

Manuel du kit *artus*[®] HSV-1/2 RG PCR

 24 (référence 4500263)

 96 (référence 4500265)

Version 1

IVD

Diagnostics *in vitro* qualitatifs

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

CE

REF

4500263, 4500265

HB

1060171FR



QIAGEN GmbH, QIAGEN Straße 1, 40724 Hilden,

ALEMAGNE

R2

MAT

1060171FR



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 ARN interférence;
- 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.

Contenu

Contenu du kit	4
Symboles	4
Stockage	5
Utilisation prévue	5
Limitations de l'utilisation du produit	6
Support technique	6
Contrôle qualité	6
Avertissements et précautions	7
Introduction	8
Principe	8
Informations sur le pathogène	8
Caractéristiques de performance	9
Sensibilité analytique	9
Spécificité	10
Précision	13
Robustesse	16
Reproductibilité	16
Équipement et réactifs devant être fournis par l'utilisateur	17
Remarques importantes	18
Précautions générales	18
Isolation d'ADN	18
Témoin interne	19
Protocole : PCR et analyse des données	20
<i>i</i> Remarques importantes avant de commencer	20
Avant de commencer	20
Procédure	20
Résolution des principaux problèmes rencontrés	31
Références	34
Pour commander	35

Contenu du kit

Kit <i>artus</i> ® HSV-1/2 RG PCR		(24)	(96)
Référence		4500263	4500265
Nombre de réactions		24	96
Bleu	HSV-1/2 RG Master	2 x 300 µl	8 x 300 µl
Jaune	HSV-1/2 RG Mg-Sol* Mg-S	600 µl	600 µl
Rouge	HSV-1 RG PC† (100 cop/µl)	200 µl	200 µl
Marron	HSV-2 RG PC† (100 cop/µl)	200 µl	200 µl
Vert	HSV-1/2 RG IC‡ IC	1000 µl	2 x 1000 µl
Blanc	Water (PCR grade)	1000 µl	1000 µl
	Manuel 	1	1

* Solution de magnésium.

† Témoin positif.

‡Témoin interne.

Symboles



<N>

Kit contient des réactifs pour <N> tests



A utiliser avant



Dispositif médical de diagnostic *in vitro*



Référence










Numéro de lot



Numéro de la substance



Composants


	Contient
	Nombre
	Code article international (GTIN)
	Limitations de température
	Fabricant légal
	Se reporter au manuel
	Remarque importante

Stockage

Les composants du kit *artus* HSV-1/2 RG PCR doivent être stockés entre –15 et –30 °C et sont stables jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'étiquette. Il faut éviter la congélation-décongélation répétée (>2 x), car elle peut amoindrir la sensibilité du test. En cas d'utilisation occasionnelle, congeler les réactifs en aliquotes. Si les composants doivent être stockés entre 2 et 8 °C, la période de conservation ne doit pas dépasser 5 heures.

Utilisation prévue

Le kit *artus* HSV-1/2 RG PCR est un test par amplification en chaîne par polymérase (PCR) en temps réel pour la détection et la discrimination de l'ADN du virus humain herpès simplex de type 1 et 2 sur les appareils Rotor-Gene Q après purification entièrement automatisée d'échantillons de liquide céphalorachidien (LCR) prélevés à partir de personnes infectées par le HSV au moyen du kit EZ1[®] DSP Virus.

 Le kit *artus* HSV-1/2 RG PCR ne peut pas être utilisé avec les appareils Rotor-Gene Q 2plex.

Le kit *artus* HSV-1/2 RG PCR est à utiliser en association avec une présentation clinique et d'autres marqueurs de laboratoire pour établir le pronostic de la maladie.

Limitations de l'utilisation du produit

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

L'utilisation de ce produit est réservée à un personnel spécialement formé aux procédures de diagnostic *in vitro* (EN375).

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

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

Support technique

Chez QIAGEN, nous sommes fiers de la qualité et de la disponibilité de notre support technique. Nos départements du service technique sont composés de scientifiques expérimentés bénéficiant d'un vaste savoir-faire pratique et théorique en ce qui concerne les technologies d'échantillons et d'analyses et l'utilisation des produits QIAGEN®. N'hésitez pas à nous contacter si vous avez des questions ou rencontrez des difficultés concernant le kit *artus* HSV-1/2 RG PCR ou les produits QIAGEN en général.

Les clients de QIAGEN constituent une source d'informations majeure relative aux utilisations avancées ou spécialisées de nos produits. Ces informations sont utiles à d'autres scientifiques ainsi qu'aux chercheurs de chez QIAGEN. Par conséquent, ne pas hésiter à nous contacter pour toute suggestion concernant la performance des produits ou de nouvelles applications et techniques.

Pour le support technique et plus d'informations, consulter notre Centre de support technique à l'adresse www.qiagen.com/Support ou appeler l'un des services techniques de QIAGEN ou des distributeurs locaux (voir quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).

Contrôle qualité

En accord avec le Quality Management System QIAGEN certifié ISO, chaque lot du kit *artus* HSV-1/2 RG PCR a été testé conformément aux spécifications prédéterminées afin d'assurer une qualité constante du produit.

Avertissements et précautions

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

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

Introduction

Le kit *artus* HSV-1/2 RG PCR est un système prêt à l'emploi pour la détection de l'ADN du HSV-1 et du HSV-2 par le biais d'une amplification en chaîne par polymérase (PCR) sur les appareils Rotor-Gene Q. Le HSV-1/2 RG Master contient des réactifs et des enzymes pour l'amplification spécifique d'un fragment de génome du HSV-1 et du HSV-2 de 154 bp et pour la détection directe de l'amplicon spécifique dans le canal de fluorescence Cycling Green (source 470 nm, détecteur 510 nm) et Cycling Orange (source 585 nm, détecteur 610 nm) des appareils Rotor-Gene Q.

En outre, le kit *artus* HSV-1/2 RG PCR contient un deuxième système d'amplification hétérologue permettant d'identifier une éventuelle inhibition de la PCR. Elle est détectée en tant que témoin interne (IC) dans le canal de fluorescence Cycling Yellow (source 530 nm, détecteur 555 nm) des appareils Rotor-Gene Q. Ceci n'a aucune influence négative sur la limite de détection de la PCR analytique du HSV-1/2 (voir « Sensibilité analytique », page 9). Les témoins positifs externes (HSV-1 RG PC et HSV-2 RG PC) sont fournis.

Principe

Lors du diagnostic par amplification en chaîne par polymérase (PCR), des régions spécifiques du génome pathogène sont amplifiées. La détection a lieu à l'aide de marqueurs fluorescents au cours de la PCR en temps réel. Ceux-ci sont généralement couplés à des sondes oligonucléotidiques, qui se lient spécifiquement à l'amplicon de la PCR. La détection des intensités de fluorescence durant la PCR en temps réel permet de détecter et de quantifier les produits amplifiés sans avoir à rouvrir les tubes d'échantillon après la PCR.*

Informations sur le pathogène

Le virus herpès simplex (HSV) se retrouve dans la fraction liquide des lésions, dans la salive et les sécrétions vaginales. Il se transmet par contact direct avec les lésions ainsi que par voie sexuelle et périnatale. Dans une majeure partie des infections à HSV, le tableau clinique dominant est celui de la formation de lésions sur la peau et au niveau des muqueuses (bouche et appareil génital). L'infection à HSV peut survenir en tant que primo-infection (asymptomatique dans > 90 % des cas) ou qu'infection récurrente (secondaire). Parmi les primo-infections dues au HSV-1 figurent la gingivostomatite, l'eczéma herpétique, la kératoconjonctivite et l'encéphalite. Les formes prises par la primo-infection à HSV-2 comprennent notamment la vulvovaginite, la méningite et l'herpès généralisé du nouveau-né. La récurrence de l'infection à HSV entraîne

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

principalement la formation de lésions cutanées autour du nez, des lèvres et dans la région génitale. Les formes plus sévères sont la kératoconjonctivite récidivante et la méningite.

Caractéristiques de performance

Sensibilité analytique

Pour déterminer la sensibilité analytique du kit *artus* HSV-1/2 RG PCR, une gamme standard de dilutions a été effectuée de 10 à 0,001 copies/ μ l et analysée sur Rotor-Gene Q/6000 associé au kit *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit. Les essais ont été effectués sur 3 jours différents à raison de 8 séries par jour. Le résultat a été déterminé par analyse probit. La limite de détection analytique du kit *artus* HSV-1/2 RG PCR associé à Rotor-Gene Q/6000 se situe donc à 0,12 copie/ μ l ($p = 0,05$) pour HSV-1 et à 0,16 copies/ μ l ($p=0,05$) pour HSV-2. Cela signifie que 0,12 copie/ μ l d'ADN d'HSV-1 ou 0,16 copie/ μ l d'ADN d'HSV-2 peut être détectée avec une probabilité de 95 %. Une représentation graphique de l'analyse probit d'HSV-1 est présentée en Figure 1 ci-dessous; le diagramme de l'analyse probit d'HSV-2 est présenté en Figure 2.

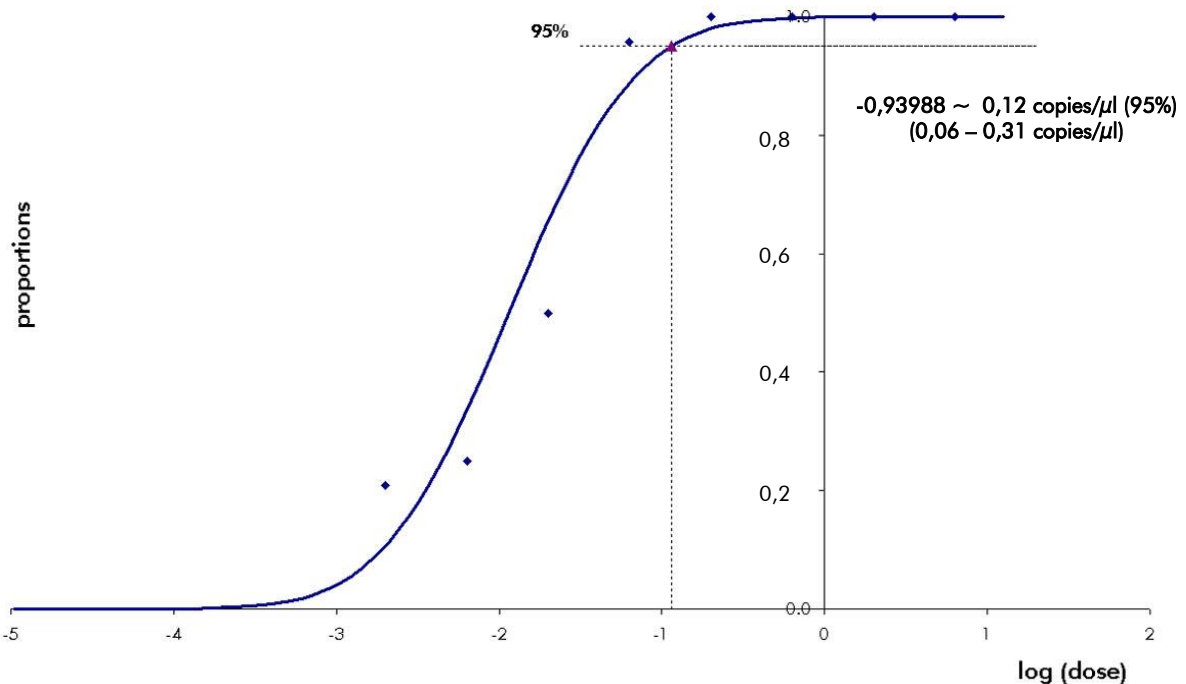


Figure 1. Analyse probit : HSV-1 (Rotor-Gene Q/6000). Sensibilité analytique d'HSV-1 avec le kit *artus* HSV-1/2 RG PCR sur Rotor-Gene Q/6000.

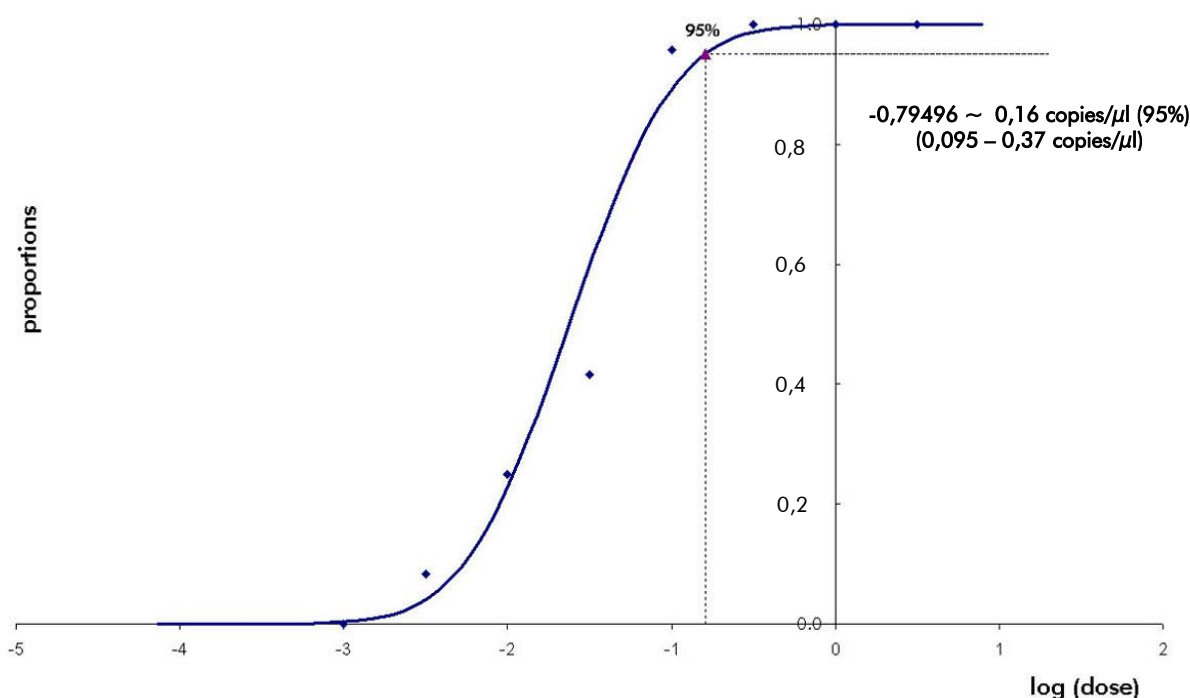


Figure 2. Analyse probit : HSV-2 (Rotor-Gene Q/6000). Sensibilité analytique d'HSV-2 avec le kit *artus* HSV-1/2 RG PCR sur Rotor-Gene Q/6000.

Spécificité

La spécificité du kit *artus* HSV-1/2 PCR est garantie en premier lieu par la sélection des amorces et des sondes ainsi que par 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 garantie par alignement de la base de données et par cycle de PCR sur les appareils Rotor-Gene avec les souches répertoriées dans le tableau 1.

La validation de la spécificité a en outre été effectuée avec 30 échantillons différents de LCR, négatifs pour HSV-1 et HSV-2, n'ayant généré aucun signal avec les amorces et les sondes spécifiques à l'HSV-1 et à l'HSV-2 intégrées dans l'HSV-1/2 RG Master.

Pour déterminer la spécificité du kit *artus* HSV-1/2 RG PCR, le groupe témoin indiqué dans le Tableau 2 a été analysé pour rechercher une éventuelle réaction croisée. Aucun des agents pathogènes analysés n'a été positif.

Tableau 1. Test de la spécificité des géotypes importants

Virus	Souche	Source	HSV-1 (Cycling Green)	HSV-2 (Cycling Green)	Témoin interne (Cycling Yellow)
HSV-1	HF	ATCC*	+	–	+
HSV-1	KOS	INSTAND†	+	–	+
HSV-1	MacIntyre	QCMD‡	+	–	+
HSV-2	HG-52	NCPV§	–	+	+
HSV-2	G	ATCC*	–	+	+
HSV-2	MS	QCMD‡	–	+	+

* ATCC American Type Culture Collection.

† INSTAND : société de promotion de l'assurance qualité dans les laboratoires médicaux.

‡ QCMD : *Quality Control for Molecular Diagnostics* ou contrôle qualité des diagnostics moléculaires.

§ NCPV : National Collection of Pathogenic Viruses ou prélèvement national des virus pathogènes.

Tableau 2. Test de spécificité du kit avec un pathogène éventuellement apte à une réaction croisée

Groupe témoin	HSV-1 (Cycling Green)	HSV-2 (Cycling Green)	Témoin interne (Cycling Yellow)
Virus de l'Herpès humain 3 (virus de la varicella-zona)	–	–	+
Virus de l'Herpès humain 4 (virus d'Epstein-Barr)	–	–	+
Virus de l'Herpès humain 5 (cytomégalovirus)	–	–	+
Virus de l'Herpès humain 6A	–	–	+
Virus de l'Herpès humain 6 B	–	–	+
Virus de l'Herpès humain 7	–	–	+
Virus de l'Herpès humain 8 (herpès virus associé au sarcome de Kaposi)	–	–	+
Virus de l'hépatite A	–	–	+
Virus de l'hépatite B	–	–	+
Virus de l'hépatite C	–	–	+
Virus de l'immunodéficience humaine (VIH)	–	–	+
Virus de la leucémie humaine à cellules T 1	–	–	+
Virus de la leucémie humaine à cellules T 2	–	–	+
Entérovirus	–	–	+
Parvovirus B 19	–	–	+
Virus du Nil occidental	–	–	+

Précision

Les données de précision du kit *artus* HSV-1/2 RG PCR ont été recueillies au moyen des appareils Rotor-Gene et 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 de la variabilité inter-lot (variabilité des différents lots utilisés). Pour ce faire, l'écart-type, la variance et le coefficient de variation sont calculés respectivement aussi bien pour la PCR spécifique du pathogène que pour la PCR du témoin interne.

Les données du kit *artus* HSV-1/2 RG PCR ont été déterminées à partir de l'ADN de l'HSV-1 et de l'HSV-2 avec une concentration de 10 copies/ μ l. Les essais ont été effectués en 8 séries. L'interprétation des résultats a été effectuée à partir des valeurs C_T des courbes d'amplification (C_T : threshold cycle, voir Tableaux 3 et 4). La variance totale d'un échantillon de concentration donnée est donc de 1,82 % (C_T) pour l'HSV-1, de 0,67 % (C_T) pour l'HSV-2 et 1,24 % (C_T) et 1,58 % (C_T) respectivement pour la détection du témoin interne. Ces valeurs sont basées sur l'ensemble de chacune des valeurs des variabilités déterminées.

Tableau 3. Données de précision pour HSV-1 à partir des valeurs C_T

	Valeur C _T	Écart-type	Coefficient de variation (%)
Variabilité intra-essai : HSV-1 10 copies/ μ l	30,46	0,25	0,81
Variabilité intra-essai : Témoin interne	25,29	0,08	0,3
Variabilité inter-essai : HSV-1 10 copies/ μ l	29,69	0,69	2,05
Variabilité inter-essai : Témoin interne	24,97	0,31	1,25
Variabilité inter-lot : HSV-1 10 copies/ μ l	29,95	0,40	1,35
Variabilité inter-lot : Témoin interne	24,90	0,30	1,20
Variance totale : HSV-1 10 copies/ μ l	29,91	0,55	1,82
Variance totale : Témoin interne	24,99	0,31	1,24

Tableau 4. Données de précision pour HSV-2 à partir des valeurs C_T

	Valeur C _T	Écart-type	Coefficient de variation (%)
Variabilité intra-essai : HSV-2 10 copies/ μ l	29,85	0,15	0,50
Variabilité intra-essai : Témoin interne	25,17	0,39	1,55
Variabilité inter-essai : HSV-2 10 copies/ μ l	29,92	0,15	0,49
Variabilité inter-essai : Témoin interne	25,11	0,41	1,63
Variabilité inter-lot : HSV-2 10 copies/ μ l	29,80	0,23	0,79
Variabilité inter-lot : Témoin interne	24,89	0,33	1,32
Variance totale : HSV-2 10 copies/ μ l	29,88	0,20	0,67
Variance totale : Témoin interne	25,07	0,40	1,58

Robustesse

La vérification de la robustesse permet de déterminer le taux d'échec total du kit *artus* HSV-1/2 RG PCR. Pour obtenir de très faibles titres de virus HSV-1 et HSV-2, 30 échantillons, négatifs pour HSV, ont chacun été mélangés à 0,36 copies/ μ l de volume d'élution d'ADN d'HSV-1 ou à 0,48 copies/ μ l de volume d'élution d'ADN d'HSV-2 (à la concentration trois fois supérieure au seuil de sensibilité analytique). Après extraction à l'aide du kit EZ1 DSP Virus, ces échantillons ont été analysés avec le kit *artus* HSV-1/2 RG PCR. Le taux d'échec était de 0 % pour la totalité des échantillons, autant pour HSV-1 que pour HSV-2. En outre, la robustesse du témoin interne a été vérifiée par la procédure d'extraction et par l'analyse des 30 échantillons de LCR négatifs pour HSV-1 et HSV-2. Le taux d'échec total était de 0 %. Aucune inhibition n'a été observée. La robustesse du kit *artus* HSV-1/2 RG PCR est donc ≥ 99 %.

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 du kit *artus* HSV-1/2 RG PCR ainsi qu'à une comparaison de performance avec d'autres produits.

Équipement et réactifs devant être fournis par l'utilisateur

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

- Kit d'isolation d'ADN, (cf. « Isolation d'ADN », page 18)
- Pipettes (réglables)*
- Cônes de pipette stériles avec filtre
- Mixeur Vortex*
- Micro-centrifugeuse* avec rotor pour tubes de réaction de 2 ml
- Appareil Rotor-Gene Q ou Rotor-Gene*[†] avec canaux de fluorescence pour Cycling Green, Cycling Orange et Cycling Yellow
- Logiciel Rotor-Gene Q version 1.7.94 et supérieure (logiciel Rotor-Gene 6000 version 1.7.65 et supérieure)
- Rangées de tubes et de bouchons, 0,1 ml, pour une utilisation avec un rotor à 72 puits (référence 981103 ou 981106)
- Sinon : Tubes pour PCR, 0,2 ml, pour une utilisation avec un rotor à 36 puits (référence 981005 ou 981008)
- Bloc réfrigérant (bloc de chargement 72 x 0,1 ml tubes, référence 9018901 ou bloc de chargement 96 x 0,2 ml tubes, référence 9018905)

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

[†] Le kit *artus* HSV-1/2 RG PCR ne peut pas être utilisé avec les appareils Rotor-Gene Q 2plex.

Remarques importantes

Précautions générales

L'utilisateur doit toujours respecter les mesures suivantes :

- Utiliser des cônes de pipette stériles avec filtre.
- Stocker et extraire les matériaux positifs (échantillons, témoins positifs et amplicons) séparément de tous les autres réactifs et les ajouter au mélange de réaction dans un lieu isolé.
- Décongeler tous les composants pour les amener à température ambiante (15 à 25 °C) avant le début du test.
- Une fois décongelés, mélanger les composants (en pipetant plusieurs fois de bas en haut ou en mélangeant par impulsion en faisant tourbillonner) et centrifuger brièvement.
- Travailler rapidement et laisser les composants dans de la glace ou dans un bloc réfrigérant (bloc de chargement 72/96 puits).

Isolation d'ADN

Le kit EZ1 DSP Virus (QIAGEN, référence 62724*) est validé pour la purification d'ADN viral à partir de LCR humain pour une utilisation avec le kit *artus* HSV-1/2 RG PCR. Réaliser la purification d'ADN viral selon les instructions fournies dans le *Manuel du kit EZ1 DSP Virus*.

ⓘ Le kit *artus* HSV-1/2 RG PCR ne peut pas être utilisé avec les méthodes d'isolation à base de phénol.


ⓘ L'utilisation d'ARN entraîneur est essentielle à l'efficacité de l'extraction et, par conséquent, pour le rendement en ADN. Ajouter la bonne quantité d'ARN entraîneur à chaque extraction suivant les instructions fournies dans le *Manuel du kit EZ1 DSP Virus*.

ⓘ Le témoin interne du kit *artus* HSV-1/2 RG PCR peut être utilisé directement dans la procédure d'isolation (cf. « Témoin interne », ci-dessous).

* Le kit EZ1 DSP Virus est également disponible dans les kits EASYartus® HSV-1/2 RG PCR homologués CE-IVD, associé au kit *artus* HSV-1/2 RG PCR (voir page 35 pour commander).

Témoin interne

Un témoin interne (HSV-1/2 RG IC) est fourni. Il permet à l'utilisateur de contrôler la procédure d'isolation d'ADN et de vérifier la survenue éventuelle d'une inhibition de la PCR. À cet effet, ajouter du témoin interne à l'isolation à un rapport de 0,1 μ l par 1 μ l de volume d'élution. Par exemple, avec le kit EZ1 DSP Virus, l'ADN est élué dans un tampon d'élution de 60 μ l (AVE). Ainsi, il faut ajouter 6 μ l de témoin interne au début.

 Ne pas ajouter directement de témoin interne et d'ARN entraîneur à l'échantillon.

Le témoin interne peut également être utilisé uniquement pour détecter une éventuelle inhibition de la PCR. À cet effet, ajouter le témoin interne directement au mélange de HSV-1/2 RG Master et de HSV-1/2 RG Mg-Sol, comme indiqué à l'étape 2b du protocole (page 21).

Protocole : PCR et analyse des données

Remarques importantes avant de commencer

- Avant de commencer la procédure, lire les « Remarques importantes », page 18
- Prendre le temps de se familiariser avec le Rotor-Gene Q avant d'exécuter le protocole. Consulter le manuel d'utilisation de l'appareil.
- S'assurer que chaque cycle de PCR intègre les témoins positifs et un témoin négatif (eau, PCR grade).

Avant de commencer

- S'assurer que le bloc réfrigérant (accessoire de Rotor-Gene Q) est pré-réfrigéré entre 2 et 8 °C.
- Avant chaque utilisation, il faut complètement décongeler tous les réactifs, les mélanger (en pipetant plusieurs fois de haut en bas ou en mélangeant rapidement par impulsion au vortex) et les centrifuger brièvement.

Procédure

- 1. Placer le nombre souhaité de tubes PCR dans les adaptateurs du bloc réfrigérant.**
- 2. En cas d'utilisation du témoin interne pour contrôler la procédure d'isolation d'ADN et vérifier la survenue éventuelle d'une inhibition de la PCR, suivre l'étape 2a.
En cas d'utilisation du témoin interne uniquement pour vérifier la survenue éventuelle d'une inhibition de la PCR, suivre l'étape 2b.
Utiliser le témoin interne selon l'étape 2b pour tous les témoins positifs et négatifs.**
 - 2a. Le témoin interne a déjà été ajouté à l'isolation (voir « Témoin interne », page 19). Dans ce cas, préparer un mélange principal d'après le Tableau 5.**

Le mélange de réaction contient en principe tous les composants nécessaires à la PCR sauf l'échantillon.

Tableau 5. Préparation du mélange principal (témoin interne utilisé pour contrôler l'isolation d'ADN et vérifier la survenue éventuelle d'une inhibition de la PCR)

Nombre d'échantillons	1	12
HSV-1/2 RG Master	25 μ l	300 μ l
HSV-1/2 RG Mg-Sol	5 μ l	60 μ l
HSV-1/2 RG IC	0 μ l	0 μ l
Volume total :	30 μl	360 μl

2b. Le témoin interne doit être ajouté directement au mélange d'HSV-1/2 RG Master et d'HSV-1/2 RG Mg-Sol. Dans ce cas, préparer un mélange principal d'après le Tableau 6.

Le mélange de réaction contient en principe tous les composants nécessaires à la PCR sauf l'échantillon.

Tableau 6. Préparation du mélange principal (témoin interne utilisé uniquement pour vérifier la survenue éventuelle d'une inhibition de la PCR)

Nombre d'échantillons	1	12
HSV-1/2 RG Master	25 μ l	300 μ l
HSV-1/2 RG Mg-Sol	5 μ l	60 μ l
HSV-1/2 RG IC	2 μ l	24 μ l
Volume total :	32 μl*	384 μl*

* L'augmentation du volume provoquée par l'ajout du témoin interne est négligée lors de la préparation de la PCR. Cela n'amoindrit pas la sensibilité du système de détection.

3. Pipeter 30 μ l du mélange principal dans chaque tube de PCR. Ajouter ensuite 20 μ l de l'échantillon d'ADN élué (cf. Tableau 7) et bien mélanger en pipetant plusieurs fois de bas en haut. Similairement, il faut utiliser 20 μ l de l'HSV-1 RG PC et de l'HSV-2 RG PC comme témoins positifs et 20 μ l d'eau (Water, PCR grade) comme témoin négatif.

Tableau 7. Préparation de la PCR

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

4. **Fermer les tubes de PCR. S'assurer que l'anneau de blocage (accessoire de Rotor-Gene) soit placé en haut du rotor pour éviter que les tubes ne s'ouvrent accidentellement au cours du cycle.**
5. **Pour détecter l'ADN de HSV-1 ou de HSV-2, créer un profil de température en suivant les étapes ci-après.**

Définition des paramètres généraux d'analyse	Figures 3, 4, 5
Activation initiale de l'enzyme à démarrage à chaud	Figure 6
Amplification de l'ADN	Figure 7
Ajustement de la sensibilité du canal de fluorescence	Figure 8
Lancement du cycle	Figure 9

Toutes les spécifications font référence au logiciel Rotor-Gene Q versions 1.7.94 et supérieures ainsi qu'au logiciel Rotor-Gene 6000 versions 1.7.65 et supérieures. Le manuel d'utilisation fournit de plus amples informations sur la programmation des appareils Rotor-Gene Q. Dans les images suivantes, ces réglages sont encadrés en noir et en gras. Ces illustrations proviennent des appareils Rotor-Gene Q.

- Commencer par ouvrir la boîte de dialogue « New Run Wizard » (assistant de lancement d'un nouveau cycle) avec la version « Advanced » (Figure 3). Cocher la case « Locking Ring Attached » (anneau de blocage posé) et cliquer sur « Next » (suivant).

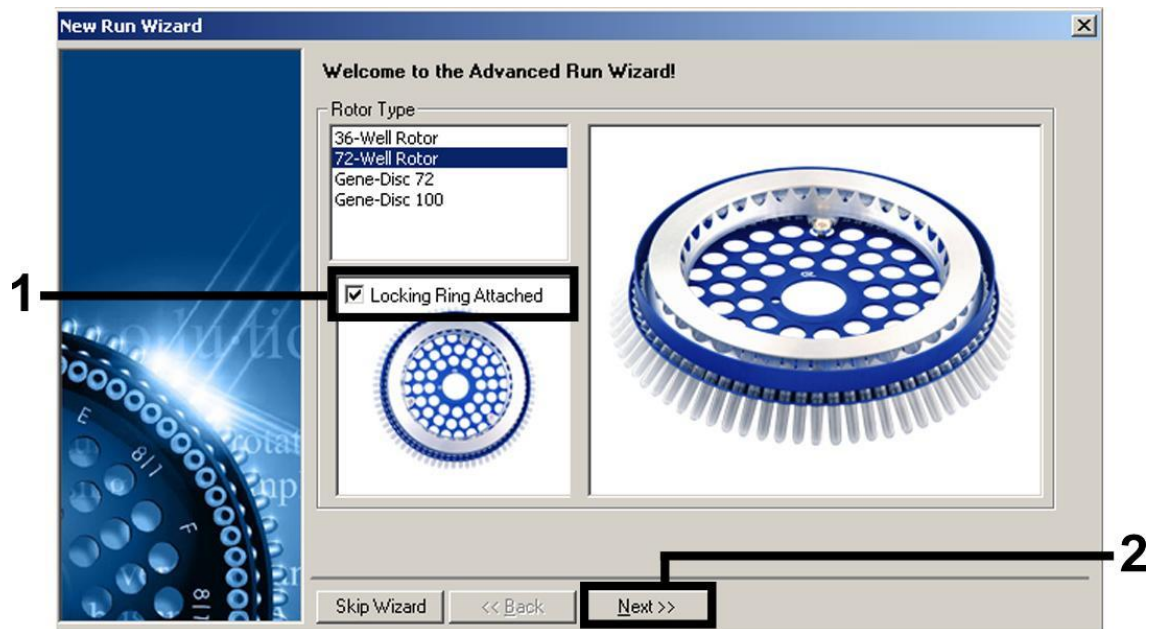


Figure 3. Boîte de dialogue « New Run Wizard ».

7. Sélectionner 50 pour le volume de réaction de la PCR et cliquer sur « Next » (Figure 4).

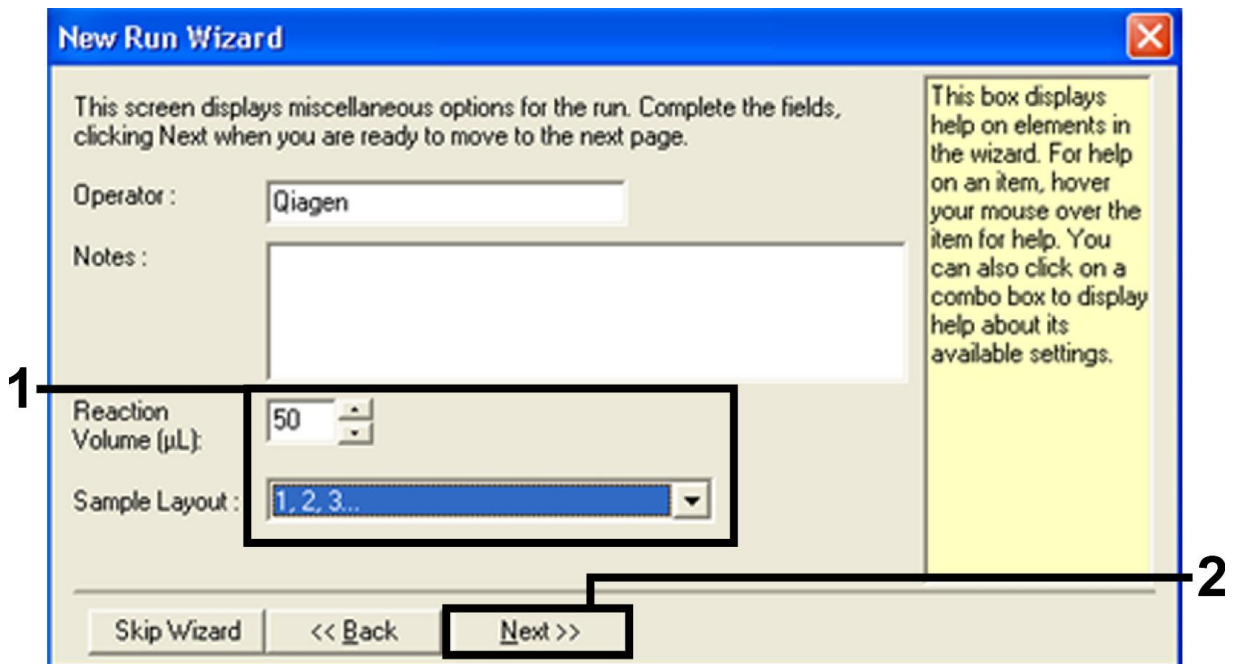


Figure 4. Définition des paramètres généraux d'analyse.

8. Dans la boîte de dialogue « New Run Wizard », cliquer sur le bouton « Edit Profile » (modifier profil) (Figure 5) et programmer le profil de température comme indiqué sur les Figures 6 à 7).

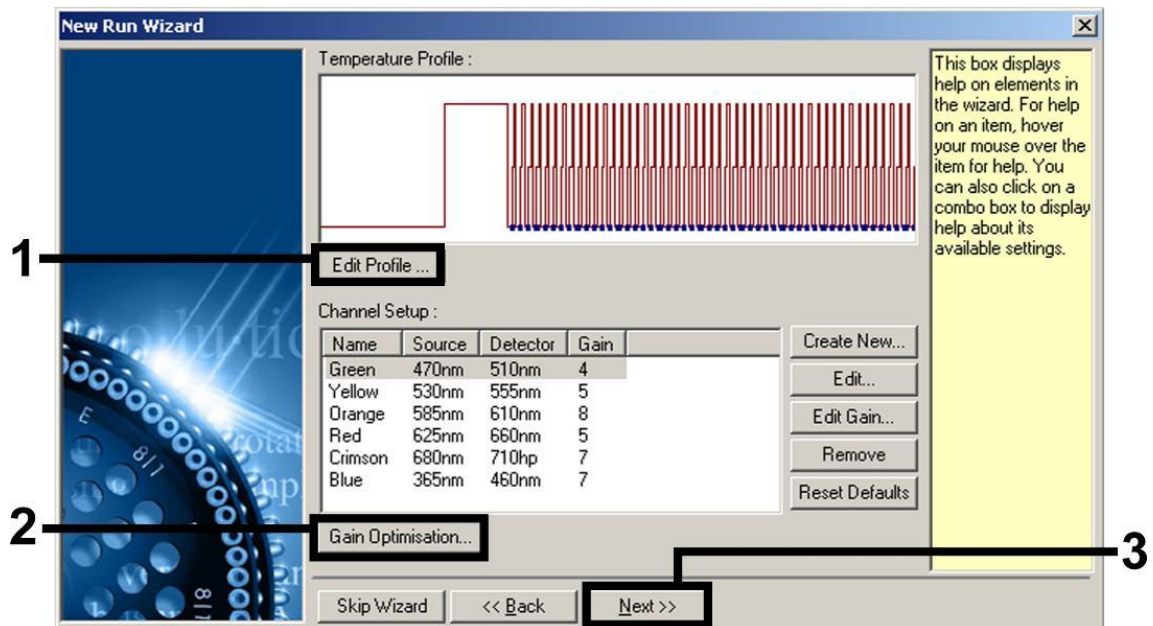


Figure 5. Modification du profil.

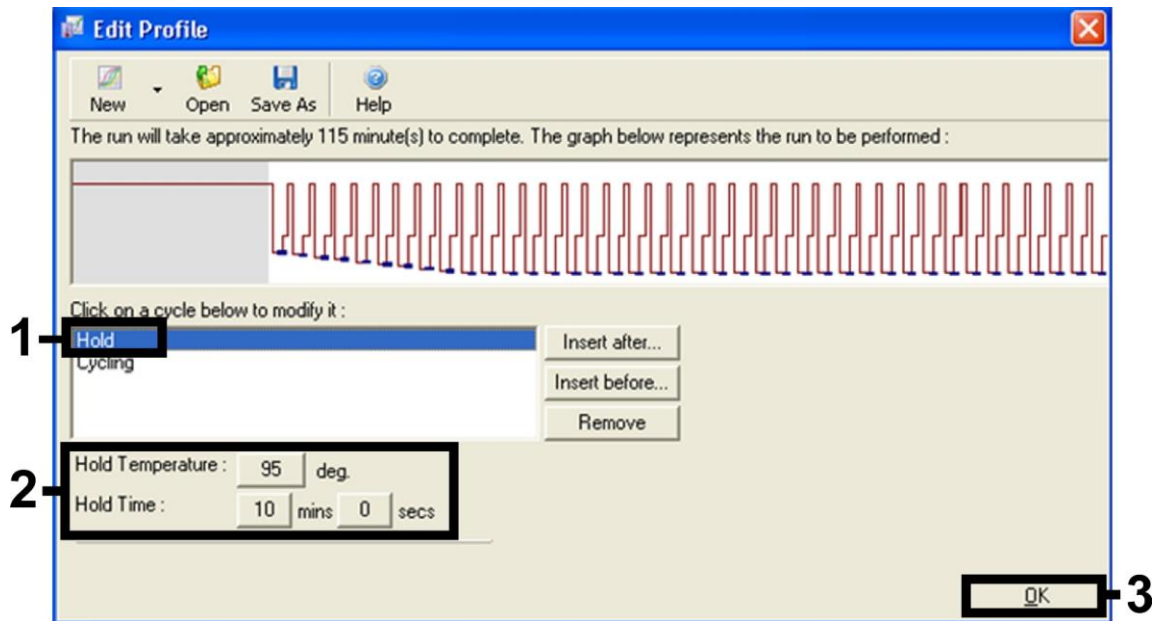


Figure 6. Activation initiale de l'enzyme « Hot Start ».

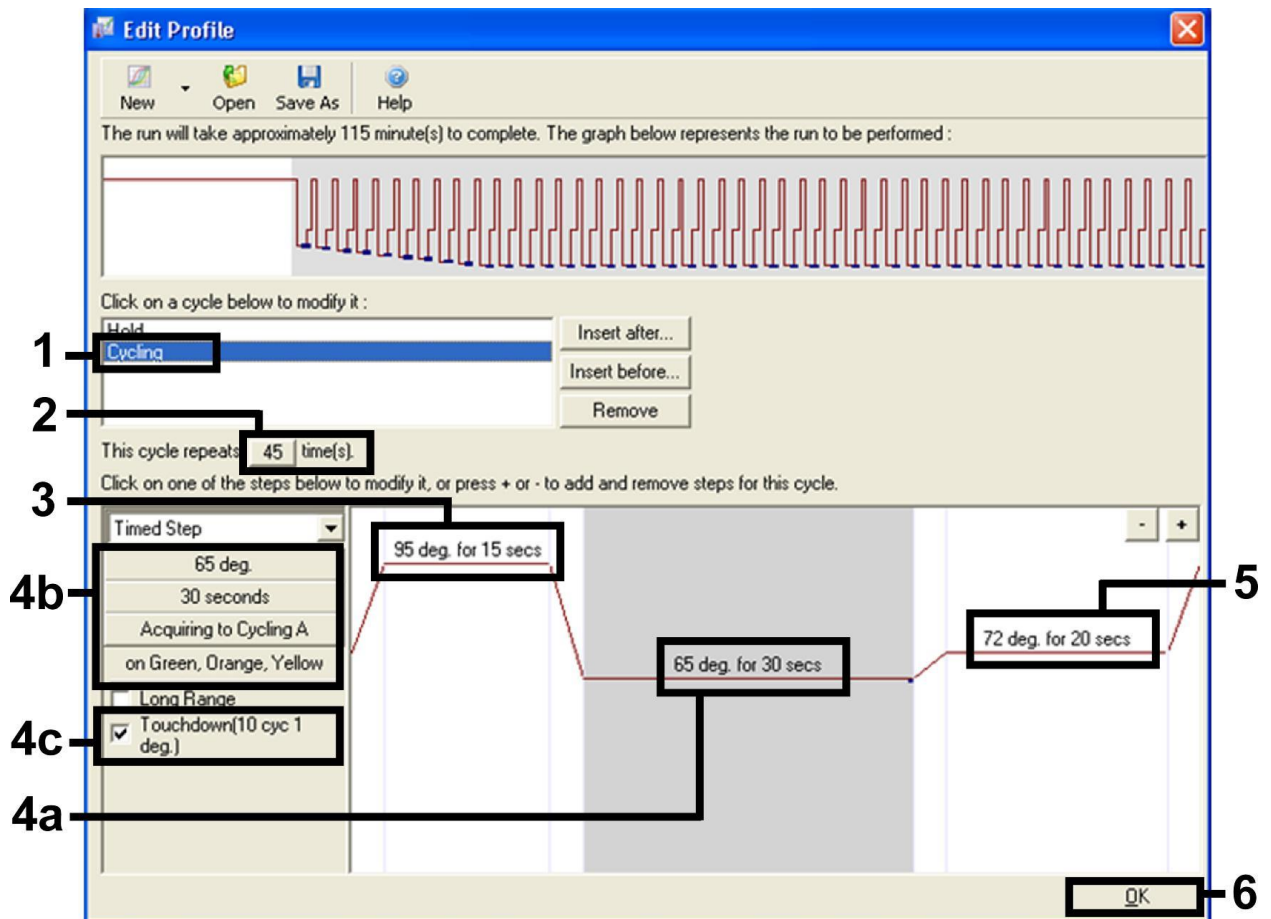


Figure 7. Amplification de l'ADN. S'assurer d'activer la fonction touchdown pendant 10 cycles au cours de l'étape d'annealing.

9. La fenêtre de détection des canaux de fluorescence doit être déterminée selon les intensités de fluorescence des tubes de PCR.

Dans la boîte de dialogue « New Run Wizard », cliquer sur « Gain Optimisation » (optimisation du gain) (voir Figure 8, étape 2) pour ouvrir la boîte de dialogue « Auto-Gain Optimisation Setup » (configuration de l'optimisation du gain automatique) (Figure 8). Fixer la température de calibration à 65 pour qu'elle corresponde à la température d'annealing du programme d'amplification (Figure 7, étape 4b). S'assurer que les trois canaux (Green, Orange et Yellow) sont sélectionnés pour « Auto-Gain Optimisation ». (Trouver les canaux dans le menu déroulant sous « Channel Settings » [paramètres de canal] et cliquer sur « Add » [ajouter].) Cliquer sur « Start » (démarrer) pour lancer l'optimisation du gain. Dans la boîte de dialogue « Auto-Gain Optimisation Setup », cliquer sur « Close » (fermer) à la fin du calibrage du gain.

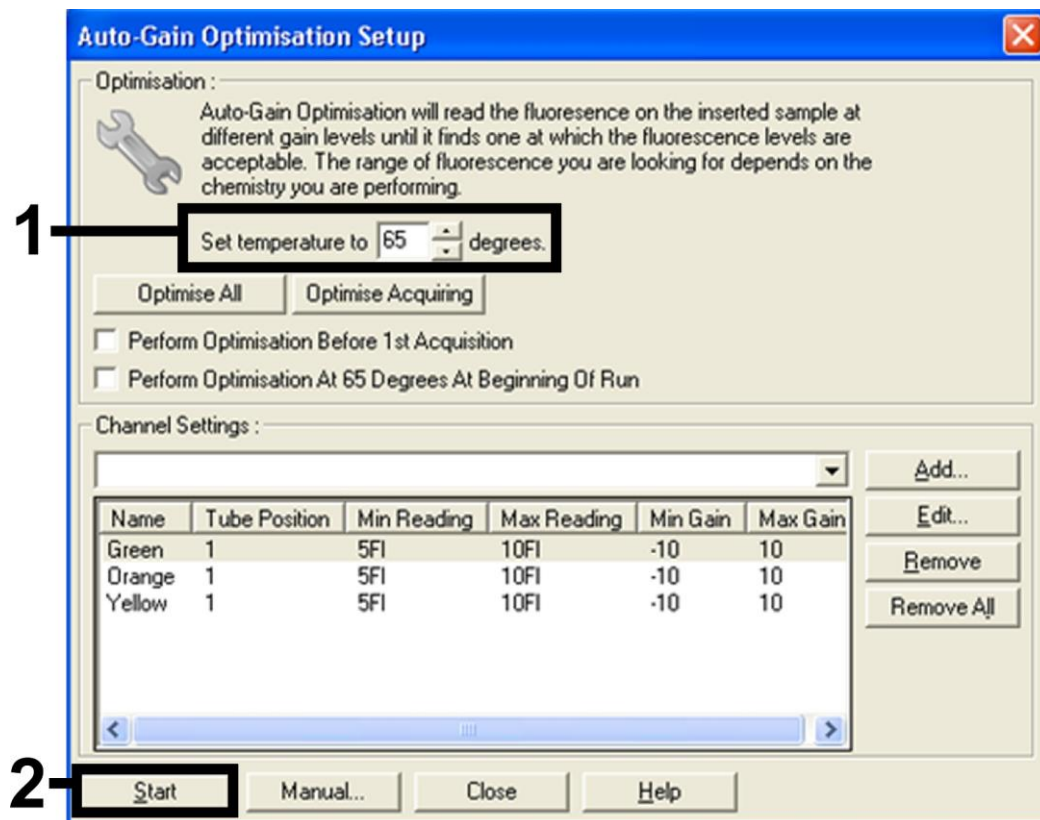


Figure 8. Ajustement de la sensibilité du canal de fluorescence

10. Les valeurs de gain déterminées par le calibrage de canal sont automatiquement enregistrées et répertoriées dans la dernière fenêtre de menu de la procédure de programmation (Figure 9). Cliquer sur « Start Run ».

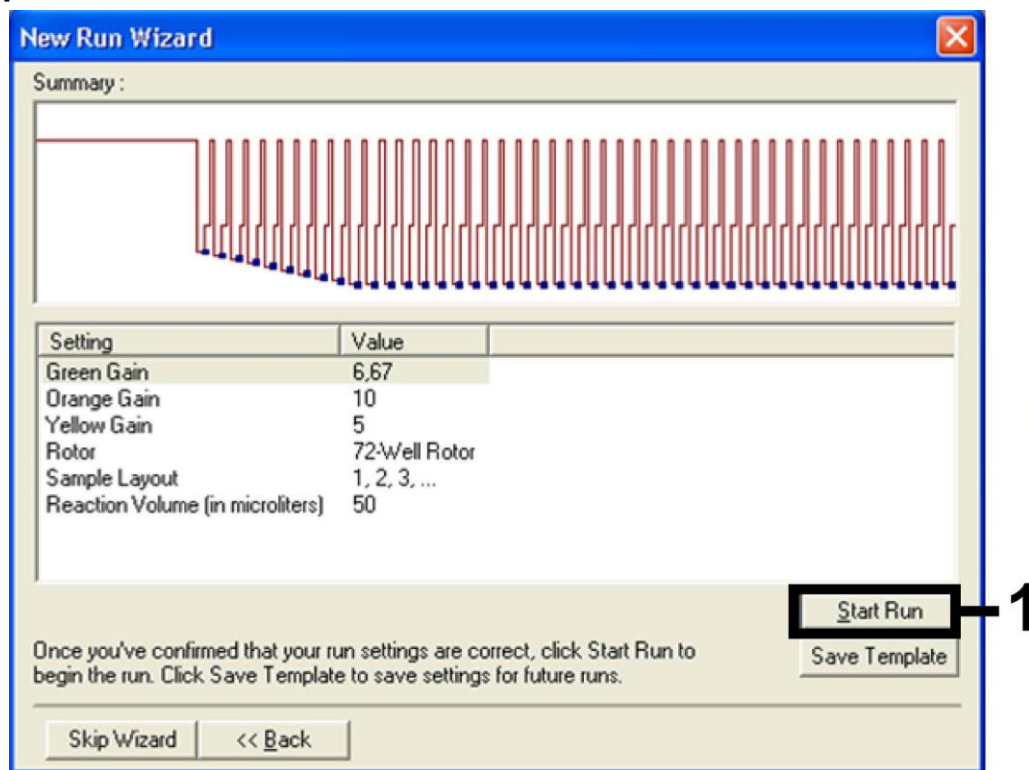


Figure 9. Lancement du cycle.

11. Une fois le cycle achevé, analyser les données. Les résultats suivants (11a, 11b, 11c, 11d, 11e et 11f) sont possibles.

Les Figure 10, 11 et 12 donnent des exemples de réactions de PCR positive et négative.

- 11a. Un signal est détecté dans le canal de fluorescence Cycling Green. Le résultat de l'analyse est positif : l'échantillon contient de l'ADN d'HSV-1.

Dans ce cas, la détection d'un signal dans le canal Cycling Yellow est superflue car de fortes concentrations initiales d'ADN d'HSV-1 (signal positif du canal Cycling Green) peuvent entraîner la réduction ou la disparition du signal de fluorescence du témoin interne du canal Cycling Yellow (concurrence).

11b. Aucun signal n'est détecté dans le canal de fluorescence Cycling Green. En même temps, un signal provenant du témoin interne apparaît dans le canal Cycling Yellow. Dans l'échantillon, il n'y a pas de détection d'ADN d'HSV-1. On peut alors le considérer comme négatif.

En cas de PCR négative d'HSV-1, le signal détecté du témoin interne exclut la possibilité d'une inhibition de la PCR.

11c. Un signal est détecté dans le canal de fluorescence Cycling Orange. Le résultat de l'analyse est positif : l'échantillon contient de l'ADN d'HSV-2.

Dans ce cas, la détection d'un signal dans le canal Cycling Yellow est superflue car de fortes concentrations initiales d'ADN d'HSV-2 (signal positif du canal Cycling Orange) peuvent entraîner la réduction ou la disparition du signal de fluorescence du témoin interne du canal Cycling Yellow (concurrence).

11d. Aucun signal n'est détecté dans le canal de fluorescence Cycling Orange. En même temps, un signal provenant du témoin interne apparaît dans le canal Cycling Yellow. Dans l'échantillon, il n'y a pas de détection d'ADN d'HSV-2. On peut alors le considérer comme négatif pour HSV-2.

En cas de PCR négative d'HSV-2, le signal détecté du témoin interne exclut la possibilité d'une inhibition de la PCR.

11e. Un signal est détecté dans les canaux Cycling Green ou Cycling Orange. Le résultat de l'analyse est positif : l'échantillon contient de l'ADN d'HSV-1 et d'HSV-2.

Dans ce cas, la détection d'un signal dans le canal Cycling Yellow est superflue car de fortes concentrations initiales d'ADN d'HSV-1 et d'HSV-2 (signal positif des canaux Cycling Green et Cycling Orange) peuvent entraîner la réduction ou la disparition du signal de fluorescence du témoin interne du canal Cycling Yellow (concurrence).

11f. Aucun signal n'est détecté dans les canaux Cycling Green, Cycling Orange ou Cycling Yellow. Aucun résultat ne peut être établi.

Pour des informations sur les sources d'erreur et leurs solutions, voir « Résolution des principaux problèmes rencontrés », page 31.

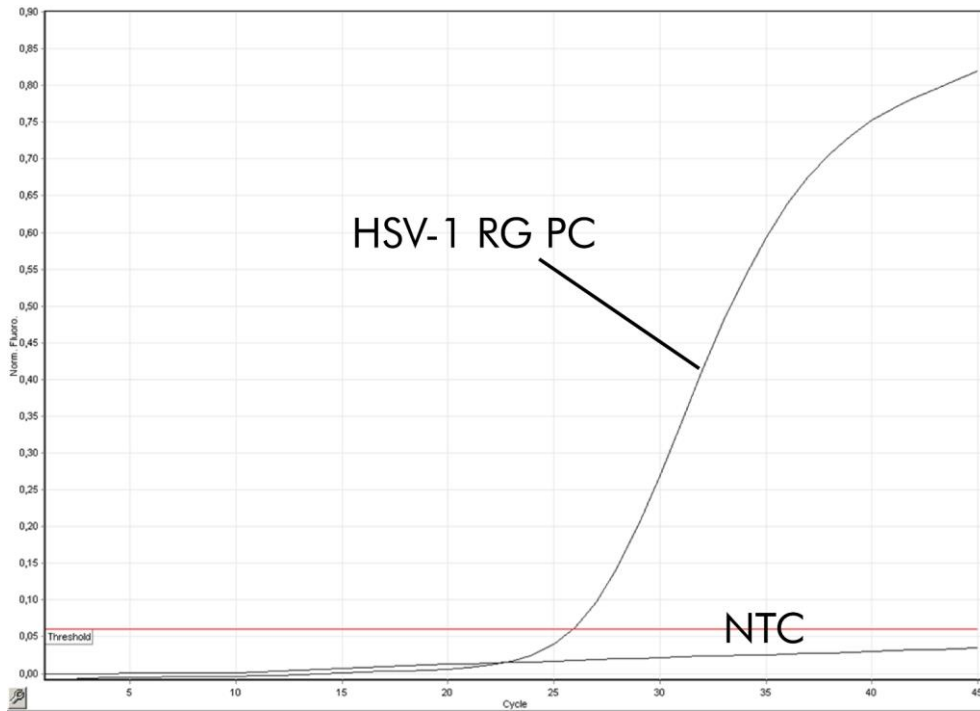


Figure 10. Détection du témoin positif d'HSV-1 (HSV-1 RG PC) dans le canal de fluorescence Cycling Green. NTC : témoin sans ADN (témoin négatif).

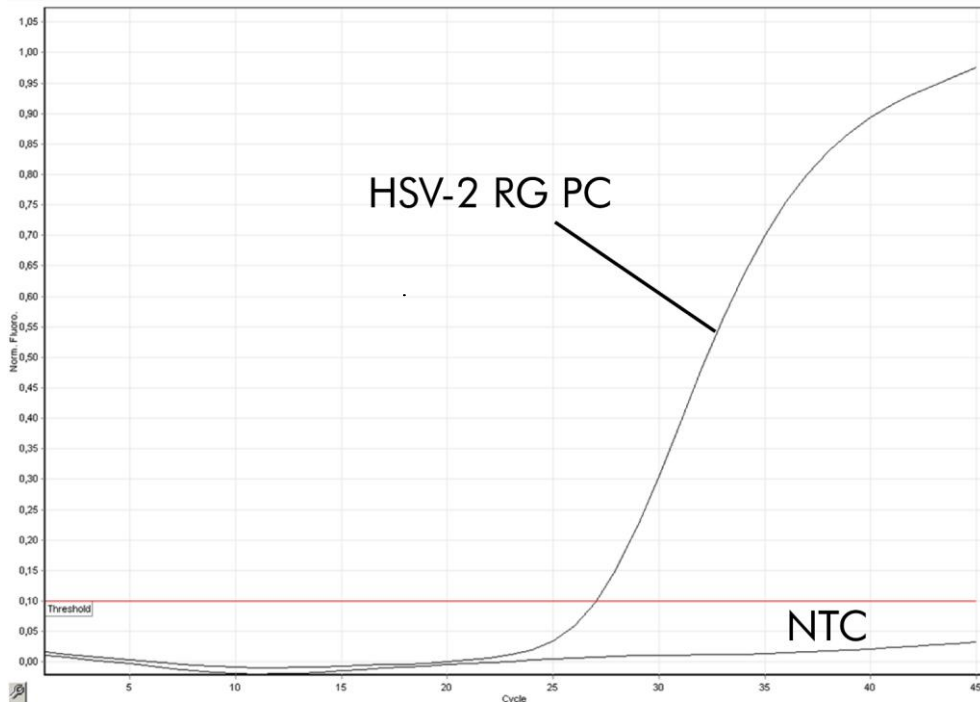


Figure 11. Détection du témoin positif d'HSV-2 (HSV-2 RG PC) dans le canal de fluorescence Cycling Orange. NTC : témoin sans ADN (témoin négatif).

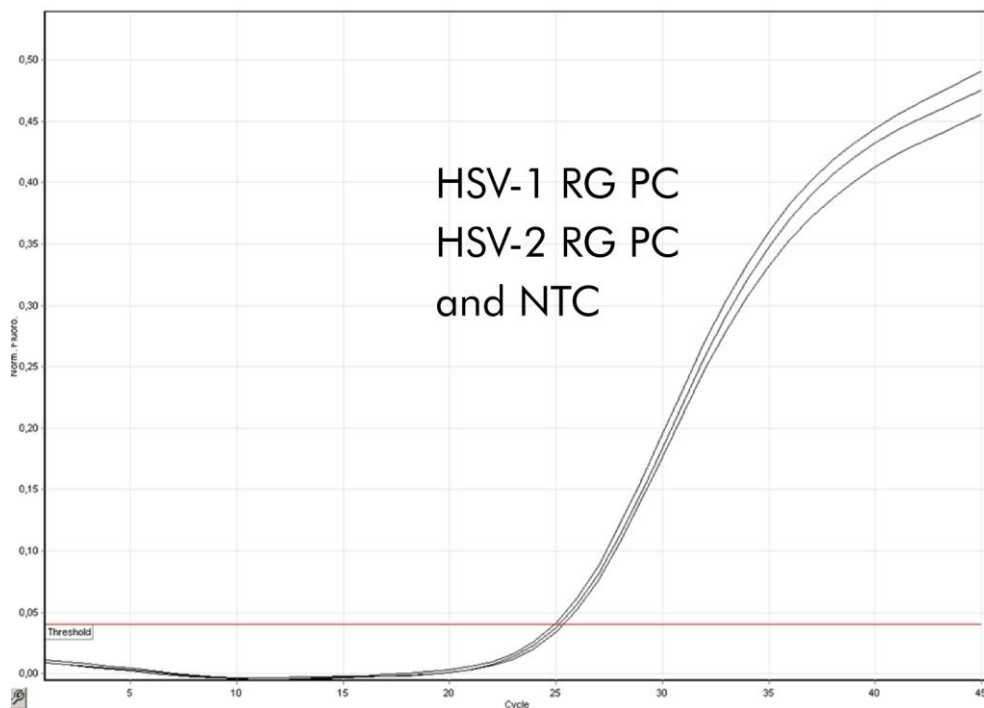







Figure 12. Détection du témoin interne (IC) dans le canal de fluorescence Cycling Yellow avec amplification simultanée des témoins positifs (HSV-1 RG PC et HSV-2 RG PC). NTC : témoin sans ADN (témoin négatif).

Résolution des principaux problèmes rencontrés

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






Commentaires et suggestions

Pas de signal avec les témoins positifs (HSV-1 RG PC et HSV-2 RG PC) dans le canal de fluorescence Cycling Green ou Cycling Orange

- | | |
|--|---|
| a) 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 Cycling Green ou Cycling Orange pour la PCR analytique du HSV-1/2 PCR et le canal de fluorescence Cycling Yellow pour la PCR du témoin interne. |
| b) Mauvaise programmation du profil de température du Rotor-Gene |  Comparer le profil de température au protocole. Voir « Protocole : PCR et analyse des données », page 20. |
| c) Mauvaise configuration de la PCR |  Vérifier les étapes de travail au moyen du schéma de pipetage et répéter la PCR si nécessaire. Voir « Protocole : PCR et analyse des données », page 20. |
| d) Les conditions de stockage d'un ou plusieurs composants du kit ne respectaient pas les instructions fournies dans « Stockage » (page 5) |  Vérifier les conditions de stockage et la date limite d'utilisation (voir l'étiquette du kit) des réactifs et utiliser un nouveau kit s'il y a lieu. |
| e) Le kit <i>artus</i> [®] HSV-1/2 RG PCR a expiré |  Vérifier les conditions de stockage et la date limite d'utilisation (cf. étiquette du kit) des réactifs et utiliser un nouveau kit s'il y a lieu. |

Commentaires et suggestions

Signal faible ou inexistant du témoin interne d'un échantillon de LCR négatif purifié au moyen du kit EZ1 DSP Virus dans le canal de fluorescence Cycling Yellow et absence simultanée de signal dans le canal Cycling Green ou Cycling Orange

- a) Les conditions de PCR ne respectent pas le protocole  Vérifier les conditions de PCR (cf. ci-dessus) et si besoin, répéter la PCR avec les réglages corrigés.
- b) La PCR a été inhibée  Veiller à ce que la méthode d'isolation recommandée soit utilisée et suivre les instructions du fabricant à la lettre.
- c) De l'ADN a été perdu lors de l'extraction  Si le témoin interne a été ajouté à l'extraction, l'absence de signal du témoin interne peut indiquer la perte d'ADN en cours d'extraction. Veiller à ce que la méthode d'isolation recommandée soit utilisée (voir « Isolation d'ADN », page 18) et suivre les instructions du fabricant à la lettre.
- d) Les conditions de stockage d'un ou plusieurs composants du kit ne respectaient pas les instructions fournies dans « Stockage » (page 5)  Vérifier les conditions de stockage et la date limite d'utilisation (voir l'étiquette du kit) des réactifs et utiliser un nouveau kit s'il y a lieu.
- e) Le kit *artus*[®] HSV-1/2 RG PCR a expiré  Vérifier les conditions de stockage et la date limite d'utilisation (voir l'étiquette du kit) des réactifs et utiliser un nouveau kit s'il y a lieu.

Commentaires et suggestions

Signaux avec les témoins négatifs du canal de fluorescence Cycling Green ou Cycling Orange de la PCR analytique

- a) Contamination lors de la préparation de la PCR
- ① Répéter la PCR avec de nouveaux réactifs dans des répliquats.
 - ① Si possible, fermer les tubes de PCR juste après ajout de l'échantillon à tester.
 - ① Veiller à pipeter les témoins positifs en dernier.
 - ① Veiller à ce que le plan de travail et les appareils soient décontaminés à intervalles réguliers.
- b) Contamination lors de l'extraction
- ① Répéter l'extraction et la PCR de l'échantillon à tester au moyen de nouveaux réactifs.
 - ① Veiller à ce que le plan de travail et les appareils soient décontaminés à intervalles réguliers.

Références

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

Pour une liste complète des références, visiter notre banque de données en ligne « QIAGEN Reference Database » à l'adresse www.qiagen.com/RefDB/search.asp ou bien contacter les services techniques de QIAGEN ou le distributeur local.

Pour commander

Produit	Contenu	Référence
<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (24)	Pour 24 réactions : Master, solution Mg, 2 témoins positifs, témoin interne, eau (grade PCR)	4500263
<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (96)	Pour 96 réactions : Master, solution Mg, 2 témoins positifs, témoin interne, eau (grade PCR)	4500265
Kit EZ1 DSP Virus : pour la purification d'acides nucléiques viraux à partir de LCR humain à des fins de diagnostic <i>in vitro</i>		
Kit EZ1 DSP Virus	Pour 48 préparations d'acides nucléiques viraux : Cartouches de réactif pré-remplies, porte-pointes jetables, pointes de filtre jetables, tubes d'échantillon, tubes d'élution, tampons, ARN porteur	62724
Kits EASY<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR : pour une purification d'échantillon entièrement intégrée conforme CE-IVD et pour la détection des pathogènes		
EASY <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (1)	Pour 48 préparations d'acides nucléiques viraux et 24 tests : 1 x EZ1 DSP Virus Kit, 1 x <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (24)	EA10023
EASY <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (2)	Pour 48 préparations d'acides nucléiques viraux et 48 tests : 1 x EZ1 DSP Virus Kit, 2 x <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (24)	EA10024

Rotor-Gene Q et accessoires

Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	Thermocycleur en temps réel et analyseur en fonte de haute résolution avec 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge et pourpre) et canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main-d'œuvre	Sur demande
Loading Block 72 x 0,1 ml Tubes	Bloc d'aluminium pour configuration manuelle de la réaction avec une pipette à canal unique dans 72 tubes de 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0,2 ml Tubes	Bloc d'aluminium pour configuration manuelle dans une barrette standard 8 x 12 la réaction avec 96 tubes de 0,2 ml	9018905
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250)	250 rangées de 4 tubes et bouchons pour 1 000 réactions	981103
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2500)	10 x 250 rangées de 4 tubes et bouchons pour 10 000 réactions	981106
PCR Tubes, 0,2 ml (1000)	1000 tubes à paroi fine pour 1000 réactions	981005
PCR Tubes, 0,2 ml (10000)	10 x 1 000 tubes à paroi fine pour 1 000 réactions	981008

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

Page laissée volontairement vierge

Page laissée volontairement vierge

Page laissée volontairement vierge

L'achat de ce produit permet à l'acheteur de l'utiliser pour poser des diagnostics humains *in vitro*. Le présent document ne constitue pas un brevet général ou une licence. Il met simplement en évidence ce droit spécial d'utilisation conféré par l'achat du produit.

Marques de commerce : QIAGEN®, artus®, EZ1®, EASYartus®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group).

Les kits artus HSV-1/2 RG PCR et EZ1 DSP Virus sont des kits de diagnostic homologués CE conformes à la directive européenne 98/79/EC sur les diagnostics *in vitro*. Produit distribué dans certains pays uniquement.

Accord de licence limitée

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur du kit artus HSV-1/2 RG PCR consent aux termes suivants :

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

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

© 2009-2014 QIAGEN, tous droits réservés.

www.qiagen.com

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

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

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

Brazil ■ Orders 55-11-5079-4000 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

China ■ Orders 800-988-0326 ■ Fax 800-988-0329 ■ 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

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 02-33430-4826 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7290 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 1544 7146 ■ Technical 1544 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 +65-68548184 ■ Technical 1800-742-4368

Spain ■ Orders +34-91-630-7050 ■ Fax +34-91-630-5145 ■ Technical +34-91-630-7050

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

