

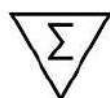


EurobioPlex RNA QC

Contrôle d'extraction et d'amplification d'ARN

Pour la PCR en temps réel.

REF **EBX-003**



100 tests



Conditions de stockage: conserver tous les réactifs à -20°C jusqu'à utilisation et après première utilisation



Mode d'emploi

UTILISATION

Le kit EurobioPlex RNA QC Contrôle d'extraction et d'amplification d'ARN permet de réaliser un contrôle des variations pouvant se produire au cours des étapes d'extraction d'ARN d'échantillons biologiques, de transcription inverse et d'amplification par PCR en temps réel (qRT-PCR). Le contrôle interne ARN permet de s'assurer qu'un résultat négatif ne peut être dû à une mauvaise extraction d'ARN et/ou des problèmes de transcription inverse et/ou à la présence d'inhibiteurs de PCR en trop grande quantité. Le contrôle interne ARN a été conçu pour être lu dans le canal Cy5 (ou équivalent). Le kit n'est pas conçu pour d'autres applications en PCR en temps réel.

INTRODUCTION

Lors de la préparation d'ARN à partir d'échantillons, des problèmes d'extraction d'ARN, de transcription inverse ou la présence d'inhibiteurs de RT-PCR peuvent 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 extraction 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 RNA QC Contrôle d'extraction et d'amplification d'ARN consiste à reverse transcrire et amplifier le contrôle interne ARN par un couple d'amorces et sonde. La sonde spécifique du contrôle interne ARN est marquée par le fluorophore Cy5 et émet une fluorescence spécifique suite à son hydrolyse au cours de l'élongation.

L'amplification du contrôle interne ARN a été validée pour des températures d'hybridation des amorces entre 55°C et 60°C et pour des PCR en temps réel comprenant 3 étapes (dénaturation, hybridation des amorces, élongation à 72°C) ou 2 étapes (dénaturation, hybridation+élongation simultanément à 60°C).

Ce contrôle doit être ajouté avant l'extraction d'ARN.

Deux résultats peuvent être obtenus :

1/ le test du contrôle interne ARN est positif (voir analyse des résultats §II) : l'ARN a été correctement extrait, et il n'y a pas d'inhibiteurs de RT-PCR. Le résultat peut être validé.

2/ le test du contrôle interne ARN est négatif : soit l'ARN n'a pas été extrait, soit la RT n'a pas bien fonctionné, soit la présence d'inhibiteurs de PCR inhibe la réaction de PCR. Il est alors recommandé de répéter l'extraction ou de diluer l'échantillon.

COMPOSITION DU KIT

Le kit EurobioPlex RNA QC Contrôle d'extraction et d'amplification d'ARN est prêt à l'emploi.

Le kit contient les réactifs suivants:

- Le contrôle interne ARN, matrice d'ARN encapsulée, non infectieuse.
- Les amorces et la sonde marquée par le fluorophore Cy5 spécifiques du CI-ARN.

Le kit ne comprend pas les enzymes reverse transcriptase ou 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 ARN est réalisée par un fluorimètre en utilisant le canal indiqué ci-dessous :

Cible	Fluorophore	Excitation	Emission
Contrôle interne ARN (CI-ARN)	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 ARN	CI ARN	4x140 µl	Prêt à l'emploi
Amorces et sonde permettant l'amplification du contrôle interne	PPR mix	4 x 30 µl	Prêt à l'emploi

CI ARN est présent à une concentration de 5.10^7 CFU/ml, soit environ 5.10^7 copies/µl.

Nous recommandons l'ajout de 5 µl de stock CI ARN par extraction puis une concentration par réaction de PCR de $1,25.10^7$ copies /réaction (5 µl d'un volume d'élution de 100 µl à la fin de l'extraction) mais ce paramètre doit être déterminé et validé dans votre propre application.

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 ARN 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.
- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée selon les bonnes pratiques de laboratoire.
- ◇ 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'ARN 2) Préparation du mélange réactionnel 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'ARN doivent être utilisées.
- ◇ Après extraction, conserver l'ARN non utilisé à -80°C.
- ◇ 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 (par aspiration/refoulement).
2. Le contrôle interne ARN contient une concentration élevée de matrice ARN. Les manipulations doivent être réalisées précautionneusement pour éviter toute contamination.
3. Nous recommandons une concentration par réaction de PCR de $1,25 \cdot 10^7$ copies /réaction mais ce paramètre doit être déterminé et validé selon votre application.

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

Ajouter le contrôle interne ARN à chaque échantillon clinique avant extraction. Sachant que nous recommandons une quantité finale de $1,25 \cdot 10^7$ copies/test de RT-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'ARN 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 virus, avec le kit InnuPREP RNA virus kit (845-KS-4800250 disponible chez Eurobio), il est recommandé pour un volume d'échantillon de 150 µl et un volume d'élution de 100 µl, d'ajouter 5 µl d'ARN contrôle avant extraction, et d'utiliser 5 µl de l'éluat pour la qRT-PCR.

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 RT-PCR et Analyse des Résultats

PROTOCOLE DE RT-PCR

- Préparez les réactifs de la RT-PCR en temps réel selon le protocole que vous avez validé pour votre application en incluant 1 µl de PPR mix pour un volume de réaction de PCR de 25 µl.
- Effectuer le test de qRT-PCR.
- En parallèle réaliser les contrôles suivants :
 - contrôle positif: 1 µl de PPR mix + 1 µl de CI-ARN + volume défini de Mastermix RT-PCR (selon les recommandations du fournisseur) + eau qsp 25 µl
 - contrôle négatif suivant : 1 µl de PPR mix + volume défini de Mastermix RT-PCR (selon les recommandations du fournisseur) + eau qsp 25 µl

- Une fois la qRT-PCR en temps réel réalisée, analysez la courbe d'amplification de l'ARN contrôle d'extraction CI-ARN.

Analyse des résultats

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<35.

Le contrôle négatif doit avoir un Ct>40.

1. Si le Ct du contrôle interne ARN est <35, l'ARN a été correctement extrait, vous pouvez valider votre résultat.
2. Si le Ct du contrôle interne ARN est >35, l'ARN n'a pas été correctement extrait, ou la RT-PCR a été inhibée. Il est alors recommandé de répéter l'extraction ou de diluer l'échantillon.

BIBLIOGRAPHIE

1. Van Maarseveen NM, Wessels E, de Brouwer CS, Vossen AC and Claas EC, Diagnosis of viral gastroenteritis by simultaneous detection of adenovirus group F, astrovirus, rotavirus group A, norovirus genogroups I and II, and sapovirus in two internally controlled multiplex real-time PCR assays, J Clin virol, 2010 ; 49(3) ; 205-10.
2. Ratcliff RM, Chang G, Kok T, Sloots TP. Molecular diagnosis of medical viruses. Curr Issues Mol Biol. 2007;9(2):87-102.
3. Pierce LR, Willey JC, Crawford EL, Palsule VV, Leaman DW, Faisal M, Kim RK, Shepherd BS, Stanoszek LM, Stepien CA. A new StaRT-PCR approach to detect and quantify fish Viral Hemorrhagic Septicemia virus (VHSV): enhanced quality control with internal standards. J Virol Methods. 2013;189(1):129-42.
4. Neisters HGM, Clinical virology in real time, 2002, J Clin Virol. 30-214-217.
5. Kim K, Park J, Chung Y, Cheon D, Lee IB, Lee S, Yoon J, Cho H, Song C, Lee KH, Use of internal standard RNA molecules for the RT-PCR amplification of the faeces-borne RNA viruses, J Virol Methods, 2002, 104(2):107-15.

ELIMINATION DES DECHETS

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

SYMBOLES



Référence



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



Mode d'emploi

RUO

Research use only

CE

Kit marqué CE

IVD

In vitro diagnostic



eurobio *AbCys*

7, avenue de Scandinavie
91953 Les Ulis Cedex
FRANCE

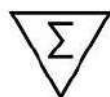


EurobioPlex RNA QC

Control of RNA extraction and amplification

Real Time RT-PCR

REF **EBX-003**



100 tests



Storage conditions: keep all reagents at -20°C until use and after first use



Instructions for use

INTENDED USE

The EurobioPlex QC Control of RNA extraction and amplification is used to control variations that may occur during the RNA extraction steps, reverse transcription and qPCR. Control RNA added before extraction or in the PCR reaction ensure that a negative result is not due to an extraction problem or due to the presence of RT-PCR inhibitors at high quantity. CI-RNA can be detected on the CY5 channel (or equivalent). This kit is not intended to be used for other RT-PCR applications.

INTRODUCTION

During the preparation of RNA from samples, problems of RNA extraction, reverse transcription or the presence of RT-PCR inhibitors can occur. Inhibitors for example are very common from samples such as blood or stool, but not only. It is therefore important to monitor these phenomena. A result can be made false negative and may be due to a bad extraction or the presence of inhibitors. It is therefore essential to add internal RNA control to each sample.

PRINCIPLE OF DETECTION

The EurobioPlex QC Control of RNA extraction and amplification aims to reverse transcribe and amplify the RNA internal control using two primers and a probe. The specific RNA internal control probe is marked by the fluorophore Cy5 and emits a specific fluorescence following its hydrolysis during elongation. Internal control RNA amplification has been validated for temperatures of hybridization of primers between 55 ° C and 60 ° C and of real time PCR comprising 3 stages (denaturation, hybridization of primers, elongation at 72 ° C) or 2 steps (denaturation, hybridization + elongation simultaneously at 60 ° C).

This control must be added before the RNA extraction.

Two results can be obtained:

- 1 / internal control RNA test is positive (see §II analysis): RNA has been properly extracted, and there is no inhibitor of RT - PCR. The result can be validated.
- 2 / the internal control RNA test is negative: RNA was not extracted, the RT did not work well, or the presence of PCR inhibitors inhibits the PCR reaction. It is then recommended to repeat the extraction or dilute the sample.

DESCRIPTION AND CONTENT OF THE KIT

The EurobioPlex QC Control of RNA extraction and amplification is ready to use.

The kit contains:

- Internal control RNA (CI-RNA), which is encapsulated, non-infectious RNA template.

- Specific primers and a fluorophore Cy5-labeled probe for CI-RNA.

The kit does not include the enzymes reverse transcriptase or Taq polymerase.

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

Target	Fluorophore	Excitation	Emission
Internal Control RNA (CI-RNA)	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	Label	Volume	Reconstitution
Internal Control RNA	CI ARN	4 x 140 µl	Ready to use
Primers and probe for CI-RNA amplification	PPR mix	4 x 30 µl	Ready to use

CI-ARN is present at a concentration of 5.10^7 CFU/ml, approximately 5.10^7 copies/µl. We recommend adding 5 µl of stock CI-RNA per extraction and a final concentration by PCR reaction of $1,25.10^7$ copies/reaction (5 µl of a 100 µl extraction eluate) but this setting must be determined and validated for your 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. Storage at + 4°C is not recommended. Once prepared ARNs should be stored at -80°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.
- ◇ Clinical samples are potentially infectious and must be processed under a laminar flow hood.
- ◇ The experiment must be performed according to good laboratory practices.
- ◇ Do not use this kit after expiration date.
- ◇ Many freezing/thawing cycles of the reagents must be avoided, and could lead to decrease in sensitivity.
- ◇ Once thawed, spin down briefly the tubes before use using a benchtop centrifuge.
- ◇ Use of ice or cooling block is advised in case of long delay due for instance to large number of samples or high temperature.
- ◇ Define three working areas: 1) Isolation of RNA, 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 RNA for cDNA transcripts should be used particularly to avoid RNase contamination.
- ◇ 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 (by suction/delivery).
- 2-The internal control RNA contains a high concentration of matrix RNA. Handling must be done carefully to avoid contamination.
- 3-We recommend a concentration of $1,25 \cdot 10^7$ copies per PCR reaction, but this must be determined and validated in your specific application.

I-RNA extraction from biological samples:

Add the internal RNA control to each clinical specimen before extraction. Knowing that we recommend a final amount of $1,25 \cdot 10^7$ copies/test RT - PCR, 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 RNA 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 samples of viruses, with the kit InnuPREP RNA virus kit (845-KS-4800250 available at Eurobio), it is recommended for a 150 µl sample volume and a volume of elution of 100 µl, add 5 µl of RNA control prior to extraction and use 5 µl of the eluate in the qRT - PCR.

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

II- RT-PCR and Results analysis

RT-PCR PROTOCOL

- Prepare the RT - PCR reagents according to the Protocol that you are using in your real-time RT-PCR application, using 1 µl of PPR mix for a volume of PCR reaction of 25 µl.
- Perform the qRT-PCR test.
- In parallel tests the following controls:
 - Positive control: 1 µl PPR mix + 1 µl CI-ARN + volume of RT-PCR Mastermix of your protocol (according to providers' recommendations) + water for a total volume of 25 µl
 - Negative control: 1 µl PPR mix + volume of RT-PCR Mastermix of your protocol (according to providers' recommendations) + water for a total volume of 25 µl
- Once the qRT - PCR real-time has been performed, analyze the RNA amplification curve for CI-RNA.

Results analysis:

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

The positive control should have a Ct<35.

The negative control should have a Ct>40.

1-If Ct<35, RNA was properly extracted, and the results are validated.

2-If Ct >35, RNA was not properly extracted, or RT - PCR was inhibited. It is then recommended to repeat the extraction or to dilute the sample.

BIBLIOGRAPHY

- 1-Van Maarseveen NM, Wessels E, de Brouwer CS, Vossen AC and Claas EC, Diagnosis of viral gastroenteritis by simultaneous detection of adenovirus group F, astrovirus, rotavirus group A, norovirus genogroups I and II, and sapovirus in two internally controlled multiplex real-time PCR assays, J Clin virol, 2010 ; 49(3) ; 205-10.
- 2-Ratcliff RM, Chang G, Kok T, Sloots TP. Molecular diagnosis of medical viruses. Curr Issues Mol Biol. 2007;9(2):87-102.
- 3-Pierce LR, Willey JC, Crawford EL, Palsule VV, Leaman DW, Faisal M, Kim RK, Shepherd BS, Stanoszek LM, Stepien CA. A new StaRT-PCR approach to detect and quantify fish Viral Hemorrhagic Septicemia virus (VHSV): enhanced quality control with internal standards. J Virol Methods. 2013;189(1):129-42.
- 4-Neisters HGM, Clinical virology in real time, 2002, J Clin Virol. 30-214-217.
- 5-Kim K, Park J, Chung Y, Cheon D, Lee IB, Lee S, Yoon J, Cho H, Song C, Lee KH, Use of internal standard RNA molecules for the RT-PCR amplification of the faeces-borne RNA viruses, J Virol Methods, 2002, 104(2):107-15.

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



CE labeled product



In Vitro Diagnostic



Instructions for use



7, avenue de Scandinavie
91953 Les Ulis Cedex
FRANCE