

# artus<sup>®</sup> EBV TM PCR Kit

## Manuel



24 (réf. catalogue 4501163)



96 (réf. catalogue 4501165)

Diagnostic in vitro quantitatif

Pour une utilisation avec les

ABIPRISM<sup>®</sup> 7000, 7700 et 7900HT Sequence Detection Systems

Version 1



4501163, 4501165



1046895FR



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALLEMAGNE

R2

**MAT**

1046895FR



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

## Table des matières

|   |    |
|---|----|
| 1. Contenu .....  | 4  |
| 2. Conservation .....   | 4  |
| 3. Matériel nécessaire et non fourni .....                            | 5  |
| 4. Précautions générales .....  | 6  |
| 5. Informations sur le pathogène.....                                 | 6  |
| 6. Principe de la PCR en temps réel .....                             | 6  |
| 7. Description du produit.....  | 7  |
| 8. Protocole .....  | 8  |
| 8.1 Extraction de l'ADN.....  | 8  |
| 8.2 Contrôle interne .....  | 11 |
| 8.3 Quantification .....  | 12 |
| 8.4 Préparation de la PCR .....                                       | 14 |
| 8.5 Programmation de l'ABI PRISM SDS.....                             | 19 |
| 9. Interprétation .....   | 37 |
| 10. Aide au dépannage .....   | 43 |
| 11. Spécifications .....  | 45 |
| 11.1 Sensibilité analytique.....                                      | 45 |
| 11.2 Spécificité .....  | 46 |
| 11.3 Reproductibilité.....  | 47 |
| 11.4 Évaluation diagnostique.....                                     | 47 |
| 12. Remarques particulières concernant l'utilisation du produit ..... | 47 |
| 13. Avertissements et précautions.....                                | 48 |
| 14. Contrôle qualité .....  | 48 |
| 15. Références bibliographiques .....                                 | 48 |
| 16. Explication des symboles .....                                    | 49 |

## artus<sup>®</sup> EBV TM PCR Kit

Pour une utilisation avec les ABI PRISM 7000, 7700 et 7900HT Sequence Detection Systems.

**Attention :** Le kit artus EBV TM PCR Kit ne peut être utilisé ni avec le GeneAmp<sup>®</sup> 5700 SDS ni avec une plaque de format 384 puits de l'ABI PRISM7900HT SDS.

### 1. Contenu

|       | Étiquetage et  | Réf. 4501163<br>24 réactions | Réf. 4501165<br>96 réactions |
|-------|--|------------------------------|------------------------------|
| Bleu  | EBV RG/TM<br>Master  | 2 x 12 rxns                  | 8 x 12 rxns                  |
| Rouge | EBV LC/RG/TM QS <sup>α</sup><br>5 x 10 <sup>4</sup> cop/μl | 1 x 200 μl                   | 1 x 200 μl                   |
| Rouge | EBV LC/RG/TM QS <sup>α</sup><br>5 x 10 <sup>3</sup> cop/μl | 1 x 200 μl                   | 1 x 200 μl                   |
| Rouge | EBV LC/RG/TM QS <sup>α</sup><br>5 x 10 <sup>2</sup> cop/μl | 1 x 200 μl                   | 1 x 200 μl                   |
| Rouge | EBV LC/RG/TM QS <sup>α</sup><br>5 x 10 <sup>1</sup> cop/μl | 1 x 200 μl                   | 1 x 200 μl                   |
| Vert  | EBV RG/TM IC <sup>α</sup>                                  | 1 x 1 000 μl                 | 2 x 1 000 μl                 |
| Blanc | Water (PCR grade)  | 1 x 1 000 μl                 | 1 x 1 000 μl                 |

<sup>α</sup> QS = Standard de quantification

IC = Contrôle interne

### 2. Conservation

Les composants de l'artus EBV TM 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.

### 3. Matériel nécessaire et non fourni

- Gants de laboratoire sans talc
- Kit d'extraction d'ADN (voir **8.1 Extraction de l'ADN**)
- Pipettes (réglables)
- Pointes de pipette stériles avec filtre
- Mixeur Vortex
- Micro-centrifugeuse avec rotor pour tubes de réaction de 2 ml
- Centrifugeuse avec rotor pour plaques de micro-titrage (facultatif)
- Plaque optique 96 puits/tubes de réaction avec bouchons optiques correspondants\* (voir **8.4 Préparation de la PCR**)
- Support avec grille de maintien 96 puits pour l'utilisation de tubes optiques (*96-Well Tray/Retainer Set*, réf. cat. 403 081, Applied Biosystems), voir **8.4 Préparation de la PCR**
- Tapis de compression à utiliser avec films adhésifs optiques (*Optical Cover Compression Pads*, réf. cat. 4 312 639, Applied Biosystems), voir **8.4 Préparation de la PCR**
- Applicateur pour l'obturation des plaques de réaction avec des films adhésifs optiques (*Adhesive Seal Applicator Kit*, réf. cat. 4 333 183, Applied Biosystems)
- *ABI PRISM 7000, 7700* ou *7900HT SDS*

**Attention :** Il est impératif de disposer d'une calibration valide des marqueurs (*Pure Spectra Component File*) et du bruit de fond (*Background Component File*) lors de l'utilisation des appareils.

---

\* L'utilisation de tubes de réaction pour les mesures optiques avec bouchons bombés est autorisée uniquement pour l'*ABI PRISM 7700 SDS* et nécessite une modification du temps d'exposition (voir **8.5.2 Programmation de l'ABI PRISM 7700 SDS, 8.5.2.5 Paramètres complémentaires importants**).

## 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.

## 5. Informations sur le pathogène

La transmission du virus d'Epstein-Barr (EBV) s'effectue par voie orale, le plus souvent par la salive contaminée. L'infection à EBV est généralement asymptomatique, notamment au cours de l'enfance. Le signe clinique d'une infection aiguë est la mononucléose infectieuse avec de la fièvre, de l'asthénie, une angine ainsi qu'une inflammation des ganglions lymphatiques et de la rate. Chez certains patients, ces symptômes peuvent apparaître de manière chronique et récurrente. On observe les formes graves de l'infection à EBV en particulier chez les patients immunodéprimés et les personnes avec une déficience en cellules T.

## 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* EBV TM PCR Kit est une trousse prête à l'emploi pour une utilisation avec l'*ABI PRISM 7000, 7700 et 7900HT Sequence Detection System*, pour détecter l'ADN d'EBV par amplification en chaîne par polymérase (PCR). L'*EBV RG/TM Master* comprend les réactifs et les enzymes nécessaires à l'amplification spécifique d'une séquence de 97 pb du génome d'EBV. La détection de l'amplicon est effectuée en mesurant la fluorescence FAM sur l'*ABI PRISM SDS*. Le kit *artus* EBV TM PCR Kit comprend en outre un deuxième système d'amplification hétérologue pour détecter une éventuelle inhibition de la PCR. Celui-ci est détecté comme *Contrôle interne (IC)* en mesurant la fluorescence VIC. Ceci n'a aucune influence négative sur la limite de détection de la PCR analytique d'EBV (voir **11.1 Sensibilité analytique**). Des *Standards de quantification* externes (*EBV LC/RG/TM QS 1 - 4*) sont fournis, permettant de déterminer la charge virale. Lire à ce sujet le paragraphe **8.3 Quantification**.

## 8. Protocole

### 8.1 Extraction de l'ADN

Différents fabricants proposent des kits d'extraction d'ADN. Procéder à l'extraction d'ADN 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 |
|--------------------|--------------------------------------|------------------------|-----------|----------------|
| Sérum, plasma, LCR | QIAamp <sup>®</sup> DNA Mini Kit     | 51 304                 | QIAGEN    | non inclus     |
|                    | QIAamp UltraSens <sup>®</sup> Virus  | 53 704                 | QIAGEN    | inclus         |
| Cellules sanguines | QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)       | 51 104                 | QIAGEN    | non inclus     |
| Plasma             | EZ1 <sup>®</sup> DSP Virus Kit (48)* | 62 724                 | QIAGEN    | inclus         |

\*A utiliser en combinaison avec l'instrument BioRobot<sup>®</sup> EZ1 DSP Workstation (réf. cat. 9001360) et la carte EZ1 DSP Virus Card (réf. cat. 9017707).

Note importante pour l'utilisation des troussees QIAamp UltraSens Virus Kit, QIAamp DNA Blood Mini Kit et QIAamp DNA Mini Kit:

- 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. Dans le cas d'une extraction d'acides nucléiques à partir de milieu sans cellule ou de matériel pauvre en ADN/ARN (par ex. LCR), si le kit d'extraction utilisé ne contient aucun ARN entraîneur, il est vivement recommandé d'ajouter un ARN entraîneur (RNA-Homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, réf. cat. 27-4110-01). Procéder alors selon les instructions suivantes:



- a) Resuspendre l'ARN entraîneur lyophilisé dans le tampon d'éluion (mais pas le tampon de lyse) du kit d'extraction (par ex. le tampon AE du QIAamp DNA Mini Kit/QIAamp DNA Blood Mini Kit) et diluer la solution jusqu'à une concentration de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Répartir cette solution d'ARN entraîneur en aliquotes en nombre désiré. Ces aliquotes devront être stockés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Éviter de répéter les étapes de congélation/décongélation ( $> 2 \times$ ) d'une fraction aliquote d'ARN entraîneur.
- b) Pour chaque extraction, utiliser 1  $\mu\text{g}$  d'ARN entraîneur par 100  $\mu\text{l}$  de tampon de lyse. Si le protocole d'extraction prévoit par exemple 200  $\mu\text{l}$  de tampon de lyse par échantillon à purifier, ajouter alors 2  $\mu\text{l}$  d'ARN entraîneur (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) directement au tampon de lyse. Avant le début de chaque extraction, un mélange de tampon de lyse et d'ARN entraîneur (et éventuellement de *Contrôle interne*, voir

**8.2 Contrôle interne)** doit être fraîchement préparé selon le schéma de pipetage suivant.

| Nombre d'échantillons                         | 1                                   | 12  |
|---|-------------------------------------|---|
| Tampon de lyse                                | par ex. 200 $\mu\text{l}$           | par ex. 2 400 $\mu\text{l}$                 |
| ARN entraîneur (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) | 2 $\mu\text{l}$                     | 24 $\mu\text{l}$                            |
| <b>Volume total</b>                           | <b>202 <math>\mu\text{l}</math></b> | <b>2 424 <math>\mu\text{l}</math></b>       |
| <b>Volume pour l'extraction</b>               | <b>200 <math>\mu\text{l}</math></b> | <b>200 <math>\mu\text{l}</math> chacune</b> |

- 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.
- 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 UltraSens Virus Kit, il est recommandé de procéder selon les instructions suivantes, qui diffèrent des directives du

manuel du kit d'extraction :

- a. Avant la première utilisation du kit d'extraction, resuspendre l'ARN entraîneur lyophilisé dans 310  $\mu\text{l}$  de tampon d'élution inclus dans le kit (concentration finale 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 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  $-20^{\circ}\text{C}$ . Éviter de répéter les étapes de congélation/décongélation ( $> 2 \times$ ) 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 **8.2 Contrôle interne**) doit être fraîchement préparé selon le schéma de pipetage suivant.

| Nombre d'échantillons                         | 1                                     | 12  |
|---|---------------------------------------|---|
| Tampon de lyse AC                             | 800 $\mu\text{l}$                     | 9 600 $\mu\text{l}$                         |
| ARN entraîneur (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) | 5,6 $\mu\text{l}$                     | 67,2 $\mu\text{l}$                          |
| <b>Volume total</b>                           | <b>805,6 <math>\mu\text{l}</math></b> | <b>9 667,2 <math>\mu\text{l}</math></b>     |
| <b>Volume pour l'extraction</b>               | <b>800 <math>\mu\text{l}</math></b>   | <b>800 <math>\mu\text{l}</math> chacune</b> |

- 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.
- L'utilisation du **QIAamp UltraSens Virus Kit** permet de concentrer l'échantillon. Si votre échantillon n'est ni du sérum ni du plasma, ajouter au moins 50 % (v/v) de plasma humain négatif à l'échantillon.
  - Les **anticoagulants** contenus dans les tubes à prélèvement sanguin peuvent avoir un effet inhibiteur sur la PCR, mais ils sont bien éliminés par les kits d'extraction mentionnés. Il est recommandé de ne pas utiliser d'héparine.
  - Dans le cas d'extractions utilisant des tampons de lavage contenant de l'**éthanol**, s'assurer obligatoirement 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* EBV TM PCR Kit ne convient pas aux procédés d'extraction à base de **phénol**.

Note importante pour l'utilisation de la trousse EZ1 DSP Virus Kit:

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

**Important** : Le *Contrôle interne* de l'*artus* EBV TM PCR Kit peut être directement utilisé pendant la procédure d'extraction (voir **8.2 Contrôle interne**).

## 8.2 Contrôle interne

Un *Contrôle interne* (EBV RG/TM IC) est inclus dans le kit. Celui-ci vous permet de contrôler **aussi bien la procédure d'extraction d'ADN qu'une éventuelle inhibition de la PCR** (voir Fig. 1). En cas d'utilisation de la trousse **EZ1 DSP Virus Kit**, le *Contrôle interne* doit être ajouté selon les instructions du manuel *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*. En employant le **QIAamp UltraSens Virus Kit**, le **QIAamp DNA Blood Mini Kit** ou le **QIAamp DNA Mini Kit**, 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 **QIAamp UltraSens Virus Kit** et éluer l'ADN 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

**8.1 Extraction de l'ADN**) 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* **exclusivement pour mettre en évidence une éventuelle inhibition de la PCR** (voir Fig. 2). Pour cela, ajouter par réaction 2  $\mu$ l de *Contrôle interne* directement dans 30  $\mu$ l d'*EBV RG/TM Master*. Pour chaque réaction PCR, utiliser 30  $\mu$ l de mélange réactionnel\* ainsi préparé et ajouter ensuite 20  $\mu$ l d'échantillon purifié. En cas de préparation d'une série de plusieurs échantillons, augmenter la quantité nécessaire d'*EBV RG/TM Master* et de *Contrôle interne* en fonction du nombre d'échantillons (voir **8.4 Préparation de la PCR**).

### 8.3 Quantification

Les *Standards de quantification* fournis (*EBV LC/RG/TM QS 1 - 4*) doivent être manipulés comme des échantillons purifiés et utilisés avec le même volume (20  $\mu$ l). Pour établir une courbe d'étalonnage sur l'*ABI PRISM Sequence Detection System*, utiliser l'ensemble des quatre *Standards de quantification* fournis, les définir comme standard et saisir les concentrations correspondantes (voir **8.5 Programmation de l'ABI PRISM SDS**). Il est impossible d'importer des courbes d'étalonnage de séries précédentes avec les logiciels *ABI PRISM 7000*, *7700* et *7900HT SDS*.

**Attention :** Les *Standards de quantification* sont exprimés en copies/ $\mu$ l. Pour

convertir les valeurs déterminées à l'aide de la courbe d'étalonnage en copies/ml d'échantillon, utiliser la formule suivante :

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

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 ABI PRISM 7000 SDS est disponible sur le site Internet [www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX](http://www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX) (Technical Note for Quantitation on the ABI PRISM 7000 SDS).

---

\* 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.

## 8.4 Préparation de la PCR

Préparer le nombre de microtubes nécessaires pour le nombre de réactions prévues ou une plaque 96 puits. Le tableau ci-dessous présente une liste de fournitures recommandées :

| Article                  | Désignation                            | Référence du catalogue | Fabricant          | Support avec grille de maintien* | Tapis de compression |
|--------------------------|--|------------------------|--------------------|----------------------------------|----------------------|
| Plaque optique 96 puits  | 96-Well Optical Reaction Plate         | 4 306 737              | Applied Biosystems | non                              | -                    |
| Films adhésifs optiques  | Optical Adhesive Covers                | 4 311 971              | Applied Biosystems | -                                | oui                  |
| Tubes optiques           | ABI PRISM Optical Tubes, 8 Tubes/Strip | 4 316 567              | Applied Biosystems | oui                              | -                    |
| Tubes optiques           | MicroAmp® Optical Tubes                | N8010933               | Applied Biosystems | oui                              | -                    |
| Bouchons optiques (plat) | ABI PRISM Optical Caps, 8 Caps/Strip   | 4 323 032              | Applied Biosystems | -                                | non                  |

**Attention :** L'utilisation de tubes de réaction optiques avec bouchons bombés est autorisée uniquement avec l'instrument *ABI PRISM 7700 SDS* et nécessite une modification du temps d'exposition (voir **8.5.2 Programmation de l'ABI PRISM 7700 SDS, 8.5.2.5 Paramètres complémentaires importants**).

Lors de la préparation de la PCR, s'assurer qu'au moins un *Standard de quantification* ainsi qu'un contrôle négatif (*Water, PCR grade*) sont testés parallèlement à chaque série de PCR. Pour établir une courbe d'étalonnage, utiliser à chaque série de PCR tous les *Standards de quantification* fournis (*EBV 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

---

\* Lors de l'utilisation du support avec grille de maintien, il est nécessaire d'ouvrir les tubes de réaction pour les mettre en place et pour les retirer. Pour prévenir toute contamination lors de cette manipulation, utiliser exclusivement la partie inférieure du support.

plusieurs fois à l'aide de la pipette ou agiter brièvement à l'aide d'un vortex) et immédiatement après les centrifuger brièvement.

Pour contrôler à l'aide du *Contrôle interne* aussi bien la procédure d'extraction qu'une éventuelle inhibition de la PCR, le *Contrôle interne* doit être ajouté auparavant à la procédure d'extraction (voir **8.2 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 | EBV RG/TM Master    | 30 $\mu$ l                  | 360 $\mu$ l                         |
|                                       | EBV RG/TM IC        | 0 $\mu$ l                   | 0 $\mu$ l                           |
|                                       | <b>Volume total</b> | <b>30 <math>\mu</math>l</b> | <b>360 <math>\mu</math>l</b>        |
| 2. Préparation de la réaction PCR     | Mélange réactionnel | 30 $\mu$ l                  | 30 $\mu$ l chacune                  |
|                                       | Échantillon         | 20 $\mu$ l                  | 20 $\mu$ l chacune                  |
|                                       | <b>Volume total</b> | <b>50 <math>\mu</math>l</b> | <b>50 <math>\mu</math>l chacune</b> |

Pour utiliser le *Contrôle interne* pour exclusivement mettre en évidence une éventuelle inhibition de la PCR, l'ajouter directement à l'EBV 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 | EBV RG/TM Master    | 30 $\mu$ l                   | 360 $\mu$ l                         |
|                                       | EBV RG/TM IC        | 2 $\mu$ l                    | 24 $\mu$ l                          |
|                                       | <b>Volume total</b> | <b>32 <math>\mu</math>l*</b> | <b>384 <math>\mu</math>l*</b>       |
| 2. Préparation de la réaction PCR     | Mélange réactionnel | 30 $\mu$ l*                  | 30 $\mu$ l* chacune                 |
|                                       | Échantillon         | 20 $\mu$ l                   | 20 $\mu$ l chacune                  |
|                                       | <b>Volume total</b> | <b>50 <math>\mu</math>l</b>  | <b>50 <math>\mu</math>l chacune</b> |

\* 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 30  $\mu$ l de mélange réactionnel dans chaque tube de réaction ou dans chaque puits nécessaire de la plaque 96 puits. Ajouter ensuite 20  $\mu$ l de l'éluat d'extrait d'ADN. S'assurer que les deux solutions sont bien mélangées, en aspirant et rejetant le mélange plusieurs fois à l'aide de la pipette. Fermer les tubes de réaction à l'aide des bouchons correspondants ou lors de l'utilisation d'une plaque 96 puits, à l'aide de films adhésifs optiques (*Optical Adhesive Covers*). Pour collecter le volume de réaction dans le fond du tube ou de la plaque, centrifuger les tubes de réaction (dans un support de stockage pour microtubes PCR) ou la plaque 96 puits dans une centrifugeuse avec rotor pour plaques de micro-titrage pendant 30 secondes à 1 780 x g (4 000 tr/min). Si vous ne disposez pas d'une telle centrifugeuse, lors de la préparation de la PCR, s'assurer de pipeter aussi bien le mélange réactionnel que le volume

d'échantillon dans le fond des tubes de réaction ou des puits. Stocker les mélanges réactionnels à 4°C, jusqu'à ce que l'instrument *ABI PRISM SDS* soit programmé (voir **8.5 Programmation de l'ABI PRISM SDS**) et les placer ensuite dans l'appareil.

#### Attention :

- Lors de l'utilisation de tubes de réaction optiques avec bouchons optiques, toujours mettre en place un support de maintien (*96-Well Tray/Retainer Set*) dans l'instrument (*ABI PRISM 7000, 7700 et 7900HT SDS*). Lors de l'utilisation du support avec grille de maintien, il est nécessaire d'ouvrir les tubes de réaction pour les mettre en place et pour les retirer. Pour prévenir toute contamination lors de ces manipulations, utiliser exclusivement la partie inférieure du support de maintien.
- L'utilisation de plaques optiques 96 puits avec films adhésifs optiques requiert la mise en place d'un tapis de compression (*Optical Cover Compression Pads*).



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

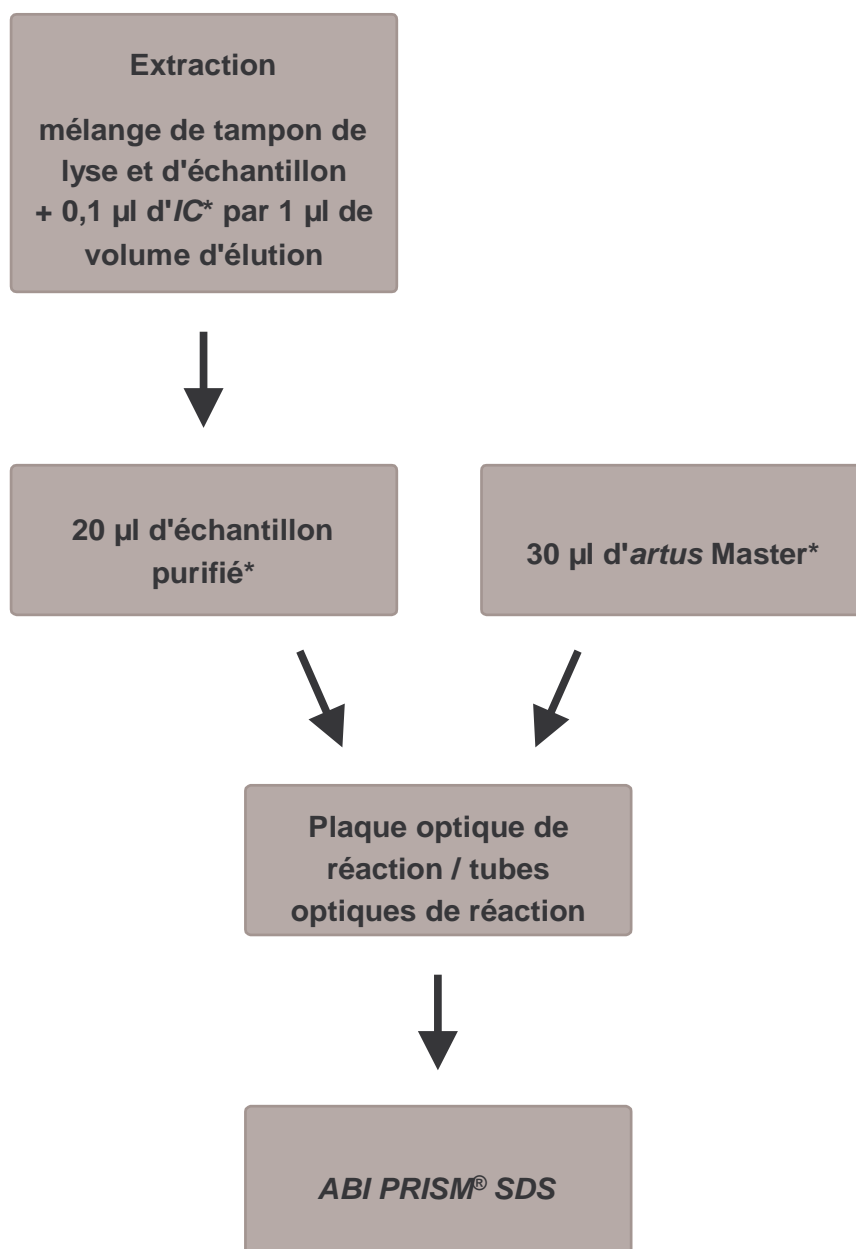


Fig. 1 : Processus d'addition du *Contrôle interne* pour contrôler l'étape d'extraction et une éventuelle inhibition de la PCR.

\* À 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

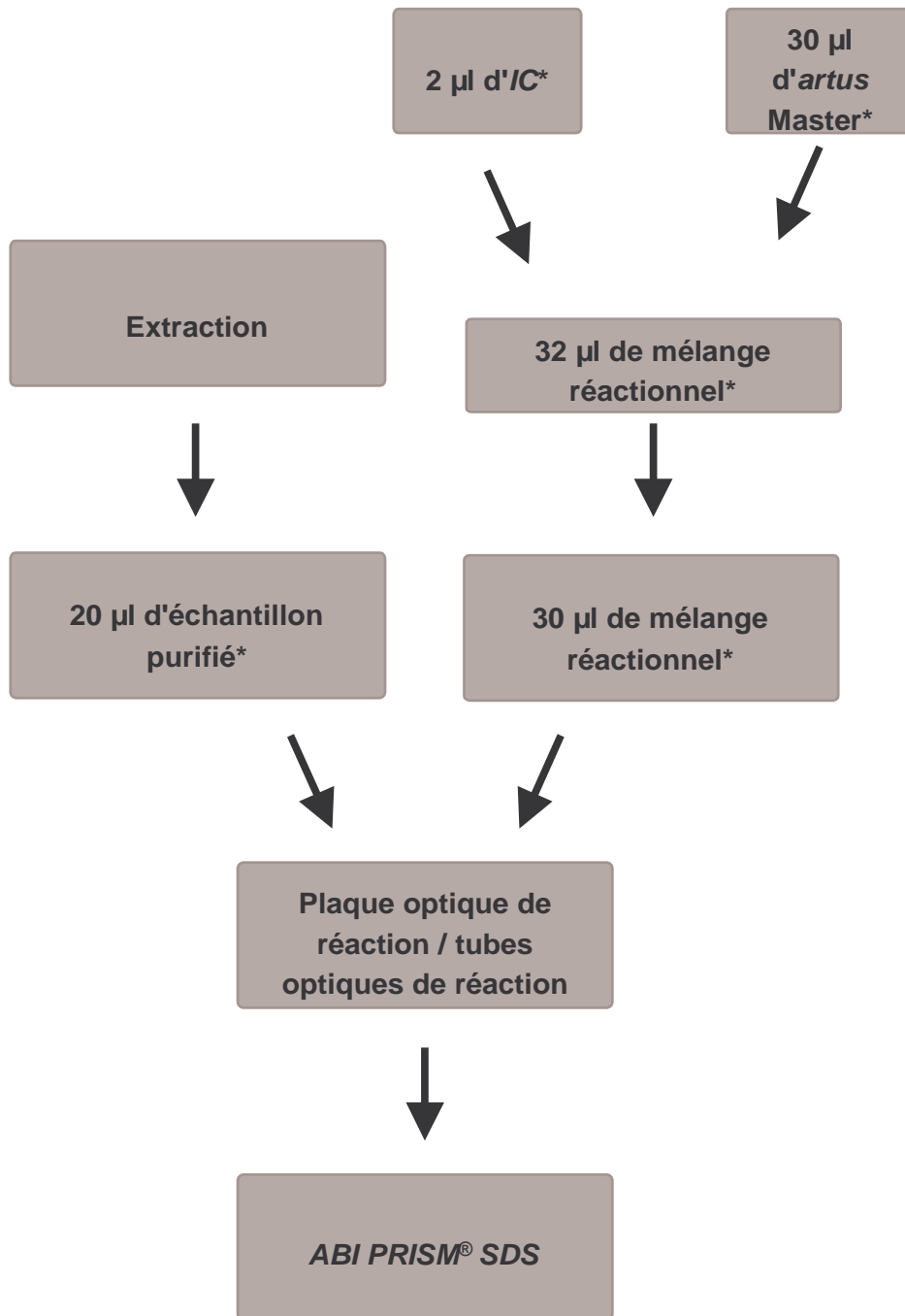


Fig. 2 : Processus d'addition du Contrôle interne pour contrôler une éventuelle inhibition de la PCR.

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

## 8.5 Programmation de l'ABI PRISM SDS

Avant le démarrage de l'essai PCR, le logiciel des ABI PRISM 7000, 7700 et 7900HT Sequence Detection Systems (SDS) a besoin de certaines informations complémentaires. Toutefois, la procédure de programmation différant nettement d'un appareil à l'autre, elle est par conséquent traitée dans des chapitres distincts.

### 8.5.1 Programmation de l'ABI PRISM 7000 SDS

Pour détecter l'ADN d'EBV, créer un profil sur l'ABI PRISM 7000 SDS, conformément aux six étapes suivantes (8.5.1.1 - 8.5.1.6). Toutes les indications font référence à la version 1.0.1 du logiciel d'ABI PRISM 7000 SDS. Pour plus de détails sur la programmation de l'ABI PRISM 7000 SDS, se reporter au manuel *ABI PRISM 7000 SDS User Guide*. Pour plus de clarté, les paramétrages à effectuer sont encadrés en noir dans les figures.

#### 8.5.1.1 Pré-paramétrages lors de la création d'un nouvel essai PCR

Dans le cas de l'ABI PRISM 7000 SDS, sélectionner la commande *New* du menu *File* et définir les paramètres de base suivants pour le nouveau document (voir Fig. 3). Un modèle préalablement enregistré (*SDS Template* [\*.sdt]) se trouve dans la liste *Template* ou peut être sélectionné à l'aide de la fonction *Browse* (voir 8.5.1.5 Enregistrement de l'essai PCR). Confirmer les indications (OK).

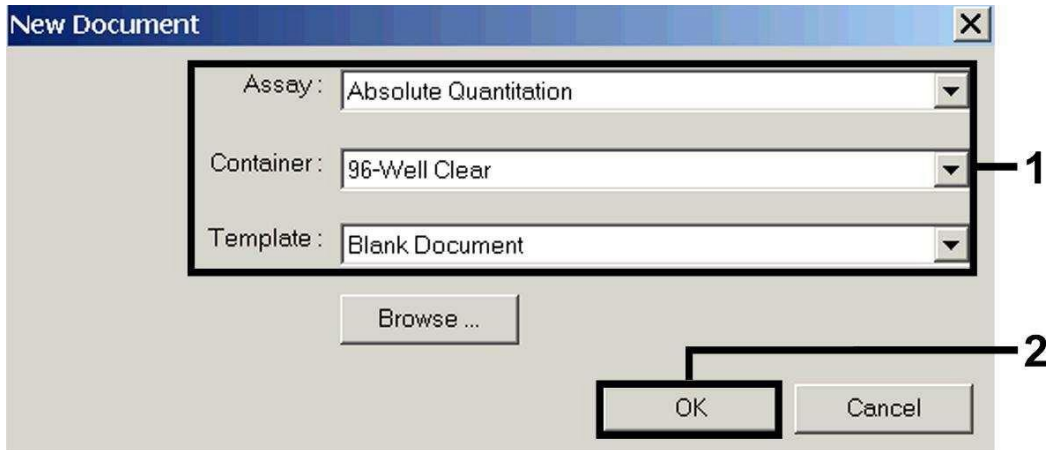


Fig. 3 : Paramétrages lors de la création d'un nouvel essai PCR (*New Document*).

### 8.5.1.2 Création/Sélection des détecteurs

À l'aide du sous-menu *Detector Manager* se trouvant sous *Tools*, affecter au document les marqueurs de détection correspondants. Pour détecter l'ADN d'EBV ainsi que le *Contrôle interne* à l'aide de l'*artus EBV TM PCR Kit*, il faut définir les rapporteurs/quenchers indiqués dans le tableau ci-dessous :

| Détection                             | Rapporteur | Quencher |
|---------------------------------------|------------|----------|
| ADN d'EBV                             | FAM        | none     |
| <i>Contrôle interne (EBV RG/TMIC)</i> | VIC        | none     |

Pour créer ces détecteurs, sélectionner l'option *File* se trouvant en bas à gauche dans *Detector Manager* et ensuite, l'option *New*.

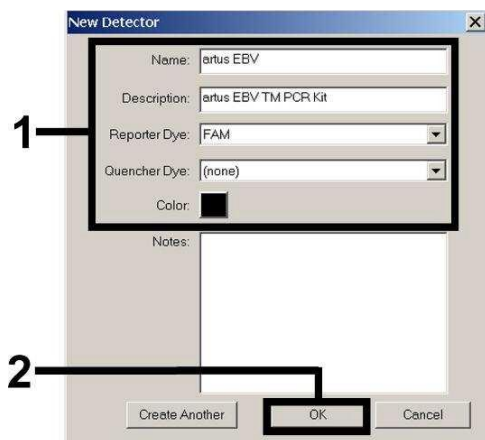


Fig. 4 : Création du détecteur spécifique à l'EBV (*Detector Manager*).

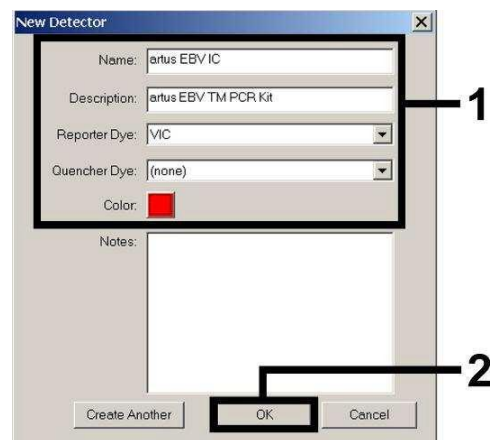


Fig. 5 : Création du détecteur spécifique au *Contrôle interne* (*Detector Manager*).

Dans la fenêtre apparaissant à présent, choisir (conformément aux Fig. 4 et Fig. 5) la combinaison rapporteur/quencher **FAM/none** pour détecter l'ADN d'EBV. Pour détecter le *Contrôle interne*, sélectionner la combinaison **VIC/none**. En confirmant la saisie (OK), un retour est effectué au *Detector Manager*. Sélectionner les détecteurs venant d'être créés et transférer chaque sélection vers *Well Inspector*, en cliquant sur l'option *Add to Plate Document* (voir Fig. 6). Fermer la fenêtre (*Done*).

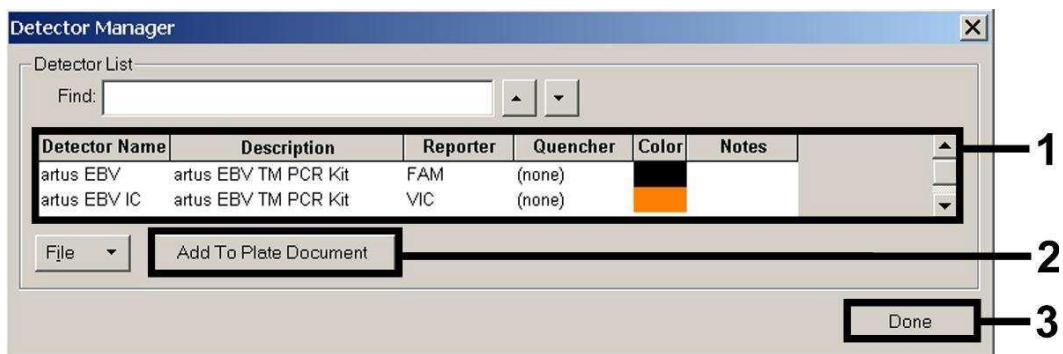


Fig. 6 : Sélection des détecteurs (*Detector Manager*).

### 8.5.1.3 Affectation des informations nécessaires aux positions de la plaque

Ouvrir à présent l'option *Well Inspector* sous *View*, afin d'y retrouver les détecteurs sélectionnés en 8.5.1.2 (voir Fig. 7).

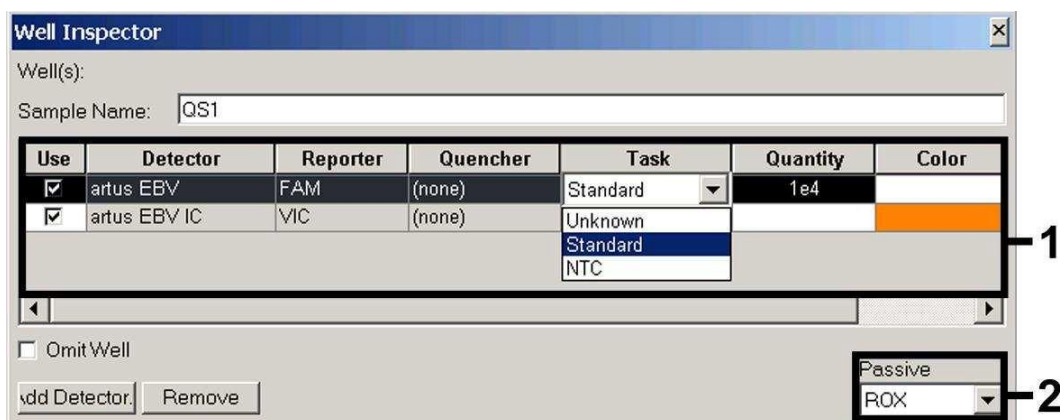


Fig. 7 : Affectation des informations nécessaires aux positions de la plaque (*Well Inspector*).

Sélectionner les positions sur la plaque destinées à la détection de l'ADN d'EBV. Affecter les détecteurs sélectionnés à ces positions, en cochant par un simple clic l'option *Use* des deux détecteurs. Identifier les différents mélanges réactionnels, en sélectionnant leur position correspondante sur la plaque et en saisissant leur nom sous *Sample Name*. Tenir compte du fait que les mélanges possédant le même *Sample Name* et une affectation identique de détecteurs sont identifiés par le logiciel comme des doublons. Il calcule alors la moyenne des valeurs de leur charge virale. Puis, pour chaque type d'échantillon, sélectionner la fonction correspondante (*Task*) suivant le tableau ci-dessous :

| Type d'échantillon | Fonction ( <i>Task</i> ) | Concentration ( <i>Quantity</i> ) | Rapporteur | Quencher |
|--------------------|--------------------------|-----------------------------------|------------|----------|
| Échantillon        | Unknown                  | -                                 | FAM        | none     |
| Contrôle négatif   | NTC                      | -                                 | FAM        | none     |
| Standard           | Standard                 | voir <b>1. Contenu</b>            | FAM        | none     |

Pour établir une courbe d'étalonnage, utiliser pour chaque essai PCR tous les *Standards de quantification* fournis (*EBV LC/RG/TM QS 1 - 4*) et saisir les concentrations (voir **1. Contenu**) correspondant à chaque standard (*Quantity*). Tenir compte du fait que lors d'une série de PCR avec l'*artus EBV TM PCR Kit*, il faut régler **ROX** comme référence passive (*Passive Reference*). La distribution uniforme du marqueur ROX entre tous les mélanges réactionnels PCR d'un lot, en mélangeant bien l'*EBV RG/TM Master*, garantit la détection et le calcul des variations *tube-to-tube* (différences de fluorescence entre les différents mélanges réactionnels PCR) par le *Sequence Detection Software* (normalisation).

#### 8.5.1.4 Création du profil de thermocyclage

Pour saisir le profil de thermocyclage, passer de l'onglet *Setup* à l'onglet *Instrument* du logiciel. Saisir, selon la Fig. 8, le profil de thermocyclage valable pour la détection de l'ADN d'EBV. Pour effacer l'étape de 50°C enregistrée

dans les pré-paramétrages, sélectionner celle-ci à l'aide de la touche gauche de la souris, tout en maintenant la touche *Shift* enfoncée, et la supprimer en utilisant la touche *Backspace*. Vérifier que le volume de réaction est réglé à 50  $\mu$ l. L'option *9600 Emulation* doit être activée et les pré-paramètres

*Auto Increment* ne sont pas modifiés (*Auto Increment* : 0.0°C, 0.0 Seconds).

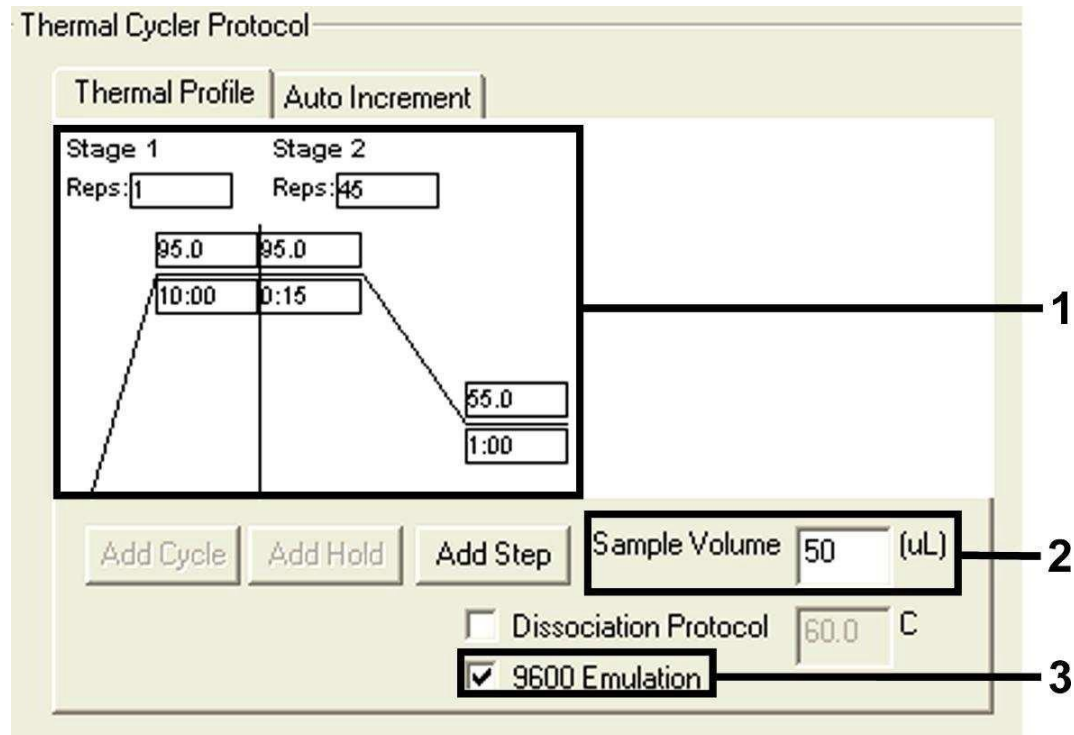


Fig. 8 : Création du profil de thermocyclage.

### 8.5.1.5 Enregistrement de l'essai PCR

À cette étape, il est possible d'enregistrer les paramètres saisis (*Setup*) en tant que modèle, pour pouvoir les utiliser lors d'applications ultérieures, sous une forme identique ou modifiée. En enregistrant les paramètres en tant que *SDS Template (\*.sdt)* dans le répertoire *Template Directory* (disque local [C:] \Program Files\ABI PRISM 7000\Templates créé par Applied Biosystems), ce fichier peut être directement sélectionné à partir de la liste déroulante *Template* dans la fenêtre *New Document*. Les modèles sauvegardés dans d'autres répertoires doivent être ouverts à l'aide de la fonction *Browse*. Avant

de démarrer l'essai PCR, s'assurer d'enregistrer à nouveau celui-ci, en tant que *SDS Document (\*.sds)*. Ceci permet de s'assurer de l'enregistrement des données accumulées au cours de la PCR.

### 8.5.1.6 Démarrage de l'essai PCR

Démarrer l'essai PCR en sélectionnant l'option *Start* du menu *Instrument* ou le champ *Start* de l'onglet *Instrument*.

## 8.5.2 Programmation de l'ABI PRISM 7700 SDS

Pour détecter l'ADN d'EBV, créer un profil sur l'ABI PRISM 7700 SDS, conformément aux sept étapes suivantes (8.5.2.1 - 8.5.2.7). Toutes les indications font référence à la version 1.9.1 du logiciel d'ABI PRISM 7700HT SDS. Pour plus de détails sur la programmation de l'ABI PRISM 7700 SDS, se reporter au guide *ABI PRISM 7700 SDS User's Manual*. Pour plus de clarté, les paramètres à effectuer sont encadrés en noir dans les figures.

### 8.5.2.1 Pré-paramétrages lors de la création d'un nouvel essai PCR

Dans le cas de l'ABI PRISM 7700 SDS, sélectionner la commande *New Plate* du menu *File* et définir les paramètres de base suivants pour le nouveau document (voir Fig. 9). Confirmer les indications (OK).

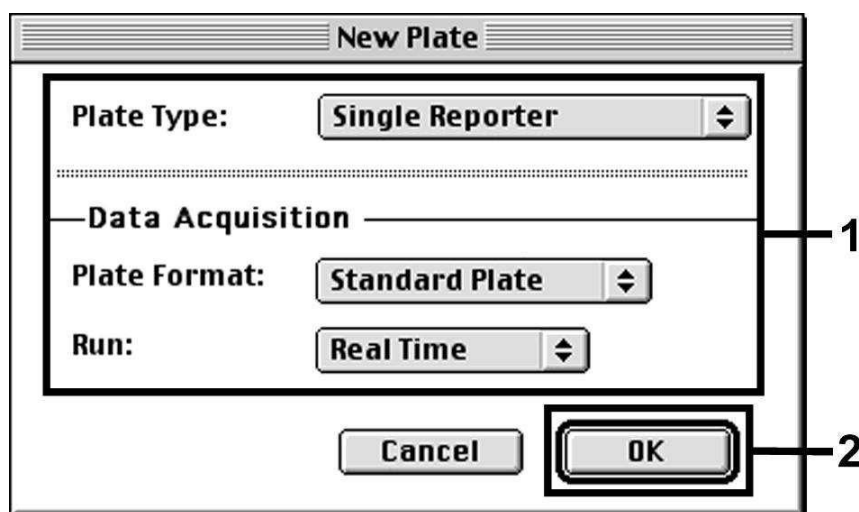


Fig. 9 : Pré-paramétrages lors de la création d'un nouvel essai PCR (*New Plate*).



### 8.5.2.2 Sélection des marqueurs de fluorescence et affectation du type d'échantillon

À l'aide du *Sample Type Setup* (Onglet *Setup* : *Sample Type/Sample Type Setup*), affecter au document les marqueurs de détection et le type d'échantillon correspondant. Pour détecter l'ADN d'EBV ainsi que le *Contrôle interne* à l'aide de l'*artus EBV TM PCR Kit*, il faut définir les rapporteurs/quencher indiqués dans le tableau ci-dessous :

| Détection                             | Rapporteur | Quencher |
|---------------------------------------|------------|----------|
| ADN d'EBV                             | FAM        | none     |
| <i>Contrôle interne (EBV RG/TMIC)</i> | VIC        | none     |

Pour mesurer l'ADN d'EBV à l'aide de l'*artus EBV TM PCR Kit*, sélectionner le marqueur rapporteur **FAM** tel qu'indiqué au tableau. Ceci vaut aussi bien pour les standards (STND) que pour les échantillons (UNKN) et les contrôles négatifs (UNKN). Pour mesurer le *Contrôle interne (IPC+)*, définir **VIC** comme rapporteur. Régler **none** comme quencher. L'affectation des marqueurs et des types d'échantillon dans la fenêtre *Sample Type Setup* est représentée dans la Fig. 10.

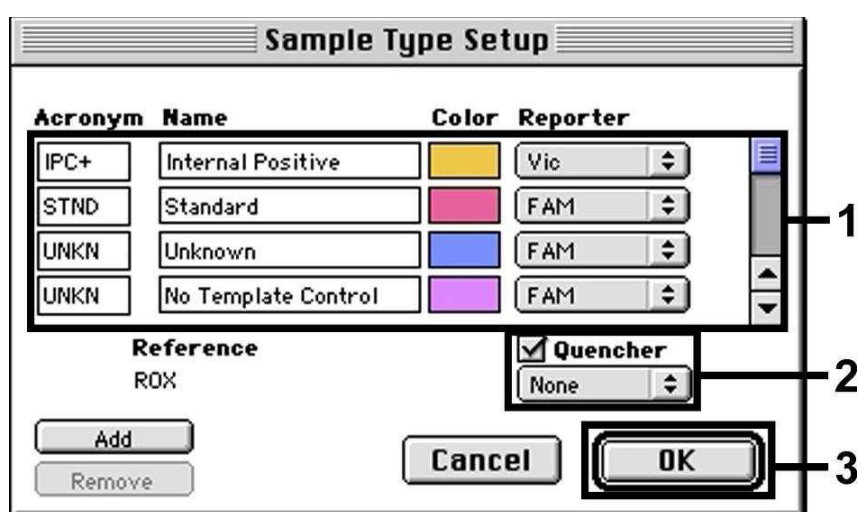


Fig. 10 : Sélection des marqueurs de fluorescence et affectation du type d'échantillon (*Sample Type Setup*).

L'affectation du type d'échantillon à leur fonction correspondante (*Acronym*) est effectuée selon le tableau ci-dessous :

| Type d'échantillon | Fonction ( <i>Acronym</i> ) | Concentration ( <i>Quantity</i> ) | Rapporteur | Quencher |
|--------------------|-----------------------------|-----------------------------------|------------|----------|
| Échantillon        | UNKN                        | -                                 | FAM        | none     |
| Contrôle négatif   | UNKN                        | -                                 | FAM        | none     |
| Standard           | STND                        | voir 1. Contenu                   | FAM        | none     |

### 8.5.2.3 Affectation des informations nécessaires aux positions de la plaque

Pour affecter les détecteurs et les types d'échantillon aux différentes positions des plaques, sélectionner les champs correspondants. Ouvrir dans l'onglet *Setup* la boîte de dialogue *Dye Layer* et affecter le rapporteur correspondant. Activer à présent le menu pop-up *Sample Type* et retrouver alors, dans la liste apparaissant à l'écran, les types d'échantillon affectés au rapporteur dans le *Sample Type Setup* (voir Fig. 11). Sélectionner le type d'échantillon approprié (voir tableau au parag. 8.5.2.2) et affecter à l'aide de *Dye Layer* et du menu *Sample Type* les autres positions de la plaque. Dans le champ *Sample Name*, il est possible d'attribuer un nom à chaque échantillon. Le logiciel calcule la moyenne des valeurs de charge virale dans les champs définis comme *Replicate* (par saisie du nom de l'échantillon de référence dans la colonne *Replicate*) ainsi que leur écart type.

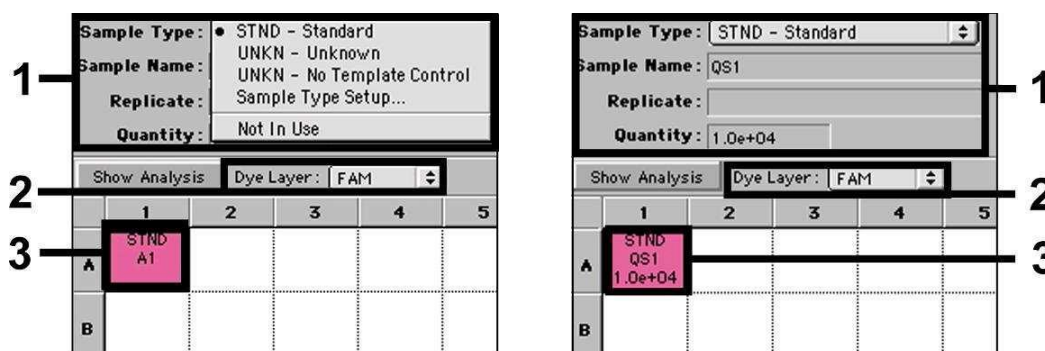


Fig. 11/12 : Affectation des informations nécessaires aux positions des plaques.

Pour établir une courbe d'étalonnage, utiliser pour chaque essai PCR tous les *Standards de quantification* fournis (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4) et saisir les concentrations (voir 1. **Contenu**) correspondant à chaque standard (*Quantity*, voir Fig. 12). Toutefois, ceci n'est possible que si les positions occupées par des standards ont été préalablement définies comme tel à l'aide du menu *Sample Type*.

#### 8.5.2.4 Création du profil de thermocyclage

Pour saisir le profil de thermocyclage, passer au menu *Thermal Cycler Conditions* de l'interface *Setup*. Saisir, selon la Fig. 13, le profil de thermocyclage valable pour la détection de l'ADN d'EBV. Vérifier que le volume de réaction est réglé à 50  $\mu$ L. Les pré-paramètres de temps *Ramp* et *Auto Increment* ne sont pas modifiés (*Ramp Time* : 0:00, *Auto Increment* : 0.0°C, 0.0 Seconds).

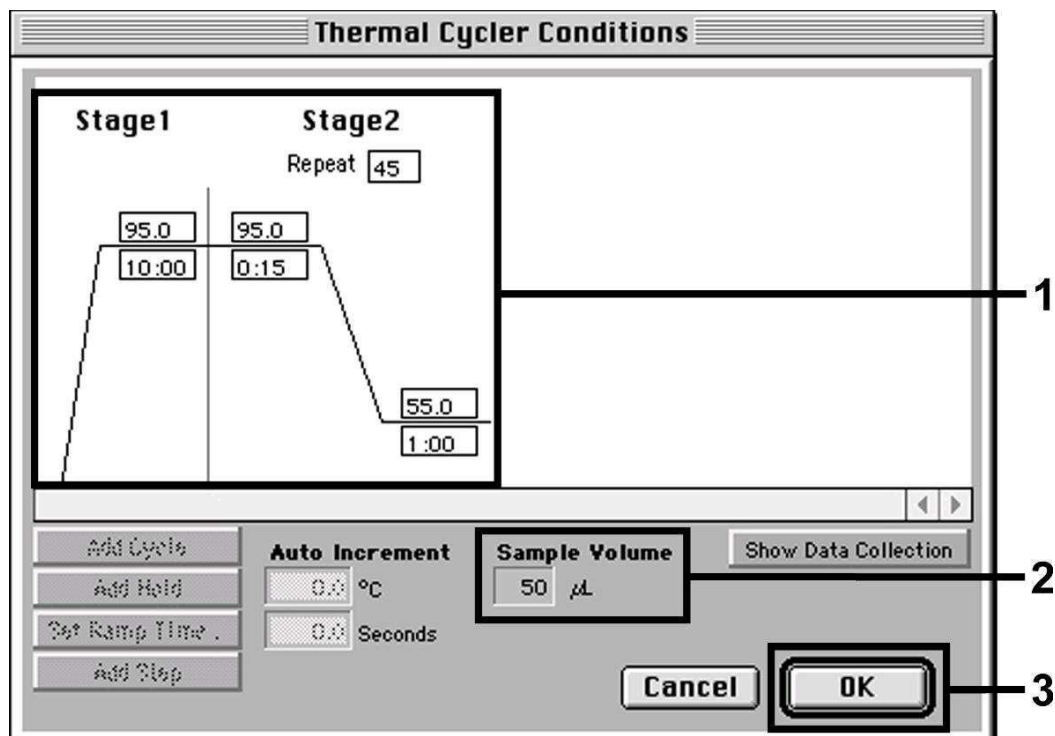


Fig. 13 : Création du profil de thermocyclage.

En outre, l'option *Show Data Collection* se trouve dans le menu *Thermal*

*Cycler Conditions*. En sélectionnant cette option, la fenêtre représentée dans la Fig. 14 apparaît. Chacune des étapes de thermocyclage *Ramp* et *Plateau* est pourvue d'une icône de collecte de données (*Data Collection Icon*), qui visualise la collecte des données à ce temps donné de l'essai. Supprimer toutes les icônes en cliquant dessus, sauf celle correspondant au temps associé à l'étape *Annealing Extension (Stage2/Step2)*, afin d'éviter des mesures de fluorescence inutiles. Ceci permet de minimiser la durée totale et la quantité de données.

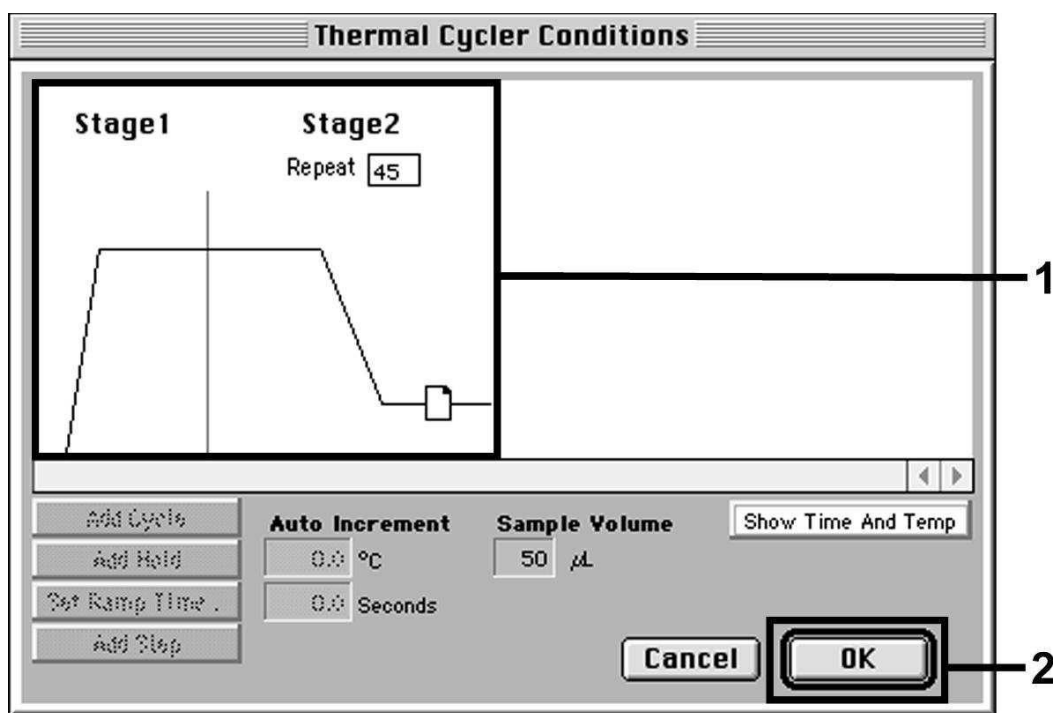


Fig. 14 : Collecte des données (*Data Collection*).

#### 8.5.2.5 Paramètres complémentaires importants

Pour paramétrer le temps d'exposition (excitation des marqueurs de fluorescence) et pour sélectionner les fichiers *Pure Spectra/Background*, passer de l'onglet *Setup* à l'onglet *Analysis*. Sélectionner l'option *Advanced Options*, à présent activée dans la commande *Diagnostics* du menu *Instrument*. Procéder aux paramétrages selon la Fig. 15. En désactivant la fonction *Spectra Components (Analysis)*, les fichiers de calibration actuels,

enregistrés dans le répertoire *Spectra Components* au moment de la génération des données, sont automatiquement utilisés lors d'une nouvelle interprétation de séries déjà analysées. Pour analyser des séries précédentes, en utilisant des *Spectra Components* nouvellement enregistrés, activer ces deux champs. Tenir compte du fait que lors d'une série de PCR avec l'*artus EBV TM PCR Kit*, il faut régler **ROX** comme référence passive (*Reference*). La distribution uniforme du marqueur ROX entre tous les mélanges réactionnels PCR d'un lot, en mélangeant bien l'*EBV RG/TM Master*, garantit la détection et le calcul des variations *tube-to-tube* (différences de fluorescence entre les différents mélanges réactionnels PCR) par le *Sequence Detection Software* (normalisation).

**Attention :** Lors de l'utilisation de plaques optiques 96 puits avec films adhésifs optiques (*Optical Adhesive Covers*) ou de tubes de réaction optiques avec bouchons plats, le temps d'exposition (*Exposure Time*) est de dix millisecondes. En cas d'utilisation de **tubes de réaction optiques avec bouchons bombés**, régler cette valeur de temps à **25 millisecondes**.

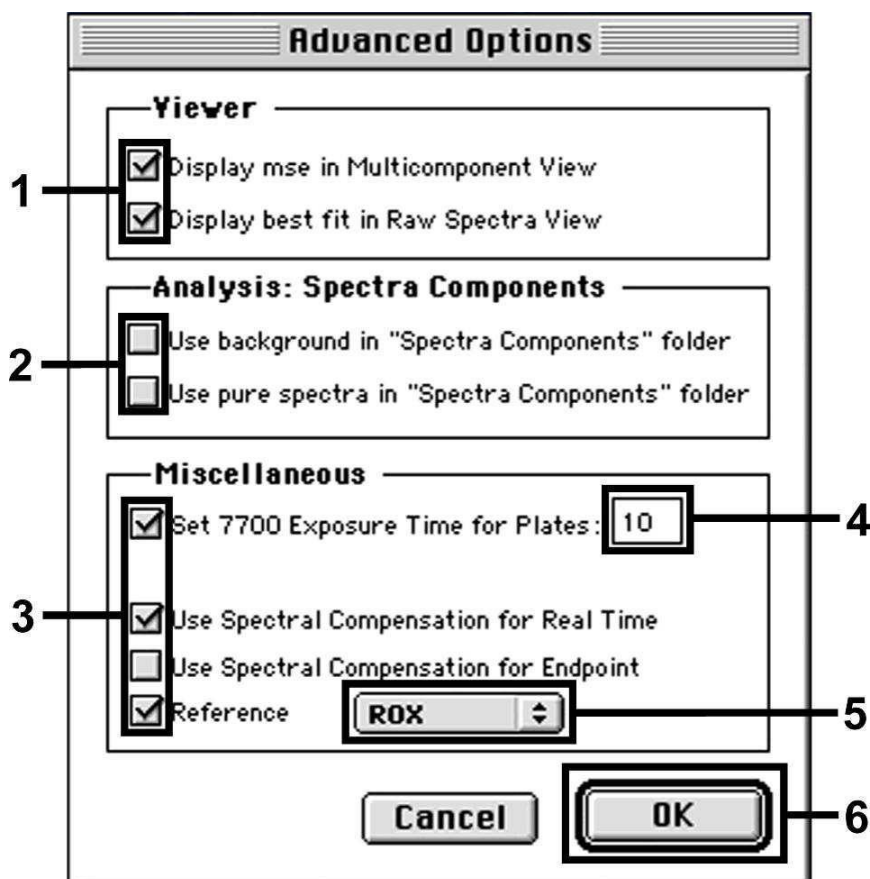


Fig. 15 : Paramètres complémentaires importants (*Advanced Options*).

### 8.5.2.6 Enregistrement de l'essai PCR

À cette étape, enregistrer les paramètres saisis (*Setup*) en tant que modèle, pour pouvoir les utiliser lors d'applications ultérieures, sous une forme identique ou modifiée. Pour ce faire, enregistrer le fichier sous *Stationary File Format*. Avant de démarrer l'essai PCR programmé actuellement, s'assurer d'enregistrer à nouveau celui-ci sous *Normal File Format*. Ceci permet de s'assurer de l'enregistrement des données accumulées au cours de la PCR.

### 8.5.2.7 Démarrage de l'essai PCR

Démarrer l'essai PCR en sélectionnant l'option *Run* du menu *Instrument* ou le champ *Run* de l'onglet *Analysis*.

### 8.5.3 Programmation de l'ABI PRISM 7900HT SDS

Pour détecter l'ADN d'EBV, créer un profil sur l'ABI PRISM 7900HT SDS, conformément aux six étapes suivantes (8.5.3.1 - 8.5.3.6). Toutes les indications font référence à la version 2.1 du logiciel ABI PRISM 7900HT SDS Software. Pour plus de détails sur la programmation de l'ABI PRISM 7900HT SDS, se reporter au manuel ABI PRISM 7900HT SDS User Guide.

Pour plus de clarté, les paramétrages à effectuer sont encadrés en noir dans les figures.

#### 8.5.3.1 Pré-paramétrages lors de la création d'un nouvel essai PCR

Dans le cas de l'ABI PRISM 7900HT SDS, sélectionner la commande *New* du menu *File* et définir les paramètres de base suivants pour le nouveau document (voir Fig. 16). Un modèle préalablement enregistré (ABI PRISM SDS Template Document [\*.sdf]) se trouve dans la liste *Template* ou peut être sélectionné à l'aide de la fonction *Browse* (voir 8.5.3.5 Enregistrement de l'essai PCR). Confirmer les indications (OK).

**Attention :** L'artus EBV TM PCR Kit ne peut pas être utilisé avec une plaque de format 384 puits de l'ABI PRISM 7900HT SDS.

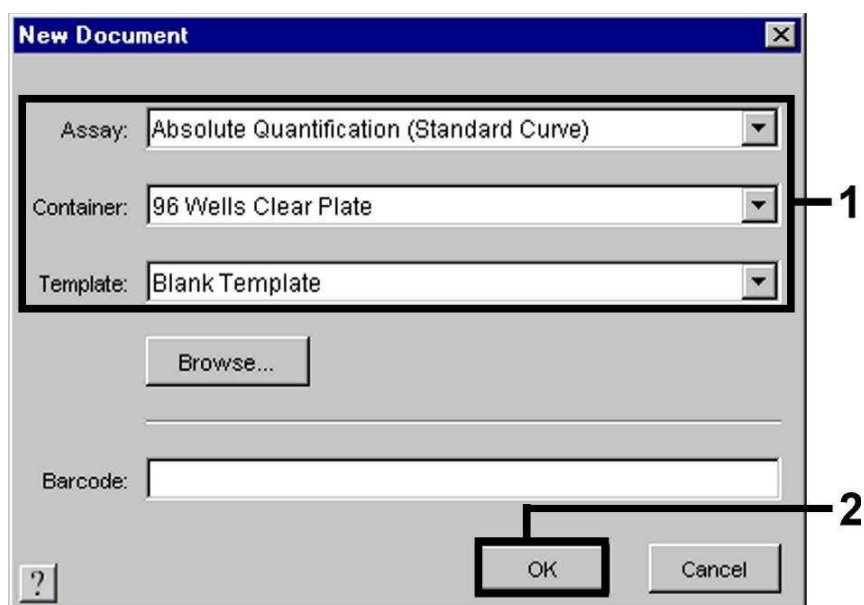


Fig. 16 : Pré-paramétrages lors de la création d'un nouvel essai PCR (New Document).

### 8.5.3.2 Création/Sélection des détecteurs

Le sous-menu *Detector Manager*, se trouvant sous *Tools* (ou en sélectionnant dans l'onglet *Setup* la fonction *Add Detector*), permet d'affecter au document les marqueurs de détection correspondants. Pour détecter l'ADN d'EBV ainsi que le *Contrôle interne* à l'aide de l'*artus EBV TM PCR Kit*, il faut définir les rapporteurs/quencher indiqués dans le tableau ci-dessous :

| Détection                             | Rapporteur | Quencher        |
|---------------------------------------|------------|-----------------|
| ADN d'EBV                             | FAM        | Non Fluorescent |
| <i>Contrôle interne (EBV RG/TMIC)</i> | VIC        | Non Fluorescent |

Pour créer ces détecteurs, sélectionner l'option *New* se trouvant en bas à gauche dans *Detector Manager*.

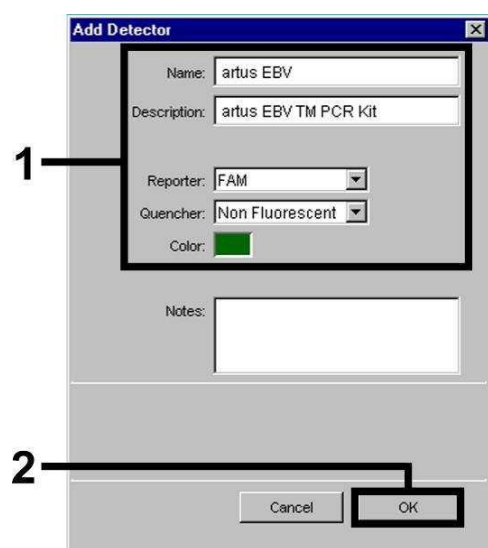


Fig. 17 : Création du détecteur spécifique à l'EBV (*DetectorManager*).

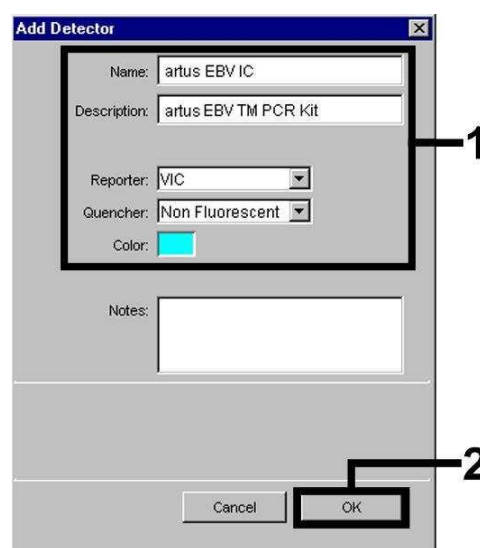


Fig. 18 : Création du détecteur spécifique au *Contrôle interne* (*Detector Manager*).



Dans la fenêtre apparaissant à présent, choisir (conformément aux Fig. 17 et Fig. 18) la combinaison rapporteur/quencher **FAM/Non Fluorescent** pour détecter l'ADN d'EBV. Pour détecter le *ContrÔle interne*, sélectionner la combinaison **VIC/Non Fluorescent**. En confirmant la saisie (OK), un retour est effectué au *Detector Manager*. Sélectionner les détecteurs venant d'être créés et transférer chaque sélection vers l'onglet *Setup*, en cliquant sur l'option *Copy to Plate Document* (voir Fig. 19). Fermer la fenêtre (*Done*).

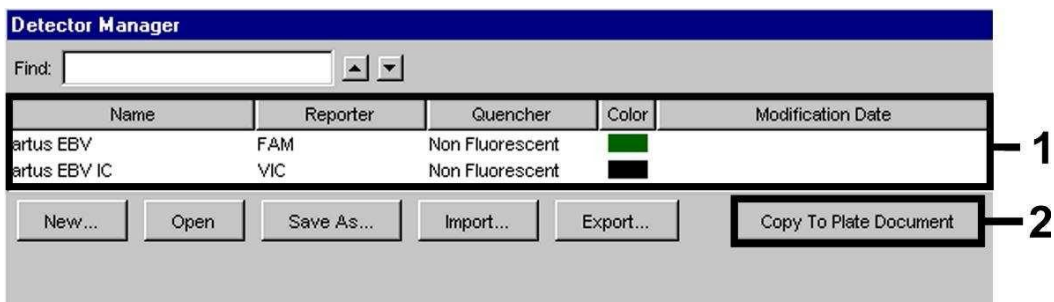


Fig. 19 : Sélection des détecteurs (*Detector Manager*).

### 8.5.3.3 Affectation des informations nécessaires aux positions de la plaque

Après avoir fermé le *Detector Manager* (*Done*), retrouver les détecteurs sélectionnés au parag. 8.5.3.2 dans l'onglet *Setup* (*Well Inspector*), représentés sous la forme d'un tableau (voir Fig. 20).

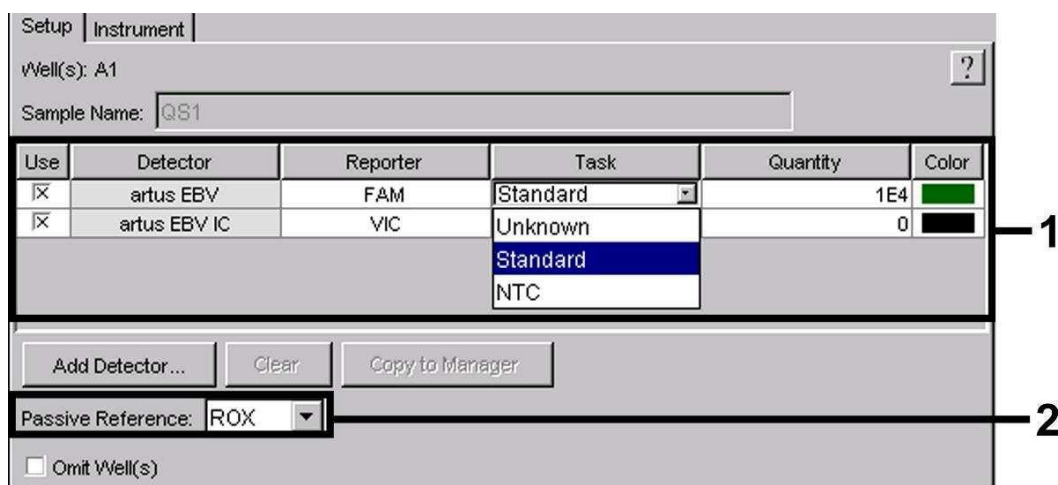


Fig. 20 : Affectation des informations nécessaires aux positions de la plaque.

Sélectionner les positions sur la plaque destinées à la détection de l'ADN d'EBV. Affecter les détecteurs sélectionnés à ces positions en cochant l'option *Use des deux détecteurs* par un simple clic. Une croix apparaît alors. Identifier les différents mélanges réactionnels, en sélectionnant leur position correspondante sur la plaque et en saisissant leur nom sous *Sample Name*. Tenir compte du fait que les mélanges possédant le même *Sample Name* et une affectation identique de détecteurs sont identifiés par le logiciel comme des doublons. Il calcule alors la moyenne des valeurs de leur charge virale. Puis, pour chaque type d'échantillon, sélectionner la fonction correspondante (*Task*) suivant le tableau ci-dessous :

| Type d'échantillon | Fonction ( <i>Task</i> ) | Concentration ( <i>Quantity</i> ) | Rapporteur | Quencher        |
|--------------------|--------------------------|-----------------------------------|------------|-----------------|
| Échantillon        | Unknown                  | -                                 | FAM        | Non Fluorescent |
| Contrôle négatif   | NTC                      | -                                 | FAM        | Non Fluorescent |
| Standard           | Standard                 | voir <b>1. Contenu</b>            | FAM        | Non Fluorescent |

Pour établir une courbe d'étalonnage, utiliser pour chaque essai PCR tous les *Standards de quantification* fournis (*EBV LC/RG/TM QS 1 - 4*) et saisir les concentrations (voir **1. Contenu**) correspondant à chaque standard (*Quantity*). Tenir compte du fait que lors d'une série de PCR avec l'*artus EBV TM PCR Kit*, il faut régler **ROX** comme référence passive (*Passive Reference*). La distribution uniforme du marqueur ROX entre tous les mélanges réactionnels PCR d'un lot, en mélangeant bien l'*EBV RG/TM Master*, garantit la détection et le calcul des variations *tube-to-tube* (différences de fluorescence entre les différents mélanges réactionnels PCR) par le *Sequence Detection Software* (normalisation).

#### 8.5.3.4 Création du profil de thermocyclage

Pour saisir le profil de thermocyclage, passer de l'onglet *Setup* à l'onglet *Instrument* du logiciel. Saisir, selon la Fig. 21, le profil de thermocyclage valable pour la détection de l'ADN d'EBV. Vérifier que le volume de réaction

est réglé à 50  $\mu$ l. L'option *9600 Emulation* doit être activée et les paramètres de temps *Ramp* et *Auto Increment* ne sont pas modifiés (*Ramp Time* : 0:00, *Auto Increment* : 0.0°C, 0.0 Seconds).

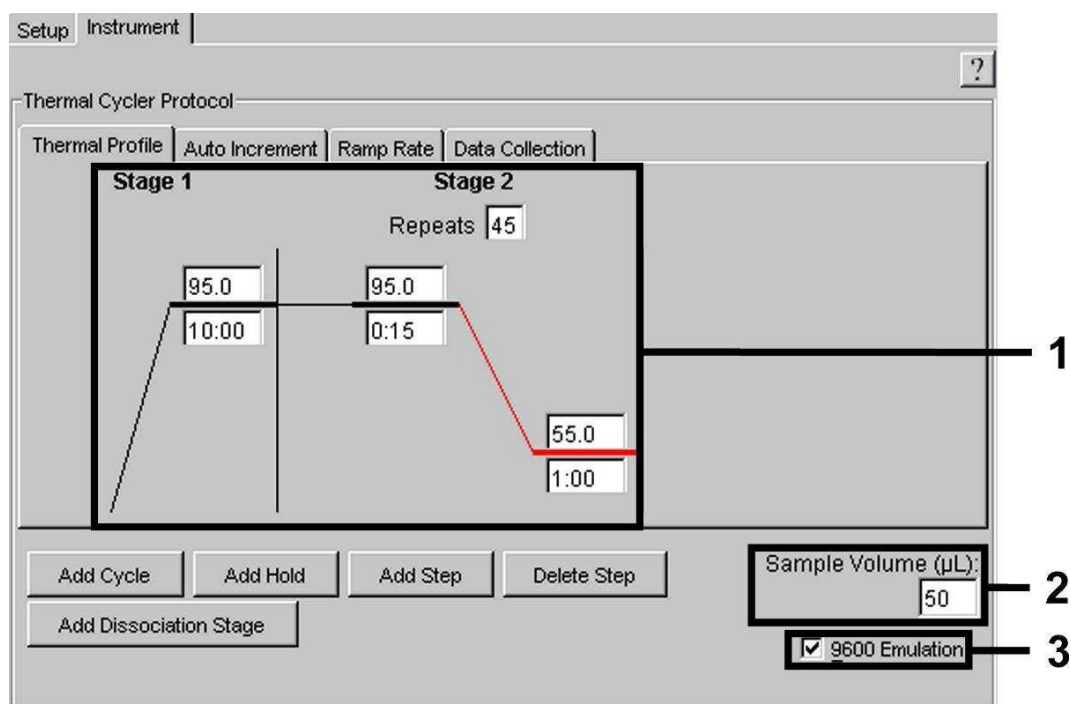


Fig. 21 : Création du profil de thermocyclage.

En outre, l'option *Data Collection* se trouve dans l'onglet *Instrument*. En sélectionnant cette option, la fenêtre représentée dans la Fig. 22 apparaît. Chacune des étapes de thermocyclage *Ramp* et *Plateau* est pourvue d'une icône de collecte de données (*Data Collection Icon*), qui visualise la collecte des données à ce temps donné de l'essai. Supprimer toutes les icônes en cliquant dessus, sauf celle correspondant au temps associé à l'étape *Annealing Extension (Stage2/Step2)*, afin d'éviter des mesures de fluorescence inutiles. Ceci permet de minimiser la durée totale et la quantité de données.

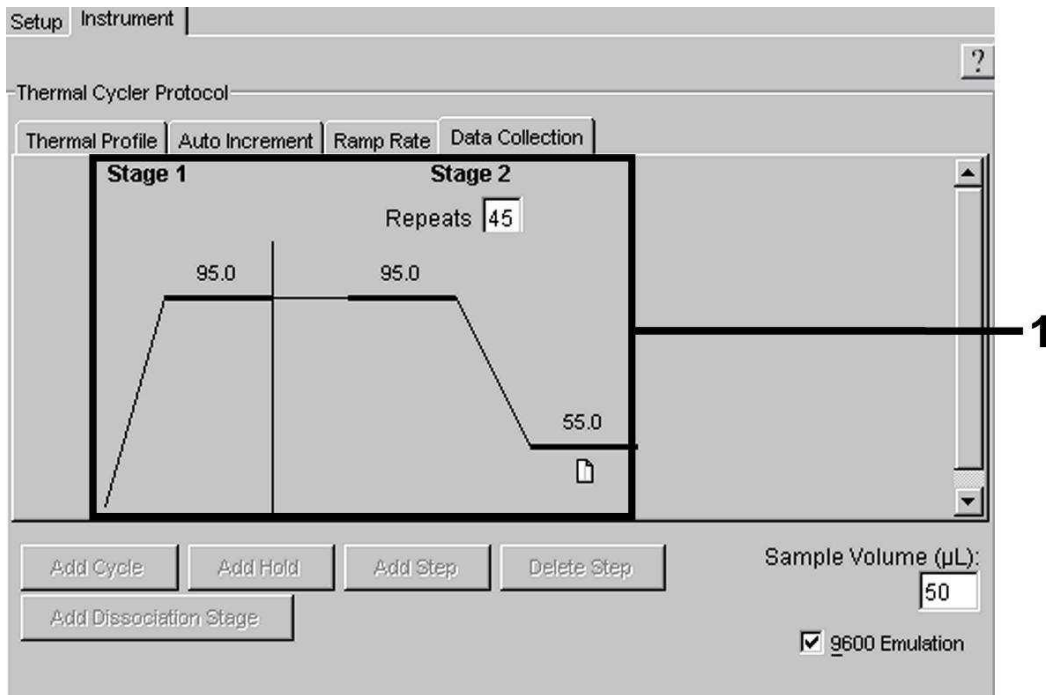


Fig. 22 : Collecte des données (Data Collection).

### 8.5.3.5 Enregistrement de l'essai PCR

À cette étape, enregistrer les paramètres saisis (*Setup*) en tant que modèle, pour pouvoir les utiliser lors d'applications ultérieures, sous une forme identique ou modifiée. En enregistrant les paramètres en tant qu'*ABI PRISM SDS Template Document (\*.sdt)* dans le répertoire *Template Directory* ([D :]\Program Files\Applied Biosystems\SDS 2.1\Templates, créé par Applied Biosystems), ce fichier peut être directement sélectionné à partir de la liste *Template* dans la fenêtre *New Document*. Les modèles sauvegardés dans d'autres répertoires doivent être ouverts à l'aide de la fonction *Browse*. Avant de démarrer l'essai PCR actuel, s'assurer d'enregistrer à nouveau celui-ci en tant qu'*ABI PRISM SDS Document (\*.sds)*. Ceci permet de s'assurer de l'enregistrement des données accumulées au cours de la PCR.

### 8.5.3.6 Démarrage de l'essai PCR

Démarrer l'essai PCR en sélectionnant l'option *Start* du menu *Instrument*.

## 9. Interprétation

Il est impératif de disposer d'une calibration valide des marqueurs (*Pure Spectra Component File*) et du bruit de fond (*Background Component File*) lors du démarrage des appareils. Ces fichiers de calibration sont requis pour calculer exactement les résultats de la manière suivante :

Tous les signaux d'interférence reliés aux appareils et influençant la mesure sont éliminés par le *Sequence Detection Software* des *ABI PRISM Sequence Detection Systems* à l'aide du *Background Component File*.

Par ailleurs, lors d'analyses multi-couleurs, des interférences apparaissent entre les spectres d'émission des différents marqueurs de fluorescence. Le logiciel de l'*ABI PRISM SDS* corrige ces interférences par une compensation avec les données du spectre des différents marqueurs, enregistrées dans le *Pure Spectra Component File*. Le logiciel procède également à l'aide des *Pure Spectra Components* à l'affectation des données de fluorescence, collectées au cours de la PCR pour l'ensemble du spectre mesurable, aux détecteurs programmés. Ensuite, les données de fluorescence des différents marqueurs ainsi déterminées sont divisées par le signal de la référence passive (ROX), pour compenser les variations *tube-to-tube* (différences de fluorescence entre les différents mélanges réactionnels PCR). Les signaux normalisés de cette manière peuvent être interprétés à l'aide de l'*Amplification Plot*.

Les fichiers de calibration, utilisés lors de l'analyse d'une série de PCR, sont enregistrés automatiquement lors de la sauvegarde. Si **aucun fichier de calibration** n'est installé, créer ces fichiers en respectant les instructions du manuel *ABI PRISM SDS User Guide/Manual*.

Si plusieurs trousse artus™ PCR ont été intégrées à l'essai PCR (**tenir compte du profil de thermocyclage**), s'assurer d'analyser ces dernières séparément. Les échantillons possédant une désignation (*Sample Name*) et

une affectation identique de détecteurs sont automatiquement identifiés par les logiciels *ABI PRISM 7000* et *7900HT SDS Software* comme des doublons. Ils calculent la moyenne des valeurs de leur charge virale.

Les résultats suivants peuvent se produire :

1. Un signal fluorescent FAM est détecté.

Le résultat de l'analyse est positif : l'échantillon contient l'ADN d'EBV.

Le cas échéant, la détection d'un signal fluorescent VIC (*Contrôle interne*) est négligeable, car les fortes concentrations en ADN d'EBV (signal fluorescent FAM positif) peuvent entraîner un signal fluorescent réduit, voire absent du *Contrôle interne* (inhibition par compétition).

2. Aucun signal fluorescent FAM n'est détecté. Simultanément, un signal fluorescent VIC (signal du *Contrôle interne*) apparaît.

Aucun ADN d'EBV ne peut être détecté dans l'échantillon. Il peut donc être considéré comme négatif.

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

3. On ne détecte ni un signal fluorescent FAM ni un signal fluorescent VIC.

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. 23/24 (*ABI PRISM 7000 SDS*), 25/26 (*ABI PRISM 7700 SDS*) et 27/28 (*ABI PRISM 7900HT SDS*).



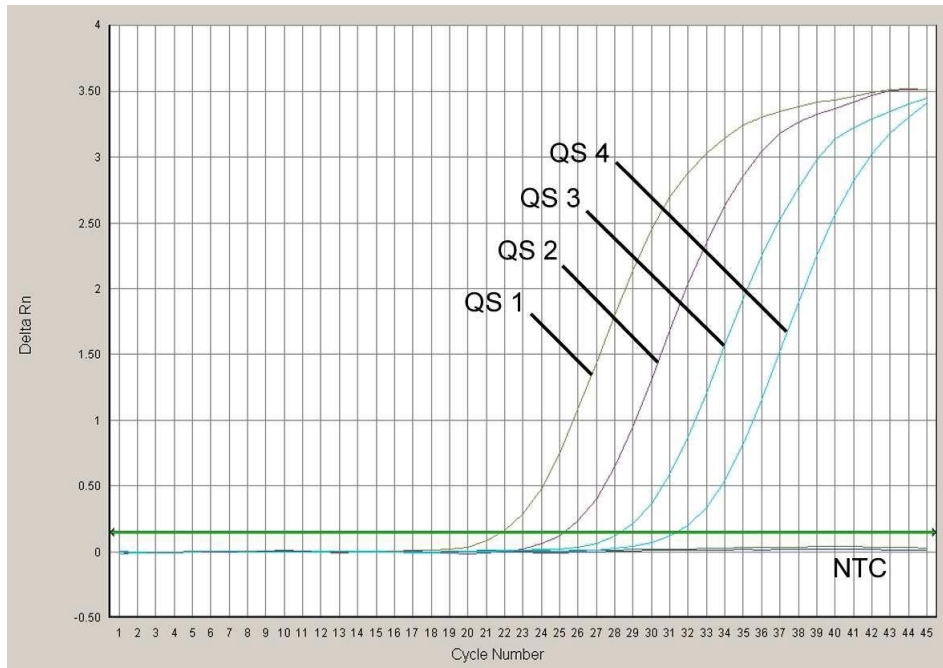


Fig. 23 : Détection des Standards de quantification (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4) par la détection d'un signal fluorescent FAM (ABI PRISM 7000 SDS). NTC : non-template control (contrôle négatif).

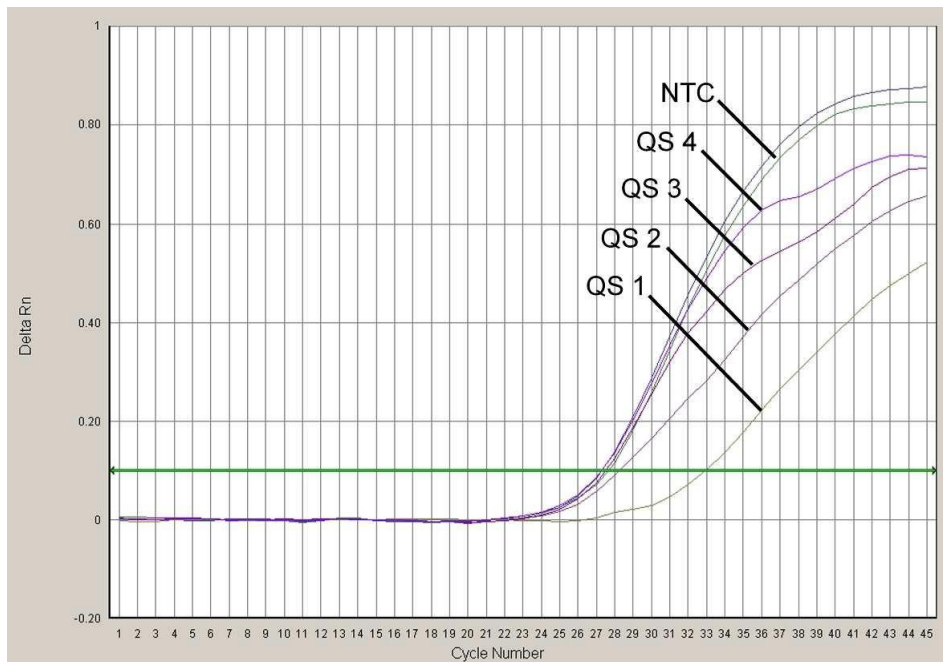


Fig. 24 : Détection du Contrôle interne (IC) par la détection d'un signal fluorescent VIC (ABI PRISM 7000 SDS) lors de l'amplification simultanée des Standards de quantification (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC : non-template control (contrôle négatif).



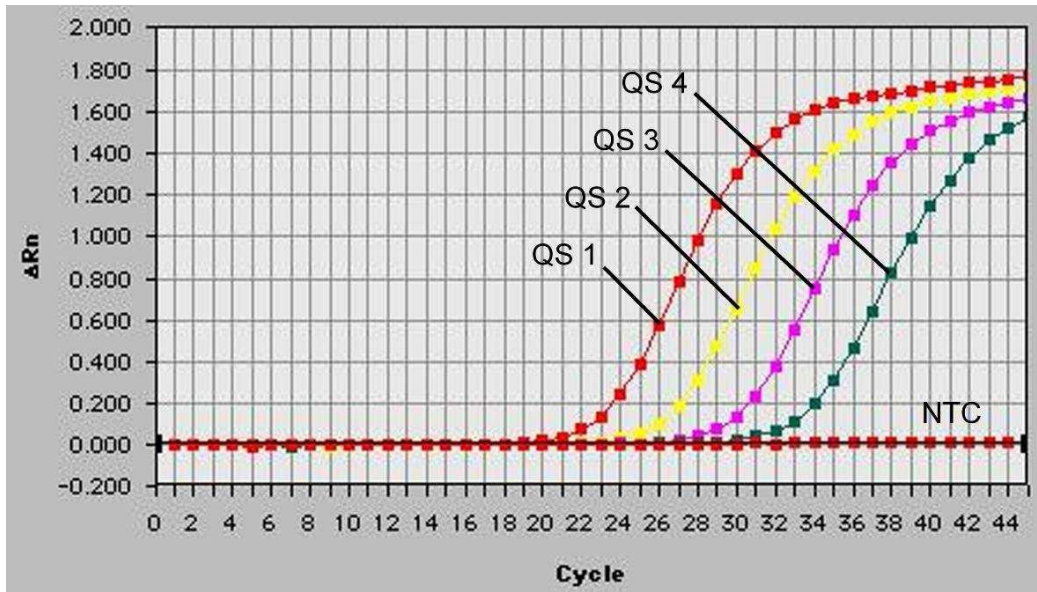


Fig. 25 : Détection des Standards de quantification (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4) par la détection d'un signal fluorescent FAM (ABI PRISM 7700 SDS). NTC : non-template control (contrôle négatif).

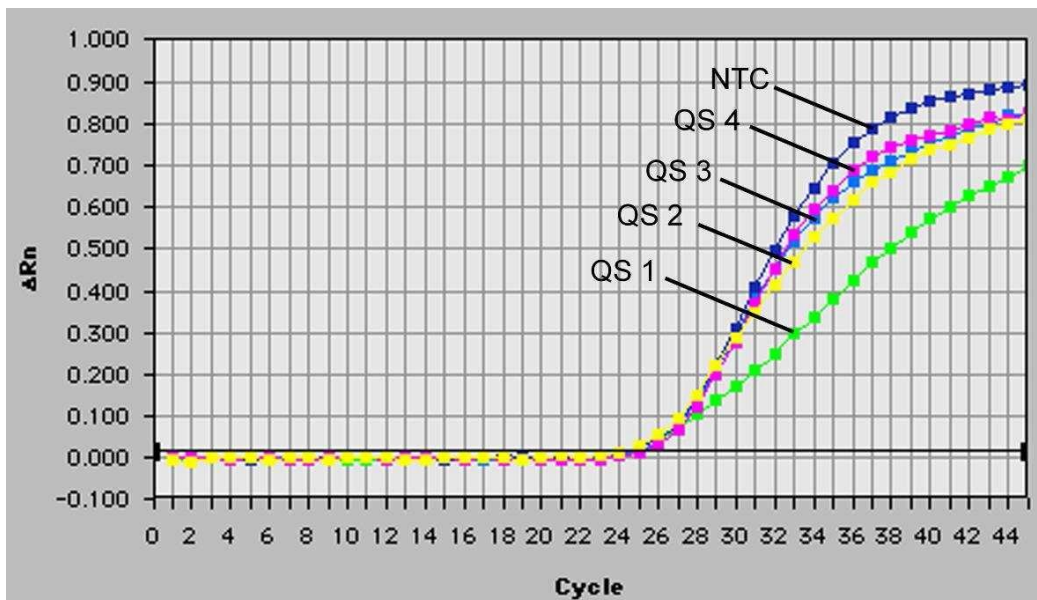


Fig. 26 : Détection du Contrôle interne (IC) par la détection d'un signal fluorescent VIC (ABI PRISM 7700 SDS) lors de l'amplification simultanée des Standards de quantification (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC : non-template control (contrôle négatif).

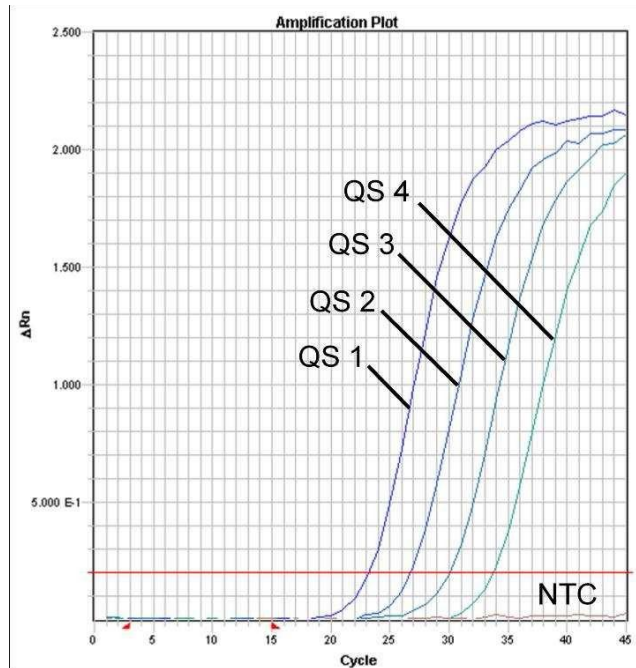


Fig. 27 : Détection des Standards de quantification (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4) par la détection d'un signal fluorescent FAM (ABI PRISM 7900HT SDS). NTC : non-template control (contrôle négatif).

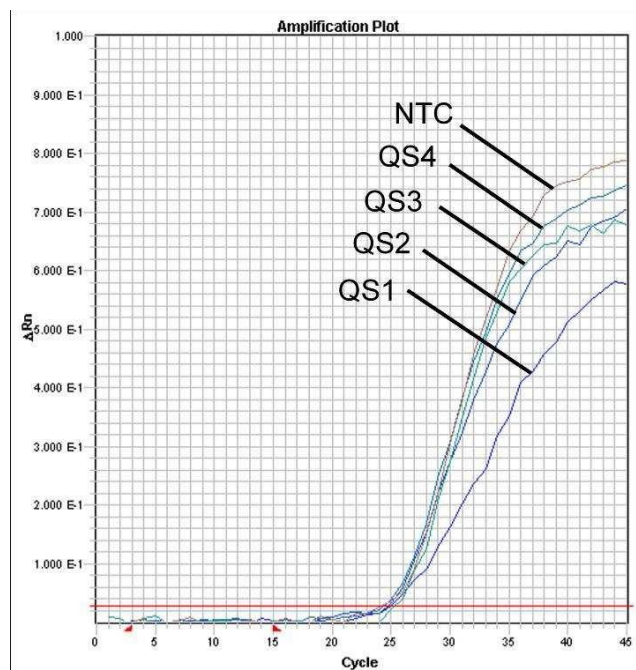


Fig. 28 : Détection du Contrôle interne (IC) par la détection d'un signal fluorescent VIC (ABI PRISM 7900HT SDS) lors de l'amplification simultanée des Standards de quantification (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC : non-template control (contrôle négatif).

## 10. Aide au dépannage

Aucun signal fluorescent FAM pour les contrôles positifs (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4):

- La sélection des marqueurs fluorescents pour l'analyse des données PCR n'est pas conforme aux directives du protocole.
  - ❖ Pour l'analyse des données, sélectionner le marqueur FAM pour la PCR analytique de l'EBV et le marqueur VIC pour la PCR du *Contrôle interne*.
- Le paramétrage des données utilisées pour l'analyse (*Extension Phase Data Extraction*), se trouvant sous *Options*, ne correspond pas à celui de la collecte de données *Data Collection* (pour ABI PRISM 7700 SDS voir **8.5.2.4 Création du profil de thermocyclage**, pour ABI PRISM 7900HT SDS voir **8.5.3.4 Création du profil de thermocyclage**).
  - ❖ Analyser l'essai PCR avec les paramètres corrigés et répéter l'interprétation (*Analysis*).
- Il y a une erreur de programmation du thermocyclage de l'ABI PRISM *Sequence Detection System*.
  - ❖ Comparer le profil de thermocyclage avec les directives du protocole (voir **8.5 Programmation de l'ABI PRISM® SDS**).
- Il y a une erreur de composition de la réaction PCR.
  - ❖ Vérifier les étapes de pipetage à l'aide du schéma de pipetage (voir **8.4 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 EBV TM 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* (signal fluorescent VIC) et absence simultanée de signal fluorescent FAM de la PCR

spécifique à l'EBV:

- 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 **8.1 Extraction de l'ADN**) est utilisé et respecter scrupuleusement les instructions du fabricant.
  - ❖ S'assurer que lors de l'extraction d'ADN, l'étape de centrifugation supplémentaire recommandée est effectuée avant l'élution pour éliminer complètement les résidus d'éthanol (voir **2. Extraction de l'ADN**).
- Il y a eu perte d'ADN 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'ADN au cours de l'extraction. S'assurer que l'un des kits d'extraction recommandés (voir **8.1 Extraction de l'ADN**) 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 EBV TM 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 du signal fluorescent FAM de la PCR analytique pour les contrôles négatifs.

- 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* EBV TM PCR Kit, une série de dilutions d'un standard a été effectuée de 50 jusqu'à 0,01 équivalents copie d'EBV\*/ $\mu$ l nominal. Celle-ci a ensuite été analysée en utilisant l'*artus* EBV TM PCR Kit avec les *ABI PRISM 7000*, *7700* et *7900HT Sequence Detection Systems*. Pour chaque appareil, les essais ont été exécutés sur trois jours différents à raison de huit séries par jour. Les résultats ont été déterminés à l'aide d'une analyse probit, représentée graphiquement (*ABI PRISM 7000 SDS*) à la Fig. 29.

| Limite de détection ( $p = 0,05$ ) |                     |
|------------------------------------|---------------------|
| <i>ABI PRISM 7000 SDS</i>          | 5,3 copies/ $\mu$ l |
| <i>ABI PRISM 7700 SDS</i>          | 1,4 copies/ $\mu$ l |
| <i>ABI PRISM 7900HT SDS</i>        | 0,7 copie/ $\mu$ l  |

Ceci signifie que 5,3 copies/ $\mu$ l (*ABI PRISM 7000 SDS*), 1,4 copies/ $\mu$ l (*ABI PRISM 7700 SDS*) ou 0,7 copie/ $\mu$ l (*ABI PRISM 7900HT SDS*) peuvent être détectées avec une probabilité de 95 %.

---

\* Le standard utilisé ici est un produit de PCR cloné, dont la concentration a été déterminée par spectroscopie d'absorbance et de fluorescence.

## Analyse probit : virus d'Epstein Barr (*ABI PRISM 7000 SDS*)

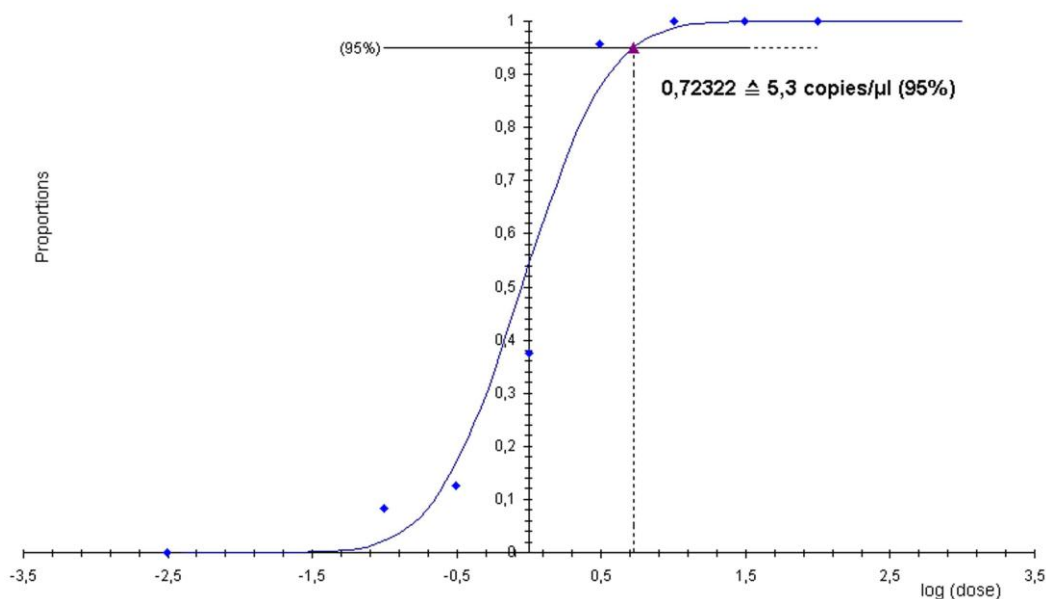


Fig. 29 : Sensibilité de l'artus EBV TM PCR Kit (*ABI PRISM 7000 SDS*).

## 11.2 Spécificité

La spécificité de l'artus EBV TM 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 homologies avec toutes les séquences représentées dans les banques génétiques. De cette façon, la détectabilité de tous les génotypes importants a également été contrôlée.

La validation de la spécificité a en outre été effectuée sur six échantillons différents de sérum, négatifs pour EBV, n'ayant généré aucun signal avec les amorces et les sondes spécifiques à l'EBV intégrées dans l'EBV RG/TM Master.

Pour déterminer la spécificité de l'artus EBV TM 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                                   | EBV (FAM) | Contrôle interne (IC) |
|---|-----------|-----------------------|
| Herpesvirus humain 1 (virus herpès simplex 1)     | -         | +                     |
| Herpesvirus humain 2 (virus herpès simplex 2)     | -         | +                     |
| Herpesvirus humain 3 (virus de la varicelle-zona) | -         | +                     |
| Herpesvirus humain 5 (cytomégalovirus)            | -         | +                     |
| Virus de la leucémie lymphoïde T humaine type 1   | -         | +                     |
| Virus de la leucémie lymphoïde T humaine type 2   | -         | +                     |

### 11.3 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 EBV TM PCR Kit ainsi qu'à une comparaison de performance avec d'autres produits.

### 11.4 Évaluation diagnostique

L'évaluation de l'artus EBV TM 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. Avertissements et précautions

Pour obtenir des informations relatives à la sécurité de l’*artus* EBV TM PCR Kit, consulter la fiche de données de sécurité correspondante (safety data sheets, SDS), disponible sur notre site Internet [www.qiagen.com/safety](http://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* EBV TM 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 |
|    | Code article international (GTIN)         |
|   | Kit contient des réactifs pour <N> tests  |
|  | Limites de température                    |
| <b>QS</b>   | <i>Standard de quantification</i>         |
| <b>IC</b>   | <i>Contrôle interne</i>                   |

artus EBV TM PCR Kit

Marques et clause de non-responsabilité

QIAGEN®, QIAamp®, artus®, BioRobot® EZ1®, UltraSens® (Groupe QIAGEN) ; ABI PRISM® ; MicroAmp®, GeneAmp® (Life Technologies Corporation).

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 EBV TM PCR Kit, la BioRobot EZ1 DSP Workstation et les EZ1 DSP Virus Kit et Card sont des instruments et trousse diagnostiques conformes au marquage CE selon la directive européenne 98/79/CE sur les dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. Ces produits ne sont pas disponibles 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.

© 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

