

Manuel du *artus*[®] Parvo B19 RG

PCR Kit



24 (n° de référence 4504263)

Diagnostics in vitro quantitatifs

Pour utilisation avec l'appareil *Rotor-Gene*[®] Q

Juillet 2018 – Version 1



4504263, 4504265



1112933 FR



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALLEMAGNE

R4

MAT

1112933 FR



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN est le premier fournisseur de technologies novatrices d'échantillonnage et de dosage permettant d'isoler et de détecter le contenu de n'importe quel échantillon biologique. Nos produits et services avancés de haute qualité garantissent le succès, de l'échantillon jusqu'au résultat.

QIAGEN fixe les normes en matière de :

- Purification d'ADN, d'ARN et de protéines
- Dosages d'acides nucléiques et de protéines
- Recherche micro-ARN et ARNi
- Automatisation des technologies d'échantillonnage et de dosage

Notre mission consiste à 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
2. Stockage	5
3. Matériel nécessaire et non fourni	6
4. Précautions générales	6
5. Utilisation prévue	6
6. Informations sur l'agent pathogène	7
7. Principe de la PCR en temps réel	7
8. Description du produit	8
9. Protocole	8
9.1 Extraction de l'ADN	8
9.2 Contrôle interne	11
9.3 Quantification	12
9.4 Préparation de la PCR	13
9.5 Programmer l'instrument Rotor-Gene Q	17
10. Analyse des données	21
11. Résolution des problèmes	23
12. Spécifications	25
12.1 Sensibilité analytique	25
12.2 Spécificité	26
12.3 Précision	27
12.4 Fiabilité	29
12.5 Reproductibilité	29
13. Limites d'utilisation	29
14. Avertissements et précautions	30

15. Contrôle de la qualité	30
16. Références	30
17. Symboles.....	31

artus Parvo B19 RG PCR Kit

À utiliser avec l'instrument Rotor-Gene Q.

1. Contenu

	Étiquettes et contenu	N° réf. 4504263 24 réactions
Bleu	<i>Parvo B19 RG/TM Master</i>	2 x 12 rxns
Rouge	<i>Parvo B19 RG/TM QS 1^{er} 1 x 10⁵ UI/μl</i>	1 x 200 μl
Rouge	<i>Parvo B19 RG/TM QS 2^e 1 x 10⁴ UI/μl</i>	1 x 200 μl
Rouge	<i>Parvo B19 RG/TM QS 3^e 1 x 10³ UI/μl</i>	1 x 200 μl
Rouge	<i>Parvo B19 RG/TM QS 4^e 1 x 10² UI/μl</i>	1 x 200 μl
Rouge	<i>Parvo B19 RG/TM QS 5^e 1 x 10¹ UI/μl</i>	1 x 200 μl
Vert	<i>Parvo B19 RG/TM IC^e</i>	1 x 1 000 μl
Blanc	<i>Eau (grade PCR)</i>	1 x 1 000 μl

QS = norme de quantification

IC = témoin interne

2. Stockage

Les composants du *artus Parvo B19 RG PCR Kit* doivent être stockés à une température de -15 °C à -30 °C et sont stables jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'étiquette. 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 $+4\text{ °C}$, 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 **section 9.1 Extraction de l'ADN**)
- Pipettes (réglables)
- Pointes de pipette stériles avec filtre
- Agitateur Vortex
- Micro-centrifugeuse avec rotor pour tubes de réaction de 2 ml
- *Appareil Rotor-Gene Q* avec logiciel version 2.3 ou supérieure
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, pour utilisation avec un rotor à 72 puits (référence 981103 ou 981106)
- Bloc de refroidissement (Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, n° réf. 9018901)

4. Précautions générales

L'utilisateur doit toujours faire attention aux éléments suivants :

- 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.
- Travailler rapidement dans de la glace ou dans le bloc réfrigérant (bloc de chargement pour rotor à 72 puits).

5. Utilisation prévue

Le *artus Parvo B19 RG PCR Kit* est un test d'amplification d'acide nucléique in vitro pour la détection et la quantification de l'ADN du parvovirus B19 dans le sérum humain ou le plasma EDTA. Le kit utilise l'amplification en chaîne par

polymérase (PCR) en temps réel et est configuré pour être utilisé avec le QIAamp UltraSens Virus Kit, le QIAamp DNA Mini Kit et l'instrument Rotor-Gene Q.

Le kit n'est pas conçu pour être utilisé comme test de dépistage de sang/produits sanguins pour l'infection au parvovirus B19. Le artus Parvo B19 RG PCR Kit est destiné à une utilisation pour le diagnostic in vitro par des professionnels de santé.

6. Informations sur l'agent pathogène

La plupart des infections à parvovirus B19 sont asymptomatiques au plan clinique. Les symptômes d'une infection aiguë à parvovirus B19 présentent des similitudes avec ceux de la grippe, mais ils peuvent également s'apparenter aux symptômes de la rubéole et, en particulier chez l'adulte, à ceux des rhumatismes. Chez les patients souffrant d'anémie hémolytique, le parvovirus B19 est souvent responsable de crises aplasiques. Des complications fœtales graves peuvent être observées chez la femme enceinte, en particulier en cas d'infections au cours des deuxième et troisième trimestres de grossesse.

7. 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. Dans la PCR en temps réel, le produit amplifié est décelé au moyen de fluorophores. 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 (c.-à-d. en temps réel) permet de détecter et de quantifier les produits amplifiés sans avoir à rouvrir les tubes de réaction après le cycle de PCR (Mackay, 2004).

8. Description du produit

Le *artus* Parvo B19 RG PCR Kit constitue un système prêt à l'emploi pour la détection de l'ADN du parvovirus B19 par le biais d'une amplification en chaîne par polymérase (PCR) dans l'*instrument Rotor-Gene Q*. Le *Parvo B19 RG/TM Master* contient des réactifs et des enzymes pour l'amplification spécifique d'un fragment de génome du parvovirus B19 de 76 bp et pour la détection directe de l'amplicon spécifique du canal de fluorescence Cycling A.Green (Cycle A vert) de l'*instrument Rotor-Gene Q*. En outre, le *artus* Parvo B19 RG PCR Kit contient un deuxième système d'amplification hétérologue permettant d'identifier une éventuelle inhibition de la PCR. Elle est détectée en tant que *contrôle interne (IC)* du canal de fluorescence Cycling A.Yellow (Cycle A jaune). Ceci n'a aucune influence négative sur la détection de la PCR analytique du parvovirus B19 (voir **section 12.1 Sensibilité analytique**). Les contrôles positifs externes (*Parvo B19 RG/TM QS 1–5*) fournis permettent de déterminer la charge de l'agent pathogène. Pour plus d'informations, veuillez vous référer à la **section 9.3 Quantification**.

9. Protocole

9.1 Extraction de l'ADN

Différents fabricants proposent des kits d'extraction d'ADN. Les quantités d'échantillons requises pour la procédure d'extraction de l'ADN dépendent du protocole utilisé. Veuillez effectuer l'extraction de l'ADN selon les recommandations du fabricant. Les kits d'extraction suivants sont recommandés :

Échantillon	Kit d'extraction d'acides nucléiques	Référence du catalogue	Fabricant	ARN entraîneur
Sérum, plasma	QIAamp® UltraSens® Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	inclus
	QIAamp DNA Mini Kit (50)	51 304	QIAGEN	non inclus

- 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. Si le kit d'extraction choisi ne contient pas d'ARN entraîneur, il est vivement recommandé d'ajouter un ARN entraîneur (RNA-Homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, référence 27-4110-01) pour extraire les acides nucléiques à partir de liquides corporels sans cellule et de matière contenant peu d'ADN/ARN (par ex. le LCR). Procéder alors selon les instructions suivantes :

- a) Remettre en suspension l'ARN entraîneur lyophilisé dans le tampon d'éluion (ne pas utiliser le tampon de lyse) du kit d'extraction (par ex., le tampon AE du QIAamp DNA Mini Kit) et diluer la solution à la concentration de 1 µg/µl. Répartir cette solution d'ARN entraîneur selon le nombre souhaité de fractions aliquotes et les stocker entre -15 °C et -30 °C. Éviter de répéter les étapes de congélation/décongélation (> 2 x) d'une fraction aliquote d'ARN.
- b) Utiliser 1 µg d'ARN entraîneur pour 100 µl de tampon de lyse. Si le protocole d'extraction prévoit par exemple 200 µl de tampon de lyse, ajouter 2 µl d'ARN entraîneur (1 µg/µl) 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 **section 9.2 Contrôle interne**) doit être fraîchement préparé selon le schéma de pipetage suivant :

Nombre d'échantillons	1	12
Tampon de lyse	par ex. 200 µl	par ex. 2 400 µl
ARN entraîneur (1 µg/µl)	2 µl	24 µl
Volume total	202 µl	2 424 µl
Volume par extraction	200 µl	200 µl chacune

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

- L'emploi d'un **ARN entraîneur** est d'une importance déterminante pour l'efficacité de l'extraction et par conséquent pour le rendement en ADN/ARN. Pour augmenter la stabilité de l'ARN entraîneur livré avec le QIAamp UltraSens Virus Kit, nous recommandons d'appliquer les instructions suivantes, qui diffèrent de celles décrites dans le manuel d'utilisation du kit d'extraction :
 - a. Remettre en suspension l'ARN entraîneur lyophilisé avant la première utilisation du kit d'extraction dans 310 µl de tampon d'éluion fourni avec le kit (concentration finale de 1 µg/µl, ne pas utiliser le tampon de lyse). Répartir cette solution d'ARN entraîneur selon le nombre souhaité de fractions aliquotes et les stocker entre -15 °C et -30 °C. Éviter de répéter les étapes de congélation/décongélation (> 2 x) d'une fraction aliquote d'ARN.
 - b. Avant le début de chaque extraction, un mélange de tampon de lyse et d'ARN entraîneur (et éventuellement de *contrôle interne*, voir **section 9.2 Contrôle interne**) doit être fraîchement préparé selon le schéma de pipetage suivant :

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

- c. Pour l'extraction, utiliser immédiatement le mélange de tampon de lyse et d'ARN entraîneur fraîchement préparé. Il n'est pas possible de conserver ce mélange.
- Il est recommandé d'éluier l'ADN dans 50 µl de tampon d'éluion pour bénéficier de la sensibilité maximale du *artus* Parvo B19 RG PCR Kit.
 - Le **QIAamp UltraSens Virus Kit** permet de concentrer l'échantillon. Si l'échantillon utilisé n'est ni du sérum ni du plasma, veuillez ajouter au moins 50 % (v/v) de plasma humain négatif à l'échantillon.

- Dans le cas d'extractions utilisant des tampons de lavage contenant de l'**éthanol**, veuillez effectuer une étape supplémentaire de centrifugation (trois minutes, 13 000 tr/min) avant l'élution, afin d'éliminer tout résidu d'éthanol. Cela permet de prévenir d'éventuelles inhibitions de la PCR.
- Le *artus* Parvo B19 RG PCR Kit ne convient pas aux procédés d'extraction à base de **phénol**.

Important : Le *contrôle interne* du *artus* Parvo B19 RG PCR Kit peut être utilisé directement dans la procédure d'extraction (voir **section 9.2 Contrôle interne**).

9.2 Contrôle interne

Un *contrôle interne* (*Parvo B19 RG/TM IC*) est fourni. Cela permet à l'utilisateur à **la fois de contrôler la procédure d'extraction de l'ADN et de vérifier une éventuelle inhibition de la PCR** (voir). 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. Par exemple, avec le QIAamp UltraSens Virus Kit, l'ADN est élué dans 50 µl de Buffer AVE. Il convient donc d'ajouter 5 µl de *contrôle interne* au départ. La quantité de *contrôle interne* utilisée dépend **uniquement** du volume d'élution. Le *contrôle interne* et l'ARN entraîneur (voir **section 9.1 Extraction de l'ADN**) doivent être ajoutés seulement

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

Le *contrôle interne* ne doit pas être ajouté directement à l'échantillon. En l'ajoutant au tampon de lyse, veuillez noter que le mélange de *contrôle interne* et de tampon de lyse/ARN entraîneur doit être préparé fraîchement et utilisé immédiatement (toute conservation du mélange à température ambiante ou au réfrigérateur, même pour quelques heures, peut altérer le *contrôle interne* et diminuer l'efficacité de l'extraction). **Ne pas** ajouter le *contrôle interne* et l'ARN entraîneur directement à l'échantillon.

Le *contrôle interne* peut éventuellement être utilisé **exclusivement pour vérifier une possible inhibition de la PCR** (voir). Pour cela, ajouter par réaction 2 µl de *contrôle interne* directement dans 30 µl de *Parvo B19 RG/TM Master*. Pour chaque réaction PCR, utiliser 30 µl de mélange réactionnel ainsi préparé* et ajouter ensuite 20 µl d'échantillon purifié. En cas de préparation d'un cycle de PCR sur plusieurs échantillons, augmenter le volume de *Parvo B19 RG/TM Master* et de *contrôle interne* en fonction du nombre d'échantillons (voir **section 9.4 Préparation de la PCR**).

9.3 Quantification

Les *normes de quantification* fournies (*Parvo B19 RG/TM QS 1 – 5*) doivent être manipulées comme des échantillons purifiés et utilisés avec le même volume (20 µl). Pour créer une courbe standard sur l'*instrument Rotor-Gene Q*, les cinq *normes de quantification* doivent être utilisées et définies comme normes dans la fenêtre de menu *Edit Samples* (Modifier échantillons) en spécifiant les concentrations (voir le manuel d'utilisation du *Rotor-Gene Q*. Cette courbe standard peut également être utilisée pour des quantifications ultérieures, si au moins une norme **d'une** concentration définie est utilisée dans le cycle en cours. Pour cela, il est nécessaire d'importer la courbe standard établie précédemment (voir le *manuel d'utilisation du Rotor-Gene Q (Rotor-Gene Q User Manual)*). Mais cette méthode de quantification peut engendrer des résultats irréguliers en raison de la variabilité entre différents cycles de PCR.

Attention : Les *normes de quantification* sont exprimées en UI/µl. L'équation suivante permet de convertir les valeurs déterminées à l'aide de la courbe standard en UI/ml d'échantillon :

$$\text{Résultat dans l'échantillon (UI/ml)} = \frac{\text{Résultat dans l'éluat (UI/µl) x volume d'éluat (µl)}}{\text{Volume d'échantillon (ml)}}$$

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

Veillez noter qu'en principe le volume initial de l'échantillon doit être saisi dans l'équation 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).

9.4 Préparation de la PCR

S'assurer que le bloc réfrigérant (accessoire du *Rotor-Gene Q instrument*) a été préalablement refroidi à +4 °C. Placer le nombre souhaité de tubes de PCR dans le bloc réfrigérant. S'assurer que chaque cycle de PCR contienne au moins une *norme de quantification* et un contrôle négatif (*eau, grade PCR*). Pour établir une courbe standard, utiliser toutes les *normes de quantification* (*Parvo B19 RG/TM QS 1 – 5*) à chaque cycle de PCR. Avant chaque utilisation, décongeler complètement tous les réactifs, les mélanger (aspirer et rejeter plusieurs fois à l'aide de la pipette ou agiter brièvement à l'aide d'un vortex) et les centrifuger brièvement.

Si vous souhaitez utiliser le *contrôle interne pour surveiller la procédure d'extraction d'ADN et déceler une éventuelle inhibition de la PCR*, ce contrôle a déjà été ajouté à la procédure d'extraction (voir **section 9.2 Contrôle interne**). Utiliser dans ce cas le tableau de pipetage suivant (voir également la représentation schématique à la) :

	Nombre d'échantillons	1	12
1. Préparation du mélange réactionnel	<i>Parvo B19 RG/TM Master</i>	30 µl	360 µl
	<i>Parvo B19 RG/TM IC</i>	0 µl	0 µl
	Volume total	30 µl	360 µl
2. Préparation de la réaction de PCR	Mélange réactionnel	30 µl	30 µl chacun
	Échantillon	20 µl	20 µl chacun
	Volume total	50 µl	50 µl chacun

Pour utiliser le *contrôle interne* **exclusivement pour mettre en évidence une éventuelle inhibition de la PCR**, l'ajouter directement au *Parvo B19 RG/TM Master*. Utiliser dans ce cas le tableau de pipetage suivant (voir également la représentation schématique à la) :

	Nombre d'échantillons	1	12
1. Préparation du mélange réactionnel	<i>Parvo B19 RG/TM Master</i>	30 µl	360 µl
	<i>Parvo B19 RG/TM IC</i>	2 µl	24 µl
	Volume total	32 µl*	384 µl
2. Préparation de la réaction de PCR	Mélange réactionnel	30 µl	30 µl chacun
	Échantillon	20 µl	20 µl chacun
	Volume total	50 µl	50 µl chacun

Pipeter 30 µl de mélange réactionnel dans chaque tube de PCR. Ajouter ensuite 20 µl d'ADN de l'échantillon élué à chaque tube et mélanger le tout convenablement en aspirant et rejetant le mélange plusieurs fois. De manière correspondante, il convient d'utiliser 20 µl d'au moins l'une des *normes de quantification (Parvo B19 RG/TM QS 1 – 5)* comme contrôle positif et 20 µl d'eau (*grade PCR*) comme contrôle négatif. Fermer les tubes de PCR. S'assurer que l'*anneau de blocage* (accessoire de l'*instrument Rotor-Gene Q*) soit placé en haut du rotor pour éviter que les tubes ne s'ouvrent accidentellement au cours du cycle.

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

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.

*Veuillez vous assurer que les solutions ont été complètement décongelées, bien mélangées et brièvement centrifugées.

Addition du *contrôle interne* au mélange *artus* Master

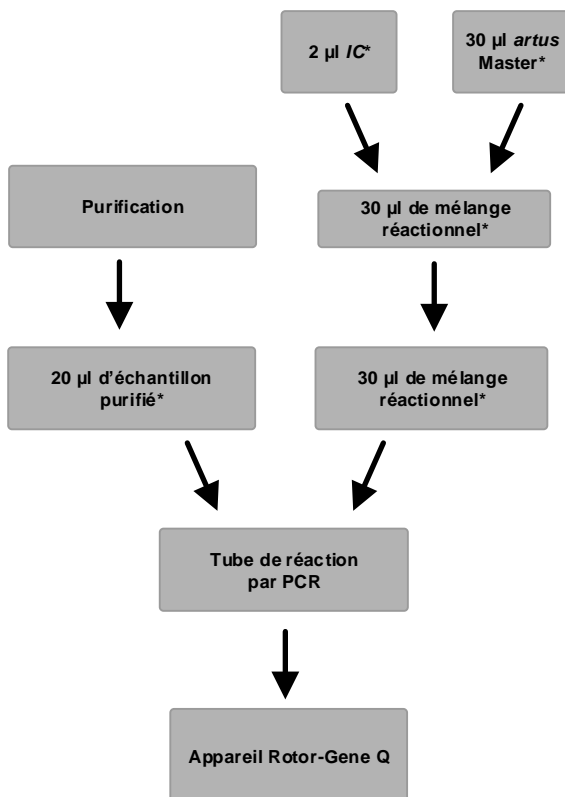


Fig. 2 : Processus d'addition du contrôle interne pour contrôler une éventuelle inhibition de la PCR.

*Veuillez vous assurer que les solutions ont été complètement décongelées, bien mélangées et brièvement centrifugées.

9.5 Programmer l'instrument Rotor-Gene Q

Pour détecter l'ADN du parvovirus B19, créer un profil de thermocyclage sur votre instrument Rotor-Gene Q selon les cinq étapes suivantes (voir Fig. 4 - 7).

- | | | |
|----|---|--------|
| A. | Définition des paramètres généraux d'analyse | Fig. 4 |
| B. | Activation initiale de l'enzyme Hot Start | Fig. 5 |
| C. | Amplification de l'ADN | Fig. 6 |
| D. | Ajustement de la sensibilité du canal de fluorescence | Fig. 7 |
| E. | Démarrage du cycle de l'instrument Rotor-Gene Q | Fig. 8 |

Toutes les spécifications font référence au logiciel Rotor-Gene version 2.3. Vous trouverez de plus amples informations sur la programmation de l'instrument Rotor-Gene Q dans le *manuel d'utilisation du Rotor-Gene Q*.

Sélectionner d'abord « Empty Run » (analyse vide) dans l'onglet Advanced (Avancé) de la boîte de dialogue « New Run » (Nouvelle analyse). Dans le panneau « Rotor Type » (Type de rotor), sélectionner « 72-Well Rotor » (Rotor 72 puits), cocher la case « Locking Ring Attached » (Anneau de blocage posé) et cliquer sur « Next » (Suivant).

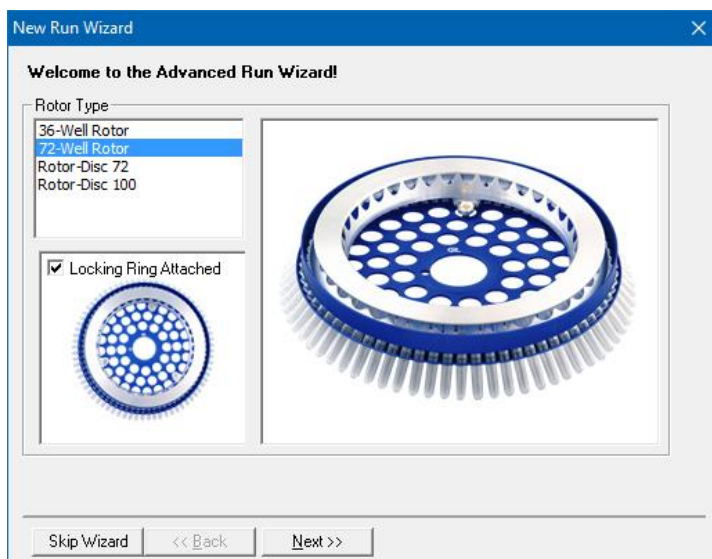


Fig. 3 : Écran d'accueil « New Run Wizard » (Assistant nouvelle analyse).

Puis saisir le volume de réaction de PCR dans la fenêtre de menu suivante *New Run Wizard* (Assistant nouvelle analyse) (voir Fig. 4).

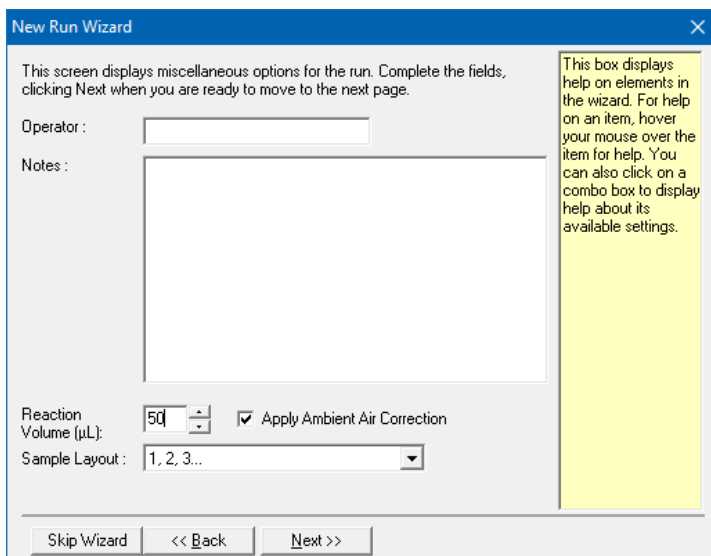


Fig. 4 : Définition des paramètres généraux d'analyse.

La programmation du profil de thermocyclage est effectuée en activant le bouton *Edit* (Modifier) dans la fenêtre de menu suivante *New Run Wizard* (Assistant nouvelle analyse) (voir Fig. 5 et 6).

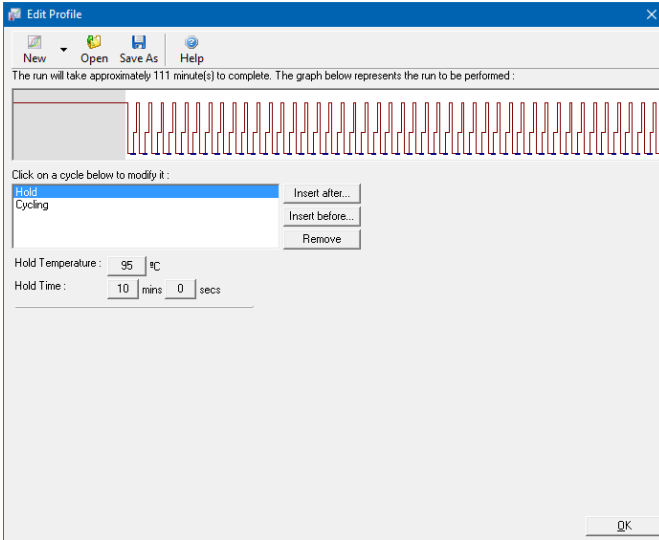


Fig. 5 : Activation initiale de l'enzyme Hot Start.

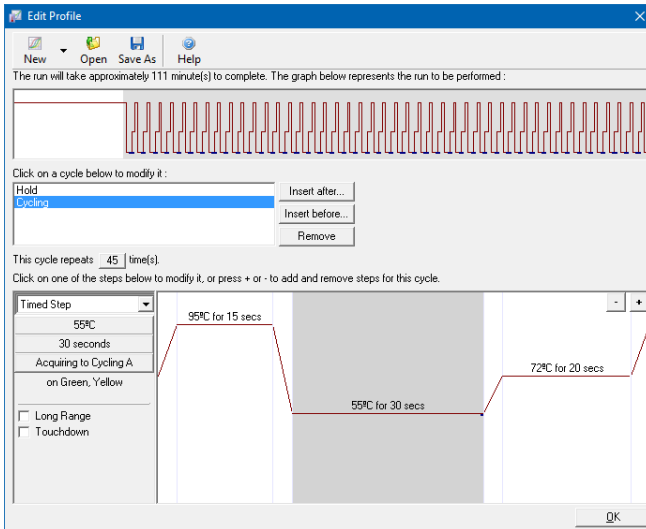


Fig. 6 : Amplification de l'ADN.

La plage de détection des canaux de fluorescence doit être déterminée selon les intensités de fluorescence des tubes de PCR. Cet ajustement est réalisé dans la fenêtre de menu *Auto Gain Optimisation Setup* (Réglage de l'optimisation du gain automatique) (activation dans la fenêtre de menu *New Run Wizard* (Assistant nouvelle analyse) sous *Gain Optimisation* (Optimisation du gain)). Veuillez régler la température de calibration sur la température d'hybridation du programme d'amplification (voir Fig. 7), sélectionner « *Optimise Acquiring* » (Optimiser l'acquisition) et démarrer la procédure.

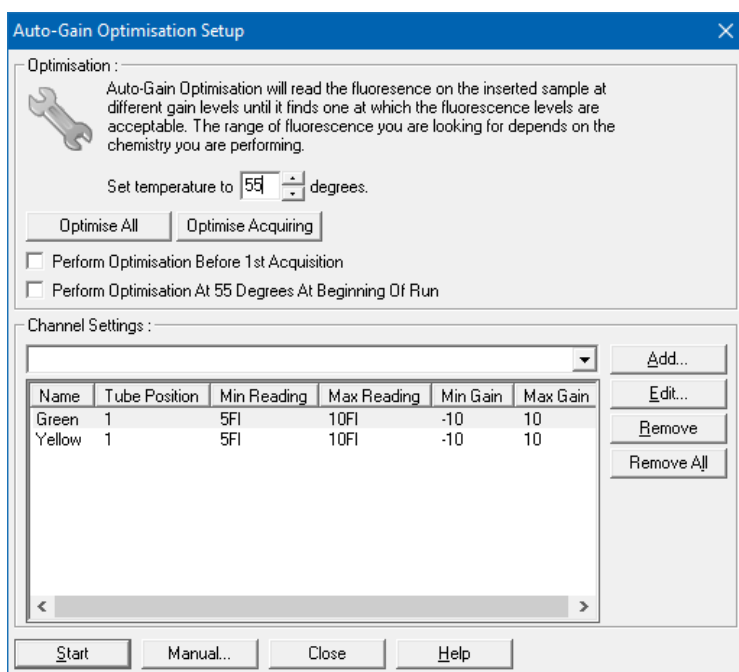


Fig. 7 : Ajustement de la sensibilité du canal de fluorescence.

Les valeurs de gain déterminées par l'optimisation du gain automatique sont automatiquement enregistrées et répertoriées dans la dernière fenêtre de menu de la procédure de programmation (voir Fig. 8).

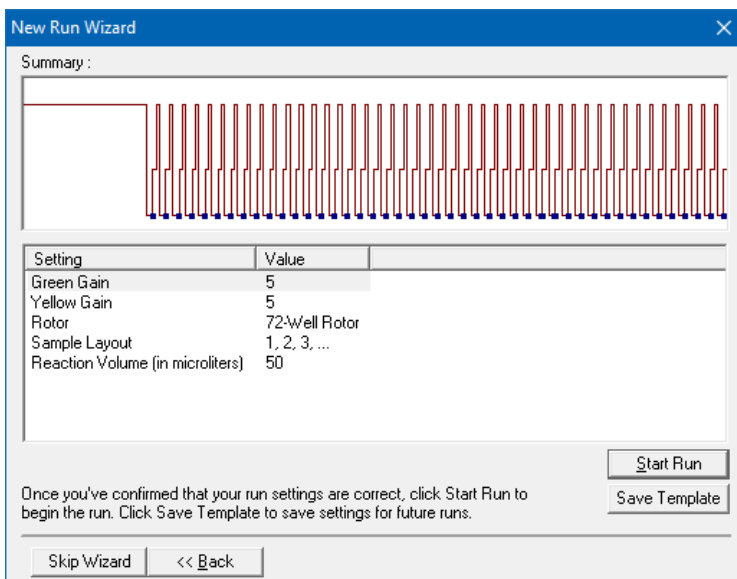


Fig. 8 : Démarrage du cycle de l'instrument Rotor-Gene Q.

10. Analyse des données

L'analyse des données est effectuée à l'aide du logiciel *Rotor-Gene* conformément aux instructions du fabricant (*manuel d'utilisation du Rotor-Gene*).

Les résultats suivants peuvent être obtenus :

1. Un signal est détecté dans le canal de fluorescence Cycling A.Green (Cycle A vert).

Le résultat de l'analyse est positif : L'échantillon contient de l'ADN du parvovirus B19.

Dans ce cas, la détection d'un signal dans le canal Cycling A.Yellow (Cycle A jaune) est superflue car de fortes concentrations initiales d'ADN du parvovirus B19 (signal positif du canal Cycling A.Green (Cycle A vert)) peuvent entraîner la réduction ou la disparition du signal de fluorescence du *contrôle interne* du canal Cycling A.Yellow (Cycle A jaune) (compétition).

2. Aucun signal n'est détecté dans le canal de fluorescence Cycling A.Green (Cycle A vert). Simultanément, un signal provenant du *contrôle interne* apparaît dans le canal Cycling A.Yellow (Cycle A jaune).

Aucun ADN du parvovirus B19 ne peut être détecté dans l'échantillon. Il peut donc être considéré comme négatif.

En cas de PCR négative pour le parvovirus B19, le signal détecté pour le *contrôle interne* exclut toute possibilité d'inhibition de la PCR.

3. Aucun signal n'est détecté dans les canaux Cycling A.Green (Cycle A vert) ou Cycling A.Yellow (Cycle A jaune).

Aucun résultat ne peut être établi.

Pour des informations sur les sources d'erreur et leurs solutions, voir **section 11. Résolution des problèmes.**

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

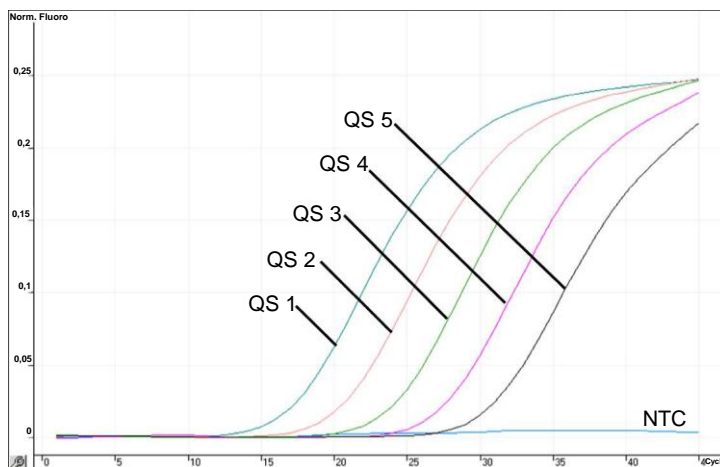


Fig. 9 : Détection des *normes de quantification (Parvo B19 RG/TM QS 1 – 5)* dans le canal de fluorescence Cycling A.Green (Cycle A vert). NTC : Contrôle sans matrice (contrôle négatif).

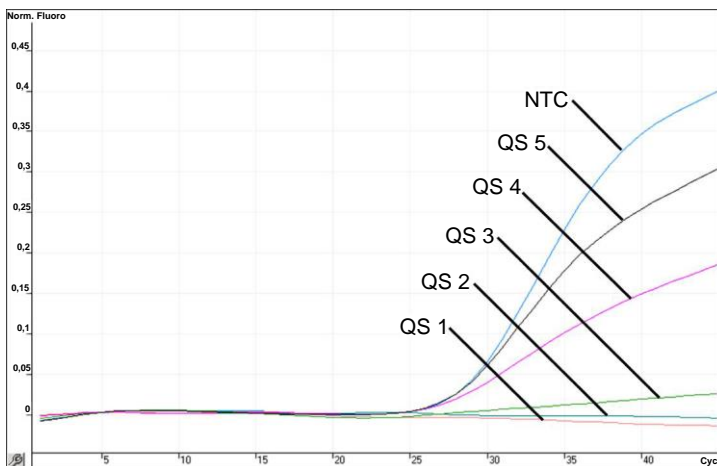


Fig. 10 : Détection du *contrôle interne* (IC) dans le canal de fluorescence Cycling A.Yellow (Cycle A jaune) avec amplification simultanée des *normes de quantification* (Parvo B19 RG/TM QS 1 – 5). NTC : contrôle sans matrice (contrôle négatif).

11. Résolution des problèmes

Pas de signal avec les contrôles positifs (Parvo B19 RG/TM QS 1 – 5) dans le canal de fluorescence Cycling A.Green (Cycle A vert) :

- Le canal de fluorescence sélectionné pour l'analyse des données de PCR ne respecte pas le protocole.
 - Pour l'analyse des données, sélectionner le canal de fluorescence A.Green pour la PCR analytique du parvovirus B19 et le canal de fluorescence A.Yellow pour la PCR du *contrôle interne*
- Mauvaise programmation du profil de température de l'*instrument Rotor-Gene Q*.
 - Comparer le profil de thermocyclage au protocole (voir **section 9.5 Programmer l'instrument Rotor-Gene Q**).

- Il y a une erreur de composition de la réaction PCR.
 - Vérifier les étapes de la procédure à l'aide d'un schéma de pipetage (voir **section 9.4 Préparation de la PCR**) et recommencer la PCR si nécessaire.
- Les conditions de stockage d'un ou plusieurs composants du kit ne respectaient pas les instructions fournies dans la **section 2. Stockage** ou la date de péremption du *artus* Parvo B19 RG PCR Kit a expiré.
 - Vérifier les conditions de conservation et 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.Yellow (Cycle A jaune) et absence simultanée de signal dans le canal Cycling A.Green (Cycle A vert) :

- Les conditions de PCR ne sont pas conformes au protocole.
 - Vérifier les conditions de PCR (voir ci-dessus) et si besoin, répéter la PCR avec les réglages corrigés.
- Il y a eu inhibition de la PCR.
 - S'assurer que l'un des kits d'extraction recommandés (voir **section 9.1 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'éluion pour éliminer complètement les résidus d'éthanol (voir **section 9.1 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 **section 9.1 Extraction de l'ADN**) est utilisé et respecter scrupuleusement les instructions du fabricant.
- Les conditions de stockage d'un ou plusieurs composants du kit ne respectaient pas les instructions fournies dans la **section 2. Stockage** ou la date de péremption du *artus* Parvo B19 RG PCR Kit a expiré.
 - Vérifier les conditions de conservation et la date de péremption des réactifs (voir l'étiquette du kit) et, si nécessaire, employer un nouveau kit.

Signaux avec les contrôles négatifs du canal de fluorescence Cycling A.Green (Cycle A vert) de la PCR analytique.

- Il y a eu contamination pendant la préparation de la PCR.
 - Répéter la PCR en double avec des réactifs encore non utilisés.
 - Si possible, fermer les tubes de PCR juste après l'addition de l'échantillon à tester.
 - 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.

12. Spécifications

12.1 Sensibilité analytique

Pour déterminer la limite de détection analytique du *artus* Parvo B19 RG PCR Kit, une série de dilutions d'une norme a été effectuée de 100 à 0,03 UI nominale de parvovirus B19*/ μl et analysée avec le *artus* Parvo B19 RG PCR Kit. 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. Une illustration graphique de l'analyse probit est présentée dans la Fig. 11. La limite de détection analytique du *artus* Parvo B19 RG PCR Kit est de 0,2 UI/ μl ($p = 0,05$). Cela signifie que 0,2 UI/ μl est détectée avec une probabilité de 95 %.

* La norme utilisée ici est un produit de PCR cloné, dont la concentration a été déterminée par spectroscopie d'absorption et de fluorescence.

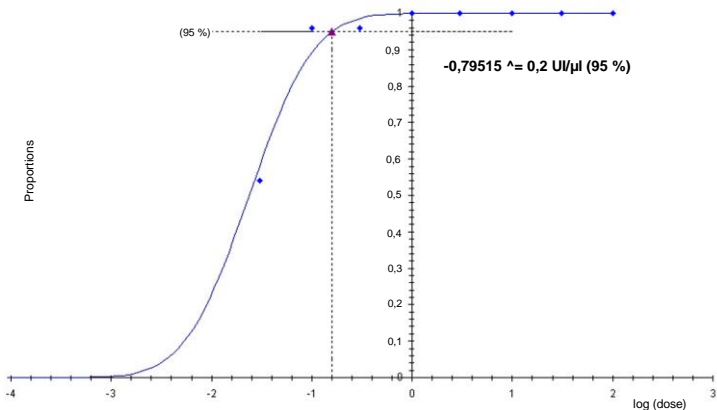


Fig. 11 : Sensibilité analytique du *artus Parvo B19 RG PCR Kit*.

12.2 Spécificité

La spécificité du *artus Parvo B19 RG PCR Kit* est garantie en premier lieu par la sélection des amorces et des sondes ainsi que de conditions de réaction strictes. Une analyse par comparaison de séquences des amorces et des sondes a été effectuée afin de rechercher d'éventuelles homologues avec toutes les séquences représentées dans les banques génétiques. De cette façon, la détectabilité de tous les génotypes importants a également été garantie.

De plus, la spécificité a été validée avec six échantillons de sérum différents négatifs pour le parvovirus B19. Ceux-ci n'ont généré aucun signal avec les amorces et les sondes spécifiques au parvovirus B19, intégrées au *Parvo B19 RG/TM Master*.

Pour déterminer la spécificité du *artus Parvo B19 RG PCR Kit*, le groupe contrôle indiqué dans le tableau suivant (voir Tableau 1) a été analysé pour rechercher une éventuelle réaction croisée. Aucun des agents pathogènes testés n'a été positif.

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

Groupe de contrôle	Parvovirus B19 (Cycling A.Green (Cycle A vert))	Contrôle interne (Cycling A.Yellow (Cycle A jaune))
Herpèsvirus humain 1 (virus herpès simplex 1)		
Herpèsvirus humain 2 (virus herpès simplex 2)		
Herpèsvirus humain 3 (virus varicelle-zona)		
Herpèsvirus humain 5 (cytomégalovirus)		
Virus humain de la leucémie à cellules T de type 1		
Virus humain de la leucémie à cellules T de type 2		

12.3 Précision

Les données de précision du *artus* Parvo B19 RG PCR Kit permettent de déterminer la variance totale du système. Cette variance totale est composée de la **variabilité intra-essai** (variabilité des résultats obtenus avec des échantillons de même concentration au sein du même essai), de la **variabilité inter-essai** (variabilité des résultats générés par différents appareils de même type utilisés par différentes personnes à l'intérieur d'un laboratoire) et la **variabilité inter-lot** (variabilité des différents lots utilisés). Les données obtenues ont été utilisées pour déterminer l'écart type, la variance et le coefficient de variation aussi bien pour la PCR spécifique à l'agent pathogène que pour la PCR du *contrôle interne*.

Les données de précision du *artus* Parvo B19 RG PCR Kit ont été recueillies à l'aide de la *norme de quantification* ayant la plus faible concentration (QS 5 ; 10 UI/µl). 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 : cycle de seuil, voir Tableau 2). En outre, les données de précision des résultats quantitatifs en UI/µl ont été établies à partir des valeurs Ct correspondantes (voir Tableau 3). Sur la base de ces résultats, la variance totale d'un échantillon de concentration donnée est donc de 1,66 % (Ct) ou 17,65 % (conc.), et pour la détection du

contrôle interne, de 0,90 % (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>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	0,22	0,05	0,75
Variabilité intra-essai : <i>Contrôle interne</i>	0,18	0,03	0,80
Variabilité inter-essai : <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	0,32	0,10	1,11
Variabilité inter-essai : <i>Contrôle interne</i>	0,19	0,03	0,84
Variabilité inter-lot : <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	0,38	0,14	1,47
Variabilité inter-lot : <i>Contrôle interne</i>	0,21	0,04	0,92
Variance totale : <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	0,48	0,23	1,66
Variance totale : <i>Contrôle interne</i>	0,20	0,04	0,90

Tableau 3 : Données de précision à partir des valeurs quantitatives (en UI/ μ l).

	Écart-type	Variance	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai : <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	0,96	0,93	9,58
Variabilité inter-essai : <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	1,33	1,78	13,22
Variabilité inter-lot : <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	2,27	5,17	22,20
Variance totale : <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	1,79	3,21	17,65

12.4 Fiabilité

La vérification de la fiabilité permet de déterminer le taux d'échec total du *artus* Parvo B19 RG PCR Kit. 30 échantillons de sérum négatifs pour le parvovirus B19 ont été inoculés avec 1 UI/μl d'ADN (volume d'éluion) de parvovirus B19 de contrôle (trois fois la concentration de la limite de sensibilité analytique). Après extraction avec le QIAamp DNA Mini Kit (voir **section 9.1 Extraction de l'ADN**), ces échantillons sont analysés avec le *artus* Parvo B19 RG PCR Kit. Le taux d'échec pour le parvovirus B19 était de 0 % pour la totalité des échantillons. En outre, la fiabilité du *contrôle interne* a été vérifiée par la procédure d'extraction et l'analyse de 30 échantillons de sérum négatifs pour le parvovirus B19. Le taux d'échec total était de 0 %. Aucune inhibition n'a été observée. La fiabilité du *artus* Parvo B19 RG PCR Kit est donc de ≥ 99 %.

12.5 Reproductibilité

Les données de reproductibilité sont fournies dans le but de procéder à une évaluation régulière de la performance du *artus* Parvo B19 RG PCR Kit et d'en comparer l'efficacité avec d'autres produits. Ces données proviennent de programmes d'étude de performance établis.

13. Limites d'utilisation

- Tous les réactifs ne peuvent être utilisés que dans le cadre de diagnostics *in vitro*.
- L'utilisation de ce produit est uniquement réservée à un personnel spécialement formé aux procédures de diagnostic *in vitro*.
- Pour obtenir des résultats de PCR optimaux, se conformer au manuel de l'utilisateur de manière rigoureuse.
- Il convient de porter une attention particulière aux dates limites d'utilisation imprimées sur la boîte et les étiquettes de tous les composants. Ne pas utiliser de composants périmés.

- Dans le cas de certaines séquences relatives au génotype 3, il n'est pas possible de garantir les performances annoncées. Des mutations dans la région de liaison amorce/sonde peuvent entraîner une diminution notable de la sensibilité (Baylis and Buchheit, 2009).
- Bien que rares, les mutations au sein des zones hautement conservées du génome viral traitées par les amorces et/ou la sonde du kit peuvent entraîner une sous-quantification ou un échec de la détection du virus dans ces cas-là. La validité et la performance du format d'analyse sont contrôlées à intervalles réguliers.

14. Avertissements et précautions

Lors de la manipulation de produits chimiques, porter systématiquement une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consultez les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Celles-ci sont disponibles en ligne dans un format PDF pratique et compact sur le site www.qiagen.com/safety répertoriant les FDS consultables et imprimables pour chaque kit QIAGEN® et pour chaque composant de kit.

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

15. Contrôle de la qualité

En accord avec le Quality Management System certifié ISO de QIAGEN, chaque lot du *artus* Parvo B19 RG PCR Kit a été testé conformément aux spécifications prédéterminées afin d'assurer une qualité constante du produit.

16. Références

Baylis SA, Buchheit KH. A proficiency testing study to evaluate laboratory performance for the detection of different genotypes of parvovirus B19. *Vox Sang.* 2009; 97 (1): 13 – 20.

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

17. Symboles



À utiliser avant



Code de lot



Fabricant



Référence du catalogue



Numéro de matériel



Manuel



Dispositif médical de diagnostic in vitro



Composants



Contient



Nombre



Code article international (Global Trade Item Number, GTIN)



<N>

Contient suffisamment de réactifs pour <N> tests



Limite de température



Consulter le mode d'emploi

QS

Norme de quantification

IC

Contrôle interne

artus Parvo B19 RG PCR Kit

Marques de commerce et clauses de responsabilité
QIAGEN®, QIAamp®, artus®, Rotor-Gene®, UltraSens® (groupe QIAGEN).

Historique des révisions du document	
R4 07/2018	Ceci est la révision 4 du manuel du artus Parvo RG PCR Kit. Les modifications par rapport à la version précédente incluent la clarification de l'usage prévu et la mise à jour de la description de l'instrument Rotor-Gene Q et du logiciel aux versions actuellement disponibles.

Les noms déposés, les marques commerciales, etc., cités dans ce document, même s'ils ne sont pas spécifiquement signalés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

Le artus Parvo B19 RG PCR Kit est un kit de diagnostic homologué CE conforme à la directive européenne 98/79/CE sur les diagnostics in vitro. Produit distribué dans certains pays uniquement.

Pour obtenir des informations actualisées et les clauses de non-responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN correspondant. Les manuels des kits et les manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès des services techniques QIAGEN ou de votre distributeur local.

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

Accord de licence limitée

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur du artus Parvo B19 RG PCR Kit consent aux termes suivants :

1. Le artus Parvo B19 RG PCR Kit ne doit être utilisé que conformément au manuel du artus Parvo B19 RG PCR Kit et uniquement avec les composants fournis à l'intérieur du kit. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce kit avec tout autre composant non fourni dans ce kit, à l'exception de ce qui est stipulé dans le manuel du artus Parvo B19 RG PCR Kit et autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com.
2. En dehors des licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou son ou ses utilisations ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce kit et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette notamment toutes les autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du kit consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les termes précédents. QIAGEN est susceptible de faire appliquer les interdictions de cet Accord de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais d'investigation et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application du présent Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

Pour consulter les mises à jour de la licence, voir le site www.qiagen.com.

www.qiagen.com

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1112933FR



Sample & Assay Technologies