



# Manual de uso del kit *artus*<sup>®</sup> HSV-1/2 RG PCR

 24 (ref. 4500263)  
 96 (ref. 4500265)

Versión 1

**IVD**

Diagnóstico *in vitro* cualitativo

Para utilizar con los instrumentos Rotor-Gene<sup>®</sup> Q

**CE**

**REF** 4500263, 4500265

**HB** 1060171ES

 QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANIA

**R2** **MAT** 1060171ES



## **QIAGEN: Tecnologías de tratamiento de muestras y ensayos de biología molecular**

QIAGEN es el proveedor líder de tecnologías innovadoras para el tratamiento 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 tratamiento 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](http://www.qiagen.com).

# Contenido

<b>Contenido del kit</b>	<b>4</b>
<b>Símbolos</b>	<b>4</b>
<b>Almacenamiento</b>	<b>5</b>
<b>Uso previsto</b>	<b>5</b>
<b>Limitaciones de uso del producto</b>	<b>6</b>
<b>Asistencia técnica</b>	<b>6</b>
<b>Control de calidad</b>	<b>6</b>
<b>Información sobre seguridad</b>	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
<b>Introducción</b>	<b>8</b>
Principio	8
Información sobre el patógeno	8
Características de rendimiento	9
<b>Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario</b>	<b>17</b>
<b>Notas importantes</b>	<b>18</b>
Precauciones generales	18
Aislamiento de ADN	18
Control interno	19
<b>Protocolo</b>	
■ <b>PCR y análisis de los datos</b>	<b>20</b>
<b>Guía de resolución de problemas</b>	<b>31</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>34</b>
<b>Información para pedidos</b>	<b>35</b>

## Contenido del kit

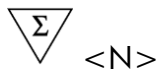
Kit <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR		(24)	(96)
Referencia		4500263	4500265
Número de reacciones		24	96
Azul	Mezcla maestra HSV-1/2 RG	2 x 300 µl	8 x 300 µl
Amarillo	HSV-1/2 RG Mg-Sol* <b>Mg-Sol</b>	600 µl	600 µl
Rojo	HSV-1 RG PC <sup>†</sup> (100 cop/µl)	200 µl	200 µl
Marrón	HSV-2 RG PC <sup>†</sup> (100 cop/µl)	200 µl	200 µl
Verde	HSV-1/2 RG IC <sup>‡</sup> <b>IC</b>	1000 µl	2 x 1000 µl
Blanco	Agua (de calidad para PCR)	1000 µl	1000 µl
	Manual 	1	1

\* Solución de magnesio.

† Control positivo.

‡ Control interno.

## Símbolos



Contiene reactivos para <N> pruebas



Fecha de caducidad



Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*



Referencia










Número de lote



Número de material



Componentes


	Contiene
	Número
	Número mundial de artículo comercial
	Limitación de temperatura
	Fabricante legal
	Consultar la información proporcionada en el manual
	Nota importante

## Almacenamiento

Los componentes del kit *artus* HSV-1/2 RG PCR deben almacenarse a una temperatura de  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  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 los reactivos se van a utilizar sólo de forma intermitente, deben dividirse en partes para congelarlos. El almacenamiento a  $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  no debe superar las 5 horas.

## Uso previsto

El kit *artus* HSV-1/2 RG PCR es un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) en tiempo real para la detección y la discriminación del ADN de los virus del herpes simple humano de tipos 1 (VHS-1) y 2 (VHS-2) utilizando los instrumentos Rotor-Gene Q después de la purificación totalmente automatizada de muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) procedentes de sujetos con infección por el VHS utilizando el kit EZ1<sup>®</sup> DSP Virus.

 El kit *artus* HSV-1/2 RG PCR no puede utilizarse con instrumentos Rotor-Gene Q 2plex.

El kit *artus* HSV-1/2 RG PCR se ha diseñado para utilizarse en combinación con la presentación clínica y otros marcadores de laboratorio para realizar un pronóstico de la enfermedad.

## Limitaciones de uso del producto

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

Este producto debe ser utilizado únicamente por personal con formación y preparación específicas en los procedimientos de diagnóstico *in vitro* (EN 375).

Para obtener resultados óptimos con la PCR es necesario un cumplimiento estricto de la guía 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.

## Asistencia técnica

En QIAGEN nos enorgullecemos de la calidad y de la disponibilidad de nuestra asistencia técnica. Nuestros departamentos de servicio técnico cuentan con científicos expertos con amplia experiencia en los aspectos prácticos y teóricos de las tecnologías para el tratamiento de muestras y ensayos de biología molecular y en el uso de los productos de QIAGEN®. Si desea formular cualquier pregunta o si tiene dificultades con el kit *artus* HSV-1/2 RG PCR o con los productos de QIAGEN en general, no dude en ponerse en contacto con nosotros.

Los clientes de QIAGEN son una importante fuente de información sobre los usos avanzados o especializados de nuestros productos. Esta información es de utilidad para otros científicos, además de para los investigadores de QIAGEN. Por este motivo, lo animamos a ponerse en contacto con nosotros si tiene cualquier sugerencia sobre el rendimiento de nuestros productos o sobre nuevas aplicaciones y técnicas.

Para recibir asistencia técnica y solicitar más información, visítenos en nuestro Centro de Servicio Técnico (Technical Support Center) en [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) o póngase en contacto telefónico con uno de los departamentos de servicio técnico de QIAGEN o con los distribuidores locales (consulte la contraportada o visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote de kit *artus* HSV-1/2 RG PCR se analiza en relación con especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad de los productos.

## Advertencias y precauciones

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) correspondientes. Estas fichas están disponibles online en un formato PDF cómodo y compacto en [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), donde podrá encontrar, visualizar e imprimir la ficha de datos de seguridad correspondiente a cada kit y a cada componente del kit de QIAGEN®.

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

## Introducción

El kit *artus* HSV-1/2 RG PCR constituye un sistema listo para usar para la detección del ADN del VHS-1 y del VHS-2 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en los instrumentos Rotor-Gene Q. La mezcla maestra HSV-1/2 RG contiene los reactivos y las enzimas necesarios para la amplificación específica de una región de 154 pb del genoma del VHS-1 y del VHS-2, así como para la detección directa del amplicón específico en el canal de fluorescencia Cycling Green (fuente 470 nm, detector 510 nm) y en el canal de fluorescencia Cycling Orange (fuente 585 nm, detector 610 nm) de los instrumentos Rotor-Gene Q.

Además, el kit *artus* HSV-1/2 RG PCR contiene un segundo sistema de amplificación heteróloga para comprobar si se ha producido una inhibición de la PCR. Esto se detecta como un control interno (*internal control*, IC) en el canal de fluorescencia Cycling Yellow (fuente 530 nm, detector 555 nm) de los instrumentos Rotor-Gene Q. El límite de detección de la PCR para el VHS-1 y el VHS-2 con los instrumentos RG (consulte "Sensibilidad analítica" en la página 9) no se reduce. Se suministran controles positivos externos (HSV-1 RG PC y HSV-2 RG PC).

## Principio

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 fluorocromos. Estos fluorocromo suelen estar ligados a sondas oligonucleotídicas que se unen específicamente al producto amplificado. La monitorización de las intensidades de fluorescencia durante el proceso 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 finalizado el proceso de PCR.\*

## Información sobre el patógeno

El virus del herpes simple (VHS) está presente en el líquido de las lesiones, la saliva, el líquido cefalorraquídeo (LCR) y las secreciones vaginales. Se transmite principalmente mediante contacto directo con las lesiones y mediante las relaciones sexuales, así como de forma perinatal. Las lesiones de la piel y las mucosas de la boca y los genitales caracterizan a la mayoría de los casos de positividad para el VHS. La infección por el VHS puede ser primaria (> 90 % de estos casos son asintomáticos) o recurrente (secundaria). La infección primaria por el VHS-1 puede causar, entre otros trastornos, gingivostomatitis, eccema

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

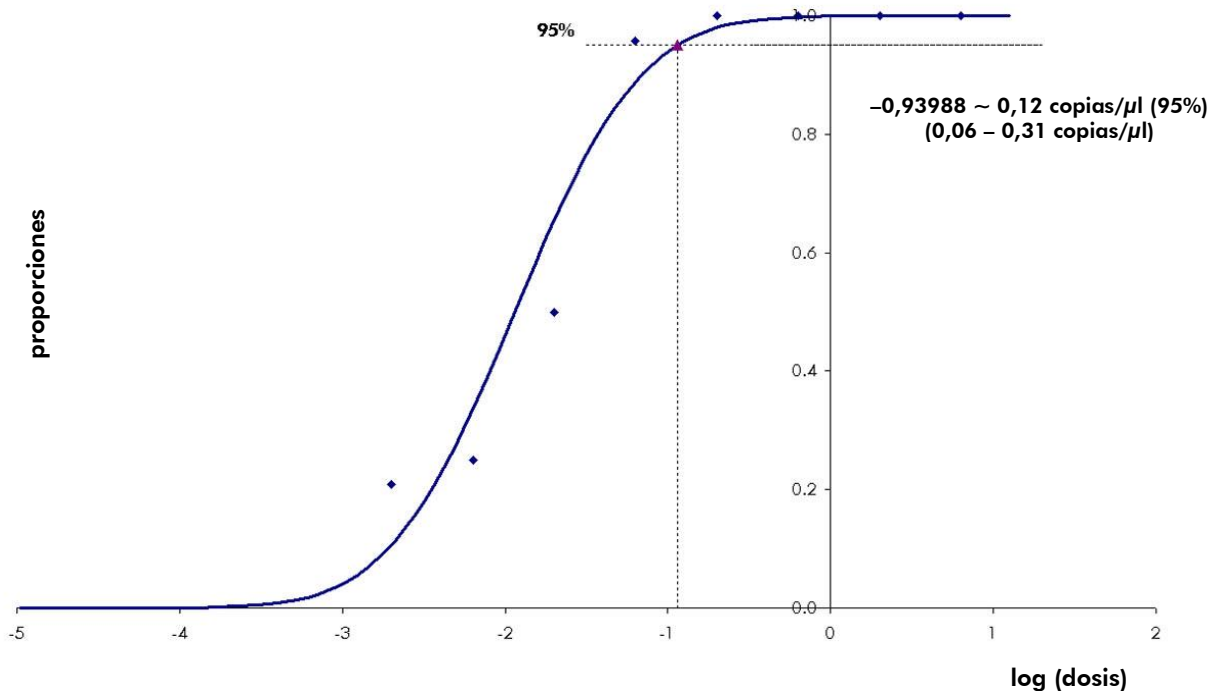


herpético, queratoconjuntivitis y encefalitis; la infección primaria por el VHS-2 se manifiesta por (entre otros trastornos) vulvovaginitis, meningitis y herpes generalizado en el recién nacido. Los síntomas principales de una infección secundaria son las lesiones cutáneas en la nariz, la boca y la región genital. Son incluso más intensas las formas recidivantes de queratoconjuntivitis y de meningitis.

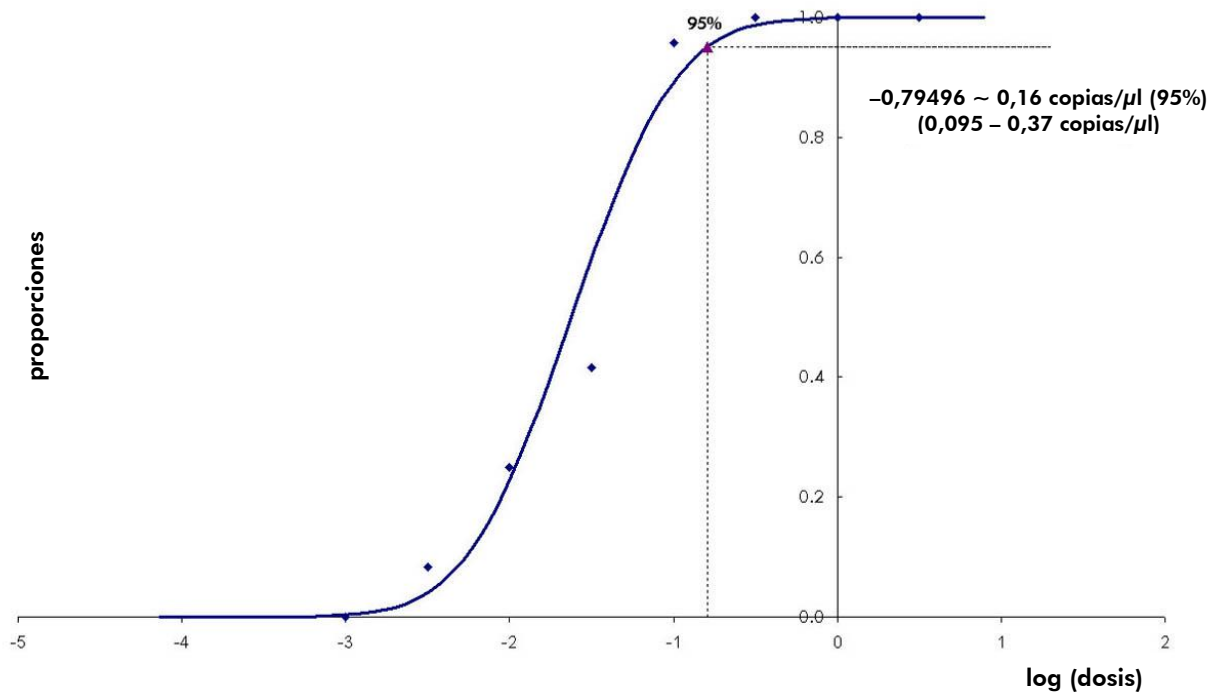
## Características de rendimiento

### Sensibilidad analítica

Para determinar la sensibilidad analítica del kit *artus* HSV-1/2 RG PCR, se estableció una serie de dilución estándar de 10 a 0,001 copias/ $\mu$ l y se analizó en el instrumento Rotor-Gene Q/6000 en combinación con el kit *artus* HSV-1/2 RG PCR. El análisis se realizó en 3 días diferentes con 8 duplicados. Los resultados se determinaron mediante un análisis probit. El límite de detección analítica del kit *artus* HSV-1/2 RG PCR en combinación con el instrumento Rotor-Gene Q/6000 es uniformemente de 0,12 copias/ $\mu$ l ( $p = 0,05$ ) para el VHS-1 y de 0,16 copias/ $\mu$ l ( $p = 0,05$ ) para el VHS-2. Esto significa que hay una probabilidad del 95% de detectar 0,12 copias/ $\mu$ l del ADN del VHS-1 o 0,16 copias/ $\mu$ l del ADN del VHS-2. En la figura 1, a continuación, se muestra una ilustración gráfica del análisis probit para el VHS-1; el diagrama del análisis probit para el VHS-2 se muestra en la Figura 2.



**Figura 1. Análisis probit: VHS-1 (Rotor-Gene Q/6000).** Sensibilidad analítica para el VHS-1 del kit *artus* HSV-1/2 RG PCR en el instrumento Rotor-Gene Q/6000.



**Figura 2. Análisis probit: VHS-2 (Rotor-Gene Q/6000).** Sensibilidad analítica para el VHS-2 del kit *artus* HSV-1/2 RG PCR en el instrumento Rotor-Gene Q/6000.

## Especificidad

La especificidad del kit *artus* HSV-1/2 RG PCR está garantizada en primer y principal lugar por la selección de los cebadores y las sondas, así como por la selección de condiciones de reacción rigurosas. Los cebadores y las sondas se evaluaron para detectar posibles homologías respecto a todas las secuencias publicadas en bancos de genes mediante análisis de comparación de secuencias. Por consiguiente, queda garantizada la detectabilidad de todos los genotipos relevantes mediante una alineación de bases de datos y mediante un proceso de PCR en los instrumentos Rotor-Gene con las cepas que aparecen en la tabla 1.

Además, la especificidad se validó con 30 muestras de LCR diferentes negativas para el VHS-1 y para el VHS-2. Éstas no generaron ninguna señal con los cebadores y las sondas específicos del VHS-1 y del VHS-2, que están incluidos en la mezcla maestra HSV-1/2 RG.

Se evaluó una posible reactividad cruzada del kit *artus* HSV-1/2 RG PCR utilizando el grupo de control que aparece en la tabla 2. Ninguno de los patógenos analizados fue reactivo.

**Tabla 1. Análisis de la especificidad de genotipos relevantes**

<b>Virus</b>	<b>Cepa</b>	<b>Fuente</b>	<b>VHS-1 (Cycling Green)</b>	<b>VHS-2 (Cycling Orange)</b>	<b>Control interno (Cycling Yellow)</b>
VHS-1	HF	ATCC*	+	–	+
VHS-1	KOS	INSTAND†	+	–	+
VHS-1	MacIntyre	QCMD‡	+	–	+
VHS-2	HG-52	NCPV§	–	+	+
VHS-2	G	ATCC*	–	+	+
VHS-2	MS	QCMD‡	–	+	+

\* ATCC: American Type Culture Collection.

† INSTAND: Society for Promotion of Quality Assurance in the Medical Laboratories.

‡ QCMD: Quality Control for Molecular Diagnostics.

§ NCPV: National Collection of Pathogenic Viruses.

**Tabla 2. Análisis de la especificidad del kit con patógenos con posible reactividad cruzada**

<b>Grupo de control</b>	<b>VHS-1 (Cycling Green)</b>	<b>VHS-2 (Cycling Orange)</b>	<b>Control interno (Cycling Yellow)</b>
Virus herpético humano 3 (virus de la varicela-zóster)	-	-	+
Virus herpético humano 4 (virus de Epstein-Barr)	-	-	+
Virus herpético humano 5 (citomegalovirus)	-	-	+
Virus herpético humano 6A	-	-	+
Virus herpético humano 6B	-	-	+
Virus herpético humano 7	-	-	+
Virus herpético humano 8 (virus herpético asociado al sarcoma de Kaposi)	-	-	+
Virus de la hepatitis A	-	-	+
Virus de la hepatitis B	-	-	+
Virus de la hepatitis C	-	-	+
Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)	-	-	+
Virus humano de tipo 1 de la leucemia de células T	-	-	+
Virus humano de tipo 2 de la leucemia de células T	-	-	+
Enterovirus	-	-	+
Parvovirus B19	-	-	+
Virus del Nilo Occidental	-	-	+

## Precisión

Los datos de precisión del kit *artus* HSV-1/2 RG PCR se han obtenido mediante los instrumentos Rotor-Gene y permiten determinar la varianza total del ensayo. La varianza total consiste en la variabilidad intraensayo (variabilidad de múltiples resultados de muestras de la misma concentración dentro de un mismo experimento), la variabilidad entre ensayos (variabilidad de múltiples resultados del ensayo generados en diferentes instrumentos del mismo tipo por diferentes operadores en un mismo laboratorio) y la variabilidad entre lotes (variabilidad de múltiples resultados del ensayo utilizando diversos lotes). Los datos obtenidos se utilizaron para determinar la desviación estándar, la varianza y el coeficiente de variación para la PCR específica del patógeno y para la PCR del control interno.

Los datos de precisión del kit *artus* HSV-1/2 RG PCR se han obtenido utilizando ADN del VHS-1 y del VHS-2 con la concentración de 10 copias/ $\mu$ l. El análisis se realizó con 8 duplicados. Los datos de precisión se calcularon en función de los valores de  $C_T$  de las curvas de amplificación ( $C_T$ : ciclo de umbral; consulte las tablas 3 y 4). En función de estos resultados, la dispersión estadística global de cualquier muestra dada con la concentración mencionada es de 1,82% ( $C_T$ ) para el VHS-1, de 0,67% ( $C_T$ ) para el VHS-2 y de 1,24% ( $C_T$ ) y 1,58% ( $C_T$ ) respectivamente para la detección del control interno. Estos valores se basan en la totalidad de todos los valores individuales de la variabilidad determinada.

**Tabla 3. Datos de precisión para el VHS-1 en función de los valores de  $C_T$**

	<b>Valor de <math>C_T</math></b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Coficiente de variación (%)</b>
Variabilidad intraensayo: 10 copias/ $\mu$ l del VHS-1	30,46	0,25	0,81
Variabilidad intraensayo: Control interno	25,29	0,08	0,3
Variabilidad entre ensayos: 10 copias/ $\mu$ l del VHS-1	29,69	0,69	2,05
Variabilidad entre ensayos: Control interno	24,97	0,31	1,25
Variabilidad entre lotes: 10 copias/ $\mu$ l del VHS-1	29,95	0,40	1,35
Variabilidad entre lotes: Control interno	24,90	0,30	1,20
Varianza total: 10 copias/ $\mu$ l del VHS-1	29,91	0,55	1,82
Varianza total: Control interno	24,99	0,31	1,24

**Tabla 4. Datos de precisión para el VHS-2 en función de los valores de  $C_T$**

	<b>Valor de <math>C_T</math></b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Coefficiente de variación (%)</b>
Variabilidad intraensayo: 10 copias/ $\mu$ l del VHS-2	29,85	0,15	0,50
Variabilidad intraensayo: Control interno	25,17	0,39	1,55
Variabilidad entre ensayos: 10 copias/ $\mu$ l del VHS-2	29,92	0,15	0,49
Variabilidad entre ensayos: Control interno	25,11	0,41	1,63
Variabilidad entre lotes: 10 copias/ $\mu$ l del VHS-2	29,80	0,23	0,79
Variabilidad entre lotes: Control interno	24,89	0,33	1,32
Varianza total: 10 copias/ $\mu$ l del VHS-2	29,88	0,20	0,67
Varianza total: Control interno	25,07	0,40	1,58

## **Solidez**

La verificación de la solidez permite determinar la tasa de fracaso total para el kit *artus* HSV-1/2 RG PCR. Para obtener títulos virales muy bajos del VHS-1 y del VHS-2, se añadieron a 30 muestras de LCR negativas 0,36 copias/ $\mu$ l de volumen de elución de ADN del VHS-1 o 0,48 copias/ $\mu$ l de volumen de elución de ADN del VHS-2 (concentración tres veces el límite de sensibilidad analítica). Tras la extracción utilizando el kit EZ1 DSP Virus, estas muestras se analizaron con el kit *artus* HSV-1/2 RG PCR. Las 30 muestras se evaluaron correctamente como positivos débiles para cada tipo de VHS, con una tasa de fracaso del 0%. Además, la solidez del control interno se evaluó mediante la purificación y el análisis de 30 muestras de LCR negativas para el VHS-1 y para el VHS-2. No se detectó ninguna inhibición de la PCR, de modo que se obtuvo una tasa de fracaso total del 0%. Por consiguiente, la solidez del kit *artus* HSV-1/2 RG PCR es  $\geq 99\%$ .

## **Reproducibilidad**

Los datos de reproducibilidad permiten realizar una valoración regular del rendimiento del kit *artus* HSV-1/2 RG PCR, así como una comparación de la eficiencia con otros productos. Estos datos se obtienen mediante la participación en programas de competencia establecidos.



## Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario

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

- Kit de aislamiento del ADN (consulte “Aislamiento de ADN” en la página 18)
- Pipetas (ajustables)\*
- Puntas de pipeta estériles con filtro
- Agitador vorticial\*
- Centrifugadora de mesa\* con rotor para tubos de reacción de 2 ml
- Instrumento Rotor-Gene Q o Rotor-Gene\*<sup>†</sup> con canales de fluorescencia Cycling Green, Cycling Orange y Cycling Yellow
- Software Rotor-Gene Q, versión 1.7.94 y superiores (software Rotor-Gene 6000 versión 1.7.65 y superiores)
- Tubos en tira y tapones, 0,1 ml, para utilizar con el rotor de 72 pocillos (ref. 981103 ó 981106)
- Otra opción: tubos de PCR de 0,2 ml, para utilizar con el rotor de 36 pocillos (ref. 981005 ó 981008)
- Bloque de refrigeración (bloque de carga, 72 tubos de 0,1 ml, ref. 9018901, o bloque de carga, 96 tubos de 0,2 ml, ref. 9018905)

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

<sup>†</sup> El kit *artus* HSV-1/2 RG PCR no puede utilizarse con instrumentos Rotor-Gene Q 2plex.

# Notas importantes

## Precauciones generales

El usuario debe prestar atención a los siguientes aspectos en todo momento:

- 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 lugar físicamente separado.
- Descongele todos los componentes totalmente a temperatura ambiente (15–25 °C) antes de comenzar un ensayo.
- Una vez descongelados, mezcle los componentes (mediante pipeteo repetido arriba y abajo 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).

## Aislamiento de ADN

El kit EZ1 DSP Virus (QIAGEN, ref. 62724\*) está validado para la purificación de ADN viral a partir de LCR humano para utilizarse con el kit *artus* HSV-1/2 RG PCR. Realice la purificación del ADN viral según las instrucciones del *Manual de uso del kit EZ1 DSP Virus*.

ⓘ El kit *artus* HSV-1/2 RG PCR no debe utilizarse con métodos de aislamiento a base de fenol.

ⓘ El uso de ARN transportador es esencial para la eficiencia de la extracción y, por consiguiente, para el rendimiento de ADN. Añada la cantidad apropiada de ARN transportador a cada extracción según las instrucciones del *Manual del uso del kit EZ1 DSP Virus*.

ⓘ El control interno del kit *artus* HSV-1/2 RG PCR se puede utilizar directamente en el procedimiento de aislamiento (consulte “Control interno”, a continuación).

\* El kit EZ1 DSP Virus también está disponible como kits EASYartus® HSV-1/2 RG PCR con el marcado CE-IVD, combinados con el kit *artus* HSV-1/2 RG PCR (encontrará la información para pedidos en la página 35).

## Control interno

Se suministra un control interno (HSV-1/2 RG IC). Esto permite al usuario controlar el procedimiento de aislamiento del ADN y comprobar si se ha producido una inhibición de la PCR. Para esta aplicación, añada el control interno al aislado en una proporción de 0,1  $\mu$ l por 1  $\mu$ l de volumen de elución. Por ejemplo, utilizando el kit EZ1 DSP Virus, el ADN se eluye en 60  $\mu$ l de tampón de elución (AVE). Por consiguiente, deben añadirse inicialmente 6  $\mu$ l de control interno.

**i** No añada el control interno y el ARN transportador al material de muestra directamente.

Otra opción es utilizar el control interno exclusivamente para comprobar si se ha producido una inhibición de la PCR. Para esta aplicación, añada el control interno directamente a la mezcla de mezcla maestra HSV-1/2 RG y HSV-1/2 RG Mg-Sol, según se describe en el paso 2b del protocolo (página 21).

## Protocolo: PCR y análisis de los datos

### **Cuestiones importantes antes de comenzar**

- Antes de comenzar el procedimiento, lea el apartado “Notas importantes” en la página 18.
- Tómese tiempo para familiarizarse con el instrumento Rotor-Gene Q antes de iniciar el protocolo. Consulte el manual de usuario del instrumento.
- Asegúrese de que se incluyan los controles positivos y un control negativo (agua, de calidad para PCR) para cada procesamiento de PCR.

### **Antes de comenzar**

- Asegúrese de que el bloque de refrigeración (accesorio del instrumento Rotor-Gene Q) esté prerrefrigerado a 2–8 °C.
- Antes de cada uso, todos los reactivos deben ser descongelados completamente, mezclados (mediante pipeteo repetido arriba y abajo 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 está utilizando el control interno para controlar el procedimiento de aislamiento del ADN y para comprobar si se ha producido una inhibición de la PCR, siga el paso 2a.**  
**Si está utilizando el control interno exclusivamente para comprobar si se ha producido una inhibición de la PCR, siga el paso 2b.**  
**Utilice el control interno de acuerdo con el paso 2b para todos los controles positivos y negativos.**
- 2a. El control interno ya se ha añadido al aislado (consulte “Control interno” en la página 19). En este caso, prepare una mezcla maestra tal como se indica en la tabla 5.**

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

**Tabla 5. Preparación de la mezcla maestra (el control interno se utiliza para controlar el procedimiento de aislamiento del ADN y para comprobar si se ha producido una inhibición de la PCR)**

<b>Número de muestras</b>	<b>1</b>	<b>12</b>
Mezcla maestra HSV-1/2 RG	25 $\mu$ l	300 $\mu$ l
HSV-1/2 RG Mg-Sol	5 $\mu$ l	60 $\mu$ l
HSV-1/2 RG IC	0 $\mu$ l	0 $\mu$ l
<b>Volumen total</b>	<b>30 <math>\mu</math>l</b>	<b>360 <math>\mu</math>l</b>

**2b. El control interno debe añadirse directamente a la mezcla de HSV-1/2 RG y HSV-1/2 RG Mg-Sol. En este caso, prepare una mezcla maestra tal como se indica en la tabla 6.**

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

**Tabla 6. Preparación de la mezcla maestra (el control interno se utiliza exclusivamente para comprobar si se ha producido una inhibición de la PCR)**

<b>Número de muestras</b>	<b>1</b>	<b>12</b>
Mezcla maestra HSV-1/2 RG	25 $\mu$ l	300 $\mu$ l
HSV-1/2 RG Mg-Sol	5 $\mu$ l	60 $\mu$ l
HSV-1/2 RG IC	2 $\mu$ l	24 $\mu$ l
<b>Volumen total</b>	<b>32 <math>\mu</math>l*</b>	<b>384 <math>\mu</math>l*</b>

\* El aumento del volumen causado por la adición del control interno no se tiene en cuenta al preparar el ensayo de PCR. La sensibilidad del sistema de detección no se ve alterada.

**3. Pipetee 30  $\mu$ l de la mezcla maestra en cada tubo de PCR. A continuación añada 20  $\mu$ l del ADN de la muestra eluido (consulte la tabla 7), y mezcle bien pipeteando repetidamente arriba y abajo. En correspondencia, deben utilizarse 20  $\mu$ l de HSV-1 RG PC y HSV-2 RG PC como controles positivos y 20  $\mu$ l de agua (agua, de calidad para PCR) como control negativo.**

**Tabla 7. Preparación del ensayo de PCR**

<b>Número de muestras</b>	<b>1</b>	<b>12</b>
Mezcla maestra	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l cada una
Muestra	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l cada una
<b>Volumen total</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>	<b>50 <math>\mu</math>l cada una</b>

- 4. Cierre los tubos de PCR. Asegúrese de que el anillo de bloqueo (accesorio del instrumento Rotor-Gene) esté colocado en la parte superior del rotor para prevenir la apertura accidental de los tubos durante el procesamiento.**
- 5. Para la detección del ADN del VHS-1 o del VHS-2, cree un perfil de temperatura siguiendo los pasos que se detallan a continuación.**

<b>Configuración de los parámetros generales del ensayo</b>	<b>Figuras 3, 4, 5</b>
<b>Activación inicial de la enzima hot-start</b>	<b>Figura 6</b>
<b>Amplificación del ADN</b>	<b>Figura 7</b>
<b>Ajuste de la sensibilidad de los canales de fluorescencia</b>	<b>Figura 8</b>
<b>Inicio del procesamiento</b>	<b>Figura 9</b>

Todas las especificaciones se refieren al software Rotor-Gene Q versión 1.7.94 y superiores, software Rotor-Gene 6000 versión 1.7.65 y superiores. Puede encontrar más información acerca de la programación de los instrumentos Rotor-Gene en la guía del usuario del instrumento. En las ilustraciones, estos valores de configuración aparecen recuadrados en negrita. Se incluyen ilustraciones para los instrumentos Rotor-Gene Q.

6. En primer lugar, abra el cuadro de diálogo "New Run Wizard" (Asistente para nuevo procesamiento) con la versión "Advanced" (Avanzada) (figura 3). Marque la casilla "Locking Ring Attached" (Anillo de bloqueo acoplado) y haga clic en "Next" (Siguiete).

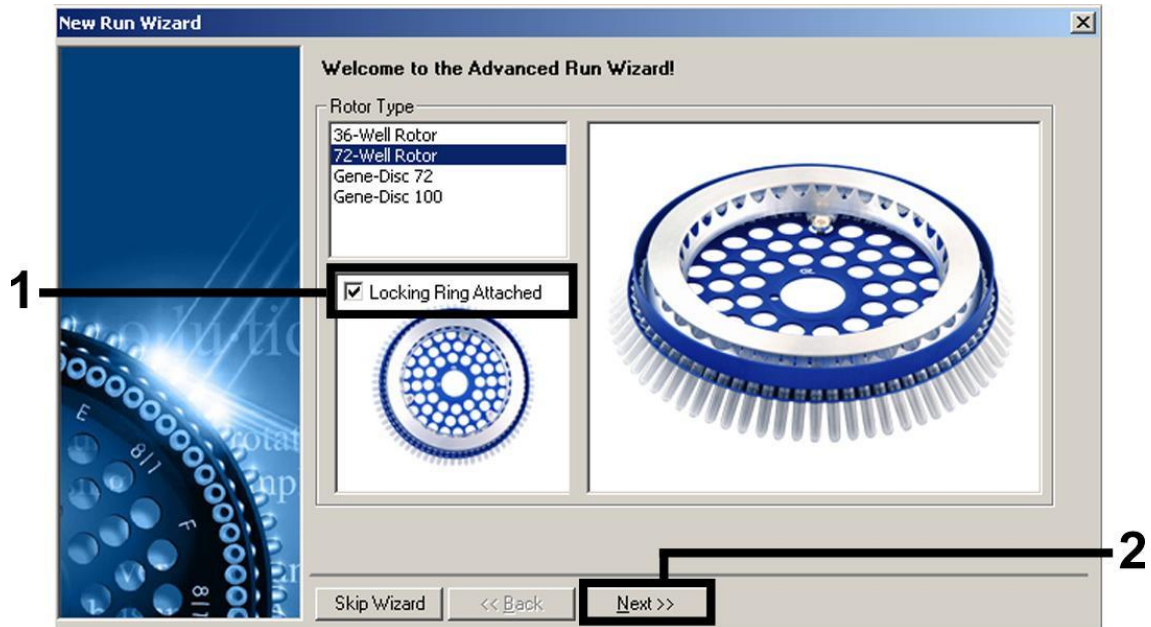


Figura 3. Cuadro de diálogo "New Run Wizard".

7. Seleccione 50 en el campo "Reaction Volume ( $\mu\text{L}$ ):" (Volumen de reacción [ $\mu\text{l}$ ]:) y haga clic en "Next" (figura 4).

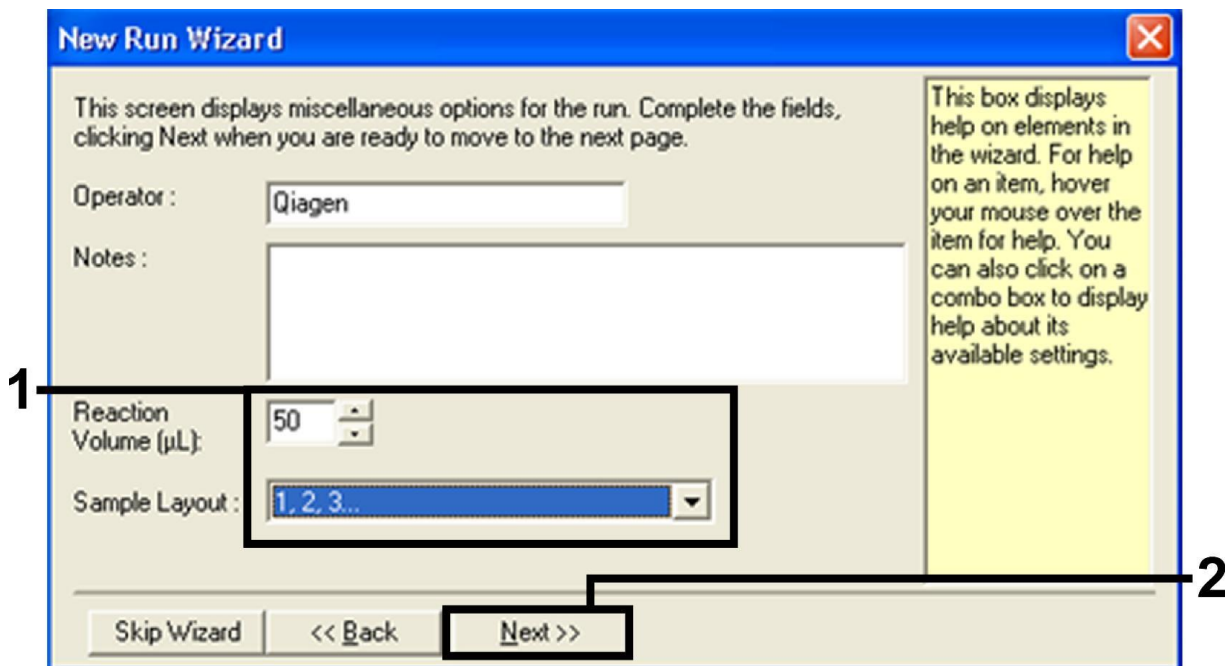


Figura 4. Configuración de los parámetros generales del ensayo.

8. Haga clic en el botón "Edit Profile" (Editar perfil) en el siguiente cuadro de diálogo "New Run Wizard" (figura 5) y programe el perfil de temperatura tal como se muestra en las figuras 6-7.

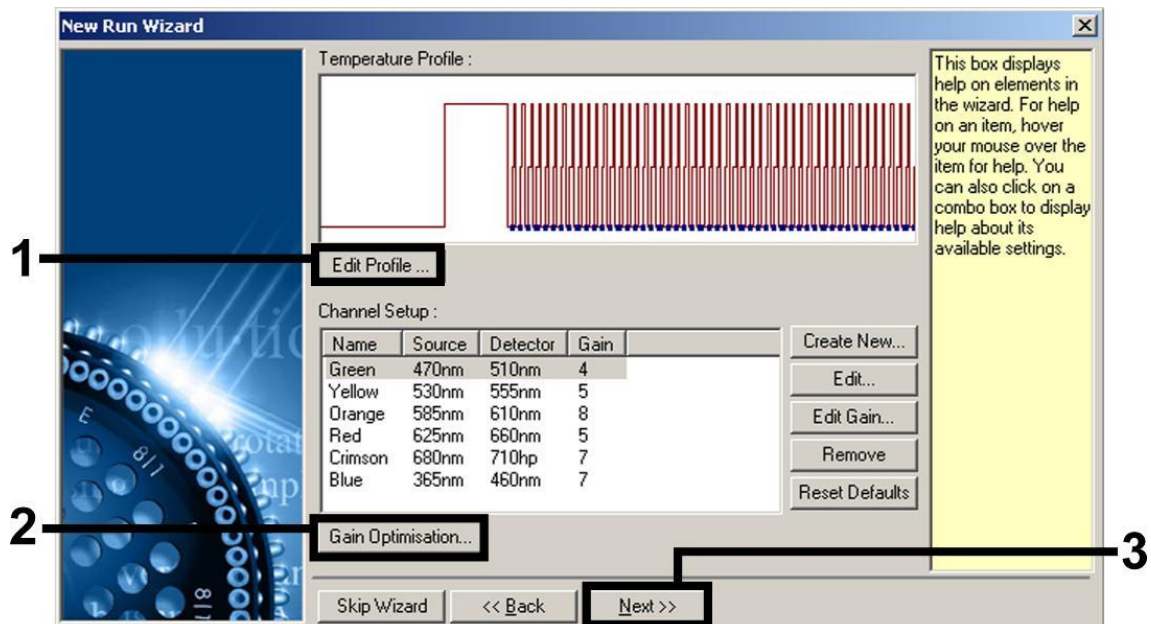


Figura 5. Edición del perfil.



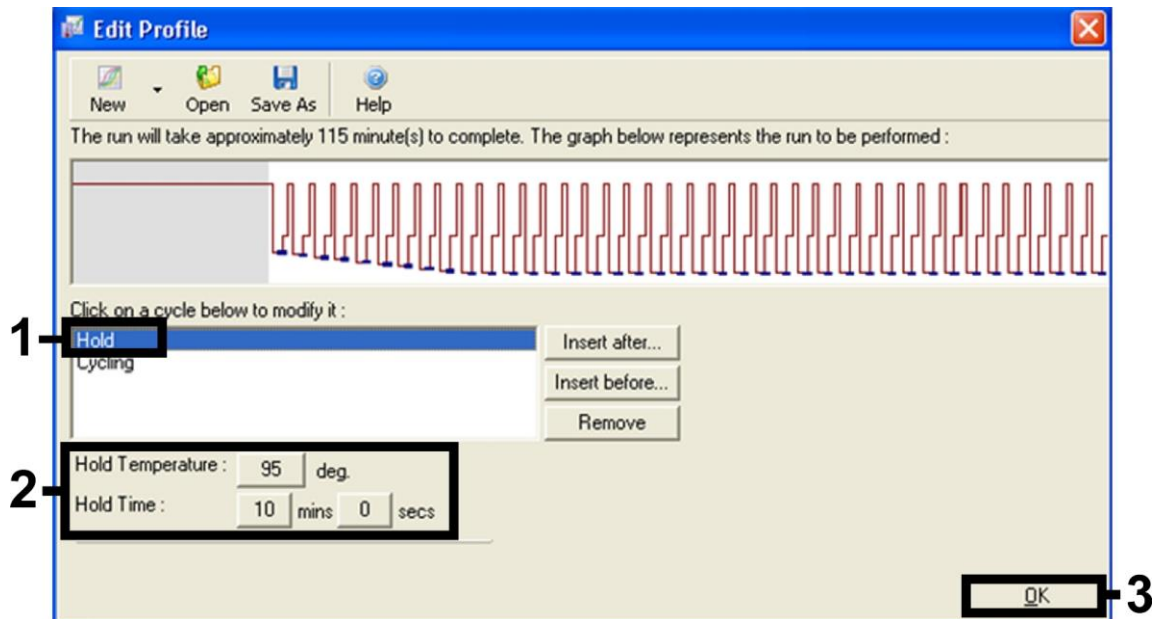


Figura 6. Activación inicial de la enzima *hot-start*.

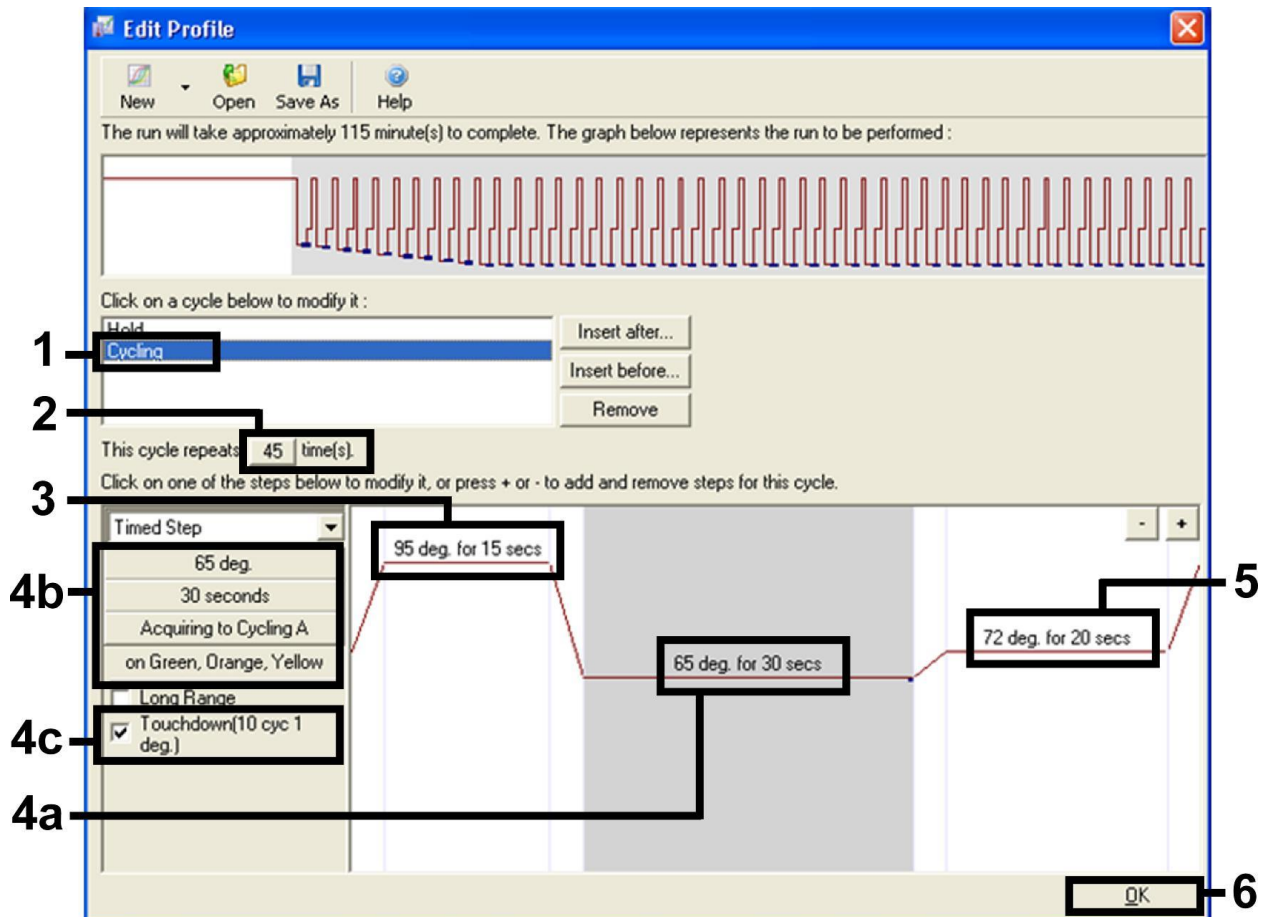


Figura 7. Amplificación del ADN. Asegúrese de activar la función Touchdown para 10 ciclos en el paso de renaturalización.

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 el paso 2) para abrir el cuadro de diálogo "Auto-Gain Optimisation Setup" (Configuración de la optimización de ganancia automática) (figura 8). Configure la temperatura de calibración en 65 para que coincida con la temperatura de renaturalización del programa de amplificación (figura 7, paso 4b). Asegúrese de que los tres canales (Green, Orange y Yellow) estén seleccionados para "Auto-Gain Optimisation". (Busque los canales en el menú desplegable en "Channel Settings" [Configuración de canales] y haga clic en "Add" [Añadir].) Haga clic en "Start" (Iniciar) para comenzar la optimización de ganancia. Haga clic en "Close" (Cerrar) en el cuadro de diálogo de "Auto-Gain Optimisation Setup" cuando la calibración de ganancia haya finalizado.

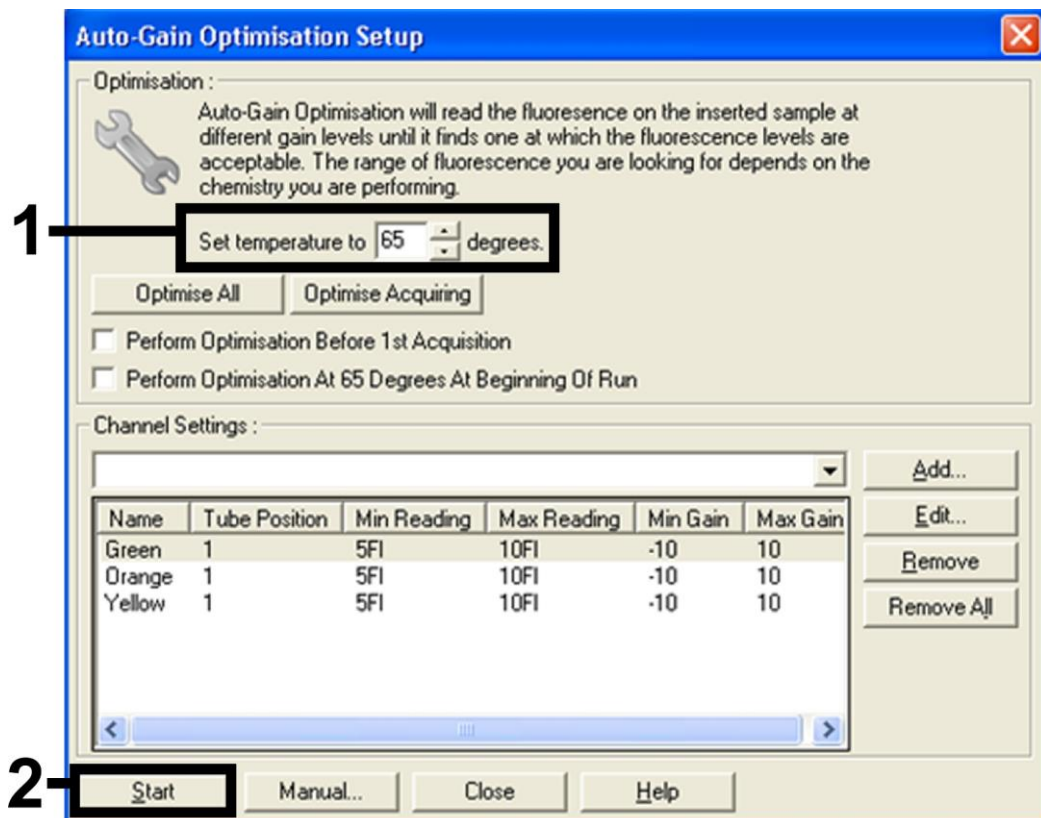


Figura 8. Ajuste de la sensibilidad de los canales de fluorescencia.

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 9). Haga clic en "Start Run" (Iniciar procesamiento).

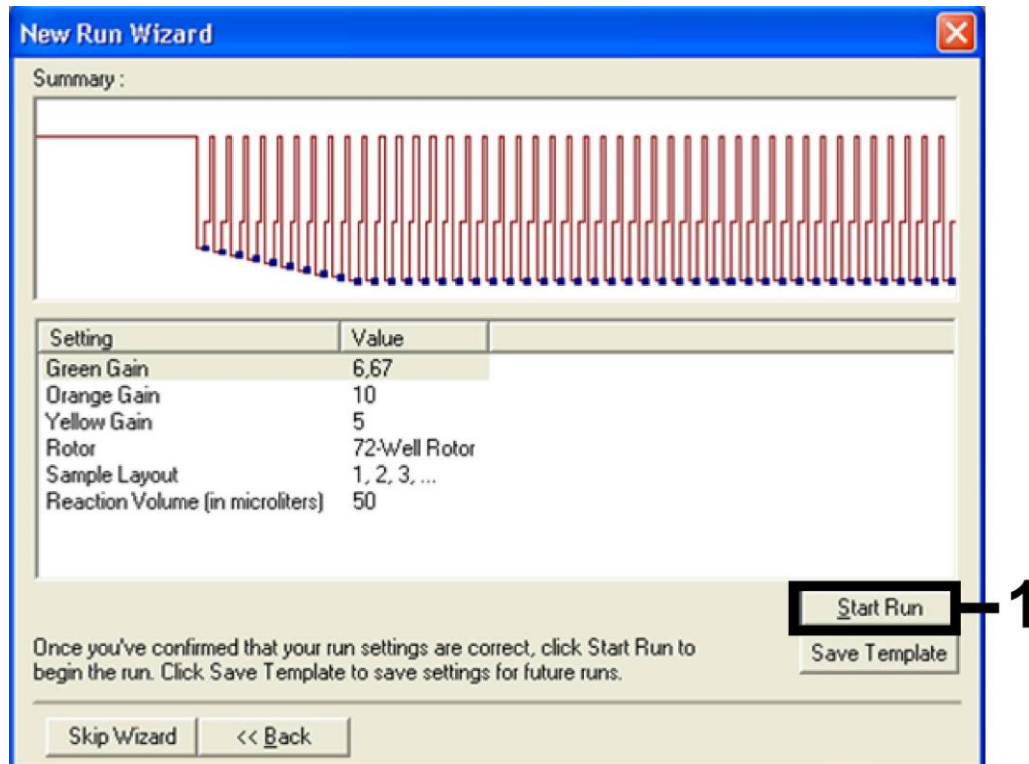


Figura 9. Inicio del procesamiento.

11. Cuando el procesamiento haya finalizado, analice los datos. Son posibles los siguientes resultados (11a, 11b, 11c, 11d, 11e y 11f).

En las figuras 10, 11 y 12 se presentan ejemplos de reacciones de PCR positivas y negativas.

- 11a. Se detecta una señal en el canal de fluorescencia Cycling Green. El resultado del análisis es positivo: la muestra contiene ADN del VHS-1.

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 VHS-1 (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).

**11b. No se detecta ninguna señal en el canal de fluorescencia Cycling Green. Al mismo tiempo, aparece una señal procedente del control interno en el canal Cycling Yellow. En la muestra no hay ADN del VHS-1 detectable. Puede considerarse negativa.**

En el caso de una PCR del VHS-1 negativa, la señal detectada del control interno descarta la posibilidad de inhibición de la PCR.

**11c. Se detecta una señal en el canal de fluorescencia Cycling Orange. El resultado del análisis es positivo: la muestra contiene ADN del VHS-2.**

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 VHS-2 (señal positiva en el canal Cycling Orange) pueden dar lugar a una reducción o a la ausencia de señal de fluorescencia del control interno en el canal Cycling Yellow (competición).

**11d. No se detecta ninguna señal en el canal de fluorescencia Cycling Orange. Al mismo tiempo, aparece una señal procedente del control interno en el canal Cycling Yellow. En la muestra no hay ADN del VHS-2 detectable. Puede considerarse negativa para el VHS-2.**

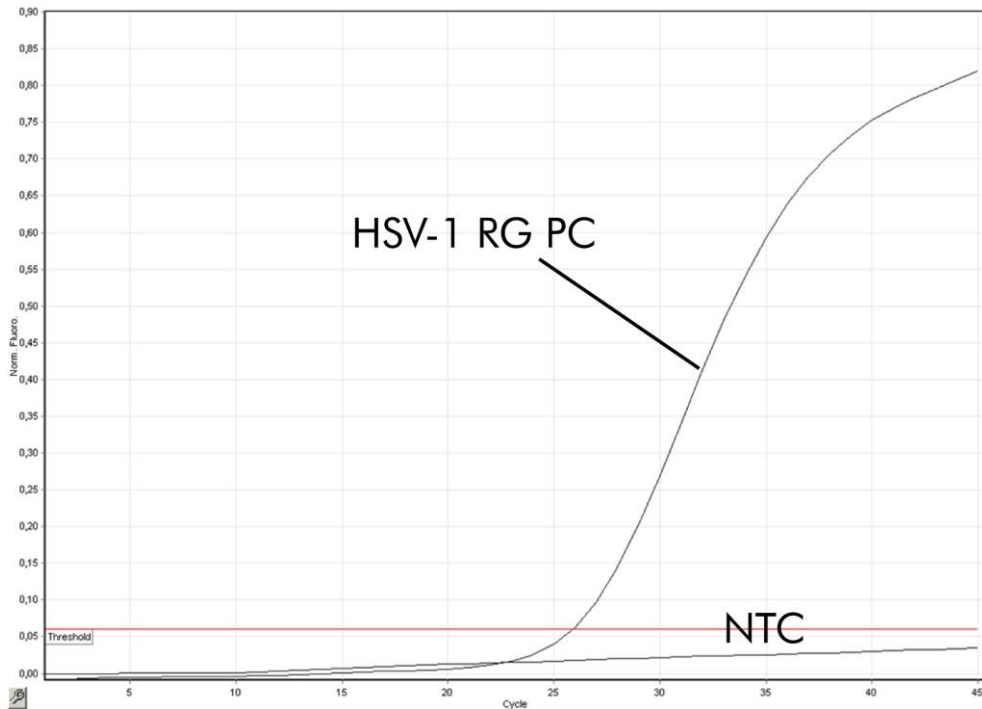
En el caso de una PCR del VHS-2 negativa, la señal detectada del control interno descarta la posibilidad de inhibición de la PCR.

**11e. Se detecta una señal en los canales Cycling Green y Cycling Orange. El resultado del análisis es positivo: la muestra contiene ADN del VHS-1 además de ADN del VHS-2.**

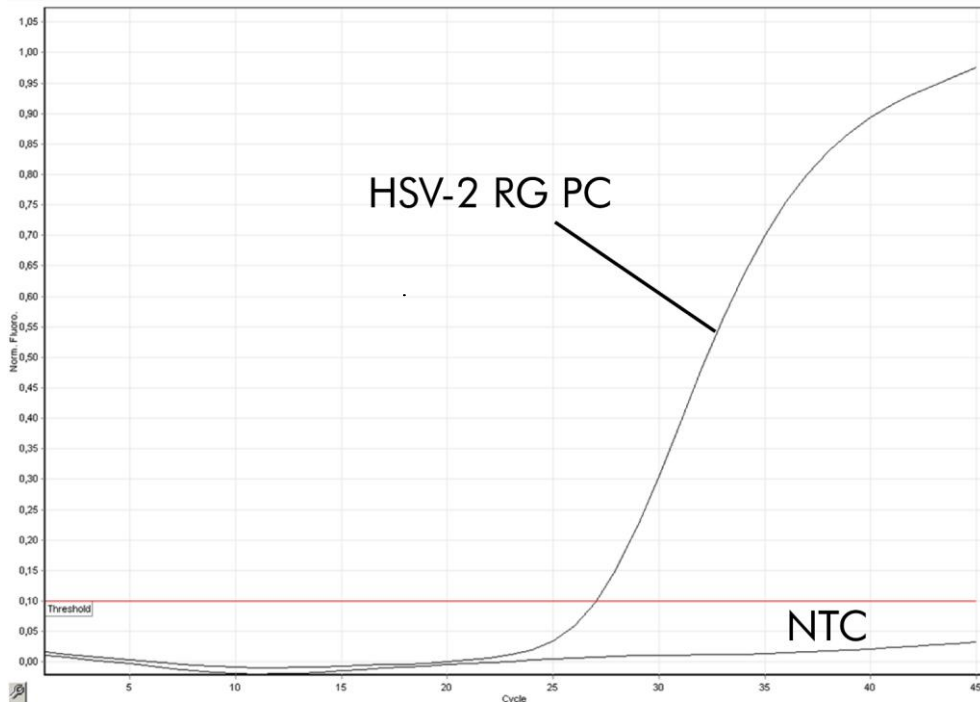
En este caso, la detección de una señal en el canal Cycling Yellow no es imprescindible, ya que las concentraciones altas iniciales de ADN tanto del VHS-1 como del VHS-2 (señal positiva en los canales Cycling Green y Cycling Orange) pueden dar lugar a una reducción o a la ausencia de señal de fluorescencia del control interno en el canal Cycling Yellow (competición).

**11f. No se detecta ninguna señal en los canales Cycling Green, Cycling Orange y Cycling Yellow. No puede obtenerse un resultado.**

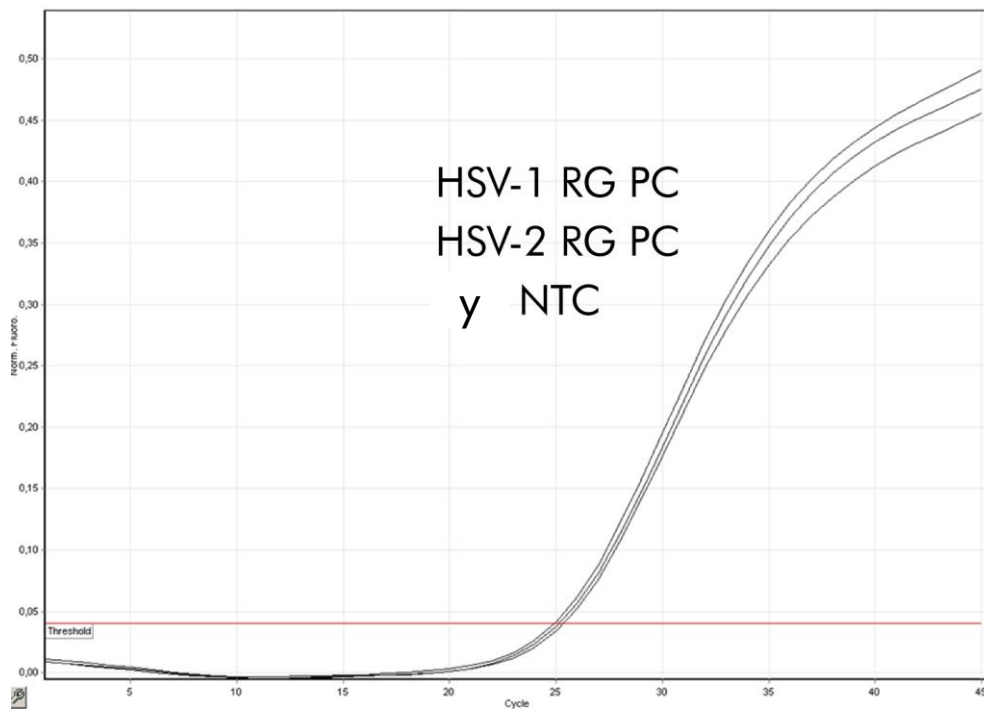
Puede encontrarse información acerca de las fuentes de error y su solución en el apartado "Guía de resolución de problemas" en la página 31.



**Figura 10. Detección del control positivo del VHS-1 (HSV-1 RG PC) en el canal de fluorescencia Cycling Green. NTC: Sin control de plantilla (control negativo).**



**Figura 11. Detección del control positivo del VHS-2 (HSV-2 RG PC) en el canal de fluorescencia Cycling Orange. NTC: Sin control de plantilla (control negativo).**



**Figura 12. Detección del control interno (IC) en el canal de fluorescencia Cycling Yellow con amplificación simultánea de los controles positivos (HSV-1 RG PC y HSV-2 RG PC). NTC: Sin control de plantilla (control negativo).**

## Guía de 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 (*Frequently Asked Questions, FAQ*) de nuestro Centro de Asistencia Técnica: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Los científicos del Servicio Técnico de QIAGEN se encargarán 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 contraportada o en [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

### Comentarios y sugerencias


---

#### **Ausencia de señal con los controles positivos (HSV-1 RG PC y HSV-2 RG PC) en los canales de fluorescencia Cycling Green o Cycling Orange**






- |  |   |
|--|---|
| a) El canal de fluorescencia seleccionado para el análisis de los datos de PCR no cumple el protocolo  | ① Para el análisis de los datos, seleccione los canales de fluorescencia Cycling Green y Cycling Orange para la PCR analítica del VHS-1 y VHS-2 y el canal de fluorescencia Cycling Yellow para la PCR del control interno. |
| b) Programación incorrecta del perfil de temperatura del instrumento Rotor-Gene  | ① Compare el perfil de temperatura con el protocolo. Consulte “Protocolo: PCR y análisis de los datos” en la página 20.   |
| c) Configuración incorrecta de la PCR  | ① Compruebe los pasos de trabajo mediante el esquema de pipeteo, y repita la PCR en caso necesario. Consulte “Protocolo: PCR y análisis de los datos” en la página 20.  |
| d) Las condiciones de almacenamiento de uno o más de los componentes del kit no cumplan las instrucciones indicadas en el apartado “Almacenamiento” (página 5) | ① 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.   |

## Comentarios y sugerencias

---

- e) El kit *artus* HSV-1/2 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 de una muestra de LCR negativa sometida a purificación con el kit EZ1 DSP Virus en el canal de fluorescencia Cycling Yellow y ausencia simultánea de una señal en el canal Cycling Green o en el canal Cycling Orange**

- 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 utilizar el método de aislamiento recomendado y siga meticulosamente las instrucciones del fabricante.
- c) Se perdió ADN durante la extracción  Si se añadió 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 utilizar el método de aislamiento recomendado (consulte "Aislamiento de ADN" en la página 18) y siga meticulosamente las instrucciones del fabricante.
- d) Las condiciones de almacenamiento de uno o más de los componentes del kit no cumplían las instrucciones indicadas en el apartado "Almacenamiento" (página 5)  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* HSV-1/2 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.



## Comentarios y sugerencias

---

### Señales con los controles negativos en los canales de fluorescencia Cycling Green o Cycling Orange de la PCR analítica

- a) Se produjo contaminación durante la preparación de la PCR
- ① Repita la PCR con nuevos reactivos en duplicados.
  - ① Si es posible, cierre los tubos de PCR inmediatamente después de añadir la muestra que se desea analizar.
  - ① Asegúrese de pipetear en último lugar los controles positivos.
  - ① Asegúrese de descontaminar el espacio de trabajo y los instrumentos a intervalos regulares.
- b) Se produjo contaminación durante la extracción
- ① Repita la extracción y la PCR de la muestra que se desea analizar utilizando nuevos reactivos.
  - ① Asegúrese de descontaminar el espacio de trabajo y los instrumentos a intervalos regulares.

## Bibliografía

QIAGEN mantiene online una base de datos extensa y actualizada de publicaciones científicas en las que se utilizan los productos de QIAGEN. Las opciones integrales 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](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) o póngase en contacto con los servicios técnicos de QIAGEN o con su distribuidor local.

## Información para pedidos

Producto	Contenido	Referencia
<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (24)	Para 24 reacciones: mezcla maestra, solución Mg, 2 controles positivos, control interno, agua (de calidad para PCR)	4500263
<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (96)	Para 96 reacciones: mezcla maestra, solución Mg, 2 controles positivos, control interno, agua (de calidad para PCR)	4500265
<b>Kit EZ1 DSP Virus: para la purificación de ácidos nucleicos virales a partir de LCR humano con fines de diagnóstico <i>in vitro</i></b>		
EZ1 DSP Virus Kit	Para 48 preparaciones de ácido nucleico viral: cartuchos de reactivo precargados, portapuntas desechables, puntas con filtro desechables, tubos de muestra, tubos de elución, tampones, ARN transportador.	62724
<b>Kits EASY<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR: para la purificación de muestras y la detección de patógenos automatizada integrada totalmente conforme con el marcado CE-IVD</b>		
EASY <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit 1	Para 48 preparaciones de ácido nucleico viral y 24 ensayos: 1 kit EZ1 DSP Virus, 1 kit <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR (24)	EA10023
EASY <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit 2	Para 48 preparaciones de ácido nucleico viral y 48 ensayos: 1 kit EZ1 DSP Virus, 2 kits <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR (24)	EA10024

<b>Producto</b>	<b>Contenido</b>	<b>Referencia</b>
<b>Rotor-Gene Q y accesorios</b>		
Rotor-Gene Q 5plex HRM	Cicladora 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, garantía de 1 año para piezas y mano de obra.	Consultar
Loading Block 72 x 0,1 ml Tubes	Bloque de aluminio para la preparación manual de las reacciones con un pipeta monocal en 72 tubos de 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0,2 ml Tubes	Bloque de aluminio para la preparación manual de las reacciones en una matriz estándar 8 x 12 utilizando 96 tubos de 0,2 ml	9018905
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250)	250 tiras de 4 tubos y tapas para 1000 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)	1000 tubos de pared fina para 1000 reacciones	981005
PCR Tubes, 0,2 ml (10000)	10 x 1000 tubos de pared fina para 10 000 reacciones	981008

Para obtener información actualizada sobre licencias y sobre exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual o la guía del usuario del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales y los manuales de usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) o pueden solicitarse al Servicio Técnico de QIAGEN o a su distribuidor local.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco.





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

Marcas comerciales: QIAGEN®, *artus*®, EZ1®, EASYartus®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group).

El kit *artus* HSV-1/2 RG PCR y el kit EZ1 DSP Virus son kits de diagnóstico con el marcado CE conforme a la Directiva Europea sobre diagnóstico *in vitro* 98/79/CE. No disponible en todos los países.

#### **Acuerdo de licencia limitada**

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del kit *artus* HSV-1/2 RG PCR la aceptación de los siguientes términos:

1. El kit *artus* HSV-1/2 RG PCR puede utilizarse exclusivamente de acuerdo con las especificaciones del *Manual de uso del kit artus HSV-1/2 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 HSV-1/2 RG PCR* y en protocolos adicionales disponibles en [www.qiagen.com](http://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 específicamente renuncia a 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 garantía 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](http://www.qiagen.com).

© 2009-2014 QIAGEN, reservados todos los derechos.

[www.qiagen.com](http://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 55-11-5079-4000 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

**China** ■ Orders 800-988-0326 ■ Fax 800-988-0329 ■ 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

**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 02-33430-4826 ■ Technical 800-787980

**Japan** ■ Telephone 03-6890-7290 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

**Korea (South)** ■ Orders 080-000-7146 ■ 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 01-800-7742-436

**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 +65-68548184 ■ Technical 1800-742-4368

**Spain** ■ Orders +34-91-630-7050 ■ Fax +34-91-630-5145 ■ Technical +34-91-630-7050

**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

