

Manuel du test *digene*[®] HPV Genotyping LQ, kit de détection



Version 1



Pour la détection de 18 génotypes de papillomavirus humain (HPV) haut risque par la technologie xMAP[®]



613215



1057456FR



QIAGEN GmbH, QIAGEN Straße 1, D-40724 Hilden

R2



1057456FR



Technologies d'échantillons et d'analyses QIAGEN

QIAGEN est le premier fournisseur de technologies novatrices d'échantillons et d'analyses, permettant d'isoler et de détecter le contenu de n'importe quel échantillon biologique. Nos produits et services ultramodernes de grande qualité garantissent un succès total, de l'échantillon jusqu'au résultat.

QIAGEN fixe les normes en matière de :






- purification d'ADN, d'ARN et de protéines ;
- analyses d'acides nucléiques et de protéines ;
- recherche micro-ARN et interférence ARN ;
- automatisation des technologies d'échantillons et d'analyses.

Notre mission est de permettre à notre clientèle de réussir et d'accomplir des progrès décisifs. Pour plus d'informations, visiter www.qiagen.com.

Contenu

Contenu du kit	4
Symboles	4
Conservation	5
Utilisation prévue	5
Limitations de l'utilisation du produit	5
Contrôle de la qualité	5
Assistance technique	6
Informations de sécurité	7
Introduction	8
Principe	8
Caractéristiques de performance	10
Équipement et réactifs devant être fournis par l'utilisateur	17
Remarques importantes	19
Préparation des réactifs	19
Analyse des résultats du multiplexage	19
Protocoles	
■ 1 : Préparation de la plaque de filtration	20
■ 2 : Hybridation et dénaturation	21
■ 3 : Lavage 1	23
■ 4 : Incubation du conjugué	24
■ 5 : Lavage 2	25
■ 6 : Lecture	26
Résolution des principaux problèmes rencontrés	27
Annexe A : Interprétation des résultats	31
Annexe B : Maîtrise de la contamination des réactions de PCR	33
Références	34

Contenu du kit

Test <i>digene</i> HPV Genotyping LQ, kit de détection		(96)
Référence		613215
Nombre de préparations		96
B	Billes de détection d'HPV haut risque	4,6 ml
S1	Solution 1	  50 ml
S2	Solution 2	  50 ml
C	Conjugué de détection 500x	20 µl
3B	Tampon 3B	400 µl
	Plaque de filtration (96 puits)	1
	Film d'étanchéité transparent pour plaque de filtration	4
	Manuel	 1

Symboles



<N>

Kit contient des réactifs pour <N> tests



Dispositif médical de diagnostic in vitro



Conformité européenne



Référence



Fabricant



Code de lot



Référence du matériel



Remarque importante



Limitations de température



À utiliser avant



Lire les informations dans le manuel

Conservation

Tous les réactifs du test *digene* HPV Genotyping LQ, kit de détection doivent être conservés entre 2 et 8 °C dès réception. Veiller à conserver le kit à l'abri de toute source de contamination par l'ADN, en particulier des produits d'amplification de l'ADN. Dans ces conditions, tous les réactifs sont stables jusqu'à leur date de péremption. Conservées entre 2 et 8 °C, les billes de détection d'HPV haut risque (B) sont stables jusqu'à leur date de péremption. Conserver à l'obscurité et ne pas congeler.

Utilisation prévue

Le test *digene* HPV Genotyping LQ, kit de détection est un test d'hybridation *in vitro* qui emploie les amorces GP5+ et GP6+ pour l'identification des types individuels d'HPV haut risque 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 et 82. Ce test est indiqué comme test réflexe de dépistage chez les femmes présentant un résultat positif au test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Limitations de l'utilisation du produit

Ce test a été validé pour une utilisation avec des échantillons prélevés dans le milieu Specimen Transport Media (STM) et dans la solution Hologic® ThinPrep® Pap Test PreservCyt®. L'utilisation du produit est réservée au personnel formé aux techniques de PCR. Les recommandations relatives à l'agencement et aux pratiques de laboratoire doivent être suivies pour éviter les résultats erronés et la contamination par l'ADN.

L'hybridation, le lavage stringent avec la solution 1 (S1) et l'incubation dans le conjugué doivent être réalisés précisément à 50 °C afin d'éviter les résultats faussement positifs ou faussement négatifs.

Contrôle de la qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO de QIAGEN, chaque lot du test *digene* HPV Genotyping LQ, kit de détection est testé selon des spécifications prédéterminées afin de garantir une qualité constante.

Le test *digene* HPV Genotyping LQ, kit de détection contient un contrôle conjugué (type de bille 23) utilisable pour ajouter un conjugué réactif pendant la procédure d'incubation. Il doit toujours être positif et son intensité doit être presque équivalente dans tous les puits d'essai d'une même analyse. Si ce contrôle présente une intensité moyenne de fluorescence (IMF) inférieure à 100, le test est invalide. La sonde de la bille de type 44 sert de contrôle interne. Elle réagit avec l'ADN génomique humain co-amplifié présent dans l'échantillon clinique. Elle sert de contrôle interne pour détecter l'inhibition de la PCR, vérifier l'adéquation de la méthode de prélèvement de l'échantillon et d'extraction d'ADN. La présence d'un signal d'une IMF supérieure ou égale à 50 (sans soustraction du bruit de fond) est considérée comme étant le résultat d'une réaction positive. Si l'HPV est présent dans l'échantillon, il se peut que la sonde de la bêta-globine soit négative en raison de la compétition lors de la PCR dans la mesure où l'ADN d'HPV est préférentiellement amplifié.

Assistance technique

Chez QIAGEN, nous sommes fiers de la qualité et de la disponibilité de notre assistance technique. Nos services techniques sont composés de scientifiques expérimentés bénéficiant d'un vaste savoir-faire pratique et théorique en ce qui concerne les technologies d'échantillons et d'analyses et l'utilisation des produits QIAGEN. Ne pas hésiter à nous contacter pour toute question ou en cas de difficultés rencontrées avec le test *digene* HPV Genotyping LQ, kit de détection ou les produits QIAGEN en général.

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

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

Informations de sécurité

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

Informations d'urgence 24 heures sur 24

Des informations médicales d'urgence en anglais, français et allemand peuvent être obtenues 24 heures sur 24 auprès du :

Centre d'information Antipoison, Mayence, Allemagne

Tél : +49-6131-19240

Introduction

Le test *digene* HPV Genotyping LQ est constitué de 2 kits : le kit d'amplification et le kit de détection. Le second permet une identification aisée et fiable des génotypes du papillomavirus humain (HPV) haut risque par hybridation et technologie xMAP sur automate LiquiChip®. Les produits de PCR utilisés pour l'hybridation inverse sont générés à partir d'une matrice d'ADN par amplification d'une séquence L1 hautement conservée à l'aide du test *digene* HPV Genotyping LQ, kit d'amplification.

Principe

Technologie xMAP sur automate LiquiChip

L'automate QIAGEN LiquiChip est un système souple pour les séries d'échantillons en suspension qui repose sur la technologie xMAP utilisant des billes. Une grande variété d'essais, comme les immuno-essais, les dosages de la kinase et les tests d'interaction, sont réalisés en phase aqueuse homogène de manière rapide et efficace. Le multiplexage offre la possibilité de détecter simultanément jusqu'à 100 analytes différents dans un même échantillon.

Avec la technologie xMAP, les réactions moléculaires ont lieu à la surface de billes codées en couleur. Pour chaque pathogène, des sondes de capture spécifiques des cibles sont liées par liaison covalente à un jeu spécifique de billes codées en couleur. Les produits de PCR marqués en suspension d'hybridation sont capturés par les sondes de capture liées aux billes. Un système microfluidique amène le mélange réactionnel sous forme de suspension d'hybridation à un dispositif de détection à double faisceau laser. Un laser rouge identifie chacune des billes (ou sondes HPV) par son code de couleur tandis qu'un laser vert détecte le signal d'hybridation associé à chaque bille, indiquant la présence ou l'absence d'un amplimère particulier.

L'identification des génotypes d'HPV repose sur l'hybridation inverse à l'aide de la technologie xMAP. Des amplimères biotinylés dénaturés, obtenus par amplification d'une partie de la séquence L1 avec les amorces GP5+ et GP6+, sont hybridés avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques, fixées sur des types spécifiques de billes (Tableau 1, page 10). Après hybridation et lavage stringent, le conjugué streptavidine-R-phycoérythrine, capable de se lier à l'hybride biotinylé présent, est ajouté. Après incubation et lavage stringent supplémentaire, les échantillons peuvent être analysés sur l'automate LiquiChip (voir l'organigramme page suivante). Le contrôle interne utilisé pour confirmer la présence d'ADN amplifiable après extraction est un fragment du gène humain de la bêta-globine co-amplifié avec l'ADN d'HPV par PCR multiplexe. Les billes de type 44 contiennent une sonde capable de détecter l'amplimère de bêta-globine.

Procédure de détection avec le test *digene* HPV Genotyping LQ

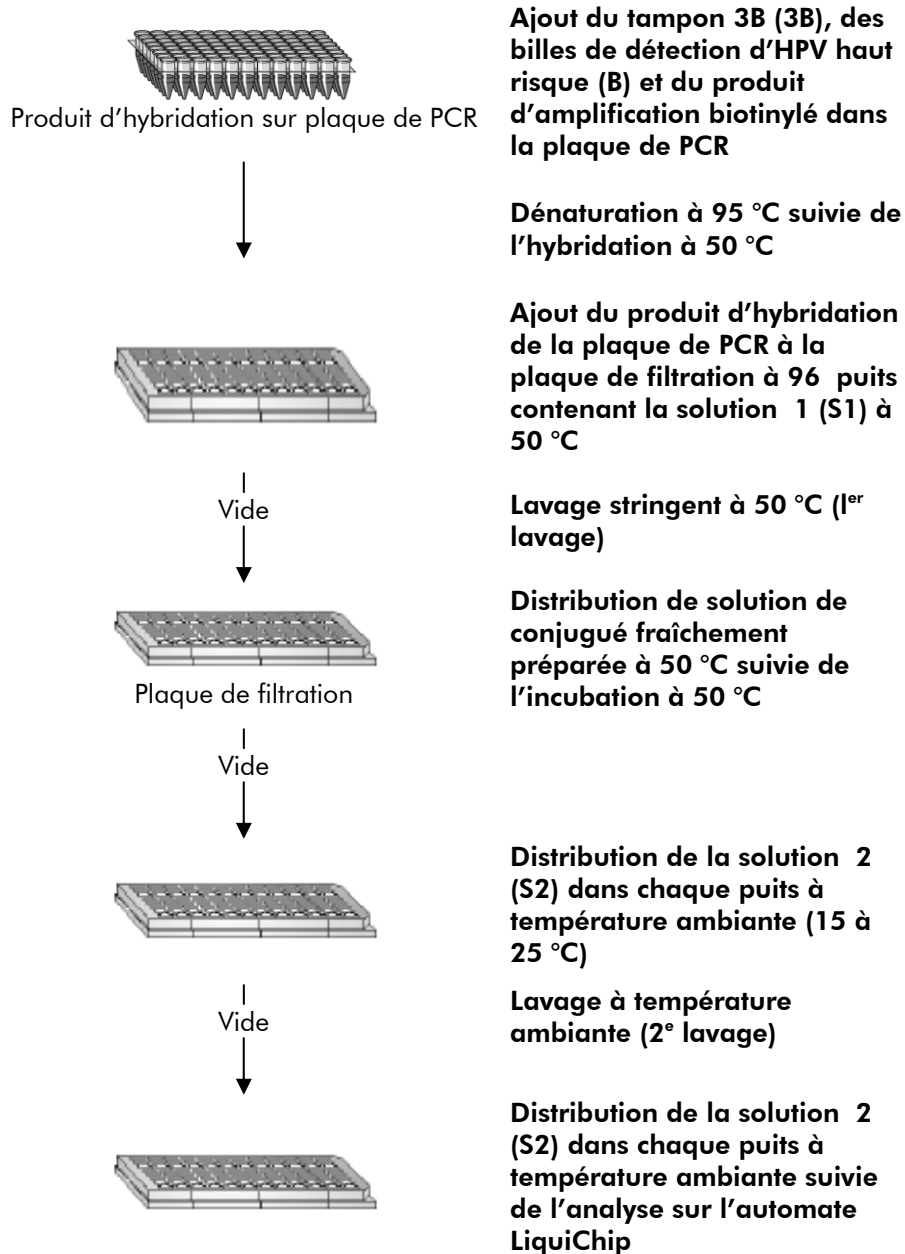


Tableau 1. Liste des billes et des sondes de génotypage d'HPV associées

Bille de type	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Sonde HPV	CC*	16	18	26	31	33	35	39	45	51

* CC = contrôle du conjugué

Bille de type	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
Sonde HPV	52	53	56	58	59	66	68	68	73	82	82	bêta-globine

Caractéristiques de performance

Sensibilité analytique

Le seuil de détection des types HPV 16, HPV 18 et HPV 45 a été formellement déterminé. Les résultats sont présentés dans le Tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2. Sensibilité analytique, seuil de détection d'HPV 16, 18 et 45

Génotype	Seuil de détection (copies/PCR)
HPV 16	5
HPV 18	8
HPV 45	20

La sensibilité analytique de la PCR multiplexe en présence de GP5+, GP6+ et de bêta-globine pour les types d'HPV 31, 35, 39 et 52 a été évaluée par le biais d'un test consistant en 2 analyses de 4 dilutions en 2 exemplaires.

La sensibilité analytique de la PCR multiplexe en présence de GP5+, GP6+ et de bêta-globine pour les types d'HPV 26, 33, 51, 53, 56, 58, 59, 66, 68 (et sous-type 68a), 73 et 82 (MM4 et IS39) a été évaluée par le biais d'un test consistant en une analyse d'au moins 4 dilutions. Pour les 15 types restants, une série de dilutions a été analysée en plusieurs exemplaires et la concentration a été déterminée avec 100 % de résultats positifs. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3. Sensibilité, seuil de détection de la concentration en fonction du génotype

Type	Seuil de détection en nombre de copies par PCR	Méthode d'analyse
HPV 16	5	Seuil de détection maximal
HPV 18	8	
HPV 45	20	
HPV 31	10	Seuil de détection limité
HPV 35	10	
HPV 39	100 à 1000	
HPV 52	100 à 1000	
HPV 26	100	
HPV 33	1	Une seule série de dilutions
HPV 51	100	
HPV 53	10 000	
HPV 56	10	
HPV 58	100	
HPV 59	100	
HPV 66	10	
HPV 68	10 000	
HPV 68a	1000	
HPV 73	100	
HPV 82 (MM4)	1000	
HPV 82 (IS39)	100	

Spécificité analytique pratique

Les amplimères des 18 génotypes d'HPV et des 2 sous-types ciblés par le test (à savoir HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68 (68a), 73, 82 MM4 (82IS39)) ont donné un résultat exact pour le test *digene* HPV Genotyping LQ, kit de détection, confirmant ainsi la bonne identification du type d'HPV. De grandes quantités d'amplimères (obtenus à partir des 10 000 000 copies d'HPV par PCR des types et sous-types 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 61, 66, 67, 68 (et 68a), 69, 71, 72, 73, 81, 82 (MM4 et IS39)) ont servi à rechercher une éventuelle réactivité croisée. Aucune des sondes n'a réagi avec un amplimère d'un type de HPV non ciblé.

La spécificité du test *digene* HPV Genotyping LQ, kit de détection est assurée par la sélection des sondes ainsi que celle de conditions de réaction stringentes. Une analyse comparative de séquences des sondes a été effectuée afin de rechercher d'éventuelles homologues avec toutes les séquences publiées dans les banques génétiques. De cette façon, la détectabilité de toutes les séquences des souches importantes a également été contrôlée. En outre, les microorganismes généralement présents dans la région anogénitale féminine ont été analysés.

Aucun des agents pathogènes testés n'a réagi (voir Tableau 4). La présence de ces microorganismes ne réduit pas la sensibilité de détection des génotypes d'HPV haut risque.

Tableau 4. Agents pathogènes susceptibles d'entraîner une réaction croisée

Agent pathogène
<i>Acinetobacter anitratus</i>
<i>Acinetobacter lwoffii</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Escherichia coli</i> (HB101)
<i>Escherichia coli</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Mobiluncus curtisii</i>
<i>Mobiluncus mulieris</i>

Précision

Un panel de 10 échantillons différents, contenant des plasmides des 20 géotypes et sous-types d'HPV concernés par le test ont été analysés à une concentration dix fois supérieure au seuil de détection estimé, en 3 exemplaires, sur 3 jours, par 2 techniciens et une fois, un autre jour, avec des kits de 2 autres codes de lot, soit un total de 24 points de donnée par échantillon. Tous les résultats de géotypage se sont révélés identiques.

En outre, l'ADN purifié de 92 échantillons a été testé par 2 techniciens avec des kits de 3 lots différents. 3 catégories de résultats ont été obtenues : identiques (correspondance à 100 % des géotypes), compatibles (au moins un géotype en commun) ou discordants (aucun géotype en commun). Entre ces 2 techniciens, le pourcentage de résultats identiques ou compatibles était compris entre 98 et 100 %. En comparant les kits de différents lots utilisés par les techniciens (c'est-à-dire en comparant les 6 résultats), le pourcentage de résultats identiques ou compatibles était de 95 %.

Enfin, une sélection de 25 échantillons du panel ci-dessus a été analysée en 2 exemplaires, par 2 techniciens (analyse intra-laboratoire) dans un autre laboratoire (analyse inter-laboratoires). À nouveau, 3 catégories de résultats ont été obtenues : identiques (correspondance à 100 % des géotypes), compatibles (au moins un géotype en commun) ou discordants (aucun géotype en commun). Les deux techniciens ont obtenu 96 % de résultats identiques par l'analyse en 2 exemplaires des échantillons, un échantillon présentant des résultats compatibles.

Entre ces 2 techniciens, le pourcentage de résultats identiques était de 88 % et le pourcentage de résultats compatibles de 12 %. Aucun résultat discordant n'a été observé. En comparant les 10 résultats de géotypage de chacun des 25 échantillons de l'analyse inter-laboratoires (premier et deuxième sites), le pourcentage de résultats identiques ou compatibles était de 100 %, avec 72 % de résultats identiques et 28 % de résultats compatibles. Aucun résultat discordant n'a été observé.

En résumé, pour évaluer la similitude des résultats entre les mesures, une série d'échantillons artificiels contenant tous les types d'HPV concernés par le présent test et 92 échantillons cliniques ont été analysés en plusieurs exemplaires. Chaque échantillon a été analysé en plusieurs exemplaires, sur plusieurs jours et par différents techniciens. Différents lots ont également été analysés. Les résultats ont révélé 100 % de géotypes identiques pour les échantillons artificiels et plus de 95 % de géotypes identiques ou compatibles pour les échantillons cliniques.

Fidélité

Des aliquotes d'ADN purifié à partir d'un ensemble de 108 échantillons cliniques comprenant 50 échantillons positifs pour le test HC2 prélevés dans le STM, 50 échantillons positifs pour le test HC2 prélevés dans la solution PreservCyt et 8 échantillons négatifs pour le test HC2 prélevés dans le STM ont été analysées avec le test *digene* HPV Genotyping LQ, kit de détection sur l'automate d'hybridation inverse sur bandelette de l'Université Libre (1).

3 catégories de résultats ont été obtenues : identiques (correspondance à 100 % des génotypes), compatibles (au moins un génotype en commun) ou discordants (aucun génotype en commun). Les divergences (résultats de génotypage discordants) ont été corrigées en répétant les deux analyses et, en cas de divergences persistantes, par une analyse ultérieure de l'échantillon avec le test SPF10-LiPA₂₅ (version 1).

La comparaison a donné 85 % de résultats de génotypage identiques, 8 % de résultats compatibles et 7 % de résultats discordants. La répétition des deux analyses a permis de résoudre les divergences de 4 échantillons sur 7. L'analyse ultérieure avec le test SPF10-LiPA₂₅ a permis de corriger les divergences d'un autre échantillon. Seules les divergences de 2 échantillons n'ont pas été résolues. Dans le premier, HPV 45 a été détecté par le test *digene* HPV Genotyping LQ tandis que l'hybridation inverse sur bandelette a donné un résultat négatif. Dans le deuxième échantillon, HPV 58 a été détecté par hybridation inverse sur bandelette mais le résultat du test *digene* HPV Genotyping LQ, kit de détection était négatif.

En résumé, pour évaluer la similitude des résultats, le test *digene* HPV Genotyping LQ, kit de détection a été comparé à l'hybridation inverse sur bandelette d'HPV, test de référence largement accepté, avec 108 échantillons analysés en parallèle. 3 catégories de résultats ont été obtenues : identiques, compatibles ou discordants. Une nouvelle analyse avec le test SPF10-LiPA₂₅ a permis de lever la discordance des échantillons concernés. Les résultats montrent un très faible taux de divergence des échantillons (2 %) après une première correction des divergences (voir Tableau 5).

Tableau 5. Comparaison du test *digene* HPV Genotyping LQ, kit de détection et de l'hybridation inverse sur bandelette d'HPV

Analyse de la fidélité	% d'échantillons cliniques
Identique	85
Compatible	12
Discordant	2

Robustesse

La capacité du test *digene* HPV Genotyping LQ, kit de détection à ne pas être affecté par des variations volontaires des paramètres de la méthode concernée a été évaluée comme suit. Deux exemplaires des échantillons des génotypes d'HPV 16, 18, 45 et 52 à une concentration dix fois supérieure au seuil de détection de la PCR ont été amplifiés dans les conditions de la PCR, à une température supérieure ou inférieure d'1 °C. La détection d'HPV par le test *digene* HPV Genotyping LQ, kit de détection n'a pas été affectée par rapport aux conditions normales de cycle.

Une série d'amplimères des 18 génotypes et des 2 sous-types d'HPV à une concentration dix fois supérieure au seuil de détection approximatif a été testée aux limites supérieure et inférieure de la température d'hybridation spécifiée pour le Thermomixer ($\pm 2,0$ °C). Le test aux températures limites de 52,0 °C et 48,0 °C n'a pas modifié les résultats de génotypage.

Une série d'amplimères des 18 génotypes et des 2 sous-types d'HPV à une concentration de 10 millions de copies d'HPV par PCR a été testée aux limites supérieure et inférieure de la température d'hybridation spécifiée pour le Thermomixer ($\pm 2,0$ °C). Le test aux températures limites de 52,0 °C et 48,0 °C n'a pas modifié les résultats de génotypage. Aucune réaction croisée n'a été observée.

Substances interférentes

L'effet du sang et d'autres substances potentiellement interférentes sur le test *digene* HPV Genotyping LQ, kit de détection a été évalué (voir Tableau 6). La présence de ces substances n'entraîne pas de résultats faussement positifs ni ne réduit la sensibilité aux virus HPV.

Tableau 6. Substances interférentes

Substance
Sang
Agent hydratant
Anesthésique antihémorroïdaire
Talc
Crème antifongique
Lubrifiant vaginal

Évaluation de diagnostic

Le test *digene* HPV Genotyping LQ a été comparé au système Free University RLB (1) établi dans le cadre d'une étude multicentrique.

À cet effet, 567 prélèvements cervicaux testés positifs au test *digene* HC2 High Risk HPV DNA ont été sélectionnés. Les échantillons ont été prélevés en milieux STM et PreservCyt et l'ADN a été isolé manuellement avec le kit QIAamp[®] MinElute[®] Virus Spin ou automatiquement sur EZ1 Advanced avec le kit EZ1[®] DSP Virus.

Sur les 567 échantillons cervicaux, 552 des échantillons positifs HC2 étaient également positifs à l'un des 18 types d'HPV HR au test *digene* HPV Genotyping LQ.

Les génotypes fréquents à l'analyse ont été comparés et les résultats étaient soit identiques (100 % de génotypes correspondants), soit compatibles (au moins un génotype en commun) ou discordants (aucun génotype en commun).

Le pourcentage d'accords identiques/compatibles entre les analyses de génotypage était de 96,3 % (546 échantillons sur 567) avec 80,0 % d'identiques et 16,2 % de résultats compatibles (cf. Tableau 7). 4,5 % (21 échantillons sur 567) des résultats de génotypage étaient discordants.

Tableau 7. Comparaison des résultats de génotypage entre le test *digene* HPV Genotyping LQ et le système Free University RLB dans 567 frottis cervicaux positifs HC2.

Accord	N=567 (%)
Résultat de typage identique	454 (80,0)
Résultat de typage compatible	92 (16,2)
Résultat de typage discordant	21 (3,7)

Équipement et réactifs devant être fournis par l'utilisateur

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

- Eau distillée ou déionisée
- Liquide de gaine (par exemple, LiquiChip System Fluid, référence 922902 ou Luminex[®] Sheath Fluid, référence 40-500000, voir www.luminexcorp.com)*
- Pipettes[†] et pointes de pipette jetables stériles munies de filtre (recommandées) de 1 à 20 µl, de 20 à 200 µl, 50–200 µl et de 200 à 1000 µl[†]
- Plaque de PCR à 96 puits
- Poste de travail LiquiChip 200 Workstation (MDD), référence 9001382 ou Luminex 100 ou 200 IS Total System[†]
- Pipette à canaux multiples[†]
- Pipette distributrice et pointes (par exemple, Gilson Repetman[®], voir www.gilson.com)*[†]
- Bain à ultrasons[†]
- Pompe à vide et distributeur à vide pour plaques (par exemple, distributeur à vide Millipore MultiScreen, voir www.millipore.com, QIAvac Vacuum Manifold and Vacuum pump (référence 84010), voir www.qiagen.com)*[†]
- Mixeur Vortex[†]
- Bain-marie muni d'un couvercle, pour protéger l'analyse de la lumière, et capable d'atteindre une température de 50 ± 0,5 °C[†]
- Incubateur muni d'une porte, pour protéger l'analyse de la lumière, et capable d'atteindre une température de 50 ± 0,5 °C ou incubateur pour microplaques[†]
- Thermocycleur (par exemple, ABI[™] GeneAmp[®] PCR System 9700, voir www.appliedbiosystems.com)*[†]
- Thermomètre calibré

* Cette liste des fournisseurs n'est pas exhaustive et n'inclut pas plusieurs vendeurs importants de produits biologiques.

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

- Minuterie de laboratoire pouvant atteindre 15 h (\pm 1 min)[†]
- Bloc thermique XYP (Luminex, référence CN-0017-01, voir www.luminexcorp.com)*
- Bouchons ou film d'étanchéité pour plaque de PCR à 96 puits
- Tubes coniques pour la préparation du conjugué (1 ml, 5 ml ou 10 ml)
- Papier absorbant
- Agitateur à étuve réglable Eppendorf Thermomixer® Comfort, adaptateur pour microplaques et adaptateur pour 96 tubes de PCR de 0,2 ml[†]

[†] S'assurer que tous les instruments sont vérifiés et calibrés régulièrement selon les recommandations du fabricant.

Remarques importantes

Préparation des réactifs

Solution de conjugué

Pour préparer une solution prête à l'emploi de conjugué, diluer le conjugué de détection 500x (C) au 1/500 dans la solution 1 (S1) préchauffée à 50 °C. Préparer 75 µl de solution de conjugué pour chaque test et prévoir 2 tests supplémentaires tous les 8 tests (voir Tableau 8). Veiller à utiliser un récipient neuf et propre. La solution de conjugué diluée doit être préparée juste avant emploi et brièvement mélangée au vortex. Mettre dans un bain-marie préchauffé à 50 °C jusqu'à l'emploi.

Tableau 8. Préparation de la solution de conjugué

Nb de tests	Volume de solution 1 (S1) (µl)	Volume de conjugué de détection (C) 500x (µl)	Volume total (µl)
1	100	0,20	100,0
8	750	1,5	751,5
24	2250	4,5	2254,5
96	9000	18,0	9018,0

Analyse des résultats du multiplexage

L'utilisation du test *digene* HPV Genotyping LQ, kit de détection exige la mise à jour du logiciel QIAplex® MDD avec le logiciel QIAplex MDD HPV Genotyping LQ. Pour ce faire, exécuter le programme d'installation du logiciel MDD inclus sur le CD du logiciel QIAplex MDD HPV Genotyping LQ.

Pour toute aide technique, appeler les services techniques de QIAGEN (voir le quatrième de couverture des manuels et guides d'utilisation QIAGEN).

Protocole 1 : Préparation de la plaque de filtration

Remarques importantes avant de commencer

- Ne pas utiliser les réactifs dont la date de péremption est dépassée.
- Ne pas mélanger les réactifs de lots différents.

Avant de commencer

- Amener tous les réactifs et les billes de détection d'HPV haut risque (B) à température ambiante (15 à 25 °C) avant emploi.
- Régler un bain-marie à 50 °C. Vérifier que la température de l'eau est bien de $50 \pm 0,5$ °C à l'aide d'un thermomètre calibré.
- Placer la solution 1 (S1) dans le bain-marie à 50 °C au moins 30 minutes.
- Régler un incubateur à 50 °C. Vérifier que la température de l'incubateur est bien de $50 \pm 0,5$ °C à l'aide d'un thermomètre calibré.
- Placer le bloc thermique XYP dans l'incubateur préchauffé à 50 °C.
- Réglez le thermomixeur à 50 °C pendant au moins 10 minutes avant utilisation.

Procédure :

1. **Vérifier que le bloc thermique XYP se trouve dans l'incubateur préchauffé à $50 \pm 0,5$ °C.**
2. **Pour conditionner la plaque de filtration, distribuer 200 µl d'eau dans chacun des puits d'essai.**
3. **Relier la plaque de filtration au distributeur à vide et mettre sous vide. Appliquer le vide jusqu'au transfert complet du liquide. Arrêter le vide et retirer la plaque de filtration du distributeur à vide. Sécher le fond de la plaque de filtration avec un papier absorbant propre.**
4. **Répéter les étapes 2 et 3.**
 - ① Il est très important que le fond de la plaque de filtration soit sec pour éviter à la solution suivante (solution 1 (S1) de passer immédiatement à travers la plaque.
5. **Distribuer 200 µl de solution 1 (S1) préchauffée à 50 °C dans chaque puits d'essai. Placer la plaque de filtration sur le bloc thermique XYP dans l'incubateur préchauffé à 50 °C. Laisser la plaque dans l'incubateur jusqu'à emploi.**

Protocole 2 : Hybridation et dénaturation

Remarques importantes avant de commencer

- Ne pas utiliser les réactifs dont la date de péremption est dépassée.
- Ne pas mélanger les réactifs de lots différents.
- Fermer le flacon contenant les billes de détection d'HPV haut risque (B) immédiatement après emploi. Une exposition prolongée à la lumière peut entraîner une mauvaise classification des billes.
- Conserver tous les réactifs et les billes de détection d'HPV haut risque (B) entre 2 à 8 °C immédiatement après emploi.
- Éviter l'exposition prolongée à la lumière des tests, y compris des billes et du conjugué de détection. Une exposition prolongée à la lumière peut entraîner une mauvaise classification des billes et une détérioration du conjugué.
- Garder la plaque de PCR et la plaque de filtration contenant les billes à l'abri de la lumière directe tout en veillant à éviter un mauvais transfert de chaleur (par exemple, ne pas envelopper les plaques dans du papier d'aluminium).
- Veiller à ce que la température ne chute pas en dessous de 50 °C entre l'hybridation et le deuxième lavage.

Procédure

1. **Déposer 4 µl de tampon 3B (3B) dans le nombre de puits d'une plaque de PCR à 96 puits (non fournie) équivalent au nombre de tests.**
2. **Avant emploi, mélanger délicatement au vortex les billes de détection d'HPV haut risque (B) pendant 5 s. Passer ensuite le flacon de billes au bain à ultrasons pendant 20 s. Mélanger à nouveau le flacon de billes délicatement au vortex pendant 5 s.**
3. **Déposer 46 µl de billes de détection d'HPV haut risque (B) dans chaque puits de la plaque de PCR contenant le tampon 3B (3B). Le mélange tampon 3B et billes (B) est appelé « mélange d'hybridation ».**
4. **Ajouter 4 µl de produit de PCR biotinyté, amplifié à l'aide du test *digene* HPV Genotyping LQ, kit d'amplification, dans chaque puits de la plaque de PCR contenant le mélange d'hybridation. Utiliser une pointe de pipette stérile, munie d'un filtre, neuve pour chaque échantillon. Mélanger délicatement en pipetant et en versant le mélange plusieurs fois de suite.**

5. **Sceller les puits de la plaque de PCR à l'aide de bouchons ou d'un film d'étanchéité.**
6. **Pour dénaturer les amplicons de PCR biotinylés et permettre l'hybridation des billes de détection d'HPV haut risque (B) aux sondes oligonucléotidiques monobrins, placer la plaque de PCR dans un thermocycleur (de préférence muni d'un couvercle chauffant sous pression) et le programmer comme suit :**
 - **Amener à 95 °C le plus rapidement possible.**
 - **Maintenir 3 min à 95 °C.**
 - **Refroidir à 60 °C le plus rapidement possible.**
 - **Maintenir indéfiniment à 60 °C.**

Cette étape permet une dénaturation complète des amplicons de PCR biotinylés et une hybridation efficace des sondes oligonucléotidiques monobrins sur les billes (B).

7. **Dès que le thermocycleur est refroidi à 60 °C, placer la plaque de PCR dans le Thermomixer et procéder à l'hybridation à 50 °C pendant 15 min à 500 tr/min.**
 - ① Il est important de transférer immédiatement la plaque de PCR afin d'éviter une chute de la température en deçà de la température d'hybridation. Une telle chute de température peut entraîner une liaison non spécifique.
 - ① Il est également important de transférer la plaque immédiatement pour éviter la sédimentation des billes. La sédimentation prolongée des billes peut entraîner un affaiblissement des signaux obtenus.
8. **Pendant les dernières 3 min de l'incubation d'hybridation, préparer une nouvelle solution de conjugué prête à l'emploi (voir Tableau 8, page 19). Placer la solution de conjugué diluée au bain-marie à 50 °C et l'y laisser jusqu'à l'emploi. Conserver la solution de conjugué à l'abri de la lumière.**
9. **Tandis que la plaque de PCR se trouve encore dans le Thermomixer, transférer l'intégralité du mélange échantillon-mélange d'hybridation (54 µl) de chaque puits de la plaque de PCR à la plaque de filtration contenant 200 µl de solution 1 (S1) préchauffée à 50 °C. Au cours de cette étape, veiller à ce que la plaque de filtration reste sur le bloc thermique XYP préchauffé.**

Protocole 3 : Lavage 1

Remarques importantes avant de commencer

- Appliquer un vide léger pour éviter que les billes ne collent au filtre, ce qui réduirait le nombre de billes comptées.
- Après aspiration à l'aide du distributeur à vide, le fond de la plaque de filtration doit être séchée au moyen d'un papier absorbant propre. Il est très important que le fond de la plaque de filtration soit sec pour éviter à la solution suivante de passer immédiatement à travers la plaque. Ne pas sécher par essuyage mais en pressant la plaque sur un papier absorbant. Lors de l'ajout de la solution suivante, ne pas laisser la plaque de filtration sur le papier absorbant mais sur une paille. Dans le cas contraire, la solution versée passe immédiatement à travers la plaque.

Procédure

1. **Relier la plaque de filtration au distributeur à vide et mettre sous vide. Appliquer le vide jusqu'au transfert complet du liquide. Arrêter le vide et retirer la plaque de filtration du distributeur à vide.**
Les cibles liées aux billes sont retenues sur la plaque de filtration tandis que le liquide passe à travers celle-ci.
2. **Sécher le fond de la plaque de filtration avec un papier absorbant propre.**
3. **Remettre le bloc thermique XYP dans l'incubateur réglé à 50 °C pour un usage ultérieur.**
4. **Distribuer 100 µl de solution 1 (S1) préchauffée à 50 °C dans chaque puits de la plaque de filtration. Relier la plaque de filtration au distributeur à vide et mettre sous vide. Appliquer le vide jusqu'au transfert complet du liquide. Arrêter le vide et retirer la plaque de filtration du distributeur à vide.**
5. **Sécher le fond de la plaque de filtration avec un papier absorbant propre.**

Protocole 4 : Incubation du conjugué

Procédure

- 1. Distribuer 75 μ l de solution de conjugué préchauffée à 50 °C dans chaque puits d'essai (fraîchement préparée comme à l'étape 8 du Protocole 2 : Hybridation et dénaturation).**
- 2. Incuber la plaque de filtration à 50 °C dans le Thermomixer à 500 tr/min pendant 2 min. Protéger la plaque de filtration de la lumière.**
- 3. Placer la plaque de filtration sur le bloc thermique XYP préchauffé et incuber dans l'incubateur à 50 °C pendant 13 min. Protéger la plaque de filtration de la lumière.**
- 4. Retirer la plaque de filtration de l'incubateur. Relier la plaque de filtration au distributeur à vide et mettre sous vide. Appliquer le vide jusqu'au transfert complet du liquide. Arrêter le vide et retirer la plaque de filtration du distributeur à vide.**
- 5. Sécher le fond de la plaque de filtration avec un papier absorbant propre.**

Protocole 5 : Lavage 2

Procédure

- 1. Distribuer 100 μ l de solution 2 (S1) à température ambiante (15 à 25 °C) dans chaque puits d'essai de la plaque de filtration. Relier la plaque de filtration au distributeur à vide et mettre sous vide. Appliquer le vide jusqu'au transfert complet du liquide. Arrêter le vide et retirer la plaque de filtration du distributeur à vide.**
- 2. Sécher le fond de la plaque de filtration avec un papier absorbant propre.**
- 3. Distribuer 100 μ l de solution 2 (S2) à température ambiante dans chaque puits d'essai. Relier la plaque de filtration au distributeur à vide et mettre sous vide. Appliquer le vide jusqu'au transfert complet du liquide. Arrêter le vide et retirer la plaque de filtration du distributeur à vide.**
- 4. Sécher le fond de la plaque de filtration avec un papier absorbant propre.**
- 5. Distribuer 100 μ l de solution 2 (S2) à température ambiante dans chaque puits d'essai.**

Protocole 6 : Lecture

Procédure

1. Incuber la plaque de filtration à une température comprise entre la température ambiante (15 à 25 °C) et 50 °C dans le Thermomixer à 500 tr/min pendant 1 min. Protéger la plaque de filtration de la lumière jusqu'à emploi à l'étape 2.
i Un mélange complet est indispensable pour assurer la remise en suspension des billes de détection d'HPV haut risque (B).
2. Placer la plaque de filtration sur la plateforme XY de l'automate LiquiChip et lancer l'analyse. Le logiciel QIAplex MDD HPV Genotyping LQ permet la saisie des échantillons et l'analyse des données. Pour en savoir plus, se reporter au manuel correspondant. Pour effectuer l'analyse directement avec le logiciel LiquiChip IS, configurer les paramètres indiqués aux Tableaux 1 et 9. Pour plus d'informations, voir « Annexe A : Interprétation des résultats », page 31.

Tableau 9. Paramètres d'analyse sur l'automate LiquiChip

Élément	Paramètre
Sample volume (µl)	50
Sample time-out (s)	60
Minimal counts/bead type	100
DD gate low	8000
DD gate high	18 500
Data type	Median MFI

Résolution des principaux problèmes rencontrés

Ce guide de résolution des principaux problèmes rencontrés peut aider à répondre à certaines questions qui peuvent se poser. Pour plus d'informations, voir aussi la page Foire aux Questions de notre Centre d'assistance technique : www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Les scientifiques des Services techniques de QIAGEN seront ravis de répondre à toutes les questions 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

Durée de mesure longue (> 60 s)

- | | |
|--|--|
| a) Paramètres non définis sur l'automate LiquiChip | ① Saisir les paramètres adaptés sur l'automate LiquiChip, voir Tableaux 1 et 9. |
| b) Volume insuffisant de solution 2 (S2) dans le puits d'essai | ① Mettre sous vide. Appliquer le vide jusqu'au transfert complet du liquide. Arrêter le vide. Répéter la procédure à partir du Protocole 5 : Lavage 2. |
| c) Mélange incomplet des billes de détection d'HPV haut risque (B) | ① Répéter le test. Utiliser le même produit d'amplification. |
| d) Aiguille de prélèvement bouchée | ① Nettoyer l'aiguille, aspirer le contenu et répéter la procédure à partir du Protocole 5 : Lavage 2. |

Signal faible (IMF < 100) ou absent pour une série d'essai, y compris pour le contrôle du conjugué

- | | |
|--|--|
| Quantité utilisée de solution de conjugué incorrecte | ① Mettre sous vide. Appliquer le vide jusqu'au transfert complet du liquide. Arrêter le vide. Répéter la procédure à partir du Protocole 4 : Incubation du conjugué avec la même série de puits d'essai. Préparer une solution de conjugué diluée fraîche. |
|--|--|

Signal de bruit de fond élevé (en tout, IMF de 10 à 100)

- | | |
|--|--|
| a) Mauvaise élimination de l'excès de conjugué | ① Mettre sous vide. Appliquer le vide jusqu'au transfert complet du liquide. Arrêter le vide. Répéter la procédure à partir du Protocole 4 : Incubation du conjugué. |
|--|--|

Commentaires et suggestions

- | | |
|--|--|
| b) Mauvaise élimination du produit de PCR non lié en excès | ① Mettre sous vide. Appliquer le vide jusqu'au transfert complet du liquide. Arrêter le vide. Répéter la procédure à partir du Protocole 3 : Lavage 1. |
| c) Quantité de tampon 3B (3B) dans les puits d'essai incorrecte | ① Répéter le test. Utiliser le même produit d'amplification. |
| d) Mauvais transfert de chaleur pendant l'hybridation et/ou l'incubation du conjugué | ① Répéter le test. Utiliser le même produit d'amplification. |

Signaux faibles (IMF < 100) pour tous les types de billes, à l'exception du contrôle du conjugué

- | | |
|--|---|
| a) Quantité de produit d'amplification utilisée pour l'hybridation inadaptée | ① La concentration en produit d'amplification est trop faible en raison d'une amplification inefficace. Vérifier la quantité de produit d'amplification en faisant passer une aliquote de 10 µl sur gel d'agarose à 2 %. La longueur du produit d'amplification d'HPV varie entre 139 et 148 pb, selon le type d'HPV. Pour en savoir plus, voir la rubrique Amplification inefficace ci-dessous. L'amplimère de bêta-globine a une taille de 258 pb mais n'est probablement pas visible sur le gel. |
| b) Préchauffage inadapté de la solution 1 (S1) | ① Avant emploi, chauffer la solution 1 (S1) à au moins 50 ± 0,5 °C au bain-marie. Veiller à ce que la température ne dépasse pas 50 ± 0,5 °C. |
| c) Température d'hybridation, du lavage 1 ou de l'incubation du conjugué supérieure à 50 °C. | ① Veiller à régler le bain-marie et l'incubateur à la bonne température. |
| d) Mauvaise programmation du thermocycleur pour la dénaturation | ① Vérifier les conditions de réalisation du cycle. Si nécessaire, calibrer le thermocycleur. |

Amplification inefficace

- | | |
|--|--|
| a) Excès d'ADN | ① Vérifier la réaction de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose. En cas d'ajout d'un excès d'ADN, une trace d'ADN est souvent visible sur le gel. En raison de la faible température d'hybridation pendant la PCR, l'apparition de bandes de bruit de fond sur le gel est normale. Diluer l'ADN et répéter l'amplification en ajoutant 10 fois moins d'ADN. |
| b) Quantité d'ADN insuffisante | ① Répéter la réaction d'amplification (voir le manuel du test <i>digene</i> HPV Genotyping LQ, kit d'amplification) et augmenter la quantité d'ADN. |
| c) Problèmes relatifs à l'ADN | ① Si nécessaire, répéter la purification de l'ADN. Répéter la réaction d'amplification (voir le manuel du test <i>digene</i> HPV Genotyping LQ, kit d'amplification). |
| d) Mauvaise programmation du thermocycleur | ① Vérifier les conditions de réalisation du cycle. Si nécessaire, calibrer le thermocycleur. |

Signaux faussement positifs

- | | |
|--|--|
| a) Température d'hybridation, de lavage 1 ou d'incubation du conjugué trop basse | ① Des signaux non spécifiques peuvent apparaître si la température d'hybridation, de lavage 1 ou d'incubation du conjugué est trop basse. La température doit être de $50 \pm 0,5$ °C. Veiller à régler le bain-marie et l'incubateur à la bonne température. Pendant l'incubation, toujours fermer la porte de l'incubateur. |
| b) Excès d'ADN | ① Vérifier la réaction de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose. En cas d'ajout d'un excès d'ADN, une trace d'ADN est souvent visible sur le gel. En raison de la faible température d'hybridation pendant la PCR, l'apparition de bandes de bruit de fond sur le gel est normale. Diluer l'ADN et répéter l'amplification en ajoutant 10 fois moins d'ADN. |

- c) Contamination
- ① Si un motif non spécifique similaire apparaît pour la plupart des tests, une contamination est possible. La contamination peut se produire lors de la manipulation des échantillons cliniques, de la purification de l'ADN et de la préparation de la PCR. Répéter la réaction d'amplification avec des solutions fraîchement préparées et/ou répéter la purification d'ADN. Si le contrôle négatif d'ADN est négatif mais que les échantillons restent positifs pour le type d'HPV concerné, il est fort probable que la contamination se soit produite lors de la manipulation des échantillons cliniques.
- d) Chauffage inadapté de la solution 1 (S1)
- ① Avant emploi, chauffer la solution 1 (S1) à au moins $50 \pm 0,5$ °C au bain-marie. Veiller à ce que la température ne dépasse pas $50 \pm 0,5$ °C.
- e) Mauvaise programmation du Thermomixer
- ① Vérifier les conditions d'emploi. Si nécessaire, calibrer le Thermomixer.

Signaux faibles pour les billes liées à la bêta-globine

- PCR prévue pour une détection optimale de l'ADN d'HPV
- ① Il est possible que dans le cas de la préparation de certains ADN ou pour certains types d'échantillon, le signal de la bêta-globine soit toujours faible. Cela ne signifie pas forcément que les échantillons sont invalides. Contacter l'assistance technique.

Annexe A : Interprétation des résultats

Résultat positif

La présence d'un signal d'une IMF supérieure ou égale à 100 (sans soustraction du bruit de fond) est considérée comme étant le résultat d'une réaction positive. L'interprétation du résultat du test est directement liée au nom de la sonde du type d'HPV (par exemple, un signal pour la bille de type 24, à laquelle la sonde HPV 16 est liée, indique la présence d'HPV de type 16). Un même échantillon peut contenir plusieurs types d'HPV.

Contrôle de la qualité

Le test *digene* HPV Genotyping LQ, kit de détection contient un contrôle conjugué (type de bille 23) utilisable pour ajouter un conjugué réactif pendant la procédure d'incubation. Il doit toujours être positif et son intensité doit être presque équivalente dans tous les puits d'essai d'une même analyse. Si ce contrôle présente un signal d'une IMF inférieure à 100, le test est invalide. La sonde de la bille de type 44 sert de contrôle interne. Elle réagit avec l'ADN génomique humain co-amplifié présent dans l'échantillon clinique. Elle sert de contrôle interne pour détecter l'inhibition de la PCR, vérifier le choix de l'échantillon adéquat ainsi que l'extraction d'ADN. Si l'HPV est présent dans l'échantillon, il se peut que la sonde de la bêta-globine soit négative en raison de la compétition lors de la PCR dans la mesure où l'ADN d'HPV est préférentiellement amplifié.

Tableau 10. Analyse des résultats

Contrôle du conjugué	Résultat d'HPV	bêta-globine	Résultat	Commentaire
+	+	+	valide	
+	+	-	valide	L'ADN d'HPV est préférentiellement amplifié, d'où l'absence de la bande de la bêta-globine (concurrence lors de la PCR).
+	-	+	valide	

Suite du tableau page suivante

Tableau 10. Suite

Contrôle du conjugué	Résultat d'HPV	bêta-globine	Résultat	Commentaire
-	+/-	+/-	invalide	Répéter la détection avec le même amplimère.
+	-	-	invalide	La purification de l'ADN ou la PCR a échoué. Répéter toute l'analyse, de la purification de l'ADN à la PCR et à l'hybridation inverse avec l'échantillon initial. Si le même résultat se répète, contacter l'assistance technique.

Annexe B : Maîtrise de la contamination des réactions de PCR

Il est extrêmement important d'inclure au moins un contrôle négatif exempt de matrice d'acide nucléique à chaque préparation de PCR afin de détecter une contamination éventuelle. Dans le cas du contrôle négatif, seule le contrôle du conjugué doit être positif.

Recommandations relatives à l'agencement et aux pratiques de laboratoire

Il est recommandé d'effectuer les opérations dans l'ordre suivant :

1. Préparation et aliquotage des mélanges pour PCR
2. Préparation des échantillons (extraction de l'ADN)
3. Amplification
4. Analyse des produits de PCR biotinylés par la technologie xMAP

Le personnel impliqué dans les étapes 3 et 4 ne doit pas participer le même jour aux étapes 1 et 2. De même, après implication dans l'étape 2, le personnel ne doit pas participer le même jour à une étape 1.

Afin de prévenir la contamination des échantillons (par exemple, par les produits d'amplification) et ainsi d'éviter les résultats faussement positifs, la procédure doit être réalisée dans trois pièces physiquement séparées, chacune équipée de ses propres fournitures et pipettes. Une pièce est nécessaire à la préparation des réactifs, une autre à celle des échantillons et une troisième à l'amplification et à la détection des produits de PCR. L'ensemble de l'équipement doit être laissé dans la pièce où il est utilisé et ne pas être transféré d'une pièce à une autre. Des pointes de pipette munies de filtre doivent être utilisées afin de minimiser la contamination croisée des échantillons. En outre, porter des gants jetables et les changer fréquemment.

Salle 1 : Cette pièce doit être réservée à la conservation et à la préparation des réactifs de PCR. Cette pièce et l'équipement qui y est utilisé doivent rester à l'abri des produits d'amplification. Le personnel de laboratoire doit porter une blouse propre qui ne doit pas quitter la pièce. Toujours porter des gants.

Salle 2 : Cette pièce sert à la préparation des échantillons et doit rester à l'abri des produits d'amplification. Le personnel de laboratoire doit porter une blouse propre qui ne doit pas quitter la pièce. Pendant la préparation des échantillons, changer de gants jetables régulièrement. Déboucher avec précaution les flacons contenant les échantillons traités pour éviter toute contamination croisée. Éviter d'ouvrir simultanément plusieurs flacons contenant des échantillons.

Salle 3 : Cette pièce sert à l'amplification et à la détection des produits de PCR. Le personnel de laboratoire doit porter une blouse propre qui ne doit pas quitter la pièce. Changer de blouse tous les jours. Porter des gants jetables pour manipuler les produits d'amplification.

Le test *digene* HC2 High-Risk HPV et le test *digene* HPV Genotyping LQ, kit de détection peuvent être réalisés dans la même pièce. Dans ce cas, procéder au traitement de l'échantillon, à la dénaturation et au transfert sur la plaque d'hybridation avant d'entrer dans le laboratoire réservé au test HC2 et à la phase de détection du test Genotyping LQ (Salle 3). Cela protège l'échantillon initial, à traiter dans la Salle 2, d'une exposition aux produits d'amplification manipulés dans la Salle 3.

En cas de contamination, les paillasses, l'appareillage et les pipettes peuvent être décontaminés par nettoyage avec les solutions DNA AWAY et RNase AWAY (Molecular BioProducts) ou avec une solution commerciale d'eau de Javel diluée à 1/10*†. Rincer ensuite les paillasses et les pipettes avec de l'eau exempte de RNase.

Précautions générales relatives aux produits chimiques

Il est recommandé de conserver les solutions mères pour PCR en petites aliquotes et d'utiliser des aliquotes fraîches à chaque analyse.

Références

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

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

Référence citée

1. van den Brule, A. J., Pol R., Fransen-Daalmeije, N., Schouls, L. M., Meijer, C. J., and Snijders, P. J. (2002) GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot

* La plupart des solutions commerciales d'eau de Javel contiennent environ 5,25 % d'hypochlorite de sodium. Il s'agit d'une substance irritante qui doit être manipulée avec précaution.

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

analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol* **40**, 779.

Pour commander

Produit	Contenu	Référence
<i>digene</i> HPV Genotyping LQ Test (96)	test <i>digene</i> HPV Genotyping LQ, kit d'amplification et test <i>digene</i> HPV Genotyping LQ, kit de détection	613215
QIAplex® MDD HPV Genotyping LQ Software	Logiciel qui accompagne le test <i>digene</i> HPV Genotyping LQ, kit de détection	9020145
Produits assimilés		
QIAamp MinElute Virus Spin Kit (50)	Pour 50 minipréparations : 50 colonnes QIAamp MinElute, protéase QIAGEN, ARN entraîneur, tampons, tubes de prélèvement (2 ml)	57704
EZ1® DSP Virus Kit (48)	Pour 48 préparations d'acides nucléiques viraux : cartouches de réactif préremplies, porte-pointes jetables, pointes munies de filtre jetables, tubes d'échantillon, tubes d'élution, tampons, ARN entraîneur	62724

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

Page laissée volontairement vierge

Page laissée volontairement vierge

Marques de commerce : QIAGEN®, QIAamp®, QIAplex®, *digene*®, EZ1®, LiquiChip®, HC2™, MinElute®, Specimen Transport Medium™ (Groupe QIAGEN) ; Eppendorf®, Thermomixer® (Eppendorf AG) ; GeneAmp® (Applied Biosystems ou ses filiales) ; Repetman® (Gilson, Inc.) ; xMAP® (Luminex Corporation) ; ThinPrep®, PreservCyt® (Hologic).

Accord de licence limitée

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur du test *digene* HPV Genotyping LQ, kit de détection accepte les conditions suivantes :

1. Le test *digene* HPV Genotyping LQ, kit de détection ne doit être utilisé que conformément au « Manuel du test *digene* HPV Genotyping LQ, kit de détection » et 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 test *digene* HPV Genotyping LQ, kit de détection » 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, expresse ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du kit consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre, de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les termes précédents. QIAGEN peut faire appliquer des interdictions de cet Accord de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de cet Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

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

© 2009 QIAGEN, tous droits réservés.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 03-9840-9800 ■ 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

China ■ Orders 0086-21-3865-3865 ■ Fax 0086-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325, 800-988-0327

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 02-33430-420 ■ Fax 02-33430-426 ■ Technical 800-787980

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

Korea (South) ■ Orders 1544 7145 ■ Fax 1544 7146 ■ Technical 1544 7145

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

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

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

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

Singapore ■ Orders 65-67775366 ■ Fax 65-67785177 ■ Technical 65-67775366

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

