



Manuel du kit *artus*[®] HI Virus-1 RG RT-PCR

 24 (référence 4513263)
 96 (référence 4513265)

Version 1



Diagnostics in vitro quantitatifs

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



4513263, 4513265



1049310FR



QIAGEN GmbH, QIAGEN Straße 1, 40724

Hilden, ALLEMAGNE

R5



1049310FR



QIAGEN Sample and Assay Technologies

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 ;
- analyse d'acides nucléiques et de protéines ;
- recherche de microARN 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.

Sommaire

Contenu du kit	6
Symboles	6
Stockage	7
Utilisation prévue	7
Limites d'utilisation	8
Avertissements et précautions	8
Contrôle qualité	8
Introduction	10
Principe	10
Informations sur l'agent pathogène	10
Caractéristiques de performance	11
Équipement et réactifs devant être fournis par l'utilisateur	20
Remarques importantes	22
Précautions générales	22
Prélèvement, stockage et transport d'échantillon	22
Extraction de l'ARN	24
Contrôle interne	25
Configuration du seuil pour l'analyse de PCR	25
Quantification	26
Protocole : PCR et analyse des données	28
Résolution des principaux problèmes rencontrés	38
Références	41
Pour commander	42

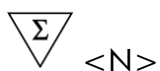
Contenu du kit

artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kit			(24)	(96)
Référence			4513263	4513265
Nombre de réactions			24	96
Bleu	HI Virus-1 RG Master A		2 x 12 réactions	8 x 12 réactions
Violet	HI Virus-1 RG Master B		2 x 12 réactions	8 x 12 réactions
Rouge	HI Virus-1 RG QS1* (1x 10 ⁴ IU/μl)	QS	200 μl	200 μl
Rouge	HI Virus-1 RG QS 2* (1x 10 ³ UI/μl)	QS	200 μl	200 μl
Rouge	HI Virus-1 RG QS 3* (1x 10 ² UI/μl)	QS	200 μl	200 μl
Rouge	HI Virus-1 RG QS 4* (1x 10 ¹ UI/μl)	QS	200 μl	200 μl
Vert	HI Virus-1 RG IC [†]	IC	1000 μl	2 x 1000 μl
Blanc	Eau (grade PCR)		1000 μl	1000 μl
	Manuel		1	1

* Norme de quantification.

† Contrôle interne.

Symboles



Contient suffisamment de réactifs pour <N> tests



À utiliser avant



Dispositif médical de diagnostic in vitro








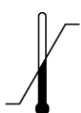



Référence



Numéro de lot



Référence du matériel

	Composants
	Contient
	Nombre
	Chlorhydrate de guanidine
	Code d'article international
	Limite de température
	Fabricant
	Lire les informations dans le manuel
	Remarque importante

Stockage

Les composants du kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR doivent être stockés à une température de -30°C à -15°C et sont stables jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'étiquette. Il convient d'éviter les cycles répétés de congélation-décongélation (>2 x), car cela 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* HI Virus-1 RG RT-PCR est un test d'amplification d'acide nucléique in vitro visant à quantifier l'ARN du virus d'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) dans le plasma humain. Ce kit de test de diagnostic exploite le principe de l'amplification en chaîne par polymérase à transcription inverse (RT-PCR) et il est configuré pour une utilisation avec les appareils Rotor-Gene Q. Le test permet de quantifier l'ARN du VIH-1 dans la plage de 120 – 1 x 10⁸ VIH-1 IU/ml. Les échantillons de plasma contenant des sous-types A à H du groupe M ont été validés pour une utilisation dans l'analyse.

 Le kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR ne doit pas être utilisé avec les appareils Rotor-Gene Q 2plex.

Le kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR doit être utilisé en association avec une présentation clinique et d'autres marqueurs de laboratoire afin d'établir le pronostic de la maladie et comme outil d'évaluation de la réponse virale au traitement antirétroviral, mesurée par les variations des taux d'ARN du VIH-1 dans le plasma EDTA humain. Le kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR n'est pas conçu pour être utilisé comme test de dépistage du VIH ou comme test de diagnostic visant à confirmer la présence d'une infection par le VIH.

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.

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.

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.

Avertissements et précautions

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

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

Contrôle qualité

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

Introduction

Le kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR constitue un système prêt à l'emploi pour la détection de l'ARN du VIH-1 par le biais d'une amplification en chaîne par polymérase (PCR) sur les appareils Rotor--Gene Q. Le kit HI Virus-1 RG Master A et B contient des réactifs et des enzymes pour la transcription inverse et l'amplification spécifique d'un fragment de génome du VIH-1 de 93 bp et pour la détection directe de l'amplicon spécifique du canal de fluorescence Cycling Green du Rotor-Gene Q ou du Rotor-Gene 6000, ou Cycling A.FAM™ (source 470 nm, détecteur 510 nm) du Rotor-Gene 3000.

En outre, le kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR contient un deuxième système d'amplification hétérologue permettant d'identifier une éventuelle inhibition de la PCR. Celui-ci est détecté en tant que contrôle interne (IC) du canal de fluorescence Cycling Orange du Rotor--Gene Q ou du Rotor-Gene 6000 ou A.ROX™ (source 585 nm, détection 610 nm) du Rotor-Gene 3000. Ceci n'a aucune influence négative sur la limite de détection de la RT-PCR du virus IH (voir « Sensibilité analytique », page 11). Les contrôles positifs externes (HI Virus-1 RG QS 1–4) fournis permettent de déterminer la quantité d'ARN viral. Pour plus d'informations, voir « **Quantification** », page 26.

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 l'agent pathogène

Le virus d'immunodéficience humaine (VIH) est un rétrovirus à l'origine du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Il existe deux types de VIH responsables d'infections humaines, le VIH-1 et VIH-2, qui se distinguent par leur virulence et leur prévalence. La plupart des cas rapportés de sida à travers le monde ont été attribués au VIH-1. L'infection au VIH est provoquée par la transfusion de sang infecté, les liquides vaginaux, le lait maternel et les autres fluides corporels. Dans ces fluides corporels, le VIH est présent sous forme de particules virales libres et sous forme de cellules immunitaires infectées. Les trois modes de transmission principaux sont les rapports sexuels non protégés, les aiguilles contaminées et la transmission d'une mère à son enfant à la naissance ou via le lait maternel.

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

Le VIH infecte essentiellement les cellules du système immunitaire, telles que les lymphocytes T auxiliaires (CD4⁺ particulièrement). L'infection par le VIH entraîne une chute du taux de ces cellules. Lorsque le nombre de lymphocytes CD4⁺ chute en dessous d'un seuil critique, l'immunité à médiation cellulaire est détruite et l'organisme devient plus sensible aux infections opportunistes.

Les symptômes du SIDA se manifestent à un stade avancé de l'infection par le VIH, lorsque le système immunitaire compromis ne peut plus lutter contre ces infections. À ce stade, la personne infectée développe de plus en plus de symptômes déclenchés par ce type d'infections. Les pathologies les plus fréquentes comprennent la diarrhée chronique à cryptosporidium, l'infection oculaire à cytomégalovirus, la pneumonie à pneumocystis, la toxoplasmose et la tuberculose, ainsi que certaines infections de type *Mycobacterium avium* complex. En outre, on observe fréquemment certains types de cancers tels que le cancer invasif cervical, le sarcome de Kaposi ou encore le lymphome. Il n'existe, à ce jour, aucun traitement permettant de guérir du SIDA et l'on pense que la plupart des personnes contaminées par ce virus mourront d'une pathologie liée à ce syndrome. Toutefois, les progrès en termes de traitements contre le VIH/SIDA, notamment concernant les traitements s'attaquant au virus lui-même et ceux prévenant ou traitant les infections opportunistes, ont permis d'améliorer grandement l'espérance et la qualité de vie de nombreux patients.

Caractéristiques de performance

Sensibilité analytique

La limite de détection analytique ainsi que la limite de détection analytique tenant compte de la purification (seuils de sensibilité) ont été évaluées pour le kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. La limite de détection analytique tenant compte de la purification a été calculée à partir d'échantillons cliniques positifs pour le VIH et pour une méthode d'extraction particulière. En revanche, la limite de détection analytique a été déterminée en utilisant une norme de concentration connue et indépendamment de la méthode d'extraction.

Pour déterminer la limite de détection analytique du kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR, une série de dilutions standard a été effectuée de 0,0316 à 31,6 IU*/µl, puis analysée avec le kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR sur l'appareil Rotor-Gene 3000. Les essais ont été exécutés sur 3 jours différents à raison de 8 réplicats par jour. Le résultat a été déterminé par analyse probit. La limite de détection analytique du kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR associé au Rotor-Gene 3000 est de 4,5 UI/µl ($p = 0,05$). Cela signifie que 4,5 UI/µl sont détectées avec une probabilité de 95 %.

* La norme utilisée ici est un ARN transcrit in vitro, dont la concentration a été calibrée en fonction du « 2nd International HIV standard » (OMS).

La sensibilité de l'analyse en tenant compte de la purification (kit QIAamp® DSP Virus, QIAGEN) du kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR sur les appareils Rotor-Gene a été déterminée à l'aide d'une série de dilutions de la 2e norme internationale de l'OMS concernant l'ARN du VIH-1 pour la technologie des essais d'amplification des acides nucléiques (NAT) (Code NIBSC 97/650) de 10 à 3160 IU/ml de HIV inoculés dans des échantillons de plasma cliniques. Ceux-ci ont été soumis à une extraction de l'ARN à l'aide du kit QIAamp DSP Virus (QIAGEN, volume d'extraction : 0,5 ml, volume d'élution : 25 µl). Chacune des dilutions a été analysée avec le kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR sur 3 jours différents et avec 8 réplicats. Le résultat a été déterminé par analyse probit. Une illustration graphique de l'analyse probit est présentée sur la figure 1. La limite de détection analytique du kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR associé au Rotor-Gene 3000 et tenant compte de la purification est de 71,6 UI/ml ($p = 0,05$). Cela signifie que la probabilité de détecter 71,6 UI/µl est de 95%.

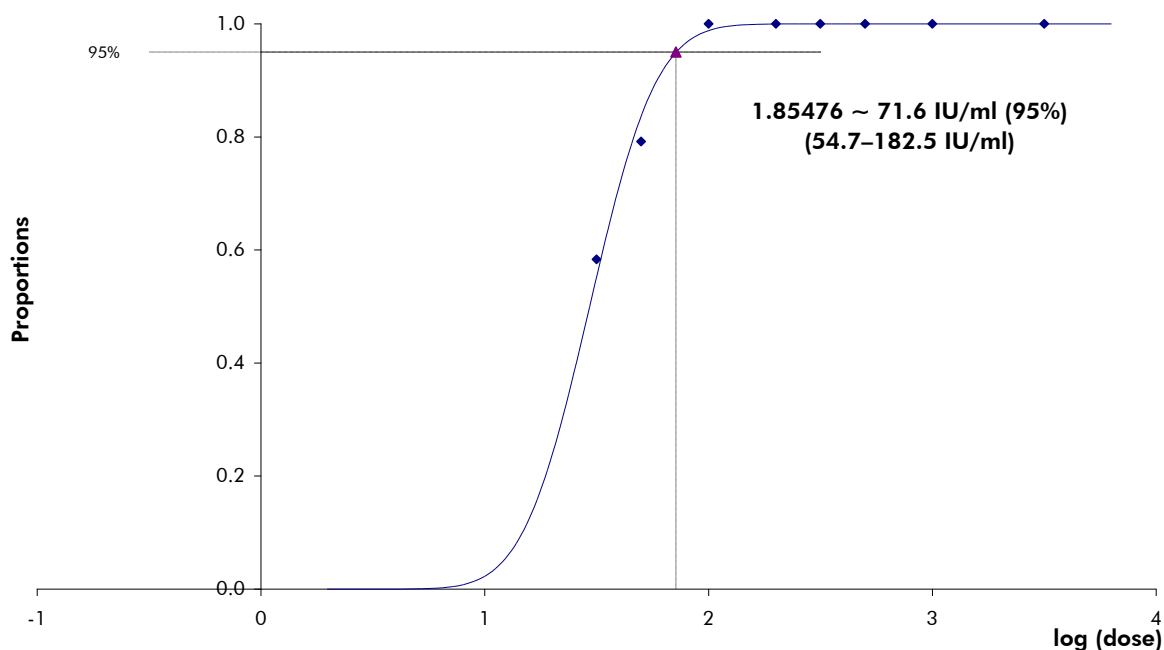


Figure 1 Analyse probit : HI Virus-1 (Rotor-Gene 3000). Sensibilité analytique tenant compte de la purification (kit QIAamp DSP Virus, QIAGEN) du kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR sur le Rotor-Gene 3000.

La limite de détection analytique du kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR associé au Rotor-Gene Q/6000 et tenant compte de la purification est de 66,9 UI/ml ($p = 0,05$). Cela signifie que la probabilité de détecter 66,9 UI/µl est de 95%.

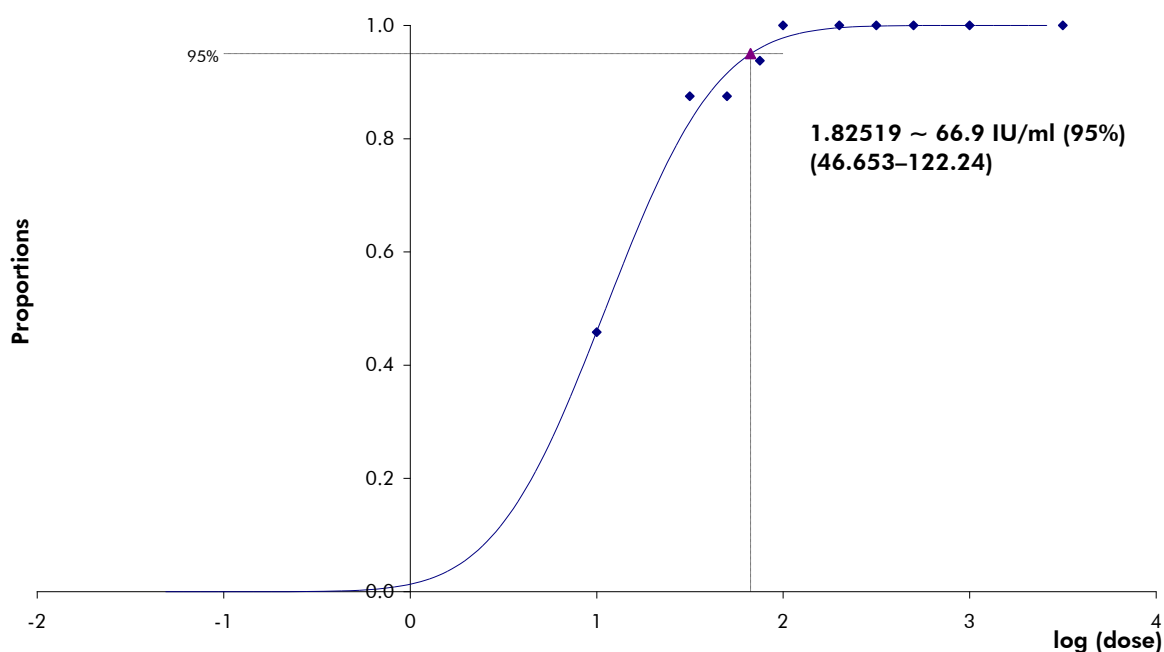


Figure 2 Analyse probit : HI Virus-1 (Rotor-Gene 6000). Sensibilité analytique tenant compte de la purification (kit QIAamp DSP Virus, QIAGEN) du kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR sur le Rotor-Gene 6000.

Spécificité

La spécificité du kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR 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 par alignement de la base de données et par cycle de PCR sur les appareils Rotor-Gene avec les génotypes suivants (voir tableau 1).

De plus, la spécificité a été validée avec 100 échantillons différents de plasma négatif pour le VIH. Ceux-ci n'ont généré aucun signal avec les amorces et les sondes spécifiques au VIH intégrées au HI Virus-1 RG Master.

Pour déterminer la spécificité du kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR, le groupe de contrôle indiqué dans le Tableau 2 a été analysé pour rechercher une éventuelle réaction croisée. Aucun des agents pathogènes testés n'a été positif. Aucune réactivité croisée n'est apparue avec les infections mixtes.

Tableau 1. Test de spécificité des génotypes importants

Virus	Génotype	Source	VIH (FAM)	Contrôle interne (ROX)
HI Virus-1	A	NIBSC*	+	+
HI Virus-1	B	NIBSC	+	+
HI Virus-1	C	NIBSC	+	+
HI Virus-1	D	NIBSC	+	+
HI Virus-1	E	NIBSC	+	+
HI Virus-1	F	NIBSC	+	+
HI Virus-1	G	NIBSC	+	+
HI Virus-1	H	NIBSC	+	+

* National Institute for Biological Standards and Control, Hertfordshire.

Tableau 2. Test de spécificité du kit avec des agents pathogènes éventuellement aptes à une réaction croisée

Groupe contrôle	HIV (Cycling Green ou Cycling A.FAM)	Contrôle interne (Cycling Orange ou Cycling A.ROX)
Virus de l'hépatite A	-	+
Virus de l'hépatite B	-	+
Virus de l'hépatite C	-	+
Herpesvirus humain 1 (virus herpès simplex 1)	-	+
Herpesvirus humain 2 (virus herpès simplex 2)	-	+
Herpesvirus humain 3 (virus de varicelle-zona)	-	+
Herpesvirus humain 5 (cytomégalovirus)	-	+

Suite du tableau page suivante

Tableau 2. Suite

Groupe contrôle	HIV (Cycling Green ou Cycling A.FAM)	Contrôle interne (Cycling Orange ou Cycling A.ROX)
Virus humain de la leucémie à cellules types 1 et 2	–	+
Entérovirus	–	+
Parvovirus B 19	–	+
Fièvre jaune	–	+
<i>Aspergillus flavus</i>	–	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	–	+
<i>Candida albicans</i>	–	+
<i>Chlamydia trachomatis</i>	–	+
<i>Cryptosporidium parvum</i>	–	+
<i>Filobasidiella neoformans</i>	–	+
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	–	+
<i>Pneumocystis carinii</i>	–	+
<i>Staphylococcus</i> sp.	–	+
<i>Streptococcus agalactiae</i>	–	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	+
<i>Streptococcus pyogenes</i>	–	+

Plage de linéarité

La plage de linéarité (mesure analytique) du kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR a été déterminée en analysant une série de dilutions d'une norme de quantification spécifique au VIH dans la plage de concentrations de

1 x 10⁸ IU/μl à 1 IU/μl. La série de dilutions a été préalablement calibrée en fonction du « 1st International HIV DNA Standard » de l'OMS.

Chaque dilution a été testée en réplicats (n = 8) en utilisant le kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR sur des instruments Rotor-Gene.

La plage de linéarité du kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR s'étend d'une concentration de 5 UI/μl à au moins 1 x 10⁸ UI/μl.

La plage de linéarité en tenant compte de la purification du kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR a été déterminée en analysant une série de dilutions du panel de quantification de l'ARN du VIH-1 OptiQuant de 1 x 10⁸ IU/ml à 120 IU/ml. La purification a été effectuée en duplicats à l'aide du kit QIAamp DSP Virus (volume d'extraction : 0,5 ml, volume d'élution : 25 μl). Chacun des 9 échantillons a été analysé à l'aide du kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. La plage de linéarité en tenant compte de la purification du kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR s'étend d'une concentration de 120 UI/μl à au moins 1 x 10⁸ UI/μl (Figure 3).

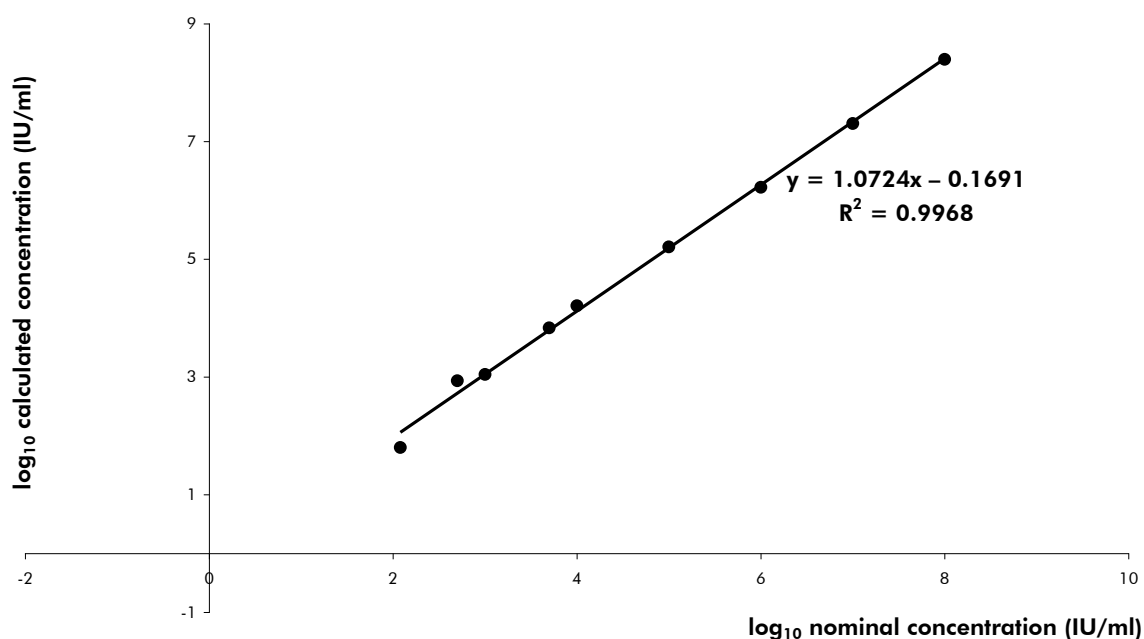


Figure 3 Plage de linéarité du kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. Calcul de la plage linéaire. La ligne droite a été déterminée par régression des concentrations log₁₀ calculées avec les concentrations log₁₀ nominales. La figure comprend l'équation de la ligne de régression.

Précision

Les données de précision du kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR ont été recueillies à l'aide d'appareils Rotor-Gene et permettent de déterminer la variance totale de l'essai. 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

généralisés 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). Les données obtenues ont été utilisées pour déterminer l'écart-type, la variance et le coefficient de variation aussi bien pour la PCR spécifique du pathogène que pour la PCR du contrôle interne.

Les données de précision du kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR ont été recueillies à l'aide de la norme de quantification ayant la plus faible concentration (QS4 ; 10 IU/ μ l). Les essais ont été effectués en 8 réplicats. Les données de précision ont été calculées en se basant sur les valeurs de C_T des courbes d'amplification (C_T : cycle seuil, voir le tableau 3). Sur la base de ces résultats, la variance totale d'un échantillon de concentration donnée est donc de 1,66% (C_T) et 2,15% (C_T) pour la détection du contrôle interne. Ces valeurs sont basées sur l'ensemble de chacune des valeurs des variabilités déterminées.

Tableau 3. Données de précision à partir des valeurs C_T

	Valeurs de C_T	Écart type	Coefficient de variation (%)
Variabilité intra-essai : HI Virus-1 RG QS 4	35,62	0,45	1,26
Variabilité intra-essai : Contrôle interne	31,24	0,18	0,58
Variabilité inter-essai : HI Virus-1 RG QS 4	35,75	0,56	1,55
Variabilité inter-essai : Contrôle interne	31,65	0,36	1,13
Variabilité inter-lot : HI Virus-1 RG QS 4	35,40	0,61	1,73
Variabilité inter-lot : Contrôle interne	31,20	0,55	1,76
Variance totale : HI Virus-1 RG QS 4	35,58	0,59	1,66
Variance totale : Contrôle interne	31,40	0,67	2,15

Fiabilité

La vérification de la fiabilité permet de déterminer le taux d'échec total du kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. 100 échantillons de plasma négatifs pour le VIH

sont inoculés avec 4,5 UI/ml d'ADN de VIH de contrôle (trois fois la concentration de la limite de sensibilité analytique). Après extraction avec le kit QIAamp DSP Virus, ces échantillons ont été analysés avec le kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. Pour tous les échantillons de VIH, le taux d'échec était de 0 %. En outre, la fiabilité du contrôle interne a été vérifiée par la procédure d'extraction et par l'analyse de 100 échantillons de plasma négatifs pour le VIH. Le taux d'échec total était de 0%. Aucune inhibition n'a été observée. Par conséquent, la fiabilité du kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR est de ≥ 99 %.

Reproductibilité

Les données de reproductibilité sont fournies dans le but de procéder à une évaluation régulière de la performance du kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR et d'en comparer l'efficacité avec d'autres produits. Ces données proviennent de programmes d'étude de performance établis.

Évaluation de diagnostic

Le kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR a fait l'objet d'une étude d'évaluation. En comparant le kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR au test COBAS® TaqMan® HIV-1, 241 échantillons de plasma ont été analysés de manière rétrospective. Tous les échantillons de plasma avaient préalablement été analysés comme positifs ou négatifs à l'aide du test COBAS TaqMan HIV-1 pour les diagnostics de routine.

L'ARN de VIH dédié au kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR a été isolé en utilisant le kit QIAamp DSP Virus, puis analysé sur l'appareil Rotor-Gene 6000. Pour l'étude comparative avec le test COBAS TaqMan HIV-1, de l'ARN de VIH a été isolé selon les instructions du fabricant fournies dans la notice d'emballage. Les résultats obtenus à l'aide du kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR ont été comparés à ceux du test COBAS TaqMan HIV-1 (voir le Tableau 4 et la Figure 4).

105 des 126 échantillons testés positifs avec le test COBAS TaqMan HIV-1 se sont également avérés positifs avec le kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. 113 des 115 échantillons testés négatifs avec le test COBAS TaqMan HIV-1 se sont également avérés négatifs avec le kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR.

Si on prend comme référence les résultats du test COBAS TaqMan HIV-1, la sensibilité diagnostique est de 98,1 % et la spécificité diagnostique est de 84,3 %.

Tableau 4. Résultats des 241 échantillons de plasma sur EDTA ayant fait l'objet d'une analyse rétrospective

		Test COBAS TaqMan HIV-1		
		+	-	Total
Kit <i>artus</i>	+	105	21	126
HI Virus-1 RG RT-PCR	-	2	113	115

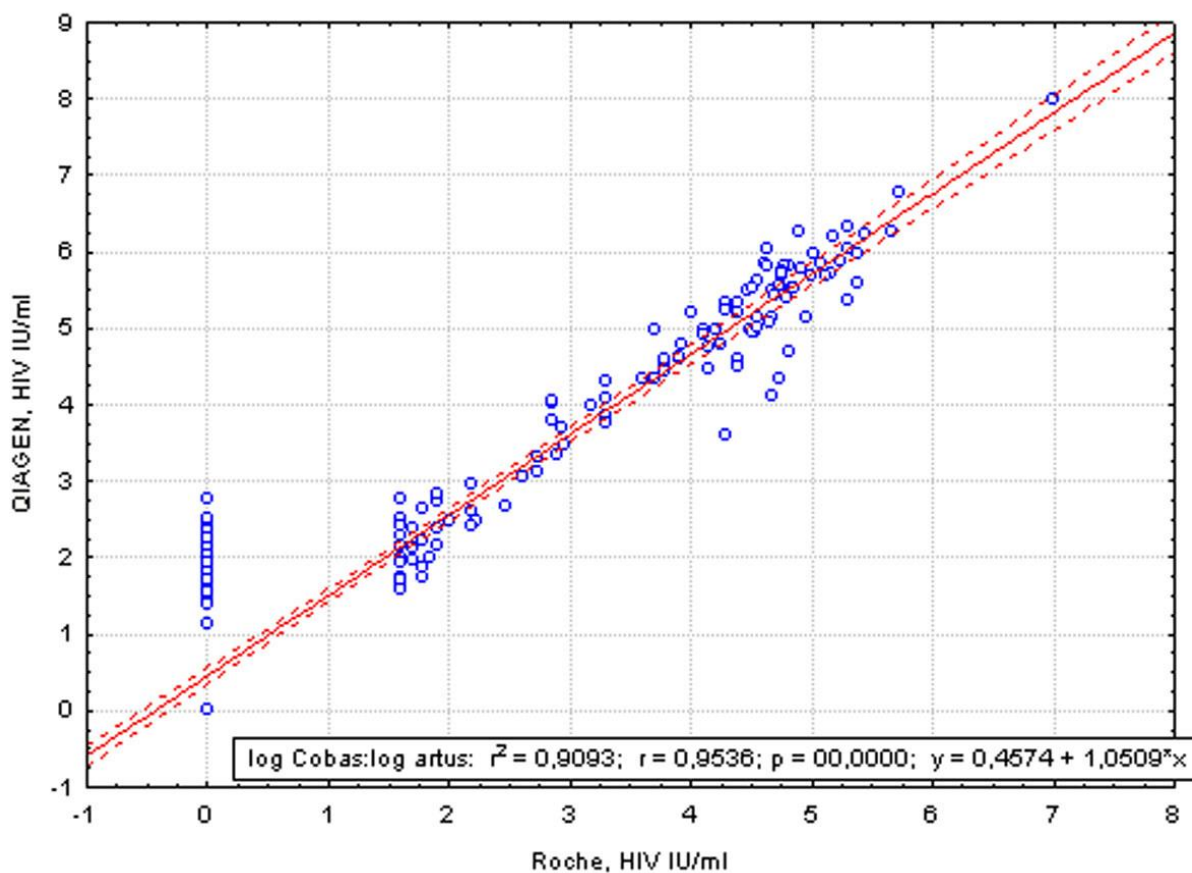


Figure 4 Comparaison du test COBAS TaqMan HIV-1 (Roche, VIH ; avec purification des échantillons via le système COBAS AmpliPrep) au kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR (QIAGEN, VIH ; avec purification des échantillons via le kit QIAamp DSP Virus). La corrélation des résultats quantitatifs des deux systèmes de test (tableau 4) a été analysée à l'aide d'une régression linéaire. Les résultats des deux kits sont représentés sous la forme d'un diagramme de dispersion XY avec une double échelle logarithmique (log-log).

Équipement et réactifs devant être fournis par l'utilisateur

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

- Kit d'extraction d'ARN (voir « Extraction de l'ARN », page 24)
- Pipettes (réglables) *
- Cônes de pipettes stériles munis de filtres
- Mixeur Vortex*
- Centrifugeuse de paillasse* avec rotor pour tubes réactionnels de 2 ml
- Appareil Rotor-Gene Q ou Rotor-Gene* avec canaux de fluorescence Cycling Green et Cycling Orange ou avec canaux de fluorescence Cycling A.FAM et Cycling A.ROX
- Logiciel Rotor-Gene Q, version 1.7.94 (logiciel Rotor-Gene 6000, versions 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94 ; logiciel Rotor-Gene 3000, version 6.0.23) ou supérieure
- Strip Tubes and Caps (rangées de tubes et de bouchons), 0,1 ml, pour utilisation avec un rotor à 72 puits (référence 981103 ou 981106)
- Éventuellement : PCR Tubes (tubes pour réaction de PCR), 0,2 ml, pour utilisation avec un rotor à 36 puits (référence 981005 ou 981008)
- Cooling block (bloc réfrigérant) (Loading Block 72 x 0,1 ml Tubes (bloc de chargement de tubes), référence 9018901, ou Loading Block 96 x 0,2 ml Tubes (bloc de chargement de tubes), référence 9018905)

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

† Le kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR ne doit 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.
- Conserver et purifier les éléments positifs (échantillons, contrôles positifs et amplicons) séparément des autres réactifs et les ajouter au mélange réactionnel dans une autre pièce.
- 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 ou en mélangeant par vortexages brefs et répétés) et centrifuger brièvement.
- Travailler rapidement et laisser les composants dans de la glace ou dans le bloc réfrigérant (bloc de chargement pour rotor à 72/96 puits).

Prélèvement, stockage et transport d'échantillon

i Tous les échantillons doivent être considérés comme potentiellement infectieux.

Seuls les prélèvements suivants sont admissibles, pour lesquels les règles suivantes concernant la collecte, le transport et le stockage doivent être strictement respectées.

i Les données disponibles jusqu'à présent indiquent que le plasma recueilli sur EDTA ou sur citrate est le matériel de prélèvement le plus approprié pour la détection du VIH. Il est donc recommandé d'utiliser ces prélèvements avec le kit *artus HI Virus-1 RG RT-PCR*.

La validation interne du kit *artus HI Virus-1 RG RT-PCR* a été effectuée avec des échantillons de plasma humain prélevé sur EDTA. Les autres prélèvements ne sont pas validés. Utiliser uniquement le kit d'extraction d'ARN recommandé (voir « **Extraction de l'ARN** », page 24) pour la préparation des échantillons.

Avec certains matériaux de prélèvement, les instructions suivantes de prélèvement, de conservation et de transport doivent impérativement être respectées.

Prélèvement des échantillons

Chaque prise de sang représente une blessure des vaisseaux sanguins (artères, veines, capillaires). N'utiliser que du matériel stérile et sans danger. Des

seringues jetables pour les prélèvements sanguins sont disponibles. Pour la ponction veineuse, il est recommandé de ne pas utiliser de canules trop fines. Le prélèvement sanguin veineux devrait avoir lieu à un endroit approprié dans le pli du coude, de l'avant-bras ou sur le dos de la main. Le sang doit être recueilli dans des tubes standard (bouchon rouge, Sarstedt ou tubes équivalents d'un autre fabricant). Un volume de 5 – 10 ml de sang sur EDTA devrait être prélevé. Les tubes avec additifs devraient être mélangés immédiatement après prélèvement en les inversant plusieurs fois (8 fois, sans agiter).

i Ne pas utiliser de prélèvement provenant de personnes traitées par héparine (voir « Substances interférentes », 23).

Conservation des échantillons

Le sang total devrait être séparé en plasma et constituants cellulaires dans un délai de six heures par centrifugation à 800 - 1 600 x g pendant 20 minutes. Le plasma doit être transféré dans un tube de polypropylène stérile. Une congélation/décongélation répétée ou une conservation trop prolongée des échantillons peut nuire à la performance du test. L'ARN enveloppé par le virus peut être conservé à +4°C pendant quelques jours, à -20°C pendant quelques semaines et à -70°C pendant quelques mois et jusqu'à des années.*

Transport des échantillons

Le prélèvement devrait être envoyé dans un récipient incassable. Ceci permettrait d'éviter un danger éventuel d'infection ou une perte d'échantillon en cas de fuite. Les échantillons doivent être envoyés conformément aux réglementations locales et nationales en vigueur en matière de transport de matériel potentiellement contaminé.†

Le temps de transport ne doit pas excéder six heures. Une conservation sur place est à déconseiller. Il est possible d'envoyer les échantillons par voie postale, si les réglementations prescrites par la loi sont respectées. Nous recommandons d'expédier l'échantillon par courrier express. Les échantillons sanguins doivent être expédiés sous forme réfrigérée (2 à 8 °C) et le plasma sous forme congelée (-15 à -30°C).

Substances interférentes

Des valeurs élevées de bilirubine (≤ 15 mg/dl) et de lipides (≤ 800 mg/dl) ainsi que des échantillons hémolytiques n'ont aucune influence sur le système. L'héparine (≥ 10 UI/ml) peut nuire à la PCR. Il est déconseillé d'utiliser des échantillons qui ont été prélevés dans des tubes contenant de l'héparine comme anticoagulant. De même, les échantillons de patients héparinés ne doivent pas être utilisés.

Arbeitskreis Blut, V17 (09.1997), Bundesgesundheitsblatt 11/1997, p. 452–456.

† International Air Transport Association (Association internationale du transport aérien, IATA).
Dangerous Goods Regulations (Règlement sur le transport des matières dangereuses).

Extraction de l'ARN

Le kit QIAamp DSP Virus (QIAGEN, référence 60704) est validé pour la purification d'ARN viral à partir de plasma humain pour une utilisation avec le kit HI Virus-1 RG RT-PCR. Effectuer la purification de l'ARN viral selon les instructions figurant dans le manuel du kit *QIAamp DSP Virus (QIAamp DSP Virus Kit Handbook)*.

i 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 kit QIAamp DSP Virus, il est recommandé de procéder selon les directives relatives à la reconstitution et la conservation de l'ARN entraîneur du manuel accompagnant le kit d'extraction (« Préparation des réactifs et des tampons »).

Avant le début de chaque extraction, un mélange de tampon de lyse et d'ARN entraîneur (et éventuellement de contrôle interne, voir « Contrôle interne », ci-dessous) doit être fraîchement préparé selon le schéma de pipetage présenté dans le tableau 5.

Tableau 5. Schéma de pipetage pour une utilisation avec le kit QIAamp DSP Virus

Nombre d'échantillons	1	12
Tampon de lyse (AL)*	550 µl	6600 µl
ARN entraîneur (1 µg/µl)	6,2 µl	74,4 µl
Volume total	556,2 µl	6674,4 µl
Volume par extraction	500 µl	500 µl chacun

* Contient du chlorhydrate de guanidine ; voir le manuel du kit *QIAamp DSP Virus (QIAamp DSP Virus Kit Handbook)* pour les informations de sécurité.

① 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.

① Le contrôle interne du kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR peut être utilisé directement dans la procédure d'extraction (voir « **Contrôle interne** », ci-dessous).

Contrôle interne

Un contrôle interne (HI Virus-1 RG IC) est fourni. Cela permet à l'utilisateur de contrôler la procédure d'isolement d'ARN et de vérifier la survenue éventuelle d'une inhibition de la PCR. Pour cette application, ajouter le contrôle interne dans un rapport de 0,1 μ l pour 1 μ l de volume d'élution pendant la procédure d'extraction. Par exemple, l'utilisation du kit QIAamp DSP Virus implique l'élution de l'ARN dans 60 μ l de tampon d'élution (AVE). Il convient donc d'ajouter initialement 6 μ l de contrôle interne.

① Le contrôle interne et l'ARN entraîneur (voir « **Extraction de l'ARN** », page 24) 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 cas d'addition au tampon de lyse, bien noter que mélange de contrôle interne et de tampon de lyse/ARN entraîneur doit être préparé fraîchement et utilisé immédiatement (la conservation de ce mélange à température ambiante ou au réfrigérateur, même pour quelques heures, peut entraîner le dysfonctionnement du contrôle interne et diminuer l'efficacité de l'extraction).

① Ne pas pipeter le contrôle interne et l'ARN entraîneur directement dans l'échantillon.

Il est également possible d'utiliser le contrôle interne exclusivement pour mettre en évidence une éventuelle inhibition de la PCR. Pour cette application, ajouter le contrôle interne directement au mélange de HI Virus-1 RG Master A et de HI Virus-1 RG Master B, comme décrit à l'étape 2b du protocole (page 29).

Configuration du seuil pour l'analyse de PCR

Il convient de définir empiriquement les paramètres du seuil optimal pour une combinaison appareil Rotor-Gene Q et kit *artus* RG PCR en testant chaque combinaison différente, étant donné qu'il s'agit là d'une valeur relative dépendant du flux de travail diagnostic global. Pour commencer, on peut fixer le seuil à une valeur préliminaire de 0,04 pour l'analyse du premier cycle de PCR, mais il faut réajuster cette valeur par une analyse comparative des cycles suivants du flux de travail. Le seuil doit être réglé manuellement juste au-dessus

du signal de fond des contrôles négatifs et des échantillons négatifs. La valeur moyenne du seuil calculée à partir de ces expériences doit fonctionner pour la majorité des cycles suivants, mais l'utilisateur doit néanmoins revoir la valeur de seuil établie à intervalles réguliers. La valeur de seuil se situe généralement dans une plage de 0,03 à 0,05 et doit être arrondie à trois chiffres après la virgule au maximum.

Quantification

Les normes de quantification fournies (HI Virus-1 RG QS 1–4) doivent être manipulées comme des échantillons purifiés et utilisées avec le même volume (20 μ l). Pour générer une courbe standard avec les appareils Rotor-Gene Q, il faut utiliser et définir les 4 normes de quantification de la boîte de dialogue « Edit Samples » (Modifier échantillons) comme les normes aux concentrations spécifiées (cf. manuel d'utilisation de l'appareil).

① Les normes de quantification sont exprimées en UI/μl.* Pour convertir les valeurs déterminées à l'aide de la courbe standard en UI/ml d'échantillon, utiliser la formule suivante :

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

Par principe, le volume initial d'échantillon doit être saisi dans l'équation ci-dessus. Il faut le prendre en compte quand le volume d'échantillon a été modifié avant extraction de l'acide nucléique (p. ex. en réduisant le volume par centrifugation ou en l'augmentant par ajout au volume nécessaire à l'isolation).

Facteur de conversion

1 IU/ml correspond à 0,50 copies/ml pour la détection de l'ARN du VIH-1 sur l'appareil Rotor-Gene Q en combinaison avec la préparation manuelle d'échantillon utilisant le kit QIAamp DSP Virus. Le facteur de conversion est une approximation basée sur un facteur moyen pour l'ensemble de la plage dynamique de l'essai.

* La norme a été calibrée à partir de la norme International HIV standard (OMS).

Protocole : PCR et analyse des données

Remarques importantes avant de commencer

- Avant de commencer la procédure, lire « **Remarques importantes** », pages 22–26.
- 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 au moins une norme de quantification et au moins un contrôle négatif (eau, grade PCR). Pour créer une courbe standard, utiliser les 4 normes de quantification fournies (HI Virus-1 RG QS 1–4) pour chaque cycle de PCR.

Étapes préliminaires

- S'assurer que le bloc réfrigérant (accessoire de l'appareil Rotor-Gene Q) ait été préalablement refroidi à 2–8 °C.
- Avant le début du test, décongeler complètement tous les réactifs à température ambiante, bien les mélanger (aspirer et rejeter plusieurs fois à l'aide de la pipette ou agiter brièvement à l'aide d'un vortex) et, immédiatement après, les centrifuger brièvement.

Procédure

- 1. Placer le nombre souhaité de tubes réactionnels pour PCR dans les adaptateurs du bloc réfrigérant.**
- 2. Si vous utilisez le contrôle interne pour surveiller la procédure d'isolement de l'ARN et une éventuelle inhibition de la PCR, suivre l'étape 2a. Si vous utilisez le contrôle interne exclusivement pour mettre en évidence une inhibition de la PCR, suivre l'étape 2b.**
 - 2a. Le contrôle interne a déjà été ajouté au milieu d'extraction (voir « Contrôle interne », page 25). Dans ce cas, préparer un mélange maître, tel que décrit dans le tableau 6.**

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

Tableau 6. Préparation du mélange maître (contrôle interne utilisé pour surveiller l'extraction de l'ARN et déceler une éventuelle inhibition de la PCR)

Nombre d'échantillons	1	12
HI Virus-1 RG Master A	12 μ l	144 μ l
HI Virus-1 RG Master B	18 μ l	216 μ l
HI Virus-1 RG IC	0 μ l	0 μ l
Volume total	30 μl	360 μl

2b. Le contrôle interne doit être ajouté directement au mélange de HI Virus-1 Master A et HI Virus-1 Master B. Dans ce cas, préparer un mélange master conformément au tableau 7.

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

Tableau 7. Préparation du mélange maître (contrôle interne utilisé exclusivement pour surveiller une éventuelle inhibition de la PCR)

Nombre d'échantillons	1	12
HI Virus-1 RG Master A	12 μ l	144 μ l
HI Virus-1 RG Master B	18 μ l	216 μ l
HI Virus-1 RG IC	2 μ l	24 μ l
Volume total	32 μl*	384 μl*

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

3. Distribuer 30 μ l de mélange maître dans chaque tube de PCR. Ajouter ensuite 20 μ l de l'échantillon d'ARN élué (voir le tableau 8). De manière correspondante, 20 μ l d'au moins une norme de quantification (HI Virus-1 RG QS 1–4) doivent être utilisés comme contrôle positif et 20 μ l d'eau (eau de grade PCR) comme contrôle négatif.

Tableau 8. Préparation de la réaction de PCR

Nombre d'échantillons	1	12
Mélange principal	30 μ l	30 μ l chacun
Echantillon	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'ARN du VIH-1, créer un profil de thermocyclage en suivant les étapes ci-après.**

Définition des paramètres généraux d'analyse	Figures 5, 6, 7
Transcription inverse de l'ARN	Figure 8
Activation initiale de l'enzyme à démarrage à chaud	Figure 9
Amplification de l'ADNc	Figure 10
Ajustement de la sensibilité des canaux de fluorescence	Figure 11
Démarrage du cycle	Figure 12

Toutes les spécifications se réfèrent au logiciel Rotor-Gene Q, version 1.7.94, aux logiciels Rotor-Gene 6000, versions 1.7.65, 1.7.87 et 1.7.94 ; et au logiciel Rotor-Gene 3000, version 6.0.23. 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. Les illustrations sont fournies pour les appareils RotorGene Q. Si des valeurs différentes sont requises pour le Rotor-Gene 3000, celles-ci sont décrites dans le texte.

6. Tout d'abord, ouvrir la boîte de dialogue « New Run Wizard » (Assistant de lancement d'un nouveau cycle) (Figure 5). Cocher la case « Locking Ring Attached » (Anneau de blocage posé) et cliquer sur « Next » (Suivant).

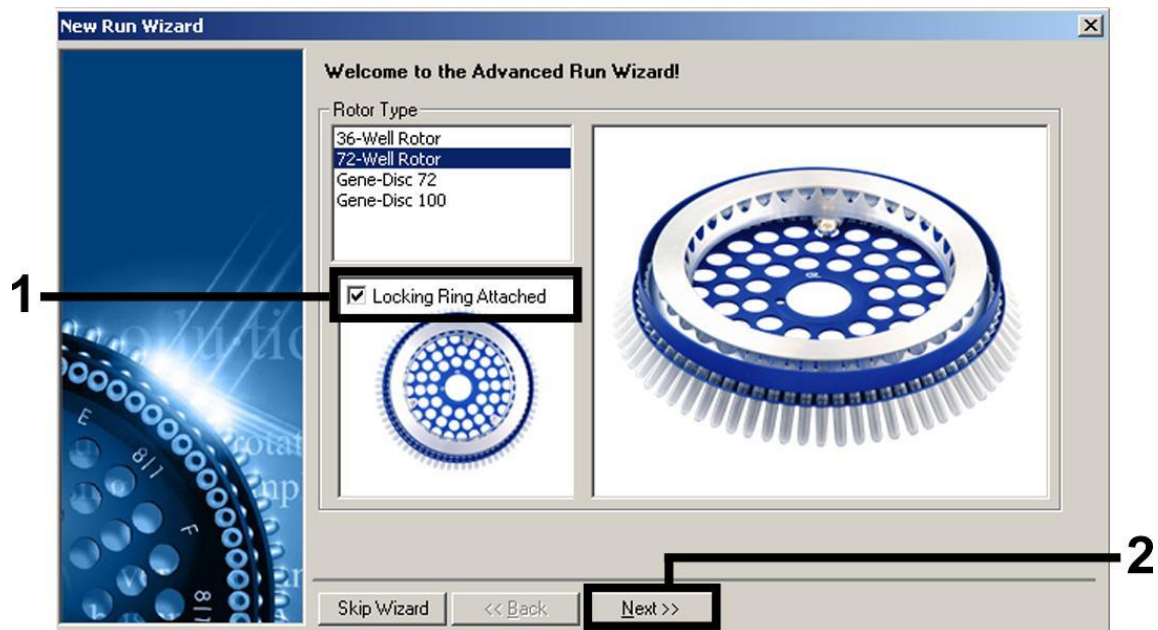


Figure 5. Boîte de dialogue « New Run Wizard ».

7. Sélectionner 50 pour le volume de réaction de la PCR et cliquer sur « Next » (figure 6).

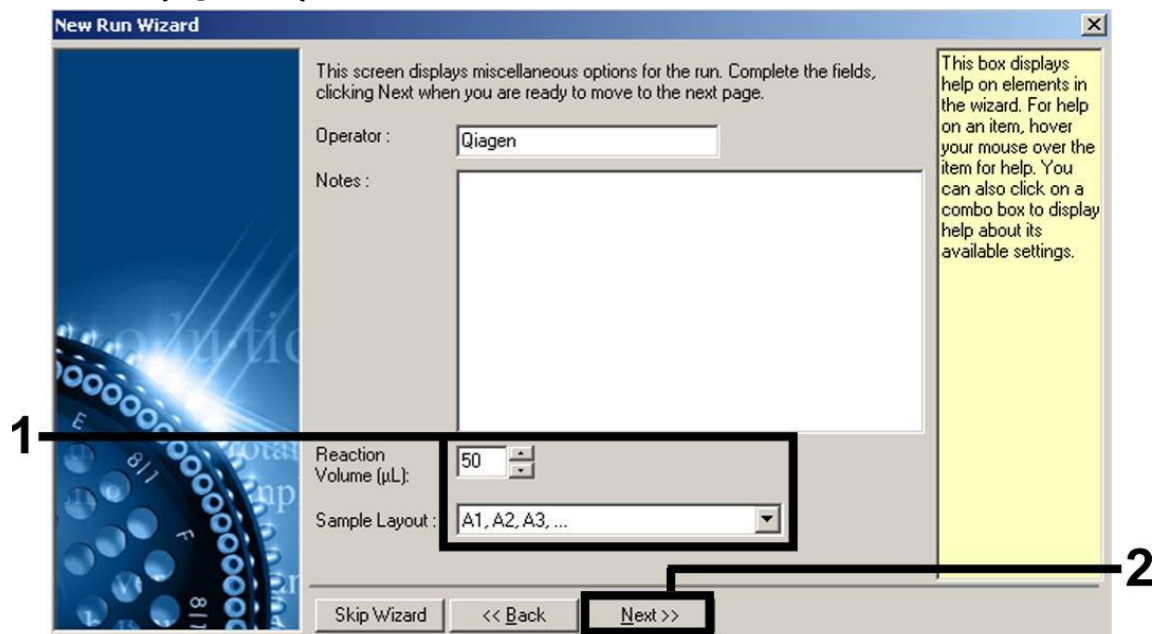


Figure 6. Définition des paramètres généraux d'analyse.

8. Dans la boîte de dialogue « New Run Wizard », cliquer sur le bouton « Edit Profile » (Modifier profil) (Figure 7) et programmer le profil de température comme indiqué sur les figures 7-10).

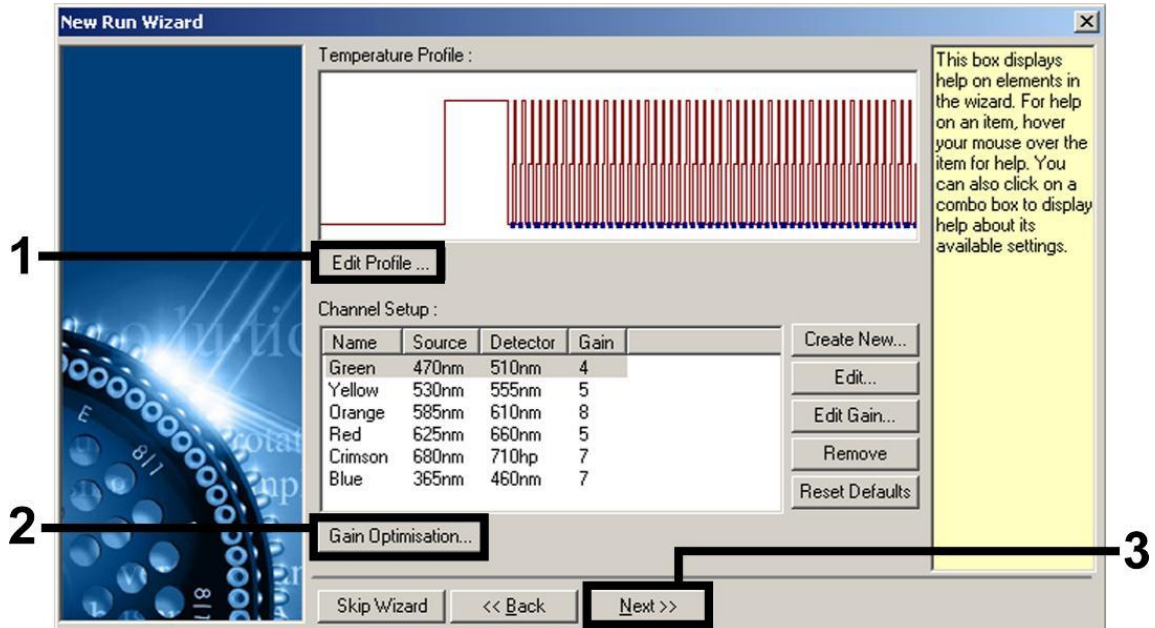


Figure 7. Modification du profil.

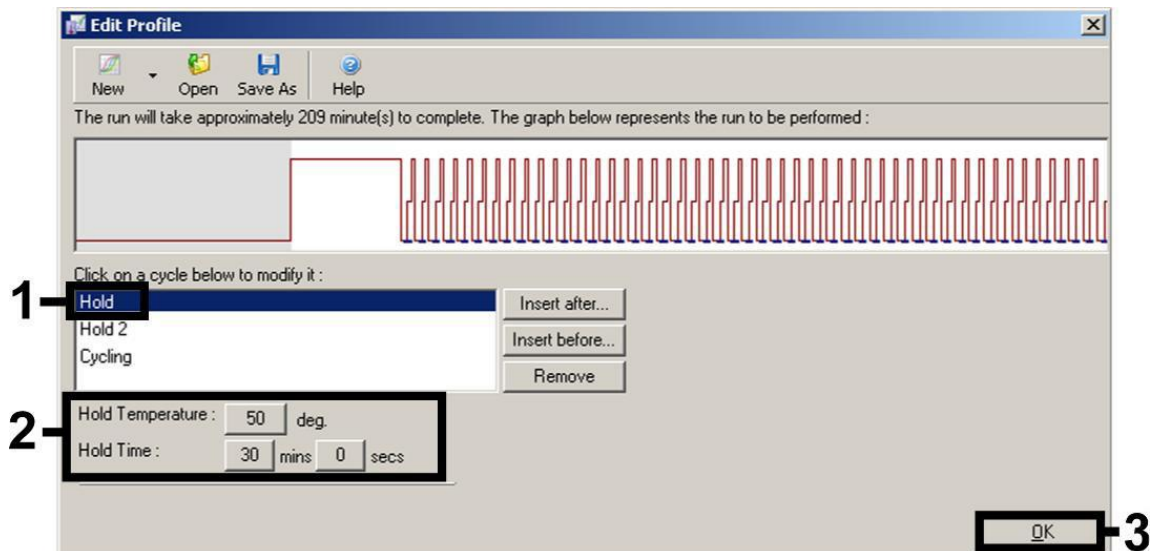


Figure 8 Transcription inverse de l'ARN.

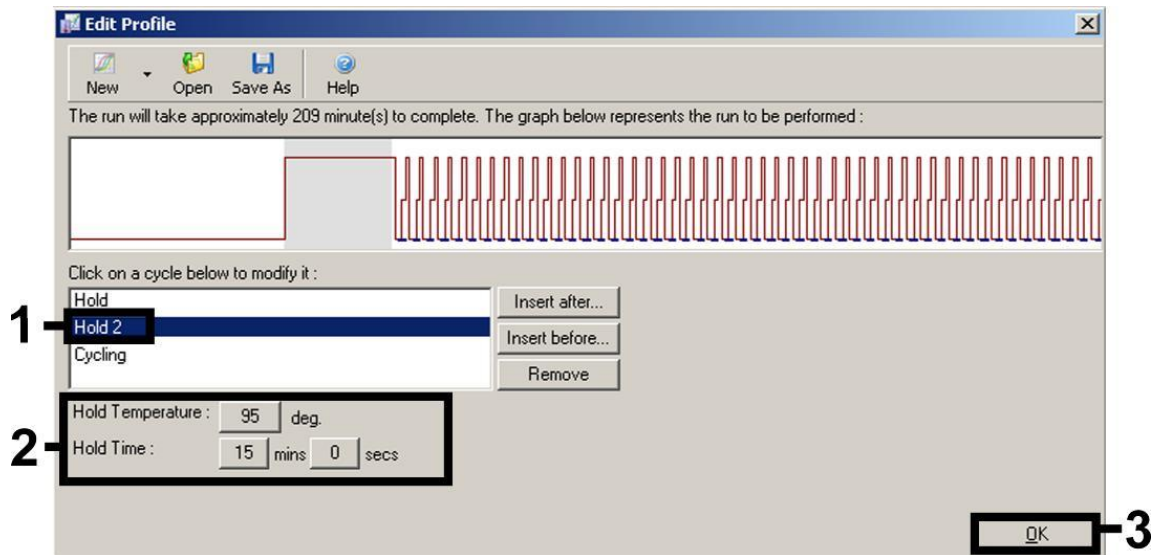


Figure 9 Activation initiale de l'enzyme à démarrage à chaud (hot-start).

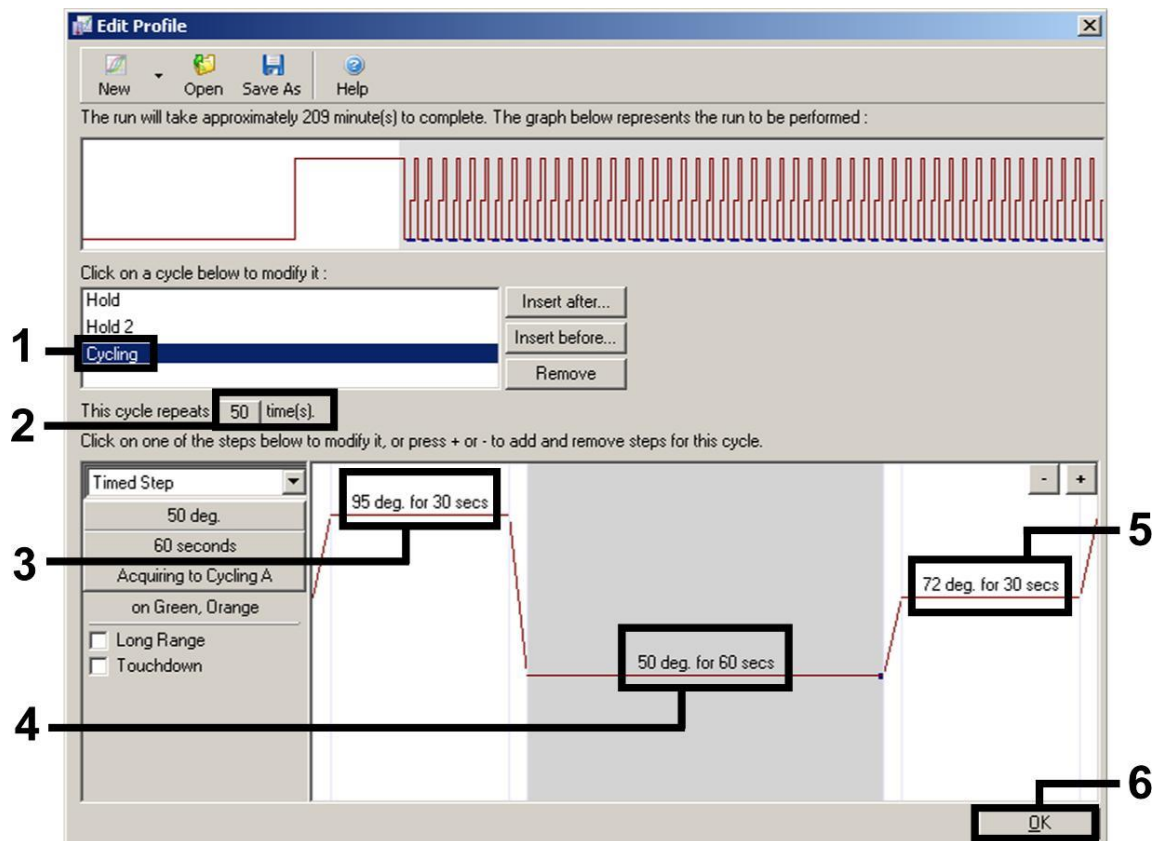


Figure 10. Amplification de l'ADNc. Il convient de noter que sur le Rotor-Gene 3000, le logiciel définit les marqueurs de fluorescence comme « FAM/Sybr, ROX ».

9. La plage 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) (cf. figure 7) pour ouvrir la boîte de dialogue « Auto-Gain Optimisation Setup » (Configuration de l'optimisation du gain automatique). Régler la température de

calibration à 50 pour qu'elle corresponde à la température d'hybridation du programme d'amplification (Figure 11).

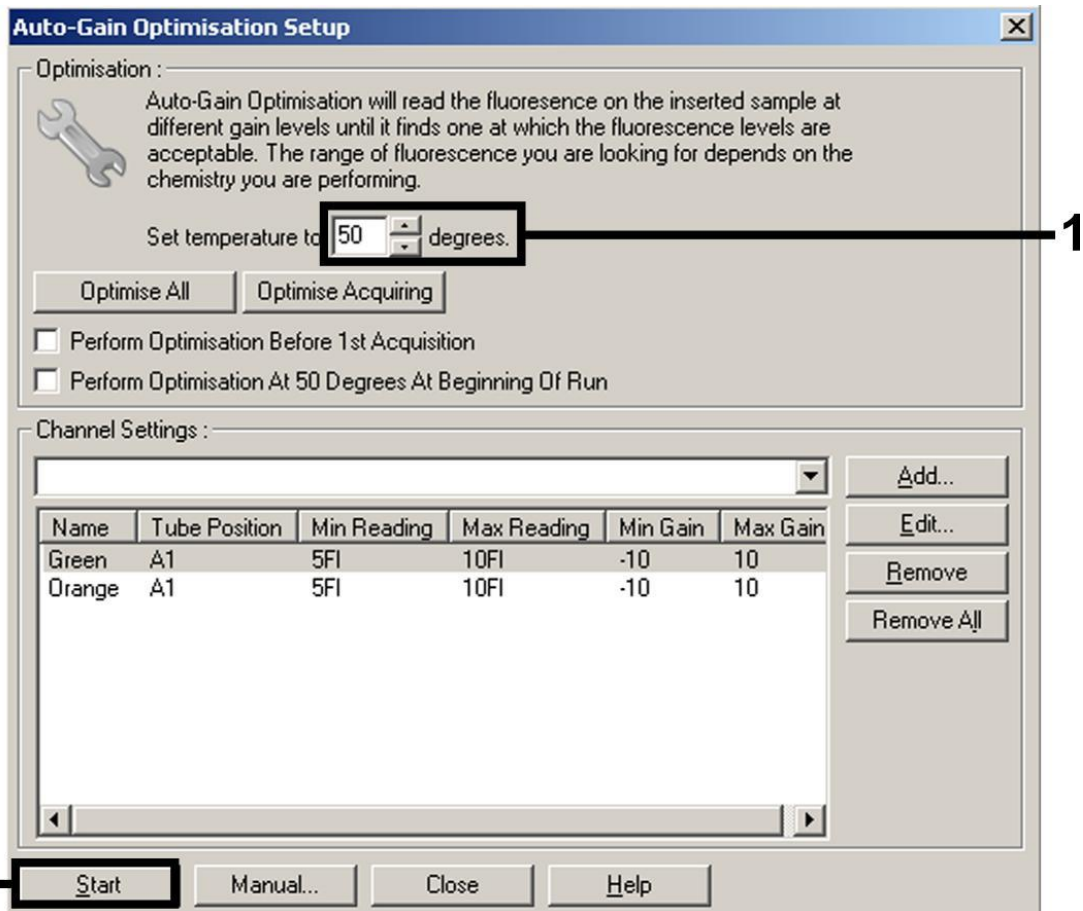


Figure 11. Ajustement de la sensibilité des canaux de fluorescence. Il convient de noter que sur le Rotor-Gene 3000, le logiciel définit les marqueurs de fluorescence comme « FAM/Sybr » et « ROX ».

- 10. Les valeurs de gain déterminées par la calibration des canaux sont automatiquement enregistrées et répertoriées dans la dernière fenêtre de menu de la procédure de programmation (figure 12). Cliquer sur « Start Run » (Démarrer le cycle).**

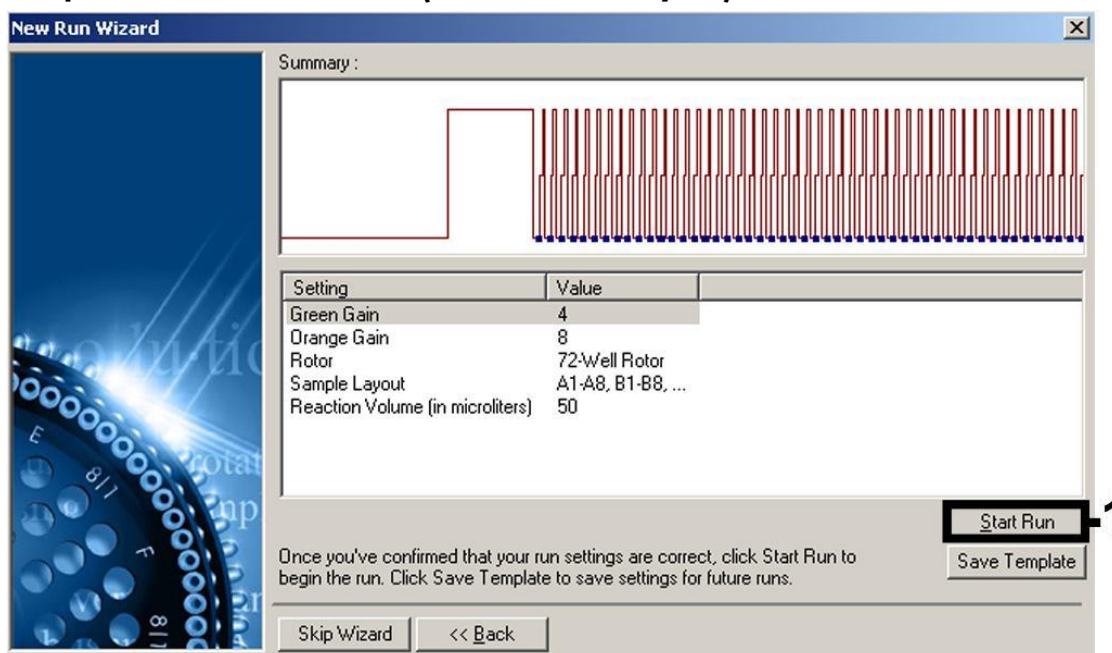


Figure 12 Démarrage du cycle. Il convient de noter que sur le Rotor-Gene 3000, le logiciel définit les marqueurs de fluorescence comme « FAM/Sybr » et « ROX ».

11. Les résultats suivants (11a, 11b et 11c) sont possibles.

Les figures 13 et 14 donnent des exemples de réactions PCR positive et négative.

Le tableau 9 présente les consignes d'interprétation des résultats quantitatifs.

11a. Un signal est détecté dans le canal de fluorescence Cycling Green.

Le résultat de l'analyse est positif : l'échantillon contient de l'ARN de VIH-1.

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



Il convient de noter que sur le Rotor-Gene 3000, les canaux pertinents sont le Cycling A.FAM pour le signal positif et le Cycling A.ROX pour le contrôle interne.

11b. Aucun signal n'est détecté dans le canal de fluorescence Cycling Green. En même temps, un signal provenant du contrôle interne apparaît dans le canal Cycling Orange.
Aucun ARN du VIH-1 ne peut être détecté dans l'échantillon. On peut alors le considérer comme négatif.

En cas de PCR négative du virus HI Virus-1 RT-PCR, le signal détecté du contrôle interne exclut la possibilité d'une inhibition de la RT-PCR.

i Il convient de noter que sur le Rotor-Gene 3000, les canaux pertinents sont le Cycling A.ROX pour le contrôle interne et une absence de signal pour le Cycling A.FAM.

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

Pour des informations sur les sources d'erreur et leurs solutions, voir « Résolution des principaux problèmes rencontrés », page 38.

i Il convient de noter que sur le Rotor-Gene 3000, les canaux pertinents sont le Cycling A.FAM et le Cycling A.ROX.

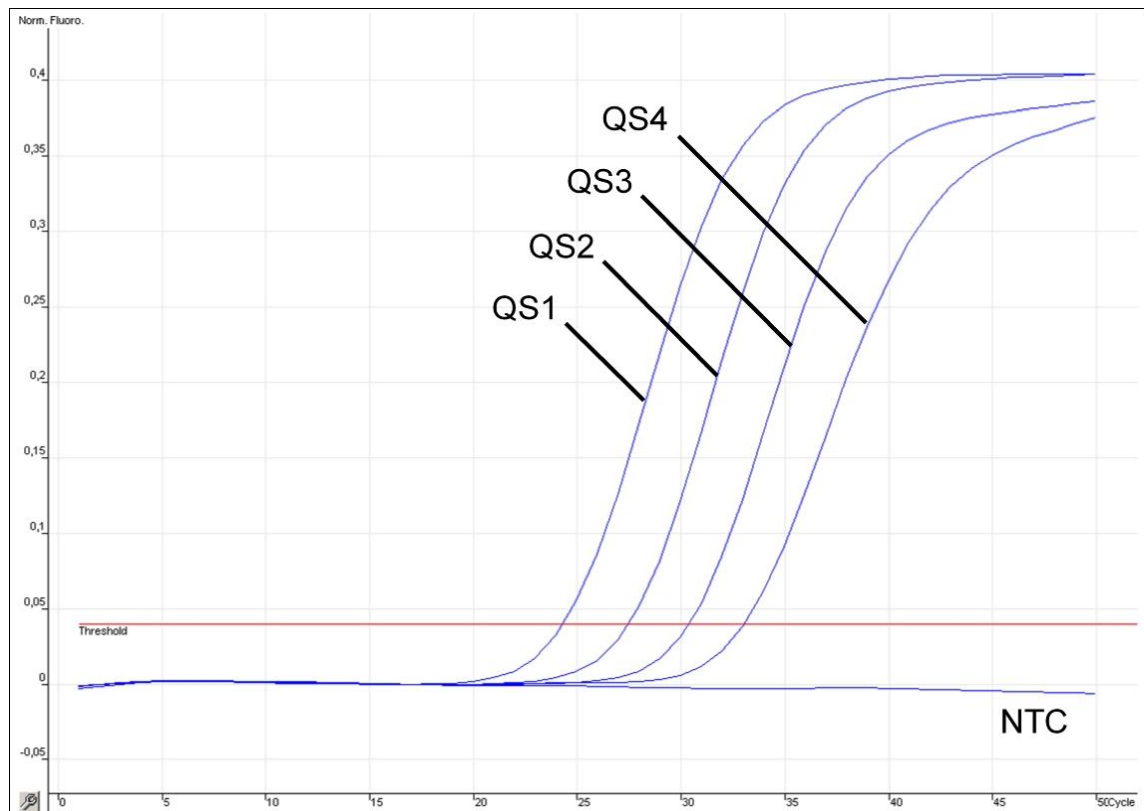


Figure 13 Détection des normes de quantification (HI Virus-1 RG QS 1-4) dans le canal de fluorescence Cycling Green. NTC : Contrôle sans matrice (contrôle négatif).

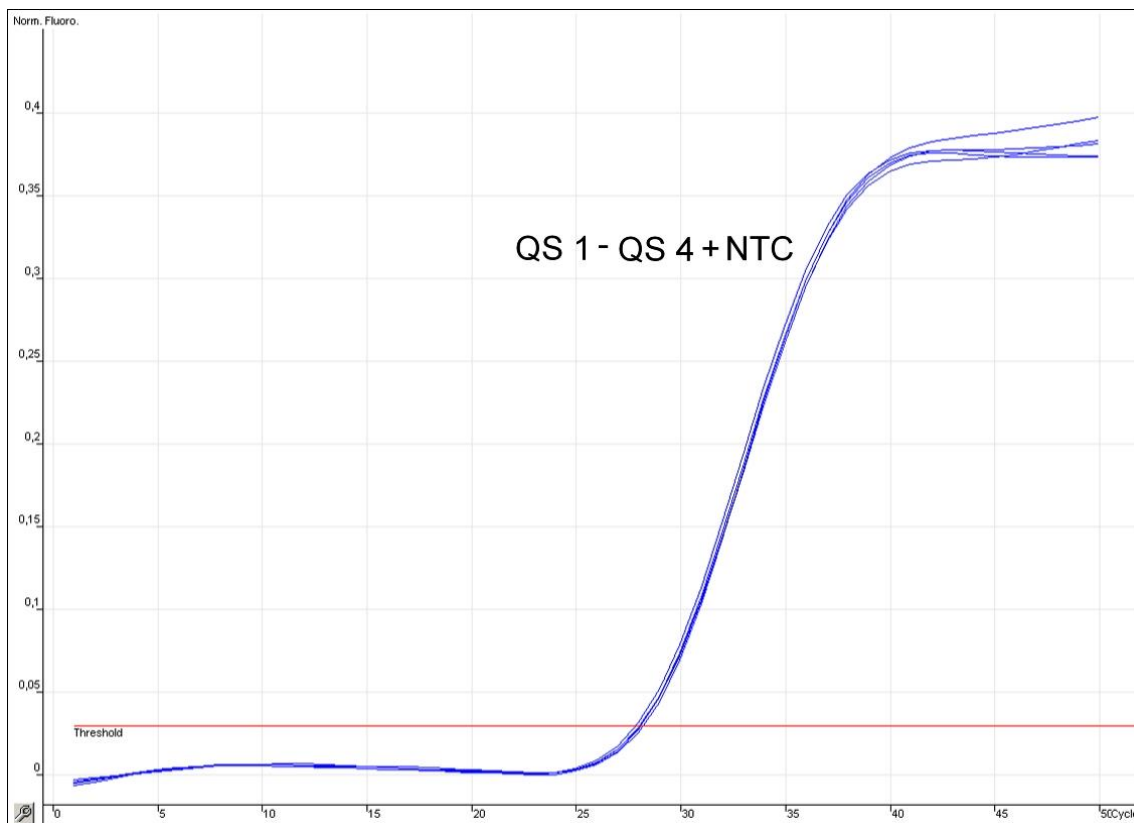


Figure 14 Détection du contrôle interne (IC) dans le canal de fluorescence Cycling Orange avec amplification simultanée des normes de quantification (HI Virus-1 RG QS 1-4). NTC : Contrôle sans matrice (contrôle négatif).

Tableau 9. Interprétation des résultats quantitatifs






Résultat	Interprétation
ARN du VIH >72 IU/ml	Le résultat se situe dans la plage de test déterminée. La probabilité de détection de l'ARN du VIH est >95 %. Le résultat positif du test est statistiquement garanti.
ARN du VIH <72 IU/ml	Le résultat se situe hors de la plage de test déterminée. La reproductibilité du résultat positif n'est pas garantie.
ARN du VIH négatif	Aucun ARN du VIH n'a été détecté.

Résolution des principaux problèmes rencontrés

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

Commentaires et suggestions

Pas de signal avec les contrôles positifs (HI Virus-1 RG QS 1–4) dans le canal de fluorescence Cycling Green ou Cycling A.FAM

- | | |
|--|--|
| a) Le canal de fluorescence sélectionné pour l'analyse des données de PCR n'est pas conforme au protocole |  Pour l'analyse des données, sélectionner le canal de fluorescence Cycling Green ou Cycling A.FAM pour la RT-PCR analytique d'VIH et le canal de fluorescence Cycling Orange ou Cycling A.ROX pour la RT-PCR du contrôle 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 28. |
| c) Mauvaise configuration de la PCR |  Vérifier les étapes de la procédure à l'aide d'un schéma de pipetage et recommencer la PCR si nécessaire. Voir « Protocole : PCR et analyse des données », page 28. |
| d) Les conditions de stockage d'un ou plusieurs composants du kit ne respectaient pas les instructions fournies dans la section « Stockage » (page 7) |  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. |
| e) Le kit <i>artus</i> HI Virus-1 RG RT-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 absent du contrôle interne dans le canal de fluorescence Cycling Orange ou Cycling A.ROX et absence simultanée de signal dans le canal Cycling Green ou Cycling A.FAM

- 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
- ⓘ S'assurer que la méthode d'isolement appropriée est utilisée et respecter scrupuleusement les instructions du fabricant.
- c) De l'ARN a été perdu lors de l'extraction
- ⓘ Si le contrôle interne a été ajouté à l'extraction, l'absence de signal du contrôle interne peut indiquer la perte d'ARN en cours d'extraction. Veiller à ce que la méthode d'isolement recommandée est utilisée (voir « **Extraction de l'ARN** », page 24) 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 la section « **Stockage** » (page 7)
- ⓘ 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.
- e) Le kit *artus* HI Virus-1 RG RT-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

Signaux avec les contrôles négatifs dans le canal de fluorescence Cycling Green ou Cycling A.FAM de la PCR analytique

- a) Contamination lors de la préparation de la PCR
- ① Répéter la PCR avec de nouveaux réactifs et en réplicats.
 - ① Si possible, fermer les tubes de PCR juste après l'addition de l'échantillon à tester.
 - ① S'assurer de pipeter les contrôles 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 d'un mot-clé ou en spécifiant l'application, le domaine de recherche, le titre, etc.

Pour une bibliographie complète, consulter la Base de données bibliographique QIAGEN en ligne à l'adresse www.qiagen.com/RefDB/search.asp ou contacter les Services techniques de QIAGEN ou le distributeur local.

Pour commander

Produit	Contenu	Référence
<i>artus</i> HI Virus-1 RG RT-PCR Kit (24)	Pour 24 réactions : 2 masters, 4 normes de quantification, contrôle interne, eau (grade PCR)	4513263
<i>artus</i> HI Virus-1 RG RT-PCR Kit (96)	Pour 96 réactions : 2 masters, 4 normes de quantification, contrôle interne, eau (grade PCR)	4513265
QIAamp DSP Virus Kit — pour la purification d'acides nucléiques viraux à partir de plasma humain à fins de diagnostic in vitro		
QIAamp DSP Virus Kit	Pour 50 préparations : Colonnes de centrifugation QIAamp MinElute®, tampons, réactifs, tubes, éléments d'extension de colonne et connecteurs VacConnectors	60704
Rotor-Gene Q MDx — pour l'analyse par PCR en temps réel validée pour l'IVD dans des applications cliniques		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Thermocycleur de PCR en temps réel à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 -an pièces et main d'œuvre, installation et formation comprises	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Thermocycleur de PCR en temps réel à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 -an pièces et main d'œuvre, installation et formation non comprises	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Thermocycleur pour PCR en temps réel et analyseur « High Resolution Melt » (fusion haute résolution) à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge et pourpre) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires : garantie 1 an pièces, main d'œuvre, installation et formation comprises	9002033

Produit	Contenu	Référence
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Thermocycleur pour PCR en temps réel et analyseur « High Resolution Melt » (fusion haute résolution) à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge et pourpre) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires : garantie 1 an pièces et main d'œuvre, installation et formation non comprises	9002032
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Appareil de PCR en temps réel à 6 canaux (bleu, vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 -an pièces et main d'œuvre, installation et formation comprises	9002043
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Appareil de PCR en temps réel à 6 canaux (bleu, vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 -an pièces et main d'œuvre, installation et formation non comprises	9002042
Rotor-Gene Q — pour de remarquables performances de PCR en temps réel		
Rotor-Gene Q 5plex System	Thermocycleur de PCR en temps réel à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 -an pièces et main d'œuvre, installation et formation comprises	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Platform	Thermocycleur de PCR en temps réel à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 -an pièces et main d'œuvre, installation et formation non comprises	9001570

Produit	Contenu	Référence
Rotor-Gene Q 5plex HRM System	Thermocycleur pour PCR en temps réel et analyseur « High Resolution Melt » (fusion haute résolution) à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge et pourpre) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires : garantie 1 an pièces, main d'œuvre, installation et formation comprises	9001650
Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	Thermocycleur pour PCR en temps réel et analyseur « High Resolution Melt » (fusion haute résolution) à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge et pourpre) plus canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires : garantie 1 an pièces et main d'œuvre, installation et formation non comprises	9001580
Rotor-Gene Q 6plex System	Appareil de PCR en temps réel à 6 canaux (bleu, vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 -an pièces et main d'œuvre, installation et formation comprises	9001660
Rotor-Gene Q 6plex Platform	Appareil de PCR en temps réel à 6 canaux (bleu, vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 -an pièces et main d'œuvre, installation et formation non comprises	9001590
Accessoires du Rotor-Gene Q		
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloc en aluminium pour la préparation manuelle des tubes réactionnels à l'aide d'une pipette monocanal dans 72 tubes de 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Bloc en aluminium pour la préparation manuelle des tubes réactionnels selon le format standard 8 x 12 utilisant 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

Produit	Contenu	Référence
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)	1 000 tubes à paroi mince pour la préparation de 1 000 réactions	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1 000 tubes à paroi mince pour la préparation de 1 000 réactions	981008

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

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. Aucun brevet général ni licence d'aucune sorte autre que ce droit spécifique d'utilisation à l'achat n'est accordé par la présente.

Marques de commerce : QIAGEN®, QIAamp®, artus®, MinElute®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); COBAS®, TaqMan® (Roche Group); FAM™, ROX™ (Life Technologies Corporation); SYBR® (Molecular Probes, Inc.).

Le kit artus HI Virus-1 RG RT-PCR et le kit QIAamp DSP Virus sont des kits de diagnostic homologués 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 HI Virus-1 RG RT-PCR consent aux termes suivants :

1. Le kit artus HI Virus-1 RG RT-PCR ne doit être utilisé que conformément au manuel du kit artus BK Virus RG PCR (*artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kit Handbook*) 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 **HI Virus-1 RG RT-PCR (artus HI Virus-1 RG RT-PCR Handbook)** 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.

© 2015 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 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)



Sample & Assay Technologies