

Mode d'emploi

RealStar[®] *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0

01/2017 FR

RealStar®

alpha Herpesvirus 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)

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



081013



96



01 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
6.2 Types de prélèvement.....	10
7. Mises en garde et précautions.....	11
8. Mode d'emploi	12
8.1 Préparation du prélèvement.....	12
8.2 Préparation du Mastermix	13
8.3 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	18
10.1 Validation des tests de diagnostic	21
10.1.1 Validité des tests de diagnostic	21
10.1.2 Invalidité des tests de diagnostic	21
10.2 Interprétation des résultats.....	22
10.2.1 Analyse qualitative	22

11. Evaluation des performances	23
11.1 Sensibilité analytique	23
11.2 Spécificité analytique	25
11.3 Précision	26
12. Limites.....	28
13. Contrôle qualité.....	29
14. Assistance technique	29
15. Bibliographie	29
16. Marques déposées et responsabilité	30
17. Explications des symboles	31

1. Usage prévu

Le kit RealStar® *alpha* Herpesvirus 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 différenciation de l'ADN spécifique du virus de l'herpes simplex de type 1 (HSV-1), du virus de l'herpes simplex de type 2 (HSV-2) et du virus varicelle-zona (VZV).

2. Composants du kit

Couleur du bouchon	Composants	Nombre de tubes	Volume [μ L/tube]
Bleu	Master A	8	60
Violet	Master B	8	180
Vert	Internal Control	1	1000
Rouge	Positive Control VZV	1	250
Jaune	Positive Control HSV-1	1	250
Orange	Positive Control HSV-2	1	250
Blanc	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control = Contrôle interne

Positive Control = Contrôle positif

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

3. Conservation

- Le kit RealStar® *alpha* Herpesvirus 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 $+2^{\circ}\text{C}$ et $+8^{\circ}\text{C}$ 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
- 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



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



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

L'*herpesviridae* est une grande famille de virus à ADN qui provoque des maladies chez les animaux, dont les humains. Tous les virus de l'herpès sont composés d'un génome linéaire à double brin. Les virus de l'herpès ont une réplication nucléaire, c'est à dire que la réplication de l'ADN viral et la transcription des gènes viraux se passent à l'intérieur des noyaux des cellules infectées. En fonction des différences de pathogénicités, de cellules hôtes, et des caractéristiques de réplication, les *herpesviridae* peuvent être divisés en trois groupes: l'*herpesviridae alpha*-, *beta*-, et *gamma*. Le type alphaherpesvirus est caractérisé par un cycle de reproduction court, une destruction rapide des cellules hôtes et leur capacité de réplication dans une large variété de tissus hôtes. Une caractéristique importante de ces virus est leur capacité à établir une infection latente permanente dans le système nerveux périphérique de l'hôte. Le virus *herpes simplex de type 1* (HSV-1), de *type 2* (HSV-2) et le virus de la *varicelle-zona* (VZV) appartiennent à la famille *alpha-herpesviridae*.

6. Description du produit

Le kit RealStar® *alpha* Herpesvirus 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 différenciation de l'ADN spécifique du virus de l'herpes simplex de type 1 (HSV-1), du virus de l'herpes simplex de type 2 (HSV-2) et du virus varicelle-zona (VZV). 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 HSV-1 sont marquées par le fluorophore ROX™, tandis que les sondes spécifiques de l'ADN du HSV-2 sont marquées par un fluorophore qui montrent les mêmes caractéristiques que le Cy®5 et les sondes spécifiques de l'ADN du VZV 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 HSV-1, du HSV-2, du VZV, 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® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 est composé de:

- Deux Masters (Master A et Master B)
- Un contrôle interne
- Trois contrôles positifs:
 - Contrôle positif: HSV-1
 - Contrôle positif: HSV-2
 - Contrôle positif: VZV
- 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 HSV-1, de l'ADN du HSV-2 et de l'ADN du VZV ainsi que du contrôle interne en une seule étape de réaction.

6.1 Instruments de PCR en temps réel

Le kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 a 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)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

6.2 Types de prélèvement

Les types de prélèvement suivants ont été validés avec le kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0:

- Prélèvement des lésions cutanéomuqueuses humaines
- Liquide céphalo-rachidien humain

Si une procédure appropriée d'extraction des acides nucléiques est appliquée, d'autres types de prélèvements peuvent être utilisés avec le kit RealStar® *alpha* Herpesvirus 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.
- 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.

- 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® *alpha* Herpesvirus 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® *alpha* Herpesvirus 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.



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® *alpha* Herpesvirus 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.



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 de l'échantillon (éluat issu de l'extraction des acides nucléiques) ou 10 µL des contrôles (contrôles positifs ou négatifs).

Préparation de la réaction	
Mastermix	20 µL
Echantillon ou contrôle	10 µL
Volume total	30 µL

- ▶ S'assurer que chaque contrôle positif et au moins un contrôle négatif sont utilisés par essai.
- ▶ 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® *alpha* Herpesvirus 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	Aucun

9.2 Marqueurs de fluorescence (fluorophores)

- Définir les marqueurs de fluorescence (fluorophores):

Cible	Nom du marqueur	Fluorophore (Reporter)	Désactivateur (Quencher)
ADN spécifique du HSV-1	HSV-1	ROX™	(aucun)
ADN spécifique du HSV-2	HSV-2	Cy®5	(aucun)
ADN spécifique du VZV	VZV	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:

	Étape	Nombre 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® alpha Herpesvirus PCR Kit 1.0 sur différents instruments de PCR en temps réel, merci de contacter notre support technique (Chapitre 14. Assistance technique).

L'analyse des données si vous utilisez l'ABI Prism® 7500 SDS ou le 7500 Fast SDS (Applied Bio- systems), le m2000rt (Abbott Diagnostics), le VERSANT® KPCR System (Siemens) ou le Mx3005P™ QPCR System (Stratagene):

Si vous utilisez un de ces systèmes de PCR en temps réel, il n'y aura pas d'interférences entre les différents canaux de détection, si l'étalonnage des fluorophores purs a été bien réalisé (Fichier de compensation couleur de fluorophores) ainsi que le blanc (Fichier de compensation couleur du blanc). Par conséquent, le signal de l'ADN spécifique du **VZV** n'apparaît que dans le canal de détection du FAM™, l'ADN spécifique du **HSV-1** n'apparaît que dans le canal de détection du ROX™, l'ADN spécifique du **HSV-2** n'apparaît que dans le canal de détection du Cy®5 et le contrôle interne n'est visible que dans le canal de détection du JOE™ (voir figure 1).

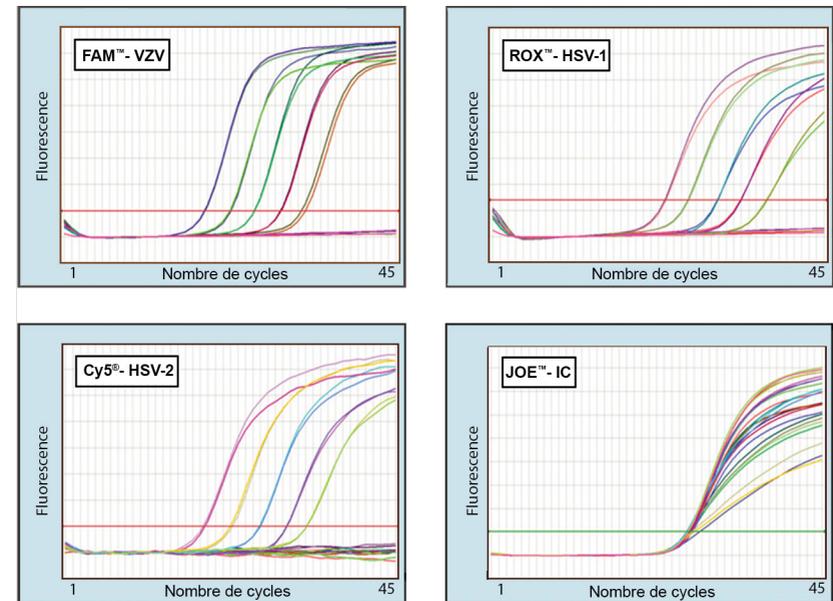


Figure 1: Dilutions en série de l'ADN spécifique du VZV, du HSV-1, et du HSV-2 variant de 1 copie/μL à 1.00E+04 copies/μL. Les échantillons ont été analysés en utilisant le kit RealStar®alpha Herpesvirus PCR Kit 1.0 sur un ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems). Les échantillons positifs à l'ADN du VZV génèrent des signaux dans le canal de détection FAM™. Les échantillons positifs à l'ADN de HSV-1 génèrent des signaux dans le canal de détection de ROX™ et les échantillons positifs à l'ADN de HSV-2 génèrent des signaux dans le canal de détection de Cy®5. Le contrôle interne génère des signaux dans le canal de détection JOE™.

Analyse des données en utilisant le Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) ou le Rotor-Gene Q 5/6 plex Platform (QIAGEN):

L'utilisation du Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) ou du Rotor-Gene Q 5/6 plex Platform (QIAGEN) peut entraîner de légères interférences entre les canaux de détection ROX™ et Cy®5. Par conséquent, le signal de l'ADN spécifique du **VZV** n'apparaîtra que dans le canal de détection vert FAM™, celui du HSV-2 n'apparaîtra que dans le canal de détection rouge (Cy®5) et le signal spécifique du contrôle interne n'apparaîtra que dans le canal jaune (JOE™) (voir figure 2). Cependant, le signal de l'ADN spécifique du **HSV-1** n'apparaît pas uniquement dans le canal de

détection orange (ROX™) mais produit également un signal faible d'interférence dans le canal de détection Cy®5. Ce signal d'interférence dans le Cy®5 sera toujours plus faible (fluorescence plus faible) qu'un signal produit par un échantillon d'ADN spécifique du **HSV-2** en Cy®5. Par conséquent, nous recommandons fortement d'analyser les échantillons en comparant avec les contrôles positifs des VZV, HSV-1, et HSV-2 (voir figure 2). Si vous avez des questions relatives à l'analyse de données sur l'automate Rotor-Gene, merci de contacter notre support technique.

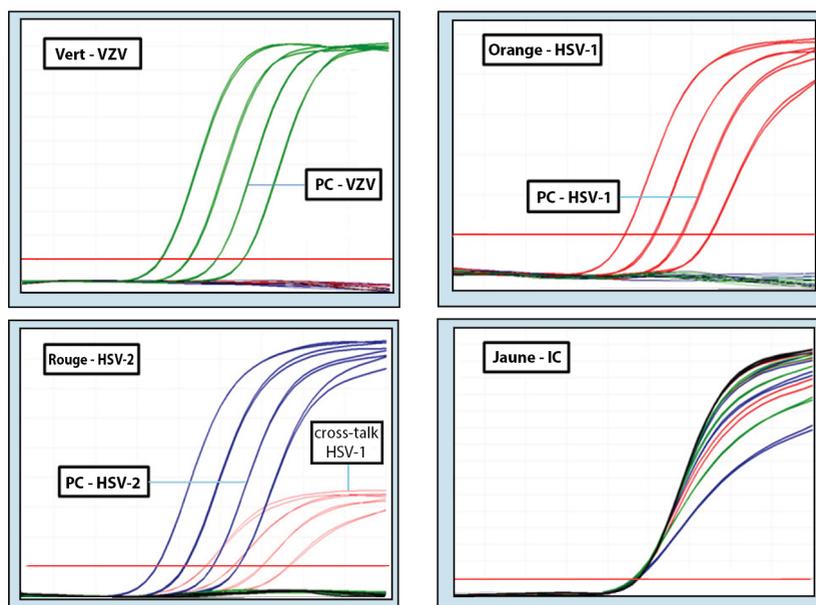


Figure 2: Dilution en série de l'ADN spécifique du VZV, du HSV-1, et du HSV-2 variant de 10 copies/μL à 1.00E+04 copies/μL. Les échantillons ont été analysés en utilisant le kit RealStar®alpha Herpesvirus PCR Kit 1.0 sur un Rotor-Gene® 6000 Instrument (Corbett-Research). Les échantillons positifs de l'ADN du VZV génèrent des signaux uniquement dans le canal de détection vert (FAM™), les échantillons positifs de l'ADN du HSV-2 génèrent des signaux seulement dans le canal de détection Rouge (Cy®5) et le contrôle interne génère des signaux uniquement dans le canal de détection Jaune (JOE™). Les échantillons positifs de l'ADN de HSV-1 génèrent des signaux non seulement dans l'orange (ROX™) mais aussi un signal plus faible dans le canal de détection du Cy®5. Ce signal d'interférence sera toujours plus faible (fluorescence plus faible) qu'un signal produit par un échantillon positif de l'ADN du HSV-2 en Cy®5.

10.1 Validation des tests de diagnostic

10.1.1 Validité des tests de diagnostic

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

Nom du Contrôle	Canal de détection			
	ROX™	Cy®5	FAM™	JOE™
Contrôle positif HSV-1	+	- ¹	-	+/-*
Contrôle positif HSV-2	-	+	-	+/-*
Contrôle positif VZV	-	-	+	+/-*
Contrôle négatif	-	-	-	+

* La présence ou l'absence d'un signal dans le canal JOE™ n'est pas pertinente pour la validité de l'essai.

¹ Un signal d'interférence peut apparaître dans le canal de détection Rouge (Cy®5) si vous utilisez un Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) ou Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN).

10.1.2 Invalidité des tests de diagnostic

Un test de diagnostic 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.

10.2 Interprétation des résultats

10.2.1 Analyse qualitative

Canal de détection				Interprétation des résultats
ROX™	Cy®5	FAM™	JOE™	
+	- ¹	-	+*	ADN spécifique du HSV-1 détecté.
-	+	-	+*	ADN spécifique du HSV-2 détecté.
-	-	+	+*	ADN spécifique du VZV détecté.
-	-	-	+	ADN spécifique du HSV-1, du HSV-2 ou du VZV non détecté. L'échantillon ne contient pas de quantités détectables d'ADN spécifique du HSV-1, du HSV-2, et du VZV.
-	-	-	-	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 ROX™, Cy®5 ou FAM™. De fortes charges en ADN spécifique du HSV-1, du HSV-2, et du VZV dans l'échantillon peuvent conduire à des signaux absents ou très faibles pour le contrôle interne.

¹ Un signal d'interférence peut apparaître dans le canal de détection Rouge (Cy®5) si vous utilisez un Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) ou Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN).

11. Evaluation des performances

L'évaluation des performances du kit RealStar® alpha Herpesvirus PCR Kit 1.0 a été réalisée en utilisant de l'ADN spécifique du HSV-1 (souche HSV-1 ELLEN; ATCC® Numéro: VR-1367), de l'ADN spécifique du HSV-1 (ATCC® Numéro: VR-1493) et de l'ADN spécifique du HSV-2 (ATCC® Numéro:VR-540).

11.1 Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du RealStar® alpha Herpesvirus PCR Kit 1.0 est définie comme étant la concentration (copies par µL d'éluat) de molécules d'ADN spécifique des VZV, HSV-1 et HSV-2 qui peuvent être détectées avec un taux supérieur à 95%. La sensibilité analytique a été déterminée en analysant des dilutions en série d'ADN quantifié du VZV, HSV-1 et HSV-2.

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

[C] initiale [copies/µL]	Nombre de répétitions	Nombre de Positifs	Taux de réussite [%]
3,162	12	12	100
1,000	12	12	100
0,316	12	11	92
0,100	12	8	67
0,032	12	2	17
0,010	12	2	17
0,003	12	0	0
0,001	12	0	0

Tableau 2: Résultats de **PCR** utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique concernant la détection de l'ADN spécifique du HSV-2

[C] initiale [copies/μL]	Nombre de répétitions	Nombre de Positifs	Taux de réussite [%]
10,000	12	12	100
3,162	12	12	100
1,000	12	12	100
0,316	12	10	83
0,100	12	3	25
0,032	12	1	8
0,010	12	2	17
0,003	12	0	0

Tableau 3: Résultats de **PCR** utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique concernant la détection de l'ADN spécifique du VZV

[C] initiale [copies/μL]	Nombre de répétitions	Nombre de Positifs	Taux de réussite [%]
3,162	17	17	100
1,000	18	18	100
0,316	18	18	100
0,100	18	17	94
0,032	18	7	39
0,010	18	6	33
0,003	18	1	6
0,001	12	0	0

La sensibilité analytique du kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 a été déterminée par analyse Probit:

- Pour la détection de l'ADN spécifique du VZV, la sensibilité analytique est de 0,2 copies/μL d'éluat [Intervalle de confiance à 95% (CI) : 0,1 – 1,5 copies/μL]

- Pour la détection de l'ADN spécifique du HSV-1, la sensibilité analytique est de 0,46 copies/μL d'éluat [Intervalle de confiance à 95% (CI) : 0,23 – 1,8 copies/μL].
- Pour la détection de l'ADN spécifique du HSV-2, la sensibilité analytique est de 1,00 copy/μL d'éluat [Intervalle de confiance à 95% (CI) : 0,5 – 4,1 copies/μL]

11.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du kit RealStar® *alpha* Herpesvirus 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 HSV-1, du HSV-2, et du VZV seront détectées.

La spécificité analytique du kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 a été évaluée en testant un panel d'ADN/ARN génomique extrait d'autres virus herpétiques ou d'autres pathogènes significatifs pour les patients immunodéprimés.

Le kit RealStar® *alpha* Herpesvirus 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 B
- Virus de l'hépatite C
- 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
- Parvovirus humain B19
- Virus JC

11.3 Précision

Les données de précision du kit RealStar® *alpha* Herpesvirus 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 inter-lot (variabilité entre différents lots de production). La variabilité totale a été calculée en combinant les trois analyses.

La variabilité des données est exprimée en terme d'écart type et de coefficient de variation. Les données sont basées sur l'analyse quantitative des concentrations définies d'ADN spécifique du HSV-1, du HSV-2 et du VZV et sur la valeur seuil du cycle (C) en terme de contrôle interne. Pour déterminer la variabilité intra-essai, la variabilité inter-essai et la variabilité inter-lot, au moins six réplicats par échantillon ont été analysés.

Tableau 4: Données de précision pour l'ADN spécifique du HSV-1

HSV-1	Conc. moyenne [copies/μL]	Ecart type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	96,0	4,7	4,9
Variabilité inter-essai	96,2	5,8	6,0
Variabilité inter-lot	96,0	4,8	5,0
Variabilité totale	96,1	5,5	5,7

Tableau 5: Données de précision pour l'ADN spécifique du HSV-2

HSV-2	Conc. moyenne [copies/μL]	Standard deviation	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	91,5	7,3	7,9
Variabilité inter-essai	95,3	7,8	8,2
Variabilité inter-lot	89,9	8,2	9,1
Variabilité totale	92,9	8,7	9,4

Tableau 6: Données de précision pour l'ADN spécifique du VZV

VZV	Conc. moyenne [copies/μL]	Ecart type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	86,3	4,0	4,6
Variabilité inter-essai	92,8	8,2	8,9
Variabilité inter-lot	89,4	4,2	4,7
Variabilité totale	92,6	6,8	7,3

Tableau 7: Données de précision pour le contrôle interne

Contrôle interne	Valeurs C _t moyennes	Ecart type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	24,55	0,02	0,10
Variabilité inter-essai	24,55	0,05	0,19
Variabilité inter-lot	24,58	0,06	0,24
Variabilité totale	24,57	0,06	0,23

12. Limites

- Une stricte conformité aux instructions d'utilisation est nécessaire afin d'obtenir les meilleurs résultats.
- L'utilisation de ces produits est limitée au personnel compétent 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) est susceptible d'entraîner des résultats faussement négatifs ou erronés.
- De potentielles mutations dans les régions du génome du VZV, du HSV-1 et/ou du HSV-2 couvertes par l'amorce et/ou les sondes du test peuvent empêcher la détection de pathogènes.
- Le RealStar® *alpha* Herpesvirus 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® *alpha* Herpesvirus 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); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, 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® *alpha* Herpesvirus 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

	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

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

