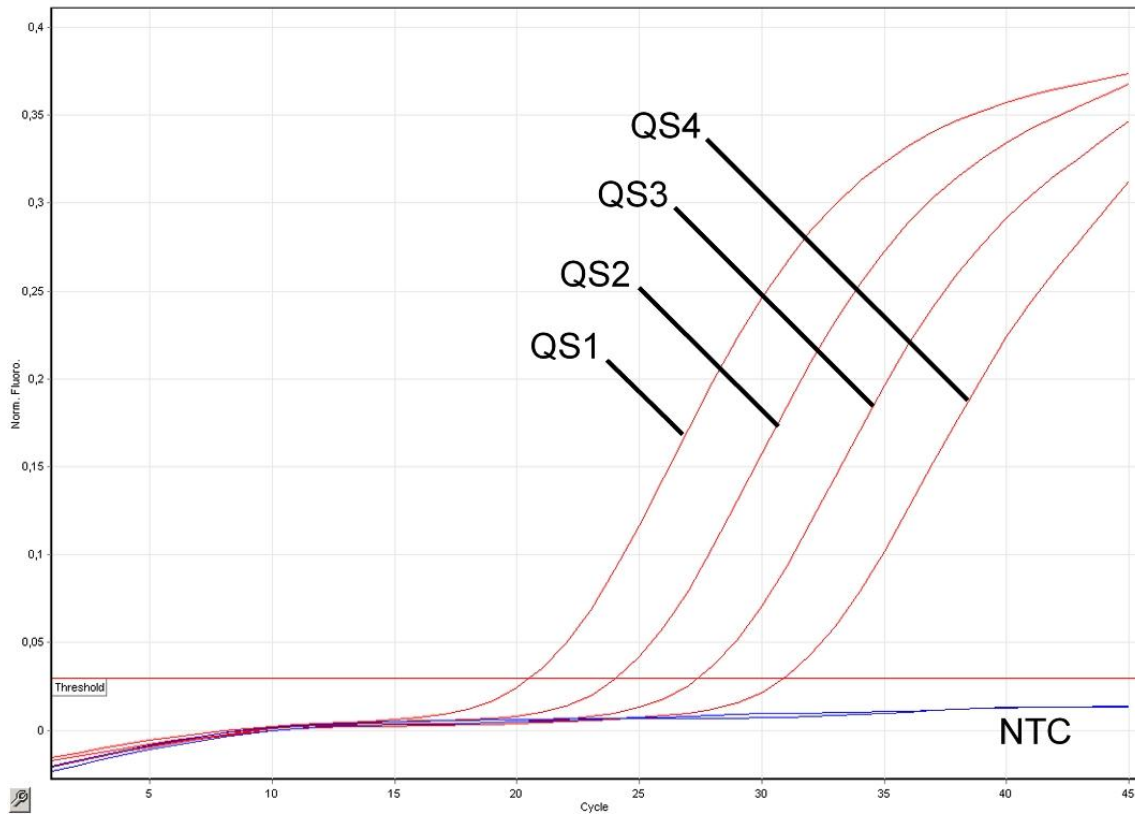
$$\text{Αποτέλεσμα (αντίγραφα/ml)} = \frac{\text{Αποτέλεσμα (αντίγραφα/μl)} \times \text{Όγκος έκλουσης (μl)}}{\text{Όγκος δείγματος (ml)}}$$

Κατ' αρχήν, ο αρχικός όγκος δείγματος πρέπει να καταχωρηθεί στην παραπάνω εξίσωση. Αυτό πρέπει να ληφθεί υπόψη σε περίπτωση τροποποίησης του όγκου δείγματος πριν από την εκχύλιση του νουκλεϊκού

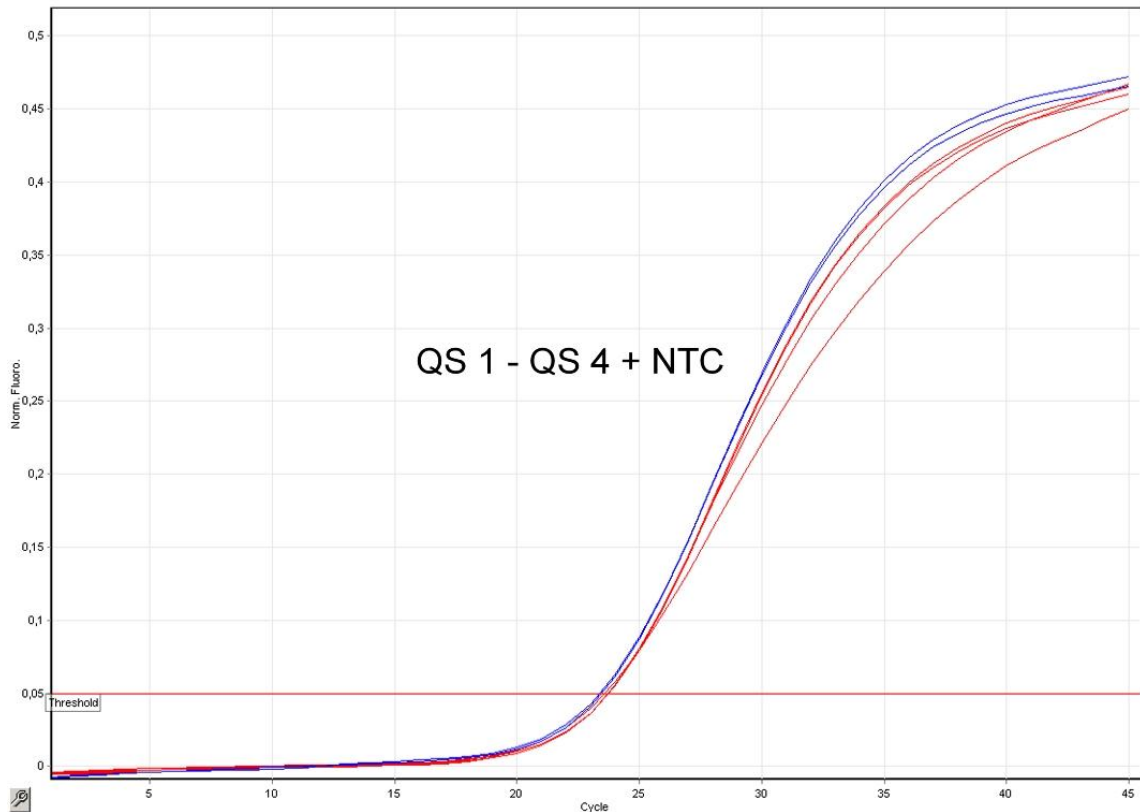
οξέος (π.χ., μείωση του όγκου με φυγοκέντρηση ή αύξηση του όγκου με προσθήκη του απαιτούμενου για την απομόνωση όγκου).

Αποτελέσματα

Παραδείγματα θετικών και αρνητικών αντιδράσεων PCR παρέχονται στην Εικόνα 8 και στην Εικόνα 9.



Εικόνα 8. Ανίχνευση των προτύπων ποσοτικοποίησης (EBV RG QS 1–4) στο κανάλι φθορισμού Cycling Green. NTC: No template control (αρνητικός μάρτυρας).



Εικόνα 9. Ανίχνευση του εσωτερικού μάρτυρα (IC) στο κανάλι φθορισμού Cycling Yellow με ταυτόχρονη ενίσχυση των προτύπων ποσοτικοποίησης (EBV RG QS 1–4). NTC: No template control (αρνητικός μάρτυρας).

Ένα σήμα ανιχνεύεται στο κανάλι φθορισμού Cycling Green. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης είναι θετικό: το δείγμα περιέχει DNA από EBV.

Σε αυτήν την περίπτωση, η ανίχνευση ενός σήματος στο κανάλι Cyclin Yellow μπορεί να αγνοηθεί, και αυτό διότι υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις DNA από EBV (θετικό σήμα στο κανάλι Cycling Green) μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση ή απώλεια σήματος φθορισμού του εσωτερικού μάρτυρα στο κανάλι Cycling Yellow (ανταγωνισμός).

Σημείωση: Στο Rotor-Gene 3000, τα αντίστοιχα κανάλια είναι Cycling A.FAM για το θετικό σήμα και Cycling A.JOE για τον εσωτερικό μάρτυρα.

Στο κανάλι φθορισμού Cycling Green δεν ανιχνεύεται σήμα. Ταυτόχρονα, εμφανίζεται σήμα του εσωτερικού μάρτυρα στο κανάλι Cycling Yellow. Στο δείγμα δεν υπάρχει ανιχνεύσιμο DNA από EBV. Το δείγμα μπορεί να θεωρηθεί αρνητικό.

Στην περίπτωση αρνητικής PCR για τον EBV, το ανιχνευμένο σήμα του εσωτερικού μάρτυρα αποκλείει το ενδεχόμενο αναστολής της PCR.

Σημείωση: Στο Rotor-Gene 3000, τα αντίστοιχα κανάλια είναι Cycling A.JOE για τον εσωτερικό μάρτυρα και απουσία σήματος για το Cycling A.FAM.

Κανένα σήμα δεν ανιχνεύεται στο κανάλι Cycling Green ή στο κανάλι Cycling Yellow.

Η λήψη αποτελέσματος δεν είναι δυνατή.

Πληροφορίες σχετικά με τις πηγές σφαλμάτων και την επίλυσή τους θα βρείτε στο «Οδηγός αντιμετώπισης **προβλημάτων**», σελίδα 25.

Σημείωση: Στο Rotor-Gene 3000, τα αντίστοιχα κανάλια είναι Cycling A.FAM και Cycling A.JOE.

Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση οποιωνδήποτε προβλημάτων που ενδεχομένως προκύψουν. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στη σελίδα Frequently Asked Questions (Συχνές ερωτήσεις) του Κέντρου τεχνικής υποστήριξης της εταιρείας μας: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Οι επιστήμονες των Τεχνικών Υπηρεσιών QIAGEN είναι πάντοτε πρόθυμοι(-ες) να απαντήσουν σε οποιεσδήποτε απορίες σας σχετικά με τις πληροφορίες και τα πρωτόκολλα αυτού του εγχειριδίου ή τεχνολογίες δειγμάτων και προσδιορισμών (για πληροφορίες επικοινωνίας, βλ. οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε μας στη διεύθυνση www.qiagen.com).

Σχόλια και προτάσεις

Απουσία σήματος με θετικούς μάρτυρες (EBV RG QS 1–4) στο κανάλι φθορισμού Cycling Green ή Cycling A.FAM

- | | |
|--|---|
| α) Το επιλεγμένο κανάλι φθορισμού για ανάλυση δεδομένων PCR δεν συμμορφώνεται με το πρωτόκολλο | Για ανάλυση δεδομένων επιλέξτε το κανάλι φθορισμού Cycling Green ή Cycling A.FAM για την ανάλυση EBV PCR και το κανάλι φθορισμού Cycling Yellow ή Cycling A.JOE για την PCR εσωτερικού μάρτυρα. |
| β) Λανθασμένος προγραμματισμός του θερμοκρασιακού προφίλ στο όργανο Rotor-Gene | Συγκρίνετε το προφίλ θερμοκρασίας με το πρωτόκολλο. Βλέπε «Πρωτόκολλο: PCR και ανάλυση δεδομένων», σελίδα 15. |
| γ) Λανθασμένη διαμόρφωση της PCR | Ελέγξτε τα βήματα του σχήματος διανομής με πιπέτα και επαναλάβετε την PCR εάν είναι απαραίτητο. Βλέπε «Πρωτόκολλο: PCR και ανάλυση δεδομένων», σελίδα 15. |

Σχόλια και προτάσεις

- δ) Οι συνθήκες φύλαξης για ένα ή περισσότερα συστατικά του κιτ δεν ήταν σύμφωνες με τις οδηγίες της ενότητας «Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων» (σελίδα 9) Ελέγξτε τις συνθήκες φύλαξης και την ημερομηνία λήξης (βλ. ετικέτα του κιτ) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε νέο κιτ, εάν χρειαστεί.
- ε) Το κιτ *artus* EBV RG PCR έχει λήξει Ελέγξτε τις συνθήκες φύλαξης και την ημερομηνία λήξης (βλ. ετικέτα του κιτ) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε νέο κιτ, εάν χρειαστεί.

Ασθενές σήμα ή απουσία σήματος του εσωτερικού μάρτυρα στο κανάλι φθορισμού *Cycling Yellow* ή *Cycling A.JOE* και ταυτόχρονη απουσία σήματος στο κανάλι *Cycling Green* ή *Cycling A.FAM*

- α) Οι συνθήκες PCR δεν συμμορφώνονται με το πρωτόκολλο Ελέγξτε τις συνθήκες PCR (βλ. παραπάνω) και επαναλάβετε την PCR με διορθωμένες ρυθμίσεις, εάν είναι απαραίτητο.
- β) Συνέβη αναστολή της PCR Βεβαιωθείτε πως χρησιμοποιείτε τη συνιστώμενη μέθοδο απομόνωσης και ακολουθήστε προσεκτικά τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Όταν χρησιμοποιείτε το κιτ *QIAamp DNA Mini*, το κιτ *QIAamp DNA Blood Mini*, ή το κιτ *QIAamp UltraSens Virus*, βεβαιωθείτε ότι κατά τη διάρκεια της απομόνωσης του DNA έχει πραγματοποιηθεί το συνιστώμενο πρόσθετο βήμα φυγοκέντρησης πριν από την έκλυση για την απομάκρυνση των καταλοίπων αιθανόλης (βλέπε «Απομόνωση DNA», σελίδες 11 και 12).
- γ) Χάθηκε DNA κατά την εκχύλιση Εάν ο εσωτερικός μάρτυρας προστέθηκε στην εκχύλιση, η απουσία σήματος του εσωτερικού μάρτυρα μπορεί να υποδεικνύει απώλεια κατά την εκχύλιση. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε τη συνιστώμενη μέθοδο απομόνωσης (βλέπε «Απομόνωση DNA», σελίδα 10) και ακολουθήστε πιστά τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Σχόλια και προτάσεις

- δ) Οι συνθήκες φύλαξης για ένα ή περισσότερα συστατικά του κιτ δεν ήταν σύμφωνες με τις οδηγίες της ενότητας «Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων» (σελίδα 9) Ελέγξτε τις συνθήκες φύλαξης και την ημερομηνία λήξης (βλ. ετικέτα του κιτ) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε νέο κιτ, εάν χρειαστεί.
- ε) Το κιτ *artus* EBV RG PCR έχει λήξει Ελέγξτε τις συνθήκες φύλαξης και την ημερομηνία λήξης (βλ. ετικέτα του κιτ) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε νέο κιτ, εάν χρειαστεί.

Σήματα με τους αρνητικούς μάρτυρες στο κανάλι φθορισμού **Cycling Green** ή **Cycling A.FAM** της ανάλυσης PCR

- α) Συνέβη επιμόλυνση κατά την προετοιμασία της PCR Επαναλάβετε την PCR με νέα αντιδραστήρια σε αντίγραφα.
Εάν είναι εφικτό, κλείστε τα σωληνάρια PCR αμέσως μετά την προσθήκη του δείγματος που θα υποβληθεί σε έλεγχο.
Βεβαιωθείτε πως οι θετικοί μάρτυρες διανέμονται με πιπέτα τελευταίοι.
Βεβαιωθείτε ότι ο χώρος εργασίας και τα όργανα απολυμαίνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα.
- β) Συνέβη επιμόλυνση κατά την εκχύλιση Επαναλάβετε την εκχύλιση και την PCR του δείγματος που θα υποβληθεί σε έλεγχο, χρησιμοποιώντας νέα αντιδραστήρια.
Βεβαιωθείτε πως ο χώρος εργασίας και τα όργανα απολυμαίνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα.

Ποιοτικός έλεγχος

Σε συμμόρφωση με το πιστοποιημένο με ISO Σύστημα Διαχείρισης Ποιότητας της QIAGEN, κάθε παρτίδα του κιτ *artus* EBV RG PCR ελέγχεται ως προς τις προκαθορισμένες προδιαγραφές για την διασφάλιση ομοιογενούς ποιότητας των προϊόντων.

Περιορισμοί

Η χρήση όλων των αντιδραστηρίων επιτρέπεται αποκλειστικά για *in vitro* διαγνωστικούς σκοπούς.

Το προϊόν πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο από ειδικά καταρτισμένο και εκπαιδευμένο προσωπικό στις *in vitro* διαγνωστικές διαδικασίες.

Για βέλτιστα αποτελέσματα της PCR απαιτείται αυστηρή συμμόρφωση με το εγχειρίδιο χρήσης.

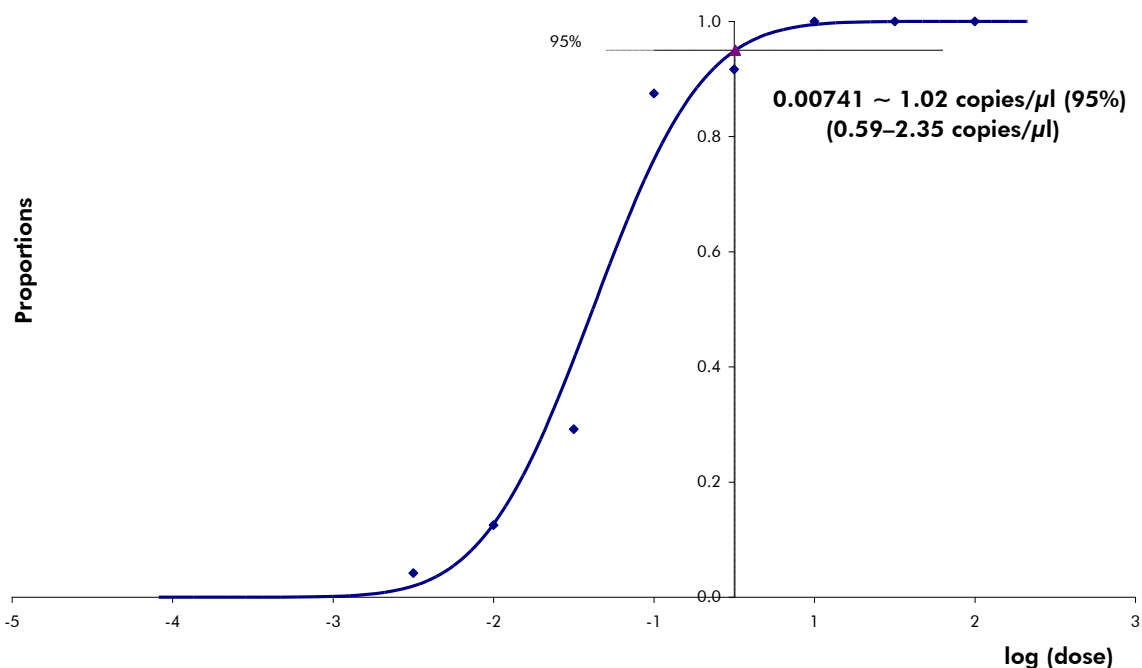
Δώστε προσοχή στις ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στο κουτί και στις ετικέτες όλων των συστατικών. Μη χρησιμοποιείτε τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης τους.

Αν και σπάνιες, οι μεταλλάξεις εντός των εξαιρετικά συντηρημένων περιοχών του ιικού γονιδιώματος που καλύπτονται από τους εκκινητές και/ή τον ανιχνευτή του kit, μπορούν να έχουν ως αποτέλεσμα χαμηλότερες ποσοτικές τιμές ή αδυναμία ανίχνευσης της παρουσίας του ιού στις περιπτώσεις αυτές. Η εγκυρότητα και η απόδοση της σχεδίασης του προσδιορισμού αναθεωρούνται ανά τακτά διαστήματα.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Αναλυτική ευαισθησία

Για τον προσδιορισμό της αναλυτικής ευαισθησίας του kit *artus* EBV RG PCR, δημιουργήθηκε μια σειρά αραιώσεων από 31,6 έως 0,01 και από 100 έως ονομαστικά 0,03 ισοδύναμα αντιγράφων EBV/μl και υποβλήθηκε σε ανάλυση στο Rotor-Gene 6000 και στο Rotor-Gene 3000, αντίστοιχα, σε συνδυασμό με το kit *artus* EBV RG PCR. Η δοκιμασία εκτελέστηκε σε 3 διαφορετικές ημέρες σε 8 θυγατρικούς κλώνους. Η εξαγωγή του αποτελέσματος έγινε με τη βοήθεια ανάλυσης Probit. Μια γραφική αναπαράσταση της ανάλυσης probit στο Rotor-Gene 6000 παρουσιάζεται στην Εικόνα 10. Το αναλυτικό όριο ανίχνευσης του kit *artus* EBV RG PCR σε συνδυασμό με το Rotor-Gene Q MDx/Q/6000 και το Rotor-Gene 3000 είναι 1,02 αντίγραφα/μl ($p = 0,05$) και 3,8 αντίγραφα/μl ($p = 0,05$), αντίστοιχα. Αυτό σημαίνει ότι 1,02 αντίγραφα/μl ή 3,8 αντίγραφα/μl ανιχνεύονται με πιθανότητα 95%.



Εικόνα 10. Ανάλυση Probit: EBV (Rotor-Gene 6000). Αναλυτική ευαισθησία του kit *artus* EBV RG PCR στο Rotor-Gene 6000.

Ειδικότητα

Η ειδικότητα του kit *artus* EBV RG PCR διασφαλίζεται κατά κύριο λόγο από την επιλογή των εκκινητών και των ανιχνευτών, καθώς και από την τήρηση αυστηρών συνθηκών για την αντίδραση. Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές ελέγχθηκαν ως προς πιθανές ομολογίες με όλες τις δημοσιευμένες ακολουθίες σε τράπεζες γονιδίων μέσω ανάλυσης σύγκρισης ακολουθιών. Η ανιχνευσιμότητα όλων των σχετικών γονότυπων συνεπώς διασφαλίστηκε.

Επιπλέον, η ειδικότητα επικυρώθηκε με 6 διαφορετικούς αρνητικούς μάρτυρες EBV ορού. Αυτοί δεν παρήγαγαν κανένα σήμα με τους ειδικούς για EBV ενισχυτές και ανιχνευτές, που περιλαμβάνονται στο EBV RG Master.

Ελέγχθηκε μία πιθανή διασταυρούμενη αντιδραστικότητα του kit *artus* EBV RG PCR με χρήση της ομάδας μαρτύρων που παρατίθεται στον Πίνακα 7. Κανένας από τους εξεταζόμενους παθογόνους παράγοντες δεν προκάλεσε αντίδραση.

Πίνακας 7. Έλεγχος της ειδικότητας του kit με δυνητικώς διασταυρούμενα αντιδρώντα παθογόνα

Ομάδα μαρτύρων	EBV (Cycling Green ή Cycling A.FAM)	Εσωτερικός μάρτυρας (Cycling Yellow ή Cycling A.JOE)
Ανθρώπινος ιός έρπητα 1 (ιός απλού έρπητα 1)	-	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 2 (ιός απλού έρπητα 2)	-	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 3 (ιός varicella-zoster)	-	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 5 (κυτταρομεγαλοϊός)	-	+
Ανθρώπινος ιός λευχαιμίας T κυττάρων 1	-	+
Ανθρώπινος ιός λευχαιμίας T κυττάρων 2	-	+

Επαναληψιμότητα

Τα δεδομένα αναπαραγωγιμότητας παρέχουν τη δυνατότητα τακτικής αξιολόγησης της απόδοσης του kit *artus* EBV RG PCR καθώς και μία σύγκριση της αποτελεσματικότητας με άλλα προϊόντα. Αυτά τα δεδομένα λαμβάνονται από τη συμμετοχή σε καθιερωμένα προγράμματα επάρκειας.

Βιβλιογραφία

Η QIAGEN διατηρεί μία μεγάλη, ενημερωμένη online βάση δεδομένων επιστημονικών δημοσιεύσεων στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν προϊόντα της QIAGEN. Με τις εύχρηστες δυνατότητες αναζήτησης μπορείτε να βρείτε τα άρθρα που αναζητάτε – είτε με απλή αναζήτηση λέξης-κλειδιού ή ορίζοντας την εφαρμογή, τον ερευνητικό τομέα, τον τίτλο κτλ.

Για ένα πλήρη κατάλογο της βιβλιογραφίας, επισκεφθείτε την online βιβλιογραφική βάση δεδομένων της QIAGEN (Reference Database) στη διεύθυνση www.qiagen.com/RefDB/search.asp ή επικοινωνήστε με το Τμήμα τεχνικής υποστήριξης της QIAGEN ή τον τοπικό σας αντιπρόσωπο.

Σύμβολα



Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για <N> δοκιμασίες



Ημερομηνία λήξης



In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν



Αριθμός καταλόγου



Αριθμός παρτίδας



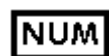
Αριθμός υλικού



Συστατικά



Περιέχει



Αριθμός



Διεθνής Κωδικός Μονάδων Εμπορίας



Περιορισμός θερμοκρασίας



Κατασκευαστής



Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης

Πληροφορίες επικοινωνίας

Για θέματα τεχνικής υποστήριξης και περαιτέρω πληροφορίες, επισκεφθείτε το Κέντρο Τεχνικής Υποστήριξης στη διεύθυνση www.qiagen.com/Support ή επικοινωνήστε τηλεφωνικά με κάποιον από τα Τμήματα Τεχνικής Εξυπηρέτησης της QIAGEN ή με τους τοπικούς αντιπροσώπους (βλ. οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε τη διεύθυνση www.qiagen.com).

Πληροφορίες παραγγελίας

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. καταλ.
<i>artus</i> EBV RG PCR Kit (24)	Για 24 αντιδράσεις: Master, 4 πρότυπα ποσοτικοποίησης, εσωτερικός μάρτυρας, νερό (βαθμού PCR)	4501263
<i>artus</i> EBV RG PCR Kit (96)	Για 96 αντιδράσεις: Master, 4 πρότυπα ποσοτικοποίησης, εσωτερικός μάρτυρας, νερό (βαθμού PCR)	4501265
Κιτ EASY<i>artus</i> EBV RG PCR — για αυτοματοποιημένο καθαρισμό δείγματος και ανίχνευση παθογόνων σε πλήρη συμμόρφωση με τις απαιτήσεις CE για IVD		
EASY <i>artus</i> EBV RG PCR Kit 1	Για 48 προετοιμασίες ιικών νουκλεϊκών οξέων και 24 προσδιορισμούς: 1 x κιτ EZ1 DSP Virus, 1 x κιτ <i>artus</i> EBV RG PCR (24)	EA10123
EASY <i>artus</i> EBV RG PCR Kit 2	Για 48 προετοιμασίες ιικών νουκλεϊκών οξέων και 48 προσδιορισμούς: 1 x κιτ EZ1 DSP Virus, 2 x κιτ <i>artus</i> EBV RG PCR (24)	EA10124
Κιτ EZ1 DSP Virus — για αυτοματοποιημένο, ταυτόχρονο καθαρισμό ιικού DNA και RNA από 1–14 δείγματα ορού, πλάσματος, ή ENY		
EZ1 DSP Virus Kit (48)	Για 48 προετοιμασίες ιικών νουκλεϊκών οξέων: Προγεμισμένες φύσιγγες αντιδραστηρίων, υποδοχές ρυγχών μίας χρήσης, αναλώσιμα ρύγχη με φίλτρο, σωληνάρια δείγματος, σωληνάρια έκλουσης, ρυθμιστικά διαλύματα, φορέας RNA	62724
Κιτ QIAamp DNA Mini — για τον καθαρισμό γονιδιωματικού και ιικού DNA από ιστούς και άλλα δείγματα		
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Για 50 παρασκευές DNA: 50 στήλες QIAamp Mini Spin, πρωτεϊνάση K QIAGEN, αντιδραστήρια, ρυθμιστικά διαλύματα, σωληνάρια συλλογής (2 ml)	51304

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. καταλ.
Κιτ QIAamp UltraSens Virus — για τη συγκέντρωση και απομόνωση ιικού DNA και RNA από ορό και πλάσμα		
QIAamp UltraSens Virus Kit (50)	Για 50 προετοιμασίες ιικών νουκλεϊκών οξέων: 50 στήλες QIAamp Mini Spin, πρωτεϊνάση K, φορέας RNA, σωληνάρια συλλογής (2 ml), ρυθμιστικά διαλύματα	53704
Κιτ QIAamp DNA Blood Mini — για τον καθαρισμό έως 12 μg γονιδιωματικού, μιτοχονδριακού, ή ιικού DNA από αίμα και σχετιζόμενα σωματικά υγρά		
QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	Για 50 μίνι παρασκευές DNA: 50 στήλες QIAamp Mini Spin, πρωτεάση QIAGEN, αντιδραστήρια, ρυθμιστικά διαλύματα, σωληνάρια συλλογής (2 ml)	51104
Rotor-Gene Q MDx και παρελκόμενα		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ), φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ), φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση	9002032

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. καταλ.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Όργανο PCR πραγματικού χρόνου με 6 κανάλια (μπλε, πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ), συμπεριλαμβάνεται φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση δεν συμπεριλαμβάνονται	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Όργανο PCR πραγματικού χρόνου με 6 κανάλια (μπλε, πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ), συμπεριλαμβάνεται φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9002043
Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου με 2 κανάλια (πράσινο, κίτρινο), φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση	9002002
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου με 2 κανάλια (πράσινο, κίτρινο), φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9002003

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. καταλ.
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 2 κανάλια (πράσινο, κίτρινο) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση	9002012
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 2 κανάλια (πράσινο, κίτρινο) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9002013
Loading Block 72 x 0,1 ml Tubes	Τεμάχιο αλουμινίου για χειροκίνητη προετοιμασία της αντίδρασης με μία πιπέτα μονού αυλού σε 72 σωληνάρια του 0,1 ml.	9018901
Loading Block 96 x 0,2 ml Tubes	Τεμάχιο αλουμινίου για χειροκίνητη προετοιμασία της αντίδρασης σε τυπική διάταξη 8 x 12 με χρήση 96 σωληναρίων των 0,2 ml.	9018905
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250)	250 ταινίες των 4 σωληναρίων και καπακιών για 1000 αντιδράσεις	981103
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2.500)	10 x 250 ταινίες των 4 σωληναρίων και καπακιών για 10.000 αντιδράσεις	981106
PCR Tubes, 0,2 ml (1.000)	1.000 σωληνάρια λεπτού τοιχώματος για 1.000 αντιδράσεις	981005
PCR Tubes, 0,2 ml (10.000)	10 x 1.000 σωληνάρια λεπτού τοιχώματος για 10.000 αντιδράσεις	981008

Για τις τρέχουσες πληροφορίες άδειας και αποποιήσεις σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο σχετικό εγχειρίδιο ή οδηγίες χρήσης του kit QIAGEN. Οι οδηγίες ή τα εγχειρίδια χρήσης των kit QIAGEN είναι διαθέσιμα στο www.qiagen.com ή μπορούν να ζητηθούν από τις τεχνικές υπηρεσίες της QIAGEN ή από τον τοπικό σας διανομέα.

Η αγορά αυτού του προϊόντος παρέχει στον αγοραστή τη δυνατότητα της χρήσης του για την εκτέλεση διαγνωστικών υπηρεσιών για in vitro διάγνωση σε ανθρώπους. Με τον παρόν δεν παρέχεται κανένα γενικό δικαίωμα ευρεσιτεχνίας ή άλλη άδεια οποιουδήποτε είδους, εκτός από το παρόν, συγκεκριμένο δικαίωμα χρήσης από την αγορά.

Εμπορικά σήματα: QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, EASY*artus*®, EZ1®, Rotor-Gene®, UltraSens® (Όμιλος QIAGEN)· FAM™, JOE™ (Life Technologies)· SYBR® (Molecular Probes, Inc.).

Άδεια περιορισμένης χρήσης

Η χρήση αυτού του προϊόντος ισοδυναμεί με την αποδοχή από πλευράς οποιουδήποτε αγοραστή ή χρήστη του kit *artus* EBV RG PCR των εξής όρων:

1. Η χρήση του kit *artus* EBV RG PCR επιτρέπεται μόνο σύμφωνα με το *Εγχειρίδιο kit artus EBV RG PCR* και μόνο μαζί με τα συστατικά που περιέχει το kit. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του kit σε οποιαδήποτε συστατικά που δεν περιλαμβάνονται σε αυτά τα kit, εκτός και αν περιγράφεται διαφορετικά στο *Εγχειρίδιο kit artus EBV RG PCR* και πρόσθετα πρωτόκολλα στη διεύθυνση www.qiagen.com.
2. Με την εξαίρεση των ρητά αναφερόμενων αδειών, η QIAGEN δεν παρέχει καμία εγγύηση πως αυτό το kit και/ή η χρήση(εις) του δεν παραβιάζουν τα δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το kit και τα συστατικά του φέρουν άδεια χρήσης για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επανάχρηση, η εκ νέου επεξεργασία ή η μεταπώλησή του.
4. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά οποιοσδήποτε άλλες άδειες, ρητές ή έμμεσες εκτός από αυτές που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής ή ο χρήστης του kit συμφωνεί να μην προβεί και να μην επιτρέψει σε κανέναν άλλο να προβεί σε οποιαδήποτε ενέργειες που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ή να διευκολύνουν οποιασδήποτε πράξεις που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Άδειας περιορισμένης χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και θα αποζημιωθεί για όλες τις δαπάνες ανάκρισης και δικαστηρίου, συμπεριλαμβανομένων των δαπανών υπεράσπισης στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή αυτής της Άδειας περιορισμένης χρήσης ή οποιοσδήποτε των πνευματικών δικαιωμάτων της σχετικά με το kit και/ή τα συστατικά του.

Για τους ενημερωμένους όρους της άδειας, βλ. www.qiagen.com.

© 2009–2014 QIAGEN, με την επιφύλαξη κάθε δικαιώματος.

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)

