

Příručka pro sadu *artus*[®] EBV RG PCR



24 (katalogové č. 4501263)



96 (katalogové č. 4501265)

Verze 1



In vitro diagnostikum pro kvantitativní stanovení

Pro použití s přístrojem Rotor-Gene[®] Q



4501263, 4501265



1046897CS



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

NĚMECKO

R5



1046897CS



QIAGEN Sample and Assay Technologies

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

QIAGEN určuje standardy:

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

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

Obsah

Zamýšlené použití	6
Souhrn a vysvětlení	6
Informace o patogenu	6
Princip metody	6
Dodávané materiály	7
Obsah sady	7
Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky	7
Varování a bezpečnostní opatření	8
Všeobecná bezpečnostní opatření	8
Uchovávání a nakládání s reagensy	9
Postup	10
Izolace DNA	10
Interní kontrola	13
Protokol: PCR a analýza dat	14
Interpretace výsledků	20
Kvantifikace	20
Výsledky	21
Řešení problémů	23
Řízení jakosti	25
Omezení	25
Charakteristiky chování	26
Analytická senzitivita	26
Specifická	26
Reprodukovatelnost	27
Literatura	27
Symboly	28
Kontaktní informace	28
Informace o způsobu objednávání	29

Zamýšlené použití

Sada *artus* EBV RG PCR je test amplifikace nukleových kyselin in vitro pro kvantifikaci DNA viru Epsteina a Barrové (EBV) z lidské plazmy, séra, likvoru nebo krevních buněk. Tato diagnostická sada využívá polymerázovou řetězovou reakci (PCR) a je konfigurována pro použití s přístroji Rotor-Gene Q.

Souhrn a vysvětlení

Sada *artus* EBV RG PCR je systém k přímému použití pro průkaz DNA viru EBV pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) v přístrojích Rotor-Gene Q. EBV RG Master obsahuje reagentie a enzymy pro specifickou amplifikaci úseku 97 bp genomu viru EBV a také pro bezprostřední detekci specifického amplifikátu ve fluorescenčním kanálu Cycling Green přístroje Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q nebo Rotor-Gene 6000, případně kanálu Cycling A.FAM™ přístroje Rotor-Gene 3000.

Kromě toho sada *artus* EBV RG PCR obsahuje druhý heterologní amplifikační systém pro průkaz potenciální inhibice PCR. Tento systém je detekován jako interní kontrola (IC) ve fluorescenčním kanálu Cycling Yellow přístroje Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q nebo Rotor-Gene 6000, případně kanálu A.JOE™ přístroje Rotor-Gene 3000. Limit detekce analytické EBV PCR (viz „Analytická senzitivita“, strana 26) přitom není negativně ovlivněn. Spolu s produktem se dodávají externí pozitivní kontroly (EBV RG QS 1–4), pomocí nichž lze určit množství virové DNA. Další informace viz “Kvantifikace”, strana 20.

Informace o patogenu

K přenosu viru Epsteina a Barrové (EBV) dochází perorálně, především kontaminovanými slinami. Obecně lze říci, že je infekce EBV, získaná zejména v dětství, asymptomatická. Klinickým příznakem akutní infekce je infekční mononukleóza spojená s horečkou, únavou a angínou, stejně tak zánětem lymfatických uzlin a sleziny. U některých pacientů se tyto příznaky objevují chronicky. S těžkými formami infekce EBV se lze setkat u imunodeficitních pacientů a u lidí s defektem buněk T.


Princip metody

Průkaz původce pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) je založen na amplifikaci specifické oblasti genomu původce. Detekce probíhá při PCR v reálném čase pomocí fluorescenčních barviv. Barviva jsou zpravidla vázaná na oligonukleotidové sondy, které se vážou specificky na PCR amplifikát. Detekce intenzity fluorescence v průběhu PCR v reálném čase umožňuje průkaz a kvantifikaci kumulujícího se produktu, aniž by bylo nutné po PCR znovu otevírat reakční zkumavky.*

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

Dodávané materiály

Obsah sady

artus EBV RG PCR Kit		(24)	(96)
Katalogové č.		4501263	4501265
Počet reakcí		24	96
Modrá	EBV RG Master	2 x 12 reakcí	8 x 12 reakcí
Červená	EBV RG QS 1* (5 x 10 ⁴ kopií/μl)	QS 200 μl	200 μl
Červená	EBV RG QS 2* (5 x 10 ³ kopií/μl)	QS 200 μl	200 μl
Červená	EBV RG QS 3* (5 x 10 ² kopií/μl)	QS 200 μl	200 μl
Červená	EBV RG QS 4* (5 x 10 ¹ kopií/μl)	QS 200 μl	200 μl
Zelená	EBV RG IC [†]	IC 1000 μl	2 x 1000 μl
Bílá	Voda (v kvalitě vhodné pro PCR)	1000 μl	1000 μl
	Příručka	 1	1

* Kvantifikační standard.

† Interní kontrola.

Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL), které lze získat od dodavatele produktu.

Reagencie

- Sada k izolaci DNA (viz „Izolace DNA“, strana 10)

Spotřební materiál

- Sterilní pipetovací špičky s filtrem
- Zkumavky v stripech s uzávěry, 0,1 ml, pro použití s 72jamkovým rotorem (kat. čís. 981103 nebo 981106)
- Alternativně: Zkumavky PCR, 0,2 ml, pro použití s 36jamkovým rotorem (kat. čís. 981005 nebo 981008)

Vybavení

- Pipety (nastavitelné)*
- Třepačka vortex*
- Stolní centrifuga s rotorem pro 2ml reakční zkumavky
- Přístroj Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q nebo Rotor-Gene* s fluorescenčními kanály Cycling Green a Cycling Yellow nebo s fluorescenčními kanály Cycling A.FAM a Cycling A.JOE
- Software Rotor-Gene Q MDx / Rotor-Gene Q verze 1.7.94 a vyšší (software Rotor-Gene 6000 verze 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94; software Rotor-Gene 3000 verze 6.0.23)
- Chladicí blok (vkládací blok 72 x 0,1ml zkumavky, kat. čís. 9018901, nebo vkládací blok 96 x 0,2ml zkumavky, kat. čís. 9018905)

Varování a bezpečnostní opatření

Pro diagnostické použití in vitro

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

Odpad ze vzorků a rozborů likvidujte podle místních bezpečnostních předpisů.

Všeobecná bezpečnostní opatření

Vždy dbejte na následující:

- Používejte sterilní pipetovací špičky s filtrem.
- Skladujte, izolujte a přidávejte pozitivní materiál (vzorky, pozitivní kontroly a amplifikáty) do reakční směsi na jiném místě než ostatní reagenty.
- Všechny komponenty před počátkem analýzy úplně rozmrazte při pokojové teplotě (15–25 °C).
- Následně komponenty řádně promíchejte (opakovaný náběh pipetou a vypuštění pipety nebo pulzní třepačka) a krátce centrifugujte.
- Pracujte rychle a udržujte komponenty na ledu nebo v chladicím bloku (72-/96jamkový vkládací blok).

* Ujistěte se, že byly přístroje kontrolovány a kalibrovány podle doporučení výrobce.

Uchovávání a nakládání s reagensiemi

Komponenty sady *artus* EBV RG PCR se skladují při teplotě -15 °C až -30 °C a mají trvanlivost do data uvedeného na štítku. Zabraňte opakovanému rozmrazení a zmrazení ($> 2x$), snižuje se tím senzitivita analýzy. Pokud se reagensie mají používat pouze občasně, je nutné je zmrazit v alikvotních množstvích. Uchovávání při $2\text{--}8\text{ °C}$ by nemělo překročit dobu pěti hodin.

Postup

Izolace DNA

Sady společnosti QIAGEN uvedené v tabulce 1 jsou validovány pro purifikaci virové DNA z uvedených typů vzorků lidské tkáně pro použití se sadou *artus* EBV RG PCR. Purifikaci virové DNA proveďte podle pokynů v příručce k jednotlivým sadám.

Tabulka 1. Izolační sady validované pro použití se sadou *artus* EBV RG PCR

Materiál vzorku	Objem vzorku	Sada k izolaci nukleových kyselin	Katalogové číslo (QIAGEN)	Nosičová RNA
sérum, plazma, likvor	200 µl	QIAamp [®] DNA Mini Kit (50)	51304	neobsažena
sérum, plazma	1 ml	QIAamp UltraSens [®] Virus Kit (50)	53704	obsažena
krevní buňky	200 µl	QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	51104	neobsažena
plazma	400 µl	EZ1 [®] DSP Virus Kit (48)*	62724	obsažena

* Sada EZ1 DSP Virus je rovněž dostupná jako sada EASY*artus*[®] EBV RG PCR s certifikací CE-IVD v kombinaci se sadou *artus* EBV RG PCR (informace o možnostech objednávky viz strana 29).

Poznámka: Antikoagulanty obsažené v odběrových zkumavkách mohou mít inhibiční účinek na PCR. Pokud však použijete výše uvedené izolační sady, zmíněné inhibitory tím eliminujete. Doporučujeme nepoužívat heparinovou krev.

Poznámka: Sada *artus* EBV RG PCR není vhodná pro izolační metody na základě fenolu.

Použití minisady QIAamp DNA Blood nebo QIAamp DNA

Poznámka: Užití nosičové RNA má rozhodující význam pro efektivitu izolace a tím i pro výtěžek DNA/RNA. Upozornění: Při izolaci nukleových kyselin z nebuněčných tělesných tekutin a materiálů s nízkým obsahem DNA a RNA (např. likvor) důrazně doporučujeme přidat nosič (RNA Homopolymer Poly[rA]), není součástí minisady QIAamp DNA Blood ani QIAamp DNA). V těchto případech připravte nosičovou RNA následujícím způsobem.

- Resuspendujte lyofilizovanou nosičovou RNA (RNA Homopolymer Poly[rA], není součástí minisady QIAamp DNA Blood ani QIAamp DNA) v elučním pufru (nepoužívejte lyzační pufr) izolační sady (pufr AE minisady QIAamp DNA a QIAamp DNA Blood) a ředěním vytvořte roztok o koncentraci 1 µg/µl. Tento roztok nosičové RNA rozdělte na alikvoty podle potřeby a skladujte je při teplotě –15 °C až –30 °C. Alikvot nosičové RNA opakovaně nerozmrazujte (> 2x).
- Na 100 µl lyzačního pufru použijte 1 µg nosičové RNA. Stanovuje-li například izolační protokol 200 µl lyzačního pufru, přidejte 2 µl nosičové RNA (1 µg/µl) přímo do lyzačního pufru (pufr AL minisady QIAamp DNA a QIAamp DNA Blood). Před začátkem každé izolace musí být připravena čerstvá směs lyzačního pufru a nosičové RNA (příp. i interní kontroly, viz „Interní kontrola“, strana 13) podle pipetovacího schématu uvedeného v tabulce 2.

Tabulka 2. Pipetovací schéma pro použití s minisadou QIAamp DNA Blood nebo QIAamp DNA

Počet vzorků	1	12
Pufr AL (lyzační pufr)*	např. 200 µl	např. 2400 µl
Nosičová RNA (1 µg/µl)	2 µl	24 µl
Celkový objem	202 µl	2424 µl
Objem na izolaci	200 µl	po 200 µl

* Obsahuje guanidin hydrochlorid; bezpečnostní informace viz příručka pro sadu.

Poznámka: Čerstvě připravenou směs lyzačního pufru a nosičové RNA použijte ihned k izolaci. Skladování směsi není možné.

Poznámka: Interní kontrolu sady *artus* EBV RG PCR lze vložit přímo do izolace (viz „Interní kontrola“, strana 13).

Poznámka: Důrazně doporučujeme provést centrifugaci podle kroku 10 v protokolu (*QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook*, třetí vydání, duben 2010, strana 29 a 32), čímž odstraníte veškeré zbytky etanolu. Doporučujeme prodloužit tuto centrifugaci na 3 minuty.

Aby bylo dosaženo maximální senzitivity sady *artus* EBV RG PCR, doporučujeme eluovat DNA v 50 µl elučního pufru.

Použití sady QIAamp UltraSens Virus

Poznámka: Užití nosičové RNA má rozhodující význam pro efektivitu izolace a tím i pro výtěžek DNA/RNA. Aby bylo dosaženo vyšší stability nosičové RNA

dodávané spolu se sadou QIAamp UltraSens Virus, doporučujeme následující postup, který se liší od pokynů v příručce pro izolační sadu.

- Před prvním použitím izolační sady resuspendujte lyofilizovanou nosičovou RNA v 310 µl elučního pufru (pufr AVE) dodávaného se sadou (konečná koncentrace 1 µg/µl, nepoužívejte lyzační pufr). Tento roztok nosičové RNA rozdělte na alikvoty podle potřeby a skladujte je při teplotě –15 °C až –30 °C. Alikvot nosičové RNA opakovaně nerozmrazujte (> 2x).
- Před začátkem každé izolace musí být připravena čerstvá směs lyzačního pufru a nosičové RNA (příp. i Interní kontroly, viz „Interní kontrola“, strana 13) podle pipetovacího schématu uvedeného v tabulce 3:

Tabulka 3. Pipetovací schéma pro použití se sadou QIAamp UltraSens Virus

Počet vzorků	1	12
Pufr AC (lyzační pufr)*	800 µl	9600 µl
Nosičová RNA (1 µg/µl)	5,6 µl	67,2 µl
Celkový objem	805,6 µl	9667,2 µl
Objem na izolaci	800 µl	po 800 µl

* Obsahuje isopropanol; bezpečnostní informace viz příručka pro sadu.

Poznámka: Čerstvě připravenou směs lyzačního pufru a nosičové RNA použijte ihned k izolaci. Skladování směsi není možné.

Poznámka: Interní kontrolu sady *artus* EBV RG PCR lze vložit přímo do izolace (viz „Interní kontrola“, strana 13).

Poznámka: Důrazně doporučujeme provést dodatečnou centrifugaci popsanou v kroku 14 protokolu (*QIAamp UltraSens Virus Handbook*, duben 2010, strana 17), čímž odstraníte veškeré zbytky etanolu. Doporučujeme prodloužit tuto centrifugaci na 3 minuty.

Aby bylo dosaženo maximální senzitivity sady *artus* EBV RG PCR, doporučujeme eluovat DNA v 50 µl elučního pufru.

Sada QIAamp UltraSens Virus umožňuje koncentrování vzorku. Pokud jako materiál vzorku nepoužíváte sérum ani plazmu, přidejte k vzorku alespoň 50 % (v/v) negativní lidské plazmy.

Použití sady EZ1 DSP Virus

Poznámka: Užití nosičové RNA má rozhodující význam pro efektivitu izolace a tím i pro výtěžek DNA/RNA. Ke každé izolaci přidejte odpovídající množství nosičové RNA podle pokynů v příručce pro sadu *EZ1 DSP Virus*.

Poznámka: Interní kontrolu sady *artus* EBV RG PCR lze vložit přímo do izolace (viz „Interní kontrola“, dole).

Poznámka: Po izolaci pomocí sady EZ1 DSP Virus důrazně doporučujeme použít purifikované virové nukleové kyseliny ihned k PCR. Eluáty lze případně před analýzou PCR uchovávat až 3 tři dny při teplotě 4 °C.

Interní kontrola

Spolu s produktem se dodává interní kontrola (EBV RG IC). Uživatel má tak možnost kontrolovat jak izolaci DNA, tak také možnou inhibici PCR. Při použití izolační sady EZ1 DSP Virus musí být interní kontrola přidána podle pokynů uvedených v *EZ1 DSP Virus Kit Manuálu*. Používáte-li sadu QIAamp UltraSens Virus, minisadu QIAamp DNA Blood nebo QIAamp DNA, přidejte interní kontrolu k izolaci v poměru 0,1 µl na 1 µl elučního objemu. Používáte-li například sadu QIAamp UltraSens Virus a DNA eluujete v 50 µl pufru AVE, přidejte na začátku 5 µl interní kontroly. Množství vkládané interní kontroly závisí pouze na elučním objemu.

Poznámka: Interní kontrola a nosičová RNA (viz „Izolace DNA“, strana 10) by měly být přidávány pouze ke směsi lyzačního pufru a vzorku nebo přímo k lyzačnímu pufru.

Interní kontrola nesmí být přidána přímo ke vzorku. Upozorňujeme, že při přidávání k lyzačnímu pufru musíte směs interní kontroly a lyzačního pufru / nosičové RNA připravit vždy čerstvou a ihned použít (skladování směsi při pokojové teplotě nebo v lednici může již po několika hodinách vést k selhání interní kontroly a ke snížení efektivity izolace).

Poznámka: Interní kontrolu a nosičovou RNA nepipetujte přímo do vzorku.

Volitelně lze interní kontrolu použít výhradně ke kontrole možné inhibice PCR. V tomto případě přidejte interní kontrolu přímo ke směsi EBV RG Master, jak popisuje krok 2b protokolu (strana 15).

Protokol: PCR a analýza dat

Důležité body před zahájením

- Před zahájením procedury získajte základní informace o přístroji Rotor-Gene Q. Viz uživatelská příručka k přístroji.
- Dbejte na to, aby byl do každého běhu PCR zahrnut alespoň jeden kvantifikační standard a jedna negativní kontrola (voda v kvalitě vhodné pro PCR). Pro vytvoření standardní křivky použijte u každého běhu PCR všechny 4 kvantifikační standardy (EBV RG QS 1–4) dodávané spolu s produktem.

Věci, které je nutné udělat před zahájením

- Ověřte, že je chladicí blok (příslušenství přístroje Rotor-Gene Q) předem vychlazen na 2–8 °C.
- Všechny reagenty se musí před začátkem testu zcela rozmrazit při pokojové teplotě, musí být dobře promíchány (opakovaný náběr pipetou a vypuštění pipety nebo krátký vortex) a následně centrifugovány.

Postup

1. Umístěte požadovaný počet zkumavek PCR do adaptérů chladicího bloku.
 2. Chcete-li pomocí interní kontroly sledovat jak izolaci DNA, tak možnou inhibici PCR, postupujte podle kroku 2a. Chcete-li interní kontrolu použít výhradně ke kontrole inhibice PCR, postupujte podle kroku 2b.
- 2a. Interní kontrola již byla přidána k izolaci (viz „Interní kontrola“, strana 13). V tomto případě připravte směs Master Mix podle tabulky 4.**

Reakční směs obvykle obsahuje všechny komponenty potřebné pro PCR kromě vzorku.

Tabulka 4. Příprava směsi Master Mix (interní kontrola použitá ke sledování izolace DNA a ke kontrole inhibice PCR)

Počet vzorků	1	12
EBV RG Master	30 µl	360 µl
EBV RG IC	0 µl	0 µl
Celkový objem	30 µl	360 µl

- 2b. Interní kontrola musí být přidána přímo ke směsi EBV RG Master. V tomto případě připravte směs Master Mix podle tabulky 5.**

Reakční směs obvykle obsahuje všechny komponenty potřebné pro PCR kromě vzorku.

Tabulka 5. Příprava směsi Master Mix (interní kontrola použita výhradně ke kontrole inhibice PCR)

Počet vzorků	1	12
EBV RG Master	30 µl	360 µl
EBV RG IC	2 µl	24 µl
Celkový objem	32 µl*	384 µl*

* Zvýšení objemu podmíněné přidáním interní kontroly se při přípravě reakce PCR nezohledňuje. Senzitivita detekčního systému není omezena.

- 3. Odměřte pipetou do každé zkumavky PCR 30 µl směsi Master Mix. Poté přidejte 20 µl eluátu z izolace DNA (viz tabulka 6). Obdobně musíte přidat jako pozitivní kontrolu 20 µl alespoň jednoho kvantifikačního standardu (EBV RG QS 1–4) a jako negativní kontrolu 20 µl vody v kvalitě vhodné pro PCR (Water, PCR grade).**

Tabulka 6. Příprava PCR reakce

Počet vzorků	1	12
Master Mix	30 µl	po 30 µl
Vzorek	20 µl	po 20 µl
Celkový objem	50 µl	po 50 µl

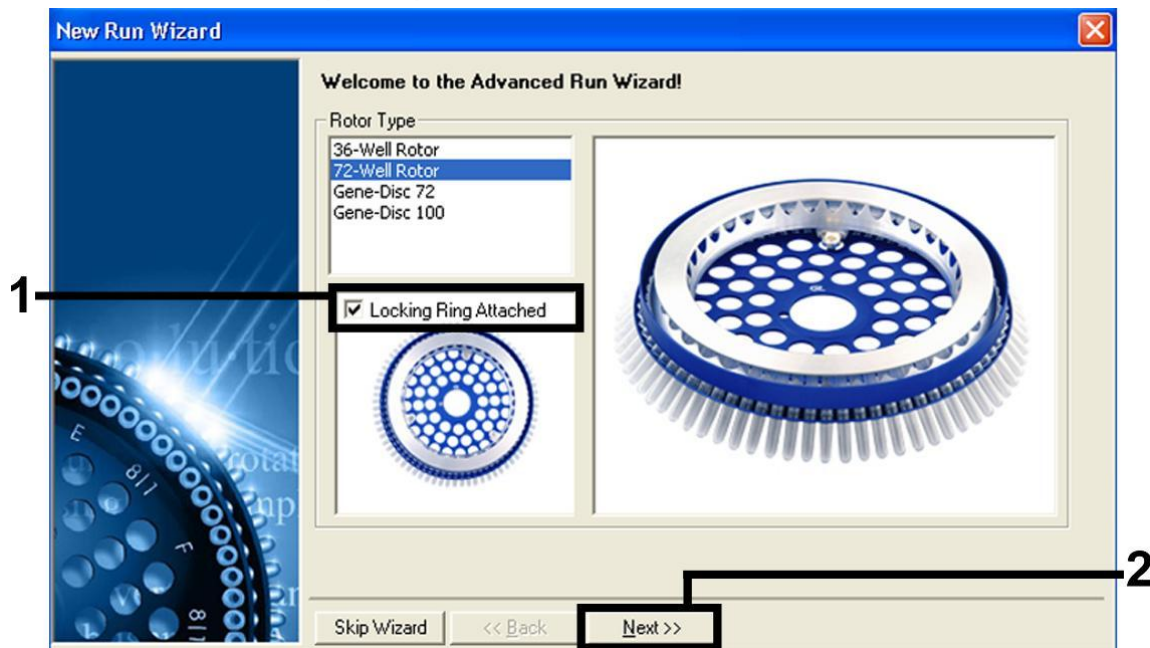
- 4. Uzavřete zkumavky PCR. Ujistěte se, že byl na rotor nasazen Locking Ring (příslušenství přístroje Rotor-Gene) jako prevence nechtěného otevření zkumavek během běhu.**

5. Pro detekci DNA EBV vytvořte teplotní profil podle následujících kroků.

Nastavení obecných parametrů	Obrázky 1, 2, 3
Počáteční aktivace Hot Start enzymu	Obrázek 4
Amplifikace DNA (touchdown PCR)	Obrázek 5
Nastavení senzitivity fluorescenčních kanálů	Obrázek 6
Spuštění běhu	Obrázek 7

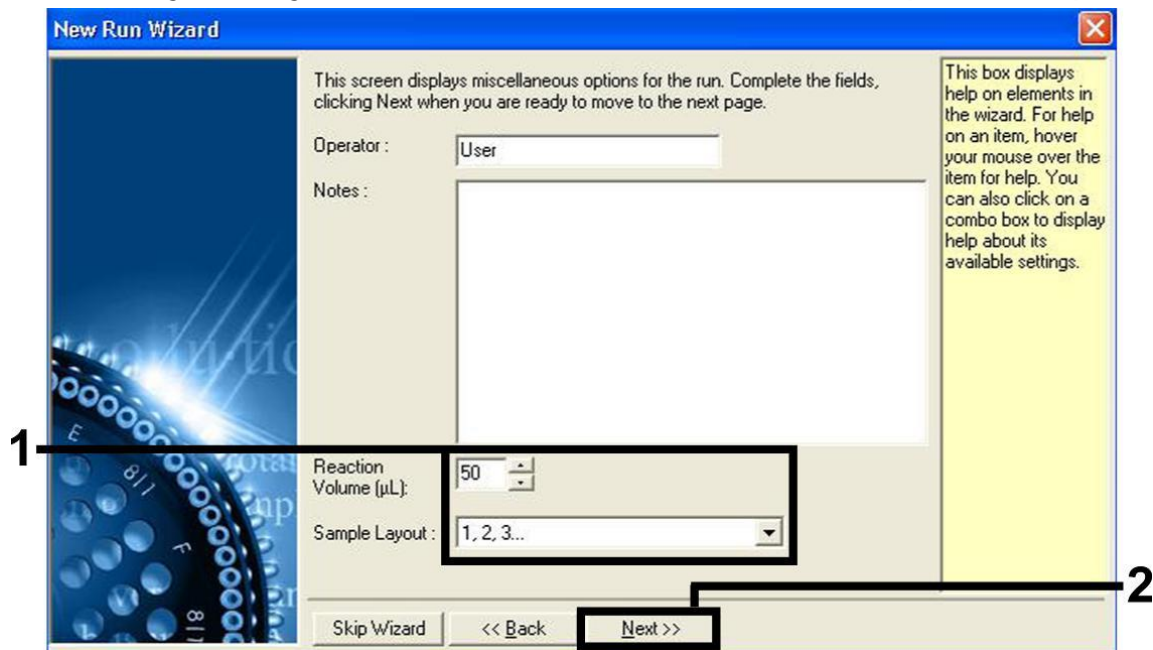
Veškeré údaje se vztahují na software Rotor-Gene Q MDx / Rotor-Gene Q verze 1.7.94, software Rotor--Gene 6000 verze 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94 a software Rotor--Gene 3000 verze 6.0.23. Podrobnosti k programování přístrojů Rotor-Gene naleznete v uživatelské příručce k přístroji. Na obrázcích jsou tato nastavení zvýrazněna černými rámečky. Ilustrace se vztahují k přístrojům Rotor--Gene Q. Vyžaduje-li přístroj Rotor-Gene 3000 jiné hodnoty, rozdíly jsou popsány v textu.

6. Nejdříve otevřete okno “New Run Wizard” (obrázek 1). Zaškrtněte rámeček “Locking Ring Attached” (Přípevněn pojistný prstenec) a klikněte na “Next” (Další).



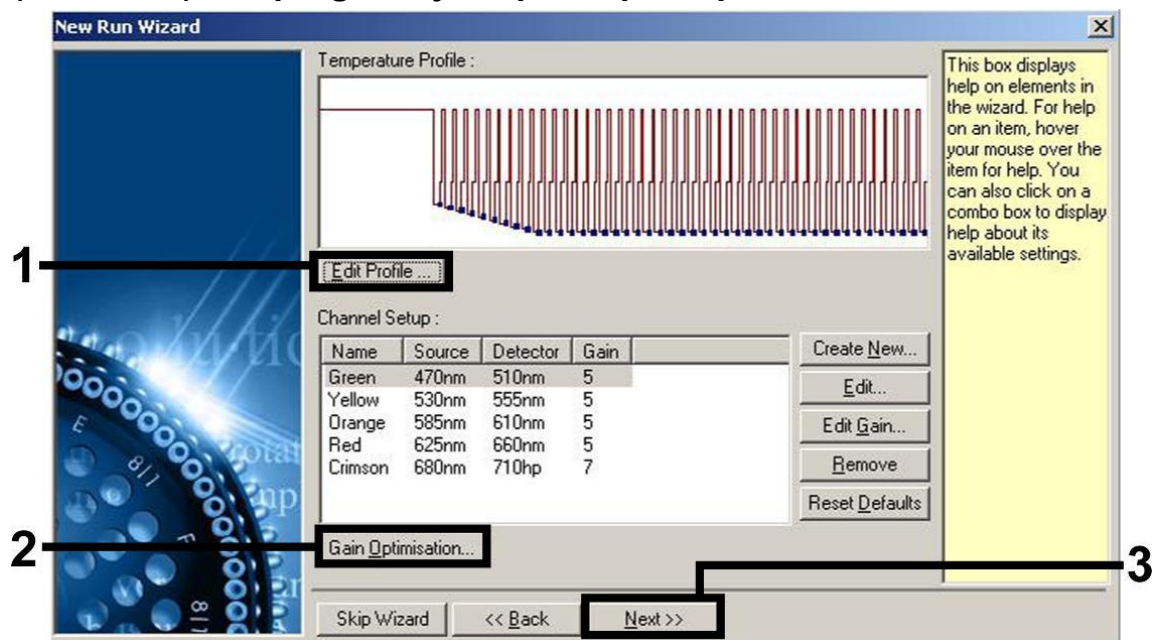
Obrázek 1. Dialogové okno “New Run Wizard”.

7. Zvolte 50 jako objem PCR reakce a klikněte na “Next” (obrázek 2).

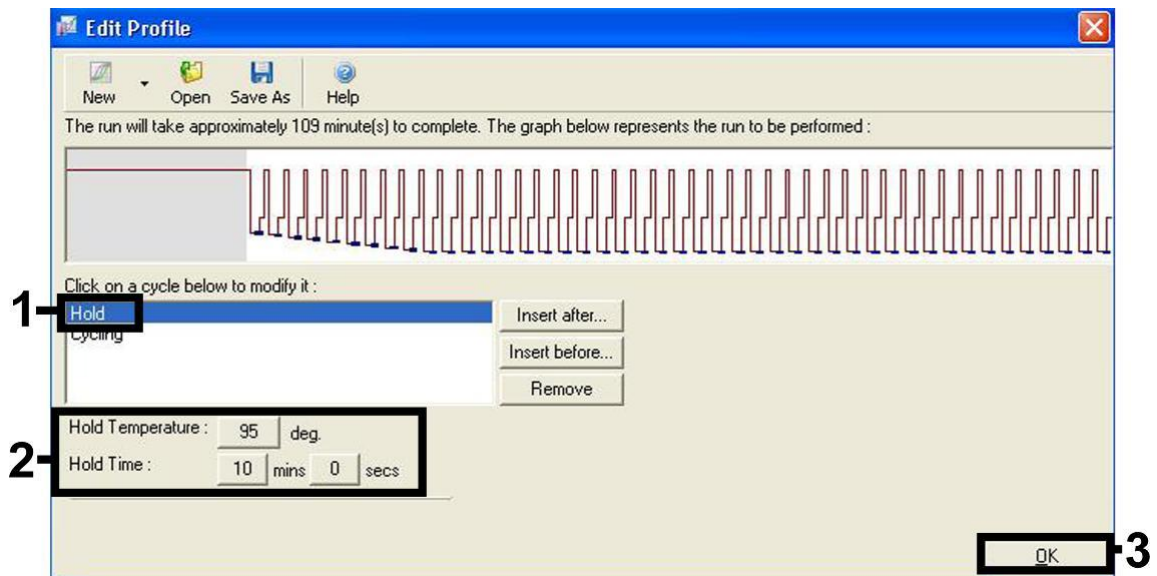


Obrázek 2. Nastavení obecných parametrů analýzy.

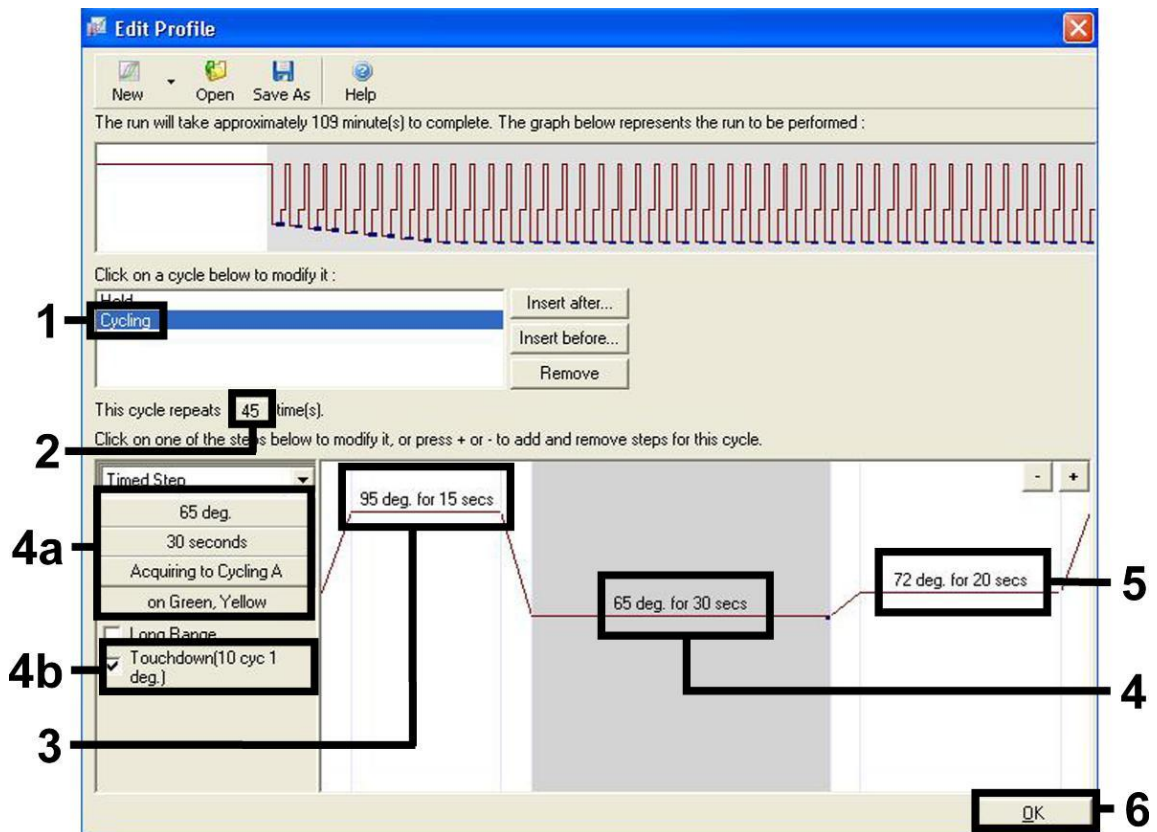
8. Klikněte na tlačítko “Edit Profile” v dalším okně “New Run Wizard” (obrázek 3) a naprogramujte teplotní profil podle obrázků 3-5.



Obrázek 3. Úprava profilu.

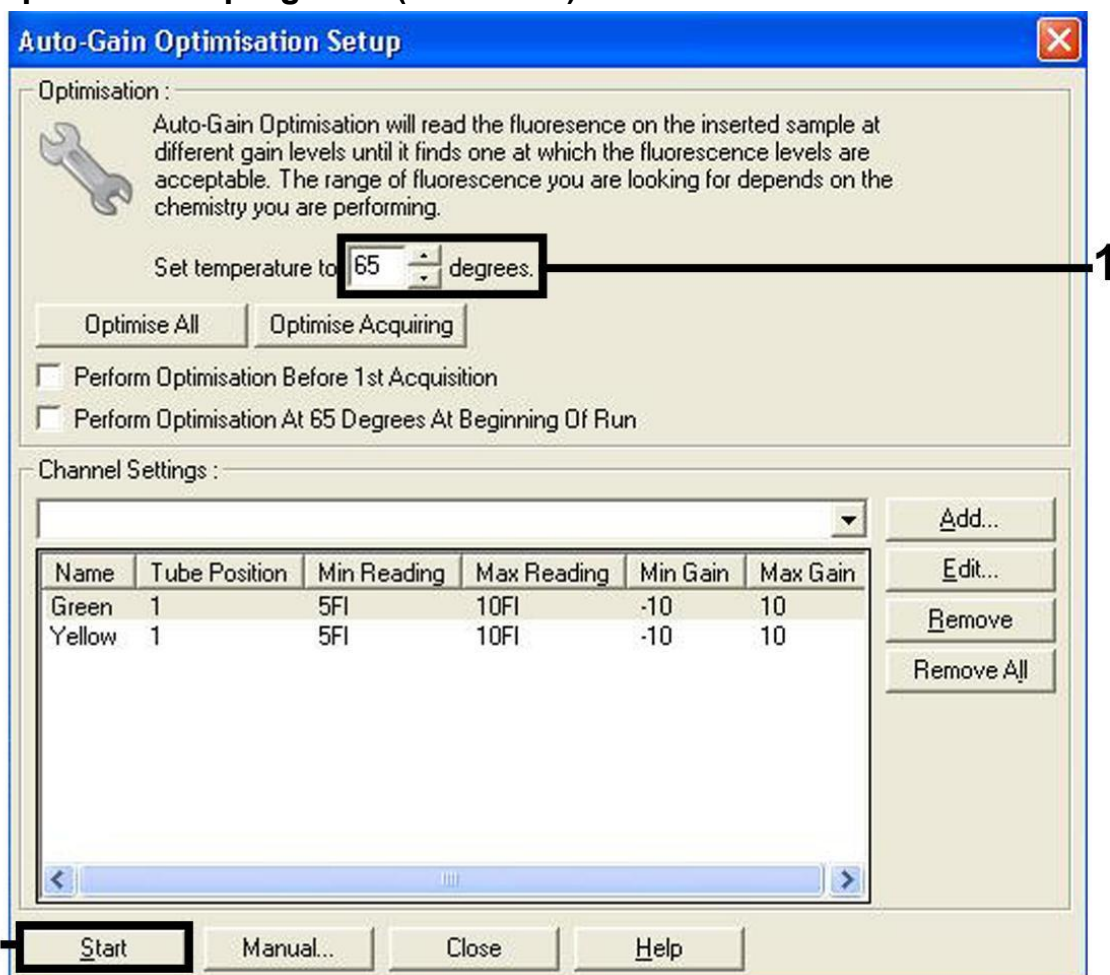


Obrázek 4. Počáteční aktivace Hot Start enzymu.



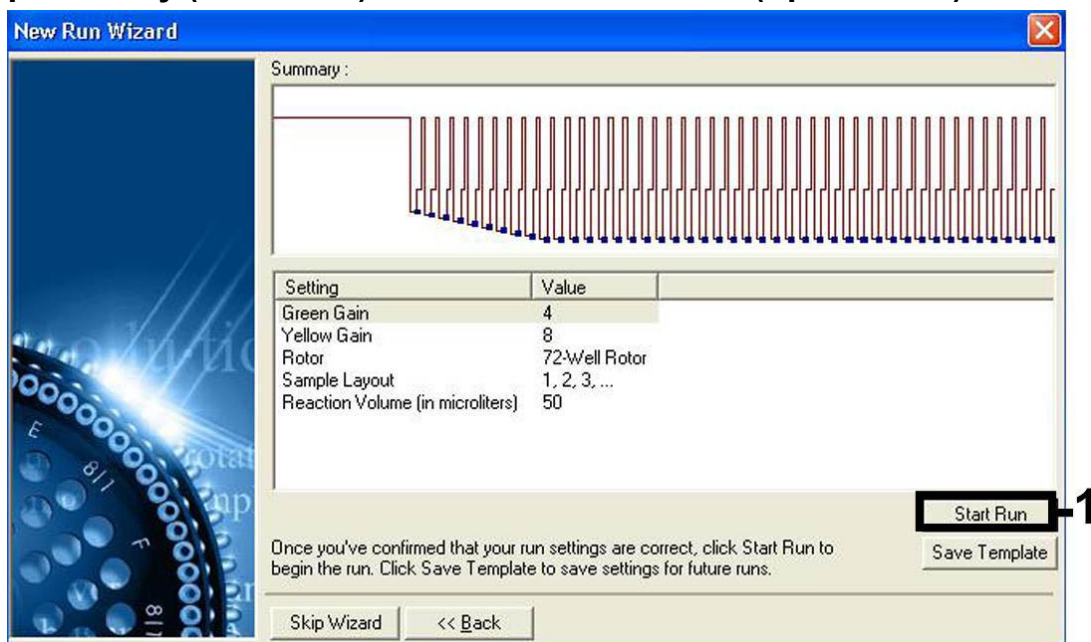
Obrázek 5. Amplifikace DNA. Ujistěte se, že je dotyková funkce u kroku temperování aktivována pro 10 cyklů. Upozorňujeme, že software přístroje Rotor-Gene 3000 definuje fluorescenční barviva jako „FAM/Sybr, JOE“.

9. Měřicí rozsah fluorescenčních kanálů je třeba určit podle fluorescenční intenzity v PCR zkumavkách. Klikněte na “Gain Optimisation” v okně menu “New Run Wizard” (viz obrázek 3) pro otevření okna “Auto-Gain Optimisation Setup”. Nastavte kalibrační teplotu na 65, aby odpovídala reasociační (annealing) teplotě amplifikačního programu (obrázek 6).



Obrázek 6. Nastavení senzitivity fluorescenčních kanálů. Upozorňujeme, že software přístroje Rotor-Gene 3000 definuje fluorescenční barviva jako „FAM/Sybr“ a „JOE“.

10. Hodnoty výsledků determinované kalibrací kanálů se automaticky uloží a jsou uvedené v seznamu v posledním okně programovací procedury (obrázek 7). Stiskněte “Start Run” (Spustit běh).



Obrázek 7. Spuštění běhu. Upozorňujeme, že software přístroje Rotor-Gene 3000 definuje fluorescenční barviva jako „FAM/Sybr“ a „JOE“.

Interpretace výsledků

Kvantifikace

S kvantifikačními standardy (EBV RG QS 1–4) dodávanými spolu s produktem se zachází stejně jako s již izolovanými vzorky a přidávají se ve stejném objemu (20 µl). Standardní křivku na přístroji Rotor-Gene Q vytvoříte tak, že použijete všech 4 kvantifikačních standardů, definujete je v dialogovém okně „Edit Samples“ (Upravit vzorky) jako standardy a zadáte odpovídající koncentrace (viz uživatelská příručka k přístroji).

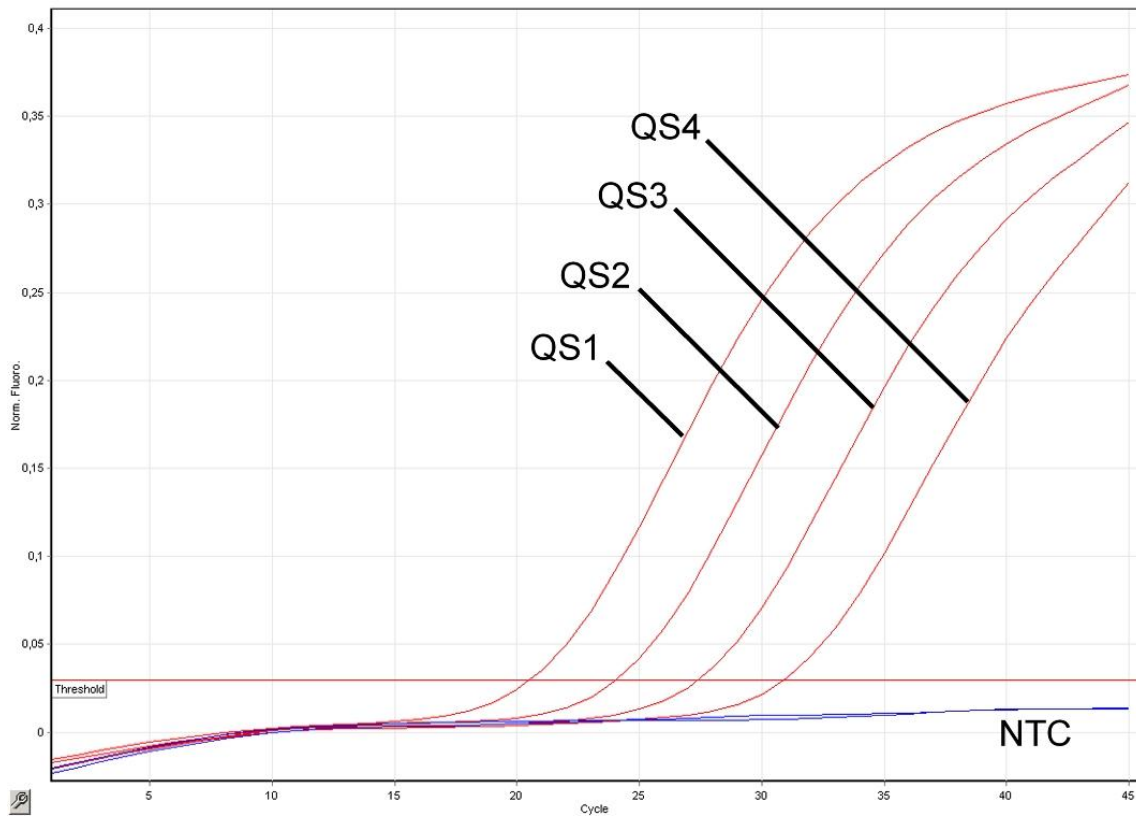
Poznámka: Kvantifikační standardy jsou definovány jako kopie/µl. Pro přepočtení hodnot získaných pomocí standardní křivky na kopie/ml vzorku se používá následující vzorec:

$$\text{Výsledek (kopie/ml)} = \frac{\text{výsledek (kopie/}\mu\text{l)} \times \text{eluční objem (}\mu\text{l)}}{\text{objem vzorku (ml)}}$$

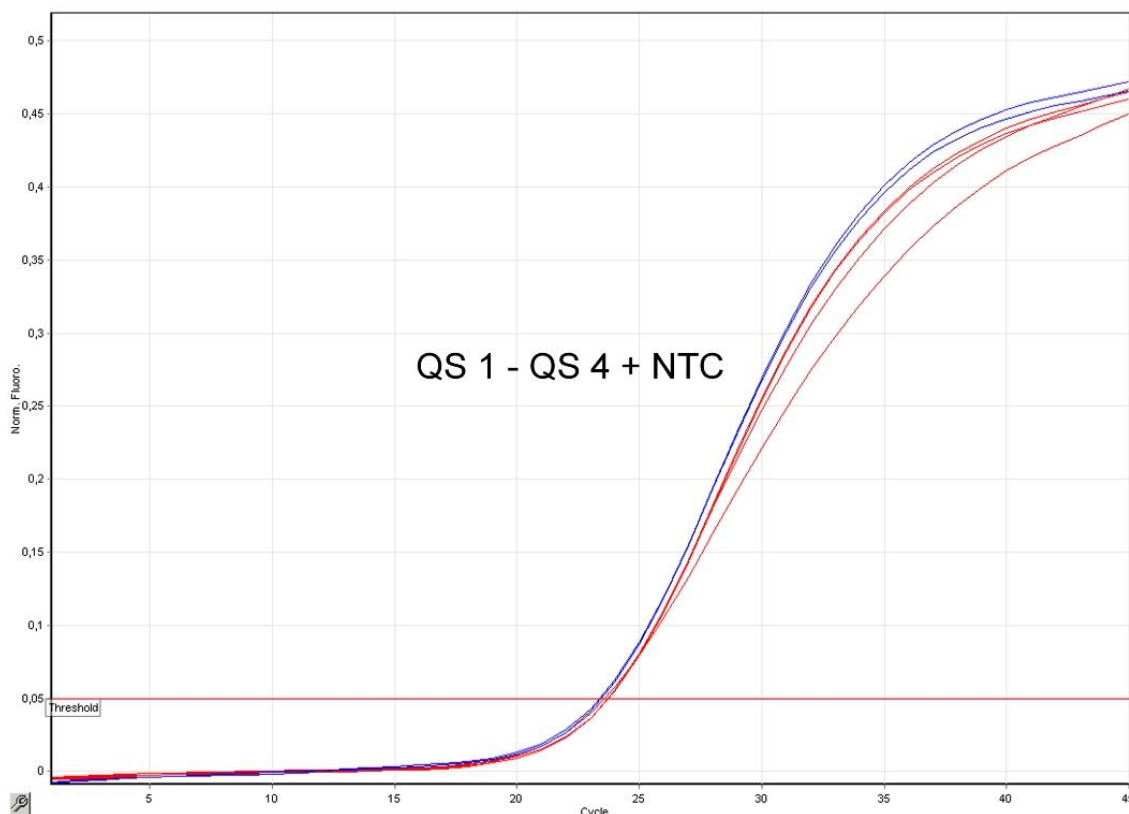
Do výše uvedeného vzorce se dosazuje zásadně původní objem vzorku. Toto se musí zohlednit, byl-li objem vzorku před izolací nukleových kyselin pozměněn (např. redukce objemu centrifugací nebo jeho zvýšení naplněním na objem požadovaný pro izolaci).

Výsledky

Příklady pozitivních a negativních reakcí PCR jsou uvedeny na obrázcích 8 a 9.



Obrázek 8. Průkaz kvantifikačních standardů (EBV RG QS 1–4) ve fluorescenčním kanálu Cycling Green. NTC: Beztemplátová kontrola (negativní kontrola).



Obrázek 9. Průkaz interní kontroly (IC) ve fluorescenčním kanálu Cycling Yellow při současné amplifikaci kvantifikačních standardů (EBV RG QS 1–4). NTC: Beztemplátová kontrola (negativní kontrola).

Ve fluorescenčním kanálu Cycling Green je detekován signál. Výsledek analýzy je pozitivní: Vzorek obsahuje DNA EBV.

V tomto případě je detekce signálu v kanálu Cycling Yellow podružná, protože vysoké výchozí koncentrace DNA EBV (pozitivní signál v kanálu Cycling Green) mohou vést k redukovanému až chybějícímu fluorescenčnímu signálu interní kontroly v kanálu Cycling Yellow (kompetice).

Poznámka: U přístroje Rotor-Gene 3000 se relevantní kanály označují Cycling A.FAM pro pozitivní signál a Cycling A.JOE pro interní kontrolu.

Ve fluorescenčním kanálu Cycling Green není detekován žádný signál. Současně se v kanálu Cycling Yellow objevuje signál interní kontroly. Ve vzorku není prokazatelná žádná DNA EBV. Lze jej proto považovat za negativní.

Při negativní EBV PCR vylučuje detekovaný signál interní kontroly možnost inhibice PCR.

Poznámka: U přístroje Rotor-Gene 3000 se relevantní kanály označují Cycling A.JOE pro interní kontrolu a Cycling A.FAM pro chybějící signál.

Signál není detekován ani v kanálu Cycling Green ani v kanálu Cycling Yellow.

Není možné učinit závěr.

Pokyny týkající se zdrojů chyb a jejich odstranění jsou uvedeny v kapitole "Řešení problémů", strana 23.

Poznámka: U přístroje Rotor-Gene 3000 se relevantní kanály označují Cycling A.FAM a Cycling A.JOE.

Řešení problémů

V této kapitole naleznete užitečné informace, které Vám mohou pomoci při řešení případných problémů. Více informací lze získat také na internetové stránce naší technické podpory: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vědci z technické podpory QIAGEN vždy rádi zodpoví Vaše otázky ohledně údajů a protokolu v tomto manuálu i obecně k technologiím pro přípravu vzorků a jejich rozboru (možnosti navázání kontaktu viz zadní strana nebo navštivte www.qiagen.com).

Komentáře a návrhy

Žádný signál u pozitivních kontrol (EBV RG QS 1–4) ve fluorescenčním kanálu Cycling Green nebo Cycling A.FAM

- | | |
|--|---|
| a) Fluorescenční kanál zvolený pro analýzu PCR dat neodpovídá protokolu | K analýze dat zvolte fluorescenční kanál Cycling Green nebo Cycling A.FAM pro analytickou EBV PCR a fluorescenční kanál Cycling Yellow nebo Cycling A.JOE pro PCR interní kontroly. |
| b) Chybné naprogramování teplotního profilu přístroje Rotor-Gene | Porovnejte teplotní profil s údaji protokolu. Viz „Protokol: PCR a analýza dat“, strana 14. |
| c) Chybná konfigurace PCR | Porovnejte svůj pracovní postup s pipetovacím schématem, případně PCR zopakujte. Viz „Protokol: PCR a analýza dat“, strana 14. |
| d) Podmínky skladování jednoho nebo více komponentů soupravy neodpovídají předpisům uvedeným v kapitole „Uchovávání a nakládání s reagensy“ (strana 9) | Prosím zkontrolujte jak podmínky uchovávání, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu. |

Komentáře a návrhy

- e) Doba životnosti sady *artus* EBV RG PCR vypršela Prosím zkontrolujte jak podmínky uchovávání, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.

Slabý nebo chybějící signál interní kontroly ve fluorescenčním kanálu Cycling Yellow nebo -Cycling A.JOE při současné nepřítomnosti signálu v kanálu Cycling Green nebo Cycling A.FAM

- a) Podmínky PCR neodpovídají protokolu Zkontrolujte podmínky PCR (viz výše) a popř. PCR zopakujte s opraveným nastavením.
- b) Došlo k inhibici PCR Ujistěte se, že používáte doporučený postup izolace a držte se přesně pokynů výrobce.

Při použití minisady QIAamp DNA, QIAamp DNA Blood nebo sady QIAamp UltraSens Virus se ujistěte, že byla před elucí během izolace DNA provedena doporučená dodatečná centrifugace, aby byly odstraněny veškeré zbytky etanolu (viz „Izolace DNA“, strana 10 a 11).
- c) Během extrakce došlo k úbytku DNA Byla-li k izolaci přidána interní kontrola, může nepřítomnost signálu interní kontroly znamenat úbytek DNA během extrakce. Ujistěte se, že používáte doporučenou izolační metodu (viz „Izolace DNA“, strana 10) a držte se přesně pokynů výrobce.
- d) Podmínky skladování jednoho nebo více komponentů soupravy neodpovídají předpisům uvedeným v kapitole „Uchovávání a nakládání s reagensy“ (strana 9) Prosím zkontrolujte jak podmínky uchovávání, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.
- e) Doba životnosti sady *artus* EBV RG PCR vypršela Prosím zkontrolujte jak podmínky uchovávání, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.

Komentáře a návrhy

Signály u negativních kontrol ve fluorescenčním kanálu Cycling Green nebo Cycling A.FAM při analytické PCR

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

Řízení jakosti

V souladu se systémem managementu jakosti společnosti QIAGEN certifikovaným podle norem ISO byla každá šarže sady *artus* EBV RG PCR testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zaručena jednotná kvalita produktu.

Omezení

Všechny reagensy se smí používat výhradně pro diagnostiku *in vitro*.

Produkt by měli používat pouze pracovníci, kteří jsou speciálně poučeni a vyškoleni v metodice diagnostiky *in vitro*.

Přesné dodržování protokolu je bezpodmínečně nutné k dosažení optimálních výsledků PCR.

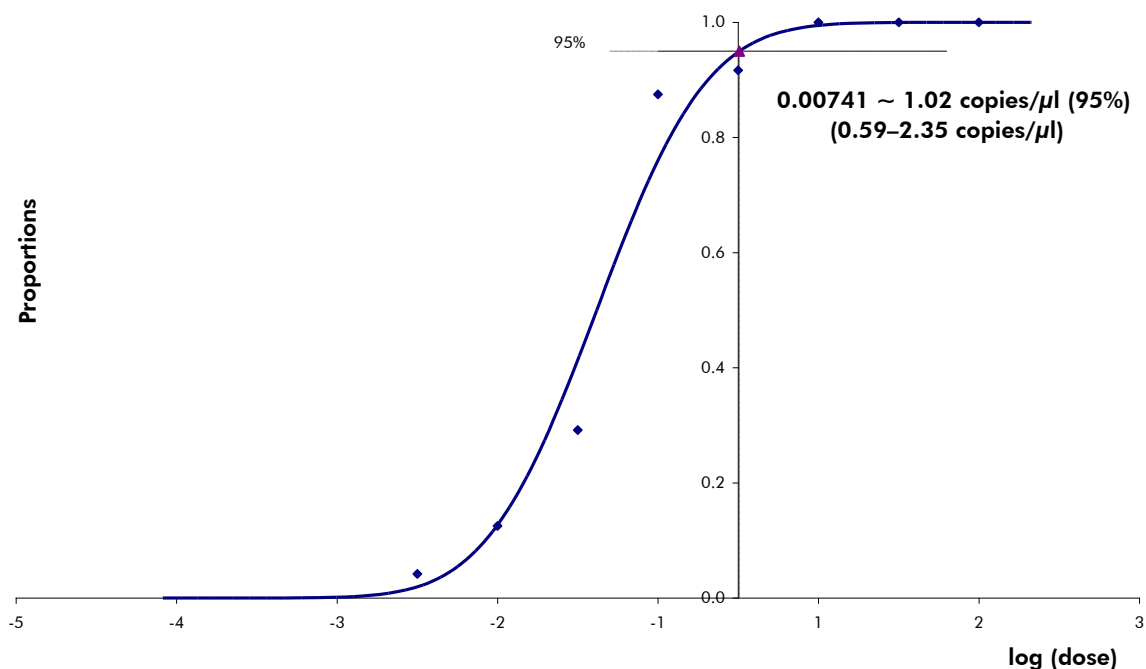
Dbejte na konec doby použitelnosti uvedený na balení a na štítcích jednotlivých komponent. Nepoužívejte reagensy s prošlou trvanlivostí.

V ojedinělých případech mohou mutace ve vysoce konzervovaných oblastech virového genomu, které jsou pokryty primery a/nebo sondami soupravy, vést k nedostatečné kvantifikaci nebo k selhání detekce přítomnosti viru. Validita a účinnost testu jsou pravidelně kontrolovány.

Charakteristiky chování

Analytická senzitivita

Pro určení analytické senzitivity sady *artus* EBV RG PCR byla vytvořena řada ředění od 31,6 do 0,01 a od 100 do nominálně 0,03 ekvivalentu kopie EBV/ μ l. Ta byla následně analyzována za použití sady *artus* EBV RG PCR na přístroji Rotor-Gene 6000 a Rotor-Gene 3000. Experimenty byly provedeny ve 3 různých dnech formou osminásobných určení. Výsledky byly zjištěny probitovou analýzou. Grafické znázornění probitové analýzy na přístroji Rotor-Gene 6000 naleznete na obrázku 10. Analytický limit detekce sady *artus* EBV RG PCR za použití přístrojů Rotor--Gene Q MDx/Q/6000 a Rotor-Gene 3000 je 1,02 kopie/ μ l ($p = 0,05$) a 3,8 kopie/ μ l ($p = 0,05$). To znamená, že bude s 95% pravděpodobností detekováno 1,02 kopie/ μ l nebo 3,8 kopie/ μ l.



Obrázek 10. Probitová analýza: EBV (Rotor-Gene 6000). Analytická senzitivita sady *artus* EBV RG PCR na přístroji Rotor-Gene 6000.

Specifická

Specifická sady *artus* EBV RG PCR je v první řadě zaručena výběrem primerů a sond, jakož i volbou přísných reakčních podmínek. Primery a sondy byly na základě srovnávací sekvencí analýzy přezkoušeny na eventuální homologie se všemi sekvencemi publikovanými v genových bankách. Detekovatelnost všech relevantních genotypů byla takto zajištěna.

Specifická byla navíc validována pomocí 6 různých EBV negativních vzorků séra, které spolu se specifickými primery a sondami pro EBV zahrnutými ve směsi EBV RG Master nevytvářely žádný signál.

Potenciální křížová reaktivita sady *artus* EBV RG PCR byla testována pomocí kontrolní skupiny uvedené v tabulce 7. Žádný z testovaných původců nebyl reaktivní.

Tabulka 7. Testování specifity diagnostické soupravy pomocí potenciálně křížově reaktivních patogenů

Kontrolní skupina	EBV (Cycling Green nebo Cycling A.FAM)	Interní kontrola (Cycling Yellow nebo Cycling A.JOE)
Lidský herpesvirus 1 (herpes simplex virus 1)	–	+
Lidský herpesvirus 2 (herpes simplex virus 2)	–	+
Lidský herpesvirus 3 (varicella-zoster virus)	–	+
Lidský herpesvirus 5 (cytomegalovirus)	–	+
Lidský virus leukémie T-buněk 1	–	+
Lidský virus leukémie T-buněk 2	–	+

Reprodukovatelnost

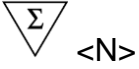









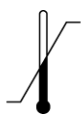


Údaje o reprodukovatelnosti jsou pořizovány za účelem pravidelného hodnocení výkonnosti sady *artus* EBV RG PCR a výkonnostního srovnání s ostatními produkty. Tyto údaje jsou získávány na základě účastí v uznávaných programech pro výkonnostní hodnocení.

Literatura

QIAGEN udržuje rozsáhlou aktuální online databázi vědeckých publikací, které hodnotí produkty QIAGEN. Podrobné volby hledání umožňují nalezení potřebných článků, buďto jednoduchým zadáním klíčových slov nebo upřesněním druhu aplikace, oboru výzkumu, názvu, atd.

Úplný seznam literatury naleznete v databázi "QIAGEN Reference Database" (Databáze odkazů QIAGEN) na stránce www.qiagen.com/RefDB/search.asp nebo kontaktujte technický servis QIAGEN nebo Vašeho místního distributora.

Symbols

	Obsahuje reagentie pro <N> testů
	Použijte do
	Prostředek zdravotnické techniky pro in vitro diagnostiku
	Katalogové číslo
	Číslo šarže
	Číslo materiálu
	Díly
	Obsahuje
	Počet
	Mezinárodní číslo obchodní položky GTIN
	Teplotní rozmezí
	Výrobce
	Další informace viz návod k použití

Kontaktní informace

Pro technické otázky a více informací navštivte naše Centrum technické podpory na stránkách www.qiagen.com/Support, zavolejte na některé Oddělení technických služeb společnosti QIAGEN nebo kontaktujte místního distributora (viz zadní strana nebo www.qiagen.com).

Informace o způsobu objednávání

Produkt	Obsah	Kat. č.
<i>artus</i> EBV RG PCR Kit (24)	Pro 24 reakcí: Master, 4 kvantifikační standardy, interní kontrola, voda (v kvalitě vhodné pro PCR)	4501263
<i>artus</i> EBV RG PCR Kit (96)	Pro 96 reakcí: Master, 4 kvantifikační standardy, interní kontrola, voda (v kvalitě vhodné pro PCR)	4501265
Sady EASY<i>artus</i> EBV RG PCR – pro plně integrovanou, automatizovanou purifikaci vzorků a průkaz původce s certifikací CE-IVD		
EASY <i>artus</i> EBV RG PCR Kit 1	Pro 48 příprav virových nukleových kyselin a 24 reakcí: 1 x sada EZ1 DSP Virus, 1 x sada <i>artus</i> EBV RG PCR (24)	EA10123
EASY <i>artus</i> EBV RG PCR Kit 2	Pro 48 příprav virových nukleových kyselin a 48 reakcí: 1 x sada EZ1 DSP Virus, 2 x sada <i>artus</i> EBV RG PCR (24)	EA10124
Sada EZ1 DSP Virus – pro automatizovanou souběžnou purifikaci virové DNA a RNA z 1–14 vzorků séra, plazmy nebo likvoru		
EZ1 DSP Virus Kit (48)	Pro 48 příprav virových nukleových kyselin: předplněné zásobníky s reagensy, jednorázové držáky na špičky, jednorázové špičky s filtrem, zkumavky na vzorky, eluční zkumavky, pufrý, nosičová RNA	62724
Minisada QIAamp DNA – pro purifikace genomové a virové DNA z tkání a jiných vzorků		
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Na 50 příprav DNA: 50 centrifugačních minikolonek QIAamp, proteináza QIAGEN K, reagensy, pufrý, sběrné zkumavky (2 ml)	51304

Produkt	Obsah	Kat. č.
Sada QIAamp UltraSens Virus – pro koncentraci a izolaci virové DNA a RNA ze séra a plazmy		
QIAamp UltraSens Virus Kit (50)	Pro 50 příprav virových nukleových kyselin: 50 centrifugačních minikolonek QIAamp, proteináza K, nosičová RNA, sběrné zkumavky (2 ml), pufry	53704
Minisada QIAamp DNA Blood – pro purifikaci až 12 µg genomové, mitochondriální či virové DNA z krve a příbuzných tělních tekutin		
QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	Na 50 minipříprav DNA: 50 centrifugačních minikolonek QIAamp, proteináza QIAGEN, reagentie, pufry, sběrné zkumavky (2 ml)	51104
Rotor-Gene Q MDx a příslušenství		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Cyklér pro PCR v reálném čase s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový), notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční záruku na součásti a servis bez instalace a školení	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Cyklér pro PCR v reálném čase s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový), notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční záruku na součásti a servis, instalaci a školení	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cyklér pro PCR v reálném čase a analyzátor křivek tání s vysokým rozlišením (High Resolution Melt – HRM) s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) plus kanál HRM, notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční záruku na součásti a servis bez instalace a školení	9002032

Produkt	Obsah	Kat. č.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Cyklér pro PCR v reálném čase a analyzátor křivek tání s vysokým rozlišením (High Resolution Melt – HRM) s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) plus kanál HRM, notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční záruku na součásti a servis, instalaci a školení	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Přístroj pro PCR v reálném čase s 6 kanály (modrý, zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) plus notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční záruku na součásti a servis bez instalace a školení	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Přístroj pro PCR v reálném čase s 6 kanály (modrý, zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) plus notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční záruku na součásti a servis, instalaci a školení	9002043
Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform	Cyklér pro PCR v reálném čase s 2 kanály (zelený, žlutý), notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční záruku na součásti a servis bez instalace a školení	9002002
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	Cyklér pro PCR v reálném čase s 2 kanály (zelený, žlutý), notebook, software, příslušenství: roční záruka na součásti a servis, instalace a školení	9002003
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform	Cyklér pro PCR v reálném čase a analyzátor křivek tání s vysokým rozlišením (High Resolution Melt – HRM) s 2 kanály (zelený, žlutý) plus kanál HRM, notebook, software, příslušenství: roční záruka na součásti a servis, bez instalace a školení	9002012

Produkt	Obsah	Kat. č.
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	Cyklér pro PCR v reálném čase a analyzátor křivek tání s vysokým rozlišením (High Resolution Melt – HRM) s 2 kanály (zelený, žlutý) plus kanál HRM, notebook, software, příslušenství: roční záruka na součásti a servis, instalace a školení	9002013
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Hliníkový blok pro ruční nastavení reakce pomocí jednokanálové pipety s využitím zkumavek 72 x 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Hliníkový blok pro ruční nastavení reakce ve standardní sestavě 8 x 12 s využitím zkumavek 96 x 0,2 ml	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 stripů po 4 zkumavkách s víčky pro 1000 reakcí	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 stripů po 4 zkumavkách s víčky pro 10 000 reakcí	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 tenkostěnných zkumavek pro 1000 reakcí	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 tenkostěnných zkumavek pro 10 000 reakcí	981008

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příručce pro sadu QIAGEN nebo příručce uživatele. Manuály k produktům QIAGEN jsou dostupné na www.qiagen.com nebo na požádání u technického servisu QIAGEN nebo lokálního distributora.

Koupě tohoto produktu opravňuje kupujícího k jeho užití k provedení diagnostických služeb pro humánní in vitro diagnostiku. Tímto se neuděluje žádný jiný obecný patent nebo licence jiného druhu než toto specifické právo k používání vyplývající z nákupu.

Ochranné známky: QIAGEN[®], QIAamp[®], artus[®], EASYartus[®], EZ1[®], Rotor-Gene[®], UltraSens[®] (QIAGEN Group); FAM[™], JOE[™] (Life Technologies); SYBR[®] (Molecular Probes, Inc.).

Omezená licenční smlouva

Použití tohoto produktu znamená, že jakýkoliv kupující či uživatel sady artus EBV RG PCR souhlasí s následujícími podmínkami:

1. Sada artus EBV RG PCR může být používána výlučně v souladu s *Příručkou pro sadu artus EBV RG PCR* a smí se používat pouze s komponenty obsaženými v sadě. QIAGEN neposkytuje žádnou licenci v rámci kteréhokoliv svého duševního vlastnictví k použití nebo k začlenění přiložených komponentů sady s komponenty, které nejsou v této sadě zahrnuty, s výjimkou případů uvedených v *Příručce pro sadu artus EBV RG PCR* a dodatečných protokolech dostupných na www.qiagen.com.
2. Mimo výslovně uvedenou licenci QIAGEN neposkytuje žádnou záruku, že tato souprava a/nebo její použití neporušuje práva třetích stran.
3. Tato sada a její komponenty jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmí se používat opakovaně, přepřelcovávat ani opakovaně prodávat.
4. QIAGEN zvláště vylučuje odpovědnost za jakékoliv jiné licence, vyjádřené či implikované, než výslovně uvedené.
5. Kupující a uživatel této sady souhlasí s tím, že neposkytne a nepovolí nikomu jinému provádět žádné kroky, které by mohly vést nebo by usnadnily jakékoliv shora zakázané činnosti. QIAGEN může zákazy tohoto Omezeného licenčního ujednání prosadit u každého soudu a vyžadovat úhradu všech vyšetřovacích a soudních poplatků, vč. poplatků za advokáta, v rámci jakéhokoliv postupu k prosazení tohoto Omezeného licenčního ujednání nebo jakýchkoliv jiných práv duševního vlastnictví vztahujících se na tuto soupravu a/nebo její komponenty.

Pro aktualizovanou licenční ustanovení viz www.qiagen.com.

© 2009-2014 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

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)

