



Manuel du kit *artus*[®] EBV RG PCR

 24 (référence 4501263)
 96 (référence 4501265)

Version 1



Diagnostics in vitro quantitatifs

Pour utilisation avec les appareils Rotor-Gene[®] Q



4501263, 4501265



1046897FR



QIAGEN GmbH, QIAGEN Straße 1, 40724 Hilden,

ALLEMAGNE

R5



1046897FR



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN est le premier fournisseur de technologies novatrices d'échantillons et d'analyses, permettant d'isoler et de détecter le contenu de n'importe quel échantillon biologique. Nos produits et services ultramodernes de grande qualité garantissent un succès total, de l'échantillon jusqu'au résultat.

QIAGEN fixe les normes en matière de :

- purification d'ADN, d'ARN et de protéines ;
- analyse d'acides nucléiques et de protéines ;
- recherche de microARN et interférence ARN ;
- automatisation des technologies d'échantillons et d'analyses.

Notre mission est de permettre à notre clientèle de réussir et d'accomplir des progrès décisifs. Pour plus d'informations, visiter www.qiagen.com.

Sommaire

Utilisation prévue	6
Résumé et description	6
Informations sur l'agent pathogène	6
Principe de la technique	6
Matériel fourni	7
Contenu du kit	7
Matériel nécessaire mais non fourni	7
Avertissements et précautions	8
Précautions générales	8
Stockage et manipulation des réactifs	9
Procédure	10
Extraction de l'ADN	10
Contrôle interne	13
Protocole : PCR et analyse des données	15
Interprétation des résultats	22
Quantification	22
Résultats	23
Résolution des principaux problèmes rencontrés	24
Contrôle qualité	27
Limites	27
Caractéristiques de performance	27
Sensibilité analytique	27
Spécificité	28
Reproductibilité	29
Références	29
Symboles	30
Coordonnées	30
Pour commander	31

Utilisation prévue

Le kit *artus* EBV RG PCR est un test d'amplification d'acide nucléique in vitro visant à quantifier l'ADN du virus d'Epstein-Barr (EBV) dans un échantillon de plasma, de sérum, de LCR ou de cellules humains. Ce kit de test de diagnostic exploite le principe de l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) et il est configuré pour une utilisation avec les appareils Rotor-Gene Q.

Résumé et description

Le kit *artus* EBV RG PCR constitue un système prêt à l'emploi pour la détection de l'ADN de l'EBV par le biais d'une amplification en chaîne par polymérase (PCR) sur les appareils Rotor-Gene Q. L'EBV RG/TM Master contient des réactifs et des enzymes pour l'amplification spécifique d'un fragment de génome de l'EBV de 97 bp et pour la détection directe de l'amplicon spécifique du canal de fluorescence Cycling Green du Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q ou Rotor-Gene 6000, ou Cycling A.FAM™ du Rotor-Gene 3000.

Le kit *artus* EBV RG PCR comprend en outre un deuxième système d'amplification hétérologue pour détecter une éventuelle inhibition de la PCR. Celui-ci est détecté en tant que contrôle interne (IC) du canal de fluorescence Cycling Yellow du Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q ou Rotor-Gene 6000, ou A.JOE™ du Rotor-Gene 3000. Ceci n'a aucune influence négative sur la limite de détection de la PCR analytique de l'EBV (voir « Sensibilité analytique », page 27). Les contrôles positifs externes (EBV RG QS 1-4) fournis permettent de déterminer la quantité d'ADN viral. Pour plus d'informations, voir « Quantification », page 22.

Informations sur l'agent pathogène

La transmission du virus d'Epstein-Barr (EBV) se fait par voie orale, principalement par salive contaminée. En général, l'infection par l'EBV, en particulier si le virus est contracté dans l'enfance, est asymptomatique. Le signe clinique d'une infection aiguë est la mononucléose infectieuse associée à de la fièvre, de la fatigue et une angine de poitrine, ainsi qu'une inflammation des ganglions lymphatiques et de la rate. Chez certains patients, ces symptômes réapparaissent de manière chronique. Des formes sévères de l'infection par l'EBV peuvent être détectées chez les patients immunodéficients et les personnes présentant des anomalies des cellules T.

Principe de la technique


Lors du diagnostic par amplification en chaîne par polymérase (PCR), des régions spécifiques du génome pathogène sont amplifiées. La détection a lieu à l'aide de marqueurs fluorescents au cours de la PCR en temps réel. Ceux-ci sont généralement couplés à des sondes oligonucléotidiques, qui se lient

spécifiquement à l'amplicon de la PCR. La détection des intensités de fluorescence durant la PCR en temps réel permet de détecter et de quantifier les produits amplifiés sans avoir à rouvrir les tubes d'échantillon après la PCR.*

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

Matériel fourni

Contenu du kit

artus EBV RG PCR Kit			(24)	(96)
Référence			4501263	4501265
Nombre de réactions			24	96
Bleu	EBV RG Master		2 x 12 réactions	8 x 12 réactions
Rouge	EBV RG QS 1* (5 x 10 ⁴ copies/μl)	QS	200 μl	200 μl
Rouge	EBV RG QS 2* (5 x 10 ³ copies/μl)	QS	200 μl	200 μl
Rouge	EBV RG QS 3* (5 x 10 ² copies/μl)	QS	200 μl	200 μl
Rouge	EBV RG QS 4* (5 x 10 ¹ copies/μl)	QS	200 μl	200 μl
Vert	EBV RG IC [†]	IC	1 000 μl	2 x 1 000 μl
Blanc	Eau (grade PCR)		1 000 μl	1 000 μl
	Manuel		1	1

* Norme de quantification.

† Contrôle interne.

Matériel nécessaire mais non fourni

Lors de la manipulation de produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées disponibles auprès du fournisseur du produit.

Réactifs

- Kit d'extraction d'ADN (voir « Extraction de l'ADN », page 10)

Consommables

- Cônes de pipettes stériles munis de filtres

- Strip Tubes and Caps (rangées de tubes et de bouchons), 0,1 ml, pour utilisation avec un rotor à 72 puits (référence 981103 ou 981106)
- Éventuellement : PCR Tubes (tubes pour réaction de PCR), 0,2 ml, pour utilisation avec un rotor à 36 puits (référence 981005 ou 981008)

Équipement

- Pipettes (réglables) *
- Mixeur Vortex*
- Centrifugeuse de paillasse* avec rotor pour tubes réactionnels de 2 ml
- Appareil Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q ou Rotor-Gene* avec canaux de fluorescence Cycling Green et Cycling Yellow ou avec canaux de fluorescence Cycling A.FAM et Cycling A.JOE
- Logiciel Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q, version 1.7.94 ou supérieure (logiciel Rotor-Gene 6000, versions 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94 ; logiciel Rotor-Gene 3000, version 6.0.23)
- Cooling block (bloc réfrigérant) (Loading Block 72 x 0,1 ml Tubes (bloc de chargement de tubes), référence 9018901, ou Loading Block 96 x 0,2 ml Tubes (bloc de chargement de tubes), référence 9018905)

Avertissements et précautions

Pour utilisation en diagnostic in vitro

Lors de la manipulation de produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, veuillez consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Elles sont disponibles en ligne au format PDF à l'adresse www.qiagen.com/safety où vous pouvez trouver, consulter et imprimer les FDS de chaque kit et composant de kit QIAGEN®.

Mettre au rebut les déchets d'échantillons et de tests conformément aux règles de sécurité locales.

Précautions générales

L'utilisateur doit toujours respecter les mesures suivantes :

- Utiliser des cônes de pipette stériles avec filtre.
- Conserver et purifier les éléments positifs (échantillons, contrôles positifs et amplicons) séparément des autres réactifs et les ajouter au mélange réactionnel dans une autre pièce.

* S'assurer que tous les instruments sont vérifiés et calibrés selon les recommandations du fabricant.

- Décongeler tous les composants pour les amener à température ambiante (15 à 25 °C) avant le début du test.
- Une fois décongelés, mélanger les composants (en pipetant plusieurs fois ou en mélangeant par vortexages brefs et répétés) et centrifuger brièvement.
- Travailler rapidement et laisser les composants dans de la glace ou dans le bloc réfrigérant (bloc de chargement pour rotor à 72/96 puits).

Stockage et manipulation des réactifs

Les composants du kit *artus* EBV RG PCR doivent être stockés à une température de –15 °C à

–30 °C et sont stables jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'étiquette.

Il convient d'éviter les cycles répétés de congélation-décongélation (> 2 x), car cela peut amoindrir la sensibilité du test. En cas d'utilisation occasionnelle, congeler les réactifs en aliquotes. Si les composants doivent être stockés entre 2 et 8 °C, la période de conservation ne doit pas dépasser 5 heures.

Procédure

Extraction de l'ADN

Les kits de QIAGEN répertoriés dans le tableau 1 sont validés pour la purification d'ADN viral à partir du type d'échantillon humain indiqué pour une utilisation avec le kit *artus* EBV RG PCR. Effectuer la purification de l'ADN viral selon les instructions figurant dans les manuels des kits.

Tableau 1. Kits de purification validés pour une utilisation avec le kit *artus* EBV RG PCR

Matériel de prélèvement	Volume d'échantillon	Kit d'isolement d'acides nucléiques	Référence (QIAGEN)	ARN entraîneur
Sérum, plasma, LCR (liquide céphalo-rachidien)	200 µl	QIAamp® DNA Mini Kit (50)	51304	Non inclus
Sérum, plasma	1 ml	QIAamp UltraSens® Virus Kit (50)	53704	Inclus
Cellules sanguines	200 µl	QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	51104	Non inclus
Plasma	400 µl	EZ1® DSP Virus Kit (48)*	62724	Inclus

* Le kit EZ1 DSP Virus est également disponible sous forme de kits EASY*artus*® EBV RG PCR, homologués CE-IVD, associés au kit *artus* EBV RG PCR (voir page 31 pour commander).

Remarque : Les tubes de prélèvement sanguin revêtus d'anticoagulants peuvent inhiber la PCR. Mais ces inhibiteurs seront éliminés lors de l'utilisation des kits d'extraction mentionnés ci-dessus. Nous recommandons de ne pas utiliser de sang hépariné.

Remarque : Le kit *artus* EBV RG PCR ne convient pas aux procédés d'extraction à base de phénol.

Utilisation du kit QIAamp DNA Blood Mini ou QIAamp DNA Mini

Remarque : L'emploi d'un ARN entraîneur est d'une importance déterminante pour l'efficacité de l'extraction et par conséquent pour le rendement en ADN/ARN. Veuillez noter que l'addition d'un entraîneur (homopolymère d'ARN Poly[rA], non inclus dans les kits QIAamp DNA Blood Mini QIAamp DNA Mini) est fortement recommandée pour extraire les acides nucléiques à partir de liquides corporels sans cellules et de matière contenant peu d'ADN et d'ARN (par ex, le LCR). Dans ces cas, préparer l'ARN entraîneur de la manière suivante.

- Remettre en suspension l'ARN entraîneur lyophilisé (homopolymère d'ARN Poly[rA], non inclus dans les kits QIAamp DNA Blood Mini et QIAamp DNA Mini) avec le tampon d'élution (ne pas utiliser le tampon de lyse) du kit d'extraction (tampon AE des kits QIAamp DNA Mini et QIAamp DNA Blood Mini) et préparer une dilution à la concentration de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Répartir cette solution d'ARN entraîneur selon le nombre de fractions aliquotes nécessaires à vos besoins et les stocker entre -15 °C et -30 °C. Éviter de répéter les étapes de congélation/décongélation (> 2 x) d'une fraction aliquote d'ARN.
- Utiliser 1 μg d'ARN entraîneur pour 100 μl de tampon de lyse. Par exemple, si le protocole d'extraction utilise 200 μl de tampon de lyse, ajouter 2 μl d'ARN entraîneur (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) directement dans le tampon de lyse (tampon AL des kits QIAamp DNA Mini et QIAamp DNA Blood Mini). Avant le début de chaque extraction, un mélange de tampon de lyse et d'ARN entraîneur (et éventuellement de contrôle interne, voir « Contrôle interne », page 13) doit être fraîchement préparé selon le schéma de pipetage présenté dans le tableau 2.

Tableau 2. Schéma de pipetage pour une utilisation avec le kit QIAamp DNA Blood Mini ou le kit QIAamp DNA Mini

Nombre d'échantillons	1	12
Tampon AL (tampon de lyse)*	par ex. 200 μl	par ex. 2 400 μl
ARN entraîneur (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	2 μl	24 μl
Volume total	202 μl	2 424 μl
Volume par extraction	200 μl	200 μl chacun

* Contient du chlorhydrate de guanidine ; voir le manuel du kit pour les informations de sécurité.

Remarque : Pour l'extraction, utiliser immédiatement le mélange de tampon de lyse et d'ARN entraîneur fraîchement préparé. Il n'est pas possible de conserver ce mélange.

Remarque : Le contrôle interne du kit *artus* EBV RG PCR peut être utilisé directement dans la procédure d'extraction (voir « Contrôle interne », page 13).

Remarque : Nous recommandons vivement d'effectuer l'étape de centrifugation 10 recommandée dans le protocole (manuel des kits *QIAamp DNA Mini et Blood Mini (QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook)*, troisième édition, avril 2010, pages 29 et 32) pour éliminer l'éthanol résiduel. Nous recommandons d'augmenter la durée de la centrifugation à 3 minutes.

Nous recommandons d'éluer l'ADN dans 50 µl de tampon d'élution pour bénéficier de la sensibilité maximale du kit *artus* EBV RG PCR.

Utilisation du kit *QIAamp UltraSens Virus*

Remarque : L'emploi d'un ARN entraîneur est d'une importance déterminante pour l'efficacité de l'extraction et par conséquent pour le rendement en ADN/ARN. Pour augmenter la stabilité de l'ARN entraîneur livré avec le kit *QIAamp UltraSens Virus*, nous recommandons d'appliquer les instructions suivantes, qui diffèrent de celles décrites dans le manuel d'utilisation du kit.

- Remettre en suspension l'ARN entraîneur lyophilisé avant la première utilisation du kit d'extraction dans 310 µl de tampon d'élution (tampon AVE) fourni avec le kit (concentration finale de 1 µg/µl, ne pas utiliser le tampon de lyse). Répartir cette solution d'ARN entraîneur selon le nombre de fractions aliquotes nécessaires à vos besoins et les stocker entre -15 °C et -30 °C. Éviter de répéter les étapes de congélation/décongélation (> 2 x) d'une fraction aliquote d'ARN.
- Avant le début de chaque extraction, un mélange de tampon de lyse et d'ARN entraîneur (et éventuellement de contrôle interne, voir « Contrôle interne », page 13) doit être fraîchement préparé selon le schéma de pipetage présenté dans le tableau 3.

Tableau 3. Schéma de pipetage pour une utilisation avec le kit *QIAamp UltraSens Virus*

Nombre d'échantillons	1	12
Tampon AC (tampon de lyse)*	800 µl	9 600 µl
ARN entraîneur (1 µg/µl)	5,6 µl	67,2 µl
Volume total	805,6 µl	9 667,2 µl

Volume par extraction

800 µl

800 µl chacun

* Contient de l'isopropanol ; voir le manuel du kit pour les informations de sécurité.

Remarque : Pour l'extraction, utiliser immédiatement le mélange de tampon de lyse et d'ARN entraîneur fraîchement préparé. Il n'est pas possible de conserver ce mélange.

Remarque : Le contrôle interne du kit *artus* EBV RG PCR peut être utilisé directement dans la procédure d'extraction (voir « Contrôle interne », page 13).

Remarque : Nous recommandons vivement d'effectuer la centrifugation supplémentaire décrite à l'étape 14 du protocole (manuel du kit *QIAamp UltraSens Virus (QIAamp UltraSens Virus Handbook)*, avril 2010, page 17) pour éliminer l'éthanol résiduel. Nous recommandons d'augmenter la durée de la centrifugation à 3 minutes.

Nous recommandons d'éluer l'ADN dans 50 µl de tampon d'élution pour bénéficier de la sensibilité maximale du kit *artus* EBV RG PCR.

Le kit *QIAamp UltraSens Virus* permet de concentrer l'échantillon. Si l'échantillon utilisé n'est ni du sérum ni du plasma, ajouter au moins 50 % (v/v) de plasma humain négatif à l'échantillon.

Utilisation du kit *EZ1 DSP Virus*

Remarque : L'emploi d'un ARN entraîneur est d'une importance déterminante pour l'efficacité de l'extraction et par conséquent pour le rendement en ADN/ARN. Ajouter la quantité appropriée d'ARN entraîneur à chaque extraction selon les instructions fournies dans le manuel du kit *EZ1 DSP Virus (EZ1 DSP Virus Kit Handbook)*.

Remarque : Le contrôle interne du kit *artus* EBV RG PCR peut être utilisé directement dans la procédure d'extraction (voir « Contrôle interne », ci-dessous).

Remarque : Nous recommandons vivement d'utiliser les acides nucléiques viraux purifiés destinés à la PCR immédiatement après extraction avec le kit *EZ1 DSP Virus*. En variante, il est possible de conserver les éluats jusqu'à 3 jours à 4 °C avant d'effectuer l'analyse de PCR.

Contrôle interne

Un contrôle interne (EBV RG IC) est fourni. Cela permet à l'utilisateur de contrôler la procédure d'isolement d'ADN et de vérifier la survenue éventuelle d'une inhibition de la PCR. Si l'extraction est effectuée en utilisant le kit *EZ1 DSP Virus*, le contrôle interne doit être ajouté selon les instructions figurant dans le manuel du kit *EZ1 DSP Virus (EZ1 DSP Virus Kit Handbook)*. Si l'un quelconque des kits *QIAamp UltraSens Virus*, *QIAamp DNA Blood Mini* ou *QIAamp DNA*

Mini est utilisé, ajouter le contrôle interne au milieu d'extraction dans le rapport de 0,1 μ l pour 1 μ l de volume d'élution. Par exemple, avec le kit QIAamp UltraSens Virus, l'ADN est élué dans 50 μ l de tampon AVE. Il convient donc d'ajouter initialement 5 μ l de contrôle interne. La quantité de contrôle interne utilisée dépend uniquement du volume d'élution.

Remarque : Le contrôle interne et l'ARN entraîneur (voir « Extraction de l'ADN », page 10) doivent être ajoutés seulement au mélange de tampon de lyse et d'échantillon ou directement au tampon de lyse.

Le contrôle interne ne doit pas être ajouté directement à l'échantillon. En cas d'addition au tampon de lyse, bien noter que le mélange de contrôle interne et de tampon de lyse/ARN entraîneur doit être préparé fraîchement et utilisé immédiatement (la conservation de ce mélange à température ambiante ou au réfrigérateur, même pour quelques heures, peut entraîner le dysfonctionnement du contrôle interne et diminuer l'efficacité de l'extraction).

Remarque : Ne pas pipeter le contrôle interne et l'ARN entraîneur directement dans l'échantillon.

Il est également possible d'utiliser le contrôle interne exclusivement pour mettre en évidence une éventuelle inhibition de la PCR. Pour cette application, ajouter le contrôle interne directement à l'EBV RG Master, comme décrit à l'étape 2b du protocole (page 16).

Protocole : PCR et analyse des données

Remarques importantes avant de commencer

- Prenez le temps de vous familiariser avec l'appareil Rotor-Gene Q avant de démarrer le protocole. Consulter le manuel d'utilisation de l'appareil.
- S'assurer que chaque cycle de PCR intègre au moins une norme de quantification et au moins un contrôle négatif (eau, grade PCR). Pour créer une courbe standard, utiliser les 4 normes de quantification fournies (EBV RG QS 1–4) pour chaque cycle de PCR.

Étapes préliminaires

- S'assurer que le bloc réfrigérant (accessoire de l'appareil Rotor-Gene Q) ait été préalablement refroidi à 2–8 °C.
- Avant le début du test, décongeler complètement tous les réactifs à température ambiante, bien les mélanger (aspirer et rejeter plusieurs fois à l'aide de la pipette ou agiter brièvement à l'aide d'un vortex) et, immédiatement après, les centrifuger brièvement.

Procédure

- 1. Placer le nombre souhaité de tubes réactionnels pour PCR dans les adaptateurs du bloc réfrigérant.**
- 2. Si vous utilisez le contrôle interne pour surveiller la procédure d'isolement de l'ADN et une éventuelle inhibition de la PCR, suivre l'étape 2a. Si vous utilisez le contrôle interne exclusivement pour mettre en évidence une inhibition de la PCR, suivre l'étape 2b.**
 - 2a. Le contrôle interne a déjà été ajouté au milieu d'extraction (voir « Contrôle interne », page 13). Dans ce cas, préparer un mélange maître, tel que décrit dans le tableau 4.**

Le mélange réactionnel contient typiquement tous les composants nécessaires à la PCR à l'exception de l'échantillon.

Tableau 4. Préparation du mélange maître (contrôle interne utilisé pour surveiller l'extraction de l'ADN et déceler une éventuelle inhibition de la PCR)

Nombre d'échantillons	1	12
EBV RG Master	30 μ l	360 μ l
EBV RG IC	0 μ l	0 μ l
Volume total	30 μl	360 μl

- 2b. Le contrôle interne doit être ajouté directement à l'EBV RG Master. Dans ce cas, préparer un mélange maître, tel que décrit dans le tableau 5.**

Le mélange réactionnel contient typiquement tous les composants nécessaires à la PCR à l'exception de l'échantillon.

Tableau 5. Préparation du mélange maître (contrôle interne utilisé exclusivement pour surveiller une éventuelle inhibition de la PCR)

Nombre d'échantillons	1	12
EBV RG Master	30 μ l	360 μ l
EBV RG IC	2 μ l	24 μ l
Volume total	32 μl*	384 μl*

* L'augmentation de volume due à l'addition du contrôle interne est négligeable lors de la mise en œuvre de la réaction de PCR. Il n'y a pas de répercussion sur la sensibilité du système de détection.

- 3. Distribuer 30 μ l de mélange maître dans chaque tube de PCR. Ajouter ensuite 20 μ l de l'échantillon d'ADN élué (voir le tableau 6). De manière correspondante, 20 μ l d'au moins une norme de quantification (EBV RG QS 1-4) doivent être utilisés comme contrôle positif et 20 μ l d'eau (eau de grade PCR) comme contrôle négatif.**

Tableau 6. Préparation de la réaction PCR

Nombre d'échantillons	1	12
Mélange principal	30 μ l	30 μ l chacun
Échantillon	20 μ l	20 μ l chacun
Volume total	50 μl	50 μl chacun

4. **Fermer les tubes de PCR. S'assurer que l'anneau de blocage (accessoire de Rotor-Gene) soit placé en haut du rotor pour éviter que les tubes ne s'ouvrent accidentellement au cours du cycle.**
5. **Pour détecter l'ADN d'EBV, créer un profil de température en suivant les étapes ci-après.**

Définition des paramètres généraux d'analyse	Figures 1, 2, 3
Activation initiale de l'enzyme à démarrage à chaud	Figure 4
Amplification de l'ADN (PCR par essais)	Figure 5
Ajustement de la sensibilité des canaux de fluorescence	Figure 6
Démarrage du cycle	Figure 7

Toutes les spécifications se réfèrent au logiciel Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q, version 1.7.94, aux logiciels Rotor-Gene 6000, versions 1.7.65, 1.7.87 et 1.7.94 ; et au logiciel Rotor-Gene 3000, version 6.0.23. Le manuel d'utilisation fournit de plus amples informations sur la programmation des appareils Rotor-Gene Q. Dans les images suivantes, ces réglages sont encadrés en noir et en gras. Les illustrations sont fournies pour les appareils RotorGene Q. Si des valeurs différentes sont requises pour le Rotor-Gene 3000, celles-ci sont décrites dans le texte.

6. Tout d'abord, ouvrir la boîte de dialogue « New Run Wizard » (Assistant de lancement d'un nouveau cycle) (Figure 1). Cocher la case « Locking Ring Attached » (Anneau de blocage posé) et cliquer sur « Next » (Suivant).

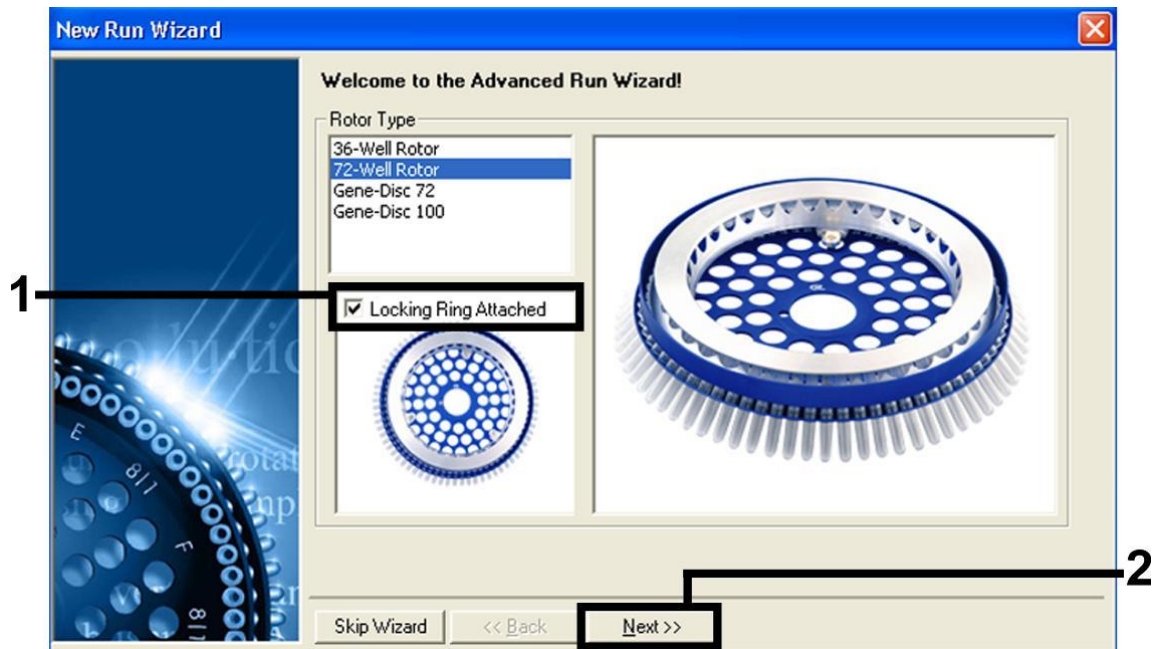


Figure 1. Boîte de dialogue « New Run Wizard ».

7. Sélectionner 50 pour le volume de réaction de la PCR et cliquer sur « Next » (figure 2).

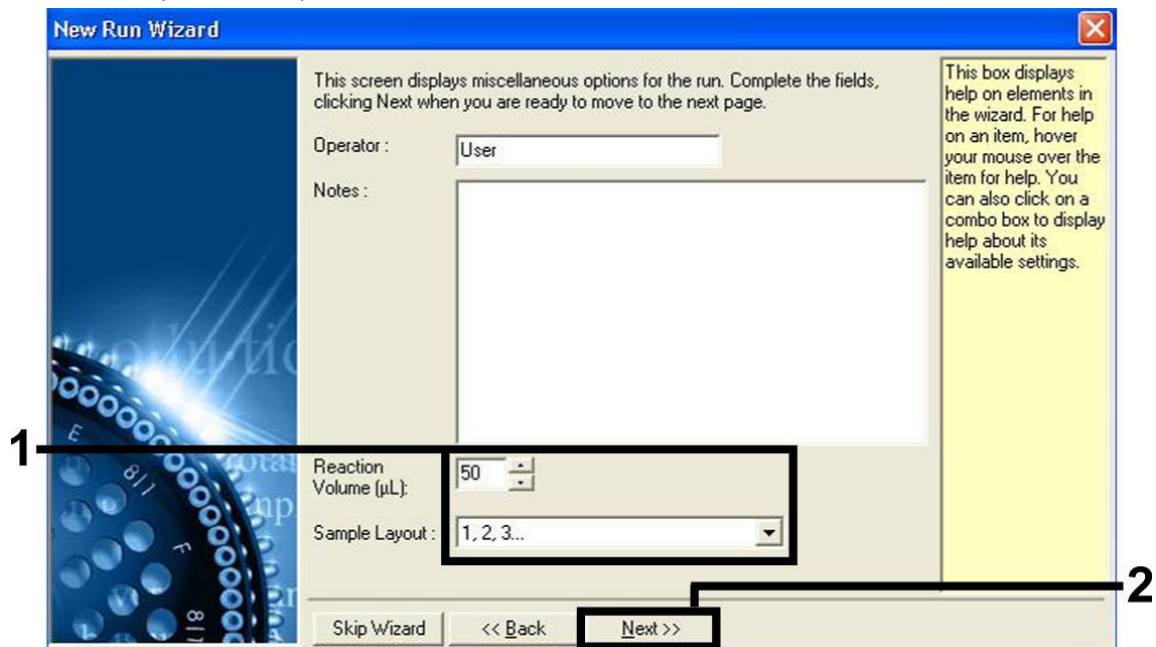


Figure 2 Définition des paramètres généraux d'analyse.

8. Dans la boîte de dialogue « New Run Wizard », cliquer sur le bouton « Edit Profile » (Modifier profil) (Figure 3) et programmer le profil de température comme indiqué sur les figures 3-5).

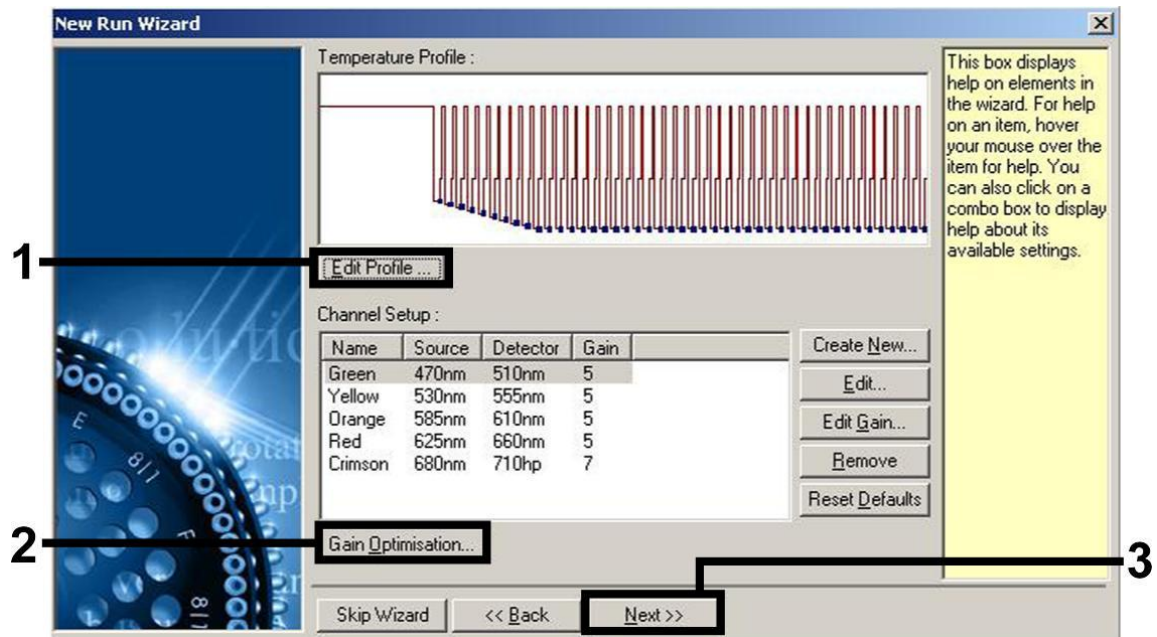


Figure 3 Modification du profil.

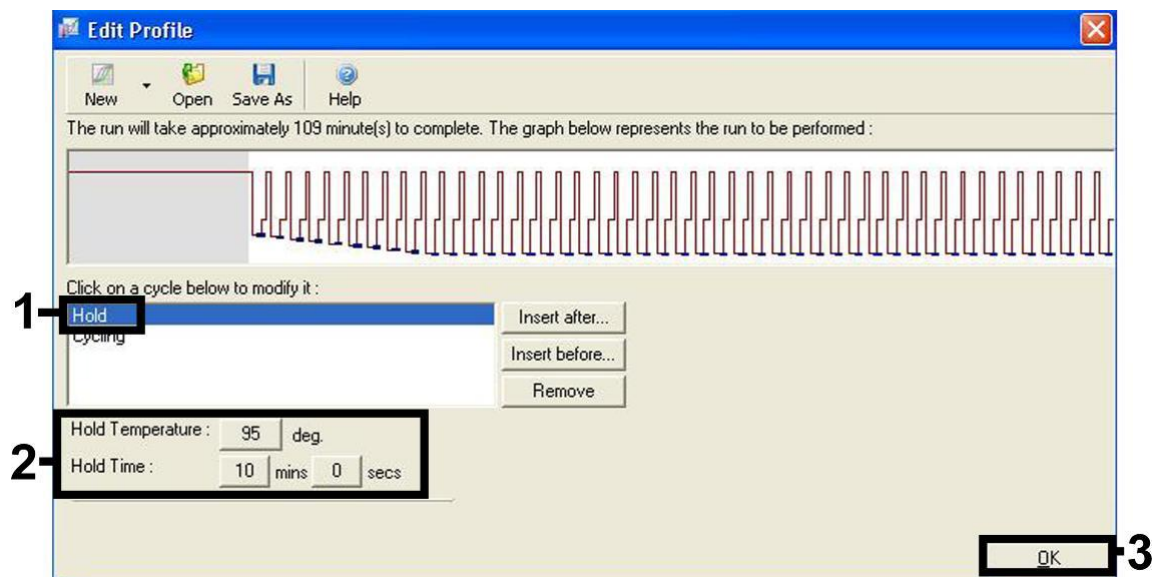


Figure 4 Activation initiale de l'enzyme à démarrage à chaud (hot-start).

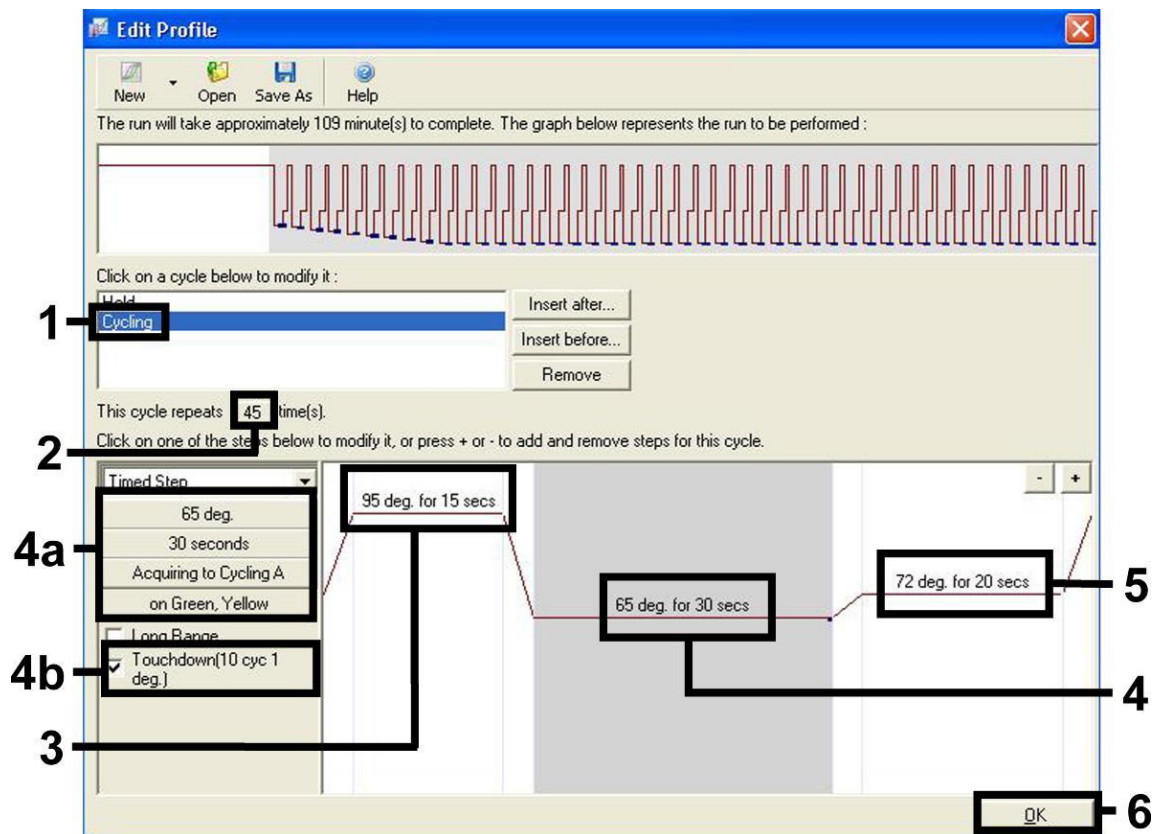


Figure 5 Amplification de l'ADN. S'assurer d'activer la fonction touchdown (touché) pendant 10 cycles au cours de l'étape de hybridation. Il convient de noter que sur le Rotor-Gene 3000, le logiciel définit les marqueurs de fluorescence comme « FAM/Sybr, JOE ».

9. La plage de détection des canaux de fluorescence doit être déterminée selon les intensités de fluorescence des tubes de PCR. Dans la boîte de dialogue « New Run Wizard », cliquer sur « Gain Optimisation » (Optimisation du gain) (cf. figure 3) pour ouvrir la boîte de dialogue « Auto-Gain Optimisation Setup » (Configuration de l'optimisation du gain automatique). Régler la température de calibration à 65 pour qu'elle corresponde à la température d'hybridation du programme d'amplification (Figure 6).

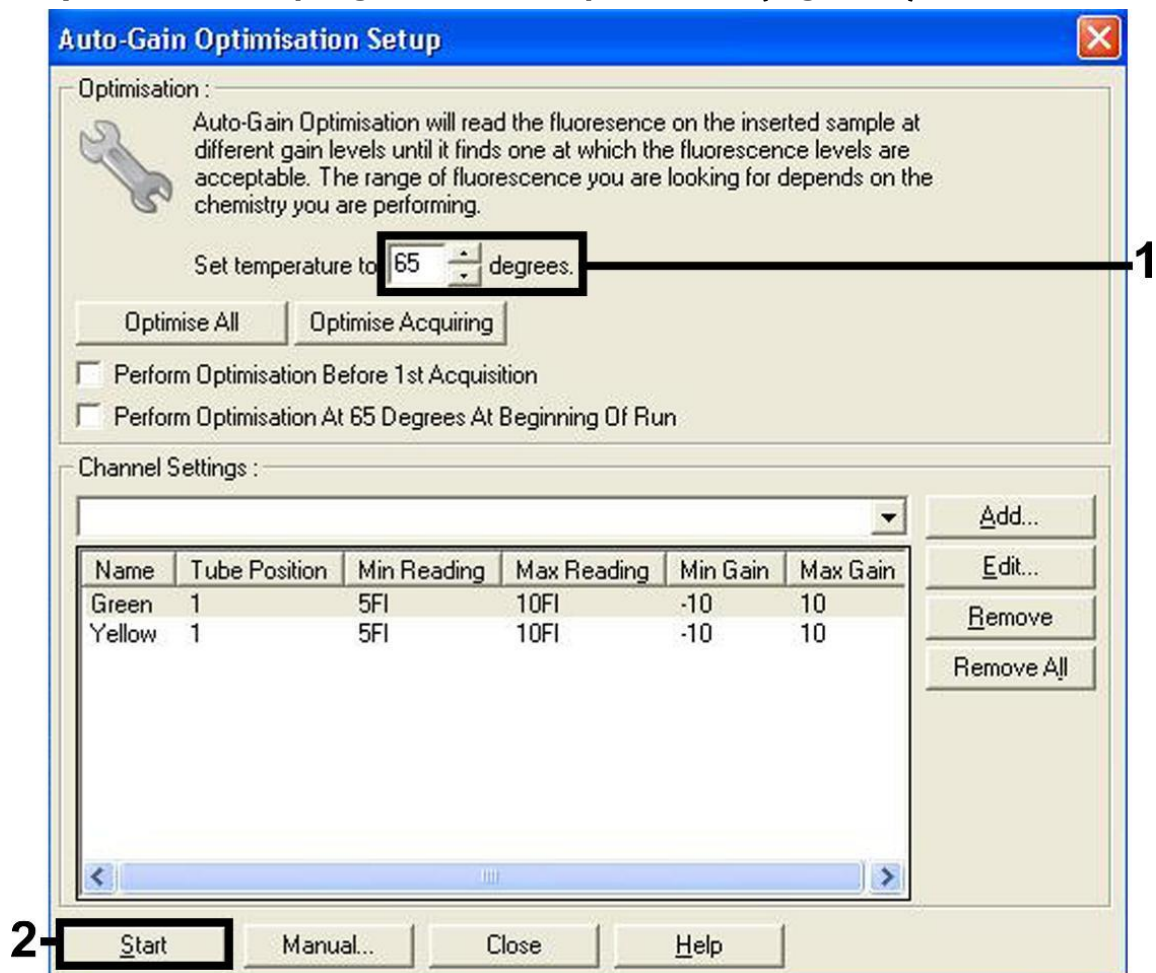


Figure 6 Ajustement de la sensibilité des canaux de fluorescence. Il convient de noter que sur le Rotor-Gene 3000, le logiciel définit les marqueurs de fluorescence comme « FAM/Sybr » et « JOE ».

10. Les valeurs de gain déterminées par la calibration des canaux sont automatiquement enregistrées et répertoriées dans la dernière fenêtre de menu de la procédure de programmation (figure 7). Cliquer sur « Start Run » (Démarrer le cycle).

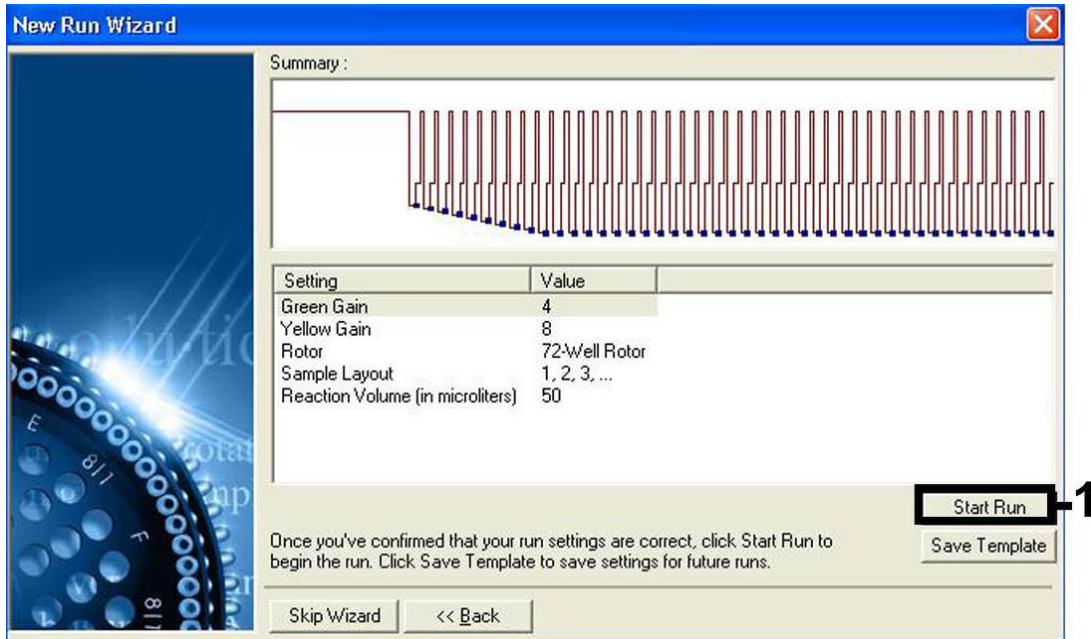


Figure 7 Démarrage du cycle. Il convient de noter que sur le Rotor-Gene 3000, le logiciel définit les marqueurs de fluorescence comme « FAM/Sybr » et « JOE ».

Interprétation des résultats

Quantification

Les normes de quantification fournies (EBV RG QS 1-4) doivent être manipulées comme des échantillons purifiés et utilisées avec le même volume (20 µl). Pour générer une courbe standard avec les appareils Rotor-Gene Q, il faut utiliser et définir les 4 normes de quantification de la boîte de dialogue « Edit Samples » (Modifier échantillons) comme les normes aux concentrations spécifiées (cf. manuel d'utilisation de l'appareil).

Remarque : Les normes de quantification sont exprimées en copies/µl. L'équation suivante doit être appliquée pour convertir les valeurs déterminées par le biais de la courbe standard en copies/ml de matériel de prélèvement :

$$\text{Résultat (copies/ml)} = \frac{\text{Résultat (copies/}\mu\text{l)} \times \text{volume d'élution (}\mu\text{l)}}{\text{Volume d'échantillon (ml)}}$$

Par principe, le volume initial d'échantillon doit être saisi dans l'équation ci-dessus. Il faut le prendre en compte quand le volume d'échantillon a été modifié avant extraction de l'acide nucléique (p. ex. en réduisant le volume par centrifugation ou en l'augmentant par ajout au volume nécessaire à l'isolation).

Résultats

Les figures 8 et 9 donnent des exemples de réactions PCR positive et négative.

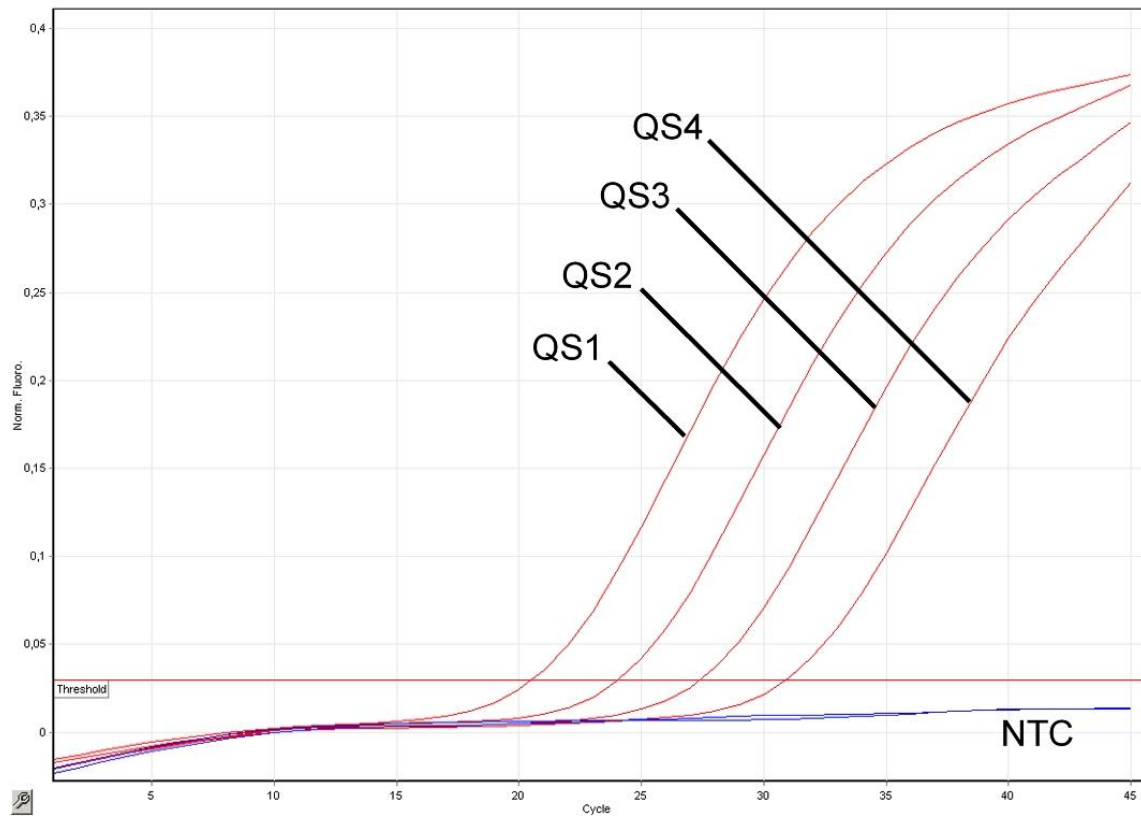


Figure 8 Détection des normes de quantification (EBV RG QS 1–4) dans le canal de fluorescence Cycling Green. NTC : Contrôle sans matrice (contrôle négatif).

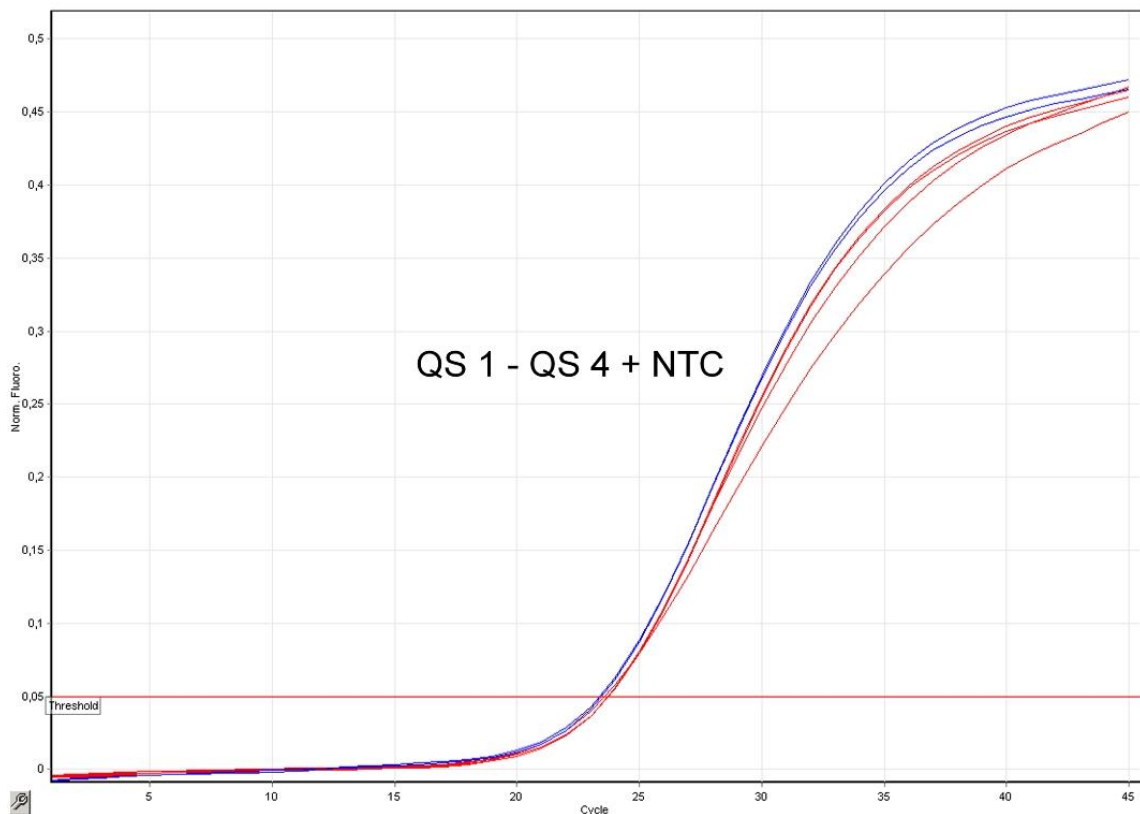


Figure 9 Détection du contrôle interne (IC) dans le canal de fluorescence Cycling Yellow avec amplification simultanée des normes de quantification (EBV RG QS 1-4). NTC : Contrôle sans matrice (contrôle négatif).

**Un signal est détecté dans le canal de fluorescence Cycling Green.
Le résultat de l'analyse est positif : l'échantillon contient de l'ADN d'EBV.**

Dans ce cas, la détection d'un signal dans le canal Cycling Yellow est superflue car de fortes concentrations initiales d'ADN d'EBV (signal positif du canal Cycling Green) peuvent entraîner la réduction ou la disparition du signal de fluorescence du contrôle interne du canal Cycling Yellow (concurrence).

Remarque : Sur le Rotor-Gene 3000, les canaux pertinents sont le Cycling A.FAM pour le signal positif et le Cycling A.JOE pour le contrôle interne.

**Aucun signal n'est détecté dans le canal de fluorescence Cycling Green.
En même temps, un signal provenant du contrôle interne apparaît dans le canal Cycling Yellow.**

Dans l'échantillon, il n'y a pas de détection d'ADN d'EBV. Il peut donc être considéré comme négatif.

En cas de PCR négative de l'EBV, le signal détecté du contrôle interne exclut la possibilité d'une inhibition de la PCR.

Remarque : Sur le Rotor-Gene 3000, les canaux pertinents sont le Cycling A.JOE pour le contrôle interne et une absence de signal pour le Cycling A.FAM.

Aucun signal n'est détecté dans les canaux Cycling Green ou Cycling Yellow.

Aucun résultat ne peut être établi.

Pour des informations sur les sources d'erreur et leurs solutions, voir « Résolution des principaux problèmes rencontrés », page 24.

Remarque : Sur le Rotor-Gene 3000, les canaux pertinents sont le Cycling A.FAM et le Cycling A.JOE.

Résolution des principaux problèmes rencontrés

Ce guide de résolution des principaux problèmes rencontrés peut aider à répondre à certaines questions qui peuvent se poser. Pour plus d'informations, voir aussi la page Foire aux Questions de notre Centre de support technique : www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Les scientifiques des Services techniques de QIAGEN seront ravis de répondre à toutes les questions sur les informations et protocoles figurant dans ce manuel ou sur les technologies d'échantillons et d'analyses (pour les coordonnées, voir quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).

Commentaires et suggestions

Pas de signal avec les contrôles positifs (EBV RG QS 1-4) dans le canal de fluorescence Cycling Green ou Cycling A.FAM

- | | |
|--|---|
| a) Le canal de fluorescence sélectionné pour l'analyse des données de PCR n'est pas conforme au protocole | Pour l'analyse des données, sélectionner le canal de fluorescence Cycling Green ou Cycling A.FAM pour la PCR analytique de l'EBV et le canal de fluorescence Cycling Yellow ou Cycling A.JOE pour la PCR du contrôle interne. |
| b) Mauvaise programmation du profil de température du Rotor-Gene | Comparer le profil de température au protocole. Voir « Protocole : PCR et analyse des données », page 15. |
| c) Mauvaise configuration de la PCR | Vérifier les étapes de la procédure à l'aide d'un schéma de pipetage et recommencer la PCR si nécessaire. Voir « Protocole : PCR et analyse des données », page 15. |
| d) Les conditions de stockage d'un ou plusieurs composants du kit ne respectaient pas les instructions fournies dans la section « Stockage et manipulation des réactifs » (page 9) | Vérifier les conditions de stockage et la date limite d'utilisation (cf. étiquette du kit) des réactifs et utiliser un nouveau kit s'il y a lieu. |
| e) Le kit <i>artus</i> EBV RG PCR a expiré | Vérifier les conditions de stockage et la date limite d'utilisation (cf. étiquette du kit) des réactifs et utiliser un nouveau kit s'il y a lieu. |

Signal faible ou absent du contrôle interne dans le canal de fluorescence Cycling Yellow ou Cycling A.JOE et absence simultanée de signal dans le canal Cycling Green ou Cycling A.FAM

- | | |
|---|---|
| a) Les conditions de PCR ne respectent pas le protocole | Vérifier les conditions de PCR (cf. ci-dessus) et si besoin, répéter la PCR avec les réglages corrigés. |
|---|---|

Commentaires et suggestions

- b) La PCR a été inhibée S'assurer que la méthode d'isolement appropriée est utilisée et respecter scrupuleusement les instructions du fabricant.
- Lors de l'utilisation des kits QIAamp DNA Mini, QIAamp DNA Blood Mini ou QIAamp UltraSens Virus, vérifier que l'étape de centrifugation supplémentaire recommandée pendant l'extraction de l'ADN a été effectuée avant l'étape d'élution, afin d'éliminer toute trace résiduelle d'éthanol (voir « Extraction de l'ADN », pages 11 et 12).
- c) De l'ADN a été perdu lors de l'extraction Si le contrôle interne a été ajouté à l'extraction, l'absence de signal du contrôle interne peut indiquer la perte d'ADN en cours d'extraction. Veiller à ce que la méthode d'isolement recommandée est utilisée (voir « Extraction de l'ADN », page 10) et suivre les instructions du fabricant à la lettre.
- d) Les conditions de stockage d'un ou plusieurs composants du kit ne respectaient pas les instructions fournies dans la section « Stockage et manipulation des réactifs » (page 9) Vérifier les conditions de stockage et la date limite d'utilisation (cf. étiquette du kit) des réactifs et utiliser un nouveau kit s'il y a lieu.
- e) Le kit *artus* EBV RG PCR a expiré Vérifier les conditions de stockage et la date limite d'utilisation (cf. étiquette du kit) des réactifs et utiliser un nouveau kit s'il y a lieu.

Commentaires et suggestions

Signaux avec les contrôles négatifs dans le canal de fluorescence Cycling Green ou Cycling A.FAM de la PCR analytique

- | | |
|---|---|
| a) Contamination lors de la préparation de la PCR | Répéter la PCR avec de nouveaux réactifs et en répliqués.

Si possible, fermer les tubes de PCR juste après l'addition de l'échantillon à tester.

S'assurer de pipeter les contrôles positifs en dernier.

S'assurer que les surfaces de travail et les appareils sont décontaminés régulièrement. |
| b) Contamination lors de l'extraction | Répéter la procédure d'extraction et la PCR des échantillons à analyser en utilisant des réactifs encore non utilisés.

S'assurer que les surfaces de travail et les appareils sont décontaminés régulièrement. |

Contrôle qualité

En accord avec le Quality Management System QIAGEN certifié ISO, chaque lot de kit *artus* EBV RG PCR a été testé conformément aux spécifications prédéterminées afin d'assurer une qualité constante du produit.

Limites

Tous les réactifs ne peuvent être utilisés que dans le cadre de diagnostics in vitro.

L'utilisation de ce produit est uniquement réservée à un personnel spécialement formé aux procédures de diagnostic in vitro.

Il faut se conformer strictement au manuel d'utilisation pour obtenir des résultats de PCR optimaux.

Il convient de porter une attention particulière aux dates limites d'utilisation imprimées sur la boîte et les étiquettes de tous les composants. Ne pas utiliser de composants ayant expiré.

Bien que rares, les mutations au sein des zones hautement conservées du génome viral traitées par les amorces et/ou la sonde du kit peuvent entraîner une sous-quantification ou un échec de la détection du virus dans ces cas-là. La validité et la performance du format d'analyse sont contrôlées à intervalles réguliers.

Caractéristiques de performance

Sensibilité analytique

Pour déterminer la limite de détection du kit *artus* EBV RG PCR, une série de dilutions a été effectuée de 31,6 à 0,01 et de 100 à 0,03 équivalent de copie nominal d'EBV/ μ l, puis analysée avec le kit *artus* EBV RG PCR sur les appareils Rotor-Gene 6000 et Rotor-Gene 3000, respectivement. Les essais ont été exécutés sur 3 jours différents à raison de 8 réplicats par jour. Les résultats ont été déterminés à l'aide d'une analyse probit. Une illustration graphique de l'analyse probit sur l'appareil Rotor-Gene 6000 est présentée sur la figure 10. La limite de détection analytique du kit *artus* EBV RG PCR associé au Rotor-Gene Q MDx/Q/6000 et au Rotor-Gene 3000 est de 1,02 copie/ μ l ($p = 0,05$) et de 3,8 copies/ μ l ($p = 0,05$), respectivement. Cela signifie que 1,02 copie/ μ l ou 3,8 copies/ μ l sont détectées avec une probabilité de 95 %.

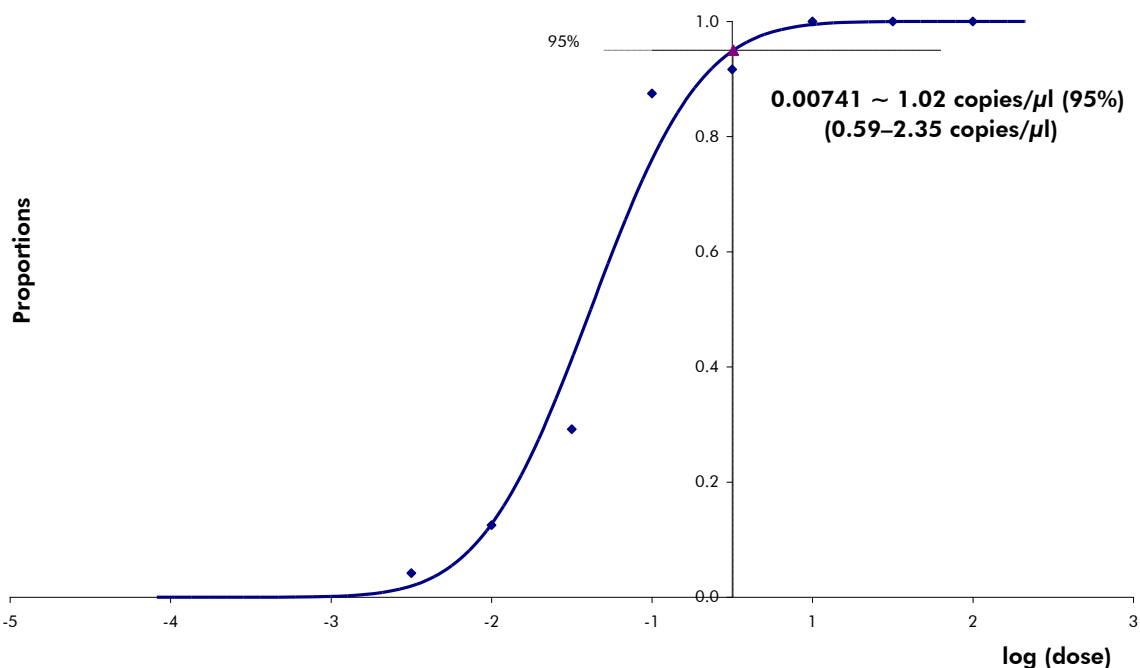


Figure 10. Analyse probit : EBV (Rotor-Gene 6000). Sensibilité analytique du kit *artus* EBV RG PCR sur le Rotor-Gene 6000.

Spécificité

La spécificité du kit *artus* EBV RG PCR est garantie en premier lieu par la sélection des amorces et des sondes ainsi que de conditions de réaction strictes. Une analyse par comparaison de séquences des amorces et des sondes a été effectuée afin de rechercher d'éventuelles homologues avec toutes les séquences représentées dans les banques génétiques. De cette façon, la détectabilité de tous les génotypes importants a également été garantie.

De plus, la spécificité a été validée avec 6 échantillons différents de sérum négatif pour l'EBV. Ceux-ci n'ont généré aucun signal avec les amorces et les sondes spécifiques à l'EBV intégrées dans l'EBV RG Master.

Pour déterminer la spécificité du kit *artus* EBV RG PCR, le groupe de contrôle indiqué dans le Tableau 7 a été analysé pour rechercher une éventuelle réaction croisée. Aucun des agents pathogènes testés n'a été positif.

Tableau 7. Test de spécificité du kit avec des agents pathogènes éventuellement aptes à une réaction croisée

Groupe contrôle	EBV (Cycling Green ou Cycling A.FAM)	Contrôle interne (Cycling Yellow ou Cycling A.JOE)
Herpèsvirus humain 1 (virus herpès simplex 1)	-	+
Herpèsvirus humain 2 (virus herpès simplex 2)	-	+
Herpèsvirus humain 3 (virus varicella-zoster)	-	+
Herpèsvirus humain 5 (cytomégalovirus)	-	+
Virus humain de la leucémie à cellules T 1	-	+
Virus humain de la leucémie à cellules T 2	-	+

Reproductibilité

Les données de reproductibilité sont fournies dans le but de procéder à une évaluation régulière de la performance du kit *artus* EBV RG PCR et d'en comparer l'efficacité avec d'autres produits. Ces données proviennent de programmes d'étude de performance établis.

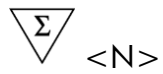












Références

QIAGEN tient à jour une grande banque de données en ligne de publications scientifiques utilisant les produits QIAGEN. Des critères de sélection de recherche aident à trouver les articles à l'aide d'un mot-clé ou en spécifiant l'application, le domaine de recherche, le titre, etc.

Décembre 2014

Pour une bibliographie complète, consulter la Base de données bibliographique QIAGEN en ligne à l'adresse www.qiagen.com/RefDB/search.asp ou contacter les Services techniques de QIAGEN ou le distributeur local.

Symboles

	Contient suffisamment de réactifs pour <N> tests
	À utiliser avant
	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Référence
	Numéro de lot
	Référence du matériel
	Composants
	Contient
	Nombre
	Code d'article international
	Limite de température
	Fabricant
	Lire les informations dans le manuel

Coordonnées

Pour une assistance technique et plus d'informations, consulter notre Centre d'assistance technique sur le site www.qiagen.com/Support ou appeler l'un des Départements du service technique de QIAGEN ou des distributeurs locaux (voir la quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).

Pour commander

Produit	Contenu	Référence
<i>artus</i> EBV RG PCR Kit (24)	Pour 24 réactions : Maître, 4 normes de quantification, contrôle interne, eau (grade PCR)	4501263
<i>artus</i> EBV RG PCR Kit (96)	Pour 96 réactions : Maître, 4 normes de quantification, contrôle interne, eau (grade PCR)	4501265
Kits EASYartus EBV RG PCR — pour la purification d'échantillons automatisée et intégrée et la détection des agents pathogènes certifiées CE-IVD		
EASYartus EBV RG PCR Kit 1	Pour 48 préparations d'acides nucléiques viraux et 24 essais : 1 x kit EZ1 DSP Virus, 1 x kit <i>artus</i> EBV RG PCR (24)	EA10123
EASYartus EBV RG PCR Kit 2	Pour 48 préparations d'acides nucléiques viraux et 48 essais : 1 x kit EZ1 DSP Virus, 2 x kits <i>artus</i> EBV RG PCR (24)	EA10124
Kit EZ1 DSP Virus — pour la purification automatique simultanée d'ADN et d'ARN viraux provenant de 1–14 échantillons de sérum, de plasma ou de LCR		
EZ1 DSP Virus Kit (48)	Pour 48 préparations d'acides nucléiques viraux : Cartouches de réactif préremplies, porte-pointes jetables, pointes munies de filtre jetables, tubes d'échantillon, tubes d'élution, tampons, ARN entraîneur	62724
Kit QIAamp DNA Mini — pour la purification d'ADN génomique et viral à partir de tissus et d'autres échantillons		
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Pour 50 préparations d'ADN : 50 colonnes QIAamp Mini Spin, protéinase K QIAGEN, réactifs, tampons et tubes de prélèvement (2 ml)	51304

Produit	Contenu	Référence
Kir QIAamp UltraSens Virus — pour la concentration et l'extraction d'ADN et d'ARN viraux à partir de sérum et de plasma		
QIAamp UltraSens Virus Kit (50)	Pour 50 préparations d'acides nucléiques viraux : 50 colonnes QIAamp Mini Spin, protéinase K, ARN entraîneur, tubes de prélèvement (2 ml), tampons	53704
Kit QIAamp DNA Blood Mini — pour purifier jusqu'à 12 µg d'ADN génomique, mitochondrial ou viral à partir de sang et de liquides corporels liés		
QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	Pour 50 mini-préparations d'ADN : 50 colonnes QIAamp Mini Spin, protéase QIAGEN, réactifs, tampons, tubes de prélèvement (2 ml)	51104
Rotor-Gene Q MDx et accessoires		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Thermocycleur de PCR en temps réel à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 -an pièces et main d'œuvre, installation et formation non comprises	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Thermocycleur de PCR en temps réel à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 -an pièces et main d'œuvre, installation et formation comprises	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Thermocycleur pour PCR en temps réel et analyseur « High Resolution Melt » (fusion haute résolution) à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge et pourpre) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires : garantie 1 an pièces et main d'œuvre, installation et formation non comprises	9002032

Produit	Contenu	Référence
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Thermocycleur pour PCR en temps réel et analyseur « High Resolution Melt » à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge et pourpre) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires : garantie 1 an pièces et main d'œuvre, installation et formation comprises	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Appareil de PCR en temps réel à 6 canaux (bleu, vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 -an pièces et main d'œuvre, installation et formation non comprises	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Appareil de PCR en temps réel à 6 canaux (bleu, vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 -an pièces et main d'œuvre, installation et formation comprises	9002043
Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform	Thermocycleur de PCR en temps réel à 2 canaux (vert, jaune), ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 -an pièces et main d'œuvre, installation et formation non comprises	9002002
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	Thermocycleur de PCR en temps réel à 2 canaux (vert, jaune), ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 -an pièces et main d'œuvre, installation et formation comprises	9002003
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform	Thermocycleur pour PCR en temps réel et analyseur « High Resolution Melt » (fusion haute résolution) à 2 canaux (vert, jaune) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires : garantie 1 an pièces et main d'œuvre, installation et formation non comprises	9002012

Produit	Contenu	Référence
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	Thermocycleur pour PCR en temps réel et analyseur « High Resolution Melt » (fusion haute résolution) à 2 canaux (vert, jaune) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires : garantie 1 an pièces et main d'œuvre, installation et formation comprises	9002013
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloc en aluminium pour la préparation manuelle des tubes réactionnels à l'aide d'une pipette monocanal dans 72 tubes de 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Bloc en aluminium pour la préparation manuelle des tubes réactionnels selon le format standard 8 x 12 utilisant 96 tubes de 0,2 ml	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 rangées de 4 tubes et bouchons pour 1 000 réactions	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 rangées de 4 tubes et bouchons pour 10 000 réactions	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1 000 tubes à paroi mince pour la préparation de 1 000 réactions	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1 000 tubes à paroi mince pour la préparation de 10 000 réactions	981008

Pour obtenir les dernières informations sur la licence et les clauses de responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN respectif. Les manuels des kits et manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès des Services techniques QIAGEN ou du distributeur local.

L'achat de ce produit permet à l'acheteur de l'utiliser pour poser des diagnostics humains in vitro. Aucun brevet général ni licence d'aucune sorte autre que ce droit spécifique d'utilisation à l'achat n'est accordé par la présente.

Marques de commerce : QIAGEN®, QIAamp®, artus®, EASYartus®, EZ1®, Rotor-Gene®, UltraSens® (Groupe QIAGEN) ; FAM™, JOE™ (Life Technologies) ; SYBR® (Molecular Probes, Inc.).

Accord de licence limitée

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur du kit *artus* EBV RG PCR consent aux termes suivants :

1. Le kit *artus* EBV RG PCR ne doit être utilisé que conformément au manuel du kit *artus* EBV RG PCR (*artus* EBV RG PCR Kit Handbook) et uniquement avec les composants fournis à l'intérieur du kit. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce kit avec tout autre composant non fourni dans ce kit, à l'exception de ce qui est stipulé dans le manuel du kit *artus* EBV RG PCR (*artus* EBV RG PCR Kit Handbook) et autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com.
2. Hormis les licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou son(s) utilisation(s) ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce kit et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette notamment toutes autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du kit consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre, de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les termes précédents. QIAGEN peut faire appliquer des interdictions de cet Accord de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de cet Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

Pour les termes de licence mis à jour, voir www.qiagen.com.

© 2009-2014 QIAGEN, tous droits réservés.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

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

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

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

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

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

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

Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

