

Juin 2015

# Manuel du RespiFast RG Panel



Version 1

**IVD**

Diagnostics in vitro qualitatifs

Pour utilisation avec les appareils Rotor-Gene® Q

**CE**  
0120

**REF**

4693163



PathoFinder B.V., Randwycksingel 45, 6229 EG  
Maastricht, PAYS-BAS

Distribué par QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1,  
40724 Hilden, ALLEMAGNE

R1 **MAT**

1090425FR



# Sommaire

Utilisation prévue.....	4
Résumé et description.....	5
Principes de la procédure .....	5
<b>Gènes cibles</b> .....	7
Matériel fourni.....	10
<b>Contenu du kit</b> .....	10
Matériel nécessaire mais non fourni .....	10
Avertissements et précautions .....	12
<b>Précautions générales</b> .....	12
Stockage et manipulation des réactifs.....	14
Manipulation et conservation des échantillons.....	14
Procédure .....	15
Extraction et préparation des acides nucléiques .....	15
Utilisation d'un contrôle négatif.....	16
Utilisation d'un contrôle interne et d'ARN entraîneur .....	16
Utilisation du contrôle d'amplification .....	19
Utilisation du contrôle positif.....	19
Protocole : Amplification par PCR et analyse de la fusion .....	21
Interprétation des résultats.....	45
Normalisation .....	45
Analyse.....	45

---

Seuil .....	46
Résolution des principaux problèmes rencontrés .....	50
Contrôle de la qualité.....	51
Limites .....	51
Caractéristiques de performance .....	52
Symboles.....	53
Coordonnées .....	54
Pour commander .....	55

# Utilisation prévue

Le test RespiFast RG Panel est un test de PCR multiplex qualitatif permettant de détecter et de différencier 16 virus à ARN,\* 2 virus à ADN et 4 bactéries, qui sont tous en mesure de provoquer des infections des voies respiratoires chez l'homme : adénovirus, bocavirus, coronavirus OC43, coronavirus 229E, coronavirus NL63/HKU1, métapneumovirus humain (hMPV), virus de l'influenza A, virus de l'influenza B, virus de l'influenza A sous-type H1N1pdm09, virus parainfluenza de type 1, virus parainfluenza de type 2, virus parainfluenza de type 3, virus parainfluenza de type 4, rhinovirus/entérovirus, virus respiratoire syncytial de type A (RSVA), virus respiratoire syncytial de type B (RSVB), *Bordetella pertussis*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* et *Mycoplasma pneumoniae*.

Le test RespiFast RG Panel facilite le diagnostic d'une infection des voies respiratoires lorsqu'il est utilisé conjointement avec d'autres résultats d'analyse clinique et de laboratoire. Des résultats négatifs n'indiquent pas nécessairement l'absence d'une infection virale ou bactérienne des voies respiratoires ; un diagnostic, une thérapie ou tout autre choix de traitement ne doivent en aucun cas se fonder sur de seuls résultats négatifs. Des résultats positifs n'excluent pas une co-infection par d'autres agents pathogènes. Le ou les agents pathogènes détectés peuvent ne pas être la véritable cause de la maladie.

Il convient d'intégrer d'autres analyses de laboratoire et une évaluation du tableau clinique au diagnostic final. Ce produit ne doit être utilisé que par du personnel de laboratoire expérimenté.

\* Le test RespiFast RG Panel détecte 16 virus à ARN, mais ne différencie pas les rhinovirus des entérovirus ni les coronavirus HKU1 des coronavirus NL63.

---

## Résumé et description

Les infections aiguës des voies respiratoires représentent le type d'infection aiguë le plus répandu chez les adultes et les enfants et sont une importante cause de maladie chez les patients immunocompromis. Les infections des voies respiratoires (RTI) sont généralement réparties en infections des voies respiratoires supérieures (URTI) et en infections des voies respiratoires inférieures (LRTI). Les URTI comprennent la rhinorrhée, la conjonctivite, la pharyngite, l'otite moyenne et la sinusite. Les LRTI comprennent la pneumonie, la bronchiolite et la bronchite. Les RTI aiguës peuvent être causées par des virus comme par des bactéries, et les agents responsables sont aussi nombreux que variés, ce qui constitue un défi de taille en matière de diagnostic.

Les tests d'amplification d'acides nucléiques se sont avérés des variantes d'analyse rapides, sensibles et spécifiques, au format monoplex ou multiplex. Les tests multiplex permettent l'amplification conjointe de plus d'une cible, ce qui fournit des informations sur la signification des infections mixtes et sur le pronostic et la recrudescence de la maladie respiratoire.

## Principes de la procédure

Le test RespiFast RG Panel est basé sur SmartFinder<sup>®</sup>, une technologie qui permet de réaliser une analyse très complexe d'un ensemble comprenant jusqu'à 14 cibles en une seule réaction de PCR en temps réel. Le test RespiFast RG Panel contient 23 jeux d'amorces RespiFast combinées avec 15 sondes SMART (amplification multiplex en temps réel et en un seul tube) à marquage de fluorescence, qui permettent la détection de 22 agents pathogènes différents, ainsi qu'un contrôle interne et 2 contrôles d'amplification. La réaction commence par une amplification préliminaire qui combine une étape de transcription inverse avec une étape de PCR pour amplifier l'ADNc ou l'ADN cible. Ensuite, une fraction de la réaction d'amplification préliminaire est transférée dans deux tubes de PCR. Deux réactions

distinctes correspondant à l'étape 2 sont réalisées. La détection est effectuée par le biais d'une analyse de la courbe de fusion. Une représentation schématique de tout le test est présentée sur la Figure 1.

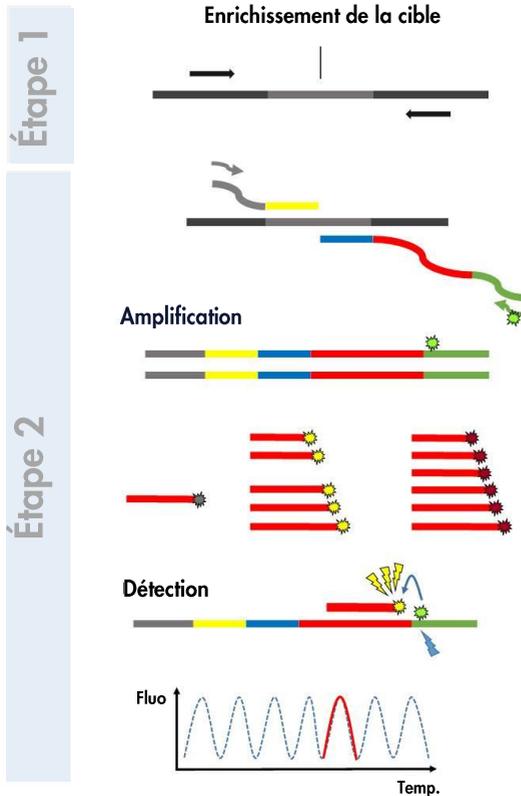


Figure 1. Aperçu de la procédure d'utilisation du test RespiFast RG Panel.

Le test RespiFast RG Panel est utilisé avec l'appareil Rotor-Gene Q MDx ou Rotor-Gene Q pour la détection des acides nucléiques du ou des agents pathogènes.

---

Un contrôle interne (IC) est incorporé au test dans le but de discriminer les échantillons vraiment négatifs des échantillons faussement négatifs résultant de la dégradation des acides nucléiques, de l'inhibition de la PCR ou d'un dysfonctionnement du test. Le test RespiFast RG Panel contient par ailleurs 2 contrôles d'amplification (AC) qui permettent de discriminer les conditions d'échec de l'extraction des conditions d'échec de l'amplification lors du test.

L'échantillon de départ comprend l'intégralité des acides nucléiques extraits et purifiés à partir d'échantillons nasopharyngés prélevés sur écouvillons. Les échantillons sont préparés selon un processus distinct du champ d'application du panel. Utiliser des méthodes ou des produits appropriés pour manipuler les échantillons et pour extraire et purifier les acides nucléiques (voir les rubriques « Manipulation et conservation des échantillons » page 14 et « Extraction et préparation des acides nucléiques », page 15).

## Gènes cibles

Les gènes cibles utilisés pour la conception des sondes et des amorces sont présentés dans le Tableau 1.

**Tableau 1. Gènes cibles du test RespiFast RG Panel**

Cible	Gène	Code de l'agent pathogène
<b>Contrôle</b>		
Contrôle interne	Gène de la protéine de lyse du phage MS2	IC
Contrôle d'amplification 1	séquence artificielle unique	AC1
Contrôle d'amplification 2	séquence artificielle unique	AC2
<b>Virus</b>		
Adénovirus	Gène de l'hexon (H)	Adeno
Bocavirus	Gène de protéine non capsidique (NP1)	Boca
Coronavirus 229E	Gène de protéine nucléocapsidique (NP)	229E
Coronavirus HKU1	Gène de phosphoprotéine nucléocapsidique (N)	HKU1
Coronavirus NL63	Gène de protéine nucléocapsidique (NP)	NL63
Coronavirus OC43	Gène de protéine nucléocapsidique (NP)	OC43
Métapneumovirus humain	Gène de protéine nucléocapsidique (NP)	hMPV
Virus de l'influenza A	Gène de protéine matricielle (M1)	InfA
Virus de l'influenza B	Gène de protéine matricielle (M1)	InfB
Virus de l'influenza A soustypé H1N1 pdm09	Gène de la neuraminidase	H1N1
Virus parainfluenza de type 1	Gène de l'hémagglutinine-neuraminidase (HN)	PIV1
Virus parainfluenza de type 2	Gène de l'hémagglutinine-neuraminidase (HN)	PIV2
Virus parainfluenza de type 3	Gène de l'hémagglutinine-neuraminidase (HN)	PIV3
Virus parainfluenza de type 4	Gène de la protéine nucléocapsidique majeure (N)	PIV4
Rhinovirus/Entérovirus	Gène de la polyprotéine de la région non traduite en 5' (PP)	Rhino/Entero
Virus respiratoire syncytial de type A	Gène de protéine non structurale	RSVA
Virus respiratoire syncytial de type B	Gène de nucléoprotéine	RSVB
<b>Bactéries</b>		
<i>Bordetella pertussis</i>	Séquence d'insertion 481 (IS481)	B. pert
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	Gène de la protéine majeure de la membrane externe (OmpA)	C. pneu

Cible	Gène	Code de l'agent pathogène
<i>Legionella pneumophila</i>	Gène de potentialisation de l'inhibiteur de macrophages (Mip)	L. pneu
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Gène de la protéine cytadhésine (P1)	M. pneu

Pour chaque échantillon, une amplification préliminaire (étape 1) et deux réactions d'étape 2 sont réalisées. Les agents pathogènes, les marqueurs et le  $T_m$  mentionné pour les sondes d'hybridation SMART correspondantes dans les 2 réactions RespiFast sont présentés dans le Tableau 2.

**Tableau 2. Cibles et valeurs de  $T_m$  correspondantes des sondes SMART**

Marqueur	Sonde SMART	Plage d'acceptation des valeurs de $T_m$ (°C)	Code de l'agent pathogène (mélange 1)	Code de l'agent pathogène (mélange 2)	
Cy5®5	Cy5 sonde 1	50,5-53,5*	L. pneu	OC43	
	Cy5 sonde 2a	55-58	B. pert	–	
	Cy5 sonde 2b	52,5-55,5	–	HKU1/NL63	
	Cy5 sonde 3		60,5-63,5	Rhino/Entero	229E
			58,5-61,5		
	Cy5 sonde 4	66,5-69,5	C. pneu	–	
	Cy5 sonde 5	70,5-73,5	M. pneu	–	
Cy5 sonde 6	76-79	–	H1N1		
ROX™	ROX sonde 1	53,5-56,5	RSVA	PIV1	
	ROX sonde 2	58-61	Adeno	PIV2	
	ROX sonde 3	62,5-65,5	hMPV	PIV3	
	ROX sonde 4	66,5-69,5	RSVB	PIV4	
	ROX sonde 5	72,5-75,5	InfA	Boca	
	ROX sonde 6	76,5-79,5	InfB	–	
BHQ®1	BHQ1 sonde 1	70,5-73,5	IC	IC	
		61-64	AC1	–	
	BHQ1 sonde AC1	55,5-58,5	–	AC2	
	BHQ1 sonde AC2				

\* Les pics de la sonde 1 Cy5 ont parfois l'apparence d'un double pic. La valeur  $T_m$  correcte est celle du second pic.

## Matériel fourni

### Contenu du kit

<b>RespiFast RG Panel</b>		<b>(25)</b>
<b>Référence</b>		<b>4693163</b>
<b>Nombre de réactions</b>		<b>25</b>
<b>Description</b>	<b>Couleur de bouchon</b>	<b>Volume</b>
Mélange maître d'amplification préliminaire	Violet	> 160 µl
Mélange d'amorces d'amplification préliminaire	Blanc	> 220 µl
Tampon RespiFast 1 (contient l'AC1)	Rouge	> 500 µl
Tampon RespiFast 2 (contient l'AC2)	Bleu	> 500 µl
Enzyme RespiFast	Orange	> 55 µl
Contrôle interne (IC)	Noir	> 450 µl
Contrôle positif (PC)	Vert	> 50 µl
Tampon de dilution	Transparent	> 1 500 µl
<i>RespiFast RG Panel Handbook (Manuel du RespiFast RG Panel) (anglais)</i>		1

## 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'ARN/ADN (voir la rubrique « Extraction et préparation des acides nucléiques », page 15)

- Eau exempte de RNase/DNase

## Consommables

- Cônes jetables avec filtres hydrophobes
- Cônes jetables à faible rétention avec filtres hydrophobes
- Tubes de 1,5 ml exempts de RNase/DNase
- Tubes de PCR de 0,2 ml exempts de RNase/DNase (tubes individuels avec bouchons ou rangées de tubes avec bouchons individuels)
- Rangées de tubes et de bouchons, 0,1 ml (référence 981103 ou 981106) pour utilisation avec les appareils Rotor-Gene Q

## Équipement

- Pipettes réglables :\* 0,1–2 µl, 2–20 µl, 20–200 µl
- Mixeur Vortex\*
- Micro-centrifugeuse\* avec rotor pour tubes de 2 ml
- Centrifugeuse\* pour tubes réactionnels de 0,2 ml
- Bloc de refroidissement ou glace
- Thermocycleur\* pour tubes de PCR de 0,2 ml avec couvercle chauffé et vitesses de montée en température de 1 à 5 °C/seconde (pour l'amplification préliminaire ; par ex., le thermocycleur à bloc thermique GeneAmp® PCR System 9700)
- Appareils Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM\* ou Rotor-Gene Q 5plex HRM\* et accessoires

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

---

# Avertissements et précautions

Pour utilisation en diagnostic in vitro

En cas de 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. Elles sont disponibles en ligne au format PDF à l'adresse [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) où l'on peut trouver, consulter et imprimer les FDS de chaque kit et composant de kit QIAGEN®.

Pour connaître les informations de sécurité relatives au kit de purification utilisé, consulter le manuel du kit en question. Pour connaître les informations de sécurité relatives aux appareils, consulter le manuel d'utilisation de l'appareil en question.

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

## Précautions générales

Toujours respecter les mesures suivantes :

- Ce test moléculaire ne doit être effectué que par du personnel de laboratoire qualifié.
- Stocker et extraire les matières positives (échantillons et contrôles positifs) séparément de tous les autres réactifs, puis les ajouter au mélange réactionnel dans une zone de laboratoire spatialement éloignée.
- Porter des gants jetables pendant la réalisation du test.
- Utiliser des cônes jetables munis de filtres hydrophobes pour prévenir le risque de contamination croisée.

- Utiliser des cônes jetables à faible rétention munis de filtres hydrophobes lors de la manipulation du mélange maître d'amplification préliminaire et de l'enzyme RespiFast.
- Utiliser des flacons de PCR exempts de RNase/DNase.
- Toujours décongeler les échantillons d'ARN/ADN dans de la glace, puis les maintenir dans la glace ou dans un bloc réfrigérant.
- Toujours conserver les enzymes dans de la glace ou dans un bloc réfrigérant une fois qu'elles ont été sorties du congélateur. Manipuler les enzymes délicatement et les mélanger avec beaucoup de précautions.
- Une fois décongelés, centrifuger les réactifs pendant 5 secondes dans une centrifugeuse et les mélanger délicatement par pipetage.
- Tous les programmes de cycles doivent être enregistrés dans le logiciel du Rotor-Gene Q avant d'effectuer le test.
- Toujours centrifuger les flacons et les plaques de PCR brièvement et les ouvrir avec précautions pour éviter la formation d'aérosols.

**Remarque :** Pour éviter toute contamination, nous recommandons vivement d'effectuer les préparations expérimentales sous des hottes de PCR, dans les 3 zones distinctes suivantes :

Zone 1 : Préparer les mélanges maîtres pour l'amplification préliminaire et l'étape 2/analyse de fusion.

Zone 2 : Ajouter l'échantillon d'ARN/ADN au mélange.

Zone 3 : Effectuer l'étape 2 d'amplification préliminaire et l'analyse de la courbe de fusion en 2 étapes :

- Effectuer l'amplification préliminaire.
- Ajouter les produits d'amplification préliminaire au mélange obtenu à l'étape 2 (de préférence sous une hotte de PCR), puis effectuer l'étape 2 et l'analyse de la courbe de fusion.

---

## Stockage et manipulation des réactifs

Les composants du test RespiFast RG Panel doivent être conservés à l'abri de la lumière à une température de -30 à -15 °C et sont stables jusqu'à la date d'expiration mentionnée sur l'étiquette. Il convient d'éviter les cycles répétés de congélation-décongélation (> 5 x), car cela peut amoindrir la sensibilité du test.

## Manipulation et conservation des échantillons

La détection d'agents pathogènes du système respiratoire dépend du prélèvement d'échantillons de grande qualité, de leur transport rapide jusqu'au laboratoire et de leur conservation dans des conditions appropriées avant leur analyse en laboratoire. Les prélèvements nasopharyngés sur écouvillons conviennent à la détection d'infections virales et/ou bactériennes des voies respiratoires.

Les échantillons cliniques doivent être transportés au laboratoire le plus tôt possible, puis répartis en fractions aliquotes et traités. Les échantillons doivent être maintenus à 4 °C. Si les échantillons ne peuvent pas être traités en l'espace de 48 heures, il est impératif de les conserver sous forme congelée, à une température inférieure ou égale à -20 °C, de préférence à -70 °C.

# Procédure

## Extraction et préparation des acides nucléiques

Le kit QIAamp® MinElute® Virus Spin et le kit QIAasymphony® DSP Virus/Pathogen Mini de QIAGEN, présentés dans le Tableau 3, sont validés pour la purification de l'ADN et de l'ARN à partir du type d'échantillon humain indiqué pour une utilisation avec le test RespiFast RG Panel. Effectuer la purification des acides nucléiques selon les instructions figurant dans le manuel du kit.

**Tableau 3. Kit de purification validé pour une utilisation avec le test RespiFast RG Panel**

Type d'échantillon	Kit d'isolement d'acides nucléiques	Référence (QIAGEN)
Prélèvements nasopharyngés sur écouvillons	QIAamp MinElute Virus Spin Kit (50)	57704
	Kit QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Mini avec protocole Complex 200	937036

Utiliser 200 µl de matériau d'échantillon et éluer dans 60 µl de tampon d'élution. Nous recommandons vivement de ne pas essayer de concentrer les acides nucléiques, car cela pourrait accroître le risque d'inhibition des enzymes de RT-PCR. Un contrôle interne est ajouté à l'échantillon lysé (voir la rubrique « Utilisation d'un contrôle interne et d'ARN entraîneur », page 16).

Lors de l'utilisation du kit QIAamp MinElute Virus Spin, nous recommandons d'ajouter le tampon de lyse à l'échantillon sous une hotte à flux laminaire. La procédure d'extraction peut être poursuivie sur la paillasse une fois l'échantillon lysé. Après utilisation, il est conseillé de décontaminer la hotte à flux laminaire avec une solution de décontamination

(par ex. hypochlorite de sodium en concentration de 1 000 ppm)\* et d'allumer les lampes UV pendant 30 minutes.

Éviter autant que possible les cycles de congélation-décongélation de l'ADN/ARN extrait et stocker les extraits d'acides nucléiques à 4 °C s'il doivent être analysés en l'espace d'un jour. Pour un stockage sur de plus longues périodes, conserver l'ARN/ADN extrait à une température de -20 °C ou de -70 °C.

## Utilisation d'un contrôle négatif



Chaque cycle doit comprendre un contrôle négatif. Un contrôle négatif comprend 200 µl d'eau de qualité PCR et du contrôle interne (IC). Ce contrôle négatif est traité comme un échantillon normal, en ce qu'il est également soumis à la procédure d'extraction des acides nucléiques. Lors de l'analyse finale, le signal du contrôle négatif est utilisé comme référence pour le signal de fond dans les canaux FAM/ROX et FAM/Cy5 et pour les signaux d'IC et d'AC positifs dans le canal Green.

## Utilisation d'un contrôle interne et d'ARN entraîneur

L'emploi du kit QIAamp MinElute Virus Spin ou QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Mini conjointement avec le test RespiFast RG Panel nécessite l'introduction d'un contrôle interne (IC) dans la procédure de purification afin de surveiller l'efficacité de la préparation des échantillons et de l'analyse en aval. Par ailleurs, les kits QIAamp MinElute Virus Spin et QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Mini imposent la préparation d'un ARN entraîneur.

L'IC est un phage MS2 fourni à titre de contrôle pour la lyse, l'extraction de l'ARN/ADN, les performances du test RespiFast RG Panel et pour vérifier une éventuelle inhibition de la PCR.

\* En cas de 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.

L'IC est ajouté conjointement avec l'ARN entraîneur au tampon de lyse, puis le tout est ajouté à l'échantillon. La quantité d'IC inoculée est indépendante du volume initial de l'échantillon.

La quantité d'IC inoculée dépend du volume d'élution. Avec le kit QIAamp MinElute Virus Spin, l'ARN/ADN extrait sera élué dans un volume de 60 µl. Le volume d'IC à ajouter au tampon AL est de 5,5 µl par échantillon (voir le Tableau 4).

En cas d'infection sévère et/ou d'infections multiples, le pic de fusion de l'IC peut ne pas être visible dans l'analyse finale. Cela s'explique par le fait que des quantités élevées d'acides nucléiques d'un agent pathogène consomment la plupart des réactifs de l'essai. En conséquence, lorsque le signal de l'IC est absent malgré la présence d'un ou de plusieurs pics de fusion spécifiques à une infection, l'essai est encore valable.

**Tableau 4. Volumes de tampon AL, de mélange ARN entraîneur-tampon AVE et d'IC nécessaires avec l'extraction du kit QIAamp MinElute Virus Spin**

Nombre d'échantillons	Volume de tampon AL (ml)	Volume de mélange ARN entraîneur-AVE (µl)	Volume de contrôle interne (µl)
1	0,22	6,2	5,5
2	0,44	12,3	11
3	0,66	18,5	16,5
4	0,88	24,6	22
5	1,1	30,8	27,5
6	1,32	36,9	33
7	1,54	43,1	38,5
8	1,76	49,2	44
9	1,98	55,4	49,5
10	2,2	61,5	55
11	2,42	67,7	60,5
12	2,64	73,8	66

L'emploi du kit QIASymphony DSP ou QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini conjointement avec le test RespiFast RG Panel nécessite l'introduction d'un contrôle interne (IC) dans la procédure de purification afin de surveiller l'efficacité de la préparation des échantillons et de l'analyse en aval.

Pour le calcul du contrôle interne (IC), il faut utiliser la fonction « IC Calculator » (calculateur IC) du QIASymphony Management Console (QMC).

Pour garantir un volume d'élution de 60 µl, l'appareil doit ajouter un volume réel de tampon d'élution de 90 µl à l'échantillon. La quantité d'IC ajoutée par échantillon est de 7,5 µl. Il convient donc de configurer un rapport contrôle interne/échantillon de 7,5 dans la fonction « IC Calculator » du QIASymphony Management Console (QMC).

Le Tableau 5 présente l'addition du contrôle interne à l'échantillon dans le rapport de 7,5 µl par échantillon. Il est recommandé de préparer des mélanges frais pour chaque cycle juste avant leur utilisation.

**Tableau 5. Préparation de l'ARN entraîneur et du contrôle interne**

Composant	n = nombre d'échantillons et de contrôles	
	n ≤ 13	n ≥ 13
	Volume (µl) (Tubes Sarstedt)*	Volume (µl) (Tubes CO)†
Solution mère d'ARN entraîneur (CARRIER)	(n + 3) x 3	(n + 5) x 3
Contrôle interne	(n + 3) x 7,5	(n + 5) x 7,5
Tampon AVE	(n + 3) x 109,5	(n + 5) x 109,5
<b>Volume final par échantillon (hors volume mort)</b>	<b>120</b>	<b>120</b>
<b>Volume total pour n échantillons</b>	<b>(n + 3) x 120</b>	<b>(n + 5) x 120</b>

\* Micro tubes 2,0 ml Type H et Micro tubes 2,0 ml Type I (microtubes Sarstedt, références 72.693 et 72.694). Si l'IC est préparé sous forme de solution mère dans un tube plus gros, multiplier le volume total de chaque composant par le nombre de tubes d'IC utilisés. Un mélange de contrôle interne correspondant à 3 échantillons supplémentaires (c'est-à-dire 360 µl) est requis. Ne pas remplir plus de 1,92 ml de volume total (ce qui correspond à un maximum de 13 échantillons).

Si plus de 13 réactions sont prévues dans des microtubes de 2,0 ml, préparer les réactions dans un tube plus gros et charger le tout dans plusieurs tubes. Pour chaque tube, veiller à ajouter le volume excédentaire requis pour 3 réactions supplémentaires.

<sup>†</sup> Tubes en polystyrène à fond rond de 14 ml, 17 x 100 mm (Corning, anciennement Becton Dickinson, référence 352051). Un mélange de contrôle interne correspondant à 5 échantillons supplémentaires (c'est-à-dire 600 µl) est requis. Ne pas remplir plus de 13,92 ml de volume total.

## Utilisation du contrôle d'amplification

Les tampons RespiFast 1 et 2 contiennent un contrôle d'amplification (AC) qui leur est propre. L'AC permet de contrôler la deuxième partie du protocole RespiFast : l'ajout correct de réactifs et l'application du protocole adéquat de PCR et d'analyse de fusion. L'AC 1 et l'AC 2 sont détectés par une sonde marquée BHQ1 et renvoient des valeurs  $T_m$  différentes, ce qui permet de détecter les erreurs de confusion concernant les réactions de mélange 1 et 2.

La réaction de l'AC peut être concurrencée en présence d'une infection sévère. Si aucun agent pathogène n'est détecté au cours de la réaction, l'AC doit mettre en évidence un pic de fusion, qui permettra de valider l'absence de réactions pathogènes.

Lorsqu'une infection sévère est présente dans l'un des mélanges RespiFast d'un échantillon, l'IC peut ne pas être détecté dans ce mélange RespiFast et dans le mélange RespiFast correspondant, car il a été concurrencé par l'agent pathogène au cours de l'amplification préliminaire. Dans ce cas, la présence de l'AC dans le mélange RespiFast correspondant garantit qu'une amplification adéquate a eu lieu dans les deux mélanges RespiFast.

## Utilisation du contrôle positif

Le test RespiFast RG Panel intègre un contrôle positif composé d'un ADN plasmidique contenant les séquences cibles de 4 agents pathogènes susceptibles d'être détectés par le test. Tableau 6 fournit un aperçu du contenu du contrôle positif. Il est inutile d'extraire le contrôle positif, qui est considéré comme un échantillon standard dans le protocole

RespiFast RG. Il est recommandé, mais pas obligatoire, d'utiliser le contrôle positif au cours d'un cycle RespiFast RG Panel.

**Tableau 6. Contrôle positif**

<b>Cible</b>	<b>Mélange de détection</b>	<b>Canal de détection</b>	<b><math>T_m</math> moyen</b>
Influenza A	Mélange 1	FAM/ROX	74 °C
<i>Bordetella pertussis</i>	Mélange 1	FAM/Cy5	56,5 °C
Virus parainfluenza de type 2	Mélange 2	FAM/ROX	59,5 °C
Coronavirus 229E	Mélange 2	FAM/Cy5	60 °C

# Protocole : Amplification par PCR et analyse de la fusion

## Avant de commencer

- Décongeler l'ARN/ADN matriciel (si celui-ci est congelé) et tous les réactifs, et maintenir les tubes dans de la glace.
- Préparer les volumes requis des divers mélanges en quantité légèrement supérieure de manière à compenser les pertes dues au pipetage.

## Procédure

### Amplification préliminaire

1. Homogénéiser le mélange maître d'amplification préliminaire par retournement à plusieurs reprises pour garantir sa décongélation complète et un mélange homogène de la solution. Centrifuger brièvement le tube. Préparer le mélange de la réaction d'amplification préliminaire tel que décrit dans le Tableau 7 et le conserver dans de la glace.

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

**Remarque** : Les mélanges de l'étape 2 peuvent être préparés en même temps que le mélange d'amplification préliminaire et doivent être conservés à l'abri de la lumière à 4 °C jusqu'à leur utilisation. Une préparation simultanée des mélanges n'est possible que lorsque le protocole est intégralement appliqué et sans aucun délai ; aucune interruption n'est tolérée entre les deux étapes. La stabilité des mélanges n'est pas garantie en cas de stockage plus long (par ex. un stockage jusqu'au lendemain).

**Tableau 7. Préparation du mélange réactionnel d'amplification préliminaire**

<b>Nombre d'échantillons (couleur de bouchon du tube réactionnel)</b>	<b>1</b>	<b>12</b>
Mélange maître d'amplification préliminaire (violet)	6,25 µl	75 µl
Mélange amorces d'amplification préliminaire (blanc)	8,75 µl	105 µl
<b>Volume total</b>	<b>15 µl</b>	<b>180 µl</b>

2. Homogénéiser délicatement, mais complètement, le mélange réactionnel d'amplification préliminaire et distribuer 15 µl du mélange dans chaque tube de PCR de 0,2 ml. Ajouter ensuite 10 µl de l'échantillon d'ADN/ARN élué, de contrôle négatif ou de contrôle positif (voir le Tableau 8).
3. Fermer les tubes de PCR. Mélanger soigneusement. Centrifuger brièvement les tubes et les placer à nouveau dans de la glace ou dans un bloc réfrigérant.

**Tableau 8. Préparation des réactions d'amplification préliminaire**

<b>Nombre d'échantillons</b>	<b>1</b>	<b>12</b>
Mélange maître d'amplification préliminaire	15 µl	15 µl chacun
Contrôle d'échantillon négatif ou positif	10 µl	10 µl chacun
<b>Volume total</b>	<b>25 µl</b>	<b>25 µl chacun</b>

4. Programmer le thermocycleur à bloc thermique tel que décrit dans le Tableau 9.

**Tableau 9. Programme du thermocycleur pour l'amplification préliminaire**

<b>Transcription inverse :</b>	10 minutes	50°C
<b>Étape initiale d'activation :</b>	2 minutes	95°C
<b>Cycle en 3-étapes :</b>		
Dénaturation	20 secondes.	94°C
Hybridation	20 secondes.	55°C
Élongation	35 secondes.	72°C
Nombre de cycles	40	
<b>Plateau :</b>	–	20°C

- Démarrer le programme d'amplification préliminaire tandis que les tubes de PCR sont encore dans la glace. Attendre que le thermocycleur atteigne une température de 50 °C. Placer ensuite les tubes dans le bloc du thermocycleur et fermer le couvercle chauffant.

## Étape 2 du test RespiFast RG Panel

- Créer un profil de température pour l'appareil Rotor-Gene Q selon les étapes suivantes. Un aperçu du programme du thermocycleur est présenté dans le Tableau 10.

Définition des paramètres généraux d'analyse	<b>Figure 2, Figure 3</b>
Création de nouveaux canaux	<b>Figure 4 à Figure 7</b>
Modification du gain	<b>Figure 8, Figure 9</b>
Programmation du profil de température	<b>Figure 10 à Figure 15</b>
Programmation du programme de fusion	<b>Figure 16, Figure 17</b>
Résumé et enregistrement du modèle	<b>Figure 18, Figure 19</b>
Démarrage du cycle	<b>Figure 20</b>

Toutes les spécifications font référence au logiciel Rotor-Gene Q version 2.3. Le manuel d'utilisation fournit de plus amples informations sur la programmation des appareils Rotor-Gene. Dans les images suivantes, ces réglages sont encadrés en noir et en gras. Les illustrations sont fournies pour les appareils Rotor-Gene Q.

**Tableau 10. Aperçu du programme du thermocycleur pour des cycles de l'étape 2**

			Commentaires
<b>Étape de dénaturation initiale :</b>	2 minutes	95°C	
<b>PCR 1 : Cycle en 3-étapes :</b>			PCR de spécificité élevée
Dénaturation	15 secondes.	94°C	
Hybridation	15 secondes.	55°C	
Élongation	15 secondes.	72°C	
Nombre de cycles	10		
<b>PCR 2 : Cycle en 3-étapes :</b>			
Dénaturation	15 secondes.	94°C	
Hybridation	15 secondes.	50°C	Acquisition*
Dénaturation	15 secondes.	72°C	
Nombre de cycles	23		
<b>Dénaturation :</b>	2 minutes	95°C	
<b>Programme de fusion :</b>	–	40-90°C	Acquisition†

\* Canaux d'acquisition : Vert, gain 4 ; Rouge, gain 1 ; FAM™/ROX, gain 8 ; et FAM/Cy5, gain 10.

† Canaux d'acquisition : Vert, Rouge, FAM/ROX et FAM/Cy5. Utiliser l'option « Optimize gain before melt on all tubes » (Optimiser le gain avant d'effectuer la fusion dans tous les tubes). « The gain giving the highest fluorescence less than 95 will be selected » (Le gain présentant la fluorescence la plus élevée inférieure à 95 sera sélectionné).

7. Commencer par ouvrir la boîte de dialogue « New Run Wizard » (Assistant de lancement d'un nouveau cycle) (**Figure 2**). Cocher la case « Locking Ring Attached » (Anneau de blocage posé) et cliquer sur « Next » (Suivant).

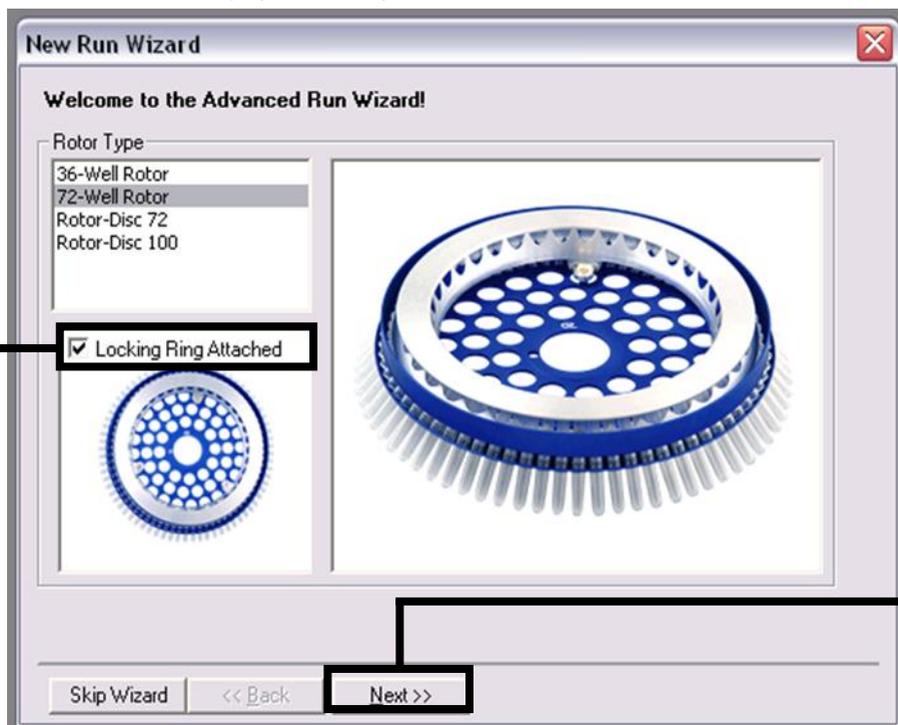


Figure 2. Boîte de dialogue « New Run Wizard ».

8. Sélectionner 25 pour le volume réactionnel et cliquer sur « Next » (Figure 3).

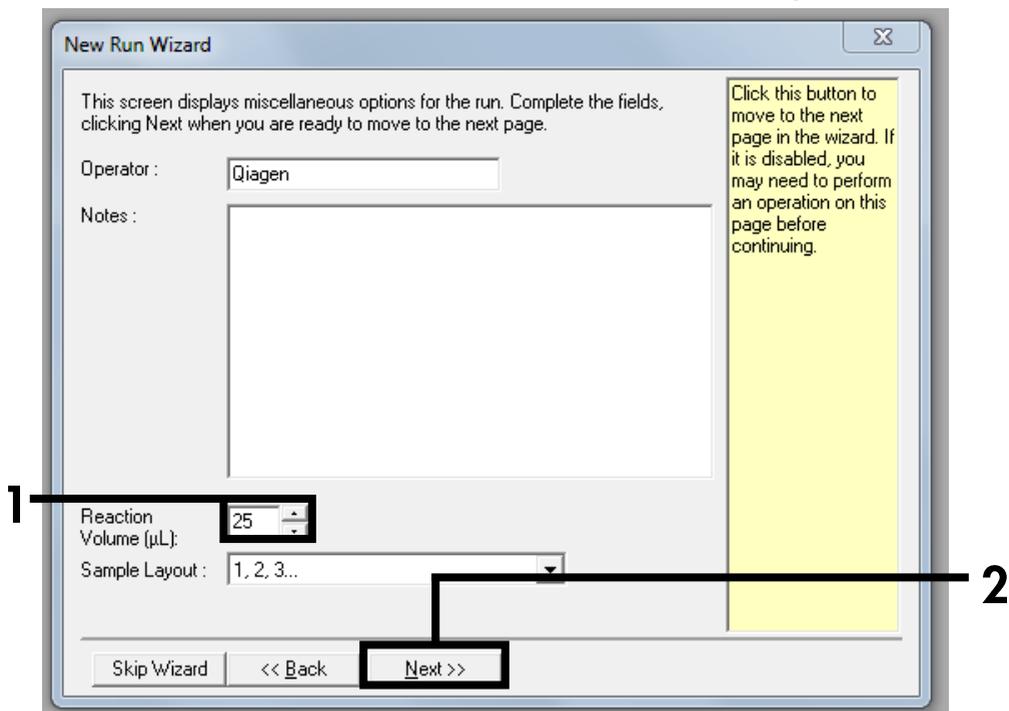


Figure 3. Définition des paramètres généraux d'analyse.

9. Cliquer sur le bouton « Create new » (Créer un nouveau) dans la boîte de dialogue « New Run Wizard » suivante (Figure 4) et programmer 2 canaux supplémentaires, comme indiqué sur les Figure 5 à Figure 7).

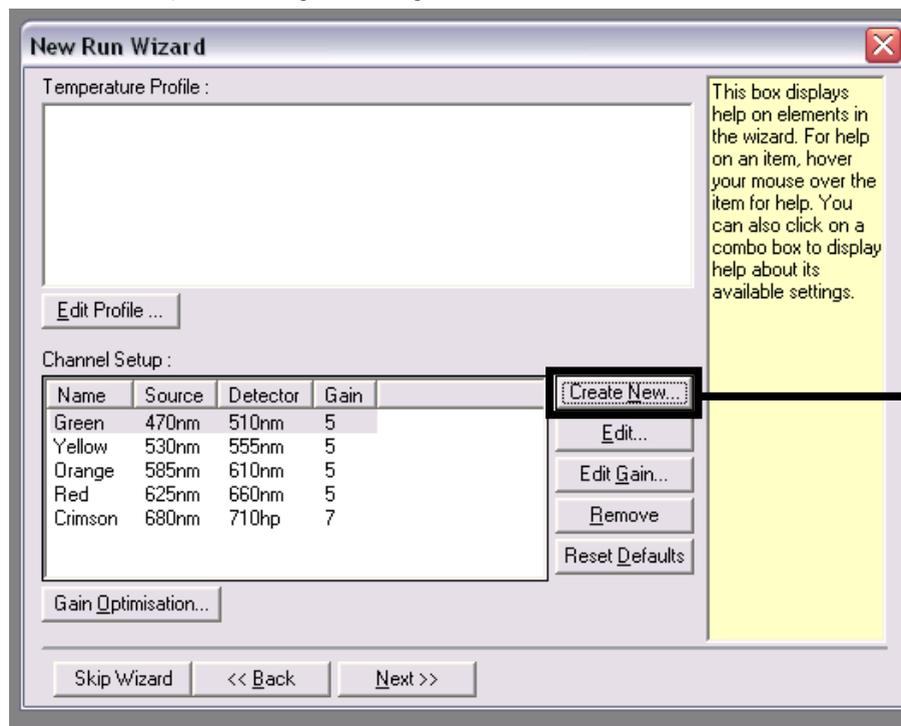


Figure 4. Création de nouveaux canaux.

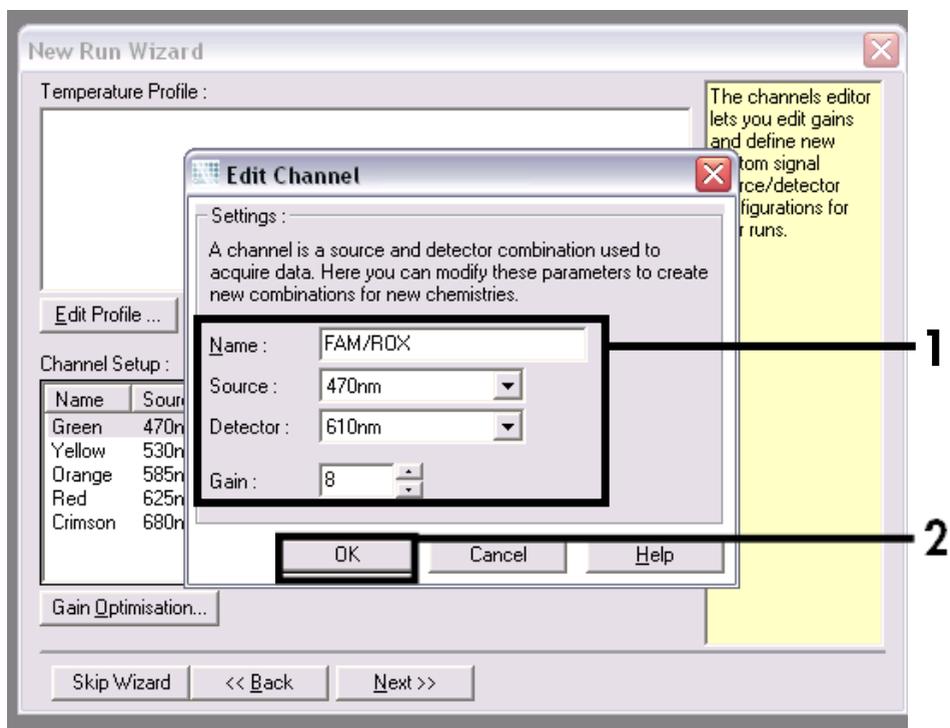


Figure 5. Création d'un nouveau canal « FAM/ROX ».

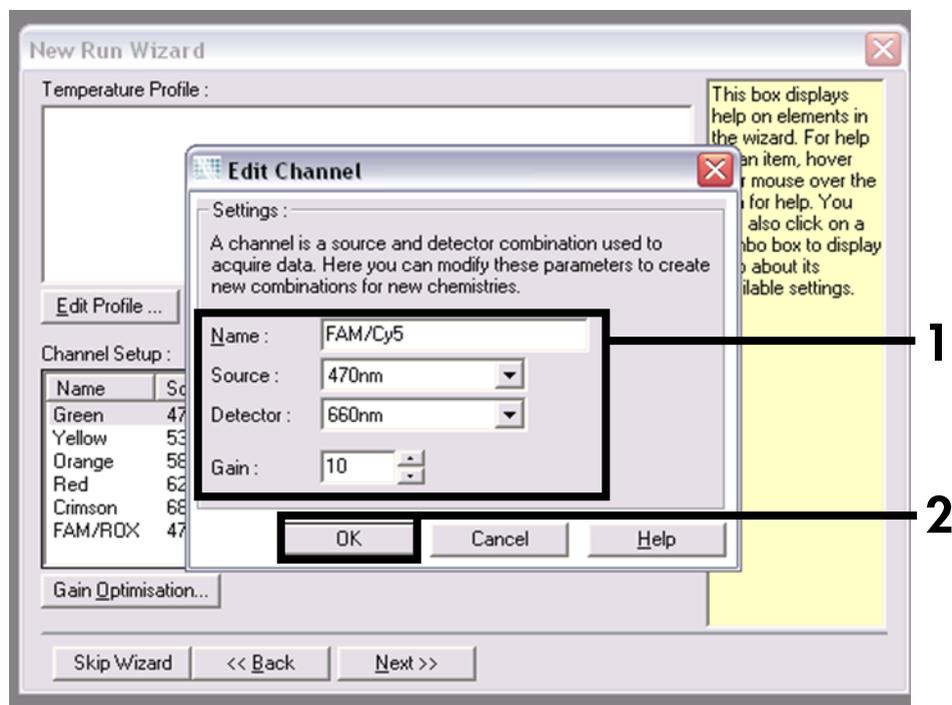


Figure 6. Création d'un nouveau canal « FAM/Cy5 ».

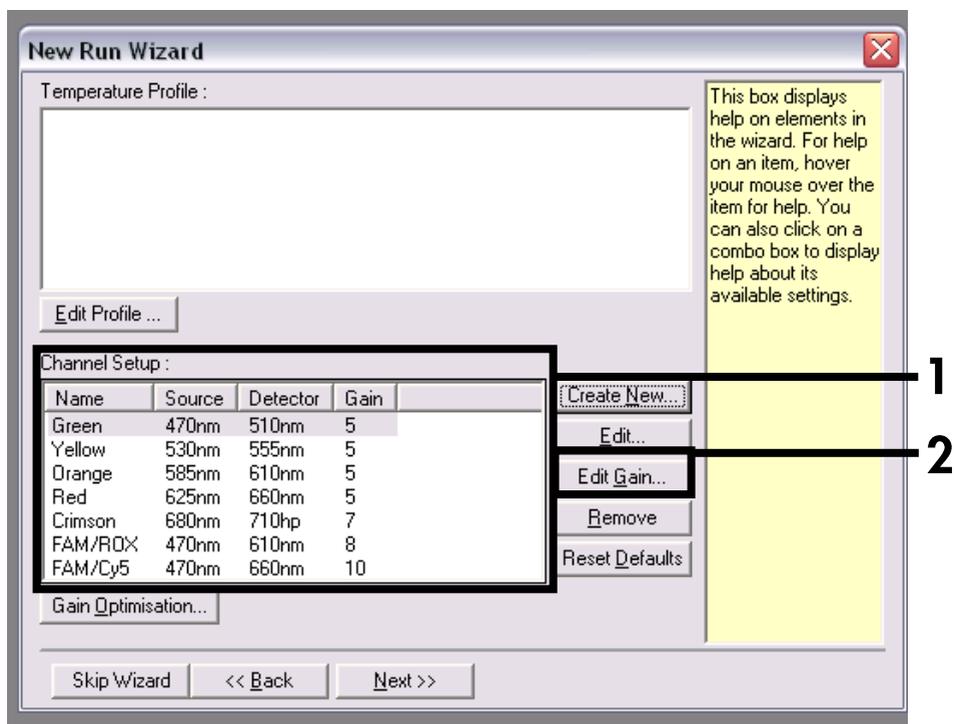
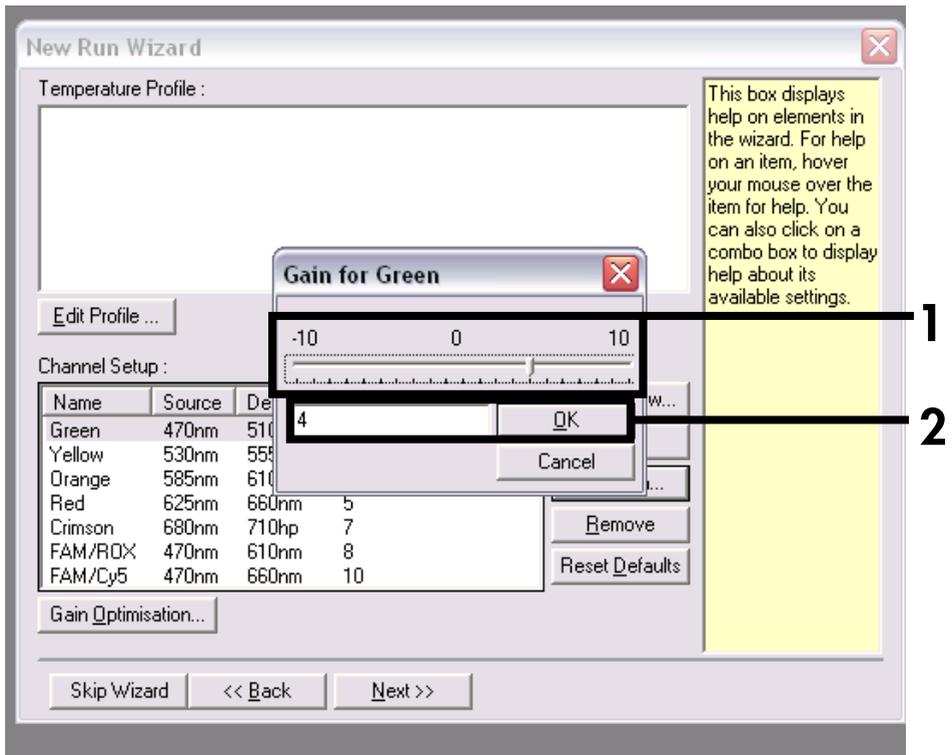


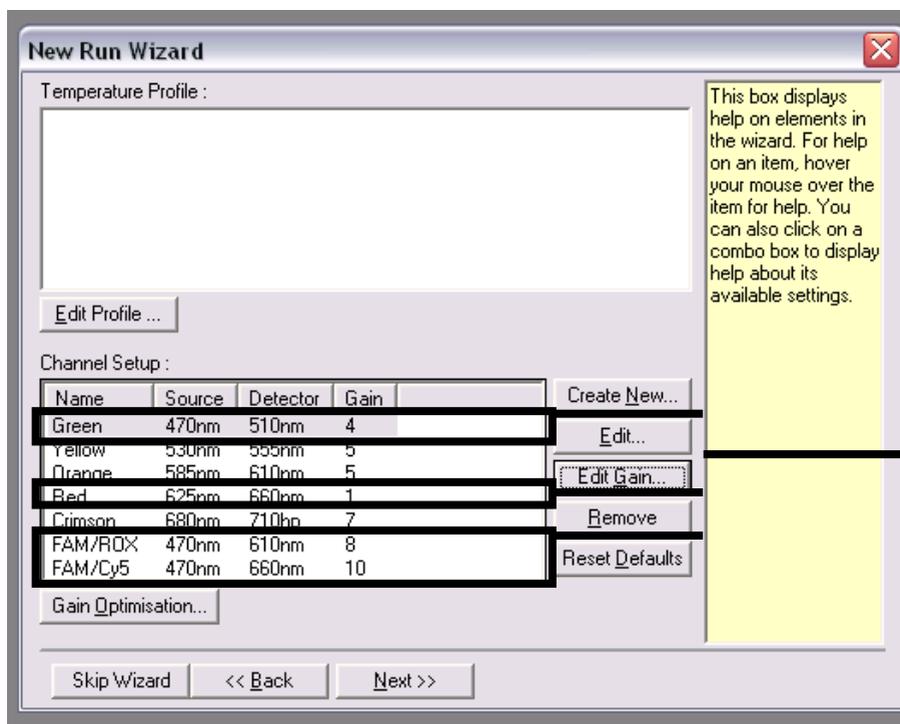
Figure 7. Nouveaux canaux intégrés.

10. Modifier le gain pour chaque canal, comme indiqué sur la **Figure 8**. Les réglages du gain final pour chaque canal sont indiqués sur la **Figure 9**.

Les réglages du gain pour l'appareil Rotor-Gene Q sont sélectionnés pour éviter la saturation des canaux de détection. Cependant, si une saturation est observée dans l'un quelconque des canaux de détection, les réglages de gain pour le canal saturé en question doivent être adaptés et une nouvelle analyse de la courbe de fusion doit être effectuée.

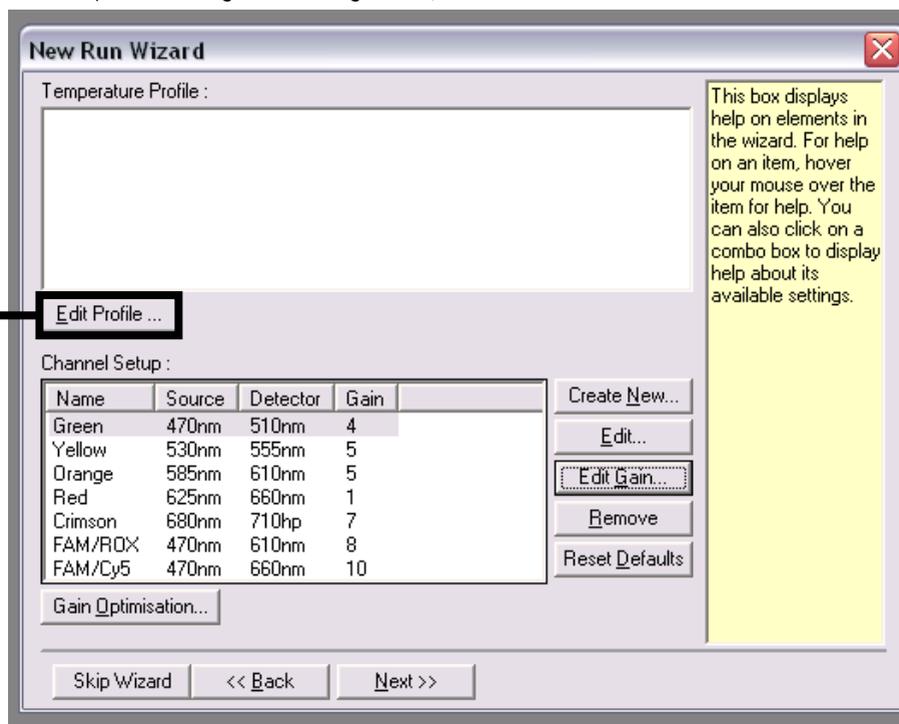


**Figure 8. Modification du gain.** À titre d'exemple, la figure montre le réglage du gain sur la valeur 4 pour le canal Cycling Green.



**Figure 9. Réglages du gain final pour tous les canaux.** Les canaux requis sont les suivants : Vert, gain 4 ; Rouge, gain 1 ; FAM/ROX, gain 8 ; et FAM/Cy5, gain 10.

11. Dans la boîte de dialogue « New Run Wizard » suivante, cliquer sur le bouton « Edit Profile » (Modifier profil) (**Figure 10**) et programmer le profil de température comme indiqué sur les **Figure 11** à **Figure 16**).



**Figure 10. Modification du profil.**

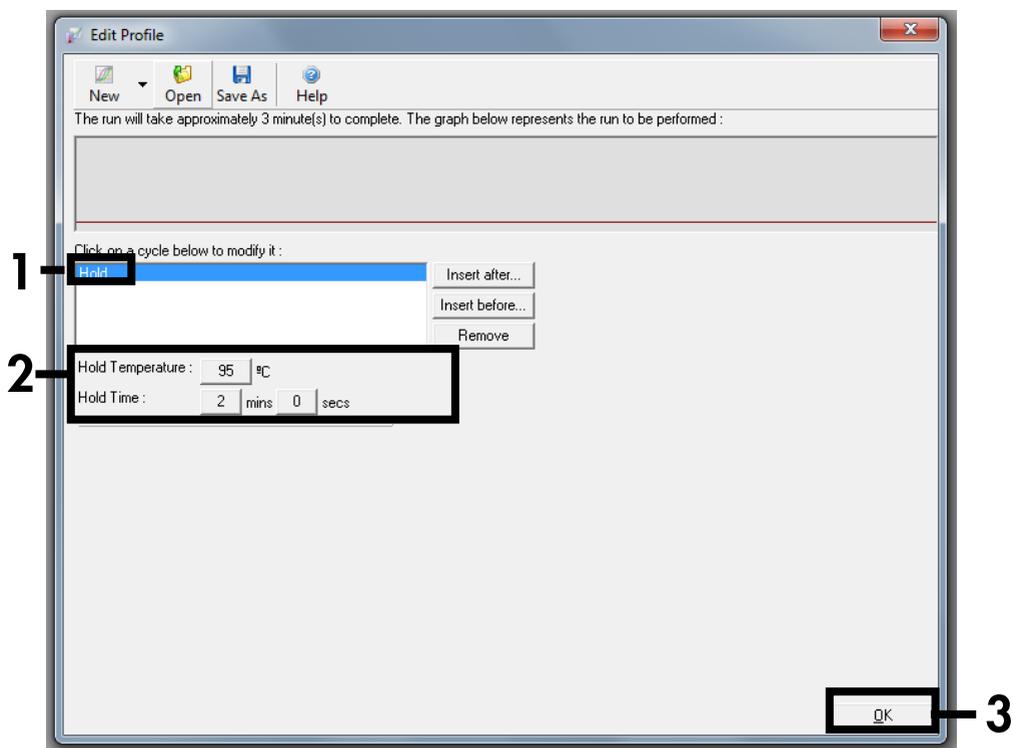


Figure 11. Étape de dénaturation initiale.

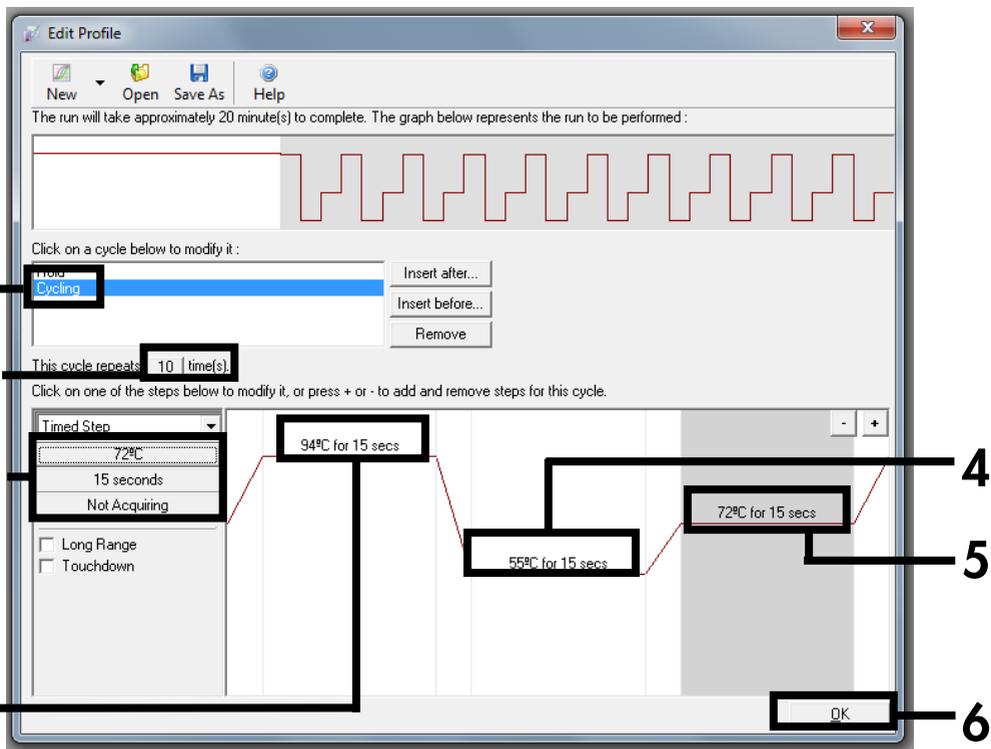


Figure 12. PCR 1.

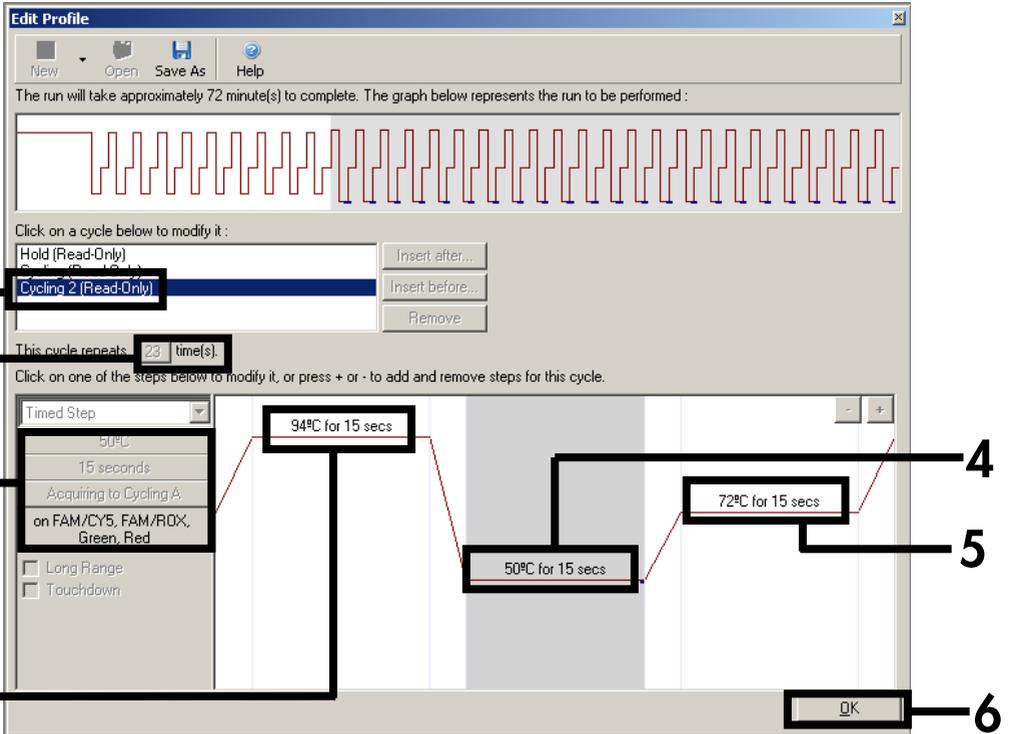


Figure 13. PCR 2 présentant une acquisition de signal à 50 °C. Les canaux requis pour l'acquisition sont présentés sur la Figure 14.

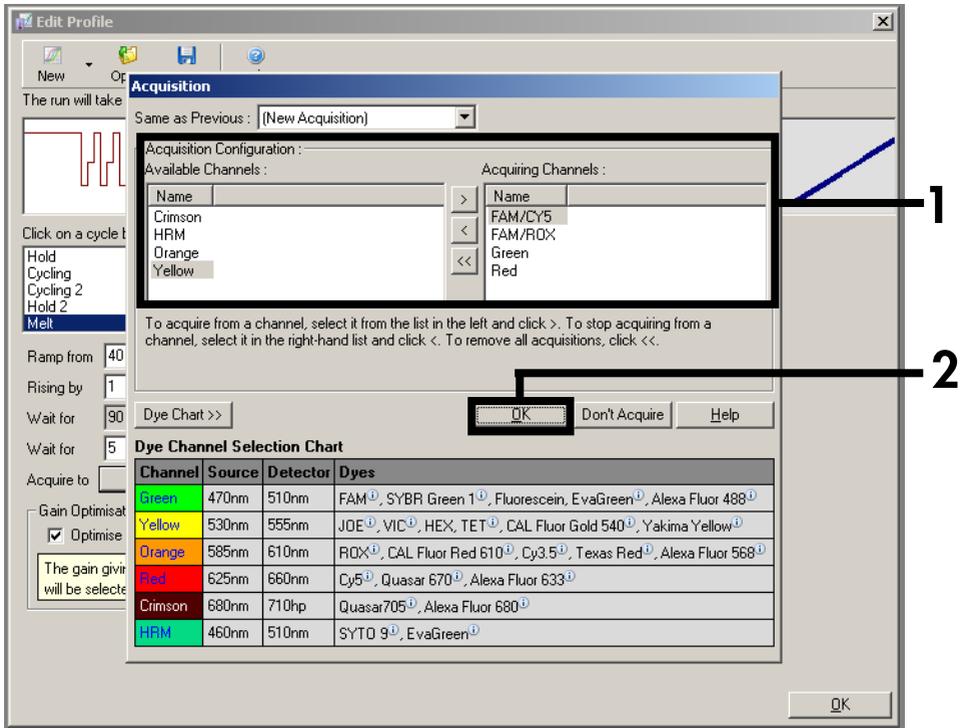


Figure 14. Sélection de tous les canaux requis pour l'acquisition.

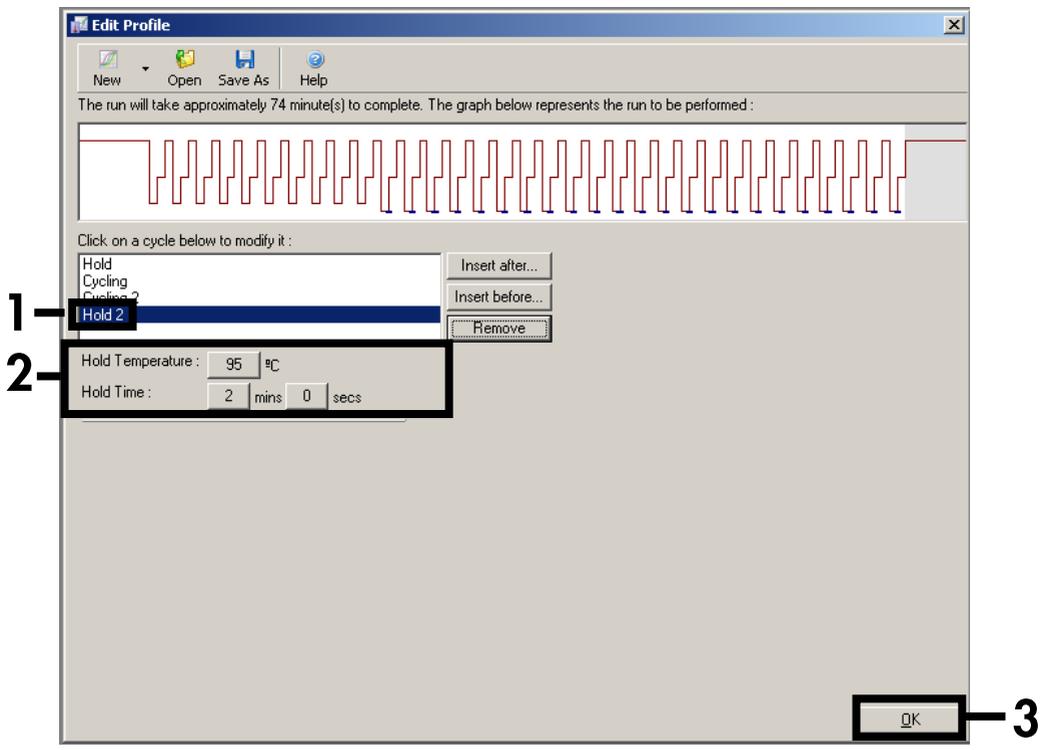


Figure 15. Dénaturation des produits de PCR.

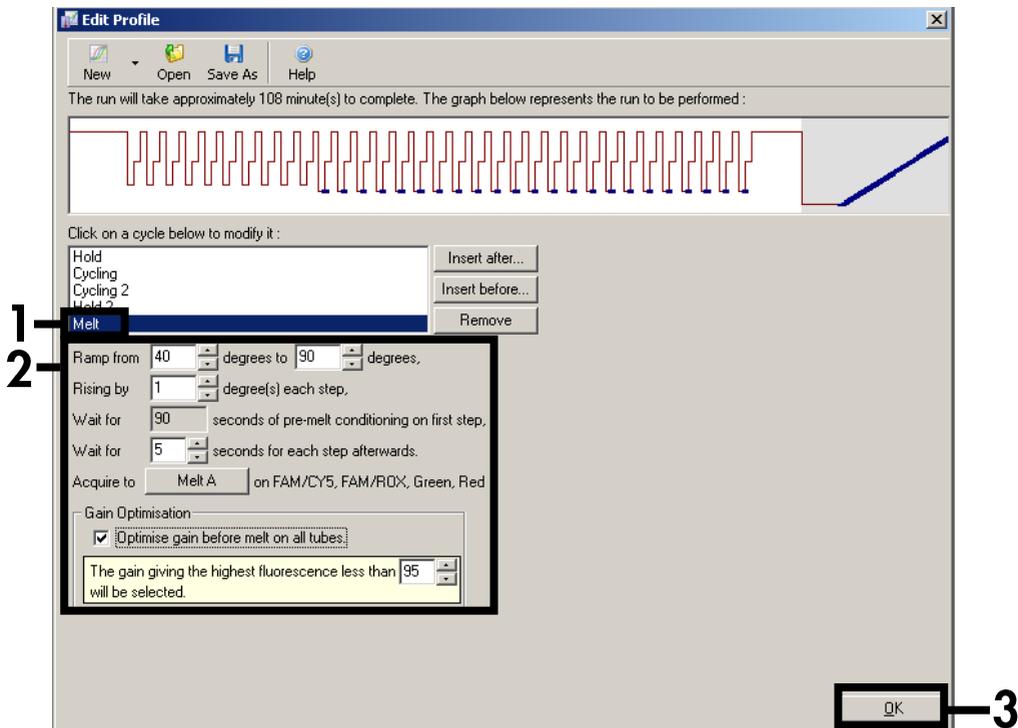


Figure 16. Programme de fusion.

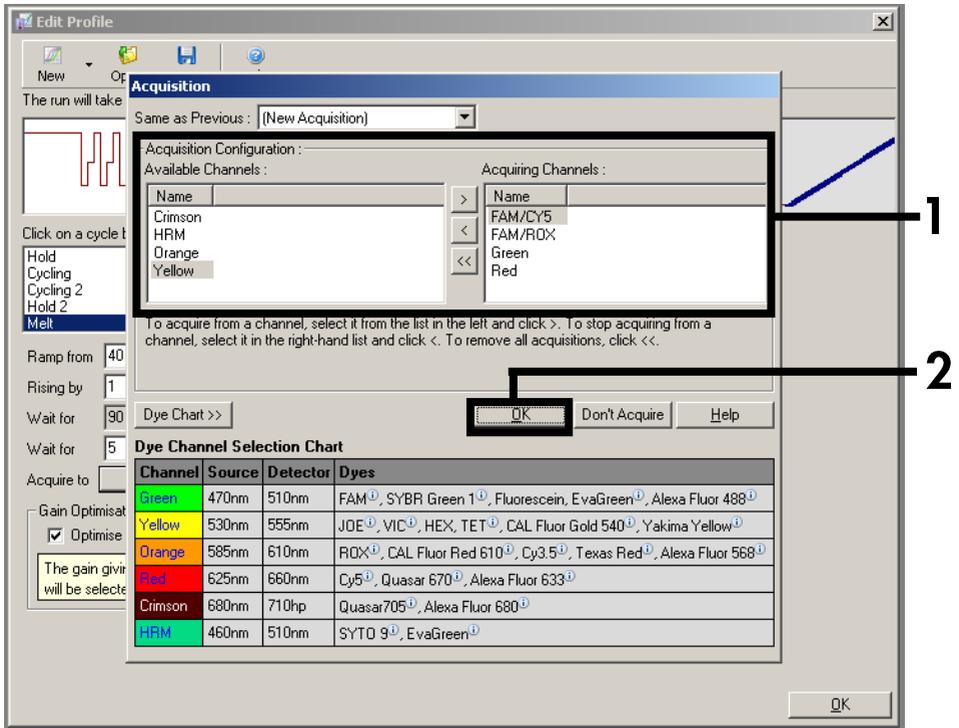


Figure 17. Acquisition pendant le programme de fusion.

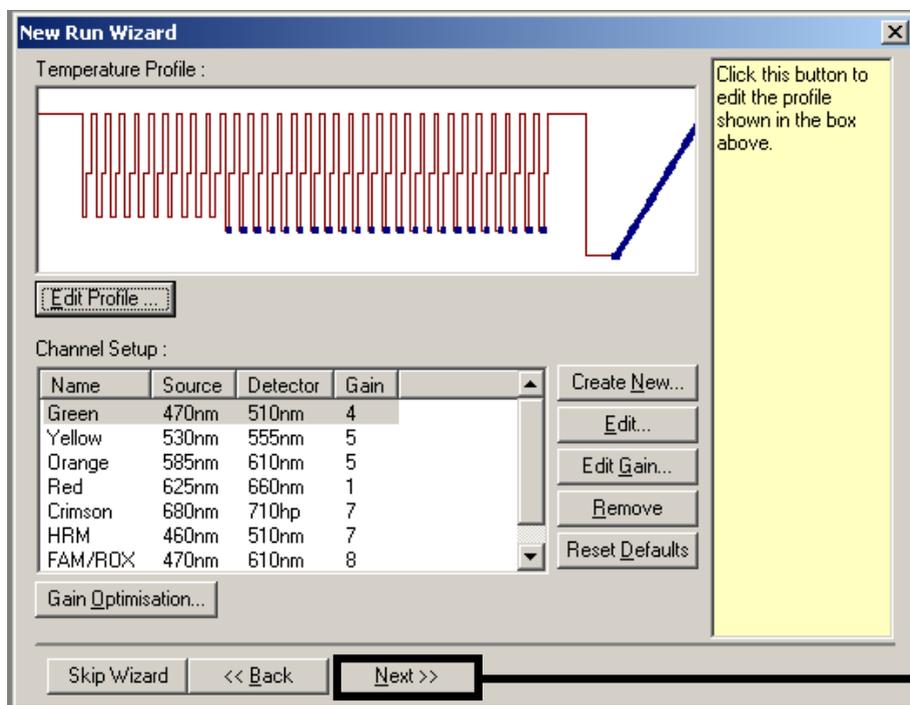


Figure 18. Résumé du profil de température.

12. Enregistrer le modèle pour une utilisation ultérieure (Figure 19).

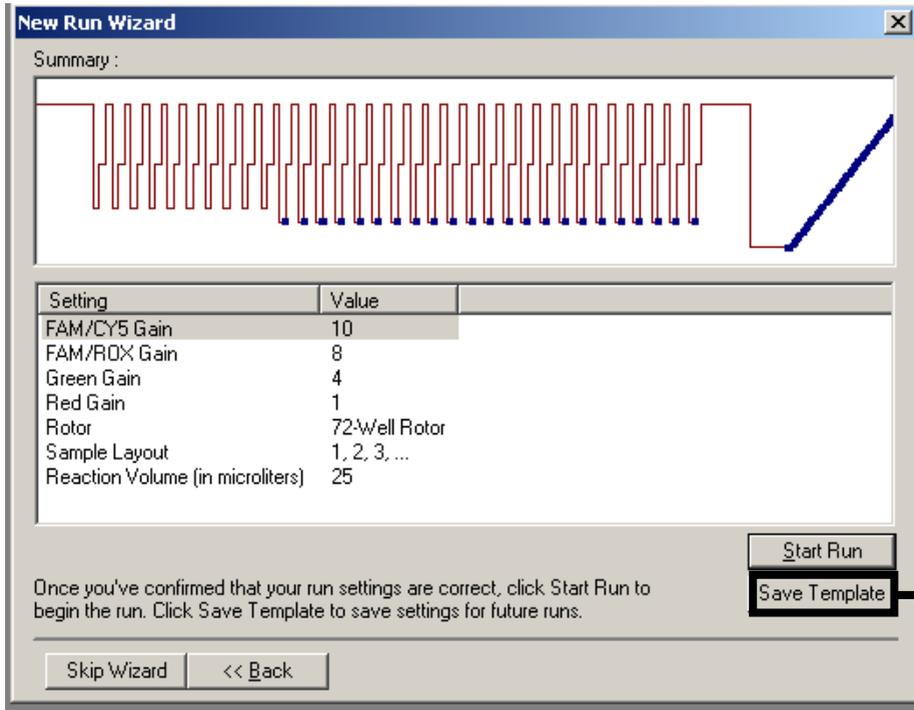


Figure 19. Enregistrement du modèle pour une utilisation ultérieure.

13. Préparer le mélange 1 de l'étape 2 tel que décrit dans le Tableau 11 et le mélange 2 de l'étape 2 tel que décrit dans le Tableau 12 et mélanger le tout délicatement, mais complètement.

Si les mélanges de l'étape 2 ont déjà été préparés à l'étape 1, attendre la fin du programme d'amplification préliminaire, puis passer à l'étape 14.

**Tableau 11. Préparation du mélange 1 de l'étape 2**

<b>Nombre d'échantillons (couleur de bouchon du tube réactionnel)</b>	<b>1</b>	<b>12</b>
Tampon RespiFast 1 (rouge)	19 µl	228 µl
Enzyme RespiFast (orange)	1 µl	12 µl
<b>Volume total du mélange 1 de l'étape 2</b>	<b>20 µl</b>	<b>240 µl</b>

**Tableau 12. Préparation du mélange 2 de l'étape 2**

<b>Nombre d'échantillons (couleur de bouchon du tube réactionnel)</b>	<b>1</b>	<b>12</b>
Tampon RespiFast 2 (bleu)	19 µl	228 µl
Enzyme RespiFast (orange)	1 µl	12 µl
<b>Volume total du mélange 2 de l'étape 2</b>	<b>20 µl</b>	<b>240 µl</b>

14. Pour chaque échantillon, distribuer 20 µl de mélange 1 de l'étape 2 dans une rangée de tubes de PCR pour Rotor-Gene et distribuer 20 µl de mélange 2 de l'étape 2 dans une nouvelle rangée de tubes de PCR pour Rotor-Gene.

15. À la fin du programme d'amplification préliminaire (étape 5), sortir les tubes de PCR du thermocycleur et les centrifuger brièvement. Distribuer 5 µl de chaque réaction d'amplification préliminaire dans chacune des 2 rangées de tubes de PCR — l'une contenant le mélange 1 de l'étape 2 et l'autre le mélange 2 de l'étape 2 (voir le Tableau 13).

**Tableau 13. Préparation des réactions de l'étape 2**

<b>Nombre d'échantillons</b>	<b>1</b>	<b>12</b>
Mélange 1 de l'étape 2	20 µl	20 µl chacun
Réaction d'amplification préliminaire	5 µl	5 µl chacun
<b>Volume total</b>	<b>25 µl</b>	<b>25 µl chacun</b>
Mélange 2 de l'étape 2	20 µl	20 µl chacun
Réaction d'amplification préliminaire	5 µl	5 µl chacun
<b>Volume total</b>	<b>25 µl</b>	<b>25 µl chacun</b>

16. Fermer les rangées de tubes à l'aide des bouchons appropriés et les placer dans le rotor de l'appareil Rotor-Gene Q.
17. Placer le rotor dans l'appareil Rotor-Gene Q. S'assurer que l'anneau de blocage (accessoire de l'appareil Rotor-Gene Q) est placé en haut du rotor pour éviter que les tubes ne s'ouvrent accidentellement au cours du cycle.
18. Démarrer le cycle (**Figure 20**) en utilisant le modèle enregistré (étape 12).

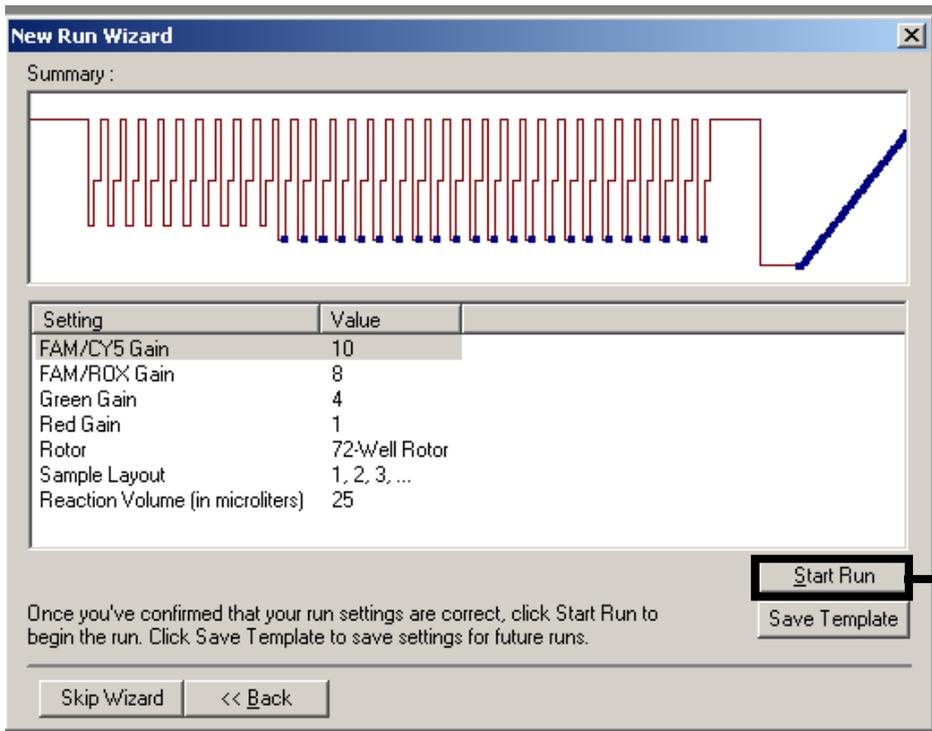


Figure 20. Démarrage du cycle.

# Interprétation des résultats

## Normalisation

Sur les appareils Rotor-Gene Q, les données brutes du canal FAM/Cy5 doivent d'abord être normalisées afin de compenser les interférences entre les différents canaux.

Pour normaliser les signaux du Cy5, ouvrir le canal brut Melt A.FAM/Cy5 (réglages de filtre sur 470–660 nm). Cliquer sur le bouton « Option » (Option) et sélectionner la fonction « Normalise to Melt A.FAM/ROX » (Normaliser sur Melt A.FAM/ROX). Le fichier de données brutes nouvellement généré **Melt A.FAM/Cy5/Melt A.FAM/ROX** doit être encore normalisé pour le canal Red (réglages de filtre sur 625/660 nm). Pour réaliser cette opération, ouvrir le nouveau fichier de données brutes **Melt A.FAM/Cy5/Melt A.FAM/ROX**, puis cliquer sur le bouton « Option » et sélectionner la fonction « Normalise to Melt A.Red » (Normaliser sur Melt A.Red). Cette normalisation permet de corriger la fluorescence dépendante de la température du Cy5, ce qui génère un pic de fusion plus symétrique.

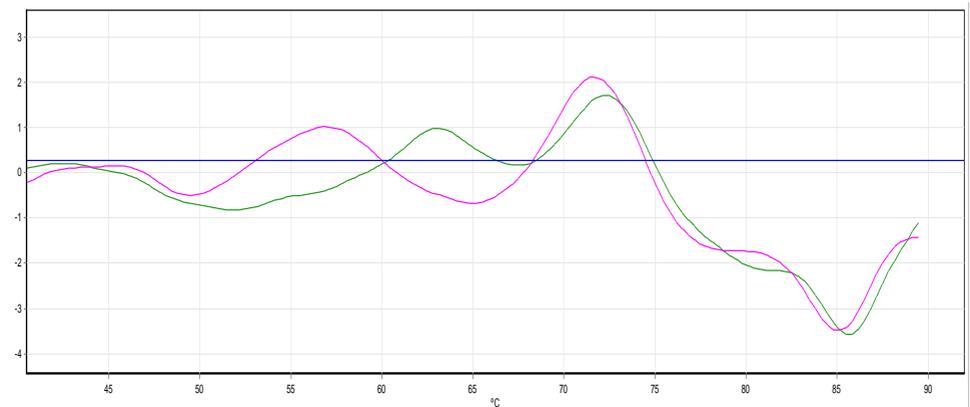
## Analyse

Pour analyser le fichier de données brutes, ouvrir la fenêtre « Analysis » (Analyse) et sélectionner le fichier de données brutes normalisé approprié pour le canal FAM/Cy5 dans l'onglet « Melt » (Fusion). Il n'est pas nécessaire que les signaux obtenus dans le canal Green (IC) (réglages de filtre sur 470–510 nm) et le canal FAM/ROX (réglages de filtre sur 470–610 nm) soient normalisés ; les fichiers de données brutes correspondants pour les canaux FAM/ROX et Green sont également sélectionnés. Les diverses températures de fusion des sondes SMART sont indiquées dans le Tableau 14, page 47.

## Seuil

En utilisant l'optimisation du gain du logiciel du Rotor-Gene Q dans le programme de fusion de la réaction de l'étape 2 du kit RespiFast RG Panel, comme décrit dans le Tableau 10 (page 24) et sur la **Figure 16** (page 39), il est nécessaire de configurer les valeurs de seuil suivantes dans les tracés d'analyse de courbe de fusion pour analyser les résultats des échantillons.

- Canal FAM/ROX : Seuil = 1
- Canal FAM/Cy5 (normalisé) : Seuil = 0
- Canal Green (IC) : Inverser le signe de  $df/dT$  et sélectionner tous les échantillons n'ayant pas présenté de pic de fusion positif dans les canaux FAM/ROX et FAM/Cy5 avec les deux mélanges. Configurer le seuil manuellement sur le niveau de fluorescence le plus élevé obtenu entre 40 et 45 °C avec ces échantillons négatifs. Les échantillons qui présentent des pics de fusion avec les deux mélanges dans les plages d'acceptation de  $T_m$  du contrôle interne et des contrôles d'amplification peuvent à présent être considérés comme des échantillons vraiment négatifs (voir l'exemple dans la **Figure 21**). Les échantillons qui ne présentent qu'un seul résultat de contrôle interne ou de contrôle d'amplification, ou aucun, doivent être définis comme non valides. Les échantillons définis comme non valides doivent être testés à nouveau.



**Figure 21. Exemple d'échantillon négatif détecté dans le canal Green :** Dans la réaction Green du mélange 1, dans la réaction Pink du mélange 2. Le seuil est défini sur le niveau de fluorescence le plus élevé obtenu entre 40 et 45 °C.

**Tableau 14. Cibles et valeurs de  $T_m$  correspondantes des sondes SMART**

Marqueur	Sonde SMART	Plage d'acceptation des valeurs de $T_m$ (°C)	Code de l'agent pathogène (mélange 1)	Code de l'agent pathogène (mélange 2)	
Cy5	Cy5 sonde 1	50,5-53,5*	L. pneu	OC43	
	Cy5 sonde 2a	55-58	B. pert	–	
	Cy5 sonde 2b	52,5-55.	–	HKU1/NL63	
	Cy5 sonde 3		60,5-63,5	Rhino/Entero	
			58,5-61,5		229E
	Cy5 sonde 4	66,5-69,5	C. pneu	–	
	Cy5 sonde 5	70,5-73,5	M. pneu	–	
Cy5 sonde 6	76-79	–	H1N1		
ROX	ROX sonde 1	53,5-56,5	RSVA	PIV1	
	ROX sonde 2	58-61	Adeno	PIV2	
	ROX sonde 3	62,5-65,5	hMPV	PIV3	
	ROX sonde 4	66,5-69,5	RSVB	PIV4	
	ROX sonde 5	72,5-75,5	InfA	Boca	
	ROX sonde 6	76,5-79,5	InfB	–	
BHQ1	BHQ1 sonde 1	70,5-73,5	IC	IC	
	BHQ1 sonde AC1	61-64	AC1	–	
	BHQ1 sonde AC	55,5-58,5	–	AC2	

\* Les pics de la sonde 1 Cy5 ont parfois l'apparence d'un double pic. La valeur  $T_m$  correcte est celle du second pic.

Le Tableau 15 présente les résultats de la courbe de fusion.

Tableau 15. Résultats de la courbe de fusion du test RespiFast RG Panel

Réaction RespiFast								Résultats de l'échantillon
Mélange 1				Mélange 2				
FAM				FAM				
ROX	Cy5	IC	AC1	ROX	Cy5	IC	AC2	
+	-	+/-	+/-	-	-	+/-	+	Cible ROX 1 positive*
-	+	+/-	+/-	-	-	+/-	+	Cible Cy5 1 positive*
-	-	+/-	+	+	-	+/-	+/-	Cible ROX 2 positive*
-	-	+/-	+	-	+	+/-	+/-	Cible Cy5 2 positive*
-	-	+	+	-	-	+	+	Négatif
+	+	+/-	+/-	-	-	+/-	+	Cibles ROX 1 et Cy5 1 positives*
-	-	+/-	+	+	+	+/-	+/-	Cibles ROX 2 et Cy5 2 positives*
+	-	+/-	+/-	+	-	+/-	+/-	Cibles ROX 1 et ROX 2 positives*†
-	+	+/-	+/-	-	+	+/-	+/-	Cibles Cy5 1 et Cy5 2 positives*†
+	-	+/-	+/-	-	+	+/-	+/-	Cibles ROX 1 et Cy5 2 positives*†
-	+	+/-	+/-	+	-	+/-	+/-	Cibles Cy5 1 et ROX 2 positives*†
+	-	+/-	+/-	-	-	-	-	Non valide en raison de l'absence de réaction du mélange 2
-	+	+/-	+/-	-	-	-	-	Non valide en raison de l'absence de réaction du mélange 2
-	-	-	-	+	-	+/-	+/-	Non valide en raison de l'absence de réaction du mélange 1
-	-	-	-	-	+	+/-	+/-	Non valide en raison de l'absence de réaction du mélange 1
-	-	-	-	-	-	-	-	Non valide
-	-	-	+	-	-	-	+	Non valide ; extraction incorrecte/pas d'ajout d'échantillon à la réaction 2SMART

\* Le ou les agents pathogènes correspondants sont indiqués dans le Tableau 14.

† Toutes les combinaisons de ces résultats sont possibles, ce qui entraîne un résultat positif pour plusieurs cibles détectées avec le mélange 1 et le mélange 2 dans les canaux de détection ROX et Cy5.

---

**Remarque** : une réaction du mélange de test RespiFast RG Panel est validée par la présence de l'un des éléments suivants :

- Pic de fusion positif pour un agent pathogène
- Pic de fusion positif pour l'AC et pic positif pour l'IC
- Pic de fusion positif pour l'AC (l'IC est concurrencé par l'infection pathogène sévère détectée par le mélange d'étape 2 RespiFast correspondant).

Les réactions définies comme non valides doivent être testées à nouveau. Lorsqu'une seule des deux réactions de l'étape 2 RespiFast d'un échantillon met en évidence un résultat non valide, la réaction RespiFast RG Panel non valide doit être testée à nouveau, en commençant par la réaction d'amplification préliminaire (en utilisant un extrait d'acide nucléique disponible).

Lorsqu'un échantillon met en évidence un résultat d'échantillon non valide en raison de l'absence d'agent pathogène, d'IC et d'AC ou en raison de l'absence d'agent pathogène et d'IC, la réaction RespiFast RG Panel doit être testée à nouveau, en commençant par l'extraction de l'acide nucléique dans l'échantillon d'origine.

# 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](http://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](http://www.qiagen.com)).

## Commentaires et suggestions

---

### Aucun pic de fusion spécifique visible et pic de fusion d'IC non visible

- |   |  |
|---|--|
| a) Erreur(s) de programmation dans le programme de cycles thermiques                | Programmer le thermocycleur comme décrit dans la rubrique « Protocole : Amplification par PCR et analyse de la fusion », page 21 et recommencer le test.   |
| b) Erreur de pipetage ou réactif manquant   | Recommencer le test RespiFast comme décrit dans la rubrique « Protocole : Amplification par PCR et analyse de la fusion », page 21.  |
| c) Omission de l'IC ou IC ajouté avant l'addition du tampon de lyse à l'échantillon | Il est important d'ajouter l'IC et l'ARN entraîneur au tampon de lyse, de préférence après qu'il a été ajouté à l'échantillon, indépendamment du protocole d'extraction employé (voir la rubrique « Utilisation d'un contrôle interne et d'ARN entraîneur », page 16). Autrement, l'IC pourrait se dégrader en raison de la présence de nucléases dans l'échantillon. Recommencer l'extraction des acides nucléiques et le test RespiFast. |
| d) Présence d'inhibiteurs de la PCR dans l'échantillon                              | Recommencer le test en utilisant une dilution d'un facteur cinq de l'ARN/ADN isolé.  |

### Aucun pic de fusion d'IC visible en présence de pics de fusion spécifiques à un agent pathogène

Infection sévère et/ou infections multiples

L'IC a été concurrencé lors de l'essai. Le résultat demeure valide.

### Pics de fusion équivoques visibles

### Commentaires et suggestions

---

Contamination croisée

S'assurer que les étapes réactionnelles ont été effectuées dans des salles séparées pour éviter toute contamination croisée.

Recommencer le test RespiFast.

Vérifier le programme de cycle et s'assurer que toutes les étapes de manipulation ont été respectées comme décrit dans la rubrique « Protocole : Amplification par PCR et analyse de la fusion », page 21. S'assurer de travailler dans de la glace lorsque cela est recommandé dans le protocole.

Recommencer le test RespiFast.

## Contrôle de la qualité

Le test RespiFast RG Panel est fabriqué par PathoFinder BV à Maastricht, Pays-Bas, dans le respect de systèmes de qualité accrédités selon la norme EN ISO 13485:2012.

## Limites

Le test RespiFast RG Panel facilite le diagnostic d'une infection des voies respiratoires lorsqu'il est utilisé conjointement avec d'autres résultats d'analyse clinique et de laboratoire. Des résultats négatifs n'indiquent pas nécessairement l'absence d'une infection virale ou bactérienne des voies respiratoires. Un diagnostic, une thérapie ou toute autre choix de traitement ne doivent en aucun cas se fonder sur de seuls résultats négatifs. Des résultats positifs n'excluent pas une co-infection par d'autres agents pathogènes. Le ou les agents pathogènes détectés peuvent ne pas être la véritable cause de la maladie.

Il convient d'intégrer d'autres analyses de laboratoire et une évaluation du tableau clinique au diagnostic final.

Ce produit ne doit être utilisé que par du personnel de laboratoire expérimenté.

---

# Caractéristiques de performance

Voir le site [www.qiagen.com/p/RespiFast-RG-Panel-CE](http://www.qiagen.com/p/RespiFast-RG-Panel-CE) pour les caractéristiques de performance du test RespiFast RG Panel.

# Symboles

Les symboles suivants peuvent apparaître sur l'emballage et la notice :

Symbole	Définition des symboles
	Contient suffisamment de réactifs pour <N> réactions
	À utiliser avant
	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Référence
	Numéro de lot
	Référence du matériel
	Référence marché international
	Limite de température
	Fabricant
	Lire les informations dans le manuel
	Attention
	Conserver à l'abri de la lumière du soleil

---

## Coordonnées

Pour une assistance technique et plus d'informations, consulter notre Centre d'assistance technique sur le site [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), composer le 00800-22-44-6000 ou contacter l'un des Départements du service technique de QIAGEN ou des distributeurs locaux (voir la quatrième de couverture ou le site [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Pour commander

Produit	Contenu	Référence
RespiFast RG Panel	IVD CE pour 25 réactions : mélange maître d'amplification préliminaire, contrôle interne, mélange d'amorces d'amplification préliminaire, tampons RespiFast, enzyme RespiFast, contrôle positif	4693163
<b>Kit QIAamp MinElute Virus Spin — pour la purification simultanée d'ADN et d'ARN viral à partir d'échantillons nasopharyngés sur écouvillons</b>		
QIAamp MinElute Virus Spin Kit (50)	Pour 50 préparations minipreps : 50 colonnes QIAamp MinElute, protéinase QIAGEN, ARN entraîneur, tampons, tubes de prélèvement (2 ml)	57704
<b>Kit QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Mini — pour la purification automatisée simultanée d'ADN et d'ARN viral à partir d'échantillons nasopharyngés sur écouvillons pour une utilisation simultanée avec l'appareil QIAasymphony SP</b>		
QIAasymphony Virus/Pathogen Mini Kit	DSP Pour 192 préparations (200 µl chacune) : comprend 2 cartouches de réactifs, des portoirs de tubes d'enzymes et des accessoires	937036
<b>QIAasymphony SP</b>		

Module de préparation des échantillons QIA Symphony, garantie 1 an pièces et main-d'œuvre

9001297

**Rotor-Gene Q MDx — pour l'analyse par PCR en temps réel validée pour l'IVD dans des applications cliniques**

Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform Cycleur de PCR en temps réel et analyseur « High Resolution Melt » (analyse de fusion haute résolution) à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre) plus un canal HRM, avec ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main-d'œuvre ; ne comprend pas l'installation et la formation

9002032

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, comprend l'installation et la formation

9002033

**Rotor-Gene Q — pour de remarquables performances de PCR en temps réel**

Rotor-Gene Q 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

9001580

Rotor-Gene Q 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, comprend l'installation et la formation	9001650
-------------------------------	--	---------

### Accessoires du Rotor-Gene Q

Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 rangées de 4 tubes et bouchons pour 1 000 réactions de 10–50 µl	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 rangées de 4 tubes et bouchons pour 10 000 réactions de 10–50 µl	981106

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](http://www.qiagen.com) ou peuvent être demandés auprès des Services techniques QIAGEN ou du distributeur local.

Marques de commerce : QIAGEN®, QIAamp®, MinElute®, QIASymphony®, RotorGene® (QIAGEN Group) ; BHQ® (Biosearch Technologies, Inc.) ; Cy® (GE Healthcare) ; FAM™, GeneAmp®, ROX™ (Life Technologies Corporation) ; SmartFinder (PathoFinder B.V.).

#### **Accord de licence limitée pour le test RespiFast RG Panel**

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur du produit consent aux termes suivants :

1. Le produit ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis et à ce manuel, et avec les composants fournis à l'intérieur du test. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce test avec tout autre composant non fourni dans ce test, à l'exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit, ce manuel et d'autres protocoles disponibles à l'adresse [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Certains de ces protocoles supplémentaires ont été fournis par des utilisateurs QIAGEN pour les utilisateurs QIAGEN. Ces protocoles n'ont pas été testés de manière approfondie ni optimisés par QIAGEN. QIAGEN n'offre aucune garantie sur eux ni aucune garantie qu'ils n'enfreignent pas les droits de tiers.
2. Hormis les licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce test et/ou son(s) utilisation(s) ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce test 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 toute licence, expresse ou tacite, autre que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du test 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 test et/ou à ses composants.

Pour les termes de licence mis à jour, voir [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

#### **Note à l'acheteur**

Ce produit est fabriqué par PathoFinder BV à Maastricht, Pays-Bas, dans le respect de systèmes de qualité accrédités selon la norme EN ISO 13485:2012. Ces produits sont vendus pour le seul usage de l'utilisateur final et ne doivent pas être revendus, distribués ou réemballés.

© 2015 QIAGEN, tous droits réservés.

---

Page

laissée

volontairement

vierge

---

Page

laissée

volontairement

vierge



---

Pour commander [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact) | Support technique [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Site Web [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)