

artus[®] SARS RG RT-PCR Kit

Manuel



24 (réf. catalogue 4511263)

Diagnostic in vitro quantitatif

Pour une utilisation avec l'artus[™] 3000 et le Rotor-Gene[®] 3000

Version 1



4511263



1046936FR



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALLEMAGNE

R2

MAT

1046936FR



Technologies d'échantillons et d'analyses QIAGEN

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 ;
- analyses d'acides nucléiques et de protéines ;
- recherche micro-ARN 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.

Table des matières

1. Contenu	5
1. Conservation.....	5
3. Matériel nécessaire et non fourni.....	10
4. Précautions générales	10
5. Informations sur le pathogène.....	11
6. Principe de la PCR en temps réel	12
7. Description du produit.....	12
8. Protocole	13
8.1 Pré-analytique : prélèvement, conservation et transport des échantillons.....	13
8.2 Extraction de l'ARN	15
8.3 Contrôle interne	16
8.4 Quantification	18
8.5 Préparation de la PCR.....	19
8.6 Programmation de l' <i>artus 3000</i> ou du <i>Rotor-Gene3000</i>	24
9. Interprétation	23
10. Aide au dépannage	30
11. Spécifications	32
11.1 Sensibilité analytique.....	32
11.2 Spécificité	33
11.3 Précision.....	34
11.4 Robustesse	35
11.5 Reproductibilité.....	35

11.6 Évaluation diagnostique	35
12. Remarques particulières concernant l'utilisation du produit ...	36
13. Informations de sécurité	36
14. Contrôle qualité	36
15. Références bibliographiques	36
16. Explication des symboles	37

artus SARS RG RT-PCR Kit

Pour une utilisation avec l'artus 3000 ou le Rotor-Gene 3000*.

1. Contenu

	Étiquetage et contenu	Réf. 4511263 24 réactions
Bleu	SARS-CoV RG/TM Master	2 x 12 rxns
Rouge	SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 [†] 1 x 10 ⁴ cop/μl	1 x 200 μl
Rouge	SARS-CoV LC/RG/TM QS 2 [†] 1 x 10 ³ cop/μl	1 x 200 μl
Rouge	SARS-CoV LC/RG/TM QS 3 [†] 1 x 10 ² cop/μl	1 x 200 μl
Rouge	SARS-CoV LC/RG/TM QS 4 [†] 1 x 10 ¹ cop/μl	1 x 200 μl
Vert	SARS-CoV LC/RG/TM IC [‡]	1 x 1 000 μl
Blanc	Water (PCR grade)	1 x 1 000 μl

- [†] QS = Standard de quantification
IC = Contrôle interne
Mg-Sol = Solution de magnésium

1. Conservation

Les composants de l'artus SARS RG RT-PCR Kit doivent être stockés entre -30 et -15 °C et peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Éviter de répéter les étapes de congélation/décongélation (> 2 x) qui pourraient réduire la sensibilité. En cas d'utilisation occasionnelle, répartir les réactifs en aliquotes. Si les composants doivent être stockés à +4°C, la période de conservation ne doit pas dépasser cinq heures.

* L'artus SARS RG RT-PCR Kit peut être aussi utilisé avec le Rotor-Gene™ 2000.

3. Matériel nécessaire et non fourni

- Gants de laboratoire sans talc
- Kit d'extraction d'ARN (voir 8.2 Extraction de l'ARN)
- Pipettes (réglables)
- Pointes de pipette stériles avec filtre
- Mixeur Vortex
- Micro-centrifugeuse avec rotor pour tubes de réaction de 2 ml
- *artus 3000* ou *Rotor-Gene 3000*
- Microtubes de réaction PCR 0,1 ml pour l'utilisation du rotor 72 puits (0.1 ml Strip Tubes and Caps, QIAGEN Hamburg, réf. cat. : 4699982;
0.1 ml tubes, Corbett Research, réf. cat. : ST-1001)
- Ou : microtubes de réaction PCR 0,2 ml pour l'utilisation du rotor 36 puits (par ex. 0.2 ml PCR Tubes, QIAGEN Hamburg, réf. cat. : 4699983; 0.2 ml tubes, Corbett Research, réf. cat. : SE-1003F)
- Bloc réfrigérant (72-/96-Well Loading Block, QIAGEN Hamburg, réf. cat. : 4699980/4699981; 72/96 well loading block, Corbett Research, réf. cat. : 3001-008/3001-009)

4. Précautions générales

L'utilisateur doit toujours respecter les mesures suivantes :

- Utiliser des pointes de pipette stériles avec filtre.
- Conserver et purifier les éléments positifs (échantillons, contrôles, amplicons) séparément des autres réactifs et les ajouter au mélange réactionnel dans une autre pièce.
- Décongeler complètement tous les composants à température ambiante avant le début du test.
- Mélanger ensuite soigneusement les composants et les centrifuger brièvement.
- Toujours travailler dans de la glace ou dans un bloc réfrigérant

(72/96 well loading block).

5. Informations sur le pathogène

Les coronavirus appartiennent à la famille des *Coronaviridae* et sont des virus enveloppés de grande taille à ARN monocaténaire de polarité positive, qui provoquent des maladies extrêmement virulentes chez l'homme et les animaux domestiques. Deux des coronavirus humains connus jusqu'à présent sont responsables d'un tiers des syndromes grippaux bénins et des infections nosocomiales des voies respiratoires supérieures chez les prématurés.

Un nouveau membre de la famille des coronavirus est considéré comme le pathogène du syndrome respiratoire aigu sévère SRAS (« Severe Acute Respiratory Syndrome », SARS). Une partie du gène de la polymérase du coronavirus a été identifié chez un patient, par PCR, par l'Institut Bernhard-Nocht de médecine tropicale d'Hambourg et par des laboratoires travaillant en collaboration. Basé sur ce test, un système de RT-PCR en temps réel à usage commercial a été développé pour la détection directe du nouveau type de coronavirus. La PCR peut détecter le matériel génétique du SRAS-Coronavirus (SRAS-CoV) à partir de différents prélèvements (sang, sécrétions des voies respiratoires ou tissu).

Interprétation des résultats du test

Important : Respecter les recommandations officielles de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), qui se trouvent sur le site Internet suivant : <http://www.who.int/csr/sars/guidelines/en>.

Résultats positifs du test : Un test SRAS-CoV positif signifie qu'il y a une infection au SRAS-CoV, même si le patient ne présente aucun symptôme du SRAS.

Résultats négatifs du test : Un test SRAS-CoV négatif n'exclut pas la possibilité que le patient soit atteint du SRAS. Un résultat négatif en présence de

symptômes du SRAS peut être obtenu pour les raisons suivantes :

- Au moment du prélèvement de l'échantillon, le virus n'était pas présent dans le matériel prélevé (il est encore difficile de savoir à quel stade de la pathogenèse SRAS-CoV le virus d'un échantillon particulier peut être détecté).
- Le patient présente des symptômes semblables à ceux du SRAS, dont la cause serait un autre pathogène.

6. Principe de la PCR en temps réel

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 ré-ouvrir les tubes d'échantillon après la PCR (Mackay, 2004).

7. Description du produit

L'*artus* SARS RG RT-PCR Kit est une trousse prête à l'emploi pour détecter l'ARN du SRAS-CoV par amplification en chaîne par polymérase (PCR) sur l'*artus* 3000 ou le *Rotor-Gene* 3000. Le *SARS-CoV RG/TM Master* comprend les réactifs et les enzymes nécessaires à la transcription inverse et à l'amplification spécifique d'une séquence de 92 pb du génome du SRAS-CoV ainsi qu'à la détection directe de l'amplicon dans le canal de fluorescence Cycling A.FAM de l'*artus* 3000 ou du *Rotor-Gene* 3000. L'*artus* SARS RG RT-PCR Kit 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)* dans le canal de fluorescence Cycling A.JOE. Ceci n'a aucune influence négative sur la limite de détection de la RT PCR analytique du SRAS-CoV (voir **11.1 Sensibilité analytique**). Des standards de quantification externes (*SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4*) sont fournis, permettant de déterminer la charge virale. Lire à ce sujet le paragraphe **8.4 Quantification**.

8. Protocole

8.1 Pré-analytique : prélèvement, conservation et transport des échantillons

Attention : Tous les échantillons doivent être considérés comme potentiellement infectieux.

Important : Les données disponibles jusqu'à présent indiquent que l'expectoration est le matériel de prélèvement le plus approprié pour la détection du SRAS-CoV. De ce fait, il est recommandé d'utiliser ce matériel avec l'*artus SARS RG RT-PCR Kit*.

La validation interne de l'*artus SARS RG RT-PCR Kit* a été effectuée sur des échantillons de sérum. Les autres types de prélèvement comme l'expectoration, le LBA, le lavage nasopharyngé, les écouvillons et le tissu pulmonaire ne sont pas encore complètement validés. Utiliser uniquement les kits d'extraction d'ARN recommandés pour la préparation des échantillons (voir **8.2 Extraction de l'ARN**).

Pour certains types de prélèvement, les instructions particulières de prélèvement, de conservation et de transport doivent impérativement être respectées.

Attention : Respecter également les recommandations officielles de l'OMS sur le site Internet suivant : <http://www.who.int/csr/sars/sampling/en/>.

8.1.1 Prélèvement des échantillons

Pour le prélèvement des écouvillons, utiliser le matériel suivant :
Utiliser uniquement des écouvillons à pointe en Dacron[®] ou rayonne sur tige en matière plastique. **Ne pas utiliser d'écouvillon avec tige en bois ou en aluminium.**

8.1.2 Conservation des échantillons

Une congélation de routine ou une conservation prolongée des échantillons peut nuire à la performance du test.

Les échantillons sont conservés entre +2 et +8°C. (Si les échantillons doivent être envoyés au laboratoire d'analyse, les envoyer dès que possible après le prélèvement, en respectant les prescriptions du laboratoire en matière de transport d'échantillons au SRAS-CoV).

Les écouvillons qui ne sont pas analysés dès leur arrivée au laboratoire doivent être stockés entre +2 et +8°C et traités dans un délai de 24 heures. Les écouvillons qui ne peuvent pas être traités dans les 24 heures suivant leur prélèvement doivent être stockés à -20°C ou à des températures inférieures et analysés dans les 30 jours suivant la date de prélèvement.

8.1.3 Transport des échantillons

Les écouvillons doivent être transportés sous couvert du froid.

Si les écouvillons doivent être envoyés au laboratoire d'analyse, les envoyer sous réfrigération dès que possible après le prélèvement en respectant les prescriptions du laboratoire pour le transport. Les échantillons doivent être envoyés conformément aux réglementations locales et nationales en vigueur en matière de transport de matériel potentiellement contaminé*.

* International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41st Edition, 2000.704.

8.2 Extraction de l'ARN

Différents fabricants proposent des kits d'extraction d'ARN. Procéder à l'extraction d'ARN conformément aux instructions, tel que le préconise le fabricant, en utilisant la quantité indiquée d'échantillon. Les kits d'extraction suivants sont recommandés :

Échantillon	Kit d'extraction	Référence du catalogue	Fabricant	ARN entraîneur
Expectoration, sérum, lavage nasopharyngé, LRA, écouvillon	QIAamp Viral RNA Mini Kit (50)	52 904	QIAGEN	inclus
Tissu pulmonair	RNeasy Mini Kit (50)	74 104	QIAGEN	non inclus

Si le matériel d'échantillon est un prélèvement d'expectoration, tenir compte de la recommandation suivante : Pour préparer l'échantillon, mélanger celui-ci dans un tube de réaction dans un rapport 1 : 1 avec une solution de NaCl 0,9 % contenant 1 % de N-acétylcystéine (Sigma, réf. cat.A8199), p.ex. 300 μ l d'expectoration + 300 μ l de mélange NaCl. Après une incubation à température ambiante de 30 min, utiliser 140 μ l du lysat pour l'étape suivante d'extraction d'ARN avec le kit QIAamp Viral RNA Mini Kit et procéder selon les instructions du protocole du fabricant.

- 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. Afin d'obtenir une plus grande stabilité de l'ARN entraîneur inclus dans le QIAamp Viral RNA Mini Kit, il est recommandé de procéder selon les instructions suivantes, qui diffèrent des instructions du manuel du kit d'extraction :
 - a. Avant la première utilisation du kit d'extraction, resuspendre l'ARN entraîneur lyophilisé dans 310 μ l de tampon d'éluion inclus dans le kit (concentration finale 1 μ g/ μ l, ne pas utiliser de tampon de lyse) et

répartir cette solution d'ARN entraîneur en aliquotes en nombre désiré. Ces aliquotes devront être stockés à -20°C. Éviter de repeater les étapes de congélation/décongélation (> 2 x) d'une fraction aliquote d'ARN entraîneur.

- b. Avant le début de chaque extraction, un mélange de tampon de lyse et d'ARN entraîneur (et éventuellement de *Contrôle interne*, voir **8.3 Contrôle interne**) doit être fraîchement préparé selon le schéma de pipetage suivant.

Nombre d'échantillons	1	12
Tampon de lyse AVL	560 µl	6 720 µl
ARN entraîneur (1 µg/µl)	5,6 µl	67,2 µl
Volume total	565,6 µl	6 787,2 µl
Volume pour l'extraction	560 µl	560 µl chacune

- c. Utiliser immédiatement le mélange de tampon de lyse et d'ARN entraîneur fraîchement préparé pour l'extraction. Il est impossible de conserver ce mélange.
- Dans le cas d'extractions utilisant des tampons de lavage contenant de l'**éthanol**, s'assurer impérativement qu'une étape de centrifugation supplémentaire (trois minutes, 13 000 tr/min) est exécutée avant l'élution pour éliminer les résidus d'éthanol. Cela permet de prévenir d'éventuelles inhibitions de la PCR.
 - L'*artus* SARS RG RT-PCR Kit ne convient pas aux procédés d'extraction à base de **phénol**.

Important : Le *Contrôle interne* de l'*artus* SARS RG RT-PCR Kit peut être directement utilisé pendant la procédure d'extraction (voir **8.3 Contrôle interne**).

8.3 Contrôle interne

Un *Contrôle interne* (SARS-CoV LC/RG/TM IC) est inclus dans le kit. Celui-ci

vous permet de contrôler **aussi bien la procédure d'extraction d'ARN qu'une éventuelle inhibition de la PCR** (voir Fig. 1). Pour cette application, ajouter le *Contrôle interne* dans un rapport de 0,1 μl par 1 μl de volume d'élution pendant la procédure d'extraction. Utiliser par exemple le kit QIAampViral RNA Mini Kit et éluer l'ARN dans 60 μl de tampon AVE, puis utiliser 6 μl de *Contrôle interne*. Si par exemple l'élution est de 50 μl , utiliser par conséquent 5 μl . La quantité de *Contrôle interne* utilisée dépend **uniquement** du volume d'élution. Le *Contrôle interne* et l'ARN entraîneur (voir **8.2 Extraction de l'ARN**) peuvent seulement être ajoutés

- au mélange de tampon de lyse et d'échantillon ou
- directement au tampon de lyse.

Le *Contrôle interne* ne doit pas être directement ajouté à l'échantillon. En ajoutant le tampon de lyse, noter que ce mélange de *Contrôle interne* et de tampon de lyse/ARN entraîneur ne peut être préparé que pour une utilisation immédiate. (La conservation de ce mélange à température ambiante ou au réfrigérateur, même pour quelques heures, peut avoir pour conséquence que le *Contrôle interne* fasse défaut, ce qui diminuerait l'efficacité de l'extraction). **Ne pas** pipeter le *Contrôle interne* et l'ARN entraîneur directement dans l'échantillon.

Il est aussi possible d'utiliser le *Contrôle interne* **pour exclusivement mettre en évidence une éventuelle inhibition de la PCR** (voir Fig. 2). Pour cela, ajouter par réaction 1 μl de *Contrôle interne* directement dans 15 μl de SARS-CoV RG/TM Master. Pour chaque réaction PCR, utiliser 15 μl de mélange réactionnel* ainsi préparé et ajouter ensuite 10 μl d'échantillon purifié. En cas de préparation d'une série de plusieurs échantillons, augmenter la quantité nécessaire de SARS-CoV RG/TM Master et de *Contrôle interne* en fonction du nombre d'échantillons (voir **8.5 Préparation de la PCR**).

8.4 Quantification

Les *Standards de quantification* fournis (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) doivent être manipulés comme des échantillons purifiés et utilisés avec le même volume (10 µl). Pour établir une courbe d'étalonnage avec l'*artus 3000* ou le *Rotor-Gene 3000*, utiliser les quatre *Standards de quantification* fournis, les définir comme standard dans le menu *Edit Samples* et saisir les concentrations correspondantes (voir l'*artus 3000 Software Manual* ou le *Rotor-Gene Manual, Version 4.6*). Cette courbe d'étalonnage peut également être utilisée pour des quantifications ultérieures, si au moins un standard **d'une** concentration définie est intégré dans la série en cours. Pour cela, il est nécessaire d'importer la courbe d'étalonnage établie précédemment (voir l'*artus 3000 Software Manual* ou le *Rotor- Gene Manual, Version 4.6*). Toutefois, pour cette forme de quantification, il convient de tenir compte du fait que la variabilité des essais PCR peut entraîner des écarts dans le résultat.

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

Attention : Les *Standards de quantification* sont exprimés en tant que copies/ μ l. Pour convertir les valeurs déterminées à l'aide de la courbe d'étalonnage en copies/ml d'échantillon, utiliser la formule suivante :

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

Noter qu'il faut utiliser le volume d'échantillon initial dans la formule mentionnée ci-dessus. Ceci est à considérer lorsque le volume d'échantillon a été modifié avant l'extraction d'acides nucléiques (par ex. concentration par centrifugation ou augmentation du volume au moment de l'extraction).

Important : Un guide pour l'analyse quantitative des systèmes *artus* sur l'*artus 3000* ou le *Rotor-Gene 3000* est disponible sur le site Internet www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX (Technical Note for Quantitation on the *artus 3000* or *Rotor-Gene 3000*).

8.5 Préparation de la PCR

S'assurer que le bloc réfrigérant (accessoire de l'*artus 3000* ou *Rotor-Gene 3000*) est refroidi à environ +4°C. Placer le nombre de tubes de réaction PCR nécessaires pour le nombre de réactions prévues. S'assurer qu'au moins un *Standard de quantification* ainsi qu'un contrôle négatif (*Water, PCR grade*) sont exécutés parallèlement à chaque série de PCR. Pour établir une courbe d'étalonnage, utiliser à chaque série de PCR tous les *Standards de quantification* fournis (*SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4*). 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 inverser le tube plusieurs fois) et immédiatement après les centrifuger brièvement.

Pour contrôler à l'aide du *Contrôle interne* aussi bien la procédure d'extraction d'ARN qu'une éventuelle inhibition de la PCR, le *Contrôle interne* doit être ajouté auparavant à la procédure d'extraction (voir

8.3 Contrôle interne). Utiliser dans ce cas le tableau de pipetage suivant (voir également la représentation schématique à la Fig. 1) :

		Nombre d'échantillons	
		1	12
1. Préparation du mélange réactionnel	SARS-CoV RG/TM Master	15 µl	180 µl
	SARS-CoV LC/RG/TM IC	0 µl	0 µl
	Volume total	15 µl	180 µl
2. Préparation de la réaction PCR	Mélange réactionnel	15 µl	15 µl chacune
	Échantillon	10 µl	10 µl chacune
	Volume total	25 µl	25 µl chacune

Pour utiliser le *Contrôle interne* pour exclusivement mettre en évidence une éventuelle inhibition de la PCR, l'ajouter directement au SARS-CoV RG/TM Master. Utiliser dans ce cas le tableau de pipetage suivant (voir également la représentation schématique à la Fig. 2) :

		Nombre d'échantillons	
		1	12
1. Préparation du mélange réactionnel	SARS-CoV RG/TM Master	15 µl	180 µl
	SARS-CoV LC/RG/TM IC	1 µl	12 µl
	Volume total	16 µl*	192 µl*
2. Préparation de la réaction PCR	Mélange réactionnel	15 µl*	15 µl* chacune
	Échantillon	10 µl	10 µl chacune
	Volume total	25 µl	25 µl chacune

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

Pipeter 15 μ l de mélange réactionnel dans chaque tube de réaction PCR. Ajouter ensuite 10 μ l de l'éluat d'extrait d'ARN et mélanger soigneusement en aspirant et rejetant plusieurs fois à l'aide de la pipette. De la même manière, utiliser 10 μ l d'au moins un des *Standards de quantification (SARS-CoVLC/RG/TM QS 1 - 4)* comme contrôle positif et 10 μ l d'eau pour contrôle négatif (*Water, PCR grade*). Fermer les tubes de réaction PCR. S'assurer qu'un *Locking Ring* (accessoire de l'*artus 3000* ou du *Rotor-Gene 3000*) est mis en place sur le rotor afin d'empêcher une ouverture involontaire des tubes de réaction pendant l'essai.

Addition du *Contrôle interne* à la procédure d'extraction

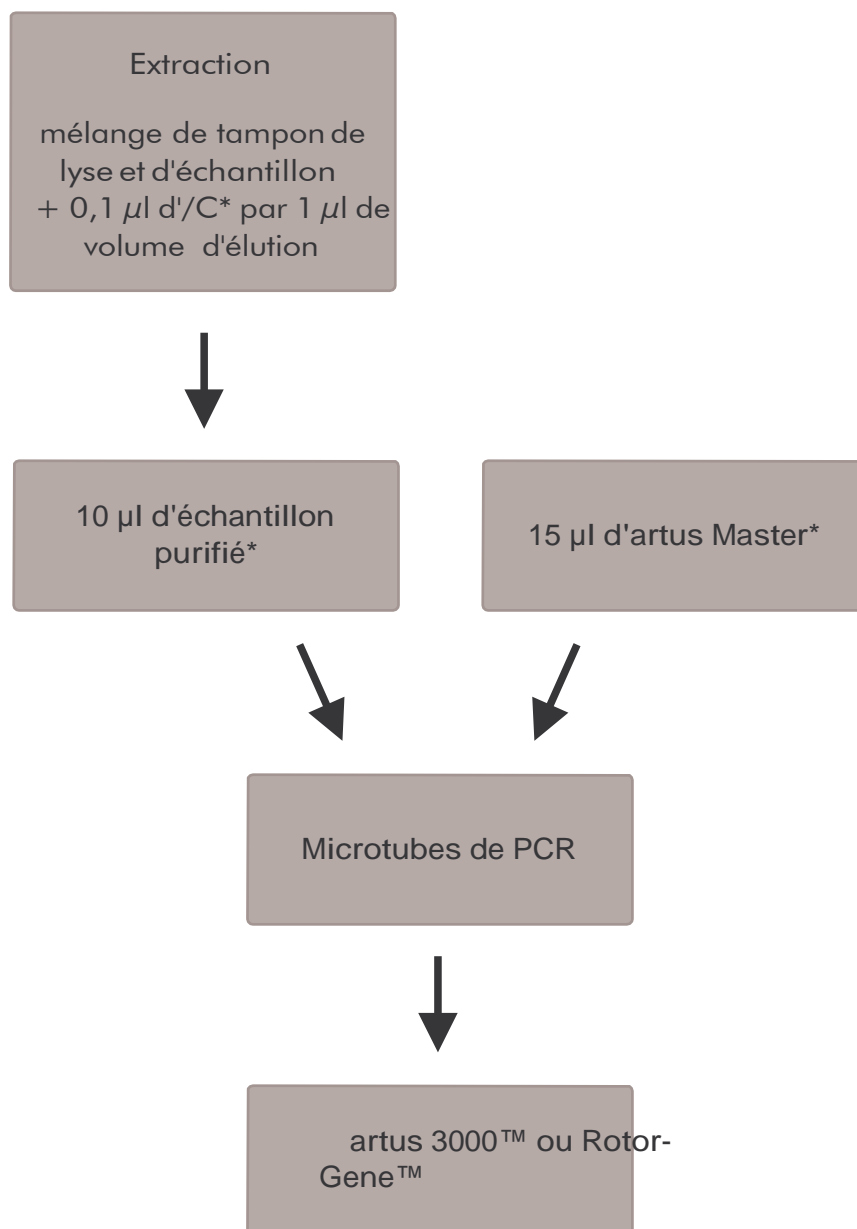


Fig. 1 : Processus d'addition du *Contrôle interne* pour contrôler la procédure d'extraction et une éventuelle inhibition de la PCR.

*

A chaque pipetage, s'assurer impérativement que les solutions à utiliser sont complètement décongelées, bien mélangées et brièvement centrifugées.

Addition du Contrôle interne à l'artus Master

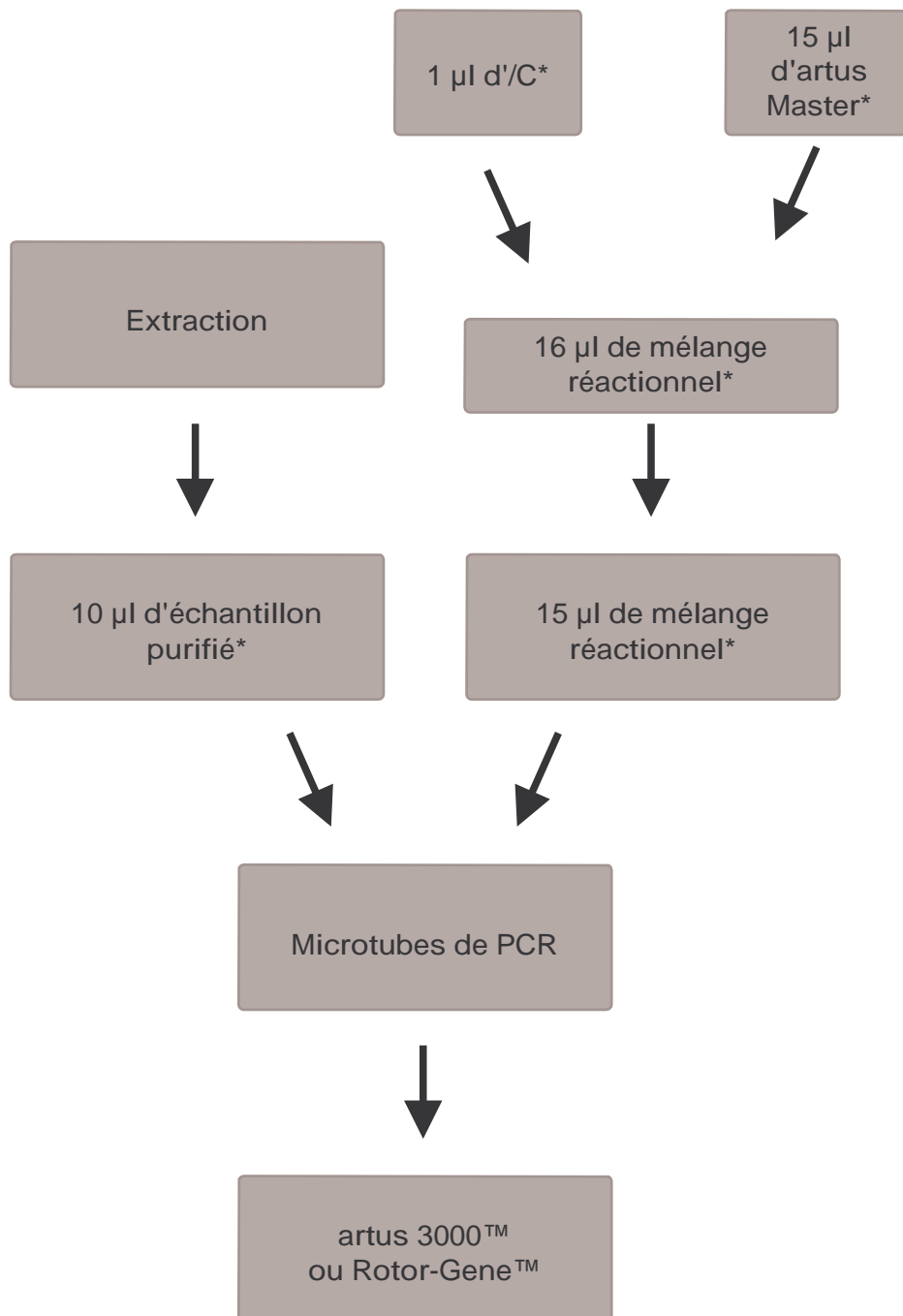


Fig. 2 : Processus d'addition du Contrôle interne pour contrôler une éventuelle inhibition de la PCR.

*

A chaque pipetage, s'assurer impérativement que les solutions à utiliser sont complètement décongelées, bien mélangées et brièvement centrifugées.

8.6 Programmation de l'artus 3000 ou du Rotor-Gene 3000

Pour détecter l'ARN de SRAS-CoV, créer un profil de thermocyclage sur l'artus 3000 ou le Rotor-Gene 3000, conformément aux six étapes suivantes (voir Fig. 3 - 8).

- | | | |
|----|--|--------|
| A. | Réglage des paramètres généraux de PCR | Fig. 3 |
| B. | Transcription inverse de l'ARN | Fig. 4 |
| C. | Activation initiale de l'enzyme « Hot Start » | Fig. 5 |
| D. | Amplification de l'ADNc | Fig. 6 |
| E. | Réglage de la sensibilité des canaux fluorescents | Fig. 7 |
| F. | Démarrage de l'essai artus 3000 ou Rotor-Gene 3000 | Fig. 8 |

Toutes les indications font référence à la version 5.0.69 du logiciel d'artus 3000 ou la version 4.6.94 du logiciel de Rotor-Gene. Pour plus de détails sur la programmation de l'artus 3000 ou du Rotor-Gene 3000, se reporter au guide *artus 3000 Software Manual* ou *Rotor-Gene Manual*, version 4.6. Pour plus de clarté, les paramétrages à effectuer sont encadrés en noir dans les figures.

Indiquer d'abord le volume de réaction PCR dans la fenêtre du menu *New Experiment Wizard* (voir Fig. 3).

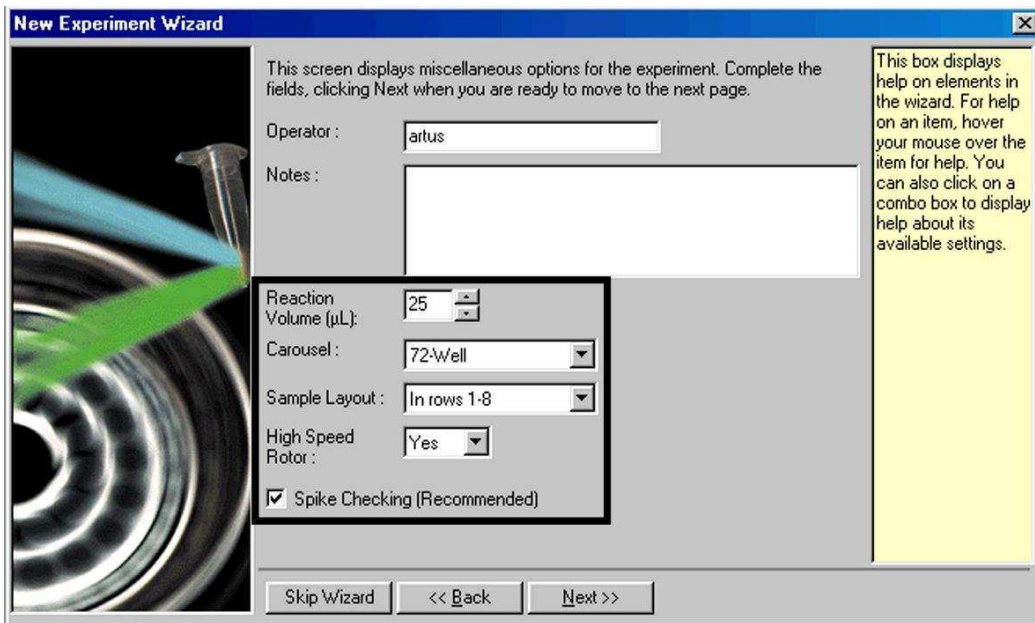


Fig. 3 : Réglage des paramètres généraux de PCR.

La programmation du profil de thermocyclage est effectuée en activant la fonction *Edit* dans la fenêtre suivante *New Experiment Wizard* (voir Fig. 4, 5 et 6).

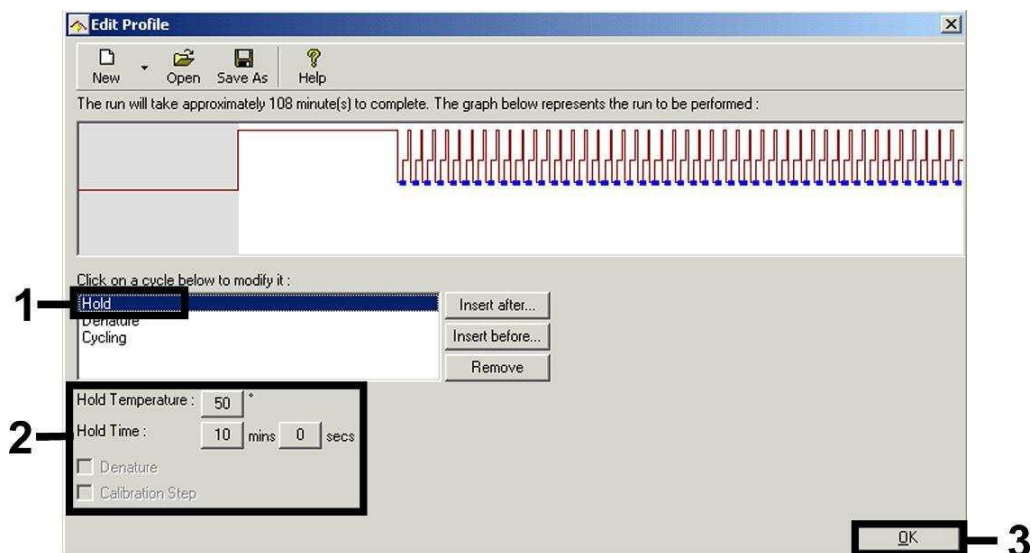


Fig. 4 : Transcription inverse de l'ARN.

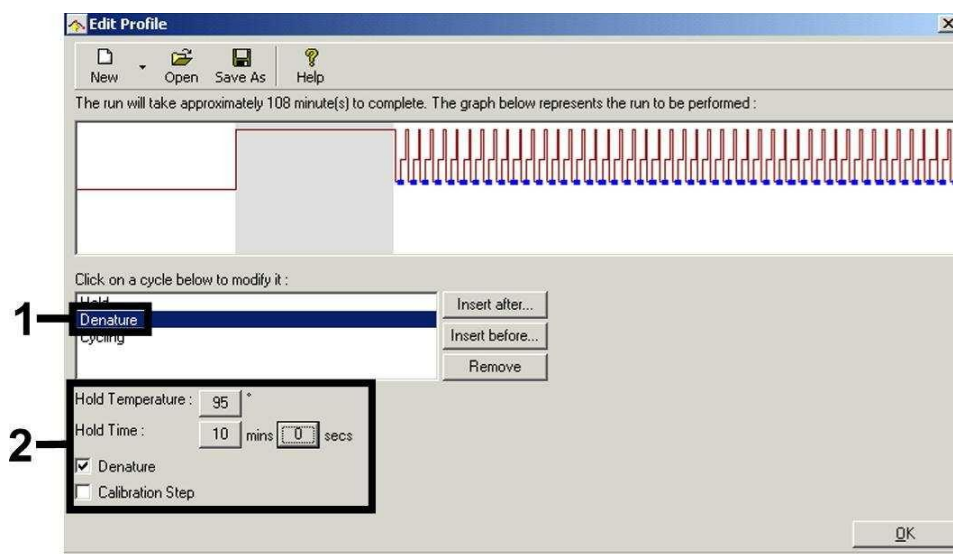


Fig. 5 : Activation initiale de l'enzyme « Hot Start ».

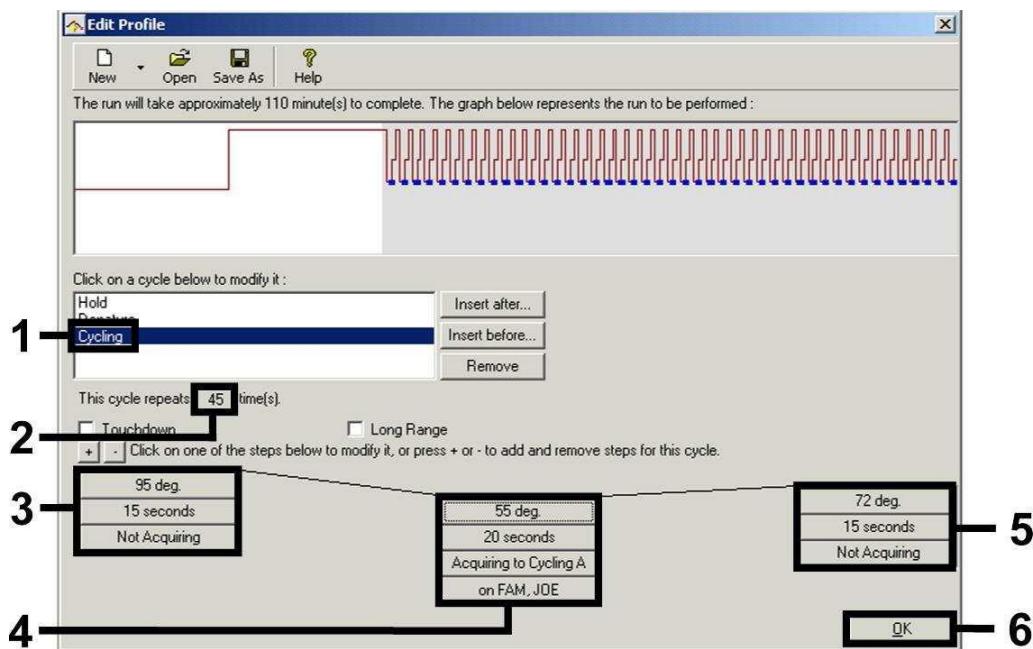


Fig. 6 : Amplification de l'ADNc.

La gamme de mesure des canaux fluorescents doit être déterminée en fonction des intensités fluorescentes dans les réactions PCR. Ce paramétrage s'effectue dans la fenêtre *Auto Gain Calibration Setup* (en activant la fenêtre *New Experiment Wizard* sous *Calibrate*). Régler la température de calibration

sur la température « Annealing » du programme d'amplification (voir Fig. 7).

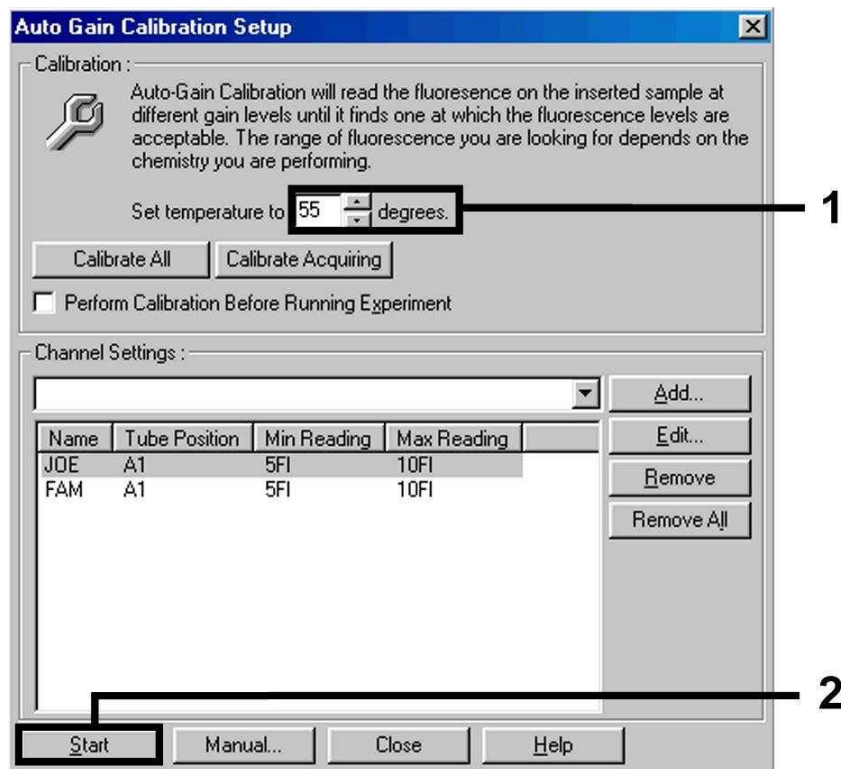


Fig. 7 : Réglage de la sensibilité des canaux fluorescents.

Les valeurs de *Gain* calculées par la calibration du canal sont automatiquement enregistrées et sont énumérées dans la dernière fenêtre de programmation (voir Fig. 8).

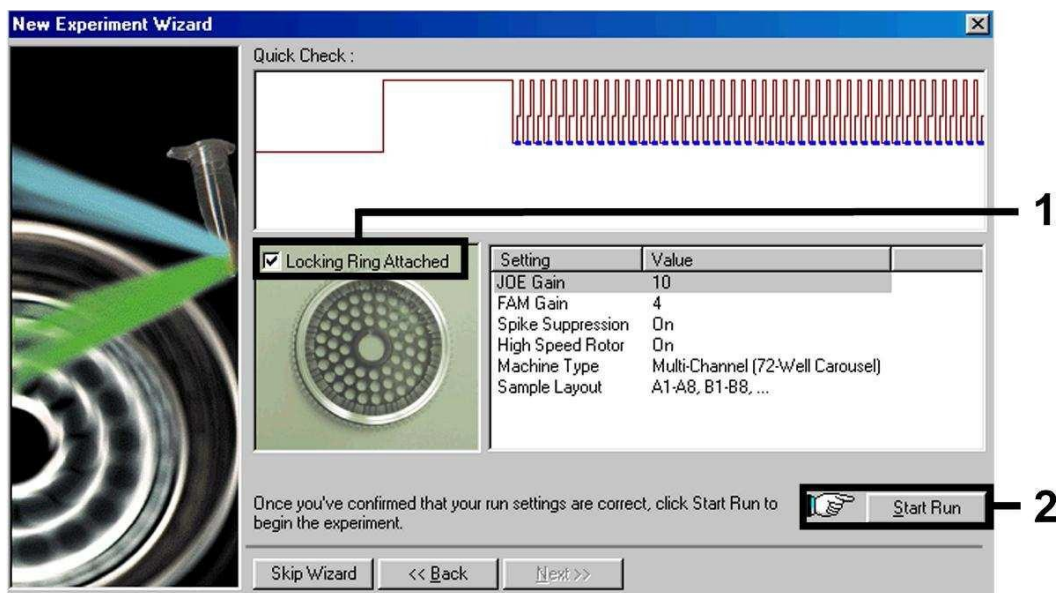


Fig. 8 : Démarrage de l'essai artus 3000™ ou Rotor-Gene™ 3000.

9. Interprétation

L'interprétation s'effectue avec le logiciel d'*artus 3000* ou de *Rotor-Gene* selon les instructions du fabricant (*artus 3000 Software Manual* ou *Rotor- Gene Manual*, Version 4.6).

Les résultats suivants peuvent se produire :

1. Un signal est détecté dans le canal fluorescent Cycling A.FAM.

Le résultat de l'analyse est positif : l'échantillon contient l'ARN du SRAS-CoV.

Le cas échéant, la détection d'un signal dans le canal Cycling A.JOE est négligeable, car les fortes concentrations en ARN du SRAS-CoV (signal positif dans le canal Cycling A.FAM) peuvent entraîner un signal fluorescent réduit, voire absent du *Contrôle interne* dans le canal Cycling A.JOE (inhibition par compétition).

2. Aucun signal n'est détecté dans le canal fluorescent Cycling A.FAM. Simultanément, un signal apparaît dans le canal Cycling A.JOE (signal du *Contrôle interne*).

Aucun ARN du SRAS-CoV ne peut être détecté dans l'échantillon. Il peut donc être considéré comme négatif.

En cas de RT PCR SRAS-CoV négative, le signal détecté du *Contrôle interne* exclut toute possibilité d'inhibition de la RT-PCR.

3. Aucun signal n'est détecté ni dans le canal Cycling A.FAM ni dans le canal Cycling A.JOE.

Un diagnostic n'est pas possible.

Des remarques relatives aux sources d'erreur et à leur traitement figurent au chapitre **10. Aide au dépannage.**

Des exemples de réactions PCR positives et négatives sont illustrés dans les Fig. 9 et Fig. 10.

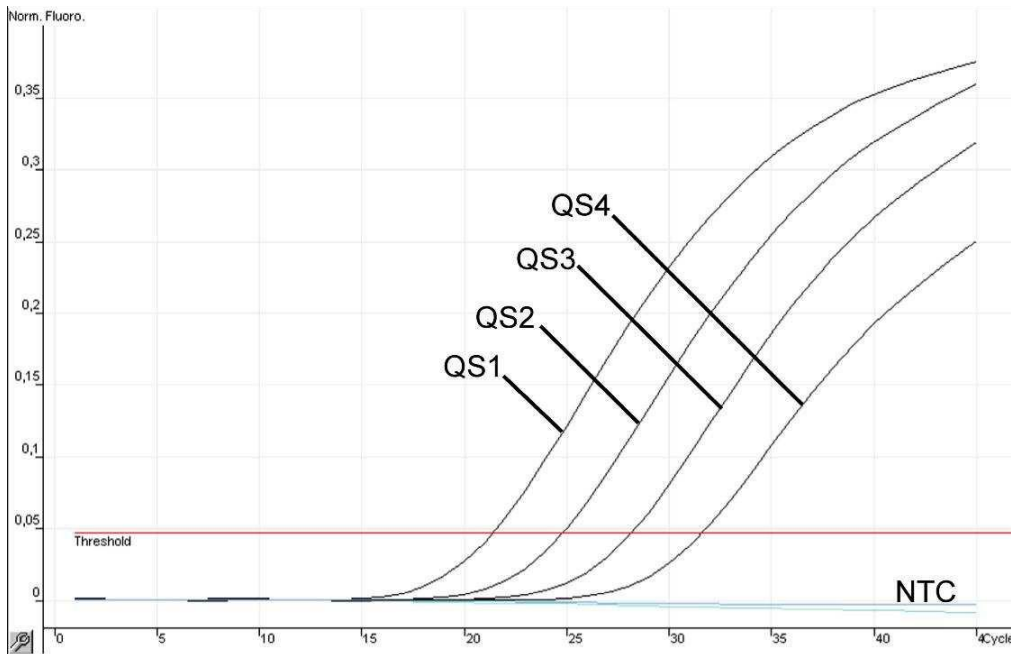


Fig. 9 : Détection des Standards de quantification (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) dans le canal fluorescent Cycling A.FAM.
 NTC : non-template control (contrôle négatif).

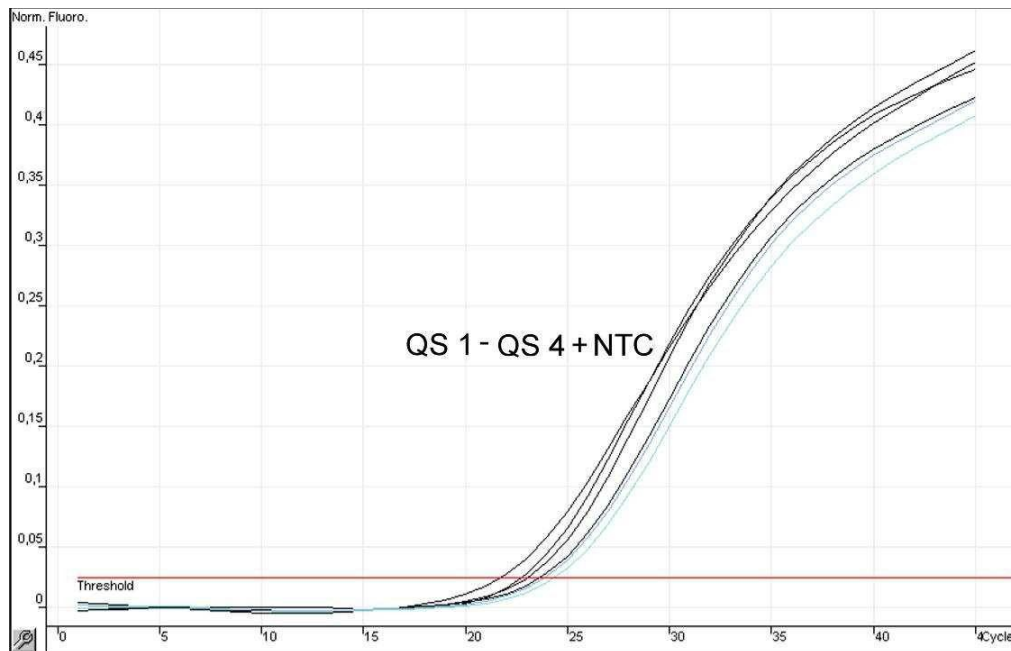


Fig. 10 : Détection du Contrôle interne (IC) dans le canal fluorescent Cycling A.JOE lors de l'amplification simultanée des Standards de quantification (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4).
 NTC : non-template control (contrôle négatif).

10. Aide au dépannage

Aucun signal pour les contrôles positifs (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) dans le canal de fluorescence Cycling A.FAM :

- La sélection du canal de fluorescence pour l'analyse des données PCR n'est pas conforme aux directives du protocole.
 - ❖ Pour l'analyse des données, sélectionner le canal de fluorescence Cycling A.FAM pour la RT PCR analytique du SRAS-CoV et le canal de fluorescence Cycling A.JOE pour la RT PCR du *Contrôle interne*.
- Il y a une erreur de programmation du thermocyclage de l'*artus 3000* ou *Rotor-Gene 3000*.
 - ❖ Comparer le profil de thermocyclage avec les directives du protocole (voir **8.6 Programmation de l'artus 3000 ou du Rotor-Gene 3000**).
- Il y a une erreur de composition de la réaction PCR.
 - ❖ Vérifier les étapes de pipetage à l'aide du schéma de pipetage (voir **8.5 Préparation de la PCR**) et si nécessaire, répéter la PCR.
- Les conditions de conservation d'un ou plusieurs composants du kit ne sont pas conformes aux directives précisées en **2. Conservation** ou la date de péremption de l'*artus SARS RG RT-PCR Kit* a été dépassée.
 - ❖ Vérifier aussi bien les conditions de conservation que la date de péremption des réactifs (voir l'étiquette du kit) et si nécessaire, employer un nouveau kit.

Signal faible ou absent du *Contrôle interne* dans le canal de fluorescence Cycling A.JOE et absence simultanée de signal dans le canal Cycling A.FAM :

- Les conditions de la PCR ne sont pas conformes au protocole.
 - ❖ Vérifier les conditions de la PCR (voir ci-dessus) et si nécessaire, répéter la PCR avec les paramètres corrigés.
- Il y a eu inhibition de la PCR.
 - ❖ S'assurer que l'un des kits d'extraction recommandés (voir **8.2 Extraction de l'ARN**) est utilisé et respecter scrupuleusement les

instructions du fabricant.

- ◆ S'assurer que lors de l'extraction d'ARN, l'étape de centrifugation supplémentaire recommandée est effectuée avant l'élution pour éliminer complètement les résidus d'éthanol (voir **8.2 Extraction de l'ARN**).
- Il y a eu perte d'ARN lors de l'extraction.
 - ◆ En cas d'addition du *Contrôle interne* à la procédure d'extraction, l'absence du signal du *Contrôle interne* peut signifier qu'il y a eu une perte d'ARN au cours de l'extraction. S'assurer que l'un des kits d'extraction recommandés (voir **8.2 Extraction de l'ARN**) est utilisé et respecter scrupuleusement les instructions du fabricant.
- Les conditions de conservation d'un ou plusieurs composants du kit ne sont pas conformes aux directives précisées en **2. Conservation** ou la date de péremption de l'*artus SARS RG RT-PCR Kit* a été dépassée.
 - ◆ Vérifier aussi bien les conditions de conservation que la date de péremption des réactifs (voir l'étiquette du kit) et si nécessaire, employer un nouveau kit.

Présence de signal des contrôles négatifs dans le canal de fluorescence Cycling

A.FAM de la RT PCR analytique.

- Il y a eu contamination pendant la préparation de la PCR.
 - ◆ Répéter la PCR en double avec des réactifs encore non utilisés.
 - ◆ Lorsque c'est possible, fermer chacun des tubes PCR immédiatement après chaque ajout de l'échantillon à analyser.
 - ◆ Toujours pipeter le contrôle positif en dernier.
 - ◆ S'assurer que les surfaces de travail et les appareils sont décontaminés régulièrement.
- Il y a eu 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.

Pour toute autre question ou en cas de problèmes, merci de contacter notre service technique.

11. Spécifications

11.1 Sensibilité analytique

Pour déterminer la sensibilité analytique de l'artus SARS RG RT-PCR Kit, une série de dilutions d'un standard a été effectuée de 10 jusqu'à 0,003 copies nominales d'ARN transcrites *in vitro* pro μl de l'amplicon SRAS-CoV et analysée avec l'artus SARS RG RT-PCR Kit. Les essais ont été exécutés sur trois jours différents à raison de huit séries par jour. Le résultat a été déterminé à l'aide d'une analyse probit, représentée graphiquement à la Fig. 11. La limite de détection de l'artus SARS RG RT-PCR Kit se situe donc à 0,5 copie/ μl ($p = 0,05$). Cela signifie que 0,5 copie/ μl peut être détectée avec une probabilité de 95 %.

Analyse probit : coronavirus SRAS (artus 3000/Rotor-Gene 3000)

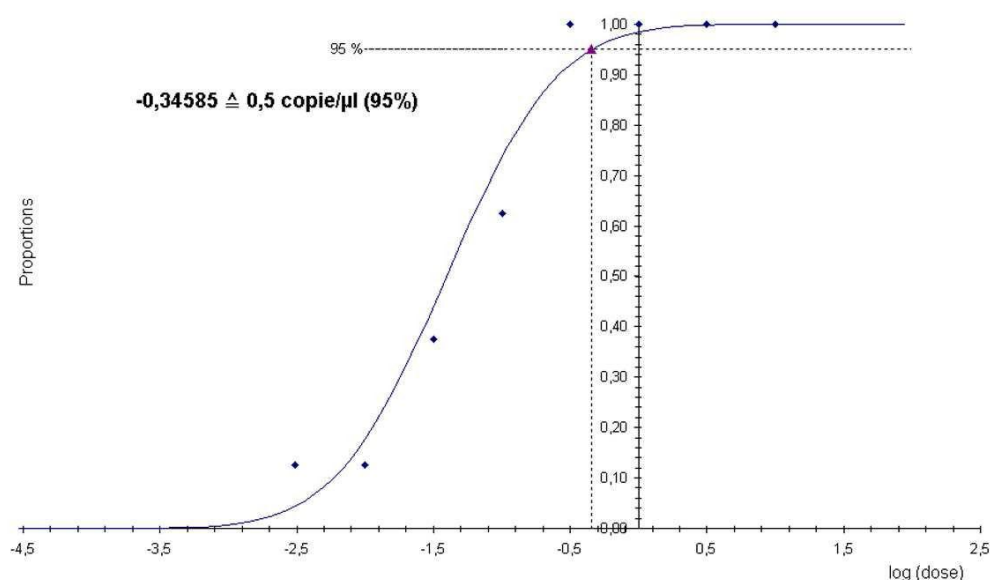


Fig. 11 : Sensibilité analytique de l'artus SARS RG RT-PCR Kit.

11.2 Spécificité

La spécificité de l'*artus SARS RG RT-PCR Kit* est garantie en premier lieu par la sélection des amorces et des sondes ainsi que des conditions de réaction des plus 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 sous-types et génotypes importants a également été contrôlée.

La validation de la spécificité a en outre été effectuée sur 30 échantillons différents de sérum, tous négatifs pour SRAS-CoV, n'ayant généré aucun signal avec les amorces et les sondes spécifiques au SRAS-CoV intégrées dans le *SARS-CoV RG/TM Master*.

Pour déterminer la spécificité de l'*artus SARS RG RT-PCR Kit*, le groupe contrôle indiqué dans le Tableau 1 a été analysé afin de rechercher son aptitude à une réaction croisée. Aucun des agents testés n'a été positif.

Tableau 1 : Test de spécificité du kit avec un pathogène éventuellement apte à une réaction croisée.

Groupe contrôle	SRAS-CoV (Cycling A.FAM)	Contrôle interne (Cycling A.JOE)
HCoV OC 43 ATCC (Human coronavirus OC 43)	-	+
HCoV 229 E ATCC (Human coronavirus 229 E)	-	+
SB 1 + 4 HCoV (Human coronavirus SB 1 + 4)	-	+
SB 164 HCoV (Human coronavirus SB 164)	-	+
IBV Beaudelle (Avian infectious bronchitis virus Beaudelle)	-	+
BCV 212 (Bovine CoV212)	-	+
TGEV Perdue (Porcine transmissible gastroenteritis virus Perdue)	-	+
TGEV Pur 46 C 188 (Porcine transmissible gastroenteritis virus Pur)	-	+
HCoV OC 43 ATCC (Human coronavirus OC 43)	-	+
HCoV 229 E ATCC (Human coronavirus 229 E)	-	+

11.3 Précision

Les données de précision de l'artus SARS RG RT-PCR Kit permettent de déterminer la variance totale du système. Cette variance totale est composée de la **variabilité intra-essai** (variabilité des échantillons de même concentration dans la mise en oeuvre d'un essai), de la **variabilité inter-essai** (variabilité suite à une utilisation par différentes personnes à l'intérieur d'un laboratoire et à un emploi de différents appareils de même type) et de la **variabilité inter-lot** (variabilité des différents lots utilisés). Pour ce faire, l'écart type, la variance et le coefficient de variation sont calculés respectivement, aussi bien pour la PCR spécifique au pathogène que pour la PCR du *Contrôle interne*.

Pour l'artus SARS RG RT-PCR Kit, ces données ont été déterminées au moyen du *Standard de quantification* ayant la plus faible concentration (QS 4; 10 copies/ μ l). Les essais ont été exécutés en huit séries. L'interprétation des résultats a été effectuée à partir des valeurs Ct des courbes d'amplification (Ct : *threshold cycle*, voir Tableau 2). La déviation totale maximale d'un échantillon de concentration donnée est donc de 1,66 % et pour la détection du *Contrôle interne*, de 1,28 % (Ct). Ces valeurs sont basées sur l'ensemble de chacune des valeurs des variabilités déterminées.

Tableau 2 : Données de précision à partir des valeurs Ct.

	Écart type	Variance	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai : <i>SARS-CoV LC/RG/TM QS4</i>	0,15	0,02	0,48
Variabilité intra-essai : <i>Contrôle interne</i>	0,40	0,15	1,67
Variabilité inter-essai : <i>SARS-CoV LC/RG/TM QS4</i>	0,23	0,05	0,75
Variabilité inter-essai : <i>Contrôle interne</i>	1,13	1,28	4,53
Variabilité inter-lot : <i>SARS-CoV LC/RG/TM QS4</i>	0,52	0,25	1,69

Variabilité inter-lot : <i>Contrôle interne</i>	0,94	0,63	3,62
Variance totale : SARS-CoV LC/RG/TM QS4	0,51	0,26	1,66
Variance totale : <i>Contrôle interne</i>	1,13	1,28	1,28

11.4 Robustesse

La vérification de la robustesse permet de déterminer le taux d'échec total de l'*artus SARS RG RT-PCR Kit*. Pour ce faire, 30 échantillons de sérum, tous négatifs pour SRAS-CoV, ont chacun été mélangés à 1,5 copies/ μ l de volume d'éluion d'ARN de contrôle du SRAS-CoV (à la concentration trois fois supérieure au seuil de sensibilité analytique), purifiés (voir **8.2 Extraction de l'ARN**) avec le QIAamp Viral RNA Mini Kit et analysés avec l'*artus SARS RG RT-PCR Kit*. Le taux d'échec pour SRAS-CoV était de 0 % pour la totalité des échantillons. En outre, la robustesse du *Contrôle interne* a été vérifiée par la procédure d'extraction et par l'analyse de 30 échantillons de sérum négatifs pour SRAS-CoV. Le taux d'échec total était de 0 %. Aucune inhibition n'a été observée. La robustesse de l'*artus SARS RG RT-PCR Kit* est donc ≥ 99 %.

11.5 Reproductibilité

Les données de reproductibilité sont fournies par le biais d'une participation à des essais inter-laboratoires dans le but de procéder à une évaluation régulière de la performance de l'*artus SARS RG RT-PCR Kit* ainsi qu'à une comparaison de performance avec d'autres produits.

11.6 Évaluation diagnostique

L'évaluation de l'*artus SARS RG RT-PCR Kit* est actuellement encore en cours dans le cadre de plusieurs études.

12. Remarques particulières concernant l'utilisation du produit

- Tous les réactifs doivent être utilisés exclusivement pour le diagnostic *in vitro*.
- L'utilisation est réservée aux personnes spécialement formées aux procédés de diagnostic *in vitro*.
- Le protocole doit impérativement être respecté scrupuleusement, afin d'optimiser les résultats PCR.
- Respecter les dates de péremption figurant sur l'emballage et les étiquettes des différents composants. Ne pas utiliser les réactifs dont la date de péremption est dépassée.

13. Informations de sécurité

Pour obtenir des informations relatives à la sécurité de l'*artus* SARS RG RT-PCR Kit, consulter la fiche de données de sécurité correspondante (safety data sheets, SDS), disponible sur notre site Internet www.qiagen.com/safety au format PDF, un format compact et convivial.












14. Contrôle qualité

En accord avec le système de gestion de la qualité de QIAGEN certifié ISO 9001 et ISO 13485, chaque lot de l'*artus* SARS RG RT-PCR Kit a été testé conformément aux spécifications prédéterminées afin d'assurer une qualité constante du produit.

15. Références bibliographiques

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 - 212.

16. Explication des symboles

	Utiliser jusqu'à
	Code du lot
	Fabricant
	Référence du catalogue
	Référence du matériel
	Manuel
	Dispositif medical de diagnostic in vitro
	Éthanol
	Code article international (GTIN)
	Kit contient des réactifs pour <N> tests
	Limites de température
QS	<i>Standard de quantification</i>
IC	<i>Contrôle interne</i>

artus SARS RG RT-PCR Kit

Marques et clause de non-responsabilité

QIAGEN[®], QIAamp[®], artus[®], Rotor-Gene[®] (Groupe QIAGEN; Dacron[®] (Invista, Inc.).

Les noms enregistrés, les marques déposées, etc. cités dans ce document ne peuvent être considérés comme juridiquement non-protégés, même si non identifiés comme tel.

L'artus SARS RG RT-PCR Kit est une trousse diagnostique conforme au marquage CE selon la directive européenne 98/79/CE sur les dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. Ce produit n'est pas disponible dans tous les pays.

Les trousse QIAamp ne sont prévues que pour un usage général en laboratoire. Les données ou les représentations du produit ne sont pas conçues dans le but de fournir des informations sur le diagnostic, la prévention ou le traitement d'une maladie.

L'acquisition des trousse PCR artus inclut une licence limitée à leur utilisation lors d'une amplification en chaîne par polymérase (PCR) dans les domaines du diagnostic in vitro humain et vétérinaire en utilisant un thermocycleur, dont l'emploi pour une application automatisée de la PCR est couvert par des redevances forfaitaires payables à Applied Biosystems ou par acquisition d'un thermocycleur autorisé. Le procédé de PCR est protégé par les équivalents nationaux des brevets US no. 5.219.727 et 5.322.770 et 5.210.015 et 5.176.995 et 6.040.166 et 6.197.563 et 5.994.056 et 6.171.785 et 5.487.972 et 5.804.375 et 5.407.800 et 5.310.652 et 5.994.056; propriété de F.

Hoffmann-La Roche Ltd.

© 2007-2015 QIAGEN, tous droits réservés.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

