

Mode d'emploi

RealStar[®] CMV PCR Kit 1.2

08/2017 FR

RealStar[®]

CMV PCR Kit 1.2

Pour utilisation avec

SmartCycler[®] II (Cepheid)

LightCycler[®] 1.2/1.5/2.0 Instruments (Roche)



021212



48



08 2017



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

Sommaire

1.	Usage prévu.....	6
2.	Composants du kit.....	6
3.	Conservation	6
4.	Matériel requis non fourni	7
5.	Informations générales.....	8
6.	Description du produit.....	8
6.1	Instruments de PCR en temps réel	10
7.	Mises en garde et précautions.....	10
8.	Mode d'emploi	12
8.1	Prélèvement, transport et stockage des échantillons.....	12
8.2	Préparation de l'échantillon.....	12
8.3	Préparation du Mastermix.....	13
8.4	Préparation de la réaction.....	15
9.	Programmation des instruments de PCR en temps réel.....	16
9.1	Paramètres.....	16
9.2	Marqueurs de fluorescence (fluorophores)	16
9.3	Profil de température et acquisition du fluorophore	17
10.	Analyse des données	17
10.1	Validation des tests de diagnostic	18
10.1.1	Validité des tests de diagnostic (qualitatif)	18
10.1.2	Invalidité des tests de diagnostic (qualitatif).....	18
10.1.3	Validité des tests de diagnostic (quantitatif)	18
10.1.4	Invalidité des tests de diagnostic (quantitatif)	19
10.2	Interprétation des résultats.....	20

10.2.1	Analyse qualitative	20
10.2.2	Analyse quantitative	20
11.	Evaluation des performances	22
11.1	Sensibilité analytique	22
11.1.1	Sensibilité analytique excluant l'extraction d'acide nucléique	22
11.1.2	Sensibilité analytique pour les échantillons de plasma EDTA.....	24
11.2	Spécificité analytique	27
11.3	Gamme de linéarité.....	28
11.4	Précision	30
11.5	Evaluation en diagnostic	31
12.	Limites.....	34
13.	Contrôle qualité.....	34
14.	Assistance technique	35
15.	Littérature.....	35
16.	Marques déposées et responsabilité	35
17.	Explications des symboles	37

1. Usage prévu

Le kit RealStar® CMV PCR Kit 1.2 est un test de diagnostic *in vitro*, basé sur la technologie de PCR en temps réel, pour la détection et la quantification de l'ADN spécifique du cytomégalo virus (CMV) dans le plasma EDTA humain.

2. Composants du kit

Couleur du bouchon	Composants	Nombre de tubes	Volume [μ L/tube]
Bleu	Master A	4	60
Violet	Master B	4	120
Vert	Internal Control	1	1000
Rouge	QS1-4*	4	250
Blanc	Water (PCR grade)	1	500

* Le kit RealStar® CMV PCR Kit 1.2 contient des étalons de quantification (QS) à quatre concentrations différentes (voir le chapitre 6. Description du produit)

Internal Control = Contrôle interne

Water (PCR grade) = Eau ultra-pure pour biologie moléculaire

3. Conservation

- Le kit RealStar® CMV PCR Kit 1.2 est expédié sous glace carbonique. Les composants du kit doivent arriver congelés. Si un ou plusieurs composants ne sont pas congelés à réception, ou si l'un des tubes a été endommagé pendant le transport, merci de contacter altona Diagnostics GmbH pour assistance.
- Tous les composants doivent être conservés entre -25°C et -15°C dès leur livraison.
- Il convient d'éviter des cycles répétés de congélation-décongélation (plus de deux) car cela peut affecter les performances du test. Les réactifs doivent être congelés en aliquots en cas d'utilisation occasionnelle.

- La conservation entre +2°C et +8°C ne doit pas excéder une période de deux heures.
- Le Master A et le Master B doivent être conservés à l'abri de la lumière.

4. Matériel requis non fourni

- Instrument adapté à la PCR en temps réel (Chapitre 6.1 Instruments de PCR en temps réel)
- Système ou kit approprié à l'extraction des acides nucléiques (voir chapitre 8.1 Préparation de l'échantillon)
- Centrifugeuse de paillasse avec rotor pour des tubes réactionnels de 2 mL
- Mini Centrifugeuse avec un rotor destiné à des tubes de réaction Céphéide
- Vortex
- LightCycler® capillaires a avec le matériel correspondante
- Des tubes de réaction de Cepheid pour le SmartCycler® II
- Pipettes (réglables)
- Cônes avec filtres (jetables)
- Gants non talqués (jetables)

NOTE



Merci de vous assurer que les instruments ont été installés, calibrés, vérifiés et entretenus selon les instructions et les recommandations du fabricant.

5. Informations générales

Le cytomégalovirus humain (CMV) est un membre de la famille des *Herpesviridae* et appartient à la sous famille des *Betaherpesvirinae*. Il est composé d'une capsid icosaédrique à double brin d'ADN d'environ 230 kpb, d'un tégument et d'une enveloppe externe.

Le CMV est présent partout dans le monde et infecte les hommes à tout âge, sans suivre un modèle saisonnier ou épidémique. La séroprévalence du CMV augmente avec l'âge dans toutes les populations et s'échelonne de 40 à 100%. Comme pour les autres infections par les virus de l'herpes, une infection primaire par le CMV se manifeste par des infections latentes ou persistantes. La réactivation du virus peut se produire suite à différents stimuli, en particulier en cas d'immunodépression. La grande majorité des infections par le CMV sont asymptomatiques ou subcliniques mais les infections congénitales et les infections chez les patients immunodéprimés peuvent être symptomatiques et sérieuses. Chez les hôtes immunodéprimés, comme les patients greffés, ceux atteints par le VIH ou par un cancer, une infection par le CMV ou sa réactivation peut être fatale.

6. Description du produit

Le kit RealStar® CMV PCR Kit 1.2 est un test de diagnostic *in vitro*, basé sur la technologie de PCR en temps réel, pour la détection et la quantification de l'ADN spécifique du cytomégalovirus (CMV) dans le plasma EDTA humain.

Le kit comprend un système d'amplification hétérologue (contrôle interne) afin d'identifier d'éventuelles inhibitions de la PCR et de confirmer l'intégrité des réactifs du kit.

Le test repose sur la technologie de PCR en temps réel, utilisant une réaction en chaîne par polymérase (PCR) pour l'amplification de séquences cibles spécifiques et de sondes cibles spécifiques pour la détection de l'ADN amplifié. Les sondes sont marquées avec un marqueur fluorescent (reporter) et un désactivateur (quencher).

Les sondes spécifiques de l'ADN du CMV sont marquées par le fluorophore FAM™. La sonde spécifique du contrôle interne est marquée par un fluorophore qui montrent les mêmes caractéristiques que le Cy®3.

L'utilisation de sondes associées à des fluorophores différents permet la détection en parallèle de l'ADN spécifique du CMV et du contrôle interne dans les canaux correspondants de l'instrument de PCR en temps réel.

Le test consiste en deux processus réalisés dans un même tube réactionnel:

- L'amplification par PCR de l'ADN et du contrôle interne
- La détection simultanée des amplicons de PCR par des sondes marquées par un fluorophore

Le kit RealStar® CMV PCR Kit 1.2 est composé de:

- Deux Masters (Master A et Master B)
- Un contrôle interne
- Quatre étalons (QS1 - QS4)
- De l'eau ultra-pure (pour biologie moléculaire)

Les réactifs du Master A et du Master B contiennent tous les composants nécessaires (tampon PCR, ADN Polymérase, sel de magnésium, amorces et sondes) afin de réaliser l'amplification par PCR et la détection de la cible ADN spécifique du CMV ainsi que du contrôle interne en une seule étape de réaction.

Les étalons contiennent des concentrations standardisées en ADN spécifique du CMV. Les étalons ont été calibrés selon le 1^{er} standard international de l'OMS pour les techniques d'amplification des acides nucléiques du cytomégalovirus (CMV) (code NIBSC: 09/162). Les étalons de quantification peuvent être utilisés séparément comme contrôles positifs, ou ensemble pour générer une **courbe d'étalonnage**, afin de déterminer la concentration en ADN spécifique du CMV dans l'échantillon.

Les concentrations suivantes sont utilisées:

Étalon	Concentration [UI/μL]
QS1	1,00E+04
QS2	1,00E+03
QS3	1,00E+02
QS4	1,00E+01

6.1 Instruments de PCR en temps réel

Le RealStar® CMV PCR Kit 1.2 a été validé pour être utilisé avec les instruments de PCR en temps réel suivants:

- SmartCycler® II (Cepheid)
- LightCycler® 1.2/1.5/2.0 Instruments (Roche)

7. Mises en garde et précautions

Lire attentivement le manuel d'utilisation avant d'utiliser le produit.

- Avant toute utilisation, veuillez vérifier que le produit et ses composants:
 - Ne sont pas endommagés,
 - Sont complets: nombre, type et volume (voir le chapitre 2. Composants du kit)
 - Sont correctement étiquetés,
 - Sont congelés à la réception
- L'utilisation de ce produit est limitée au personnel qualifié et formé aux techniques de PCR en temps réel et aux procédures de diagnostic *in vitro*.
- Manipuler les échantillons comme s'ils étaient infectieux et/ou dangereux, en accord avec les procédures de sécurité en vigueur dans le laboratoire.

- Porter des gants jetables non talqués, une blouse de laboratoire et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons.
- Éviter les contaminations microbiennes et nucléaires (par ADNase/ARNase) de l'échantillon et des composants du kit.
- Toujours utiliser des pipettes à cônes jetables avec filtre, non contaminées par de l'ADNase et de l'ARNase.
- Toujours porter des gants de protection non talqués lors de la manipulation des composants du kit.
- Utiliser des zones de travail séparées les unes des autres pour les différentes activités de (i) préparation des échantillons, (ii) préparation de la réaction et (iii) les étapes d'amplification/détection. Le sens de travail dans le laboratoire doit être unidirectionnel. Porter des gants dans chaque zone de travail et les changer avant d'entrer dans une zone différente.
- Dédier des fournitures et du matériel pour chaque zone de travail et ne pas les déplacer d'une zone à une autre.
- Conserver le matériel positif et/ou potentiellement positif séparément des autres composants du kit.
- Des témoins additionnels peuvent devoir être testés selon les directives des organisations locales/gouvernementales ou des organismes d'accréditation.
- Ne pas ouvrir les tubes/plaques de réaction après l'amplification afin d'éviter les contaminations avec les amplicons.
- Ne pas autoclaver des tubes réactionnels après une PCR, car ceci ne dégrade pas les acides nucléiques amplifiés et risque de contaminer le laboratoire.
- Ne pas utiliser les composants au-delà de leur date de péremption.
- Éliminer les échantillons et les déchets de l'essai conformément aux règles de sécurité locales.

8. Mode d'emploi

8.1 Prélèvement, transport et stockage des échantillons

Les échantillons de sang doivent être prélevés à l'aide de systèmes de prélèvement standards pour sang EDTA disponibles sur le marché (par exemple, Sarstedt, Becton Dickinson, Greiner ou système équivalent). Les tubes doivent être mélangés directement après le prélèvement des échantillons. Les échantillons de sang doivent être expédiés dans un conteneur réfrigéré (température comprise entre 2 et 8 °C). Le transport doit être effectué conformément aux instructions locales et nationales en vigueur concernant le transport de matériel biologique.

Pour produire du plasma EDTA, le sang total EDTA doit être centrifugé selon les instructions fournies par le fabricant du système de prélèvement dans les 24 heures suivant le prélèvement. Le plasma EDTA doivent être conservés à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant 14 jours maximum (Abdul-Ali et al. 2011).

8.2 Préparation de l'échantillon

L'ADN extrait du plasma EDTA humain constitue le matériel de départ pour le kit RealStar® CMV PCR Kit 1.2.

La qualité de l'ADN extrait a un impact significatif sur la performance de l'ensemble du test. Il est important de s'assurer que le système d'extraction des acides nucléiques utilisé est compatible avec la technologie de PCR en temps réel.

Le kit d'extraction d'acide nucléique suivant a été validé pour une utilisation avec RealStar® CMV PCR Kit 1.2:

- QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN)

Afin d'augmenter la sensibilité du système, le protocole du QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) peut être modifié conformément aux spécifications répertoriées dans le tableau 4: Adaptations du protocole QIAamp® MinElute® Virus

Spin Kit (QIAGEN) (voir chapitre 11.1.2 Sensibilité analytique pour les échantillons de plasma EDTA).

Si la préparation des échantillons s'effectue sur une colonne comportant des tampons de lavage à l'éthanol, une étape de centrifugation supplémentaire de 10 minutes à environ 17000 x g (~ 13000 tr/min), dans un nouveau tube à essai, est vivement recommandée avant l'élution des acides nucléiques.

ATTENTION



L'éthanol est un fort inhibiteur de la PCR en temps réel. Si votre système de préparation des échantillons utilise des tampons de lavage à l'éthanol, assurez-vous d'éliminer toute trace d'éthanol avant de procéder à l'élution des acides nucléiques.

ATTENTION



L'utilisation d'ARN porteur (carrier) est crucial pour l'efficacité de l'extraction et la stabilité des acides nucléiques extraits.

Pour toute information complémentaire ou assistance technique sur le prétraitement et la préparation des échantillons, merci de contacter notre support technique (voir chapitre 14. Assistance technique).

8.3 Préparation du Mastermix

Tous les réactifs doivent être complètement décongelés, homogénéisés (par pipetage ou léger vortexage) et brièvement centrifugés avant utilisation.

Le kit RealStar® CMV PCR Kit 1.2 contient un contrôle interne hétérologue pouvant être utilisé soit comme contrôle d'inhibition de la PCR soit comme contrôle de la préparation de l'échantillon (extraction des acides nucléiques) et de l'inhibition de la PCR.

- Si le contrôle interne est utilisé comme un contrôle d'inhibition de la PCR, mais non comme contrôle de préparation de l'échantillon, le Mastermix doit

être préparé comme décrit par le schéma de pipetage ci-dessous:

Nombre de réactions (rxns)	1	12
Master A	5 µL	60 µL
Master B	10 µL	120 µL
Internal Control (contrôle interne)	1 µL	12 µL
Volume de Mastermix	16 µL	192 µL

- ▶ Si le contrôle interne est utilisé comme contrôle de préparation de l'échantillon, et d'inhibition de la PCR, le contrôle interne doit être ajouté au moment de la procédure d'extraction des acides nucléiques.
- ▶ Quelque soit la méthode ou le système utilisé pour l'extraction des acides nucléiques, le contrôle interne ne doit **jamais** être ajouté directement à l'échantillon. Le contrôle interne doit toujours être ajouté au mélange échantillon/ tampon de lyse. Le volume du contrôle interne à ajouter dépend toujours et uniquement du volume d'élution, dont il représente 10%. Par exemple si les acides nucléiques doivent être élués dans 60 µL de tampon d'élution ou d'eau, 6 µL de contrôle interne par échantillon doivent être ajoutés au mélange échantillon/tampon de lyse.
- ▶ Si le contrôle interne a été ajouté pendant la phase de préparation de l'échantillon, le Mastermix doit être préparé selon le schéma de pipetage suivant:

Nombre de réactions (rxns)	1	12
Master A	5 µL	60 µL
Master B	10 µL	120 µL
Volume de Mastermix	15 µL	180 µL

ATTENTION

Si le contrôle interne a été ajouté pendant la phase de préparation de l'échantillon, au moins le contrôle négatif doit inclure le contrôle interne.

ATTENTION

Ne jamais ajouter le contrôle interne directement à l'échantillon.

8.4 Préparation de la réaction

- ▶ Pipeter 15 µL de Mastermix dans chaque tubes capillaire du LightCycler® ou dans les tubes de réaction pour le Smart Cycler® II.
- ▶ Ajouter 10 µL d'échantillon (éluat issu de l'extraction des acides nucléiques) ou 10 µL des contrôles (étalons, contrôles positifs ou négatifs).

Préparation de la réaction	
Mastermix	15 µL
Echantillon ou contrôle	10 µL
Volume total	25 µL

- ▶ S'assurer qu'au moins un contrôle positif (QS) et un contrôle négatif sont utilisés par essai.
- ▶ Pour une quantification, tous les étalons (QS1-4) doivent être utilisés.
- ▶ Homogénéiser avec soin les échantillons et les contrôles avec le Mastermix par pipetage.
- ▶ Couvrir les capillaires ou les tubes de réaction e utilisant les bouchons convenables.
- ▶ Centrifugez les capillaires de LightCycler® ou les tubes de réaction de Smart

Cycler® II, en utilisant une centrifuge appropriée pendant 30 secondes à environ ~ 400 x g (~ 2000 rpm).

9. Programmation des instruments de PCR en temps réel

Pour obtenir des informations générales sur la préparation et la programmation des différents instruments de PCR en temps réel, veuillez consulter les manuels d'utilisation des instruments respectifs.

Pour des instructions sur la programmation relative à l'utilisation du kit RealStar® CMV PCR Kit 1.2 avec un instrument de PCR en temps réel spécifique, merci de contacter notre support technique (voir chapitre 14. Assistance technique).

9.1 Paramètres

- Définir les paramètres suivants:

Paramètres	
Volume de réaction	25 µL*
Vitesse de la rampe	par défaut

* Le volume de réaction doit être défini comme 20 µL, si vous utilisez un instrument LightCycler® 2.0 (Roche).

9.2 Marqueurs de fluorescence (fluorophores)

- Définir les marqueurs de fluorescence (fluorophores):

Cible	LightCycler® 1.2/1.5	LightCycler® 2.0	SmartCycler® II
ADN spécifique du CMV	F1	530	FAM™
Internal Control (contrôle interne)	F2	610	Cy®3

ATTENTION

Pour une analyse précise des données sur les instruments LightCycler®, un fichier de compensation de couleur spécifique peut être nécessaire. Veuillez contacter Altona Diagnostics GmbH pour obtenir de l'aide.

ATTENTION

Si vous utilisez l'instrument LightCycler® 2.0, seuls les canaux de détection 530 et 610 doivent être activés pour la correction des couleurs.

9.3 Profil de température et acquisition du fluorophore

- Définir le profil de température et l'acquisition du fluorophore:

	Mode d'analyse	Nombre cycles	Acquisition	Température [°C]	Durée [min:sec]
Dénaturation	Aucun	1	-	95	02:00
Amplification	Quantification	45	Aucun	95	00:05
			unique	60	00:30
			Aucun	72	00:10
Refroidissement	Aucun	1	-	40	00:30

10. Analyse des données

Pour des informations de base concernant l'analyse des données sur un instrument de PCR en temps réel spécifique, merci de se référer au manuel de l'instrument concerné.

Pour des informations détaillées concernant l'analyse des données générées avec le kit RealStar® CMV PCR Kit 1.2 sur différents instruments de PCR en temps réel, merci de contacter notre support technique (voir chapitre 14. Assistance technique).

10.1 Validation des tests de diagnostic

10.1.1 Validité des tests de diagnostic (qualitatif)

Un test de diagnostic **qualitatif** est **valide**, si les valeurs suivantes des contrôles sont obtenues:

Nom du Contrôle	Canal de détection	
	FAM™/F1/530	Cy®3/F2/610
Contrôle positif (QS)	+	+/-*
Contrôle négatif	-	+

* La présence ou l'absence d'un signal dans le canal Cy®3/F2/610 n'est pas pertinente pour la validité de l'essai

10.1.2 Invalidité des tests de diagnostic (qualitatif)

Un test de diagnostic **qualitatif** est **invalide**, (i) si l'essai n'est pas complet ou (ii) si l'ensemble des conditions de contrôle pour un test de diagnostics **valide** n'est pas obtenu.

En cas d'**invalidité** du test de diagnostic, répéter le test avec les acides nucléiques purifiés restants ou recommencer depuis l'échantillon de départ.

10.1.3 Validité des tests de diagnostic (quantitatif)

La **validité quantitative** des tests de diagnostic est assurée, si toutes les conditions de contrôle d'un test de diagnostic qualitatif valide sont respectées [chapitre 10.1.1

Validité des tests de diagnostic (qualitatif)]. De plus, pour des résultats quantitatifs précis, il est nécessaire de s'assurer de la validité de la **courbe étalon** générée. Pour un test de diagnostic **quantitatif valide**, les paramètres de contrôles suivants doivent être obtenus:

Paramètres de contrôle	Valeurs valides
Pente	-3,00 / -3,74
Efficacité de la PCR	85% / 115%
R carré (R ²)	> 0,98

NOTE



Les différents instruments de PCR en temps réel n'affichent pas tous les paramètres donnés par le logiciel. Pour des informations détaillées, merci de vous référer au manuel de votre instrument.

10.1.4 Invalidité des tests de diagnostic (quantitatif)

Un test de diagnostic **quantitatif** est **invalide**, (i) si l'essai n'est pas complet ou (ii) si l'ensemble des conditions de contrôle pour un test de diagnostic valide ne sont pas obtenus.

En cas d'**invalidité** du test de diagnostic, répéter le test avec les acides nucléiques purifiés restant ou recommencer depuis l'échantillon de départ.

10.2 Interprétation des résultats

10.2.1 Analyse qualitative

Canal de détection		Interprétation des résultats
FAM™/F1/530	Cy®3/F2/610	
+	+*	ADN spécifique du CMV détecté.
-	+	ADN spécifique du CMV non détecté. L'échantillon ne contient pas de quantités détectables d'ADN du CMV.
-	-	Inhibition de la PCR ou défaillance des réactifs. Répéter le test à partir de l'échantillon d'origine ou bien prélever et tester un nouvel échantillon.

* La détection du contrôle interne dans le canal de détection Cy®3/F2/610 n'est pas requise pour des résultats positifs dans le canal de détection FAM™/F1/530. De fortes charges en ADN spécifique du CMV dans l'échantillon peuvent conduire à des signaux absents ou très faibles pour le contrôle interne.

Un résultat positif spécifique au CMV peut être attendu avec un taux de positivité de 95%, si l'échantillon analysé contient au moins 80,71 UI de CMV par ml de plasma EDTA [intervalle de confiance à 95% : 44,90 – 230,86 UI/mL].

Ainsi que pour tout test de diagnostic, les résultats obtenus avec le kit RealStar® CMV PCR Kit 1.2 doivent être interprétés en prenant en compte tous les symptômes cliniques et les résultats du laboratoire.

10.2.2 Analyse quantitative

Le kit RealStar® CMV PCR Kit 1.2 fournit quatre étalons (QS). Afin de générer une **courbe d'étalonnage** pour les analyses quantitatives, les QS doivent être définis comme des **standards** de concentrations définis (Chapitre 6. Description du Produit). afin de générer la courbe d'étalonnage.

$$C_t = m \cdot \log(N_0) + b$$

C_t = Cycle seuil
 m = Pente
 N_0 = Concentration initiale
 b = interception

A partir de la courbe d'étalonnage, la concentration des échantillons inconnus peut être déterminée avec la formule suivante:

$$N_0 = 10^{(C_t - b) / m}$$

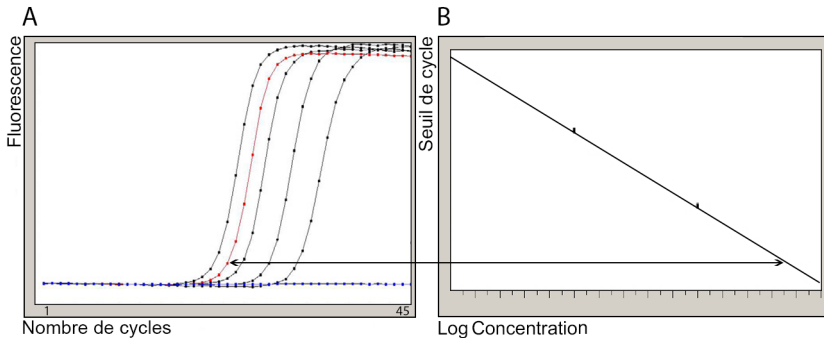


Figure 1: [A] Etalons de quantification (en noir), un échantillon positif (en rouge) et un échantillon négatif (en bleu) dans l'écran d'amplification; [B] analyse de la courbe d'étalonnage

NOTE



La concentration de "l'échantillon" est affichée en UI/μL et se réfère à la concentration dans l'éluat.

Afin de déterminer la charge **virale de l'échantillon d'origine**, la formule suivante doit être appliquée:

$$\text{Charge Virale (échantillon) [UI/mL]} = \frac{\text{Volume (Eluat) } [\mu\text{L}] \cdot \text{Charge Virale (Eluat) [UI/\mu\text{L}]}{\text{Volume d'échantillon [mL]}}$$

11. Evaluation des performances

L'évaluation de la performance analytique sans méthode d'extraction d'acide nucléique sélectionnée a été réalisée à l'aide d'un ADN spécifique au CMV quantifié. L'évaluation de la performance analytique avec des méthodes d'extraction d'acide nucléique sélectionnées a été réalisée à l'aide de la 1^{er} standard international de l'OMS concernant le cytomégalo virus humain pour les techniques d'amplification d'acide nucléique (code NIBSC : 09/162).

11.1 Sensibilité analytique

La sensibilité analytique (limite de détection - LD) du RealStar® CMV PCR Kit 1.2 est définie comme étant la concentration de molécules d'ADN du CMV pouvant être détectées avec un taux de positivité de 95 %. La sensibilité analytique a été déterminée avec et sans méthode d'extraction d'acide nucléique sélectionnée.

11.1.1 Sensibilité analytique excluant l'extraction d'acide nucléique

Une série de dilution de l'ADN du CMV a été établie de 3,1623 UI/μL jusqu'à 0,0003 UI/μL (valeur nominale) et analysée à l'aide du RealStar® CMV PCR Kit 1.2 en association avec les instruments de PCR en temps réel suivants:

- SmartCycle® II (Cepheid)
- LightCycler® 1.2/1.5/2.0 Instruments (Roche)

Les tests ont été effectués sur deux jours avec au moins huit réplicats par concentration à la fois. Les résultats ont été déterminés par analyse Probit.

Tableau 1: Résultats PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique [LightCycler® 1.2/1.5/2.0 Instruments (Roche)]

[C] initiale [UI/μL]	Nombre de répétitions	Number of Positives	Taux de réussite [%]
3,1623	16	16	100
1,0000	16	16	100
0,3162	16	13	81
0,1000	16	7	44
0,0316	16	3	19
0,0100	16	0	0
0,0032	16	0	0
0,0010	16	0	0
0,0003	16	0	0

Tableau 2: Résultats PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique [SmartCycler® II (Cepheid)]

[C] initiale [UI/μL]	Nombre de répétitions	Nombre de Positifs	Taux de réussite [%]
3,1623	16	16	100
1,0000	16	16	100
0,3162	16	14	88
0,2081	16	13	81
0,1000	32	8	25
0,0658	16	1	6
0,0316	16	1	6
0,0100	16	0	0
0,0032	16	0	0
0,0010	16	0	0
0,0003	16	0	0

Tableau 3: Sensibilité analytique déterminée par analyse Probit à l'aide de différents instruments de PCR en temps réel

Instrument de PCR en temps réel	Limite de détection [95%]	Intervalle de confiance [95%]
LightCycler® 1.2/1.5/2.0 Instruments	0,62 UI/μL	0,35 - 1,75 UI/μL
SmartCycler® II	0,42 UI/μL	0,30 - 0,83 UI/μL

11.1.2 Sensibilité analytique pour les échantillons de plasma EDTA

La sensibilité analytique en fonction d'une méthode d'extraction d'acide nucléique sélectionnée pour des échantillons de plasma EDTA a été déterminée à l'aide d'une série de dilution de la 1^{er} standard international de l'OMS concernant le cytomégalo virus humain pour les techniques d'amplification d'acide nucléique (code NIBSC : 09/162) allant de CMV 1000 UI/mL à 0,32 UI/mL (valeur nominale) dans du plasma EDTA négatif au CMV.

En deux jours, huit aliquotes par concentration à la fois ont été soumises à une extraction d'acide nucléique à l'aide du QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN). Le protocole du QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) a été adapté selon le tableau suivant.

Tableau 4: Adaptation du protocole du QIAmp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN)

	Protocole QIAGEN [µL]	Adaptation [µL]
Echantillon	200	400
Protease	25	50
Tampon de lyse (AL)	200	400
Ethanol ¹ (abs.)	250	500
Tampon de lavage (AW1)	500	700
Tampon de lavage (AW2)	500	700
Ethanol ² (abs.)	500	700

¹ ajouté au mix échantillon/tampon de lyse

² 3^{ème} étape de lavage

Chaque éluat a été analysé en utilisant le kit RealStar® CMV PCR Kit 1.2 en combinaison avec les instruments de PCR en temps réel suivants:

- SmartCycler® II (Cepheid)
- LightCycler® 1.2/1.5/2.0 Instruments (Roche)

Les résultats ont été déterminés par analyse Probit.

Tableau 5: Résultats PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique des échantillons de plasma EDTA [LightCycler® 1.2/1.5/2.0 Instruments (Roche)]

[C] initiale [UI/mL]	Nombre de répétitions	Nombre de Positifs	Taux de réussite [%]
1000,00	16	16	100
316,23	16	16	100
100,00	16	16	100
31,62	16	14	88
10,00	16	6	38
3,16	16	5	31
1,00	16	0	0
0,32	16	0	0

Tableau 6: Résultats PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique des échantillons de plasma EDTA [SmartCycler® II (Cepheid)]

[C] initiale [UI/mL]	Nombre de répétitions	Nombre de Positifs	Taux de réussite [%]
1000,00	16	16	100
316,23	16	16	100
100,00	16	16	100
31,62	16	12	75
10,00	16	5	31
3,16	16	3	19
1,00	16	0	0
0,32	16	0	0

Tableau 7: Sensibilité analytique pour les échantillons de plasma EDTA déterminée par analyse Probit à l'aide de différents instruments de PCR en temps réel

Instrument de PCR en temps réel	Limite de détection [95%]	Intervalle de confiance [95%]
LightCycler® 1.2/1.5/2.0 Instruments	58,52 UI/mL	32,38 - 168,38 UI/mL
SmartCycler® II	80,71 UI/mL	44,90 - 230,86 UI/mL

11.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du kit RealStar® CMV PCR Kit 1.2 est assurée par une sélection minutieuse des oligonucléotides (amorces et sondes). Les séquences de ces derniers ont été comparées aux séquences publiques disponibles afin de s'assurer que toutes les souches intéressantes de CMV seront détectées.

Plus d'une centaine d'échantillons de plasma EDTA négatif au CMV ont été analysés avec le kit RealStar® CMV PCR Kit 1.2. Aucun n'a présenté de signal positif spécifique au CMV, alors que tous ont montré un signal valide pour le IC. De plus, la spécificité du kit RealStar® CMV PCR Kit 1.2 a été évaluée en testant un panel d'ADN/ARN génomique extrait à partir d'autres herpèsvirus ou d'autres pathogènes importants chez des patients immunodéprimés.

Le kit RealStar® CMV PCR Kit 1.2 n'a présenté aucune réaction croisée avec l'un des pathogènes spécifiés ci-dessous:

- Virus BK
- Virus d'Epstein-Barr
- Virus de l'hépatite A
- Virus de l'hépatite B
- Virus de l'hépatite C
- Virus de l'herpès simplex 1
- Virus de l'herpès simplex 2
- Herpèsvirus humain 6A
- Herpèsvirus humain 6B
- Herpèsvirus humain 7
- Herpèsvirus humain 8
- Virus de l'immunodéficience humaine 1
- Parvovirus B19 humain
- Virus JC
- Virus simien 40
- Virus de la varicelle et du zona

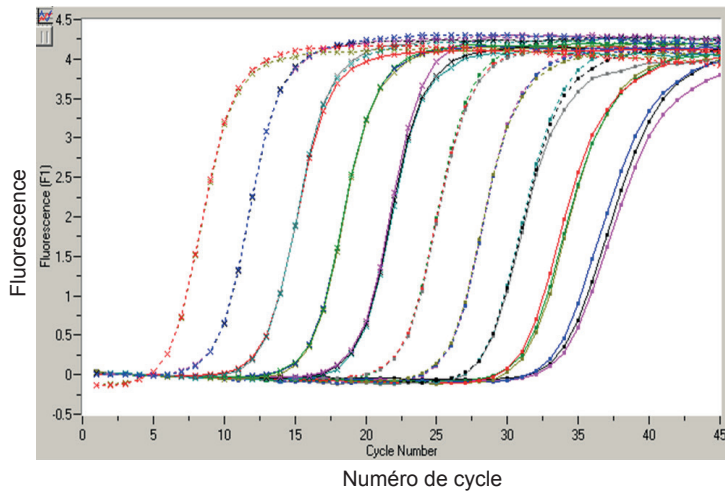
11.3 Gamme de linéarité

La gamme de linéarité du kit RealStar® CMV PCR Kit 1.2 a été évaluée par l'analyse d'une série de dilutions logarithmiques d'ADN spécifique du CMV (concentrations allant de 1,00E+09 à 1,00E+00 UI/ μ L) en utilisant l'Instrument de PCR en temps réel suivant:

- SmartCycler® II (Cepheid)
- LightCycler® 1.2/1.5/2.0 Instruments (Roche)

Chaque concentration a été analysée en quatre réplicats par instrument de PCR en temps réel.

A



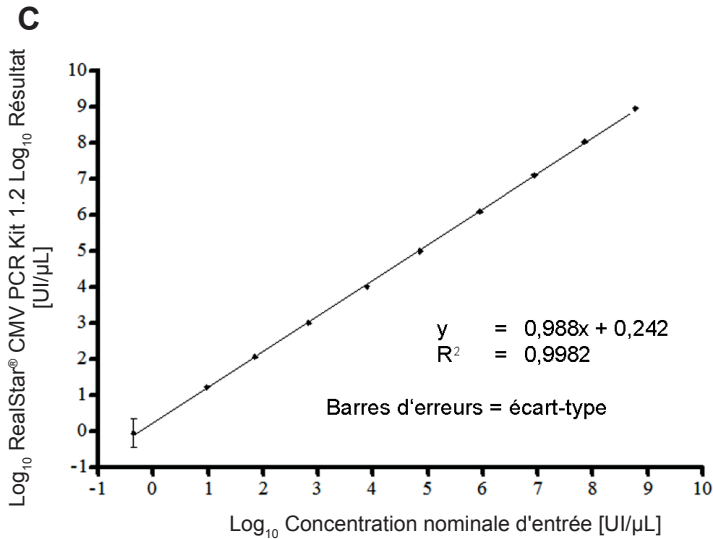
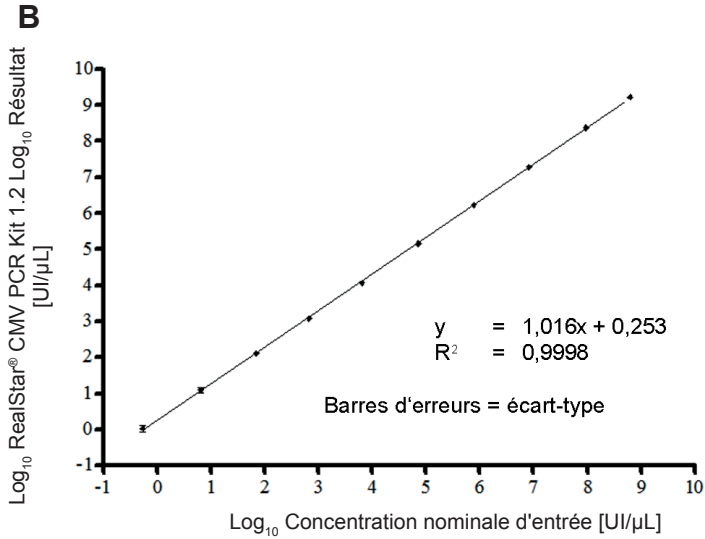


Figure 2: Courbes d'amplification sur un LightCycler® 1.5 Instrument (Roche) [A] et régression linéaire de la série de dilution analysée sur un LightCycler® 1.5 Instrument (Roche) [B] et sur un SmartCycler® II (Cepheid) [C]

La gamme de linéarité du kit RealStar® CMV PCR Kit 1.2 s'étend sur un intervalle d'au moins neuf ordres de grandeur, allant de 1,00E+01 à 1,00E+09 UI/μL.

11.4 Précision

Les données de précision du kit RealStar® CMV PCR Kit 1.2 ont été déterminées comme étant la variabilité intra-essai (variabilité au sein d'une expérience), la variabilité inter-essai (variabilité entre différentes expériences) et la variabilité interlot (variabilité entre différents lots de production). La variabilité totale a été calculée en combinant les trois analyses.

Les données de variabilité sont exprimées en termes de coefficient de variation de la variabilité totale. Les données reposent sur l'analyse de quantification d'un contrôle positif élevé (150 UI/μL) et sur la valeur du cycle seuil (C_t) en termes de contrôle positif faible (1,5 UI/μL) et le contrôle interne (IC). Au moins huit réplicats par échantillon ont été analysés.

Tableau 8: Précision en termes de coefficient de variation de la variabilité totale pour différents instruments de PCR en temps réel

Instrument de PCR en temps réel	Variabilité totale / coefficient de variation [%]		
	Contrôle positif élevé	Contrôle positif faible	Contrôle interne
LightCycler® 1.2/1.5/2.0 Instruments	11,56	2,13	0,32
SmartCycler® II	8,35	2,71	0,75

11.5 Evaluation en diagnostic

Le kit RealStar® CMV PCR Kit 1.2 a été évalué dans une étude comparative avec le marquage CE-IVD RealStar® CMV PCR Kit 1.0 (altona Diagnostics).

200 échantillons de plasma EDTA envoyés pour un test CMV de routine ont été analysés en parallèle à l'aide du RealStar® CMV PCR Kit 1.0 sur un ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems) et à l'aide du RealStar® CMV PCR Kit 1.2 sur un SmartCycler® II (Cepheid) ainsi que sur un LightCycler® 1.5 Instrument (Roche).

Tableau 9: Résultats de l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité du diagnostic [LightCycler® 1.5 Instrument (Roche)]

		RealStar® CMV PCR Kit 1.2	
		+	-
RealStar® CMV PCR Kit 1.0	+	70	8*
	-	5*	117

* Tous les Echantillons discordants avaient une concentration de CMV autour de la LoD des deux essais.

La sensibilité et la spécificité en diagnostics du kit RealStar® CMV PCR Kit 1.2 sur un instrument LightCycler® 1.5 (Roche) comparés au kit RealStar® CMV PCR Kit 1.0 sur un ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems) était de 89,7% et de 95,9%, respectivement.

Tableau 10: Résultats de l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité du diagnostic [SmartCycler® II (Cepheid)]

		RealStar® CMV PCR Kit 1.2	
		+	-
RealStar® CMV PCR Kit 1.0	+	70	8*
	-	6*	116

* Tous les Echantillons discordants avaient une concentration de CMV autour de la LoD des deux essais.

La sensibilité et la spécificité en diagnostic du kit RealStar® CMV PCR Kit 1.2 sur un SmartCycler® II (Cepheid) comparés au kit RealStar® CMV PCR Kit 1.0 sur un ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems) était de 89,7% et de 95,1%, respectivement.

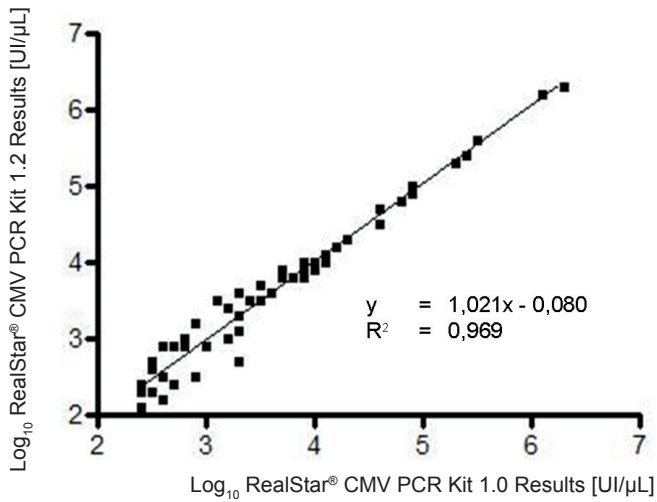
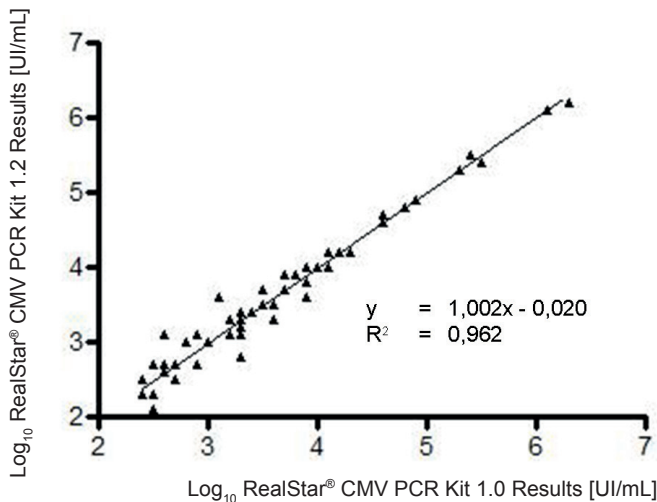
A**B**

Figure 3: Corrélation des résultats de la quantification CMV entre le kit RealStar® CMV PCR le Kit 1.2 sur un instrument LightCycler® 1.5 Instrument (Roche) ou sur un SmartCycler® II (Cepheid) et le kit RealStar® CMV PCR Kit 1.0 sur un ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems). Les coefficients de corrélation sont R = 0.984 (LightCycler® 1.5 Instrument) et R = 0.981 (SmartCycler® II); n = 55

12. Limites

- Une stricte conformité aux instructions d'utilisation est nécessaire afin d'obtenir les meilleurs résultats.
- L'utilisation de ce produit est limitée au personnel qualifié et formé aux techniques de PCR en temps réel et aux procédures de diagnostic *in vitro*.
- Le respect des bonnes pratiques de laboratoire est essentiel pour garantir le bon fonctionnement de ce test. Une attention particulière doit être apportée à la préparation des échantillons afin de préserver la pureté des composants du kit. Tous les réactifs doivent faire l'objet d'une surveillance étroite afin d'éviter des impuretés et des contaminations. Tout réactif suspect doit être éliminé.
- Il est nécessaire de respecter les procédures de prélèvement, de transport, de conservation et de traitement des échantillons afin d'assurer les performances optimales du test.
- Ce test n'est pas destiné à être utilisé directement sur l'échantillon. Des méthodes appropriées d'extraction des acides nucléiques doivent être employées avant son utilisation.
- La présence d'inhibiteurs de PCR (p.ex. héparine) peuvent induire une sous-quantification, des résultats faussement positifs ou invalides.
- De potentielles mutations dans les zones cibles du génome du CMV couvertes par les amorces et/ou sondes utilisées dans ce kit peuvent induire une sous-quantification et/ou une détection erronée de la présence du pathogène.
- Le RealStar® CMV PCR Kit 1.2 est un test de diagnostic. En conséquence, ses résultats doivent être interprétés en prenant en considération l'ensemble des symptômes cliniques et des résultats obtenus en laboratoire.

13. Contrôle qualité

Conformément au système de management de la qualité d'Altona Diagnostics GmbH, certifié ISO EN 13485, chaque lot du RealStar® CMV PCR Kit 1.2 est testé selon des spécifications prédéfinies afin de garantir une qualité constante des produits.

14. Assistance technique

Pour obtenir une assistance sur nos produits, merci de contacter notre support technique:

e-mail: **support@altona-diagnostics.com**

téléphone: **+49-(0)40-5480676-0**

15. Literature

- [1] Fryer JF, Heath AB, Anderson R, Minor PD and the Collaborative Study Group. 2010 Collaborative Study to Evaluate the Proposed 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification (NAT)- Based Assays. WHO ECBS Report WHO/BS/10.2138.
- [2] Pellett PE, Roizman B. Herpesviridae. In: Knipe DM, Howley PM, et al., eds. Fields Virology, 6th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2013:1803-1822.
- [3] Mocarski, Jr ES, Shenk T, Griffiths PD, Pass RF. Cytomegaloviruses. In: Knipe DM, Howley PM, et al., eds. Fields Virology, 6th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2013:1961-2014.
- [4] Hodinka RL. Human Cytomegalovirus. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, eds. Manual of Clinical Microbiology, 10th ed., American Society for Microbiology, Washington. 2011:1558-1574.
- [5] Abdul-Ali D, Kraft CS, Ingersoll J, Frempong M, Caliendo AM., Cytomegalovirus DNA stability in EDTA anti-coagulated EDTA whole blood and plasma samples., J Clin Virol. 2011 November ; 52(3): 222–224.

16. Marques déposées et responsabilité

RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); SmartCycler® (Cepheid); QIAamp®, MinElute® (QIAGEN).

Les noms et marques déposés cités dans ce document, même si non mentionnés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

Le kit RealStar® CMV PCR Kit 1.2 est un kit de diagnostic *in vitro* marqué CE conformément à la Directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs de diagnostic *in vitro*

Produit non homologué pour la vente par Santé Canada et n'ayant pas fait l'objet d'une notification (510(k)) ou d'une approbation (PMA) de pré-commercialisation par la FDA.

Produit distribué dans certains pays uniquement.

© 2017 altona Diagnostics GmbH; tous droits réservés.

17. Explications des symboles

Symbole	Explication
	Dispositif médical de diagnostic <i>In vitro</i>
	Numéro de lot
	Couleur du bouchon
	Référence produit
	Contenu
	Nombre
	Composant
	Code article international
	Lire les instructions d'utilisation
	Contient la quantité suffisante pour réaliser "n" tests (rxns)
	Limites de température
	À utiliser avant
	Fabricant
	Attention
	Note
	Version

Notes:

Notes:

always a drop ahead.

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0
fax +49 40 548 0676 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com

