

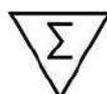


EurobioPlex DNA QC

Contrôle d'extraction et d'amplification d'ADN

Pour la PCR en temps réel.

REF EBX-002

 **100 tests**

CE **IVD**

Conditions de stockage: conserver tous les réactifs à -20°C jusqu'à utilisation et après première utilisation, éviter plus de 3 cycles de congélation/décongélation

 **Mode d'emploi**

UTILISATION

Le kit EurobioPlex DNA QC Contrôle d'extraction et d'amplification d'ADN permet de réaliser un contrôle des variations pouvant se produire au cours des étapes de préparation d'ADN d'échantillons biologiques et d'amplification par PCR en temps réel. Le contrôle interne ADN (CI ADN) permet de s'assurer qu'un résultat négatif ne peut être dû à une mauvaise préparation d'ADN et/ou à la présence d'inhibiteurs de PCR en trop grande quantité. Le kit n'est pas conçu pour d'autres applications en PCR en temps réel.

INTRODUCTION

Lors de la préparation d'ADN à partir d'échantillons, des problèmes peuvent survenir au cours des diverses étapes ou la présence d'inhibiteurs de PCR peut se produire. Les inhibiteurs sont par exemple très fréquents à partir d'échantillons tels que le sang ou les selles, mais pas seulement. Il est donc important de contrôler ces phénomènes. Un résultat peut être rendu faussement négatif et peut être dû à une mauvaise préparation d'ADN ou à la présence d'inhibiteurs. Il est donc primordial d'ajouter à chaque échantillon un contrôle interne.

PRINCIPE DE LA DETECTION

Le kit EurobioPlex DNA QC Contrôle d'extraction et d'amplification d'ADN consiste à amplifier le contrôle interne ADN par un couple d'amorces et sonde. La sonde spécifique du contrôle interne ADN est marquée par le fluorophore Cy5 et émet une fluorescence spécifique suite à son hydrolyse au cours de l'élongation.

Il est recommandé d'utiliser ce contrôle dès l'extraction d'ADN.

Dans ce cas, deux résultats peuvent être obtenus (voir analyse des résultats §II.1):

1/ le test du contrôle interne ADN est positif : l'ADN a été correctement extrait, et il n'y a pas d'inhibiteurs de PCR. Le résultat peut être validé.

2/ le test du contrôle interne ADN est négatif : soit l'ADN n'a pas été correctement préparé, soit la présence d'inhibiteurs de PCR inhibe la réaction de PCR. Il est alors recommandé de diluer l'échantillon ou de répéter l'extraction. Il est possible de vérifier si l'inhibition se produit au moment de la réaction PCR (pour se faire, suivre le protocole 2). Si le test du contrôle d'ADN est inhibé à nouveau, il peut suffire de diluer suffisamment l'échantillon pour valider les résultats.

COMPOSITION DU KIT

Le kit EurobioPlex Contrôle d'extraction et d'amplification d'ADN est prêt à l'emploi.
Le kit contient les réactifs suivants:

- Le contrôle interne ADN soit la matrice d'ADN correspondant à une séquence non codante contenue dans le plasmide PUC57. Le fragment d'ADN amplifié comporte 180 paires de bases.
- les amorces et la sonde spécifiques du CI-PCR marqué par le fluorophore Cy5.

Le kit ne comprend pas l'enzyme Taq polymérase permettant l'amplification.

La fluorescence est émise et mesurée de façon individuelle par un système optique au cours de la PCR en temps réel. La détection du fragment amplifié du contrôle interne ADN est réalisée par un fluorimètre en utilisant le canal indiqué ci-dessous :

Cible	Fluorophore	Excitation	Emission
Contrôle interne ADN	Cy5	647 nm	667 nm

Fluorophore à sélectionner en fonction du thermocycleur utilisé :

- Cy5 pour les systèmes ABI, Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx,
- Canal Alexa647 (SmartCycler II),
- Canal 670 (LC 480),
- Canal Red (RotorGene).

Composition du kit	Nom étiquette	Volume	Reconstitution
Contrôle interne ADN	CI ADN	4 x 140 µl	Prêt à l'emploi
Amorces et sonde permettant l'amplification du contrôle interne	PP mix	4 x 30 µl	Prêt à l'emploi

CI ADN est présent à une concentration de 10^6 copies/µl.

Nous recommandons une concentration par réaction de PCR de $5 \cdot 10^5$ copies/réaction mais ce paramètre doit être déterminé et validé par l'utilisateur dans son application spécifique.

Matériels nécessaires non fournis:

- ◇ Hotte biologique
- ◇ Appareil de qPCR
- ◇ Centrifugeuse pour microtubes
- ◇ Vortex
- ◇ Plaques / tubes pour réaction de qPCR
- ◇ Micropipettes
- ◇ Embouts stériles à filtres pour micropipettes
- ◇ Microtubes stériles
- ◇ Gants

CONSERVATION

Tous les réactifs doivent être stockés à -20°C.

Les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du kit.

Le réactif peut supporter jusqu'à 3 cycles de congélation/décongélation au-delà son utilisation n'est pas recommandée car cela pourrait réduire la sensibilité de l'analyse.

PRECAUTIONS ET NOTES

Lire attentivement ces instructions avant de débiter la procédure.

- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée par du personnel compétent.
- ◇ S'assurer que les instruments ont été installés, calibrés et maintenus en accord avec les recommandations du fabricant
- ◇ Les volumes indiqués pour le couple d'amorces et du contrôle interne ADN sont des recommandations et peuvent être modifiés pour s'adapter aux paramètres de votre test de PCR en temps réel.
- ◇ Les échantillons cliniques doivent être considérés comme du matériel potentiellement infectieux et doivent être préparés sous une hotte à flux laminaire.
- ◇ Ne pas utiliser ce kit après la date de péremption indiquée.
- ◇ Une fois les réactifs décongelés, centrifuger brièvement les tubes avant leur utilisation.
- ◇ Définir trois zones de travail distincts : 1) Extraction de l'ADN, 2) Préparation du mélange réactionnel et 3) Amplification / Détection des produits amplifiés.
- ◇ Les pipettes, les réactifs et autres matériels de travail ne doivent pas circuler entre ces zones.
- ◇ Une attention particulière doit être mise en œuvre pour conserver la pureté des réactifs et des mélanges réactionnels. L'utilisation de gants est obligatoire. Des méthodes appropriées de préparation d'ADN doivent être utilisées.
- ◇ Utiliser toujours des embouts stériles à filtre pour micropipettes.
- ◇ Porter des blouses et des gants distincts dans chaque zone de travail.
- ◇ Ne pas pipeter avec la bouche. Ne pas manger, ni boire ou fumer dans le laboratoire.
- ◇ Eviter les aérosols.

PROTOCOLE

Remarques générales d'utilisations:

1. Bien homogénéiser les réactifs du kit avant manipulation.
2. Le contrôle interne ADN contient une concentration élevée de matrice ADN. Les manipulations doivent être réalisées précautionneusement pour éviter toute contamination.

3. Nous recommandons une concentration par réaction de PCR de 5.10^5 copies /réaction mais ce paramètre doit être établi et validé par l'utilisateur dans son application spécifique.

I-Préparation d'ADN à partir d'échantillons :

Ajouter le contrôle interne ADN à chaque échantillon clinique avant extraction. Sachant que nous recommandons une quantité finale de 5.10^5 copies/test de PCR, le volume à ajouter sera déterminé par l'utilisateur en fonction du kit et des différents volumes de solutions dans la procédure d'extraction (lyse/ élution) utilisés. De nombreux kits d'extraction d'ADN sont disponibles chez plusieurs fabricants. Vous pouvez utiliser votre propre système d'extraction ou un système commercial adapté en se référant aux instructions du fabricant.

Par exemple :

Pour des échantillons de liquide biologique, avec le kit InnuPREP DNA Mini kit (845-KS-1040050, disponible chez Eurobio), il est recommandé pour un volume d'échantillon de 200 µl et un volume d'élution de 50 µL d'ajouter 5 µl d'ADN contrôle avant extraction (concentration après élution: 10^5 copies/microlitre).

Il est recommandé d'ajouter le contrôle interne dans le mélange tampon de lyse/échantillon et non directement dans le tampon de lyse.

II- Réalisation de la PCR et analyse des résultats

II.1- PROTOCOLE 1: AJOUT DE CI ADN FAITE À L'EXTRACTION

- Préparez les réactifs de la PCR en temps réel selon le protocole que vous avez validé pour votre application
- Ajouter 1/25 du volume total de réaction PCR du mélange d'amorces et sonde (PP mix) (ex : 1 microlitre pour 25 microlitres de réaction PCR) au mélange réactionnel de PCR.
- Effectuer le test de PCR en temps réel.
- En parallèle réaliser les contrôles suivants :
 - o contrôle positif: 1 µl de PP mix + 1 µl de CI ADN + volume défini de Mastermix PCR (selon les recommandations du fournisseur) + eau qsp 25 µl
 - o contrôle négatif suivant : 1 µl de PP mix + volume défini de Mastermix PCR (selon les recommandations du fournisseur) + eau qsp 25 µl
- Une fois la PCR en temps réel réalisée, analysez la courbe d'amplification de l'ADN contrôle d'extraction.

Analyse des résultats PROTOCOLE 1

La barre de seuil (threshold) doit être ajustée dans la phase exponentielle pour déterminer la valeur de Ct.

Le contrôle positif doit avoir un $Ct < 30$.
Le contrôle négatif doit avoir un $Ct > 40$.

1. Si le Ct du contrôle interne ADN est <32 (en ayant suivi la recommandation de 10^5 copies/microlitre final dans la PCR) : l'ADN a été correctement extrait, vous pouvez valider votre résultat.
2. Si le Ct du contrôle interne ADN est >32 (en ayant suivi la recommandation de 10^5 copies/microlitre final dans la PCR) : soit l'ADN n'a pas été correctement préparé, soit il y a des inhibiteurs de PCR. Il est alors recommandé de diluer l'échantillon ou répéter l'extraction. Il est possible d'ajouter le contrôle interne ADN à nouveau à l'amplification selon le Protocole 2. Si le test du contrôle d'ADN est inhibé à nouveau, il peut être suffisant de diluer l'échantillon pour valider les résultats.

II.2- PROTOCOLE 2: AJOUT DE CI ADN À L'AMPLIFICATION: CONTRÔLE DE L'INHIBITION DE PCR

Ce protocole 2 est utilisé uniquement pour tester l'inhibition de la PCR (par exemple dans le cas où le contrôle interne d'ADN n'a pas été ajouté à l'extraction).

- Préparez les réactifs de la PCR en temps réel selon le protocole que vous avez validé pour votre application.
- Ajouter 1/10 du volume total de réaction PCR de contrôle interne ADN (CI ADN) à l'ADN extrait (ex : 2,5 μ l pour 25 microlitres de réaction PCR soit 10^5 copies/microlitre final) et 1/25 du volume total de réaction PCR du mélange d'amorces et sonde (PP mix) (ex : 1 microlitre pour 25 microlitres de réaction PCR) au mélange réactionnel de PCR.
- Effectuer le test de PCR en temps réel.
- En parallèle réaliser les contrôles suivants :
 - o contrôle positif: 1 μ l de PP mix + 1 μ l de CI-ADN + volume défini de Mastermix PCR (selon les recommandations du fournisseur) + eau qsp 25 μ l
 - o contrôle négatif suivant : 1 μ l de PP mix + volume défini de Mastermix PCR (selon les recommandations du fournisseur) + eau qsp 25 μ l.
- Une fois la PCR en temps réel réalisée, analysez la courbe d'amplification de l'ADN contrôle d'extraction.

Analyse des résultats PROTOCOLE 2

La barre de seuil (threshold) doit être ajustée dans la phase exponentielle pour déterminer la valeur de Ct.

Le contrôle positif doit avoir un $Ct < 30$.
Le contrôle négatif doit avoir un $Ct > 40$.

1. Si le Ct du contrôle interne ADN est <32 : la PCR n'est pas inhibée. Dans le cas où le CI ADN avait été ajouté aussi avant extraction, l'ADN n'a pas été correctement préparé. L'échantillon doit être extrait à nouveau.

2. Si le Ct du contrôle interne ADN est >32 : la PCR est inhibée. Il est impossible de dire avec certitude si l'ADN a été correctement préparé. Diluer l'échantillon et tester à nouveau ou extraire à nouveau l'échantillon.

BIBLIOGRAPHIE

1-Ratcliff RM, Chang G, Kok T, Sloots TP. Molecular diagnosis of medical viruses. Curr Issues Mol Biol. 2007 Jul;9(2):87-102.

2-Haugland RA, Siefring S, Lavender J, Varma M. Influences of sample interference and interference controls on quantification of enterococci fecal indicator bacteria in surface water samples by the qPCR method. Water Res. 2012 Nov 15;46(18):5989-6001.

3-Green HC, Field KG. Sensitive detection of sample interference in environmental qPCR. Water Res. 2012 Jun 15;46(10):3251-60.

ELIMINATION DES DECHETS

Eliminer tous les déchets conformément à la législation sur les DASRI.

SYMBOLES

REF

Référence

LOT

Numéro de lot



Limite supérieure de température de conservation



Date d'expiration



Contenu suffisant pour « N » réactions



Conserver à l'abri de la lumière



Fabricant

RUO

Research Use Only

CE

Kit marqué CE

IVD

In vitro diagnostic



Mode d'emploi



eurobio *AbCys*

7, avenue de Scandinavie
91953 Les Ulis Cedex
FRANCE

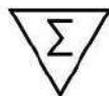


EurobioPlex DNA QC

Control of DNA extraction and amplification

Real-Time PCR

REF EBX-002



100 tests



Storage conditions:

Keep all reagents at -20°C until use and after first use.
Avoid more than 3 freezing/defrosting cycles of the reagents.



Instructions for use

INTENDED USE

The EurobioPlex DNA QC Control of DNA extraction and amplification is used to control variations that may occur during the DNA preparation step from biological samples and real-time PCR. The DNA internal control ensures that a negative result is not due to a DNA preparation problem or due to the presence of PCR inhibitors in high amounts. This kit is not intended to be used for other real-time PCR applications.

INTRODUCTION

During the preparation of DNA from samples, problems of DNA extraction, elution or the presence of PCR inhibitors can occur. Inhibitors are very common in samples such as blood or stool, but not only. It is therefore important to monitor these phenomena. A sample can be interpreted as a false negative when in fact this may be due to a bad DNA sample preparation or the presence of inhibitors. It is therefore essential to add internal DNA control to biological samples.

PRINCIPLE OF DETECTION

The EurobioPlex QC Control of DNA extraction and amplification allows to amplify the DNA internal control using two primers and a probe. The specific DNA internal control probe (CI ADN) is labeled by the Cy5 fluorophore and emits a specific fluorescence following its hydrolysis during elongation.

It is recommended to use and add this DNA internal control before DNA extraction.

In this case, two results can be obtained (see §II.1 Results analysis):

1 / internal control DNA test is positive: DNA has been properly extracted, and there is no inhibitor of PCR. The result can be validated.

2 / the internal control DNA test is negative: DNA was not extracted, or the presence of PCR inhibitors inhibits the PCR reaction. It is then recommended to dilute the sample or repeat the extraction. It is possible to check if a negative result may be due to inhibition during the PCR reaction (Follow Protocol 2). If the test of CI ADN is inhibited again in protocol 2, it may be sufficient to dilute enough the sample to validate the result.

CONTENT OF THE KIT

The EurobioPlex QC Control of DNA extraction and amplification is ready to use. The kit contains:

- Internal control DNA (CI ADN): matrix DNA corresponding to a non-coding sequence contained in the plasmid PUC57. The amplified DNA fragment comprises 180 bp.
- Specific primers and a fluorophore Cy5-labeled probe for CI ADN.

The kit does not include the enzyme Taq polymerase for the amplification.

Fluorescence is emitted and measured individually by an optical system during real-time PCR. The detection of the amplified fragment of the internal control DNA is achieved by a fluorometer using the channel shown below:

Target	Fluorophore	Excitation	Emission
Internal control DNA	Cy5	647 nm	667 nm

Fluorophores to select depending of the qPCR instrument:

- Cy5 for ABI systems, Chromo 4/CFX96, Mx systems,
- Channel Alexa647 (SmartCycler II),
- Channel 670 (LC 480),
- Channel Red (RotorGene).

Content of the kit	Label	Volume	Reconstitution
Internal control DNA	CI ADN	4 x 140 µl	Ready to use
Primers and probe for the internal control amplification	PP mix	4 x 30 µl	Ready to use

CI ADN is present at a concentration of 10^6 copies/µl. We recommend a final concentration by PCR reaction of $5 \cdot 10^5$ copies/reaction but this setting must be determined and validated by the end user and for his specific application.

Required material not provided:

- ◇ Biological Hood
- ◇ qPCR instrument
- ◇ Micro centrifuge
- ◇ Vortex
- ◇ Plates / tubes for qPCR
- ◇ Micropipettes
- ◇ Filter tips for micropipettes
- ◇ Sterile microtubes
- ◇ Gloves

STORAGE

All reagents must be stored at -20°C.

All reagents can be used until the expiration date indicated on the kit.

Many freezing/thawing cycles (> 3x) must be avoided, and could lead to decrease in sensitivity.

CAUTIONS AND NOTES

Read carefully instructions before starting.

- ◇ The experiment must be performed by competent staff.
- ◇ Instruments must have been properly installed, calibrated and maintained according to the manufacturer's recommendations.
- ◇ The volumes reported for the couple of primers and internal control DNA are recommendations and can be modified to fit the parameters of your real-time PCR test.
- ◇ Clinical samples are potentially infectious and must be processed under a laminar flow hood.
- ◇ Do not use this kit after expiration date.
- ◇ Once defrosted, spin down briefly the tubes before use.
- ◇ Use of ice or cooling block is advised in case of long delay du for instance to large number of samples or high temperature.
- ◇ Define three working areas: 1) Extraction of DNA, 2) Preparation of the reaction mix 3) Amplification / Detection of amplified products.
- ◇ Pipettes, reagents and other materials must not cross each area.
- ◇ Specific caution is required to preserve the purity of the reagents and reaction mixtures. The use of gloves is mandatory. Appropriate methods of preparation of DNA should be used.
- ◇ Always use filtered tips for micropipettes.
- ◇ Use specific lab coat and gloves in each working area.
- ◇ Do not pipette with mouth and do not eat, drink or smoke in the area.
- ◇ Avoid sprays.

PROCEDURE

General comments:

1. Mix the reagents of the kit before handling.
2. The internal control DNA contains a high concentration of matrix DNA. Handling must be done carefully to avoid contamination.
3. We recommend a concentration of $5 \cdot 10^5$ copies per PCR reaction, but this setting must be determined and validated by the end user and for his specific application.

I- DNA extraction from biological samples

Add the internal DNA control to each clinical specimen before extraction. Knowing that we recommend a final amount of $5 \cdot 10^5$ copies/PCR test, the volume added will be determined by the user according to the kit and the different volumes of solutions in the extraction procedure (lysis/elution) used. Many DNA extraction kits are available from several manufacturers. You can use your own extraction system or a suitable commercial system by referring to the manufacturer's instructions.

For example: for biological fluid samples, with the InnuPREP DNA Mini kit (845-KS-1040050 available at Eurobio), it is recommended for a 200 µl sample volume and a volume of elution of 50 µl, to add 5 µl of DNA control prior to extraction (concentration after elution: 10⁵ copies/µl).

It is recommended to add the internal control in the lysis/sample buffer mixture and not directly in the lysis buffer.

II- PCR and Results analysis

II.1- PROTOCOL 1: ADDITION OF CI ADN WAS DONE DURING EXTRACTION

- Prepare the real-time PCR reagents according to the protocol that you have validated for your real-time PCR application.
- Add 1/25 of the mixture of primers and probe (PP mix) to the total volume of PCR reaction (ex: 1 µl for 25 µl of PCR reaction)
- Perform the real-time PCR test.
- In parallel test the following controls:
 - o Positive control: 1 µl PP mix + 1 µl CI ADN + volume of PCR Mastermix of your protocol (according to supplier recommendations) + water for a total volume of 25 µl
 - o Negative control: 1 µl PP mix + volume of PCR Mastermix of your protocol (according to supplier recommendations) + water for a total volume of 25 µl
- Once the real-time PCR has been performed, analyze the DNA amplification curve for CI ADN.

Results analysis PROTOCOL 1

Threshold must be adjusted in the exponential phase to determine the value of Ct.

Positive control must have a Ct<30.

Negative control must have a Ct>40.

1. If Ct CI-ADN < 32 (following recommendation of 10⁵ copies/microliter of PCR reaction), DNA was properly extracted. The results are valid.
2. If Ct CI-ADN > 32 (following recommendation of 10⁵ copies/microliter of PCR reaction), DNA was not properly prepared, or PCR was inhibited. It is then recommended to dilute the sample or repeat the extraction. It is possible to add the internal DNA control again in the PCR according to Protocol 2. If the test is still inhibited, it may be sufficient to dilute the sample enough to validate the result.

II.2- PROTOCOL 2: ADDITION OF CI ADN INTO THE PCR: TEST OF PCR INHIBITION

Protocol 2 is used only to test if PCR is inhibited, and can be used when CI ADN was not added to the sample before extraction.

- Prepare the real-time PCR reagents according to the protocol that you have validated for your real-time PCR application.
- Add to the PCR reaction mix:
 - o 1/10 of the total volume of PCR reaction for the internal control DNA (CI ADN) (ex: 2,5 µl for 25 µl of PCR reaction: 10⁵ copies/reaction),
 - o 1/25 of the total volume of PCR reaction for the mixture of primers and probe (PP mix) (ex: 1 µl for 25 µl of PCR reaction)
- Perform the real-time PCR test.
- In parallel tests the following controls
 - o Positive control: 1 µl PP mix + 1 µl CI ADN + volume of -PCR Mastermix of your protocol (according to supplier recommendations) + water for a total volume of 25 µl
 - o Negative control: 1 µl PP mix + volume of PCR Mastermix of your protocol (according to supplier recommendations) + water for a total volume of 25 µl
- Once the real-time PCR has been performed, analyze the DNA amplification curve for CI ADN.

Results analysis PROTOCOL 2

Threshold must be adjusted in the exponential phase to determine the value of Ct.

Positive control must have a Ct<30.

Negative control must have a Ct>40.

1. If Ct CI ADN < 32, PCR is not inhibited. If CI ADN was also added before extraction, DNA was not properly prepared, and the results are validated.
2. If Ct CI-ADN > 32, PCR is inhibited. It is not possible to determine if DNA was properly prepared.
Dilute the sample and test again, or extract once again the sample.

BIBLIOGRAPHY

1-Ratcliff RM, Chang G, Kok T, Sloots TP. Molecular diagnosis of medical viruses. Curr Issues Mol Biol. 2007 Jul;9(2):87-102.

2-Haugland RA, Siefring S, Lavender J, Varma M. Influences of sample interference and interference controls on quantification of enterococci fecal indicator bacteria in surface water samples by the qPCR method. Water Res. 2012 Nov 15;46(18):5989-6001.

3-Green HC, Field KG. Sensitive detection of sample interference in environmental qPCR. Water Res. 2012 Jun 15;46(10):3251-60.

WASTE ELIMINATION

Be in accordance with the law on the elimination of waste of clinical infectious material.

SYMBOLS

	Reference
	Batch number
	Highest storage temperature
	Expiration date
	Content sufficient for « N » reactions
	Keep protected from light
	Manufacturer
RUO	Research Use Only
	CE labeled product
	In Vitro Diagnostic
	Instructions for use



eurobio *AbCys*

7, avenue de Scandinavie
91953 Les Ulis Cedex
FRANCE