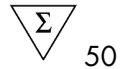


Août 2018

Manuel du QIAamp[®] DSP Virus Kit



Version 1

Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro

Le QIAamp DSP Virus Kit est un système générique utilisant une technologie de membrane à base de silice (technologie QIAamp) pour procéder à l'isolation et à la purification d'acides nucléiques viraux à partir d'échantillons de sérum ou de plasma humain à des fins de diagnostic in vitro.

IVD

CE

REF

60704

i

1114507

QIAGEN

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALLEMAGNE

R4 **MAT**

1114507FRCA

Table des matières

Contenu de la trousse.....	3
Symboles.....	4
Stockage.....	6
Contrôle qualité.....	7
Usage prévu.....	7
Limites d'utilisation du produit.....	8
Avertissements et précautions.....	9
Introduction.....	11
Principe et procédure.....	11
Équipement et réactifs que l'utilisateur doit fournir.....	14
Remarques importantes.....	15
Points importants avant le démarrage.....	15
Préparation de l'ARN.....	16
Stockage des échantillons.....	16
Préparation des réactifs et tampons.....	17
Élution des acides nucléiques viraux.....	20
Rendement et qualité des acides nucléiques viraux.....	21
Configurer le système de dépression QIAvac 24 Plus.....	22
Protocole : Isolation et purification d'acides nucléiques à partir de plasma et de sérum.....	25
Historique des révisions.....	29

Contenu de la trousse

QIAamp DSP Virus Kit			60704
N° de réf.			50
Nombre de préparations			
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (Colonnes QIAamp MinElute avec tubes de lavage (WT)) (2 ml)	COL	50
EXT	Column Extenders (Prolongateurs de colonne) (3 ml)	COL EXT	50
ET	Elution Tubes (Tubes d'éluion) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
VC	VacConnectors (Connecteurs d'aspiration)	VAC CON	50
LT	Lysis Tubes (Tubes de lyse) (2 ml)	LYS TUBE	50
WT	Wash Tubes (Tubes de lavage) (2 ml)	WASH TUBE	50
AL	Lysis Buffer (Tampon de lyse)*	LYS BUF	33 ml
AW1	Wash Buffer 1 (Tampon de lavage 1)* (concentré)	WASH BUF 1 CON	19 ml
AW2	Wash Buffer 2 (Tampon de lavage 2)† (concentré)	WASH BUF 2 CON	13 ml
AVE	Elution Buffer (Tampon d'éluion)† (bouchons violets)	ELU BUF	4 x 2 ml
PS	Protease Solvent (Solvant de protéase)†	QPROT SOLV	4,4 ml
Carrier	Carrier RNA (ARN vecteur) (bouchons rouges)	CAR RNA	310
QP	QIAGEN® Protease (Protéase QIAGEN)	QPROT	1 flacon

* Contient du chlorhydrate de guanidine. Non compatible avec les désinfectants contenant du javellisant. Voir la page 9 pour plus d'information sur la sécurité.

† Contient de l'azoture de sodium comme agent de conservation.

‡ Volume de resuspension de 4,4 ml.

Symboles



La trousse contient les réactifs nécessaires pour la préparation de 50 échantillons



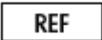
Se reporter aux informations contenues dans le manuel



Utilisation réservée à



Dispositif médical de diagnostic in vitro



Numéro de référence



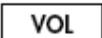
Numéro de lot



Numéro de matériel



Composants



Volume



Limites de température



Fabricant légal



À réception



Remarque importante



Changer de gants après l'étape du protocole portant cette marque



Ouvrir à la livraison; stocker les colonnes de centrifugation QIAamp Mini à une température entre 2 et 8 °C



Code article international



Noter la date du jour après l'ajout d'éthanol au flacon



Ajout



Contient



Lyophilisé



Reconstituer dans

EtOH

Éthanol

GuHCl

Chlorhydrate de guanidine

MALEIC ACID

Acide maléique

SUBT

Subtilisine



Produit

Stockage

Les colonnes QIAamp MinElute doivent être conservées à une température entre 2 et 8 °C dès réception. Lorsqu'elles sont conservées correctement, les colonnes QIAamp MinElute sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur la boîte.

Tous les tampons peuvent être conservés à température ambiante (entre 15 et 25 °C) et sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur la boîte.

L'ARN vecteur lyophilisé peut être conservé à température ambiante (entre 15 et 25 °C) jusqu'à la date d'expiration indiquée sur la boîte. L'ARN vecteur peut uniquement être dissous dans le tampon d'élution (AVE); l'ARN vecteur dissous doit être immédiatement ajouté au tampon de lyse (AL) tel que décrit à la page 10. Cette solution doit être préparée par l'opérateur et elle est stable à une température entre 2 et 8 °C pendant 48 heures au maximum. Les quantités inutilisées d'ARN vecteur dissous dans le tampon d'élution (AVE) doivent être congelées sous forme d'aliquotes à une température entre -30 et -15 °C.

La protéase QIAGEN (QP) lyophilisée peut être conservée à température ambiante (entre 15 et 25 °C) jusqu'à la date d'expiration indiquée sur la boîte sans perte de son efficacité.

La protéase QIAGEN (QP) reconstituée est stable pendant une durée de 1 an au maximum lorsqu'elle est conservée à une température entre 2 et 8 °C, mais pas au-delà de la date d'expiration indiquée sur la boîte.

Le tampon de lavage 1 (AW1) reconstitué et le tampon de lavage 2 (AW2) reconstitué sont stables pendant une durée de 1 an au maximum lorsqu'ils sont conservés à température ambiante (entre 15 et 25 °C), mais pas au-delà de la date d'expiration indiquée sur la boîte.

Contrôle qualité

Conformément au système de gestion de la qualité totale certifié de QIAGEN, chaque lot de la trousse QIAamp DSP Virus Kit est testé selon des spécifications prédéterminées afin de garantir une qualité constante du produit.

Usage prévu

Le QIAamp DSP Virus Kit est un système générique utilisant une technologie de membrane à base de silice (technologie QIAamp) pour procéder à l'isolation et à la purification d'acides nucléiques viraux à partir d'échantillons de sérum ou de plasma humain à des fins de diagnostic *in vitro*.

Seuls des professionnels tels que des techniciens et des médecins dûment formés aux techniques de biologie moléculaire sont habilités à utiliser ce produit. Il est conçu pour être utilisé avec n'importe quelle application en aval utilisant l'amplification enzymatique ou d'une autre modification enzymatique de l'ADN ou de l'ARN suivie d'une détection du signal ou de l'amplification.

Afin de minimiser les erreurs affectant les résultats diagnostiques, le produit est destiné à être utilisé avec un contrôle interne ainsi que des contrôles positif et négatif tout au long du processus de préparation de l'échantillon, et de l'amplification ou détection de signal selon l'analyse en aval employée.

Le produit est conçu pour être utilisé avec un système de dépression QIAvac 24 Plus ou équivalent.

Limites d'utilisation du produit

La trousse n'est pas prévue pour être utilisée avec du sang, des tissus, de la moelle osseuse ou des cellules de culture. La trousse n'est pas non plus destinée à l'isolation et la purification des acides nucléiques bactériens, fongiques ou parasitaires. L'efficacité de la trousse pour isoler et purifier les acides nucléiques viraux de liquides organiques sans cellules, comme l'urine et le LCR, n'a pas été évaluée.

Avertissements et précautions

Lorsque vous manipulez des produits chimiques, vous devez toujours porter un sarrau de laboratoire adapté, des gants jetables et des lunettes de protection. Pour plus d'informations, veuillez consulter les fiches de données de sécurité (FDS) correspondantes. Elles sont disponibles en ligne en format PDF pratique et compact sur www.qiagen.com/safety, où vous pouvez les trouver, les afficher et les imprimer pour chaque trousse et composant de trousse QIAGEN.

ATTENTION : N'AJOUTEZ PAS d'eau de javellisant ni de solutions acides directement dans les déchets résultant de la préparation de l'échantillon.

Le tampon de lyse (AL) et le tampon de lavage 1 (AW1) contiennent du chlorhydrate de guanidine, qui est susceptible de former des composés très réactifs lorsqu'il est combiné avec du javellisant. Si du liquide contenant ces tampons est renversé, nettoyez avec un détergent de laboratoire adapté et de l'eau. Si vous renversez un liquide contenant des agents potentiellement infectieux, nettoyez d'abord la zone concernée avec un détergent de laboratoire et de l'eau, puis avec de l'hypochlorite de sodium à 1 % (V/V).

Si les flacons de tampon sont endommagés ou fuient, portez des gants et des lunettes de protection avant de jeter les flacons afin d'éviter de vous blesser ou de blesser d'autres personnes.

QIAGEN n'a pas testé les déchets liquides produits par la procédure de la trousse QIAamp DSP Virus pour déterminer s'ils contenaient des matériaux infectieux résiduels. Par conséquent, les précautions universelles (gants, blouses de laboratoire et protection oculaire) adaptées à la manipulation de matériaux de source humaine potentiellement infectieux doivent être employées lors de l'utilisation de ce produit, et les déchets liquides doivent être traités comme des déchets infectieux et doivent être manipulés et éliminés conformément à la réglementation locale en vigueur.

Les indications suivantes de danger et de précaution s'appliquent aux composants de la trousse QIAamp DSP Virus Kit.

Buffer AL



Contient : chlorhydrate de guanidine, acide maléique. Avertissement! Peut être nocif en cas d'ingestion ou d'inhalation. Provoque une irritation cutanée. Peut provoquer une réaction allergique cutanée. Provoque une grave irritation oculaire. Porter des gants/des vêtements/des lunettes/un masque de protection.

Buffer AW1



Contient : Chlorhydrate de guanidine. Avertissement! Nocif en cas d'ingestion ou d'inhalation. Provoque une irritation cutanée. Provoque une grave irritation oculaire. Porter des gants/des vêtements/des lunettes/un masque de protection.

QIAGEN Protease



Contient : Subtilisine. Danger! Nocif en cas d'ingestion. Provoque une irritation cutanée. Provoque de graves lésions oculaires. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation. Peut provoquer une irritation des voies respiratoires. Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. Porter des gants/des vêtements/des lunettes/un masque de protection. Porter un équipement de protection respiratoire. **EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX** : Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. En cas d'exposition prouvée ou suspectée : Appeler immédiatement un **CENTRE ANTIPOISON** ou un médecin. Transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer.



Introduction

La trousse QIAamp DSP Virus Kit utilise une technologie bien établie pour l'isolation et la purification simultanées de l'ADN et de l'ARN viral. La procédure du QIAamp DSP Virus combine les propriétés de liaison sélective d'une membrane à base de silice avec des volumes d'élution minimales de 20 µl ou 60 µl.

La procédure est adaptée à une utilisation avec du sérum ou du plasma; l'un ou l'autre peut contenir du citrate ou de l'EDTA. Les échantillons peuvent être frais, lyophilisés ou congelés, à condition qu'ils n'aient pas été congelés et décongelés plus d'une fois. La procédure peut être utilisée pour l'isolation de l'ARN et de l'ADN viral d'un large éventail de virus à ADN et à ARN. La procédure est conçue pour éviter la contamination croisée des échantillons et est particulièrement adaptée au traitement simultané de plusieurs échantillons. Les acides nucléiques viraux sont élués dans le tampon d'élution (AVE), prêt à l'emploi pour les réactions d'amplification ou la conservation à -20 °C.

Principe et procédure

La procédure du QIAamp DSP Virus comprend 4 étapes :

- La lyse des particules de virus contenues dans l'échantillon
- La liaison des acides nucléiques viraux du lysat à la membrane d'une colonne QIAamp MinElute
- Le lavage de la membrane
- L'élution des acides nucléiques viraux de la membrane

La procédure est réalisée avec des colonnes QIAamp MinElute sur un collecteur à vide.

Lyse des particules virales

Les échantillons sont lysés dans des conditions dénaturantes à température élevée. La lyse est effectuée en présence de la protéase QIAGEN (QP) et du tampon de lyse (AL), qui assurent ensemble la désactivation des ARNases.

Liaison des acides nucléiques à la membrane de la colonne QIAamp MinElute

Afin d'optimiser la fixation de l'ADN et de l'ARN viral à la membrane de colonne QIAamp MinElute, de l'éthanol est d'abord ajouté aux lysats. Chaque lysat est ensuite appliqué à une colonne QIAamp MinElute, et les acides nucléiques viraux sont adsorbés sur la membrane de silice à mesure que le lysat traverse celle-ci sous l'effet du vide.

Retrait des contaminants résiduels

Lorsque les acides nucléiques viraux liés à la membrane de la colonne QIAamp MinElute, les contaminants sont éliminés efficacement à l'aide, dans un premier temps, du tampon de lavage 1 (AW1), puis du tampon de lavage 2 (AW2), et enfin d'éthanol.

Élution des acides nucléiques purifiés

Les acides nucléiques viraux sont élués à partir de la membrane de la colonne QIAamp MinElute avec le tampon d'éluion (AVE). Les colonnes QIAamp MinElute acceptent des volumes d'éluion de 20 ou 60 µl.

Procédure du QIAamp DSP Virus

Échantillon



Lyse



Liaison

Vide



Lavage
(AW1)

Retirez EXT
avant de mettre
sous vide

Vide



Lavage
(AW2)

Vide



Lavage
(éthanol)

Vide



Centrifugation



Élution



Acides nucléiques
viraux purs

Lisez le protocole (page 25) attentivement avant de commencer. Dans LT, ajoutez 75 µl de QP, 500 µl d'échantillon et 500 µl d'AL. Passez au vortex 15 secondes. Incubez pendant 15 minutes (± 1 min) à 56 °C (± 1 °C). Ajoutez 600 µl d'éthanol. Passez au vortex 15 secondes. Incubez pendant 5 minutes (± 1 min) à température ambiante (15 à 25 °C).

Transférez le lysat dans une colonne QIAamp MinElute équipée d'un prolongateur EXT.

Ajoutez 600 µl d'AW1 reconstitué.

Retirez EXT.

Ajoutez 700 µl d'AW2 reconstitué.

Ajoutez 750 µl d'éthanol.

Placez la colonne QIAamp MinElute dans WT. Centrifugez pendant 1 minute à 14 000 tr/min. Placez la colonne QIAamp MinElute dans WT. Incubez pendant 3 minutes à 56 °C. Placez la colonne QIAamp MinElute dans ET. Ajoutez 20 µl ou 60 µl d'AVE. Incubez pendant 3 minutes à température ambiante. Centrifugez pendant 1 minute à 14 000 tr/min.

Équipement et réactifs que l'utilisateur doit fournir

Lorsque vous manipulez des produits chimiques, vous devez toujours porter un sarrau de laboratoire adapté, des gants jetables et des lunettes de protection. Pour plus d'informations, veuillez consulter les fiches de données de sécurité (FDS) disponibles auprès du fournisseur du produit.

- Éthanol (96 à 100 %)
- Pipettes* et embouts de pipette (afin de prévenir toute contamination croisée, nous recommandons fortement l'utilisation d'embouts de pipette équipées de dispositifs anti-aérosols)
- Gants jetables
- Bloc chauffant* pour la lyse des échantillons à 56 °C (nous conseillons l'Eppendorf® Thermomixer comfort avec thermobloc pour microtubes à essai 2,0 ml†)
- Microcentrifugeuse*
- Éprouvette graduée (50 ml)
- Mélangeur vortex
- Système d'aspiration QIAvac 24 Plus (QIAvac 24 Plus, réf. 19413, QIAvac Connecting System, réf. 19419 et Vacuum Pump, réf. 84020‡), ou un système d'aspiration de laboratoire polyvalent équivalent.

* Pour garantir le bon traitement des échantillons dans la procédure QIAamp DSP Virus, nous recommandons fortement que les instruments (par exemple, les pipettes et les blocs chauffants) soit calibrés conformément aux recommandations de leurs fabricants.

† Ceci ne constitue pas la liste complète des fournisseurs et omet de nombreux distributeurs de fournitures biologiques importants.

‡ La référence 84020 désigne une pompe adaptée aux pays européens (comme l'Allemagne). Pour les pays ayant d'autres exigences en termes de tension ou de bouchons, contactez le service technique de QIAGEN.

Remarques importantes

Points importants avant le démarrage

- Après avoir reçu la trousse, vérifiez que ses composants ne sont pas endommagés. Si les emballages ou les flacons de tampon sont endommagés, contactez les services techniques QIAGEN ou votre distributeur local. En cas de renversement de liquide, voir « Avertissements et précautions » (page 9).
- N'utilisez pas de composants endommagés, car leur utilisation peut mener à des problèmes de fonctionnement.
- Utilisez toujours des équipements sans ARNase.
- Conservez l'éthanol (96 à 100 %) sur de la glace pendant la procédure.
- Changez systématiquement les embouts de pipette entre les transferts de liquides. Afin d'éviter toute contamination croisée, nous conseillons fortement l'utilisation d'embouts de pipette équipés de dispositifs anti-aérosols.
- Toutes les étapes de centrifugation sont effectuées à température ambiante (15 à 25 °C).
- Utilisez systématiquement des gants jetables et vérifiez régulièrement qu'ils ne sont pas contaminés par du matériel de l'échantillon.
- Jetez les gants lorsqu'ils sont contaminés, et au minimum à chaque étape marquée du symbole représentant un gant. 
- Afin d'éviter la contamination croisée, ouvrez seulement un tube à la fois.
- N'utilisez pas les composants d'autres trousse avec la trousse que vous êtes en train d'utiliser, sauf si les numéros de lot sont identiques.
- Évitez la contamination microbienne des réactifs de la trousse.
- Pour être protégés contre des matériaux potentiellement infectieux, nous recommandons de travailler sous écoulement d'air laminaire jusqu'à la fin de la lyse des échantillons.

- Cette trousse doit uniquement être utilisée par du personnel formé aux pratiques de laboratoire de diagnostic in vitro.
- La procédure fournit des instructions relatives au traitement d'un échantillon de sérum ou de plasma seul. Cependant, jusqu'à 24 échantillons peuvent être traités simultanément sur le système de dépression QIAvac 24 Plus.

Préparation de l'ARN

Lors de la préparation de l'ARN viral, travaillez rapidement durant les étapes manuelles de la procédure.

Le tampon d'éluion (AVE) contient de l'azote de sodium*, un agent antimicrobien qui empêche la croissance des organismes producteurs d'ARNase. Cependant, comme ce tampon ne contient pas de produits chimiques dégradant les ARNases, il ne va pas activement inhiber les ARNases introduites suite à une mauvaise manipulation. Il est impératif de prendre des précautions extrêmes pour éviter toute contamination par des ARNases lors de la manipulation du tampon d'éluion (AVE).

Stockage des échantillons

Après collecte et centrifugation, le plasma ou le sérum peuvent être stockés entre 2 et 8 °C pendant une durée maximale de 6 heures. Pour le stockage à long terme, la congélation à -20 °C ou -80 °C en aliquotes est recommandée. Les échantillons de plasma ou de sérum congelé ne doivent pas être dégelé plus d'une fois. Des cycles de congélation/décongélation répétées entraînent la dénaturation et la précipitation des protéines, ce qui peut réduire la concentration virale et par là-même réduire les rendements en acides nucléiques viraux.

* Lorsque vous manipulez des produits chimiques, vous devez toujours porter un sarrau de laboratoire adapté, des gants jetables et des lunettes de protection.

En outre, les cryoprécipités formés lors du cycle de congélation/décongélation vont obstruer la membrane de la colonne QIAamp MinElute. Si des cryoprécipités sont visibles, ils doivent être agglomérés en un culot par centrifugation à environ 6 800 x g pendant 3 minutes. Le surnageant clarifié doit être aspiré et traité immédiatement sans perturber le culot.

Préparation des réactifs et tampons

Préparation de la protéase QIAGEN

Ajoutez tout le contenu du flacon contenant 4,4 ml de solvant de la protéase (PS) au flacon de protéase QIAGEN (QP) lyophilisée et mélangez soigneusement. Pour éviter la formation de mousse, mélangez en retournant le flacon plusieurs fois. Vérifiez que la protéase QIAGEN (QP) est complètement dissoute.



N'ajoutez pas de protéase QIAGEN (QP) directement au tampon de lyse (AL).

Ajout de l'ARN vecteur et du contrôle interne au tampon de lyse

L'ARN vecteur a deux fonctions. Tout d'abord, il améliore la liaison des acides nucléiques viraux à la colonne QIAamp MinElute, notamment s'il y a peu de molécules cibles dans l'échantillon. Deuxièmement, l'ajout de grandes quantités d'ARN vecteur réduit les risques de dégradation de l'ARN viral dans les rares cas où les molécules d'ARNase n'ont pas été dénaturées par les sels chaotropiques et le détergent dans le tampon de lyse (AL). Si l'ARN vecteur n'est pas ajouté au tampon de lyse (AL), cela peut conduire à une réduction de l'ADN ou de l'ARN récupéré.

L'ARN vecteur peut également être inclus dans quelques réactifs de contrôle interne de dosages du commerce effectués en aval. Dans ces cas-là, veuillez vous reporter aux instructions d'utilisation du fabricant du dosage effectué en aval.

L'utilisation d'un contrôle interne est fortement recommandée lors de l'utilisation du QIAamp DSP Virus Kit en combinaison avec des systèmes d'amplification diagnostique. L'ARN ou ADN du contrôle interne et l'ARN vecteur reconstitué doivent être ajoutés au tampon de lyse (AL) et mélangés soigneusement en retournant le tube 10 fois. Pour éviter la formation de mousse, ne passez pas le tube au vortex.

Reportez-vous aux instructions du fabricant pour déterminer la concentration optimale du contrôle interne. L'utilisation d'une concentration différente de celle recommandée peut entraîner des résultats incorrects. Lors du calcul de la quantité correcte de contrôle interne à utiliser, veuillez prendre en considération le volume d'échantillon de départ et le volume d'élution. Souvenez-vous que le QIAamp DSP Virus Kit utilise un volume d'échantillon de départ de 500 µl.

Pour préparer la solution d'ARN vecteur, ajoutez 310 µl du tampon d'élution (AVE) au tube contenant 310 µg d'ARN vecteur lyophilisé pour obtenir une solution de 1 µg/µl. Dissolvez l'ARN vecteur soigneusement, divisez-le en aliquotes d'une taille pratique et stockez-le à -20 °C. Ne congelez/décongelez pas les aliquotes d'ARN vecteur plus de 2 fois.

Veuillez noter que l'ARN vecteur n'est pas soluble dans le tampon de lyse (AL). Il doit d'abord être dissous dans un tampon d'élution (AVE), puis ajouté au tampon de lyse (AL). Vérifiez que l'ARN vecteur est complètement dissous dans le bon volume de tampon d'élution (AVE) avant de le mélanger avec le tampon de lyse (AL).



Utilisez toujours le bon contrôle interne pour le dosage effectué en aval. Reportez-vous aux instructions du fabricant pour de plus amples informations.

Calculez le volume du mélange tampon de lyse (AL)/ARN vecteur nécessaire par lot d'échantillons en sélectionnant le nombre d'échantillons à traiter simultanément à partir du Tableau 1 (page 19). Les volumes sont calculés en utilisant le calcul suivant :

$$n \times 0,55 \text{ ml} = y \text{ ml}$$

$$y \text{ ml} \times 11,2 \text{ } \mu\text{l/ml} = z \text{ } \mu\text{l}$$

où : **n** = nombre d'échantillons à traiter simultanément

y = volume calculé de tampon de lyse (AL)

z = volume de mélange ARN vecteur/tampon d'éluion (AVE) à ajouter au tampon de lyse (AL)

Tableau 1.-Volumes de tampon de lyse (AL) et de mélange ARN vecteur/tampon d'éluion (AVE) nécessaires pour la procédure du QIAamp DSP Virus

N ^{bre} d'échantillons	Vol. AL (ml)	Vol. ARN vecteur/Tampon AVE (μ l)	N ^{bre} d'échantillons	Vol. AL (ml)	Vol. ARN vecteur/Tampon AVE (μ l)
1	0,55	6,2	13	7,15	80,0
2	1,10	12,3	14	7,70	86,0
3	1,65	18,5	15	8,25	92,4
4	2,20	24,6	16	8,80	98,6
5	2,75	30,8	17	9,35	104,7
6	3,30	37,0	18	9,90	110,9
7	3,85	43,1	19	10,45	117,0
8	4,40	49,3	20	11,00	123,2
9	4,95	55,0	21	11,55	129,4
10	5,50	61,6	22	12,10	135,5
11	6,05	67,8	23	12,65	141,7
12	6,60	73,9	24	13,20	147,8

Préparation du tampon de lavage 1 (AW1)

À l'aide d'une éprouvette graduée, ajoutez 25 ml d'éthanol (96 à 100 %) au flacon contenant 19 ml de concentré de tampon de lavage 1 (AW1). Conservez le tampon de lavage 1 (AW1) reconstitué à température ambiante (entre 15 et 25 °C).



Mélangez toujours le tampon de lavage 1 (AW1) reconstitué en retournant le flacon plusieurs fois avant de commencer la procédure.

Préparation du tampon de lavage 2 (AW2)

À l'aide d'une éprouvette graduée, ajoutez 30 ml d'éthanol (96 à 100 %) au flacon contenant 13 ml de concentré de tampon de lavage 2 (AW2). Conservez le tampon de lavage 2 (AW2) reconstitué à température ambiante (entre 15 et 25 °C).



Mélangez toujours le tampon de lavage 2 (AW2) reconstitué en retournant le flacon plusieurs fois avant de commencer la procédure.

Préparation du tampon d'élution (AVE)

Quatre tubes de tampon d'élution (AVE) sont fournis avec la trousse. Prenez soin de ne pas contaminer le tampon avec des ARNases. Si vous effectuez 4 procédures de purification ou moins au moyen d'une seule trousse, nous vous recommandons de jeter le tube de tampon d'élution (AVE) à la fin de chaque procédure.

Élution des acides nucléiques viraux

Pour les applications en aval qui nécessitent de petits volumes de départ (p. ex. certains dosages de PCR et RT-PCR), l'utilisation d'acides nucléiques viraux élués dans 20 µl de tampon d'élution (AVE) peut augmenter la sensibilité du dosage.

Le volume d'acides nucléiques viraux élué à partir d'une colonne QIAamp MinElute peut se monter à 5 µl de moins que le volume de tampon d'éluion (AVE) appliqué sur la colonne. Par exemple, l'éluion des acides nucléiques viraux avec 60 µl de tampon d'éluion (AVE) produit un éluat d'environ 55 µl, tandis que l'éluion avec 20 µl produit environ 15 µl d'éluat. Le volume de l'éluat récupéré dépend de la nature de l'échantillon. Si le volume de l'éluat récupéré est trop faible pour le dosage effectué en aval, augmentez le volume en ajoutant davantage de tampon d'éluion (AVE).

Les acides nucléiques viraux élués sont récupérés dans les tubes d'éluion (ET). Si vous stockez les acides nucléiques viraux pendant une durée pouvant aller jusqu'à 24 heures, nous vous recommandons de les stocker entre 2 et 8 °C.

Rendement et qualité des acides nucléiques viraux

Le rendement et la qualité des acides nucléiques viraux isolés sont adaptés à tous les types de procédures de détection en aval utilisés dans le diagnostic moléculaire. Les dosages de diagnostic doivent être réalisés conformément aux instructions des fabricants.

Configurer le système de dépression QIAvac 24 Plus

Assurez-vous d'assembler correctement le prolongateur de colonne (EXT), la colonne QIAamp MinElute, le connecteur d'aspiration (VC) et la VacValve (voir Figure 1).

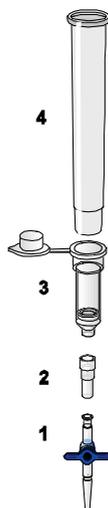


Figure 1. Assemblage des composants du QIAamp DSP Virus Kit pour le traitement des échantillons sous vide :

1 : VacValve (fournie avec le système de dépression)

3 : Colonne QIAamp MinElute

2 : Connecteur d'aspiration (VC)

4 : Prolongateur de colonne (EXT)

Nous conseillons d'étiqueter les tubes de lyse (LT), les tubes d'éluion (ET) et les colonnes QIAamp MinElute qui seront utilisés sur le système de dépression QIAvac 24 Plus conformément au modèle présenté à la Figure 2 afin d'éviter de vous perdre dans les échantillons. Cette figure peut être photocopiée et étiquetée avec les noms des échantillons.

Date : _____

Opérateur : _____

ID de l'analyse : _____

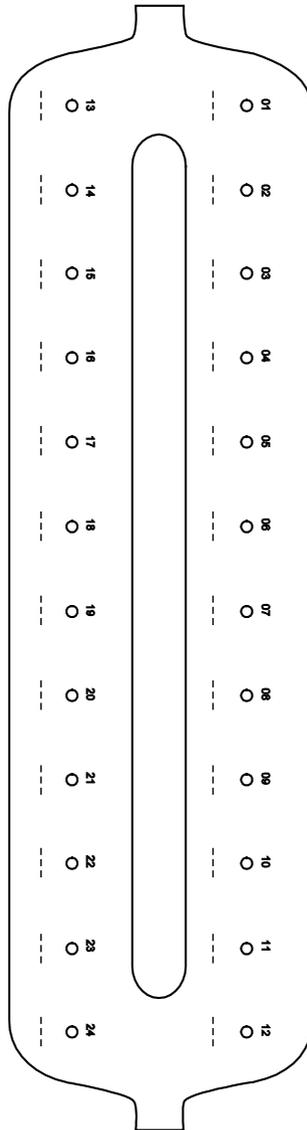


Figure 2. Modèle d'étiquetage des tubes de lyse (LT), des tubes d'élution (ET) et des colonnes QIAamp MinElute qui seront utilisés sur le système de dépression QIAvac 24 Plus.

Protocole : Isolation et purification d'acides nucléiques à partir de plasma et de sérum

Pour l'isolation et la purification des acides nucléiques viraux à partir de 500 µl de plasma ou de sérum traité à l'EDTA ou au citrate.

À faire avant de démarrer

- Équilibrez les échantillons à température ambiante (15 à 25 °C) et prenez soin de bien mélanger.
- Ajoutez l'ARN vecteur reconstitué dans le tampon d'éluion (AVE) ou le contrôle interne au tampon de lyse (AL) conformément aux instructions données en page 17.
- Veillez à ce que le tampon de lavage 1 (AW1), le tampon de lavage 2 (AW2) et la QIAGEN protease (QP) soient préparés conformément aux instructions indiquées dans « Remarques importantes » à la page 15.
- Équilibrez le tampon d'éluion (AVE) à température ambiante (15 à 25 °C). Il sera utilisé à l'étape 18. Si possible, utilisez du tampon d'éluion (AVE) fraîchement préparé pour chaque procédure (4 tubes sont fournis).
- Réglez un bloc chauffant à 56 °C. Il sera utilisé aux étapes 4 et 17.
- Pour éviter toute contamination croisée, insérez un connecteur d'aspiration (VC) dans chaque adaptateur luer du système de dépression.
- Assurez-vous que la bouteille de déchets liquides du système de dépression est vide et que tous les raccords sont connectés correctement.
- Pour plus de détails sur le fonctionnement du système de dépression, notamment sa maintenance, reportez-vous au manuel fourni avec le système.

Procédure

1. Pipetez 75 µl de QIAGEN protease (QP) dans un tube de lyse (LT).



Vérifiez la date d'expiration de la protéase reconstituée avant utilisation.

2. Ajoutez 500 µl de plasma ou de sérum au tube de lyse (LT).
3. Ajoutez 500 µl de tampon de lyse (AL) (contenant 11,2 µg/ml d'ARN vecteur) au tube de lyse (LT), fermez le couvercle, et mélangez au vortex par petites impulsions pendant 15 secondes.

Pour assurer l'efficacité de la lyse, il est primordial que l'échantillon et le tampon de lyse (AL) soient mélangés soigneusement pour produire une solution homogène.



Le tampon de lyse (AL) contient un contrôle interne. Comme le tampon de lyse (AL) présente une viscosité élevée, veillez à bien ajouter le bon volume de tampon de lyse (AL) en pipétant soigneusement ou en utilisant une pipette appropriée comme une pipette pour usage répétitif Eppendorf ou équivalente.



N'ajoutez pas de QIAGEN protease (QP) directement au tampon de lyse (AL).

4. Incubez à 56 °C (± 1 °C) pendant 15 minutes (± 1 minute).
5. Centrifugez le tube de lyse (LT) pendant ≥ 5 secondes à pleine vitesse pour retirer les gouttes présentes sur l'intérieur du couvercle.



6. Changez de gants et ouvrez le tube de lyse (LT) avec précaution.
7. Ajoutez 600 µl d'éthanol (96 à 100 %) au tube de lyse (LT), fermez le couvercle, et mélangez au vortex par petites impulsions pendant ≥ 15 secondes. Incubez pendant 5 minutes (± 1 minute) à température ambiante (15 à 25 °C).
8. Centrifugez le tube de lyse (LT) pendant ≥ 5 secondes à pleine vitesse pour retirer les gouttes présentes sur l'intérieur du couvercle.
9. Insérez la colonne QIAamp MinElute dans le connecteur d'aspiration (VC) sur le système de dépression (voir Figure 1, page 22). Insérez un prolongateur de colonne (EXT) dans la colonne QIAamp MinElute ouverte.



Gardez le tube de lavage (WT) pour la centrifugation de l'étape 16.



10. Changez de gants et ouvrez seulement un tube à la fois.

11. Introduisez avec précaution l'ensemble du lysat récupéré à l'étape 7 dans le prolongateur de colonne (EXT) de la colonne QIAamp MinElute sans mouiller le bord. Évitez de toucher la membrane de la colonne QIAamp MinElute avec la pointe de la pipette.

12. Mettez en marche la pompe à dépression. Après que le lysat a traversé la colonne QIAamp MinElute par aspiration, ouvrez la valve du système de dépression et cassez le vide.

Si vous traitez plusieurs colonnes QIAamp MinElute en même temps, nous recommandons de fermer la VacValve de chaque colonne après passage du lysat afin de réduire la durée de cette étape.



Si le lysat n'a pas complètement traversé la membrane après 15 minutes, jetez la colonne QIAamp MinElute et répétez la procédure avec un nouvel échantillon.



La valve du système de dépression doit être utilisée pour casser rapidement la pression négative.

13. Introduisez 600 µl de tampon de lavage 1 (AW1) dans la colonne QIAamp MinElute. Retirez avec précaution et jetez le prolongateur de colonne (EXT) et fermez la valve du système de dépression. Une fois que le tampon de lavage 1 (AW1) a traversé la colonne QIAamp MinElute par aspiration, ouvrez la valve et cassez le vide.



Afin d'éviter toute contamination croisée, veillez à ce que les prolongateurs de colonne (EXT) ne passent pas au-dessus des colonnes QIAamp MinElute voisines.

14. Introduisez 750 µl de tampon de lavage 2 (AW2) dans la colonne QIAamp MinElute sans mouiller le bord. Évitez de toucher la membrane de la colonne QIAamp MinElute avec la pointe de la pipette. Laissez le couvercle de la colonne ouvert et fermez la valve du système de dépression. Une fois que le tampon de lavage 2 (AW2) a traversé la colonne QIAamp MinElute par aspiration, ouvrez la valve et cassez le vide.

15. Introduisez 750 µl d'éthanol (96 à 100 %) dans la colonne QIAamp MinElute sans mouiller le bord. Évitez de toucher la membrane de la colonne QIAamp MinElute avec la pointe de la pipette. Laissez le couvercle de la colonne ouvert et fermez la valve du système de dépression. Après que l'éthanol a traversé la colonne QIAamp MinElute par aspiration, ouvrez la valve pour casser le vide.



Utilisez des embouts de pipette munies d'un dispositif anti-aérosols pour introduire l'éthanol dans la colonne QIAamp MinElute.

16. Fermez le couvercle de la colonne QIAamp MinElute, retirez-la du système de dépression et jetez le connecteur d'aspiration (VC). Placez la colonne QIAamp MinElute dans le tube de lavage (WT) mis de côté à l'étape 9, et centrifugez à pleine vitesse (environ 20 000 x g ou 14 000 tr/min) pendant 1 minute pour sécher la membrane complètement. Jetez le tube de lavage (WT) contenant le filtrat.



L'omission de la centrifugation à sec pourrait conduire à une inhibition du dosage en aval.

17. Placez la colonne QIAamp MinElute dans un nouveau tube de lavage (WT) et incubez couvercle ouvert à 56 °C pendant 3 minutes pour faire évaporer le liquide restant.

18. Placez la colonne QIAamp MinElute dans un tube d'élution propre (ET) et jetez le tube de lavage (WT). Ouvrez avec précaution le couvercle de la colonne QIAamp MinElute et appliquez 20 ou 60 µl de tampon d'élution (AVE) (en fonction du dosage qui sera effectué en aval) sur le centre de la membrane. Fermez le couvercle et incubez à température ambiante (15 à 25 °C) pendant ≥3 minutes. Centrifugez à pleine vitesse (environ 20 000 x g ou 14 000 tr/min) pendant 1 minute pour éluer les acides nucléiques viraux.



Suivez la procédure de maintenance pour le système de dépression après avoir exécuté ce protocole (voir le manuel fourni avec le système de dépression pour de plus amples renseignements).

Pour obtenir des informations actualisées et les clauses de non-responsabilité spécifiques aux produits, consultez le manuel de la trousse ou le manuel d'utilisation QIAGEN correspondant. Les manuels des troussees et les manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles sur www.qiagen.com ou peuvent être demandés aux services techniques QIAGEN ou au distributeur local.

Historique des révisions

Historique des révisions du document

R4 08/2018	Ajout d'une note de bas de page pour apporter une clarification sur la Vacuum Pump, réf., voir page 14. Mise à jour des avertissements et précautions. Mise à jour du format de manuel.
---------------	---

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Contrat de licence limité pour la trousse QIAamp DSP Virus Kit

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur accepte les conditions suivantes :

1. Le produit ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis et à ce manuel et uniquement avec les composants contenus dans cette trousse. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans cette trousse avec tout autre composant non fourni dans cette trousse, à l'exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit, dans ce manuel et dans d'autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com. Parmi ces protocoles supplémentaires, certains ont été fournis par des utilisateurs QIAGEN pour des utilisateurs QIAGEN. Ces protocoles n'ont pas été rigoureusement testés ou optimisés par QIAGEN. QIAGEN ne saurait être tenu pour responsable de leur utilisation et n'offre aucune garantie que ces protocoles ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
2. En dehors des licences expressément énoncées, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que cette trousse et son utilisation ne violent pas les droits de tiers.
3. Cette trousse et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette toutes les autres licences, expresses ou tacites, autres que celles expressément énoncées.
5. L'acheteur et l'utilisateur de la trousse s'engagent à ne pas prendre, ou autoriser quiconque à prendre, de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter des actes interdits par les conditions précédentes. QIAGEN peut faire appliquer les interdictions du présent accord de licence limité par tout tribunal et pourra recouvrir tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocat, en cas d'action en application du présent accord ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés à la trousse et/ou à ses composants.

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

Marques de commerce : QIAGEN®, QIAamp®, MinElute® (Groupe QIAGEN); Eppendorf® (Eppendorf AG). Les noms déposés, les marques de commerce, etc., cités dans ce document, même s'ils ne sont pas spécifiquement signalés comme tels, doivent être considérés comme protégés par la loi.

1114507 08/2018 HB-0105-003 © 2018 QIAGEN, tous droits réservés.

Commandez sur www.qiagen.com/shop | Soutien technique support.qiagen.com | Site Web www.qiagen.com