altona DIAGNOSTICS

Mode d'emploi

RealStar®
Parvovirus B19 PCR Kit 1.0

01/2017 FR

RealStar®

RealStar®

Parvovirus B19 PCR Kit 1.0

Pour utilisation avec

m2000rt (Abbott Diagnostics)

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)

VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)

ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)

ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)

Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)

Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

CE

IVD

REF 101013

Σ 96

01 2017

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

MAN-101010-FR-S01

Sommaire

1. Usage prévu ... 6

2. Composants du kit ... 6

3. Conservation ... 6

4. Matériel requis non fourni ... 8

5. Informations générales ... 9

6. Description du produit ... 10

6.1 Instruments de PCR en temps réel ... 12

6.2 Types de prélèvement ... 12

7. Mises en garde et précautions ... 12

8. Mode d'emploi ... 14

8.1 Préparation du prélèvement ... 14

8.2 Préparation du Mastermix ... 15

8.3 Préparation de la réaction ... 17

9. Programmation des instruments de PCR en temps réel ... 18

9.1 Paramètres ... 18

9.2 Marqueurs de fluorescence (fluorophores) ... 18

9.3 Profil de température et acquisition du fluorophore ... 18

10. Analyse des données ... 19

10.1 Validation des tests de diagnostic ... 19

10.1.1 Validité des tests de diagnostic (qualitatif) ... 19

10.1.2 Invalidité des tests de diagnostic (qualitatif) ... 20

10.1.3 Validité des tests de diagnostic (quantitatif) ... 20

10.1.4 Invalidité des tests de diagnostic (quantitatif) ... 21

10.2 Interprétation des résultats 21
10.2.1 Analyse qualitative 21
10.2.2 Analyse quantitative 22

11. Evaluation des performances 23
11.1 Sensibilité analytique 23
11.2 Spécificité analytique 24
11.3 Gamme de linéarité 25
11.4 Précision 27
11.5 Evaluation en diagnostic 27

12. Limites 29

13. Contrôle qualité 29

14. Assistance technique 30

15. Bibliographie 30

16. Marques déposées et responsabilité 30

17. Explications des symboles 32

1. Usage prévu

Le kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 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 Parvovirus B19.

2. Composants du kit

Couleur du bouchon	Composants	Nombre de tubes	Volume [µL/tube]
Bleu	Master A	8	60
Violet	Master B	8	180
Vert	Internal Control	1	1000
Rouge	QS1-4*	4	250
Blanc	Water (PCR grade)	1	500

* Le kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 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® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 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)
- Appropriate nucleic acid extraction system or kit (see chapter 8.1 Sample Preparation)
- Centrifugeuse de paillasse avec rotor pour des tubes réactionnels de 2 mL
- Centrifugeuse avec rotor pour microplaques, si des plaques de 96 puits sont utilisées
- Vortex
- Plaques de 96 puits ou tubes réactionnels avec le matériel de fermeture correspondant (optique)
- Pipettes (réglables)
- Cônes avec filtres (jetables)
- Gants non talqués (jetables)

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

NOTE	
i	***Il est fortement recommandé d'utiliser le rotor de 72 puits avec les tubes réactionnels de 0,1 ml correspondants, si le Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) ou le Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN) est utilisé.***

5. Informations générales

Le Parvovirus B19, également appelé *Erythrovirus B19*, fut le premier virus connu de l'homme dans la famille des *Parvovirinae*, du genre *Erythrovirus*. Il s'agit d'un virus icosaédrique non-enveloppé, qui contient un génome d'ADN simple brin linéaire.

Le Parvovirus B19 provoque une éruption cutanée appelée la cinquième maladie de l'enfance ou érythème infectieux ou plus communément le syndrome de la joue giflée. Le Parvovirus B19 est une cause majeure de la crise aplasique chez les patients atteints d'anémie hémolytique. De graves complications foetales peuvent être observées, notamment à la suite des infections maternelles durant les deuxième et troisième trimestres.

Trois génotypes distincts de Parvovirus B19 ont été identifiés, présentant une variation des séquences nucléotidiques allant jusqu'à 15%. A partir de l'analyse des séquences et des propriétés biologiques, le Comité International de taxonomie des virus a classé les trois génotypes (génotype I-III) comme espèces du Parvovirus B19. En Europe, les exigences réglementaires précisent que la concentration en ADN du Parvovirus B19 doit être testée dans les pools de plasma utilisés pour la production d'immunoglobulines anti-D mais aussi dans le plasma traité pour l'inactivation des virus.

Ces pools de plasma ne doivent pas dépasser un seuil de 10 UI/µL de concentration en ADN du Parvovirus B19, tel que défini par l'OMS (2ème code NIBSC 99/802).

6. Description du produit

Le kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 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 Parvovirus B19.

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 Parvovirus B19 sont marquées par le fluorophore FAM™. La sonde spécifique du contrôle interne est marquée par le fluorophore JOE™.

L'utilisation de sondes associées à des fluorophores différents permet la détection en parallèle de l'ADN spécifique du Parvovirus B19 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® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 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 spécifique de l'ADN du Parvovirus B19 ainsi que du Contrôle interne en une seule étape de réaction.

Les étalons contiennent des concentrations standardisées en ADN spécifique du Parvovirus B19. Ces étalons ont été calibrés selon le 2ème standard international de l'OMS pour les techniques d'amplification des acides nucléiques du Parvovirus B19 (code NIBSC: 99/802). 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 Parvovirus B19.

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 kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0a été développé et validé pour être utilisé avec les instruments de PCR en temps réel suivants:

- m2000rt (Abbott Diagnostics)
- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

6.2 Types de prélèvement

Les types de prélèvement suivants ont été validés avec le kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0:

- Plasma EDTA humain

Si une procédure appropriée d'extraction des acides nucléiques est appliquée, d'autres types de prélèvements peuvent être utilisés avec le kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0. La compatibilité de toute procédure d'extraction des acides nucléiques doit être validée par l'utilisateur.

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.
- Eviter 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.

- Ne pas ouvrir les tubes/plaques de réaction après l'amplification afin d'éviter toute contamination par les amplicons.
- Des témoins additionnels peuvent devoir être testés selon les directives des organisations locales/gouvernementales ou des organismes d'accréditation.
- 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.
- Eliminer les échantillons et les déchets de l'essai conformément aux règles de sécurité locales.

8. Mode d'emploi

8.1 Préparation du prélèvement

L'ADN extrait constitue le matériel de départ pour le kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0.

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. Les kits et systèmes suivants sont compatibles pour l'extraction des acides nucléiques:

- QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIAsymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

D'autres kits ou systèmes d'extraction des acides nucléiques peuvent être appropriés. L'aptitude de la procédure d'extraction des acides nucléiques à utiliser avec RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 doit être validé par l'utilisateur.

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 (Chapitre 14. Assistance technique).

8.2 Préparation du Mastermix

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

Le kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 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	15 µL	180 µL
Internal Control (contrôle interne)	1 µL	12 µL
Volume de Mastermix	**21 µL**	**252 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	15 µL	180 µL
Volume de Mastermix	**20 µL**	**240 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.

8.3 Préparation de la réaction

- ► Pipeter 20 µL de Mastermix dans chacun des puits nécessaires de la plaque 96 puits ou d'un tube à essai permettant les réactions optiques.
- ► 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	20 µL
Echantillon ou contrôle	10 µL
Volume total	**30 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 la plaque 96 puits avec un film adhésif transparent approprié et les tubes réactionnels à l'aide de bouchons appropriés.
- ► Centrifuger les plaques de 96 puits à l'aide d'un rotor à microplaques pendant 30 secondes à environ 1000 x g (~ 3000 tr/min).

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® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 avec un instrument de PCR en temps réel spécifique, merci de contacter notre support technique (Chapitre 14. Assistance technique).

9.1 Paramètres

► Définir les paramètres suivants:

Paramètres	
Volume de réaction	30 µL
Vitesse de la rampe	par défaut
Référence passive	ROX™

9.2 Marqueurs de fluorescence (fluorophores)

► Définir les marqueurs de fluorescence (fluorophores):

Cible	Nom du marqueur	Fluorophore (Reporter)	Désactivateur (Quencher)
ADN spécifique du Parvovirus B19	Parvovirus B19	FAM™	(aucun)
Internal Control (contrôle interne)	IC	JOE™	(aucun)

9.3 Profil de température et acquisition du fluorophore

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

	Etape	Nombres de cycles	Acquisition	Température [°C]	Durée [min:sec]
Dénaturation	Stationnaire	1	-	95	10:00
Amplification	Cyclique	45	-	95	00:15
			oui	58	01:00

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® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 sur différents instruments de PCR en temps réel, merci de contacter notre support technique (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™	JOE™
Contrôle positif (QS)	+	+/-*
Contrôle négatif	-	+

* La présence ou l'absence d'un signal dans le canal JOE™ 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	Valeur valide
R carré (R^2)	≥ 0.98

NOTE

Tous les instruments de PCR en temps réel ne présentent pas la valeur R carré (R^2). Pour plus d'information, merci de vous référer aux manuels d'utilisation des instruments respectifs.

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™	JOE™	
+	+*	ADN spécifique du Parvovirus B19 détecté.
-	+	ADN spécifique du Parvovirus B19 non détecté. L'échantillon ne contient pas de quantités détectables d'ADN du Parvovirus B19.
-	-	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 JOE™ n'est pas requise pour des résultats positifs dans le canal de détection FAM™. De fortes charges en ADN spécifique du Parvovirus B19 dans l'échantillon peuvent conduire à des signaux absents ou très faibles pour le contrôle interne.

10.2.2 Analyse quantitative

Le kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 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:

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

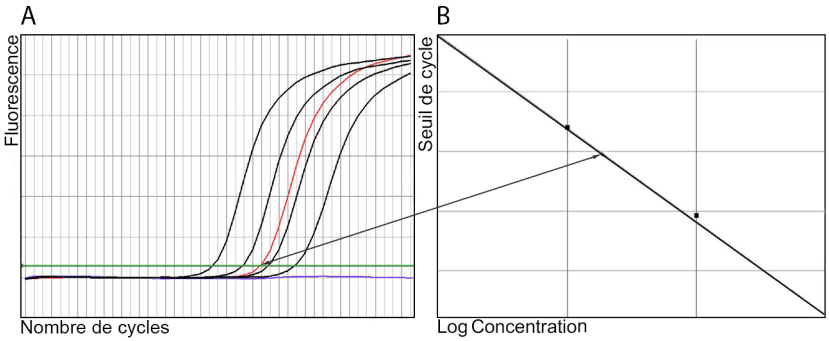


Figure 1: [**A**] Etalons de quantification (en noir), un échantillon positif (en rouge) et un échantillon négatif (en bleu) dans l'écran d'amplification; [**B**] analyse de la courbe d'étalonnage

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:

$$\text{Charge Virale (\textbf{échantillon}) [UI/mL]} = \frac{\text{Volume (\textbf{Eluat}) [µL] x Charge Virale (\textbf{Eluat}) [UI/µL]}}{\text{Volume d'échantillon [mL]}}$$

11. Evaluation des performances

L'évaluation des performances du kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 a été effectuée en utilisant de l'ADN du Parvovirus B19 quantifié en utilisant le 2ème standard international pour le Parvovirus B19 (NIBSC code: 99/802).

11.1 Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 est définie comme étant la concentration (UI/µL d'éluat) de molécules d'ADN spécifique du Parvovirus B19 qui peuvent être détectées avec un taux supérieur à 95%. La sensibilitéanalytique a été déterminée en analysant des dilutions en série d'une concentration définie en ADN du Parvovirus B19.

Tableau 1: Résultats de PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique concernant la détection de l'ADN spécifique du Parvovirus B19

[C] initiale [UI/µL]	Nombre de répétitions	Nombre de Positifs	Taux de réussite [%]
10.000	16	16	100
3.162	16	16	100
1.000	16	16	100
0.316	16	15	94
0.210	8	5	63
0.140	8	4	50
0.090	8	4	50
0.060	8	3	38
0.030	16	0	0
0.010	16	0	0

La sensibilité analytique du kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 a été déterminée par analyse Probit.

- For the detection of Parvovirus B19 specific ADN, the analytical sensitivity is 0.41 UI/µL [95% confidence interval (CI): 0.27-0.90 UI/µL]

11.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 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 du Parvovirus B19 seront détectées.

La spécificité analytique du kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 a été évaluée en testant un panel d'ADN/ARN génomique extrait d'autres virus sanguins ou d'autres pathogènes chez les patients immunodéprimés.

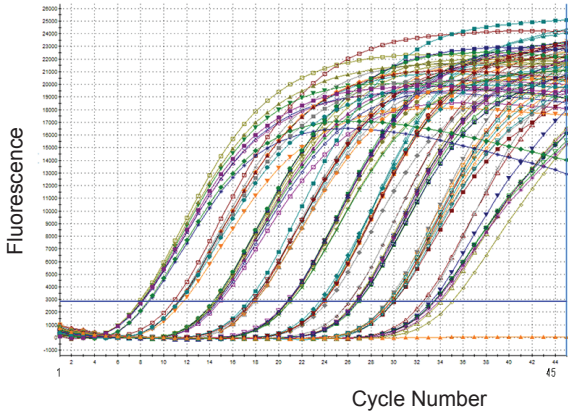
Le kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 n'a présenté aucune réaction croisée avec l'un des pathogènes spécifiés ci-dessous:

- Virus BK
- Cytomégalovirus
- Virus d'Epstein-Barr
- Virus de l'hépatite A
- Virus de l'hépatite B
- Virus de l'hépatite C
- Virus de l'herpès simplex de type 1
- Virus de l'herpès simplex de type 2
- Virus de l'herpès humain 6A
- Virus de l'herpès humain 6B
- Virus de l'herpès humain 7
- Virus de l'herpès humain 8
- Virus de l'immunodéficience humaine de type 1
- Virus JC
- Virus de la Varicelle Zona

11.3 Gamme de linéarité

La gamme de linéarité du kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 a été évaluée par l'analyse d'une série de dilutions logarithmiques d'ADN spécifique du Parvovirus B19 en utilisant des concentrations variants de 1,00E+09 à 1,00E+00 UI/µL. Au moins huit réplicats par dilution ont été analysés.

A



B

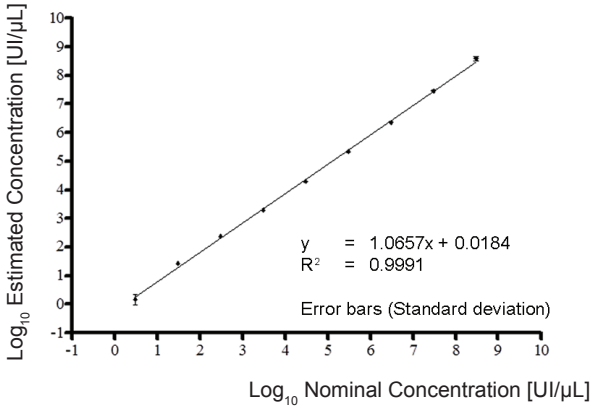


Figure 2: Courbes d'amplification [A] et régression linéaire [B] des dilutions en série analysées de l'ADN spécifique du Parvovirus B19

La gamme de linéarité du kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 s'étend sur un intervalle d'au moins huit ordres de grandeur.

11.4 Précision

Les données de précision du kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 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.

Tableau 2: Données de précision pour l'ADN spécifique du Parvovirus B19

Parvovirus	Conc. moyenne [UI/µL]	Ecart type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	219.36	5.42	2.47
Variabilité inter-essai	215.66	8.67	4.02
Variabilité inter-lot	211.65	10.47	4.95
Variabilité totale	211.75	10.07	4.75

Tableau 3: Données de précision pour le Contrôle interne

Internal Control	Valeurs C_t moyennes	Ecart type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	24.90	0.09	0.36
Variabilité inter-essai	24.75	0.13	0.54
Variabilité inter-lot	24.86	0.11	0.46
Variabilité totale	24.80	0.14	0.56

11.5 Evaluation en diagnostic

Les sensibilités et spécificités du kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 ont été évalués en analysant 115 échantillons. Les acides nucléiques ont été extraits en utilisant le QIAamp®DNA Mini Kit (QIAGEN). Les échantillons ont été analysés sur un ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems) et sur un Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Research).

Tableau 4: Résultats de l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité du kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0

		RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0	
		+	-
Méthode référence	+	93	3
	-	1	18

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 Parvovirus B19 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® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 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® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 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. Bibliographie

Versalovic, James, Carroll, Karen C.,Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Third Edition. Mosby, 2010.

16. Marques déposées et responsabilité

RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); SmartCycler® (Cepheid); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, MinElute®, QIAsymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

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® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 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
IVD	Dispositif médical de diagnostic *In vitro*
LOT	Numéro de lot
CAP	Couleur du bouchon
REF	Référence produit
CONT	Contenu
NUM	Nombre
COMP	Composant
GTIN	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

Note:

Note:

Note:

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