

Manual de uso del kit *artus*[®] EBV RG PCR

 24 (ref. 4501263)
 96 (ref. 4501265)

Versión 1



Diagnóstico *in vitro* cuantitativo

Para utilizar con los instrumentos Rotor-Gene[®] Q



4501263, 4501265



1046897ES



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

ALEMANIA

R5



1046897ES



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN es el proveedor líder de tecnologías innovadoras para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular que permiten el aislamiento y la detección del contenido de cualquier muestra biológica. Nuestros productos y servicios de vanguardia y máxima calidad garantizan el éxito desde la muestra hasta el resultado.

QIAGEN sienta las bases de excelencia en los siguientes campos:

- Purificación de ADN, ARN y proteínas.
- Ensayos de ácidos nucleicos y proteínas.
- Investigación con microARN y ARNi.
- Automatización de tecnologías de preparación de muestras y ensayos de biología molecular.

Nuestra misión es ayudarle a superar sus retos y a alcanzar un éxito excepcional. Para más información, visite www.qiagen.com.

Índice

Uso previsto	6
Resumen y explicación	6
Información sobre el patógeno	6
Principio del procedimiento	6
Materiales suministrados	7
Contenido del kit	7
Materiales necesarios pero no suministrados	7
Advertencias y precauciones	8
Precauciones generales	8
Almacenamiento y manipulación de los reactivos	9
Procedimiento	10
Aislamiento del ADN	10
Control interno	13
Protocolo: PCR y análisis de los datos	15
Interpretación de los resultados	22
Cuantificación	22
Resultados	23
Guía para la resolución de problemas	25
Control de calidad	27
Limitaciones	27
Características del rendimiento	28
Sensibilidad analítica	28
Especificidad	29
Reproducibilidad	30
Referencias citadas	30
Símbolos	31
Información de contacto	31
Información para pedidos	32

Uso previsto

El kit *artus* EBV RG PCR es una prueba de amplificación de ácidos nucleicos *in vitro* para la cuantificación del ADN del virus de Epstein-Barr (VEB) en plasma, suero, líquido cefalorraquídeo (LCR) o células sanguíneas humanas. Este kit para pruebas diagnósticas utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) y está configurado para usarse con los instrumentos Rotor-Gene Q.

Resumen y explicación

El kit *artus* EBV RG PCR es un sistema listo para usar para la detección del ADN del VEB mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en los instrumentos Rotor-Gene Q. La mezcla maestra EBV RG Master contiene los reactivos y las enzimas necesarios para la amplificación específica de una región de 97 pb del genoma del VEB, así como para la detección directa del amplicón específico en el canal de fluorescencia Cycling Green de los instrumentos Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q o Rotor-Gene 6000 o en el canal Cycling A.FAM™ del instrumento Rotor-Gene 3000.

Además, el kit *artus* EBV RG PCR contiene un segundo sistema de amplificación heterógeno para identificar una posible inhibición de la PCR. Esto se detecta como un control interno (IC) en el canal de fluorescencia Cycling Yellow de los instrumentos Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q o Rotor-Gene 6000 o en el canal A.JOE™ del instrumento Rotor-Gene 3000. El límite de detección de la PCR analítica del VEB (consulte el apartado “Sensibilidad analítica” en la página 28) no se ve disminuido. Se suministran controles positivos externos (EBV RG QS 1-4), que permiten determinar la cantidad de ADN viral. Para obtener más información, consulte el apartado “Cuantificación” en la página 22.

Información sobre el patógeno

El virus de Epstein-Barr (EBV) se transmite por vía oral, principalmente por la saliva contaminada. En general, la infección por EBV es asintomática, sobre todo si se contrae en la infancia. El signo clínico de una infección aguda es la mononucleosis infecciosa, que cursa con fiebre, cansancio y faringitis, así como con inflamación de los ganglios linfáticos y del bazo. En algunos pacientes estos síntomas reaparecen de forma crónica. Se observan formas graves de la infección con EBV en pacientes inmunodeficientes y en personas con defectos de las células T.

Principio del procedimiento

La detección de patógenos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se basa en la amplificación de regiones específicas del genoma de los patógenos. Con la PCR en tiempo real, el producto amplificado se detecta

mediante colorantes fluorescentes. Estos suelen estar ligados a sondas oligonucleotídicas que se unen específicamente al producto amplificado. La monitorización de las intensidades de fluorescencia durante la serie de PCR (es decir, en tiempo real) permite detectar y cuantificar el producto que se acumula sin tener que volver a abrir los tubos de reacción una vez finalizada la serie de PCR*.

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

Materiales suministrados

Contenido del kit

artus EBV RG PCR Kit			(24)	(96)
N.º de referencia			4501263	4501265
Número de reacciones			24	96
Azul	Mezcla maestra EBV RG Master		2 x 12 reacciones	8 x 12 reacciones
Rojo	EBV RG QS 1* (5 x 10 ⁴ copias/μl)	QS	200 μl	200 μl
Rojo	EBV RG QS 2* (5 x 10 ³ copias/μl)	QS	200 μl	200 μl
Rojo	EBV RG QS 3* (5 x 10 ² copias/μl)	QS	200 μl	200 μl
Rojo	EBV RG QS 4* (5 x 10 ¹ copias/μl)	QS	200 μl	200 μl
Verde	EBV RG IC†	IC	1.000 μl	2 x 1.000 μl
Blanco	Agua (de calidad para PCR)		1.000 μl	1.000 μl
	Manual de uso		1	1

* Estándar de cuantificación.

† Control interno.

Materiales necesarios pero no suministrados

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Si desea obtener más información, consulte las fichas de datos de seguridad (SDS, *safety data sheets*) correspondientes que el proveedor del producto pone a su disposición.

Reactivos

- Kit de aislamiento de ADN (consulte el apartado "Aislamiento del ADN" en la página 10)

Consumibles

- Puntas de pipeta estériles con filtro
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (tubos en tira y tapas, 0,1 ml), para uso con un rotor de 72 pocillos (n.º de referencia 981103 o 981106)
- De forma alternativa: PCR Tubes, 0.2 ml (tubos de PCR, 0,2 ml), para uso con un rotor de 36 pocillos (n.º de referencia 981005 o 981008)

Equipo

- Pipetas (ajustables)*
- Agitador vorticial*
- Centrifugadora de mesa* con rotor para tubos de reacción de 2 ml
- Instrumento Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q o Rotor-Gene* con canales de fluorescencia para Cycling Green y Cycling Yellow o con canales de fluorescencia para Cycling A.FAM y Cycling A.JOE
- Software Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q, versión 1.7.94 o superior (software Rotor-Gene 6000, versión 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94; software Rotor-Gene 3000, versión 6.0.23)
- Bloque de refrigeración (Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes [bloque de carga para 72 tubos de 0,1 ml], n.º de referencia 9018901, o Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes [bloque de carga para 96 tubos de 0,2 ml], n.º de referencia 9018905)

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Si desea obtener más información, consulte las fichas de datos de seguridad (SDS, *safety data sheets*) correspondientes. Dichas fichas están disponibles online en un formato PDF cómodo y compacto en www.qiagen.com/safety, donde podrá encontrar, ver e imprimir la ficha de datos de seguridad de cada kit de QIAGEN® y de cada componente del kit.

Elimine los desechos de las muestras y del ensayo de conformidad con la normativa local en materia de seguridad.

Precauciones generales

El usuario debe tener en cuenta siempre las siguientes indicaciones:

- Utilice puntas de pipeta estériles con filtro.

- Almacene y extraiga los materiales positivos (muestras, controles positivos y amplicones) por separado de todos los demás reactivos y añádalos a la mezcla de reacción en un área separada espacialmente.
- Descongele por completo todos los componentes a temperatura ambiente (15-25 °C) antes de comenzar un ensayo.
- Una vez descongelados, mezcle los componentes (mediante pipeteo ascendente y descendente repetido o mediante agitación vorticial de pulsos) y centrifugue brevemente.
- Trabaje con rapidez y mantenga los componentes en hielo o en el bloque de refrigeración (bloque de carga de 72/96 pocillos).

* Asegúrese de que los instrumentos hayan sido verificados y calibrados siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Almacenamiento y manipulación de los reactivos

Los componentes del kit *artus* EBV RG PCR deben almacenarse a una temperatura de -15 °C a -30 °C y son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Deben evitarse los ciclos repetidos de descongelación y congelación (> 2), ya que pueden reducir la sensibilidad del ensayo. Si se piensa utilizar los reactivos de forma intermitente, deberán congelarse en fracciones alícuotas. La conservación a $2-8\text{ °C}$ no debe superar un período de cinco horas.

Procedimiento

Aislamiento del ADN

Los kits de QIAGEN mostrados en la tabla 1 están validados para la purificación de ADN viral a partir de los tipos de muestras humanas indicados para su utilización con el kit *artus* EBV RG PCR. Realice la purificación de ADN viral conforme a las instrucciones descritas en los manuales de los kits.

Tabla 1. Kits de purificación validados para su utilización con el kit *artus* EBV RG PCR

Material de muestra	Tamaño de la muestra	Kit de aislamiento de ácidos nucleicos	Número de referencia (QIAGEN)	ARN transportador
Suero, plasma, LCR	200 μ l	QIAamp [®] DNA Mini Kit (50)	51304	No incluido
Suero, plasma	1 ml	QIAamp UltraSens [®] Virus Kit (50)	53704	Incluido
Células sanguíneas	200 μ l	QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	51104	No incluido
Plasma	400 μ l	EZ1 [®] DSP Virus Kit (48)*	62724	Incluido

* El kit EZ1 DSP Virus también está disponible como kits EASYartus[®] EBV RG PCR con el marcado CE-IVD, en combinación con el kit *artus* EBV RG PCR (consulte la página 32 para ver la información sobre pedidos).

Nota: Los tubos de recogida de sangre revestidos con anticoagulantes pueden inhibir la PCR. Sin embargo, estos inhibidores se eliminarán con el uso de los kits de aislamiento anteriormente indicados. Recomendamos evitar el uso de sangre heparinizada.

Nota: El kit *artus* EBV RG PCR no debe utilizarse con métodos de aislamiento basados en el fenol.

Uso del kit QIAamp DNA Blood Mini o del kit QIAamp DNA Mini

Nota: La utilización de ARN transportador es esencial para la eficiencia de la extracción y, por consiguiente, para el rendimiento en la obtención de

ADN/ARN. Debe tenerse en cuenta que se recomienda enérgicamente la adición del transportador (RNA Homopolymer Poly[rA], no incluido en el kit QIAamp DNA Blood Mini ni en el kit QIAamp DNA Mini) para la extracción de ácidos nucleicos a partir de líquidos corporales acelulares y de material con pequeñas cantidades de ADN y ARN (p. ej., LCR). En estos casos, prepare el ARN transportador tal como se indica a continuación.

- Ponga en suspensión de nuevo el ARN transportador liofilizado (RNA Homopolymer Poly[rA], no incluido en el kit QIAamp DNA Blood Mini ni en el kit QIAamp DNA Mini) utilizando el tampón de elución (no utilice tampón de lisis) del kit de extracción (tampón AE del kit QIAamp DNA Mini y del kit QIAamp DNA Blood Mini), y prepare una dilución con una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Divida esta solución de ARN transportador en un número de fracciones alícuotas suficiente para sus necesidades y almacénelas a una temperatura de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Evite la descongelación repetida (> 2 veces) de una fracción alícuota de ARN transportador.
- Utilice 1 μg de ARN transportador por 100 μl de tampón de lisis. Por ejemplo, si el protocolo de extracción utiliza 200 μl de tampón de lisis, añada 2 μl de ARN transportador (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) directamente al tampón de lisis (tampón AL del kit QIAamp DNA Mini y del kit QIAamp DNA Blood Mini). Antes de comenzar cada extracción, debe prepararse una mezcla de tampón de lisis y ARN transportador (y de control interno, cuando proceda; consulte el apartado "Control interno" en la página 13) en fresco conforme al esquema de pipeteo mostrado en la tabla 2.

Tabla 2. Esquema de pipeteo para utilizar con el kit QIAamp DNA Blood Mini o con el kit QIAamp DNA Mini

Número de muestras	1	12
Tampón AL (tampón de lisis)*	p. ej., 200 μl	p. ej., 2.400 μl
ARN transportador (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	2 μl	24 μl
Volumen total	202 μl	2424 μl
Volumen por extracción	200 μl	200 μl (cada una)

* Contiene clorhidrato de guanidina; consulte el manual de uso del kit para ver la información sobre seguridad.

Nota: Utilice la mezcla preparada en fresco de tampón de lisis y ARN transportador inmediatamente para la extracción. No se puede almacenar la mezcla.

Nota: El control interno del kit *artus* EBV RG PCR puede utilizarse directamente en el procedimiento de aislamiento (consulte el apartado “Control interno” en la página 13).

Nota: Recomendamos enérgicamente realizar el paso 10 de centrifugación recomendado del protocolo (manual de uso de QIAamp DNA Mini and Blood Mini [QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook], tercera edición, abril de 2010, páginas 29 y 32) para eliminar el etanol residual. Recomendamos aumentar el tiempo de esta centrifugación a 3 minutos.

Recomendamos eluir el ADN en 50 μ l de tampón de elución para obtener la máxima sensibilidad del kit *artus* EBV RG PCR.

Uso del kit QIAamp UltraSens Virus

Nota: La utilización de ARN transportador es esencial para la eficiencia de la extracción y, por consiguiente, para el rendimiento en la obtención de ADN/ARN. Para aumentar la estabilidad del ARN transportador proporcionado con el kit QIAamp UltraSens Virus, recomendamos el siguiente procedimiento, diferente de las instrucciones descritas en el manual de uso del kit.

- Antes de la primera utilización del kit, ponga en suspensión de nuevo el ARN transportador liofilizado en 310 μ l del tampón de elución (tampón AVE) proporcionado con el kit (concentración final de 1 μ g/ μ l, no utilice tampón de lisis). Divida esta solución de ARN transportador en un número de fracciones alícuotas suficiente para sus necesidades y almacénelas a una temperatura de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Evite la descongelación repetida (> 2 veces) de una fracción alícuota de ARN transportador.
- Antes de comenzar cada extracción, debe prepararse una mezcla de tampón de lisis y ARN transportador (y de control interno, cuando proceda; consulte el apartado “Control interno” en la página 13) en fresco conforme al esquema de pipeteo mostrado en la tabla 3.

Tabla 3. Esquema de pipeteo para utilizar con el kit QIAamp UltraSens Virus

Número de muestras	1	12
Tampón AC (tampón de lisis)*	800 μ l	9600 μ l
ARN transportador (1 μ g/ μ l)	5,6 μ l	67,2 μ l
Volumen total	805,6 μl	9667,2 μl
Volumen por extracción	800 μl	800 μl (cada una)

* Contiene isopropanol; consulte el manual de uso del kit para ver la información sobre seguridad.

Nota: Utilice la mezcla preparada en fresco de tampón de lisis y ARN transportador inmediatamente para la extracción. No se puede almacenar la mezcla.

Nota: El control interno del kit *artus* EBV RG PCR puede utilizarse directamente en el procedimiento de aislamiento (consulte el apartado “Control interno” en la página 13).

Nota: Recomendamos enérgicamente realizar la centrifugación adicional descrita en el paso 14 del protocolo (manual de uso de QIAamp UltraSens Virus [QIAamp UltraSens Virus Handbook], abril de 2010, página 17) para eliminar el etanol residual. Recomendamos aumentar el tiempo de esta centrifugación a 3 minutos.

Recomendamos eluir el ADN en 50 μ l de tampón de elución para obtener la máxima sensibilidad del kit *artus* EBV RG PCR.

El kit QIAamp UltraSens Virus permite una concentración de la muestra. Si utiliza material de muestra distinto de suero o plasma, añada al menos un 50% (v/v) de plasma humano negativo a la muestra.

Uso del kit EZ1 DSP Virus

Nota: La utilización de ARN transportador es esencial para la eficiencia de la extracción y, por consiguiente, para el rendimiento en la obtención de ADN/ARN. Añada la cantidad apropiada de ARN transportador a cada extracción conforme a las instrucciones descritas en el manual de uso del kit EZ1 DSP Virus (*EZ1 DSP Virus Kit Handbook*).

Nota: El control interno del kit *artus* EBV RG PCR puede utilizarse directamente en el procedimiento de aislamiento (consulte el apartado “Control interno”, más adelante).

Nota: Recomendamos enérgicamente utilizar los ácidos nucleicos virales purificados para la PCR justo después de la extracción utilizando el kit EZ1 DSP Virus. De forma alternativa, los eluidos pueden almacenarse durante un máximo de 3 días a 4 °C antes del análisis de PCR.

Control interno

Se suministra un control interno (EBV RG IC). Esto permite al usuario controlar el procedimiento de aislamiento del ADN y comprobar una posible inhibición de la PCR. Si se utiliza el kit EZ1 DSP Virus para la extracción, debe añadirse el control interno conforme a las instrucciones descritas en el manual de uso del kit EZ1 DSP Virus (*EZ1 DSP Virus Kit Handbook*). Si se utiliza el kit QIAamp UltraSens Virus, el kit QIAamp DNA Blood Mini o el kit QIAamp DNA Mini, añada el control interno durante el aislamiento en una razón de 0,1 μ l por 1 μ l

de volumen de elución. Por ejemplo, si se usa el kit QIAamp UltraSens Virus, el ADN se eluye en 50 μ l de tampón AVE. Por lo tanto, deben añadirse inicialmente 5 μ l del control interno. La cantidad de control interno utilizada depende únicamente del volumen de elución.

Nota: El control interno y el ARN transportador (consulte el apartado “Aislamiento del ADN” en la página 10) deben añadirse únicamente a la mezcla del tampón de lisis y el material de muestra o directamente al tampón de lisis.

El control interno no debe añadirse directamente al material de muestra. Si se añade al tampón de lisis, tenga en cuenta que la mezcla de control interno y tampón de lisis-ARN transportador debe prepararse en fresco y usarse inmediatamente (el almacenamiento de la mezcla a temperatura ambiente o en el frigorífico durante solamente unas horas puede causar el fallo del control interno y una reducción de la eficiencia de la extracción).

Nota: No añada el control interno ni el ARN transportador directamente al material de muestra.

El control interno también puede utilizarse exclusivamente para comprobar una posible inhibición de la PCR. Para esta aplicación, añada el control interno directamente a la mezcla maestra EBV RG Master, tal como se describe en el paso 2b del protocolo (página 16).

Protocolo: PCR y análisis de los datos

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Dedique tiempo suficiente a familiarizarse con el instrumento Rotor-Gene Q antes de iniciar el protocolo. Consulte el manual del usuario del instrumento.
- Asegúrese de que se incluya al menos un estándar de cuantificación y un control negativo (agua de calidad para PCR) para cada serie de PCR. Para generar una curva de estándares, utilice los 4 estándares de cuantificación suministrados (EBV RG QS 1-4) para cada serie de PCR.

Lo que hay que hacer antes de comenzar

- Asegúrese de que se ha preenfriado el bloque de refrigeración (accesorio del instrumento Rotor-Gene Q) a 2-8 °C.
- Antes de cada uso, todos los reactivos deben ser descongelados completamente, mezclados (mediante pipeteo ascendente y descendente repetido o mediante agitación vorticial rápida) y centrifugados brevemente.

Procedimiento

- 1. Coloque el número deseado de tubos de PCR en los adaptadores del bloque de refrigeración.**
- 2. Si va a utilizar el control interno para supervisar el procedimiento de aislamiento del ADN y comprobar una posible inhibición de la PCR, siga el paso 2a. Si va a utilizar el control interno exclusivamente para comprobar una posible inhibición de la PCR, siga el paso 2b.**
- 2a. El control interno ya se ha añadido a la etapa de aislamiento (consulte el apartado "Control interno" en la página 13). En este caso, prepare una mezcla maestra según se indica en la tabla 4.**

La mezcla de reacción contiene generalmente todos los componentes necesarios para la PCR excepto la muestra.

Tabla 4. Preparación de la mezcla maestra (control interno utilizado para supervisar el aislamiento del ADN y comprobar una posible inhibición de la PCR).

Número de muestras	1	12
EBV RG Master	30 μ l	360 μ l
EBV RG IC	0 μ l	0 μ l
Volumen total	30 μl	360 μl

- 2b. El control interno debe añadirse directamente a la mezcla de EBV RG Master. En este caso, prepare una mezcla maestra según se indica en la tabla 5.**

La mezcla de reacción contiene generalmente todos los componentes necesarios para la PCR excepto la muestra.

Tabla 5. Preparación de la mezcla maestra (control interno utilizado exclusivamente para comprobar una posible inhibición de la PCR).

Número de muestras	1	12
EBV RG Master	30 μ l	360 μ l
EBV RG IC	2 μ l	24 μ l
Volumen total	32 μl*	384 μl*

* El aumento de volumen causado por la adición del control interno se ignora al preparar el ensayo de PCR. La sensibilidad del sistema de detección no se ve afectada.

- 3. Pipetee 30 μ l de la mezcla maestra en cada tubo de PCR. A continuación, añada 20 μ l del ADN eluido de la muestra (consulte la tabla 6). En correspondencia, deben usarse 20 μ l de al menos uno de los estándares de cuantificación (EBV RG QS 1-4) como control positivo y 20 μ l de agua (agua de calidad para PCR) como control negativo.**

Tabla 6. Preparación del ensayo de PCR

Número de muestras	1	12
Mezcla maestra	30 μ l	30 μ l (cada una)
Muestra	20 μ l	20 μ l (cada una)
Volumen total	50 μl	50 μl (cada una)

- Cierre los tubos de PCR. Asegúrese de que el anillo de bloqueo (accesorio del instrumento Rotor-Gene) está colocado en la parte superior del rotor para prevenir la apertura accidental de los tubos durante el procesamiento.**
- Para la detección de ADN del EBV, cree un perfil de temperatura siguiendo los pasos que se indican a continuación.**

Configuración de los parámetros generales del ensayo	Figuras 1, 2, 3
Activación inicial de la enzima <i>hot-start</i> (arranque en caliente)	Figura 4
Amplificación del ADN (PCR con temperatura decreciente [<i>touchdown</i>])	Figura 5
Ajuste de la sensibilidad de los canales de fluorescencia	Figura 6
Inicio de la serie	Figura 7

Todas las especificaciones hacen referencia al software Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q, versión 1.7.94, al software Rotor-Gene 6000, versiones 1.7.65, 1.7.87 o 1.7.94, y al software Rotor-Gene 3000, versión 6.0.23. Puede encontrar más información acerca de la programación de los instrumentos Rotor-Gene en el manual del usuario del instrumento. En las ilustraciones, estos valores de configuración aparecen recuadrados en negrita. Se incluyen ilustraciones para los instrumentos Rotor-Gene Q. En caso de que se requieran valores diferentes para el instrumento Rotor-Gene 3000, estas diferencias se describen en el texto.

- En primer lugar, abra el cuadro de diálogo “New Run Wizard” (Asistente para nueva serie) (figura 1). Marque la casilla “Locking**

Ring Attached” (Anillo de bloqueo acoplado) y haga clic en “Next” (Siguiete).

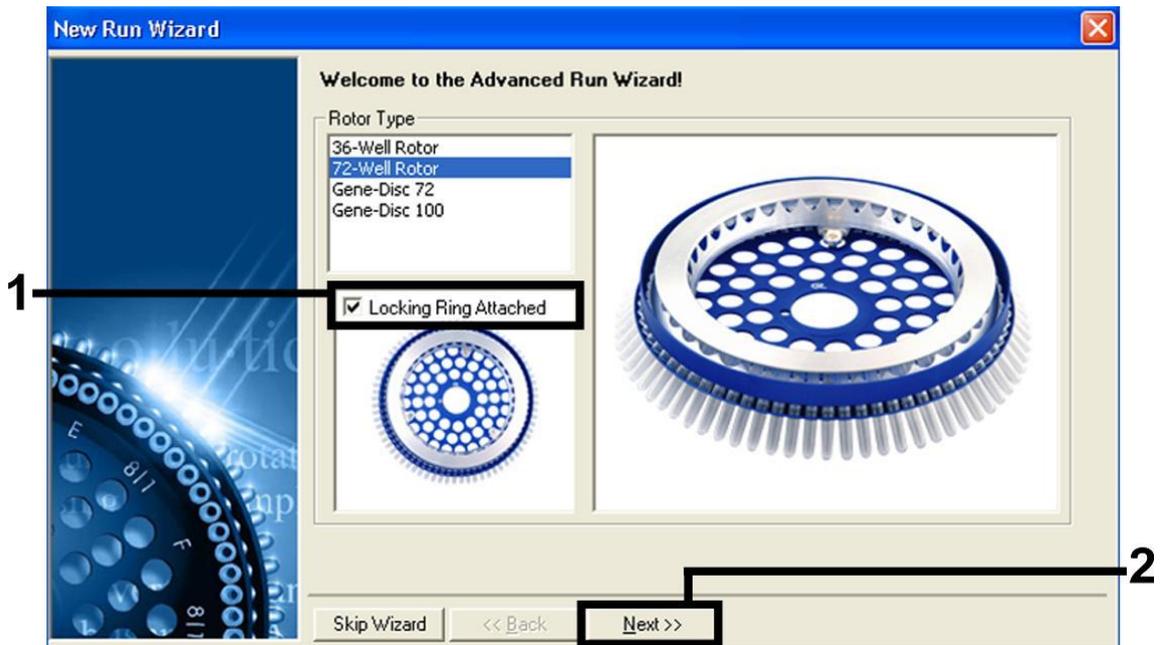


Figura 1. Cuadro de diálogo “New Run Wizard”.

7. Seleccione 50 en el campo “Reaction Volume (μL):” (Volumen de reacción [μL]) y haga clic en “Next” (figura 2).

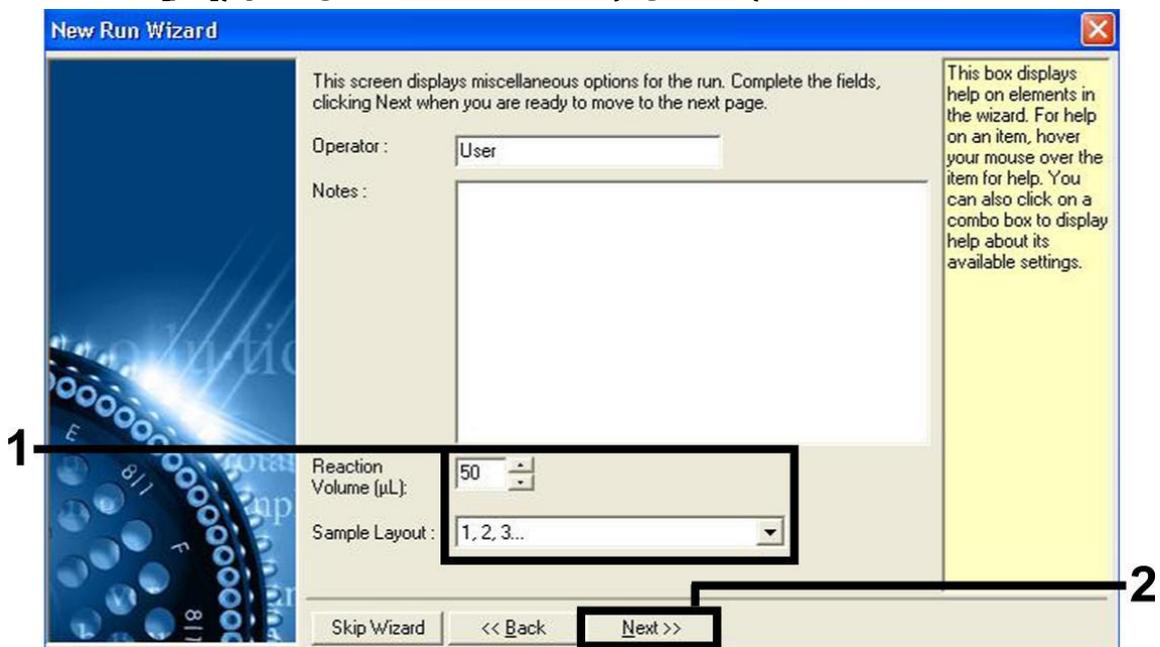


Figura 2. Configuración de los parámetros generales del ensayo.

- Haga clic en el botón "Edit Profile" (Editar perfil) en el siguiente cuadro de diálogo "New Run Wizard" (figura 3) y programe el perfil de temperatura tal como se muestra en las figuras 3-5.

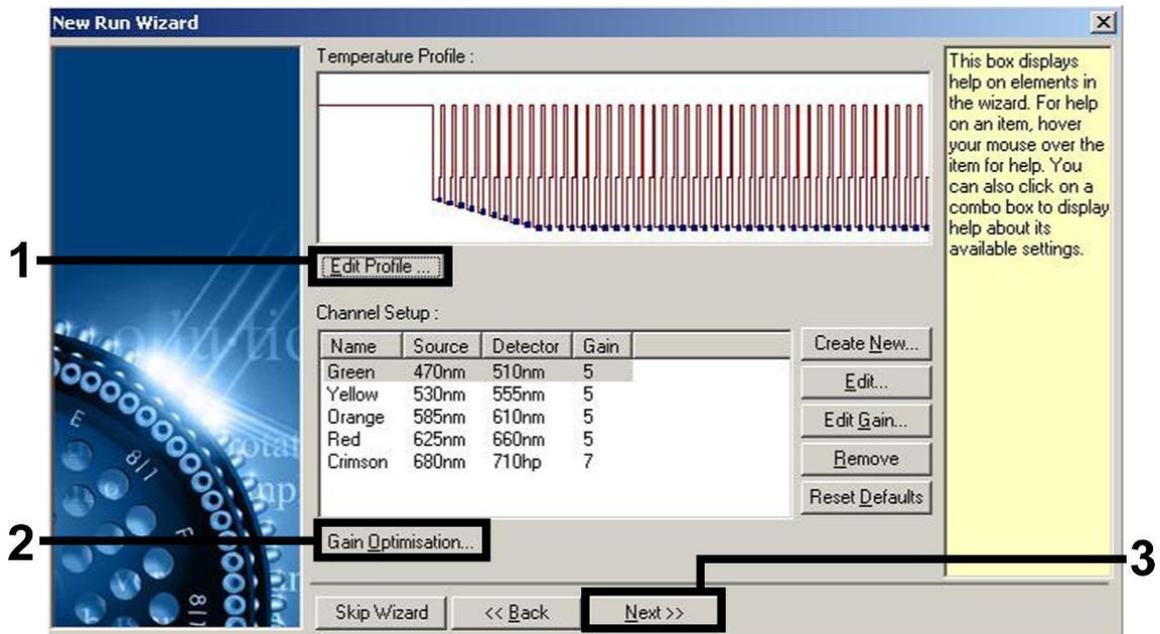


Figura 3. Edición del perfil.

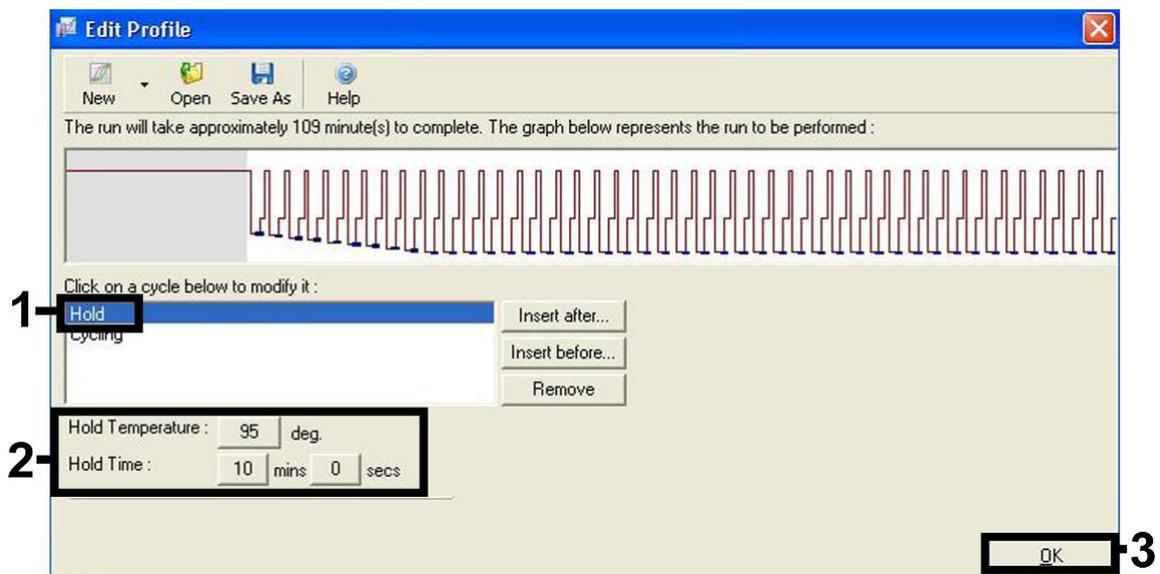


Figura 4. Activación inicial de la enzima *hot-start*.

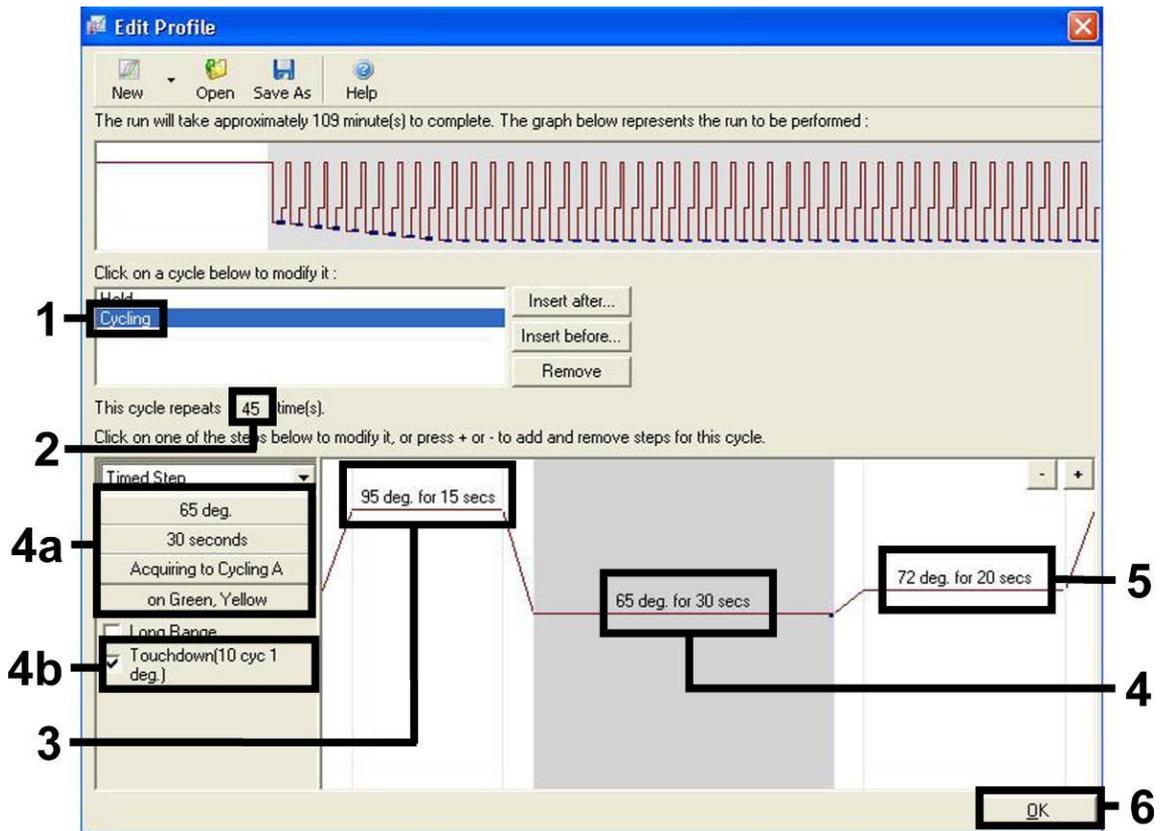


Figura 5. Amplificación del ADN. Asegúrese de activar la función “touchdown” (temperatura decreciente) durante 10 ciclos en el paso de apareamiento. Tenga en cuenta que, en el instrumento Rotor-Gene 3000, el software definirá los colorantes fluorescentes como “FAM/Sybr, JOE”.

9. El intervalo de detección de los canales de fluorescencia debe determinarse según las intensidades de fluorescencia de los tubos de PCR. Haga clic en "Gain Optimisation" (Optimización de ganancia) en el cuadro de diálogo "New Run Wizard" (consulte la figura 3) para abrir el cuadro de diálogo "Auto-Gain Optimisation Setup" (Configuración de la optimización de ganancia automática). Configure la temperatura de calibración en 65 para que coincida con la temperatura de apareamiento del programa de amplificación (figura 6).

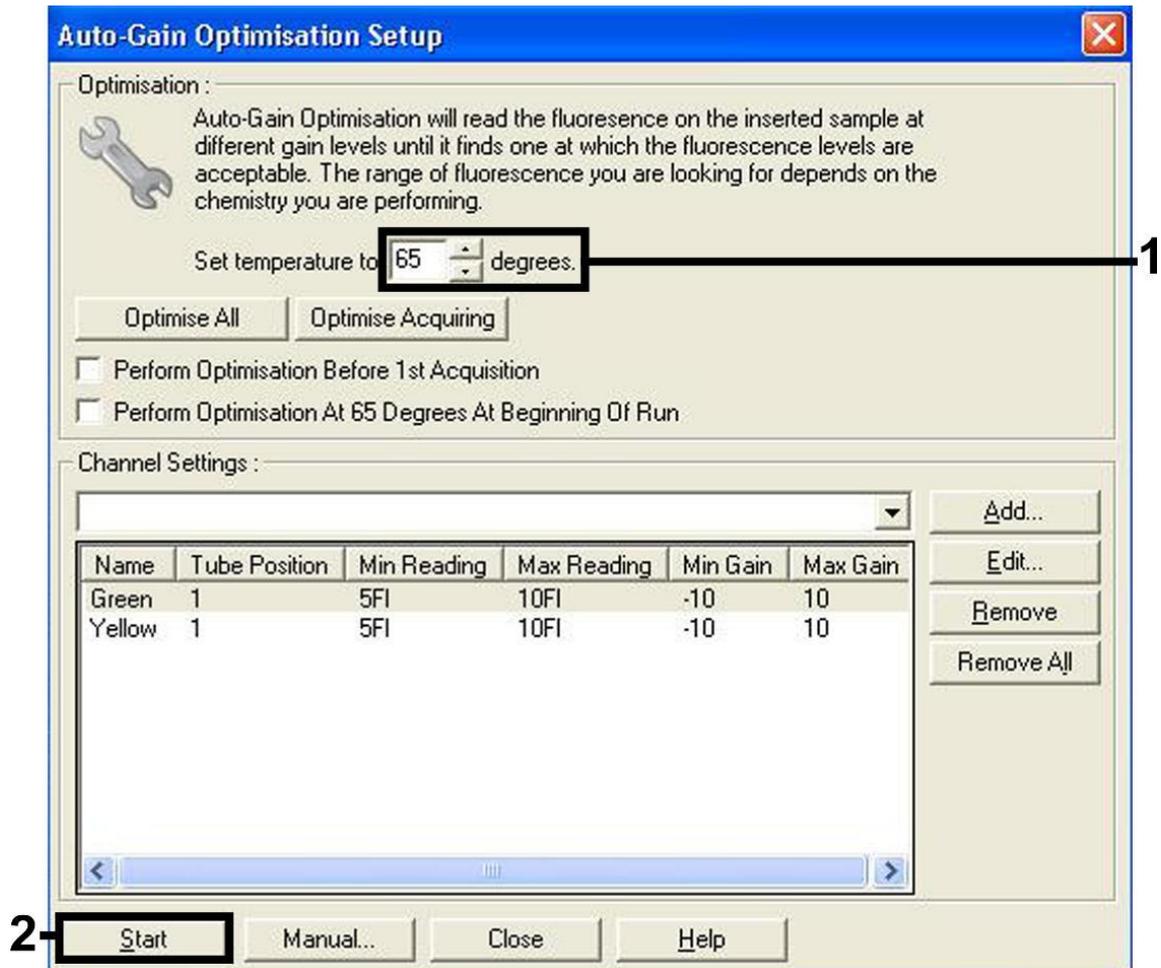


Figura 6. Ajuste de la sensibilidad de los canales de fluorescencia. Tenga en cuenta que, en el instrumento Rotor-Gene 3000, el software definirá los colorantes fluorescentes como "FAM/Sybr" y "JOE".

10. Los valores de ganancia determinados por la calibración de los canales se guardan automáticamente y se muestran en la última ventana de menú del procedimiento de programación (figura 7). Haga clic en “Start Run” (Iniciar serie).

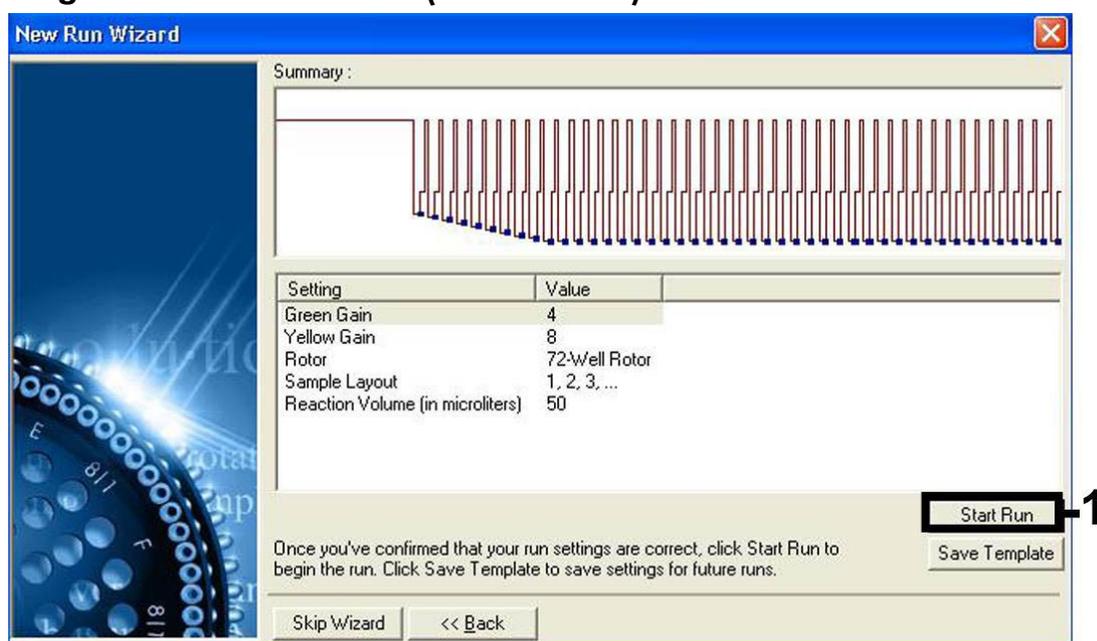


Figura 7. Inicio de la serie. Tenga en cuenta que, en el instrumento Rotor-Gene 3000, el software definirá los colorantes fluorescentes como “FAM/Sybr” y “JOE”.

Interpretación de los resultados

Cuantificación

Los estándares de cuantificación (EBV RG QS 1-4) incluidos se tratan como muestras previamente purificadas y se utiliza el mismo volumen (20 μ l). Para generar una curva de estándares con los instrumentos Rotor-Gene Q, los 4 estándares de cuantificación deben utilizarse y definirse en el cuadro de diálogo “Edit Samples” (Editar muestras) como estándares con las concentraciones especificadas (consulte el manual del usuario del instrumento).

Nota: Los estándares de cuantificación se definen como copias/ μ l. Se debe aplicar la siguiente ecuación para convertir los valores determinados utilizando la curva de estándares en copias/ml de material de muestra:

$$\text{Resultado (copias/ml)} = \frac{\text{Resultado (copias/\mu l)} \times \text{Volumen de elución (\mu l)}}{\text{Volumen de muestra (ml)}}$$

Como norma, debe introducirse en la ecuación anterior el volumen de muestra inicial. Esto debe tenerse en cuenta cuando se ha cambiado el volumen de muestra antes de la extracción de ácidos nucleicos (p. ej., reduciendo el

volumen mediante centrifugación o aumentando el volumen mediante adición hasta el volumen necesario para el aislamiento).

Resultados

En las figuras 8 y 9 se presentan ejemplos de reacciones de PCR positivas y negativas.

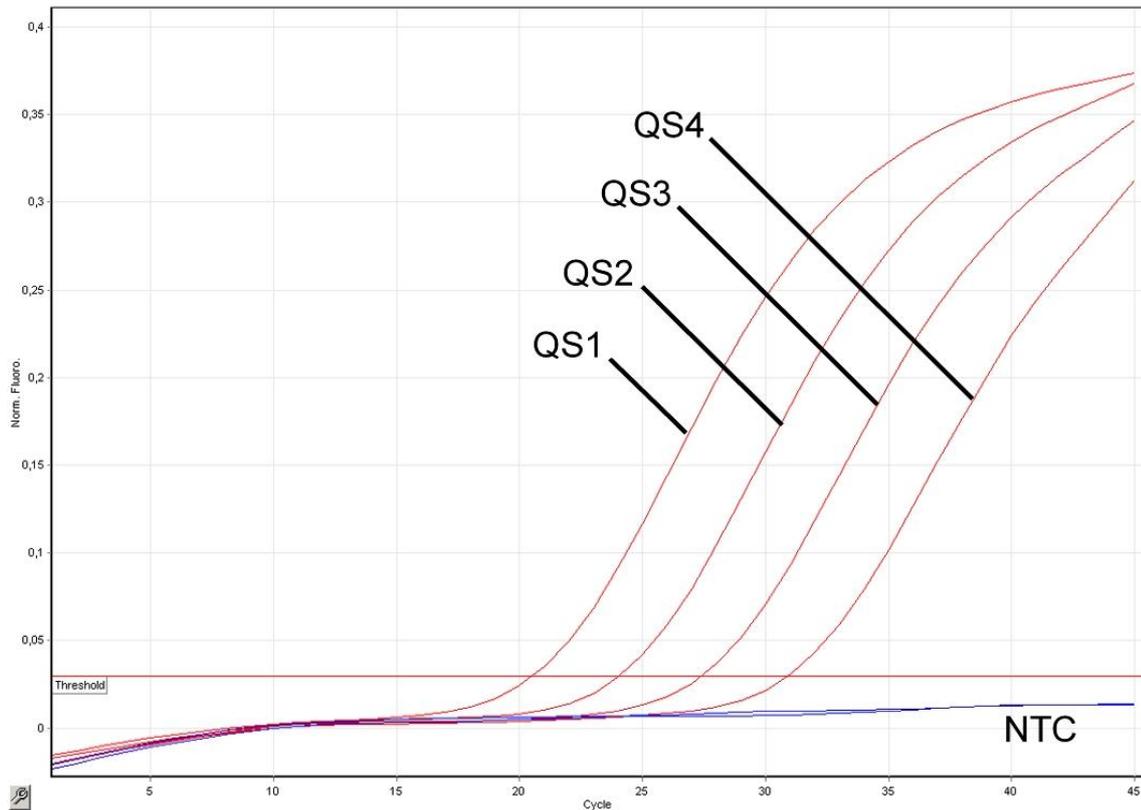


Figura 8. Detección de los estándares de cuantificación (EBV RG QS 1-4) en el canal de fluorescencia Cycling Green. NTC: control sin molde (control negativo).

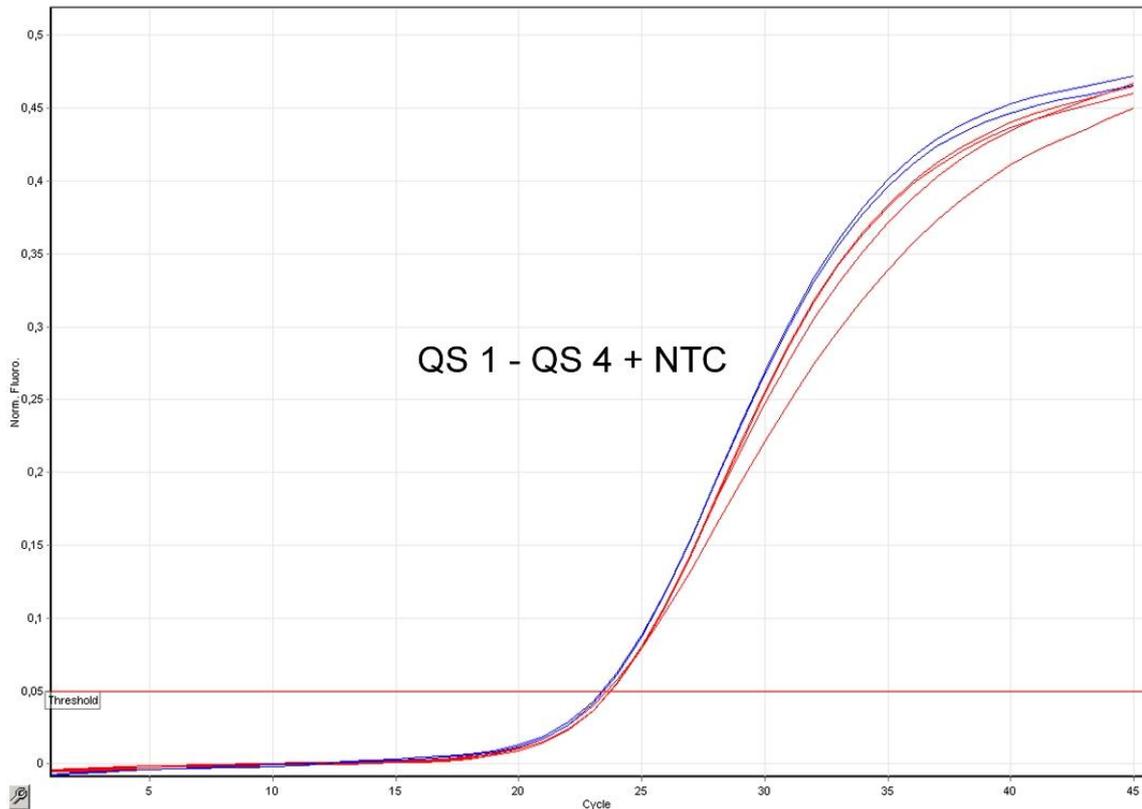


Figura 9. Detección del control interno (IC) en el canal de fluorescencia Cycling Yellow con amplificación simultánea de los estándares de cuantificación (EBV RG QS 1-4). NTC: control sin molde (control negativo).

Se detecta una señal en el canal de fluorescencia Cycling Green. El resultado del análisis es positivo: la muestra contiene ADN del VEB.

En este caso, la detección de una señal en el canal Cycling Yellow no es imprescindible, ya que las concentraciones altas iniciales de ADN del VEB (señal positiva en el canal Cycling Green) pueden dar lugar a una reducción o a la ausencia de señal de fluorescencia del control interno en el canal Cycling Yellow (competición).

Nota: En el instrumento Rotor-Gene 3000, los canales relevantes son Cycling A.FAM para la señal positiva y Cycling A.JOE para el control interno.

No se detecta una señal en el canal de fluorescencia Cycling Green. Al mismo tiempo, aparece una señal procedente del control interno en el canal Cycling Yellow.

La muestra no contiene ADN del VEB detectable. Puede considerarse negativa.

En el caso de una PCR negativa del VEB, la señal detectada del control interno descarta la posibilidad de una inhibición de la PCR.

Nota: En el instrumento Rotor-Gene 3000, los canales relevantes son Cycling A.JOE para el control interno y ausencia de señal para Cycling A.FAM.

No se detecta una señal en los canales Cycling Green o Cycling Yellow. No puede determinarse un resultado.

Puede encontrar información acerca de las fuentes de error y su solución en el apartado “Guía para la resolución de problemas” en la página 25.

Nota: En el instrumento Rotor-Gene 3000, los canales relevantes son Cycling A.FAM y Cycling A.JOE.

Guía para la resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas le será de utilidad para resolver los problemas que puedan surgir. Para obtener más información, consulte también la página de preguntas frecuentes de nuestro Centro de Asistencia Técnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Los científicos del servicio técnico de QIAGEN estarán siempre encantados de responder a cualquier pregunta que tenga sobre la información y los protocolos de este manual, así como sobre las tecnologías para el tratamiento de muestras y ensayos de biología molecular (encontrará la información de contacto en la contracubierta o en www.qiagen.com).

Comentarios y sugerencias

Ausencia de señal con controles positivos (EBV RG QS 1-4) en el canal de fluorescencia Cycling Green o Cycling A.FAM

- | | |
|---|---|
| a) El canal de fluorescencia seleccionado para el análisis de los datos de PCR no cumple el protocolo | Para el análisis de los datos, seleccione el canal de fluorescencia Cycling Green o Cycling A.FAM para la PCR analítica del VEB y el canal de fluorescencia Cycling Yellow o Cycling A.JOE para la PCR del control interno. |
| b) Programación incorrecta del perfil de temperatura del instrumento Rotor-Gene | Compare el perfil de temperatura con el protocolo. Consulte el apartado “Protocolo: PCR y análisis de los datos” en la página 15. |
| c) Configuración incorrecta de la PCR | Compruebe los pasos de trabajo por medio del esquema de pipeteo y repita la PCR en caso necesario. Consulte el apartado “Protocolo: PCR y análisis de los datos” en la página 15. |

Comentarios y sugerencias

- d) Las condiciones de almacenamiento de uno o más componentes del kit no cumplan las instrucciones indicadas en el apartado "Almacenamiento y manipulación de los reactivos" (página 9) Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad (consulte la etiqueta del kit) de los reactivos y utilice un kit nuevo en caso necesario.
- e) El kit *artus* EBV RG PCR ha caducado Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad (consulte la etiqueta del kit) de los reactivos y utilice un kit nuevo en caso necesario.

Señal débil o ausente del control interno en el canal de fluorescencia Cycling Yellow o Cycling A.JOE y ausencia simultánea de una señal en el canal Cycling Green o Cycling A.FAM:

- a) Las condiciones de la PCR no cumplen el protocolo Compruebe las condiciones de la PCR (véase anteriormente) y repita la PCR con los valores de configuración corregidos en caso necesario.
- b) Se produjo la inhibición de la PCR Asegúrese de que está utilizando el método de aislamiento recomendado y siga exactamente las instrucciones del fabricante.

Cuando utilice el kit QIAamp DNA Mini, el kit QIAamp DNA Blood Mini o el kit QIAamp UltraSens Virus, asegúrese de que, durante el aislamiento de ADN, el paso de centrifugación adicional recomendado se ha realizado antes de la elución para eliminar el etanol residual (consulte el apartado "Aislamiento del ADN" en las páginas 10 y 12).
- c) Se perdió ADN durante la extracción Si se ha añadido el control interno a la extracción, la ausencia de una señal del control interno puede indicar la pérdida de ADN durante la extracción. Asegúrese de que está utilizando el método de aislamiento recomendado (consulte el apartado "Aislamiento del ADN" en la página 10) y siga exactamente las instrucciones del fabricante.

Comentarios y sugerencias

- d) Las condiciones de almacenamiento de uno o más componentes del kit no cumplían las instrucciones indicadas en el apartado "Almacenamiento y manipulación de los reactivos" (página 9) Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad (consulte la etiqueta del kit) de los reactivos y utilice un kit nuevo en caso necesario.
- e) El kit *artus* EBV RG PCR ha caducado Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad (consulte la etiqueta del kit) de los reactivos y utilice un kit nuevo en caso necesario.

Señales con los controles negativos en el canal de fluorescencia Cycling Green o Cycling A.FAM de la PCR analítica

- a) Se produjo contaminación durante la preparación de la PCR
- Repita la PCR con nuevos reactivos en duplicados.
- Si es posible, cierre los tubos de PCR inmediatamente después de añadir la muestra que se desea analizar.
- Asegúrese de pipetear en último lugar los controles positivos.
- Asegúrese de descontaminar el espacio de trabajo y los instrumentos a intervalos regulares.
- b) Se produjo contaminación durante la extracción
- Repita la extracción y la PCR de la muestra que se desea analizar utilizando nuevos reactivos.
- Asegúrese de descontaminar el espacio de trabajo y los instrumentos a intervalos regulares.

Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote del kit *artus* EBV RG PCR se analiza en relación con las especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad de los productos.

Limitaciones

Todos los reactivos pueden utilizarse exclusivamente para diagnóstico *in vitro*.

Este producto debe ser utilizado exclusivamente por personal con formación y preparación específicas en los procedimientos de diagnóstico *in vitro*.

Para obtener resultados óptimos con la PCR es necesario un cumplimiento estricto del manual del usuario.

Debe prestarse atención a las fechas de caducidad impresas en la caja y en las etiquetas de todos los componentes. No utilice componentes caducados.

Aunque poco frecuentes, las mutaciones en las regiones altamente conservadas del genoma viral cubiertas por los *primers* y/o por la sonda del kit pueden producir en estos casos una subcuantificación o un fallo de la detección de la presencia del virus. La validez y el rendimiento del diseño del ensayo se revisan a intervalos regulares.

Características del rendimiento

Sensibilidad analítica

Para determinar la sensibilidad analítica del kit *artus* EBV RG PCR, se realizaron diluciones seriadas desde 31,6 hasta 0,01 y desde 100 hasta un valor nominal de 0,03 equivalentes de copias del VEB/ μ l y se analizaron en los instrumentos Rotor-Gene 6000 y Rotor-Gene 3000, respectivamente, en combinación con el kit *artus* EBV RG PCR. El ensayo se realizó en tres días diferentes por octuplicado. Los resultados se determinaron mediante un análisis probit. En la figura 10 se muestra una representación gráfica del análisis probit en el instrumento Rotor-Gene 6000. El límite de detección analítica del kit *artus* EBV RG PCR en combinación con los instrumentos Rotor-Gene Q MDx/Q/6000 y Rotor-Gene 3000 es 1,02 copias/ μ l ($p = 0,05$) y 3,8 copias/ μ l ($p = 0,05$), respectivamente. Esto significa que existe una probabilidad del 95% de que se detecten 1,02 copias/ μ l o 3,8 copias/ μ l.

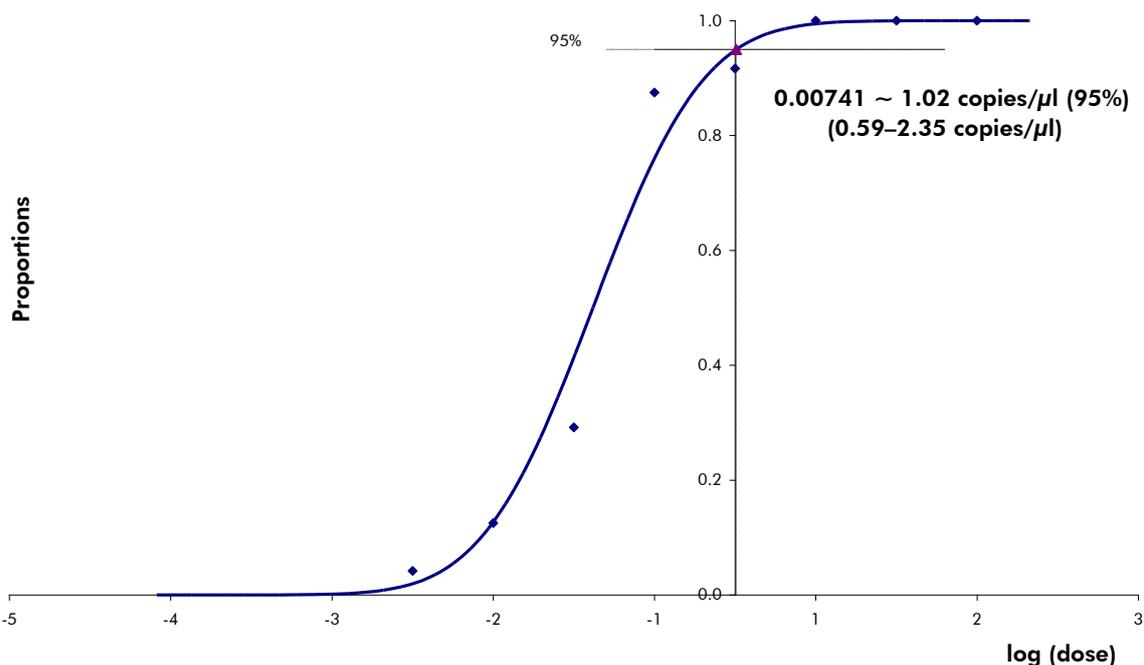


Figura 10. Análisis probit: VEB (Rotor-Gene 6000). Sensibilidad analítica del kit *artus* EBV RG PCR en el instrumento Rotor-Gene 6000.

Especificidad

La especificidad del kit *artus* EBV RG PCR se asegura ante todo mediante la selección de los *primers* y de las sondas, así como mediante la selección de condiciones estrictas para la reacción. Los *primers* y las sondas se comprobaron con respecto a posibles homologías con todas las secuencias publicadas en los bancos de genes por medio de un análisis de comparación de secuencias. De este modo se ha asegurado la detección de todos los genotipos relevantes.

La especificidad se evaluó además con 6 muestras de suero negativas para el VEB diferentes. Estas no generaron ninguna señal con los *primers* y las sondas específicos del VEB, incluidos en la mezcla maestra EBV RG Master.

Se analizó una posible reactividad cruzada del kit *artus* EBV RG PCR mediante el grupo de control indicado en la tabla 7. Ninguno de los patógenos analizados mostró reactividad.

Tabla 7. Análisis de la especificidad del kit con patógenos con posible reactividad cruzada.

Grupo de control	VEB (Cycling Green o Cycling A.FAM)	Control interno (Cycling Yellow o Cycling A.JOE)
Virus del herpes humano 1 (virus del herpes simple 1)	-	+
Virus del herpes humano 2 (virus del herpes simple 2)	-	+
Virus del herpes humano 3 (virus de la varicela-zóster)	-	+
Virus del herpes humano 5 (citomegalovirus)	-	+
Virus de la leucemia de células T humana tipo 1	-	+
Virus de la leucemia de células T humana tipo 2	-	+

Reproducibilidad

Los datos de reproducibilidad permiten evaluar de forma regular el rendimiento del kit *artus* EBV RG PCR y comparar su eficiencia con la de otros productos. Estos datos se obtienen por medio de la participación en programas de competencia establecidos.

Referencias citadas

QIAGEN mantiene una amplia y actualizada base de datos online de publicaciones científicas en las que se utilizan los productos de QIAGEN. Las exhaustivas opciones de búsqueda permiten al usuario encontrar los artículos que necesita, ya sea mediante una búsqueda sencilla de una palabra clave o especificando la aplicación, el área de investigación, el título, etc.

Para obtener una lista bibliográfica completa, visite la base de datos bibliográfica online de QIAGEN en www.qiagen.com/RefDB/search.asp o póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN o con su distribuidor local.

Símbolos



Contiene reactivos suficientes para <n> ensayos



Fecha de caducidad



Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*



Número de referencia



Número de lote



Número de material



Componentes



Contiene



Número



Número mundial de artículo comercial (*Global Trade Item Number*)



Limitación de temperatura



Fabricante



Consultar instrucciones de uso

Información de contacto

Para recibir asistencia técnica y solicitar más información, consulte nuestro Centro de asistencia técnica en www.qiagen.com/Support o póngase en contacto con uno de los departamentos de servicio técnico de QIAGEN o distribuidores locales (consulte la contracubierta o visite www.qiagen.com).

Información para pedidos

Producto	Contenido	N.º ref.
<i>artus</i> EBV RG PCR Kit (24)	Para 24 reacciones: mezcla maestra, 4 estándares de cuantificación, control interno, agua (de calidad para PCR)	4501263
<i>artus</i> EBV RG PCR Kit (96)	Para 96 reacciones: mezcla maestra, 4 estándares de cuantificación, control interno, agua (de calidad para PCR)	4501265
Kits EASYartus EBV RG PCR: para la purificación de muestras y la detección de patógenos integradas y automatizadas con plena conformidad con los criterios de marcado CE-IVD		
EASYartus EBV RG PCR Kit 1	Para 48 preparaciones de ácidos nucleicos virales y 24 ensayos: 1 x EZ1 DSP Virus Kit, 1 x <i>artus</i> EBV RG PCR Kit (24)	EA10123
EASYartus EBV RG PCR Kit 2	Para 48 preparaciones de ácidos nucleicos virales y 48 ensayos: 1 x EZ1 DSP Virus Kit, 2 x <i>artus</i> EBV RG PCR Kit (24)	EA10124
Kit EZ1 DSP Virus: para la purificación automatizada simultánea de ADN y ARN virales a partir de 1-14 muestras de plasma, suero o LCR		
EZ1 DSP Virus Kit (48)	Para 48 preparaciones de ácidos nucleicos virales: cartuchos de reactivos precargados, soportes de puntas desechables, puntas con filtro desechables, tubos de muestras, tubos de elución, tampones, ARN transportador	62724
Kit QIAamp DNA Mini: para la purificación de ADN genómico y viral a partir de tejidos y otros tipos de muestras		
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Para 50 preparaciones de ADN: 50 columnas QIAamp Mini Spin, proteinasa K de QIAGEN, reactivos, tampones, tubos de recogida (2 ml)	51304

Producto	Contenido	N.º ref.
Kit QIAamp UltraSens Virus: para la concentración y el aislamiento de ADN y ARN virales a partir de suero y plasma		
QIAamp UltraSens Virus Kit (50)	Para 50 preparaciones de ácidos nucleicos virales: 50 columnas QIAamp Mini Spin, proteinasa K, ARN transportador, tubos de recogida (2 ml), tampones	53704
Kit QIAamp DNA Blood Mini: para la purificación de hasta 12 µg de ADN genómico, mitocondrial o viral a partir de sangre y líquidos corporales relacionados		
QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	Para 50 minipreparaciones de ADN: 50 columnas QIAamp Mini Spin, proteasa de QIAGEN, reactivos, tampones, tubos de recogida (2 ml)	51104
Rotor-Gene Q MDx y accesorios		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Termociclador para PCR en tiempo real con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí), ordenador portátil, software, accesorios: incluye una garantía de 1 año para piezas y mano de obra, no incluye instalación y formación	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Termociclador para PCR en tiempo real con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí), ordenador portátil, software, accesorios: incluye una garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de disociación de alta resolución con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios: incluye una garantía de 1 año para piezas y mano de obra, no incluye instalación y formación	9002032

Producto	Contenido	N.º ref.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de disociación de alta resolución con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios: incluye una garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Instrumento para PCR en tiempo real con 6 canales (azul, verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí), ordenador portátil, software, accesorios: incluye una garantía de 1 año para piezas y mano de obra, no incluye instalación y formación	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Instrumento para PCR en tiempo real con 6 canales (azul, verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí), ordenador portátil, software, accesorios: incluye una garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación	9002043
Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform	Termociclador para PCR en tiempo real con 2 canales (verde, amarillo), ordenador portátil, software, accesorios: incluye una garantía de 1 año para piezas y mano de obra, no incluye instalación y formación	9002002
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	Termociclador para PCR en tiempo real con 2 canales (verde, amarillo), ordenador portátil, software, accesorios: incluye una garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación	9002003

Producto	Contenido	N.º ref.
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de disociación de alta resolución con 2 canales (verde, amarillo) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios: incluye una garantía de 1 año para piezas y mano de obra, no incluye instalación y formación	9002012
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de disociación de alta resolución con 2 canales (verde, amarillo) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios: incluye una garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación	9002013
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloque de aluminio para preparación manual de reacciones con una pipeta monocanal en 72 tubos de 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Bloque de aluminio para preparación manual de reacciones en una matriz estándar de 8 x 12 con 96 tubos de 0,2 ml	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 tiras de 4 tubos y tapas para 1.000 reacciones	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 tiras de 4 tubos y tapas para 10.000 reacciones	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1.000 tubos de pared fina para 1.000 reacciones	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1.000 tubos de pared fina para 10.000 reacciones	981008

Para obtener información actualizada sobre la licencia y las exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual o la guía del usuario del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales y las guías del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse al servicio técnico de QIAGEN o al distribuidor local.

La compra de este producto permite al comprador utilizarlo para la realización de servicios de diagnóstico *in vitro* en seres humanos. Por la presente no se otorga ninguna patente general ni ninguna otra licencia de ningún tipo distinta de este derecho específico de uso derivado de la compra.

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

Acuerdo de licencia limitada

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del kit *artus* EBV RG PCR la aceptación de los siguientes términos:

1. El kit *artus* EBV RG PCR puede utilizarse exclusivamente de acuerdo con las especificaciones del *Manual de uso del kit artus EBV RG PCR* y empleando únicamente los componentes contenidos en el kit. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes contenidos en este kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en el *Manual de uso del kit artus EBV RG PCR* y en protocolos adicionales disponibles en www.qiagen.com.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que este kit ni su(s) uso(s) no infrinjan los derechos de terceros.
3. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no pueden ser reutilizados, reacondicionados ni revendidos.
4. QIAGEN niega específicamente cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del kit aceptan no realizar ni permitir a otros realizar ningún paso que pueda conducir a acciones que hayan sido prohibidas en las especificaciones anteriores o que pueda facilitarlas. QIAGEN se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada, y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los costes del juicio, incluidos los honorarios de abogacía, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit y con sus componentes.

Para obtener los términos actualizados de la licencia, visite www.qiagen.com.

© 2009-2014 QIAGEN, reservados todos los derechos.

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)

