

digene[®] HPV Genotyping RH Test, Detection Kit Handbuch



Version 1



Zum Nachweis von 18 Hochrisiko-HPV-Genotypen
(humanes Papillomvirus) durch reverse Hybridisierung



613413



QIAGEN GmbH, QIAGEN Straße 1
D-40724 Hilden

R2



1057455DE



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN ist der führende Anbieter innovativer Proben- und Testtechnologien zur Isolierung und Analyse jeder biologischen Probe. Unsere hochwertigen Produkte und der exzellente Service garantieren Erfolg von der Probenvorbereitung bis zum Ergebnis.

QIAGEN setzt Standards für:


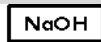



- Aufreinigung von DNA, RNA und Proteinen
- Testsysteme für Nukleinsäuren und Proteine
- microRNA Forschung und RNAi
- Automatisierung von Proben- und Testtechnologien

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


Inhaltsverzeichnis

Kit-Inhalt	4
Symbole	5
Lagerung	6
Verwendungszweck	6
Anwendungseinschränkungen	6
Qualitätskontrolle	6
Technischer Service	7
Sicherheitsinformationen	7
Einführung	9
Prinzip	9
Leistungsmerkmale	11
Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien	18
Wichtige Hinweise	19
Ansetzen der Reagenzien für das manuelle Verfahren	19
Ansetzen der Reagenzien für das automatisierte Verfahren	20
Protokolle	
■ 1: Nachweis von amplifizierter HPV-DNA mit einem manuellen Verfahren – Hybridisierung	23
■ 2: Nachweis von amplifizierter HPV-DNA mit einem manuellen Verfahren – Stringent-Waschen	26
■ 3: Nachweis von amplifizierter HPV-DNA mit einem manuellen Verfahren – Farbentwicklung	28
■ 4: Nachweis von amplifizierter HPV-DNA mit einem automatisierten Verfahren	30
Fehlerbehebung	35
Anhang A: Auswertung der Ergebnisse	40
Anhang B: Kontaminationskontrolle bei der PCR	42
Literatur	43
Bestellinformationen	47

Kit-Inhalt

digene HPV Genotyping RH Test, Detection Kit		(20)
Katalog-Nr.		613413
Anzahl der Reaktionen		20
	Hochrisiko-HPV-Streifen	20
DS	Denaturierungslösung  	250 µl
HS	Hybridisierungslösung	85 ml
SW	Stringent-Waschlösung	2 x 105 ml
C	100x Konjugat  	550 µl
CD	Konjugatverdünnungsmittel	55 ml
S	100x Substrat	550 µl
SB	Substratpuffer	110 ml
RS	5x Spüllösung	75 ml
3B	3B-Puffer	220 µl
	Inkubationsrinnenplatten	3
	Datenberichtsblätter	2
	Handbuch 	1

Symbole

	Inhalt reicht für <N> Tests
	In-vitro-diagnostisches Medizinprodukt
	Übereinstimmung mit EU- Richtlinien (CE)
	Katalognummer
	Hersteller
	Chargennummer
	Materialnummer
	Wichtiger Hinweis
	Zulässiger Temperaturbereich
	Verwendbar bis
	Bitte lesen Sie die Angaben im Handbuch

Lagerung

Alle Reagenzien des *digene* HPV Genotyping RH Test, Detection Kits müssen unmittelbar nach Erhalt bei 2–8 °C gelagert werden. Stellen Sie sicher, dass das Kit von möglichen Kontaminationsquellen durch DNA und insbesondere von amplifizierten DNA-Produkten ferngehalten wird. Alle Reagenzien sind unter diesen Bedingungen bis zu ihrem jeweiligen Verfallsdatum stabil. Die Hochrisiko-HPV-Streifen sind bis zu ihrem Verfallsdatum stabil, wenn sie bei 2–8 °C im Exsikkator gelagert werden.

Verwendungszweck

Das *digene* HPV Genotyping RH Test, Detection Kit ist ein *in-vitro* reverses Hybridisierungsassay mit GP5+/6+ Amplimer für die qualitative Identifikation der individuellen Hochrisiko-HPV-Typen 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 und 82. Die Verwendung dieses Tests ist als Reflextest für Frauen mit einem positiven Ergebnis beim *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test vorgesehen.

Anwendungseinschränkungen

Der Test ist validiert zur Verwendung mit Proben, die in Specimen Transport Media (STM) und PreservCyt®-Lösung entnommen wurden. Tests von anderen Probentypen können falsch-negative oder falsch-positive Ergebnisse liefern. Das Produkt muss von Personal verwendet werden, das in PCR-Techniken geschult ist. Die Empfehlungen zu Labor-Design und -verfahren müssen befolgt werden, um falsche Ergebnisse und DNA-Kontaminierung zu vermeiden. Die Hybridisierungs- und Stringent-Waschkubationen beim manuellen Testverfahren müssen bei genau 50 °C durchgeführt werden, um falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden. Die Wasserbadtemperatur muss mit einem kalibrierten Thermometer geprüft werden.

Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagementsystem von QIAGEN wird jede Charge des *digene* HPV Genotyping RH Test, Detection Kits nach vorgegebenen Prüfkriterien getestet, um eine gleichbleibende Produktqualität sicherzustellen.

Technischer Service

Der Technische Service von QIAGEN garantiert Qualität auch in der wissenschaftlichen Beratung unserer Kunden. Hier stehen Ihnen erfahrene Wissenschaftler für Ihre Fragen zu Probenvorbereitungs- und Testtechnologien sowie zur Anwendung der QIAGEN® Produkte gerne zur Verfügung. Rufen Sie uns an, wenn Sie Fragen zum *digene* HPV Genotyping RH Test, Detection Kit oder zu anderen QIAGEN Produkten haben.

Die Erfahrungen unserer Kunden sind eine wichtige Informationsquelle bei der Entwicklung und Verbesserung unserer Produkte. Rufen Sie uns an, denn Ihre Vorschläge und Ideen zu unseren Produkten und zu neuen Techniken interessieren uns.

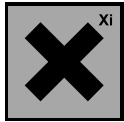
Technische Hinweise und zusätzliche nützliche Informationen finden Sie in unserem Technischen Support Center unter www.qiagen.com/support. Darüber hinaus ist Ihnen das Team vom Technischen Service gerne behilflich, falls Sie Rat oder weitere Informationen zu QIAGEN Produkten benötigen (Kontaktinformationen siehe hintere Umschlagseite oder unter www.qiagen.com).

Sicherheitsinformationen

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und Schutzbrille. Weitere Informationen finden Sie in den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (MSDSs). Diese sind online im praktischen und kompakten PDF-Format unter www.qiagen.com/support/MSDS.aspx abrufbar, wo Sie das MSDS für jedes QIAGEN Kit und jede Kit-Komponente einsehen und ausdrucken können.

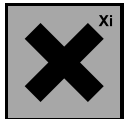
Die folgenden Risiko- und Sicherheitssätze betreffen die Komponenten des *digene* HPV Genotyping RH Test, Detection Kits.

Denaturierungslösung (DS)



Enthält Natriumhydroxid: reizend. Risiko- und Sicherheitssätze:* R36/38, S26-36/37/39-45.

Konjugat, 100x (C)



Enthält ProClin® 300 (5-Chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on, 2-Methyl-4-isothiazolin-3-on): reizend. Risiko- und Sicherheitssätze:* R43, S24-36/37/39-45.

24-Stunden-Notruf

Im Notfall können Sie 24 Stunden am Tag in englischer, französischer und deutscher Sprache medizinische Informationen erhalten über den:

Giftnotruf der Beratungsstelle bei Vergiftungen in Mainz (Deutschland),

Tel: +49-6131-19240

* R36/38: Reizt die Augen und die Haut; R43: Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich; S24: Berührung mit der Haut vermeiden; S26: Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren; S36/37/39: Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen; S45: Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).

Einführung

Der *digene* HPV Genotyping RH Test besteht aus 2 Kits: dem *digene* HPV Genotyping RH Test, Amplification Kit und dem *digene* HPV Genotyping RH Test, Detection Kit. Das *digene* HPV Genotyping RH Test, Detection Kit ermöglicht eine einfache und zuverlässige Identifizierung von Hochrisiko-HPV-Genotypen (Humanes Papillomavirus) mittels reverser Hybridisierung. Beim Verfahren der reversen Hybridisierung verwendete PCR-Produkte werden aus Template-DNA durch Amplifikation der stark konservierten L1-Sequenz mit dem *digene* HPV Genotyping RH Test, Amplification Kit erzeugt.

Prinzip

Die Identifikation von HPV-Genotypen basiert auf einem reversen Hybridisierungsverfahren. Denaturierte biotinylierte Amplikone, die aus der Amplifikation eines Teils der L1-Region mit dem GP5+/6+ Primersatz stammen, werden mit spezifischen Oligonukleotidsonden hybridisiert, die als parallele Linien auf Membranstreifen immobilisiert sind (Abbildung 1). Nach der Hybridisierung und dem Stringent-Waschen wird Streptavidin-konjugierte alkalische Phosphatase zugesetzt, die sich an alle vorhandenen biotinylierten Hybriden bindet. Inkubation mit BCIP/NBT-Chromogen ergibt einen violetten Niederschlag, der eine visuelle Interpretation der Ergebnisse ermöglicht. Nach der Isolierung wird als interne Kontrolle der Gegenwart amplifizierbarer DNA ein Fragment aus dem menschlichen Betaglobin-Gen mit der HPV-DNA in Form einer Multiplex-PCR co-amplifiziert. Die letzte Sondenlinie auf dem Streifen enthält eine Sonde zum Nachweisen des Betaglobin-Amplimers.

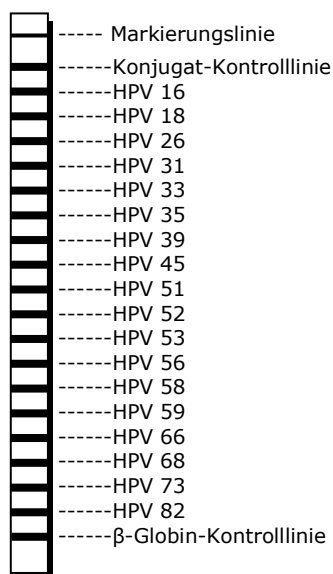
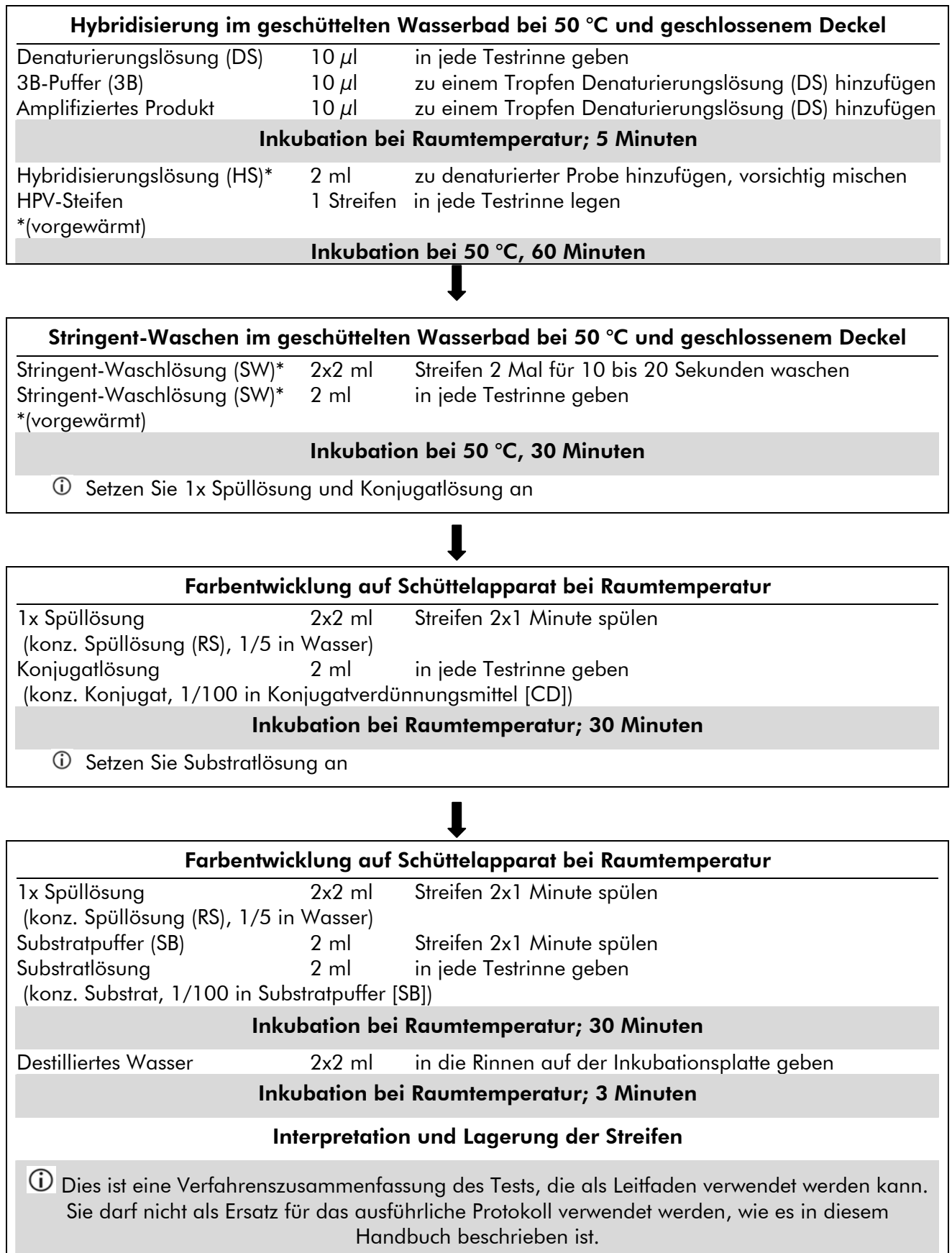


Abbildung 1. Schematische Darstellung des Genotypisierungstreifens. Zur Orientierung ist oben auf dem Streifen eine Markierungslinie (**Markierungslinie**) gezogen. Zwei Kontrolllinien (**Konjugat-Kontrolllinie**, **β-Globin-Kontrolllinie**) sind vorhanden.

Abbildung 2. Arbeitsablauf mit dem digene HPV Genotyping RH Test, Detection Kit beim manuellen Verfahren.



Leistungsmerkmale

Analytische Sensitivität

Für HPV 16, HPV 18 und HPV 45 wurden formale Bestimmungen der Nachweisgrenze (LOD, Limit of Detection) durchgeführt. Die jeweilige Nachweisgrenze ist in Tabelle 1 aufgeführt.)

Tabelle 1. Analytische Sensitivitätsnachweisgrenze (LOD) für HPV 16, 18 und 45

Genotyp	LOD-Konzentration (Kopien/PCR)
HPV16	4
HPV18	8
HPV45	23

Für die anderen 15 Typen wurden die Verdünnungsschritte analysiert, und die Konzentration mit 100 % positivem Ergebnis wurde bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2. Konzentration der Sensitivitätsnachweisgrenze (LOD) als Funktion des Genotyps

Genotyp	LOD-Konzentration (Kopien/PCR)
HPV26	1000
HPV31	10
HPV33	10
HPV35	10
HPV39	1000
HPV51	1000
HPV52	1000
HPV53	100 000
HPV56	10

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite.

Tabelle 2. Fortsetzung

Genotyp	LOD-Konzentration (Kopien/PCR)
HPV58	100
HPV59	100
HPV66	100
HPV68a	10 000
HPV68	100 000
HPV73	10 000
HPV82MM4	100 000
HPV82IS39	10 000

Praktische analytische Spezifität

Amplimere aus den 18 HPV-Genotypen und den 2 Subtypen, die mit dem Assay erfasst werden (d. h. HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68 (68a), 73, 82MM4 (82IS39)) zeigten ein korrektes Reaktionsmuster auf dem Streifen, womit die Identifikation des korrekten HPV-Typs bestätigt wird. Große Amplimer Mengen (erhalten aus 10 000 000 HPV-Kopien pro PCR von den HPV-(Sub-)-Typen 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 61, 66, 67, 68 (und 68a), 69, 71, 72, 73, 81, 82 (MM4 und IS39)) wurden verwendet, um mögliche Kreuzreaktivität aufzuspüren. Keine der Sonden zeigte irgendeine Reaktion mit einem Amplimer von einem der nicht erfassten HPV-Typen.

Die Spezifität des *digene* HPV Genotyping RH Test, Detection Kits wird durch die Sondauswahl sowie durch die Auswahl stringenter Reaktionsbedingungen sichergestellt. Die Sonden wurden auf mögliche Homologien zu allen in Genbanken publizierten Sequenzen durch eine Sequenzvergleichsanalyse geprüft. Somit wurde die Nachweisbarkeit aller relevanten Stämme sichergestellt. Zusätzlich wurden Mikroorganismen analysiert, die gewöhnlich im Anogenitaltrakt der Frau vorkommen. Keines der getesteten Pathogene war reaktiv (siehe Tabelle 3). Die Gegenwart dieser Mikroorganismen reduziert die Nachweissensitivität für die Hochrisiko-HPV-Genotypen nicht.

Tabelle 3. Potenziell kreuzreaktive Pathogene

Pathogen
Acinetobacter anitratus
Acinetobacter lwoffii
Bacteroides fragilis
Escherichia coli (HB101)
Escherichia coli
Klebsiella pneumoniae
Lactobacillus acidophilus
Mobiluncus curtisii
Mobiluncus mulieris

Präzision

Zunächst wurde eine repräsentative Gruppe von zehn verschiedenen Proben mit Plasmiden aller 20 HPV-Genotypen und -Subtypen, die von dem Assay abgedeckt werden, beim Zehnfachen über der geschätzten Nachweisgrenze dreifach an 3 verschiedenen Tagen von 2 Technikern und einmal mit 2 Kits mit anderen Chargennummern getestet, was insgesamt 24 Datenpunkte pro Probe ergab. Alle Genotypisierungsergebnisse waren identisch.

Dann wurde DNA, die aus insgesamt 92 Proben aufgereinigt wurde, von zwei Technikern mit Kits aus drei Chargen getestet. Die Ergebnisse wurden als entweder identisch (100 % passende Genotypen), kompatibel (mindestens ein gemeinsamer Genotyp) oder diskordant (keine übereinstimmenden Genotypen) eingestuft. Der Prozentwert identischer/kompatibler Übereinstimmung zwischen den beiden Technikern war 98 % und 100 %. Beim Vergleich der Kits aus verschiedenen Chargen, die von beiden Technikern verwendet wurden (d. h. beim Vergleich aller 6 Ergebnisse) lag der Anteil der identischen/kompatiblen Übereinstimmung bei 93 %.

Schließlich wurde eine Auswahl von 25 Proben aus der oben genannten repräsentativen Gruppe als Duplikate von zwei Technikern (Intertechnikertest) an einem zweiten Testort getestet (Interlabortest). Die Ergebnisse wurden wieder als identisch (100 % passende Genotypen), kompatibel (mindestens ein gemeinsamer Genotyp) oder diskordant (keine übereinstimmenden Genotypen) eingestuft. Techniker 1 zeigte 100 % identische Übereinstimmung beim Duplikattest der 25 Proben. Der zweite Techniker erreichte 93 % identische

Übereinstimmung (23 von 25 Proben) bei den Duplikatproben, wobei 2 Proben kompatible Genotypisierungsergebnisse zeigten.

Der Prozentwert identischer Übereinstimmung zwischen den beiden Technikern war 88 % und der Prozentwert kompatibler Übereinstimmung war 12 %. Es wurden keine diskordanten Ergebnisse beobachtet. Beim Vergleich aller zehn Genotypisierungsergebnisse von jeder der 25 Proben in der repräsentativen Gruppe des Interlabortests (erster und zweiter Ort) war der Prozentwert identischer/kompatibler Übereinstimmung 100 % und umfasste 72 % identische Ergebnisse und 28 % kompatible Ergebnisse. Es wurden keine diskordanten Ergebnisse beobachtet.

Um zusammenfassend den Grad der Übereinstimmung zwischen den Messungen zu beurteilen, wurde eine Reihe künstlicher Proben, die alle durch den Assay abgedeckten HPV-Typen enthielten, und 92 klinische Proben durch mehrere Probennahmen getestet. Jede Probe wurde in Replikaten an verschiedenen Tagen von verschiedenen Technikern getestet. Es wurden auch verschiedene Chargen getestet. Die Ergebnisse zeigten 100 % identische Genotypen bei den künstlichen Proben und mehr als 95 % identische und kompatible Ergebnisse bei den klinischen Proben.

Genauigkeit

Aliquote von DNA, die aus insgesamt 108 Proben aufgereinigt wurde, die aus 50 HC2-positiven in STM entnommenen Proben, 50 HC2-positiven in PC entnommenen Proben und 8 HC2-negativen in STM entnommenen Proben bestanden, wurden mit dem *digene* HPV Genotyping RH Test, Detection Kit und dem Free University RLB System (1) getestet.

Die Ergebnisse wurden als entweder identisch (100 % passende Genotypen), kompatibel (mindestens ein gemeinsamer Genotyp) oder diskordant (keine übereinstimmenden Genotypen) eingestuft. Abweichungen (diskordante Genotypisierungsergebnisse) wurden durch Wiederholung der beiden Assays und im Fall fortbestehender Abweichungen durch die anschließende Analyse mit einem dritten sensitiven HPV-Nachweis- und Genotypierungs-Assay [SPF10- LiPA₂₅ (Version1)] aufgelöst.

Der Vergleich ergab 80 % identische, 11 % kompatible und 9 % diskordante Genotypisierungsergebnisse. Wiederholen der beiden Assays löste 5 der 10 abweichenden Proben auf. Bei der anschließenden Analyse mit dem SPF10- LiPA₂₅ (Version 1) wurden weitere 3 abweichende Proben aufgelöst, so dass nur zwei abweichende Proben übrig blieben. In der ersten dieser abweichenden Proben wurde vom *digene* HPV Genotyping RH Test, Detection Kit HPV45 gefunden, während der Reverse Line Blot (RLB) negativ war. In der zweiten Probe wurde mit RLB HPV58 gefunden, und das Ergebnis des *digene* HPV Genotyping RH, Detection Kits war negativ.

Um zusammenfassend den Grad der Übereinstimmung zu bewerten, wurde das *digene* HPV Genotyping RH Test, Detection Kit gegen den HPV-RLB-Assay getestet, der eine akzeptierte Referenz ist. Ein Paralleltest von 108 klinischen Proben wurde durchgeführt, und die Ergebnisse wurden als identisch, kompatibel oder diskordant eingestuft. Diskordante Proben wurden durch eine Analyse mit dem SPF10-LiPA₂₅ (Version 1) aufgelöst. Die Ergebnisse zeigen nach der Auflösung anfänglich abweichender Proben einen sehr geringen Anteil abweichender Proben (2 %). Siehe Tabelle 4.

Tabelle 4. Test des HPV-Genotypisierungstests gegen den HPV-RLB-Assay

Genauigkeitsanalyse	% der klinischen Proben
Identisch	80
Kompatibel	18
Abweichend	2

Robustheit

Die Unabhängigkeit des Assays von gezielten Veränderungen relevanter Methodenparameter wurde wie folgt bewertet. Duplikatproben der HPV-Genotypen 16, 18, 45 und 52 mit dem 10-fachen der Nachweisgrenze der PCR wurden bei PCR-Bedingungen amplifiziert, die 1,0 °C höher oder 1,0 °C niedriger waren. Der HPV-Nachweis durch den RH-Test wurde im Vergleich zu den normalen Zyklusbedingungen nicht beeinflusst.

Amplimere mit einer Konzentration nahe der Nachweisgrenze des RH-Nachweiskits wurden bei höheren Hybridisierungstemperaturen auf möglichen Signalverlust getestet. Tests bei einer angegebenen Maximaltemperatur von 50,5 °C beeinflussten das Ergebnis nicht, und Tests bei 51,0 °C (was die Testspezifikationen überschreitet) führte zu etwas schwächeren Linien der reaktiven Sonden, jedoch nicht zu Signalverlust. Hohe Konzentrationen von Amplimeren wurden bei niedrigeren Hybridisierungstemperaturen auf mögliche Kreuzreaktionen getestet. Die Tests wurden sowohl bei 49,5 °C (was die angegebene Temperaturuntergrenze für die Hybridisierung ist) als auch bei 49,0 °C (was unter der Spezifikation liegt) getestet; es wurden keine Kreuzreaktionen beobachtet. Eine Reduzierung aller Inkubationszeiten des RHA-Verfahrens um fünf Minuten führte zu etwas schwächeren Linien der reaktiven Sonden, jedoch nicht zu Signalverlust, während ein Verlängern aller Inkubationszeiten um fünf Minuten keine sichtbaren Auswirkungen zeigte.

Störsubstanzen

Die Wirkung von Blut und anderen das *digene* HPV Genotyping RH Test, Detection Kit potenziell störenden Substanzen wurde bewertet. Die Gegenwart der Agenzien (in Tabelle 5 aufgeführt) bewirkte keine falsch-positiven Ergebnisse.

Außerdem bewirkte die Gegenwart der Substanzen keine reduzierte Sensitivität für HPV-Viren.

Tabelle 5. Störsubstanzen

Substanz
Blut
Feuchtigkeitspflegemittel
Hämorrhoiden-Anästhetikum
Talkum
Antipilzcreme
Vaginalgleitmittel

Diagnostische Bewertung

Der *digene* HPV Genotyping RH Test wurde in einer Multicenterstudie mit dem etablierten RLB-System (1) verglichen.

Zu diesem Zweck wurden 267 Zervixabstriche mit positivem Ergebnis des *digene* HC2 High Risk HPV DNA Tests ausgewählt. Die Proben wurden in STM oder in PreservCyt-Medium gesammelt. Die DNA-Isolierung aus diesen Proben erfolgte entweder manuell mit dem QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit oder automatisch auf dem EZ1 Advanced mit dem EZ1® DSP Virus Kit.

Von den 267 HC2-positiven Proben wurden 254 auch mit dem *digene* HPV Genotyping RH Test positiv getestet für einen der 18 Hochrisiko-HPV-Genotypen.

Die mit beiden Assays bestimmten Genotypen wurden verglichen und die Ergebnisse wurden entweder als identisch bewertet (zu 100 % übereinstimmende Genotypen), als vereinbar (mindestens ein Genotyp stimmt überein) oder als unvereinbar (kein Genotyp stimmt überein).

Der Anteil der identischen/vereinbaren Übereinstimmungen zwischen den Genotypisierungsassays betrug 95,5 % (255 von 267 Proben), aufgeteilt auf 82,0 % identische und 13,5 % vereinbare Ergebnisse (siehe Tabelle 6). 4,5 % (12 von 267 Proben) der Genotypisierungsergebnisse waren unvereinbar.

Tabelle 6. Vergleich der Genotypisierungsergebnisse von *digene* HPV Genotyping RH Test und dem etablierten RLB-System mit 267 HC2-positiven Zervixabstrichen.

Übereinstimmung	n = 267 (%)
Identische Typisierung	219 (82,0)
Vereinbare Typisierung	36 (13,5)
Unvereinbare Typisierung	12 (4,5)

Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und Schutzbrille. Weitere Informationen finden Sie in den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (MSDSs), die beim Hersteller erhältlich sind.

Für alle Protokolle

- Destilliertes oder entionisiertes Wasser
- Pipetten* und sterile Einmalpipettenspitzen mit Filtern (1–20 µl, 20–200 µl und 200–1000 µl)
- Pinzetten zur Handhabung der Streifen
- Messzylinder (10 ml, 25 ml, 50 ml und 100 ml)

Manuelles Protokoll

- Wasserbad* mit Schrägdeckel und Schütteltisch (80 U/min), das auf $50 \pm 0,5$ °C einstellbar ist
- Aspirator
- Kalibriertes Thermometer*
- Orbitalschüttler oder Schütteltisch
- Labor-Timer, 2 Stunden (± 1 Minute)
- Optional: Multidispenser (z. B. Finnpipette® Stepper von Thermo Electron, siehe www.thermo.com)*†

Automatisiertes Protokoll

- ProfiBlot™ 48 T (Tecan Trading AG, siehe www.tecan.com)*†
- konische 50-ml-Röhrchen

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

† Dies ist keine vollständige Herstellerliste, und viele wichtige Hersteller biologischer Artikel sind nicht aufgeführt.

Wichtige Hinweise

Ansetzen der Reagenzien für das manuelle Verfahren

1x Spüllösung

Setzen Sie eine 1/5-Verdünnung von 5x Spüllösung (RS) an, indem Sie ein Teil 5x Spüllösung (RS) in 4 Teile destilliertes oder entionisiertes Wasser geben. Setzen Sie 8 ml verdünnte Spüllösung (1x) für jede Testrinne an, plus 10 ml extra (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7. Ansetzen der 1x Spüllösung (für das manuelle Verfahren)

Anzahl der Streifen	Volumen 5x Spüllösung (RS) (ml)	Volumen Wasser (ml)	Gesamtvolumen (ml)
1	3,6	14,4	18
5	10	40	50
10	18	72	90
15	26	104	130
20	34	136	170

Substratpuffer (SB)

Verwenden Sie 2 ml Substratpuffer (SB) pro Teststreifen plus 5 ml pro Analyselauf. Verwenden Sie ein konisches 50-ml-Röhrchen und setzen Sie es in die zum Zubehör des ProfiBlot T48 gehörende Flasche. So ist es möglich, das zusätzlich benötigte überschüssige Volumen des Substratpuffers gering zu halten.

Konjugatlösung und Substratlösung

Um Arbeitslösungen von Konjugat und Substrat zu erhalten, verdünnen Sie 100x Konjugat (C) oder 100x Substrat (S) 1/100 in Konjugatverdünnungsmittel (CD) bzw. Substratpuffer (SB). Setzen Sie 2 ml Konjugatlösung oder Substratlösung für jede Testrinne an, plus 2 ml extra (siehe Tabellen 8 und 9). Verwenden Sie zur Zubereitung der Konjugat- und Substratlösungen nur saubere Gefäße, die mit destilliertem Wasser gespült wurden.

Tabelle 8. Ansetzen der Konjugatlösung (für das manuelle Verfahren)

Anzahl der Streifen	Volumen Konjugatverdünnungsmittel (CD) (ml)	Volumen 100x Konjugat (C) (μl)
1	4	40
5	12	120
10	22	220
15	32	320
20	42	420

Tabelle 9. Ansetzen der Substratlösung (für das manuelle Verfahren)

Anzahl der Streifen	Volumen Substratpuffer (ml)	Volumen 100x Substrat (S) (μl)
1	4	40
5	12	120
10	22	220
15	32	320
20	42	420

Ansetzen der Reagenzien für das automatisierte Verfahren

1x Spüllösung

Setzen Sie eine 1/5-Verdünnung von 5x Spüllösung (RS) an, indem Sie ein Teil 5x Spüllösung (RS) in 4 Teile destilliertes oder entionisiertes Wasser geben. Setzen Sie 10 ml verdünnte Spüllösung (1x) für jeden Streifen an, plus 55 ml extra (siehe Tabelle 10, Seite 21).

Tabelle 10. Ansetzen der 1x Spüllösung (für das automatisierte Verfahren)

Anzahl der Streifen	Volumen 5x Spüllösung (RS) (ml)	Volumen Wasser (ml)	Gesamtvolumen (ml)
1	13	52	65
5	21	84	105
10	31	124	155
15	41	164	205
20	51	204	255

Substratpuffer (SB)

Verwenden Sie für jeden Streifen 2 ml Substratpuffer (SB), plus 5 ml extra für jeden Lauf. Verwenden Sie ein konisches 50-ml-Röhrchen und setzen Sie es in die Flasche ein, die mit dem ProfiBlot 48 T geliefert wurde, um die Menge an überschüssigem Substratpuffer (SB) zu reduzieren, der für jeden Lauf benötigt wird.

Konjugatlösung und Substratlösung

Um Arbeitslösungen von Konjugat und Substrat zu erhalten, verdünnen Sie 100x Konjugat (C) oder 100x Substrat (S) 1/100 in Konjugatverdünnungsmittel (CD) bzw. Substratpuffer (SB). Setzen Sie 2 ml Konjugatlösung oder Substratlösung für jeden Streifen an, plus 5 ml extra (siehe Tabellen 11 und 12, nächste Seite). Verwenden Sie ein konisches 50-ml-Röhrchen und setzen Sie es in die Flasche ein, die mit dem ProfiBlot 48 T geliefert wurde, um die Menge an überschüssigem Puffer zu reduzieren, der für jeden Lauf benötigt wird. Verwenden Sie zur Zubereitung der Konjugat- und Substratlösungen nur saubere Gefäße, die mit destilliertem Wasser gespült wurden.

Tabelle 11. Ansetzen der Konjugatlösung (für das automatisierte Verfahren)

Anzahl der Streifen	Volumen Konjugatverdünnungsmittel (CD) (ml)	Volumen 100x Konjugat (C) (μl)
1	7	70
5	15	150
10	25	250
15	35	350
20	45	450

Tabelle 12. Ansetzen der Substratlösung (für das automatisierte Verfahren)

Anzahl der Streifen	Volumen Substratpuffer (ml)	Volumen 100x Substrat (S) (μl)
1	7	70
5	15	150
10	25	250
15	35	350
20	45	450

Protokoll 1: Nachweis von amplifizierter HPV-DNA mit einem manuellen Verfahren – Hybridisierung

Wichtige Punkte vor Beginn

- Verwenden Sie keine Reagenzien mit abgelaufenem Verfallsdatum.
- Mischen Sie keine Reagenzien aus verschiedenen Chargennummern.
- Das Röhrchen mit der Denaturierungslösung (DS) muss sofort nach Gebrauch wieder verschlossen werden; fortgesetzter Luftkontakt führt zu schneller Zersetzung.
- Lagern Sie alle Reagenzien und die Kunststoffröhrchen mit den Teststreifen sofort nach Gebrauch wieder bei 2–8 °C.
- Bei den verschiedenen Inkubationsschritten müssen die Teststreifen immer in der gleichen Rinne bleiben.

Arbeiten vor Beginn

- Lassen Sie alle Reagenzien und die Kunststoffröhrchen mit den Teststreifen auf Raumtemperatur (15–25 °C) erwärmen.
- Erwärmen Sie die Hybridisierungslösung (HS) und die Stringent-Waschlösung im Wasserbad auf mindestens 37 °C. Stellen Sie sicher, dass die Hybridisierungstemperatur von 50 °C nicht überschritten wird. Vor dem Gebrauch müssen alle Kristalle aufgelöst sein.
- Stellen Sie das mit Schrägdeckel und Schütteltisch ausgestattete Wasserbad auf 50 °C ein. Stellen Sie sicher, dass die Badtemperatur $50 \pm 0,5$ °C beträgt. Prüfen Sie die Temperatur mit einem kalibrierten Thermometer.
- Stellen Sie Schüttelgeschwindigkeit des Wasserbads bei den Inkubationen so hoch wie möglich ein, ohne dass Flüssigkeiten verschüttet werden.
- Stellen Sie den Wasserstand im Wasserbad so ein, dass er zwischen einem Drittel und der Hälfte der Testrinnenhöhe beträgt.

Verfahren

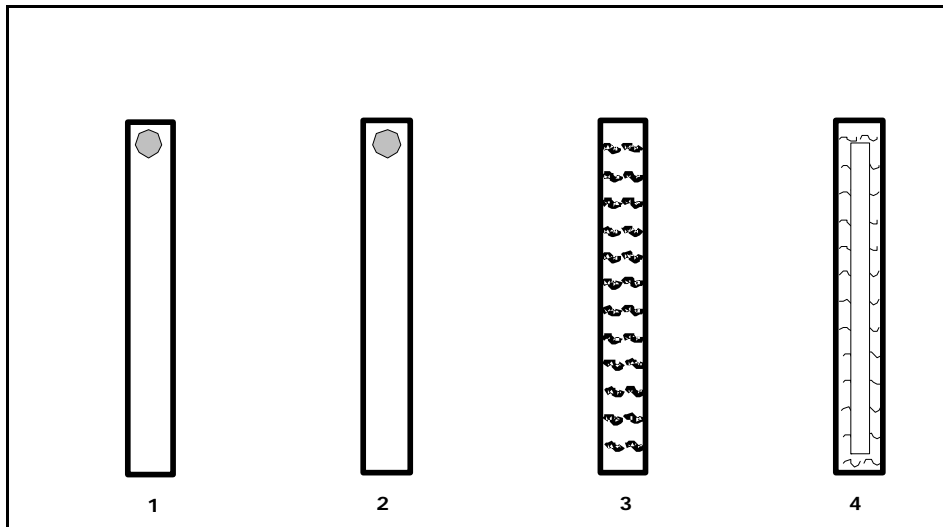


Abbildung 3. Pipettieranweisungen. 1: Geben Sie 10 μl Denaturierungslösung (DS) + 10 μl 3B-Puffer (3B) in die Rinne; 2: Mischen Sie durch Pipettieren, Geben Sie 10 μl amplifiziertes DNA-Produkt hinzu; 3: Geben Sie die Hybridisierungslösung (HS) hinzu; 4: Legen Sie den Streifen in die Rinne.

1. Geben Sie jeweils 10 μl Denaturierungslösung (DS) in die oberen Enden der erforderlichen Anzahl Testrinnen (1 Rinne pro Streifen) (siehe Abbildung 3, 1).
2. Verschließen Sie das Röhrchen mit der Denaturierungslösung (DS) sofort nach Gebrauch wieder.
3. Geben Sie 10 μl 3B-Puffer (3B) zu der Denaturierungslösung (DS) (siehe Abbildung 3, 1).
4. Geben Sie 10 μl amplifiziertes biotinyliertes Produkt in die Rinne mit der Denaturierungslösung (DS) und dem 3B-Puffer (3B).
5. Mischen Sie vorsichtig durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren (siehe Abbildung 3, 2).
 - ① Achten Sie beim Pipettieren darauf, benachbarte Rinnen nicht zu kontaminieren. Verwenden Sie für jede Probe eine frische Pipettenspitze mit Filter.
6. Inkubieren Sie bei Raumtemperatur (15–25 °C) für 5 Min.
7. Entfernen Sie mit einer Pinzette die erforderliche Anzahl Teststreifen aus dem Röhrchen (1 Streifen pro Probe). Tragen Sie mit einem Bleistift eine Identifikationsnummer über der Markierungsline auf dem Streifen ein.
 - ① Verwenden Sie nichts Anderes zum Schreiben. Greifen Sie die Streifen mit der Pinzette nur über der Markierungsline. Tragen Sie stets Handschuhe. Legen Sie bei der Behandlung der Streifen stets Papier unter.
8. Schütteln Sie die vorgewärmte Hybridisierungslösung (HS).

- 9. Geben Sie vorsichtig 2 ml Hybridisierungslösung in jede Rinne zu dem denaturierten amplifizierten Produkt (siehe Abbildung 3, 3).**
- ① Mischen Sie durch vorsichtiges Schütteln. Achten Sie beim Pipettieren darauf, benachbarte Rinnen nicht zu kontaminieren.
- 10. Legen Sie den Streifen unmittelbar danach in die Rinne (siehe Abbildung 3, 4).**
- ① Der Streifen muss vollständig in der Lösung untergetaucht sein.
 - ① Tragen Sie ungepuderte Einmalhandschuhe und verwenden Sie eine Pinzette.
- 11. Stellen Sie die Rinnenplatte in das geschüttelte Wasserbad, verschließen Sie den Deckel des Wasserbads und inkubieren Sie bei 50 °C für 60 Min.**
- ① Decken Sie die Rinnenplatte nicht ab. Kondensation kann zur wechselseitigen Kontamination der Rinnen führen.
 - ① Verwenden Sie keinen Heißluftschüttelapparat für die Inkubation. Die mangelhafte Wärmeübertragung kann abweichende Ergebnisse bewirken.
 - ① Stellen Sie während der Inkubation sicher, dass die Badtemperatur $50 \pm 0,5$ °C beträgt. Prüfen Sie die Temperatur mit einem kalibrierten Thermometer.
- 12. Fahren Sie mit Protokoll 2 fort: Nachweis von amplifizierter HPV-DNA mit einem manuellen Verfahren – Stringent-Waschen.**

Protokoll 2: Nachweis von amplifizierter HPV-DNA mit einem manuellen Verfahren – Stringent-Waschen

Wichtige Punkte vor Beginn

- Wenn Sie „Protokoll 1: Nachweis von amplifizierter HPV-DNA mit einem manuellen Verfahren – Hybridisierung“ durchgeführt haben, fahren Sie mit diesem Protokoll fort.
- Wenn Sie dieses Protokoll verwenden, müssen Sie danach auch das „Protokoll 3: Nachweis von amplifizierter HPV-DNA mit einem manuellen Verfahren – Farbentwicklung“ durchführen.

Verfahren

- 1. Nehmen Sie die Rinnenplatte nach der Hybridisierung aus dem Wasserbad.**
- 2. Halten Sie die Rinnenplatte schräg und saugen Sie die Flüssigkeit mit einer Pipette, die bevorzugt an einen Vakuumaspirator angeschlossen ist, aus den Rinnen ab.**
 - ① Achten Sie beim Absaugen der Lösung darauf, dass Sie die Oberfläche der Streifen unterhalb der Markierungslinie nicht beschädigen.
- 3. Geben Sie jeweils 2 ml vorgewärmte Stringent-Waschlösung (SW) in die Rinnen und spülen Sie die Rinnenplatte durch Schütteln bei Raumtemperatur (15-25 °C) für 20-30 s. Stellen Sie sicher, dass der ganze Streifen durch vollständiges Eintauchen in die Lösung gründlich gewaschen wird.**
- 4. Saugen Sie die Lösung jeweils aus den Rinnen ab.**
- 5. Wiederholen Sie den Waschschrift ein Mal durch Ausführen der Anweisungen in den Schritten 3 und 4 dieses Abschnitts. Lassen Sie die Streifen zwischen den beiden Waschschriften nicht trocknen. Fahren Sie mit Schritt 6 fort, nachdem die Schritte 3 und 4 wiederholt wurden.**
- 6. Saugen Sie die Lösung ab.**
- 7. Geben Sie jeweils 2 ml vorgewärmte Stringent-Waschlösung (SW) zu den Streifen.**
- 8. Inkubieren Sie bei 50 °C im geschüttelten Wasserbad für 30 Min.**
 - ① Achten Sie darauf, dass der Deckel des Wasserbads während der Inkubation geschlossen bleibt.

- ① Decken Sie die Rinnenplatte nicht ab. Kondensation kann zur wechselseitigen Kontamination der Rinnen führen.
- ① Verwenden Sie keinen Heißluftschüttelapparat für die Inkubation. Die mangelhafte Wärmeübertragung kann abweichende Ergebnisse bewirken.
- 9. Setzen Sie während der Inkubation in Schritt 4 des „Protokoll 1: Nachweis von amplifizierter HPV-DNA mit einem manuellen Verfahren – Hybridisierung“ die 1x Spüllösung und die Konjugatlösung gemäß den Anweisungen an, die unter „für das manuelle Verfahren“ beginnend auf Seite 19 stehen.**
- 10. Saugen Sie nach dem Ende der Inkubation die Stringent-Waschlösung (SW) ab.**
- 11. Fahren Sie mit „Protokoll 3 fort: Nachweis von amplifizierter HPV-DNA mit einem manuellen Verfahren – Farbentwicklung“.**

Protokoll 3: Nachweis von amplifizierter HPV-DNA mit einem manuellen Verfahren – Farbentwicklung

Wichtige Punkte vor Beginn

- Wenn Sie „Protokoll 2: Nachweis von amplifizierter HPV-DNA mit einem manuellen Verfahren – Stringent-Waschen“ durchgeführt haben, fahren Sie mit diesem Protokoll fort.
- Bei diesem Protokoll werden alle Inkubationsschritte bei Raumtemperatur (15–25 °C) durchgeführt.

Verfahren

- 1. Geben Sie jeweils 2 ml 1x Spüllösung in die Rinnen und inkubieren Sie auf einem Schütteltisch für 1 Min.**
- 2. Saugen Sie die Lösung ab.**
- 3. Geben Sie jeweils 2 ml 1x Spüllösung in die Rinnen und inkubieren Sie auf einem Schütteltisch für 1 Min.**
- 4. Saugen Sie die Lösung ab.**
- 5. Geben Sie jeweils 2 ml Konjugatlösung in die Rinnen und inkubieren Sie auf einem Schütteltisch für 30 Min.**
- 6. Setzen Sie während der Inkubation Substratlösung an (siehe Seite 19).**
 - ① Schützen Sie die Substratlösung vor Licht.
- 7. Saugen Sie nach dem Ende der Inkubation die Lösung ab.**
- 8. Geben Sie jeweils 2 ml 1x Spüllösung in die Rinnen und inkubieren Sie auf einem Schütteltisch für 1 Min.**
- 9. Saugen Sie die Lösung ab. Wiederholen Sie Schritt 8 ein Mal für insgesamt zwei Waschungen mit jeweils 2 ml 1x Spüllösung.**
- 10. Geben Sie jeweils 2 ml Substratpuffer (SB) in die Rinnen und inkubieren Sie auf einem Schütteltisch für 1 Min.**
- 11. Saugen Sie die Lösung ab.**
- 12. Geben Sie jeweils 2 ml Substratlösung in die Rinnen, decken Sie die Rinnen mit Aluminiumfolie ab und inkubieren Sie auf einem Schütteltisch für 30 Min.**
- 13. Saugen Sie nach dem Ende der Inkubation die Lösung ab.**
- 14. Geben Sie zum Beenden der Farbentwicklung jeweils 2 ml destilliertes Wasser in die Rinnen und inkubieren Sie auf einem Schütteltisch für mindestens 3 Min.**
- 15. Saugen Sie die Lösung ab.**

- 16. Geben Sie jeweils 2 ml destilliertes Wasser in die Rinnen und inkubieren Sie auf einem Schütteltisch für mindestens 3 Min.**
- 17. Entfernen Sie die Streifen mit einer Pinzette aus den Rinnen und legen Sie die Streifen auf Fließpapier.**
- 18. Lassen Sie die Streifen vollständig trocknen. Richten Sie die Konjugat-Kontrolllinie auf die entsprechende Linie auf dem Auswertungsbogen aus und kleben Sie den Streifen auf den Bogen.**
 - ① Lassen Sie die Streifen vor der visuellen Auswertung vollständig trocknen.
- 19. Lagern Sie die entwickelten trockenen Streifen bei Raumtemperatur im Dunkeln.**
- 20. Das Protokoll 4: Nachweis von amplifizierter HPV-DNA mit einem automatisierten Verfahren muss nicht durchgeführt werden. Lesen Sie weiter beim Abschnitt „Hilfe zur Fehlersuche“ dieses Handbuchs.**

Protokoll 4: Nachweis von amplifizierter HPV-DNA mit einem automatisierten Verfahren

Wichtige Punkte vor Beginn

- Bei Durchführung des automatisierten Protokolls ist es nicht erforderlich, die manuellen Protokolle 1–3 durchzugehen.
- Verwenden Sie keine Reagenzien mit abgelaufenem Verfallsdatum.
- Mischen Sie keine Reagenzien aus verschiedenen Chargennummern.

Arbeiten vor Beginn

- Lassen Sie alle Reagenzien vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (15–25 °C) erwärmen.
- Erwärmen Sie die Hybridisierungslösung (HS) im Wasserbad auf mindestens 37 °C. Stellen Sie sicher, dass die Hybridisierungstemperatur von 50 °C nicht überschritten wird. Vor dem Gebrauch müssen alle Kristalle aufgelöst sein.
Verwenden Sie für jeden Lauf 2 ml Hybridisierungslösung (HS) plus 15 ml extra.
- Erwärmen Sie die Stringent-Waschlösung (SW) im Wasserbad auf mindestens 37 °C. Stellen Sie sicher, dass die Hybridisierungstemperatur von 50 °C nicht überschritten wird. Vor dem Gebrauch müssen alle Kristalle aufgelöst sein.
Verwenden Sie für jeden Lauf 6 ml Stringent-Waschlösung (SW) plus 30 ml extra.
- Setzen Sie 10 ml verdünnte 1x Spüllösung für jeden Streifen an, plus 55 ml extra (siehe Tabelle 9 auf Seite 20 für weitere Informationen).
- Setzen Sie jeweils 2 ml Konjugatlösung und Substratlösung für jeden Streifen an, plus 5 ml extra (siehe Tabellen 10 und 11 auf Seiten 21 und 22 für weitere Informationen). Verwenden Sie zur Zubereitung der Konjugat- und Substratlösungen nur saubere Gefäße, die mit destilliertem Wasser gespült wurden.
- Folgen Sie beim Anschließen der Leitungen der Kanäle des ProfiBlot an die Puffer den Angaben aus Tabelle 13 (nächste Seite).

Tabelle 13. Pufferverteilung beim ProfiBlot T48

Kanal	Lösung
1	Hybridisierungslösung
2	Stringente Waschlösung
3	Spüllösung
4	Konjugat-Diluent
5	Substratpuffer
6	Substratpuffer

Verfahren

- 1. Programmieren Sie den kalibrierten ProfiBlot 48 T mit den auf den nachfolgenden beiden Seiten in Tabelle 14 aufgeführten Parametern.**

Tabelle 14. Das Programm für den ProfiBlot 48 T

Parameter					
1	INC	5 Min	Schüttelstufe: 3		
2	TEMP	49 °C[§]			
3	DISP	Kanal 1	2000 µl	Start Pos. 1	Ende Anzahl der Streifen
4	INC	60 Min	Schüttelstufe: 3		
5	WASH	Kanal 2	2000 µl	Start Pos. 1	Ende Anzahl der Streifen
6	INC	3 Min	Schüttelstufe: 3		
7	WASH	Kanal 2	2000 µl	Start Pos. 1	Ende Anzahl der Streifen
8	INC	3 Min	Schüttelstufe: 3		
9	WASH	Kanal 2	2000 µl	Start Pos. 1	Ende Anzahl der Streifen
10	INC	30 Min	Schüttelstufe: 3		
11	WASH	Kanal 3	2000 µl	Start Pos. 1	Ende Anzahl der Streifen
12	COOL				
13	WASH	Kanal 3	2000 µl	Start Pos. 1	Ende Anzahl der Streifen
14	WASH	Kanal 4	2000 µl	Start Pos. 1	Ende Anzahl der Streifen
15	INC	30 Min	Schüttelstufe: 3		
16	WASH	Kanal 3	2000 µl	Start Pos. 1	Ende Anzahl der Streifen
17	INC	3 Min	Schüttelstufe: 3		

Fortsetzung der Tabelle auf der folgenden Seite.

[§] Die Inkubationstemperatur für die Hybridisierung wird auf 49 °C eingestellt. Beim manuellen Verfahren wird die Hybridisierung bei 50 °C durchgeführt, um ähnliche Hybridisierungsergebnisse zu erzielen.

Tabelle 14. Das Programm für den ProfiBlot 48 T (Fortsetzung)

Parameter					
18	WASH	Kanal 3	2000 μ l	Start Pos. 1	Ende Anzahl der Streifen
19	INC	3 Min	Schüttelstufe: 3		
20	WASH	Kanal 5	2000 μ l	Start Pos. 1	Ende Anzahl der Streifen
21	INC	3 Min	Schüttelstufe: 3		
22	WASH	Kanal 6	2000 μ l	Start Pos. 1	Ende Anzahl der Streifen
23	INC	30 Min	Schüttelstufe: 3		
24	WASH	Kanal 3	2000 μ l	Start Pos. 1	Ende Anzahl der Streifen
25	INC	3 Min	Schüttelstufe: 3		
26	WASH	Kanal 3	2000 μ l	Start Pos. 1	Ende Anzahl der Streifen
27	INC	10 Min	Schüttelstufe: 3		
28	ASP				
29	END				

- 2. Schalten Sie den ProfiBlot 48 T ein und starten Sie das Programm.**
Die Maschine erwärmt sich, bis die erforderliche Temperatur erreicht ist.
- 3. Setzen Sie die Reagenzien für den Assaylauf an; siehe „Ansetzen der Reagenzien für das automatisierte Verfahren“ auf Seite 20 für weitere Information.**
- 4. Setzen Sie die Reagenzien in den ProfiBlot 48 T ein und tauchen Sie die Kapillaren des Geräts in die Puffer ein. Stellen Sie sicher, dass Sie die Kapillaren jeweils in den richtigen Puffer eintauchen (siehe Tabelle 13, Seite 31).**
- 5. Entfernen Sie mit einer Pinzette die erforderliche Anzahl Teststreifen aus dem Röhrchen (1 Streifen pro Probe). Tragen Sie mit einem Bleistift eine Identifikationsnummer über der Markierungslinie auf dem Streifen ein.**

① Verwenden Sie nichts Anderes zum Schreiben. Greifen Sie die Streifen mit der Pinzette nur über der Markierungslinie. Tragen Sie stets Handschuhe.

6. Legen Sie einen markierten Streifen an das obere Ende jeder Rinne.

7. Pipettieren Sie 10 µl Denaturierungslösung (DS) in das untere Ende jeder Rinne, die einen Streifen enthält.

① Verschließen Sie das Röhrchen sofort nach Gebrauch wieder. Zum Verteilen der Denaturierungslösung (DS) kann ein Multidispenser verwendet werden.

8. Geben Sie 10 µl 3B-Puffer (3B) zu der Denaturierungslösung (DS).

9. Geben Sie 10 µl amplifiziertes biotinyliertes Produkt zu der Denaturierungslösung (DS) in der Rinne. Mischen Sie vorsichtig durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren.

① Achten Sie beim Pipettieren darauf, benachbarte Rinnen nicht zu kontaminieren. Verwenden Sie für jede Probe eine frische sterile Pipettenspitze mit eingesetztem Filter.

10. Setzen Sie die Platte vorsichtig in den ProfiBlot 48 T ein, wenn sich das Gerät erwärmt hat, und starten Sie den Lauf.

11. Wenn der Lauf beendet ist, waschen Sie die Streifen auf der Platte für 5 Min mit destilliertem Wasser.

12. Entfernen Sie die Streifen mit einer Pinzette aus den Rinnen und legen Sie diese auf Fließpapier.

13. Lassen Sie die Streifen vollständig trocknen.

14. Richten Sie die Konjugat-Kontrolllinie auf die entsprechende Linie auf dem Auswertungsbogen aus und kleben Sie den Streifen auf den Bogen.

① Lassen Sie die Streifen vor der visuellen Auswertung vollständig trocknen.

15. Lagern Sie die entwickelten trockenen Streifen bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Fehlerbehebung

Dieser Leitfaden zur Fehlerbehebung hilft bei der Lösung auftretender Probleme. Weitere Informationen finden Sie auch auf der Seite Frequently Asked Questions in unserem Technical Support Center: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Darüber hinaus steht Ihnen unser Technischer Service (Tel.-Nr. siehe hintere Umschlagseite oder unter www.qiagen.com) unterstützend zur Seite, falls Sie Fragen zum Protokoll oder zu anderen Angaben in diesem Handbuch haben sollten. Das Team besteht aus erfahrenen Wissenschaftlern, die Ihnen in allen molekularbiologischen Fragen gerne weiterhelfen.

Kommentare und Vorschläge

Schwache oder gar keine Signale auf allen Streifen, einschließlich der Konjugat-Kontrolllinie

- | | |
|---|--|
| a) Manuelles Verfahren: Falsche Menge Konjugat oder Substrat wurde verwendet | ① Wiederholen Sie das Farbentwicklungsprotokoll mit den gleichen Streifen.

Setzen Sie frisch verdünnte 1x Spüllösung, Konjugatlösung und Substratlösung an. |
| b) Automatisiertes Verfahren: Falsche Menge Konjugat oder Substrat wurde verwendet | ① Wiederholen Sie den Test mit neuen Streifen und Puffern mit dem gleichen amplifizierten Material. |

Falsch-negative oder zu schwache Signale mit den Sondenlinien mit Ausnahme der Konjugat-Kontrolllinie

- | | |
|--|---|
| a) Unpassende Menge amplifiziertes Material wurde zur Hybridisierung zugesetzt | ① Die Konzentration des amplifizierten Materials ist aufgrund unzureichender Amplifizierung nicht ausreichend. Prüfen Sie die Menge amplifiziertes Produkt, indem Sie ein Aliquot von 10 μ l auf 2 % Agarosegel geben. Die Länge des amplifizierten HPV Produkts variiert abhängig vom HPV-Typ zwischen 139 und 148 BP. Siehe „Unzureichende Amplifizierung“ auf Seite 36 für weitere Informationen. Der Betaglobin-Amplimer weist eine Größe von 258 BP auf, ist auf dem Gel jedoch wahrscheinlich nicht sichtbar. |
|--|---|

Kommentare und Vorschläge

- b) Die Hybridisierungslösung (HS) oder die Stringent-Waschlösung (SW) wurden nicht richtig erwärmt oder gemischt
- ⓘ Erwärmen Sie vor dem Gebrauch die Hybridisierungslösung (HS) und die Stringent-Waschlösung im Wasserbad auf mindestens 37 °C. Stellen Sie sicher, dass die Temperatur 50 °C nicht überschreitet. Vor dem Gebrauch müssen alle Kristalle aufgelöst sein.
- c) **Manuelles Verfahren:** Die Temperatur hat bei der Hybridisierung und beim Stringent-Waschen 50 °C überschritten
- ⓘ Stellen Sie sicher, dass das Wasserbad auf die richtige Temperatur eingestellt ist.

Unzureichende Amplifizierung

- a) Es wurde zu viel DNA verwendet
- ⓘ Prüfen Sie die PCR durch Agarosegel-Elektrophorese. Wenn zu viel DNA zugegeben wurde, wird auf dem Gel oft ein DNA-Fleck sichtbar. Aufgrund der niedrigen Annealing-Temperatur der PCR sind einige Hintergrundbänder auf dem Gel normal. Verdünnen Sie die DNA und wiederholen Sie die Amplifikation durch Zugabe von einem Zehntel der DNA.
- b) Es wurde zu wenig DNA verwendet
- ⓘ Wiederholen Sie die Amplifizierungsreaktion und geben Sie mehr DNA hinzu.
- c) DNA-Probleme
- ⓘ Wiederholen Sie nötigenfalls die DNA-Aufreinigung. Wiederholen Sie die Amplifizierungsreaktion.
- d) Der Thermozykler wurde falsch programmiert
- ⓘ Prüfen Sie, ob die richtigen Zyklusbedingungen verwendet wurden. Kalibrieren Sie den Thermozykler nötigenfalls.

Kommentare und Vorschläge

Falsch-positive Signale

- a) Die Temperatur bei der Hybridisierung und beim Stringent-Waschen war zu niedrig
- ① Wenn die Temperatur für die Hybridisierung und das Stringent-Waschen zu niedrig ist, können unspezifische Signale auftreten. Die Temperatur muss $50 \pm 0,5$ °C betragen. Stellen Sie sicher, dass das Wasserbad richtig eingestellt ist. Schließen Sie bei der Inkubation stets den Deckel des Wasserbads.
- b) Es wurde zu viel DNA verwendet
- ① Prüfen Sie die PCR durch Agarosegel-Elektrophorese. Wenn zu viel DNA zugegeben wurde, wird auf dem Gel oft ein DNA-Fleck sichtbar. Aufgrund der niedrigen Annealing-Temperatur der PCR sind einige Hintergrundbänder auf dem Gel normal. Verdünnen Sie die DNA und wiederholen Sie die Amplifikation durch Zugabe von einem Zehntel der DNA.
- c) Kontaminierung
- ① Wenn ein ähnliches unspezifisches Muster auf den meisten Streifen auftritt, kann eine Kontaminierung vorliegen. Eine Kontaminierung kann bei der Handhabung der klinischen Proben, bei der DNA-Aufreinigung oder beim Durchführen der PCR passiert sein. Wiederholen Sie deshalb die Amplifizierungsreaktion mit frisch angesetzten Lösungen und/oder wiederholen Sie das DNA-Aufreinigungsverfahren. Wenn die negative DNA-Kontrolle negativ ist, die Proben jedoch positiv bleiben, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Kontaminierung beim Umgang mit den klinischen Proben passiert ist.
- d) **Manuelles Verfahren:** Die Hybridisierungslösung (HS) oder die Stringent-Waschlösung (SW) wurden nicht richtig erwärmt oder gemischt
- ① Erwärmen Sie vor dem Gebrauch die Hybridisierungslösung (HS) und die Stringent-Waschlösung im Wasserbad auf mindestens 37 °C. Stellen Sie sicher, dass die Temperatur 50 °C nicht überschreitet. Vor dem Gebrauch müssen alle Kristalle aufgelöst sein.

Kommentare und Vorschläge

Verfärbung oder weißer Fleck in der Mitte des Streifens oder ungleiche Färbung

- a) **Manuelles Verfahren:** Konjugat wurde falsch verdünnt oder überschüssiges Konjugat wurde nicht richtig weggespült
- ① Wiederholen Sie das Farbentwicklungsverfahren mit den gleichen Streifen.
- Erhöhen Sie die Schüttelgeschwindigkeit und stellen Sie sicher, dass die Streifen vollständig in das Reagenz eintauchen.

Starke Hintergrundfarbe

- a) **Manuelles Verfahren:** Konjugat wurde falsch verdünnt oder überschüssiges Konjugat wurde nicht richtig weggespült
- ① Wiederholen Sie den Test mit neuen Streifen beginnend mit dem Denaturierungsschritt (Schritt 7 des Protokoll 4: Nachweis von amplifizierter HPV-DNA mit einem automatisierten Verfahren oder Schritt 1 des Protokoll 1: Nachweis von amplifizierter HPV-DNA mit einem manuellen Verfahren – Hybridisierung). Verwenden Sie das gleiche amplifizierte Material. Stellen Sie sicher, dass die Streifen sich bei den Waschschrinen mit 1x Spüllösung beim Farbentwicklungsverfahren in den Rinnen hin und her bewegen. Waschen Sie die Streifen für mindestens 1 Min.
- b) **Manuelles Verfahren:** Streifen wurden zu lange in Substratlösung inkubiert
- ① Wiederholen Sie den Test mit neuen Streifen beginnend mit dem Denaturierungsschritt (Schritt 7 beim automatisierten Protokoll oder Schritt 1 des Protokoll 1: Nachweis von amplifizierter HPV-DNA mit einem manuellen Verfahren – Hybridisierung). Verwenden Sie das gleiche amplifizierte Material. Stellen Sie sicher, dass die Streifen sich bei den Waschschrinen mit 1x Spüllösung beim Farbentwicklungsverfahren in den Rinnen hin und her bewegen. Waschen Sie die Streifen für mindestens 1 Min.
- c) **Automatisiertes Verfahren:** Nicht genug Puffer angesetzt
- ① Stellen Sie sicher, dass Sie ausreichend Puffer ansetzen. Siehe „Ansetzen der Reagenzien für das automatisierte Verfahren“ auf Seite 20 für weitere Informationen.

Kommentare und Vorschläge

- d) **Automatisiertes Verfahren:** Die Kapillaren, die den Puffer verteilen, wurden nicht korrekt in die Puffergefäße eingetaucht
- e) **Automatisiertes Verfahren:** Die Streifen wurden zu lange in der 1x Spüllösung gelassen
- ⓘ Stellen Sie sicher, dass Sie die Kapillaren richtig in die Puffergefäße eintauchen.
- ⓘ Die Streifen können nicht länger als über Nacht im Gerät gelassen werden. Wiederholen Sie den Test mit neuen Streifen. Verwenden Sie das gleiche amplifizierte Material.

Schwache Signale für die Linie der Betaglobinsonde

Die PCR wurde entwickelt, um HPV-DNA optimal nachzuweisen.

ⓘ Es ist möglich, dass bei manchen DNA-Zubereitungsverfahren oder Proben typen das Betaglobinsignal stets schwach oder nicht vorhanden ist, und die Proben sind deshalb nicht unbedingt ungültig. Setzen Sie sich bitte mit unserem Technischen Service in Verbindung.

Anhang A: Auswertung der Ergebnisse

Positives Ergebnis

Das Vorhandensein einer sichtbaren Linie wird als eine positive Reaktion angesehen. Die Auswertung des Testergebnisses ist direkt mit dem Sondennamen des HPV-Typs gekoppelt (z. B. bedeutet eine purpurrote Farbe auf der Sondenlinie HPV16 die Gegenwart des HPV-Typs 16). Es können mehrere HPV-Typen in einer einzelnen Probe vorhanden sein.

Qualitätskontrolle

Die erste positive Linie ist die Konjugat-Kontrolllinie (unmittelbar unterhalb der Markierungslinie). Diese Linie ermöglicht eine Kontrolle für die Zugabe der reaktiven Konjugat- und Substratlösung beim Nachweisverfahren. Sie muss stets positiv sein und muss etwa die gleiche Intensität auf allen Streifen eines einzelnen Testlaufs aufweisen. Wenn die Kontrollzone nicht sichtbar ist, ist der Lauf ungültig. Die letzte Sondenlinie wird als die interne Kontrolle verwendet. Sie reagiert mit der co-amplifizierten DNA des menschlichen Genoms, die in der klinischen Probe vorhanden ist. Dies wird als eine interne Kontrolle verwendet, um die PCR-Inhibition sowie eine ausreichende Probenahme und/oder DNA-Isolierung zu prüfen. Wenn in der Probe HPV vorhanden ist, kann die Betaglobin-Sondenlinie aufgrund der PCR-Konkurrenz negativ sein, da die HPV-DNA bevorzugt amplifiziert wird.

Tabelle 15. Ergebnisanalyse

Konjugat-Kontrolle	HPV-Ergebnis	Betaglobin	Ergebnis	Kommentar
+	+	+	gültig	
+	+	-	gültig	HPV-DNA wird bevorzugt amplifiziert, was zum Fehlen des Betaglobinsignals führen kann (PCR-Konkurrenz)
+	-	+	gültig	
-	+/-	+/-	ungültig	Wiederholen Sie den Nachweisassay mit dem gleichen Amplimer

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Konjugat-Kontrolle	HPV-Ergebnis	Betaglobin	Ergebnis	Kommentar
+	-	-	ungültig	Entweder die DNA-Aufreinigung oder die PCR ist fehlgeschlagen. Wiederholen Sie den gesamten Assay beginnend mit der DNA-Aufreinigung durch die PCR und reverse Hybridisierung mit der ursprünglichen Probe. Setzen Sie sich mit unserem Technischen Service in Verbindung, wenn wieder das gleiche Ergebnis erhalten wird.

Anhang B: Kontaminationskontrolle bei der PCR

Es ist äußerst wichtig, bei jedem PCR-Ansatz wenigstens eine Negativkontrolle einzubeziehen, der die Template-Nukleinsäure fehlt, um eine mögliche Kontamination erkennen zu können. Bei der Negativkontrolle darf nur die Konjugat-Kontrolllinie positiv sein.

Empfehlungen für Labor-Design und -verfahren

Der folgende Verfahrensablauf wird empfohlen:

1. Vorbereitung und Aliquotierung der PCR-Mischungen
2. Probenvorbereitung (DNA-Isolierung)
3. Amplifikation
4. Analyse der biotinylierten PCR-Produkte durch reverse Hybridisierung

Das an den Schritten 3 und 4 beteiligte Personal darf nicht anschließend am gleichen Tag an den Schritten 1 und 2 arbeiten. Ebenso darf das am Schritt 2 beteiligte Personal nicht anschließend am gleichen Tag am Schritt 1 arbeiten.

Um eine Kontamination (z. B. mit Amplifikationsprodukten) von Proben zu verhindern und falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden, muss das Verfahren in drei physisch getrennten Räumen durchgeführt werden, wobei jeder mit einem eigenen Bestandsatz und eigenen Pipetten ausgestattet ist. Ein Raum ist für die Vorbereitung der Reagenzien, ein anderer für die Probenvorbereitung und ein dritter Raum für die Amplifikation und den PCR-Produktnachweis bestimmt. Alle Geräte müssen in dem Raum verbleiben, in dem diese verwendet werden. Sie dürfen nicht in einen der anderen Räume gelangen. Zum Pipettieren müssen zur Minimierung von wechselseitiger Kontamination zwischen den Proben Filterspitzen verwendet werden. Tragen Sie darüber hinaus Einmalhandschuhe, und wechseln Sie diese häufig.

Raum 1: Dieser Raum darf nur zur Lagerung und zur Vorbereitung von PCR-Reagenzien verwendet werden. Der Raum und dessen Ausstattung müssen frei von Amplifikationsprodukten gehalten werden. Das Laborpersonal muss saubere Laborkittel tragen, die nicht außerhalb dieses Raumes getragen werden dürfen. Einmalhandschuhe sind stets zu tragen.

Raum 2: Dieser Raum wird zur Probenvorbereitung verwendet und muss frei von Amplifikationsprodukten gehalten werden. Das Laborpersonal muss saubere Laborkittel tragen, die nicht außerhalb dieses Raumes getragen werden dürfen. Bei der Probenvorbereitung müssen Einmalhandschuhe häufig gewechselt werden. Öffnen Sie Röhrchen mit verarbeiteter Probe vorsichtig, um wechselseitige Kontaminationen zu vermeiden. Vermeiden Sie das gleichzeitige Öffnen von mehr als einem Reaktionsröhrchen mit Probe.

Raum 3: Dieser Raum wird für die Amplifikation und den Nachweis von PCR-Produkten verwendet. Das Laborpersonal muss saubere Laborkittel tragen, die nicht außerhalb dieses Raumes getragen werden dürfen und täglich gewechselt werden müssen. Beim Arbeiten mit Amplifikationsprodukten müssen Einmalhandschuhe getragen werden.

Der *digene* HC2 High-Risk HPV Test und das *digene* Genotyping RH Test, Detection Kit können im gleichen Raum durchgeführt werden. Führen Sie dabei die Probenverarbeitung, -denaturierung und den Transfer zur Hybridisierungsplatte für den HC2-Test vor dem Betreten des Testlabors für den HC2- und Genotypen-RH-Nachweis (Raum 3) durch. Dies verhindert, dass die ursprünglichen Proben, die in Raum 2 bearbeitet werden müssen, den in Raum 3 verwendeten PCR-Produkten ausgesetzt werden.

Im Fall einer Kontamination können Labortische, Geräte und Pipetten dekontaminiert werden, indem sie mit DNA AWAY und RNase AWAY (Molecular BioProducts) oder einer 1/10 Verdünnung einer handelsüblichen Bleichmittellösung gereinigt werden.*† Danach müssen die Tische und Pipetten mit RNase-freiem Wasser gespült werden.

Allgemeine chemische Vorsichtsmaßnahmen

Wir empfehlen die Lagerung der PCR-Stammlösungen in kleinen Aliquoten und die Verwendung von frischen Aliquoten für jede PCR.

Literatur

QIAGEN unterhält eine große und aktuelle Online-Datenbank mit wissenschaftlichen Publikationen zur Nutzung von QIAGEN-Produkten. Umfangreiche Suchoptionen ermöglichen Ihnen, die benötigten Artikel entweder durch eine einfache Stichwortsuche oder durch Angabe der Anwendung, des Forschungsbereichs, des Titels usw. zu finden.

Eine komplette Literaturliste finden Sie in der QIAGEN Literaturdatenbank online unter www.qiagen.com/RefDB/search.asp. Oder wenden Sie sich an QIAGEN Technical Services oder an Ihren Händler vor Ort.

* Die meisten handelsüblichen Bleichmittellösungen enthalten etwa 5,25 % Natriumhypochlorit. Natriumhypochlorit ist reizend und muss mit Vorsicht behandelt werden.

† Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und Schutzbrille. Weitere Informationen finden Sie in den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (MSDSs), die beim Hersteller erhältlich sind.

Zitierte Literatur

1. van den Brule, A. J., Pol R., Fransen-Daalmeije, N., Schouls, L. M., Meijer, C. J., and Snijders, P. J. (2002) GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol* **40**, 779.

Frei bleibende Seite

Frei bleibende Seite

Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Katalog-Nr.
<i>digene</i> HPV Genotyping RH Test (20)	<i>digene</i> HPV Genotyping RH Test, Amplification Kit, <i>digene</i> HPV Genotyping RH Test, Detection Kit	613413
Verwandte Produkte		
QIAamp MinElute Virus Spin Kit (50)	Für 50 Mini-Präparationen: 50 QIAamp MinElute Säulen, QIAGEN Protease, Carrier-RNA, Puffer, Probenahmeröhrchen (2 ml)	57704
EZ1 [®] DSP Virus Kit (48)	Für 48 Präparationen viraler Nukleinsäure: gefüllte Reagenzienkartuschen, Einmalspitzenhalter, Einmalfilterspitzen, Probengefäße, Elutionsgefäße, Puffer, Carrier-RNA	62724

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Anwendungseinschränkungen finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit- oder Geräte-Handbuch. QIAGEN Kit- und Geräte-Handbücher stehen unter www.qiagen.com zur Verfügung oder können Sie vom QIAGEN Technischen Service oder dem für Sie zuständigen Außendienstmitarbeiter oder Distributor anfordern.

Markennamen: QIAGEN®, QIAamp®, *digene*®, EZ1®, MinElute® (QIAGEN-Gruppe); Finnpipette® (Thermo Electron OY); ThinPrep®, PreservCyt® (Hologic); ProClin® (Rohm and Haas Company).

Eingeschränkte Lizenzvereinbarung

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Anwender des *digene* HPV Genotyping RH Test, Detection Kits die folgenden Bedingungen an:

1. Das *digene* HPV Genotyping RH Test, Detection Kit darf nur gemäß den Angaben im *digene HPV Genotyping RH Test, Detection Kit Handbuch* und mit den Komponenten, die im Kit geliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen ihrer geistigen Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zum Kit gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zum Kit gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der im *digene HPV Genotyping RH Test, Detection Kit Handbuch* und in zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen, beschriebenen Anwendungen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieses Kit und/oder seine Verwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzt.
3. Dieses Kit und seine Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN schließt außer der ausdrücklich gewährten Lizenz jede weitere Lizenzgewährung aus, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Kits stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder Anderen Schritte zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im oben stehenden Sinn führen könnten oder diese erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Lizenzvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Durchsetzung dieser eingeschränkten Lizenzvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder dessen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Lizenzbedingungen finden Sie unter www.qiagen.com.

© 2010 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 03-9840-9800 ■ 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

China ■ Orders 021-3865-3865 ■ Fax 021-3865-3965 ■ 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 02-33430-420 ■ Fax 02-33430-426 ■ Technical 800-787980

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

Korea (South) ■ Orders 1544 7145 ■ Fax 1544 7146 ■ Technical 1544 7145

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

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

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

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

Singapore ■ Orders 65-67775366 ■ Fax 65-67785177 ■ Technical 65-67775366

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

