

Octobre 2015

Manuel du kit *artus*[®] HSV-1/2 Quant RG PCR



Version 1
Pour utilisation avec les appareils Rotor-
Gene[®] Q

IVD

CE

REF



R1 MAT

4515265

altona Diagnostics GmbH,
Mörkenstraße 12, 22767 Hamburg, ALLEMAGNE

1096239-FR

Distribué par QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALLEMAGNE

Sommaire

Utilisation prévue.....	4
Résumé et description.....	4
Informations sur l'agent pathogène.....	4
Principe de la technique.....	5
Matériel fourni.....	6
Contenu du kit.....	6
Matériel nécessaire mais non fourni.....	6
Avertissements et précautions.....	7
Avertissements.....	8
Précautions d'emploi.....	8
Stockage et manipulation des réactifs.....	9
Composants du kit.....	9
Procédure.....	10
Extraction de l'ADN.....	10
Protocole : détection de l'ADN spécifique du HSV-1 et du HSV-2.....	13
Interprétation des résultats.....	24
Validité du cycle.....	24
Analyse qualitative.....	25
Analyse quantitative.....	26
Limites.....	28
Contrôle de la qualité.....	29
Caractéristiques de performance.....	29

Sensibilité analytique.....	29
Spécificité analytique.....	31
Plage linéaire.....	32
Précision	33
Répétabilité	36
Symboles.....	38
Résolution des principaux problèmes rencontrés.....	39
Pour commander	40

Utilisation prévue

Le kit *artus*[®] HSV-1/2 Quant RG PCR (96) est un test de diagnostic *in vitro* utilisant la technologie d'amplification en chaîne par polymérase (*polymerase chain reaction*, PCR) en temps réel pour détecter et quantifier simultanément l'ADN spécifique du virus herpes simplex 1 (HSV-1) et du virus herpes simplex 2 (HSV-2).

Résumé et description

Le kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR constitue un système prêt à l'emploi pour la détection de l'ADN spécifique du HSV-1 et du HSV-2 par le biais d'une PCR en temps réel sur les appareils Rotor-Gene Q. Le dosage comporte un système d'amplification hétérologue (contrôle interne) qui permet d'identifier une possible inhibition de la PCR et de vérifier l'intégrité des réactifs du kit.

Informations sur l'agent pathogène

Le virus herpes simplex 1 (HSV-1) et le virus herpes simplex 2 (HSV-2) font partie de la famille *Herpesviridae* et, avec le VZV, sont classés en tant que *Alphaherpesvirinae*. Le HSV-1 et le HSV-2 comportent un génome linéaire à ADN double brin d'environ 150 kpb. Le HSV-1 et le HSV-2 ont 80 % de nucléotides identiques dans leurs régions codant pour les protéines.

Les infections à virus herpes simplex surviennent dans le monde entier et sont dépourvues de distribution saisonnière. Le virus est transmis par contact direct avec le virus contenu dans les sécrétions. La prévalence de l'infection à HSV-1 augmente progressivement à partir de l'enfance, pour atteindre au moins 80 % à un âge plus avancé, tandis que la séroprévalence du HSV-2 reste faible jusqu'à l'adolescence. La plupart des primo-infections à HSV-1 sont contractées sous forme d'infections subcliniques ou non identifiées. Les primo-infections à

HSV-2 se manifestent généralement par un herpès génital. La primo-infection par le HSV-1 ou le HSV-2 est suivie par l'installation d'une infection latente dans les ganglions sensitifs des nerfs spinaux. Le virus se réactive de façon périodique et se déplace, par l'intermédiaire de l'axone nerveux, vers des foyers buccaux ou génitaux, entraînant la libération d'un virus infectieux et, dans certains cas, la formation de lésions. Bien qu'elles soient généralement asymptomatiques, les infections à HSV peuvent provoquer une gamme étendue de manifestations cliniques, dont l'herpès buccal, l'herpès génital, l'herpès néonatal, l'encéphalite et l'herpès oculaire.

Principe de la technique

Les Masters HSV-1/2 RG Master A et HSV-1/2 RG Master B contiennent des réactifs et des enzymes permettant d'amplifier spécifiquement des régions cibles présentes dans les gènes du HSV-1 et du HSV-2 et de détecter directement le produit d'amplification spécifique dans les canaux de fluorescence Cycling Green et Cycling Red des appareils Rotor-Gene Q.

En outre, le kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR contient un système d'amplification hétérologue permettant d'identifier d'éventuels dysfonctionnements pendant le processus de dosage. Cette détection se fait à titre de contrôle interne (IC) dans le canal de fluorescence Cycling Yellow des appareils Rotor-Gene Q.

Les sondes spécifiques de l'ADN du HSV-1 sont marquées avec le fluorophore FAM™, tandis que les sondes spécifiques de l'ADN du HSV-2 sont marquées avec un fluorophore qui présente les mêmes caractéristiques que Cy®5. La sonde spécifique du contrôle interne (IC) est marquée avec le fluorophore JOE™. L'utilisation de sondes marquées avec des fluorophores différenciables par analyse spectrale permet de détecter et de quantifier simultanément l'ADN spécifique du HSV-1 et l'ADN spécifique du HSV-2 ainsi que de détecter le contrôle interne dans les canaux correspondants de l'appareil Rotor-Gene Q.

Matériel fourni

Contenu du kit

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit		(96)
Référence		4515265
Nombre de réactions		96
Bleu	HSV-1/2 RG Master A (Master A)	8 x 60 µl
Violet	HSV-1/2 RG Master B (Master B)	8 x 180 µl
Vert	HSV-1/2 RG IC (contrôle interne)	1 x 1 000 µl
Rouge	HSV-1 QS* (étalon de quantification du HSV- 1)	4 x 250 µl
Orange	HSV-2 QS* (étalon de quantification du HSV- 2)	4 x 250 µl
Blanc	H ₂ O	1 x 500 µl
	Manuel	1

* Le kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR contient quatre étalons de quantification du HSV-1 (QS1–QS4) ainsi que quatre étalons de quantification du HSV-2 (QS1–QS4).

Matériel nécessaire mais non fourni

Avant utilisation, s'assurer que tous les instruments sont vérifiés et calibrés selon les recommandations du fabricant.

Réactifs

- QIAamp DNA Mini Kit (minikit QIAamp DNA) (QIAGEN, référence 51304 ou 51306 ; voir « Extraction de l'ADN », page 10)

Consommables

- 0.1 ml Strip Tubes and Caps (rangées de tubes de 0,1 ml et de bouchons), pour utilisation avec un rotor à 72 puits (QIAGEN, référence 981103 ou 981106)
- Microtubes à centrifuger exempts de nucléase, à faible fixation d'ADN pour la préparation des Masters
- Cônes de pipettes exempts de nucléase munis de barrières à aérosol

Équipement

- Appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex, Rotor-Gene Q 5plex ou Rotor-Gene Q 6plex
- Logiciel Rotor-Gene Q version 2.3.1 ou supérieure
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes (bloc de chargement, 72 tubes de 0,1 ml), bloc aluminium pour la préparation manuelle des tubes réactionnels (QIAGEN, référence 9018901)
- Pipettes réglables dédiées à la préparation des échantillons
- Pipettes réglables dédiées à la préparation du Mastermix
- Pipettes réglables dédiées à la distribution de l'ADN matriciel
- Mixeur Vortex
- Centrifugeuse de paillasse avec rotor pour tubes réactionnels de 2 ml

Avertissements et précautions

Pour utilisation en diagnostic in vitro.

Lire attentivement toutes les instructions avant d'utiliser le test.

Avertissements

En cas de manipulation de produits chimiques, porter systématiquement une blouse de laboratoire adéquate, des gants jetables et des lunettes de protection.

Précautions d'emploi

- L'utilisation de ce produit est réservée au personnel ayant reçu les instructions et la formation adéquates concernant les procédures de PCR en temps réel et de diagnostic *in vitro*.
- Les échantillons doivent toujours être traités comme infectieux et/ou comme représentant un risque biologique, conformément aux procédures de laboratoire sûres.
- Porter des gants de protection jetables non poudrés, une blouse de laboratoire et une protection oculaire lors de la manipulation des échantillons.
- Éviter toute contamination de l'échantillon et des composants du kit par les agents microbiens et les nucléases (DNase/RNase).
- Utiliser systématiquement des cônes de pipettes jetables exempts de DNase/RNase munis de barrières à aérosol.
- Porter systématiquement des gants de protection jetables non poudrés lors de la manipulation des composants du kit.
- Utiliser des zones de travail distinctes et isolées pour les activités de préparation des échantillons, de préparation des tubes réactionnels et d'amplification/de détection. Au laboratoire, le flux de travaux doit progresser dans une seule direction. Porter systématiquement des gants jetables dans chaque zone et en changer avant d'entrer dans une autre zone.
- Dédier des consommables et un équipement aux différentes zones de travail et ne pas les déplacer d'une zone à une autre.
- Conserver les matières positives et/ou susceptibles de l'être séparément de tous les autres composants du kit.
- Ne pas ouvrir les tubes réactionnels/plaques après l'amplification afin d'éviter toute contamination par les produits d'amplification.

- Des contrôles supplémentaires peuvent être testés en fonction des directives ou exigences de réglementations locales, étatiques et/ou fédérales ou d'organisations d'accréditation.
- Ne pas utiliser les composants du kit ayant dépassé la date d'expiration.
- Mettre au rebut les déchets d'échantillons et de dosages conformément aux règles de sécurité locales.

Stockage et manipulation des réactifs

Composants du kit

Le kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR est expédié sur carboglace. Les composants du kit doivent être congelés à réception. Si un ou plusieurs composants ne sont pas congelés à réception ou si des tubes ont été endommagés pendant le transport, contacter les services techniques de QIAGEN pour obtenir une assistance. Dès réception, conserver tous les composants du kit à une température comprise entre -30 °C et -15 °C.

Éviter de décongeler puis de recongeler les réactifs Masters (plus de deux fois), car cela peut nuire aux performances du dosage. Congeler les réactifs par aliquotes s'ils doivent être utilisés de manière intermittente. Ne pas conserver les réactifs à une température de 4 °C pendant plus de 2 heures. Conserver le master HSV-1/2 RG Master A et le master HSV-1/2 RG Master B à l'abri de la lumière.

Le kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR comprend :

- Deux Masters (HSV-1/2 RG Master A et HSV-1/2 RG Master B)
- Un contrôle interne (HSV-1/2 RG IC)
- Quatre étalons de quantification du HSV-1 (HSV-1 QS1–QS4)
- Quatre étalons de quantification du HSV-2 (HSV-2 QS1–QS4)
- De l'eau de qualité PCR (H₂O)

Les Masters HSV-1/2 RG Master A et HSV-1/2 RG Master B regroupent tous les composants (tampon, enzymes, amorces et sondes) nécessaires à l'amplification, à la détection et à la différenciation de l'ADN spécifique du HSV-1 et du HSV-2 ainsi que le contrôle interne, en une seule réaction.

Les étalons de quantification contiennent des concentrations normalisées d'ADN du HSV-1 et du HSV-2. Ils peuvent être utilisés séparément en tant que contrôles positifs ou ensemble afin de générer une courbe d'étalonnage, qui peut servir à déterminer la concentration en ADN spécifique du HSV-1 et/ou du HSV-2 dans l'échantillon. La concentration des différents étalons de quantification est présentée dans le tableau 1.

Tableau 1. Concentration des étalons de quantification

Étalon de quantification	Concentration (copies/ μ l)	
	HSV-1	HSV-2
QS1	10 000	10 000
QS2	1 000	1 000
QS3	100	100
QS4	10	10

Procédure

Extraction de l'ADN

Les séquences cibles spécifiques du HSV-1 et du HSV-2 sont amplifiées à partir de l'ADN. Les performances du dosage étant tributaires de la qualité de l'ADN matriciel, veiller à utiliser un kit de préparation d'échantillons qui fournit de l'ADN adapté à la PCR en aval.

Le minikit QIAamp DNA (QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN, référence 51304 ou 51306) est recommandé pour la purification de l'ADN en vue d'une utilisation avec le kit *artus* HSV-1/2

Quant RG PCR. Effectuer la purification de l'ADN selon les instructions figurant dans le manuel du minikit QIAamp DNA (*QIAamp DNA Mini Handbook*).

Les tampons de lavage du minikit QIAamp DNA contiennent de l'éthanol. Effectuer une étape supplémentaire de centrifugation avant de procéder à l'élution. Placer la colonne QIAamp Mini Spin dans un nouveau tube de prélèvement de 2 ml et mettre au rebut l'ancien tube de prélèvement contenant le filtrat. Centrifuger pendant 10 minutes à une vitesse d'environ 17 000 x g (ou 13 000 tr/min) avec une centrifugeuse de paillasse.

Important : L'emploi d'un ARN vecteur (CARRIER) est d'une importance cruciale pour l'efficacité de l'extraction et la stabilité des acides nucléiques extraits.

Important : L'éthanol est un fort inhibiteur de la PCR en temps réel. Si le kit de préparation des échantillons utilise des tampons de lavage à base d'éthanol, veiller à éliminer toute trace d'éthanol avant l'élution des acides nucléiques.

Contrôle interne

Le kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR contient un contrôle interne hétérologue qui peut être utilisé soit en tant que contrôle d'inhibition de la PCR, soit en tant que contrôle de la procédure de préparation des échantillons (extraction des acides nucléiques) et contrôle d'inhibition de la PCR.

Si le contrôle interne est utilisé en tant que contrôle d'inhibition de la PCR, mais pas en tant que contrôle de la procédure de préparation des échantillons, ajouter le contrôle interne directement dans le mélange de HSV-1/2 RG Master A et de HSV-1/2 RG Master B, comme le décrit l'étape 2b du protocole (page 14).

Quels que soient la méthode ou le système utilisés pour extraire les acides nucléiques, le contrôle interne ne doit pas être ajouté directement à l'échantillon. Le contrôle interne doit toujours être ajouté au mélange échantillon/tampon de lyse. Le volume de contrôle interne à

ajouter au mélange échantillon/tampon de lyse dépend uniquement du volume d'éluion et représente 10 % de celui-ci. Par exemple, avec le minikit QIAamp DNA, l'ADN est élué dans 60 µl de tampon AE. Par conséquent, ajouter 6 µl de contrôle interne au mélange échantillon/tampon de lyse pour chaque échantillon.

Important : Ne pas ajouter le contrôle interne et/ou l'ARN vecteur (CARRIER) directement à l'échantillon.

Protocole : détection de l'ADN spécifique du HSV-1 et du HSV-2

Remarques importantes avant de commencer

- Avant de commencer la procédure, lire « Précautions d'emploi », page 8.
- Prendre le temps de se familiariser avec l'appareil Rotor-Gene Q avant de démarrer le protocole. Consulter le manuel d'utilisation de l'appareil.
- S'assurer que chaque cycle de PCR intègre au moins un contrôle positif et un contrôle négatif (eau de qualité PCR).

Étapes préliminaires

- S'assurer que le bloc réfrigérant (accessoire de l'appareil Rotor-Gene Q) a été préalablement refroidi à 2–8 °C.
- Avant chaque utilisation, décongeler complètement tous les réactifs, les mélanger (aspirer et rejeter plusieurs fois à l'aide de la pipette ou agiter brièvement à l'aide d'un vortex) et les centrifuger brièvement.

Procédure

1. Placer le nombre souhaité de tubes réactionnels pour PCR dans les adaptateurs du bloc réfrigérant.
2. Si le contrôle interne est utilisé pour surveiller la procédure d'isolement de l'ADN et une éventuelle inhibition de la PCR, suivre l'étape 2a. Si le contrôle interne est utilisé exclusivement pour mettre en évidence une inhibition de la PCR, suivre l'étape 2b.

Utiliser le contrôle interne comme décrit à l'étape 2b pour tous les échantillons, les contrôles et les étalons de quantification à analyser.

- 2a. Le contrôle interne a déjà été ajouté au milieu d'isolement (voir « Contrôle interne », page 11). Dans ce cas, préparer un Mastermix, tel que décrit dans le tableau 2.

Le mélange réactionnel contient tous les composants nécessaires à la PCR, à l'exception de l'échantillon.

Tableau 2. Préparation du Mastermix (contrôle interne utilisé pour surveiller l'isolement de l'ADN et déceler une inhibition de la PCR)

Composant	1 réaction	12 réactions
HSV-1/2 RG Master A	5 µl	60 µl
HSV-1/2 RG Master B	15 µl	180 µl
Volume total	20 µl	240 µl

2b. Le contrôle interne doit être ajouté directement au mélange de HSV-1/2 RG Master A et de HSV-1/2 Master B. Dans ce cas, préparer un Mastermix conformément au tableau 3.

Le mélange réactionnel contient tous les composants nécessaires à la PCR, à l'exception de l'échantillon.

Tableau 3. Préparation du Mastermix (contrôle interne utilisé exclusivement pour surveiller une inhibition de la PCR)

Composant	1 réaction	12 réactions
HSV-1/2 RG Master A	5 µl	60 µl
HSV-1/2 RG Master B	15 µl	180 µl
Contrôle interne HSV-1/2 RG IC	1 µl	12 µl
Volume total	21 µl	252 µl

* L'augmentation de volume due à l'addition du contrôle interne est négligeable lors de la préparation du dosage par PCR. La sensibilité du système de détection n'est pas altérée.

3. Distribuer 20 µl de Mastermix dans chaque tube de PCR. Ajouter ensuite 10 µl d'ADN de l'échantillon élué et bien mélanger en aspirant et rejetant le mélange plusieurs fois. De la même manière, ajouter 10 µl d'un contrôle positif ou d'un étalon de quantification ou 10 µl d'H₂O (eau de qualité PCR) en tant que contrôle négatif.

S'assurer que chaque cycle intègre au moins un contrôle positif et un contrôle négatif. Utiliser les 8 étalons de quantification (HSV1 QS1–QS4 et HSV2 QS1–QS4) pour la quantification.

4. Fermer les tubes de PCR. S'assurer que l'anneau de blocage (accessoire de l'appareil Rotor-Gene) est placé en haut du rotor.
5. Pour détecter l'ADN spécifique du HSV-1 et du HSV-2, créer un profil de températures conformément aux étapes suivantes.

Définition des paramètres généraux de dosage	Figures 1, 2, 3, 4
Activation initiale de l'enzyme à démarrage à chaud	Figure 5
Amplification de l'ADN	Figure 6
Ajustement de la sensibilité des canaux de fluorescence	Figure 7
Démarrage du cycle	Figure 8

Toutes les spécifications font référence au logiciel Rotor-Gene Q version 2.3.1 et ultérieure. Le manuel d'utilisation fournit de plus amples informations sur la programmation des appareils Rotor-Gene. Dans les images suivantes, ces réglages sont encadrés en noir et en gras.

6. Commencer par ouvrir la boîte de dialogue **New Run Wizard** (Assistant Nouveau cycle) version **Advanced** (Avancé) et sélectionner **Two Step** (Deux étapes) (figure 1). Cliquer sur **Next** (Suivant) pour continuer.

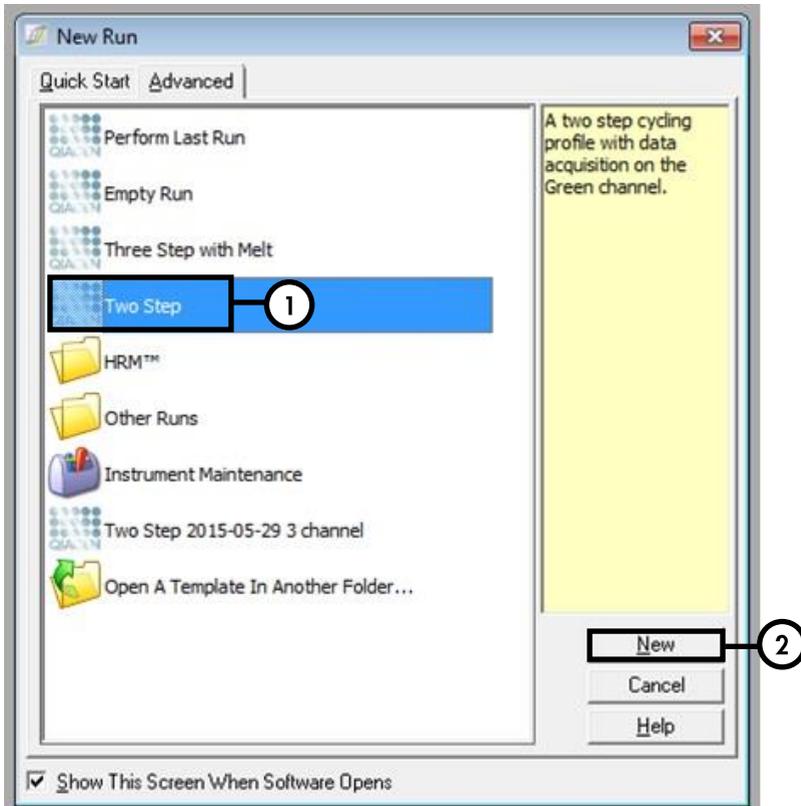


Figure 1. Boîte de dialogue New Run (Nouveau cycle).

7. Dans la boîte de dialogue **New Run Wizard** suivante (figure 2), cochez la case **Locking Ring Attached** (Anneau de blocage fixé) et cliquez sur **Next**.

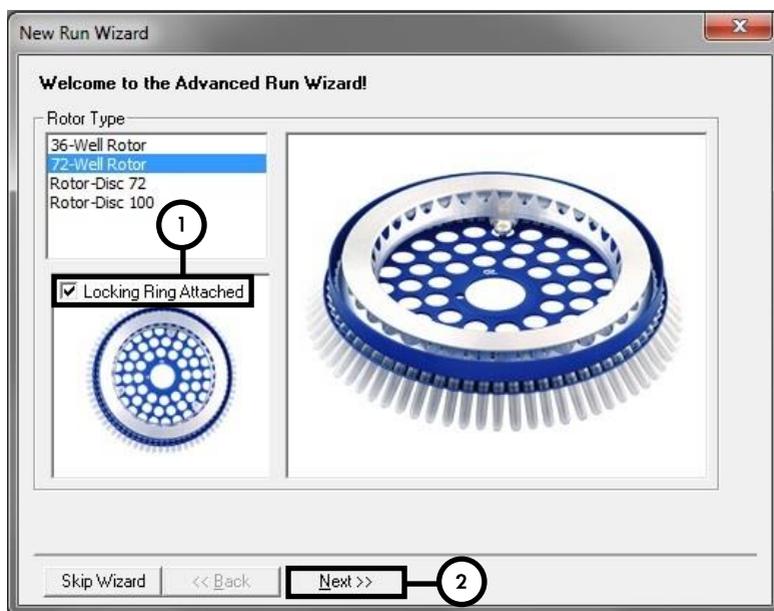


Figure 2. Boîte de dialogue New Run Wizard.

8. Sélectionner **30** comme volume de réaction de la PCR et cliquer sur **Next** (figure 3).

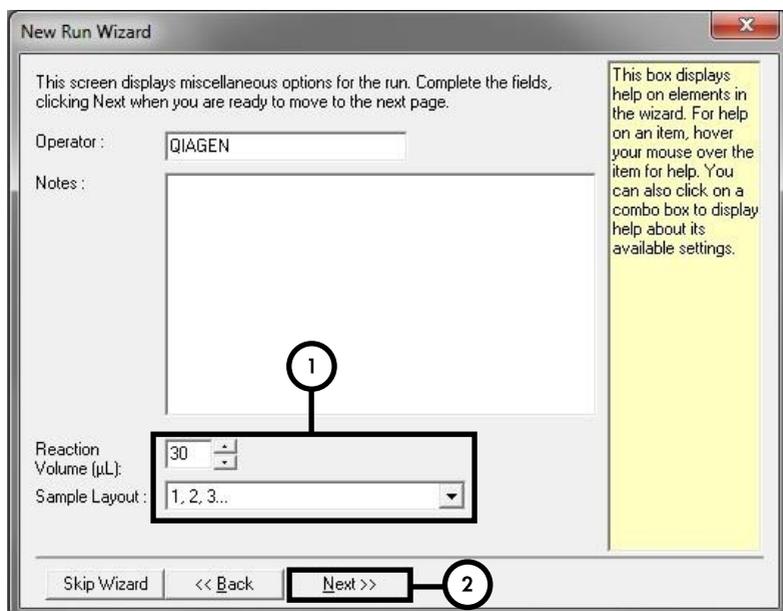


Figure 3. Définition des paramètres généraux de dosage.

9. Dans la boîte de dialogue **New Run Wizard**, cliquer sur le bouton **Edit Profile** (Modifier profil) (figure 4) et programmer le profil de températures comme indiqué sur les figures 5-6.

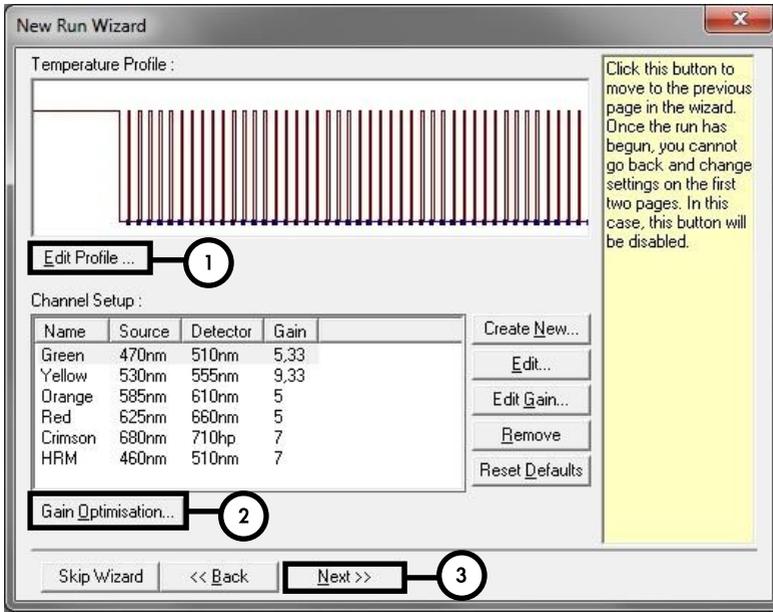


Figure 4. Modification du profil.

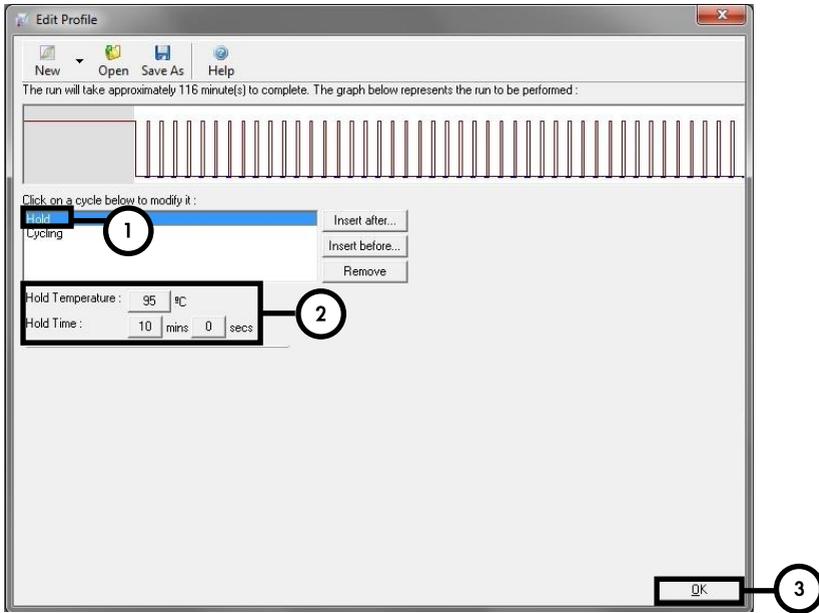


Figure 5. Activation initiale de l'enzyme à démarrage à chaud.

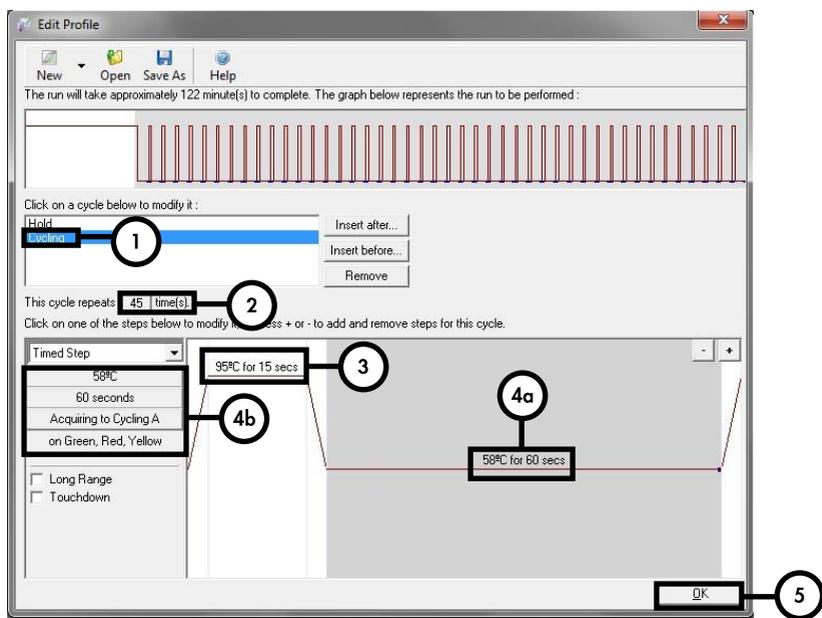


Figure 6. Amplification de l'ADN.

10. La plage de détection des canaux de fluorescence doit être déterminée selon les intensités de fluorescence des tubes de PCR. Dans la boîte de dialogue **New Run Wizard**, cliquer sur **Gain Optimisation** (Optimisation du gain) (voir figure 4, étape 2) pour ouvrir la boîte de dialogue **Auto-Gain Optimisation Setup** (Configuration de l'optimisation du gain automatique) (figure 7). Cocher la case **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (Réaliser l'optimisation avant la 1^{re} acquisition) (figure 7). S'assurer que les trois canaux (Green, Red et Yellow) sont sélectionnés pour **Auto-Gain Optimisation** (Optimisation du gain automatique) (figure 7). (Trouver les canaux dans le menu déroulant sous **Channel Settings** [Paramètres de canal] et cliquer sur **Add** [Ajouter].) Dans la boîte de dialogue **Auto-Gain Optimisation Setup**, cliquer sur **Close** (Fermer) à la fin de l'étalonnage du gain.

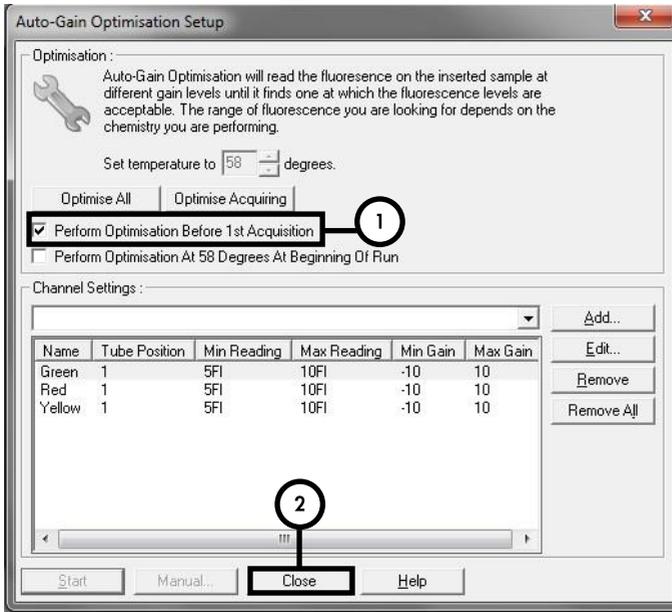


Figure 7. Ajustement de la sensibilité des canaux de fluorescence.

11. Les valeurs de gain déterminées par l'étalonnage des canaux sont automatiquement enregistrées et répertoriées dans la dernière fenêtre de menu de la procédure de programmation (figure 8). Cliquer sur **Start Run** (Démarrer le cycle).

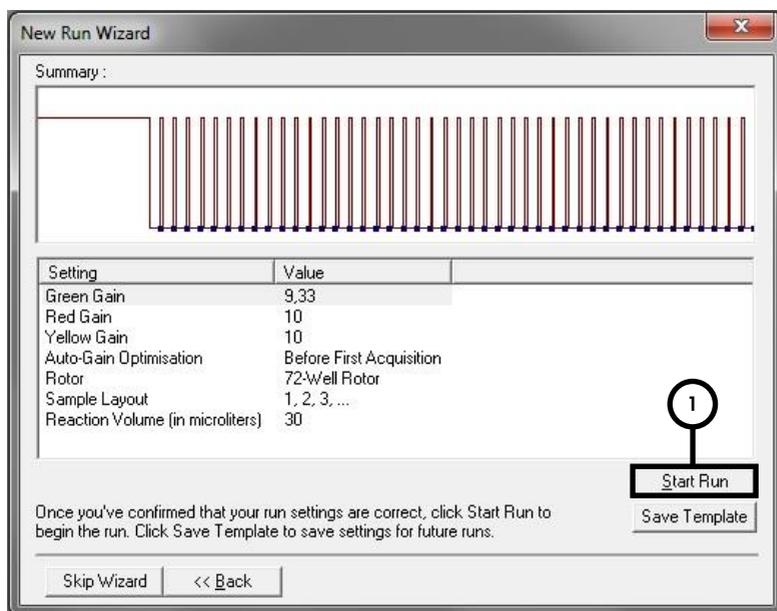


Figure 8. Démarrage du cycle.

12. Une fois le cycle achevé, analyser les données (voir « Interprétation des résultats », page 24).

Interprétation des résultats

Validité du cycle

Cycle qualitatif valide

Les conditions de contrôle suivantes doivent être remplies pour qu'un cycle qualitatif soit valide (tableau 4).

Tableau 4. Conditions de contrôle pour un cycle qualitatif valide

Contrôle	Canal de détection		
	Cycling Green	Cycling Red	Cycling Yellow
Contrôle positif HSV-1 (QS)	POSITIF	NÉGATIF	POSITIF
Contrôle positif HSV-2 (QS)	NÉGATIF	POSITIF	POSITIF
Contrôle négatif	NÉGATIF	NÉGATIF	POSITIF

Cycle qualitatif non valide

Un cycle qualitatif est non valide s'il n'a pas été terminé ou si l'une quelconque des conditions de contrôle d'un cycle qualitatif valide n'a pas été remplie.

Si un cycle qualitatif est non valide, répéter la PCR ou extraire à nouveau l'ADN des échantillons d'origine s'il ne reste plus d'ADN.

Cycle quantitatif valide

Un cycle quantitatif est valide si toutes les conditions de contrôle d'un cycle qualitatif valide sont remplies (voir tableau 4 ci-dessus). Par ailleurs, pour obtenir des résultats de quantification précis, une courbe d'étalonnage valide doit être générée. Pour un cycle

quantitatif valide, la courbe d'étalonnage doit comporter les valeurs de contrôle suivantes (tableau 5).

Tableau 5. Paramètres de contrôle d'une courbe d'étalonnage valide

Paramètre de contrôle	Valeur valide
Pente	-3,743/-2,765
Efficacité de la PCR	85 %/130 %
R au carré (R ²)	> 0,98

Cycle quantitatif non valide

Un cycle quantitatif est non valide s'il n'a pas été terminé ou si l'une quelconque des conditions de contrôle d'un cycle quantitatif valide n'a pas été remplie.

Si un cycle quantitatif est non valide, répéter la PCR ou extraire à nouveau l'ADN des échantillons d'origine s'il ne reste plus d'ADN.

Analyse qualitative

Le tableau 6 fournit une synthèse de l'interprétation des résultats.

Tableau 6. Résumé de l'interprétation des résultats

Échantillon	Canal de détection			Interprétation des résultats
	Cycling Green	Cycling Red	Cycling Yellow	
A	POSITIF	NÉGATIF	POSITIF*	ADN spécifique du HSV-1 détecté.
B	NÉGATIF	POSITIF	POSITIF*	ADN spécifique du HSV-2 détecté.
C	NÉGATIF	NÉGATIF	POSITIF	Absence de détection de l'ADN spécifique du HSV-1 et de l'ADN spécifique du HSV-2. L'échantillon ne contient pas d'ADN du HSV-1 ou du HSV-2 en quantité détectable.
D	NÉGATIF	NÉGATIF	NÉGATIF	Inhibition de la PCR ou dysfonctionnement du réactif. Répéter la procédure en utilisant l'échantillon d'origine ou prélever et tester un nouvel échantillon.

* La détection du contrôle interne dans le canal Cycling Yellow n'est pas obligatoire si des résultats positifs ont été obtenus dans le canal de détection Cycling Green ou Cycling Red. De fortes charges virales de HSV-1 ou de HSV-2 dans l'échantillon peuvent entraîner une réduction ou une absence des signaux du contrôle interne.

Analyse quantitative

Le kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR contient quatre étalons de quantification (QS1–QS4) pour le HSV-1 et quatre étalons de quantification (QS1–QS4) pour le HSV-2. Pour générer une courbe d'étalonnage en vue de l'analyse quantitative, ces étalons doivent être définis comme tels avec les concentrations adéquates (voir tableau 1, page 10). Une courbe

d'étalonnage peut être générée en vue de l'analyse quantitative en utilisant des étalons de concentrations connues.

$$C_T = m \log(N_0) + b$$

- C_T = cycle seuil
- m = pente
- N_0 = concentration initiale
- b = ordonnée à l'origine

Les concentrations des échantillons positifs de concentration inconnue peuvent être obtenues à partir de la courbe d'étalonnage (figure 9).

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

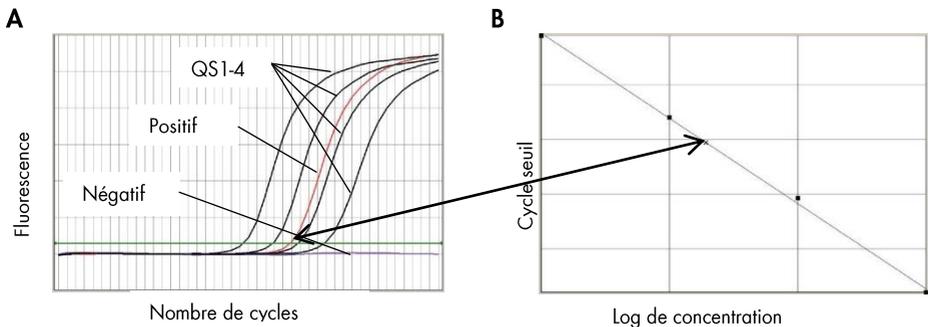


Figure 9. Étalons de quantification, un échantillon positif et un échantillon négatif affichés sur (A) un tracé d'amplification et (B) l'analyse de la courbe d'étalonnage.

Remarque : La concentration de l'échantillon est affichée en nombre de copies/ μ l et fait référence à la concentration en ADN viral dans l'éluat.

Utiliser la formule suivante pour déterminer la charge virale de l'échantillon d'origine.

$$\text{Charge virale (échantillon)} \left[\frac{\text{copies}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Volume (éluat)} \left[\mu\text{l} \right] \times \text{charge virale (éluat)} \left[\frac{\text{copies}}{\mu\text{l}} \right]}{\text{Volume d'échantillon} \left[\text{ml} \right]}$$

Limites

- L'utilisation de ce produit est réservée au personnel ayant reçu les instructions et la formation adéquates concernant les procédures de PCR en temps réel et de diagnostic in vitro.
- Le respect des bonnes pratiques de laboratoire est essentiel pour que ce dosage fonctionne correctement.
- Il est impératif de maintenir la pureté des composants du kit et des préparations de tubes réactionnels. Surveiller étroitement tous les réactifs pour détecter des impuretés et une contamination. Mettre au rebut tout réactif dans lequel une contamination est soupçonnée.
- Des procédures appropriées de prélèvement, transport, conservation et traitement des échantillons sont essentielles pour que ce dosage fonctionne de manière optimale.
- Ne pas utiliser ce dosage directement sur l'échantillon. Réaliser les procédures pertinentes d'extraction des acides nucléiques avant d'utiliser ce dosage.
- La présence d'inhibiteurs de PCR peut entraîner des résultats faux négatifs ou non valides.
- Des mutations potentielles dans les régions cibles du génome du HSV-1 et/ou du HSV-2 couvertes par les amorces et/ou les sondes utilisées dans le kit peuvent empêcher de détecter la présence des agents pathogènes.
- Comme pour tout test de diagnostic, interpréter les résultats obtenus avec le kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR en tenant compte de toutes les données cliniques et biologiques.

Contrôle de la qualité

Chaque lot du kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR est testé sur la base de spécifications prédéterminées pour garantir une qualité homogène du produit.

Caractéristiques de performance

Les caractéristiques de performance particulières du kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR ont été déterminées en utilisant de l'ADN spécifique du HSV-1 (réf. ATCC® : VR-1493) et de l'ADN spécifique du HSV-2 (réf. ATCC : VR-540) de concentrations connues.

Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR est définie comme la concentration (copies par μl d'éluat) de l'ADN spécifique du HSV-1 ou du HSV-2 pouvant être détectée avec un taux de positivité $\geq 95\%$. La sensibilité analytique a été déterminée par l'analyse d'une série de dilutions de l'ADN du HSV-1 et de l'ADN du HSV-2 de concentration connue (tableaux 7 et 8).

Tableau 7. Résultats de PCR utilisés pour calculer la sensibilité analytique de l'amplification spécifique du HSV-1

Concentration d'entrée (copies/ μ l)	Nombre de répliquats	Nombre de positifs	Pourcentage de détection (%)
3,16	12	12	100
1,0	12	12	100
0,32	12	11	91,6
0,1	12	9	75
0,03	12	6	50
0,01	12	2	16,7
0,003	12	0	0
0,001	12	0	0
NTC	12	0	0

Tableau 8. Résultats de PCR utilisés pour calculer la sensibilité analytique de l'amplification spécifique du HSV-2

Concentration d'entrée (copies/ μ l)	Nombre de répliquats	Nombre de positifs	Pourcentage de détection (%)
3,16	18	18	100
1,0	18	18	100
0,32	18	11	61,1
0,1	18	7	38,9
0,03	18	3	16,7
0,01	18	1	5,6
0,003	18	0	0
0,001	18	0	0
NTC	18	0	0

La sensibilité analytique du kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR, déterminée par analyse de probit, pour la détection de l'ADN spécifique du HSV-1 est de 0,33 copie/ μ l d'éluat (intervalle de confiance [IC] à 95 % : 0,16-1,3 copie/ μ l) et la sensibilité analytique pour la détection de l'ADN spécifique du HSV-2 est de 1,2 copie/ μ l d'éluat (IC 95 % : 0,7-3,5 copies/ μ l).

Spécificité analytique

La spécificité analytique du kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR est garantie par la sélection rigoureuse des oligonucléotides (amorces et sondes). Les oligonucléotides sont vérifiés au moyen d'une analyse par comparaison de séquences avec les séquences disponibles dans le domaine public afin de s'assurer que tous les génotypes de HSV pertinents sont détectés. Par ailleurs, la spécificité du kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR a été évaluée en testant un panel d'ADN/ARN génomique extrait d'autres herpèsvirus ou d'autres agents pathogènes pertinents pour les patients immunocompromis (tableau 9).

Tableau 9. Organismes testés pour la réactivité croisée

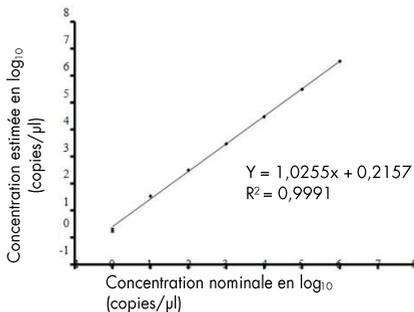
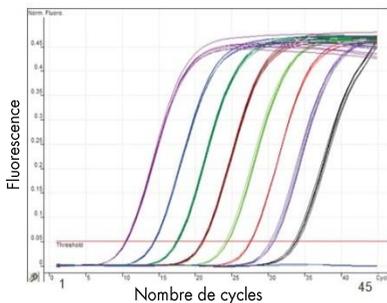
Organisme	Canal de détection		
	Cycling Green (HSV-1)	Cycling Red (HSV-2)	Cycling Yellow (IC)
Virus varicella-zoster	Négatif	Négatif	Valide
Virus d'Epstein-Barr	Négatif	Négatif	Valide
Cytomégalo virus	Négatif	Négatif	Valide
Herpès virus humain 6 (A, B)	Négatif	Négatif	Valide
Herpès virus humain 7	Négatif	Négatif	Valide
Herpès virus humain 8	Négatif	Négatif	Valide
Virus BK	Négatif	Négatif	Valide
Virus JC	Négatif	Négatif	Valide
Parvovirus B19	Négatif	Négatif	Valide
Virus de l'hépatite A	Négatif	Négatif	Valide
Virus de l'hépatite B	Négatif	Négatif	Valide
Virus de l'hépatite C	Négatif	Négatif	Valide
Virus de l'immunodéficience humaine 1	Négatif	Négatif	Valide

Le kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR n'a réagi avec aucun des organismes spécifiés.

Plage linéaire

La plage linéaire du kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR a été évaluée par analyse d'une série de dilutions logarithmique de l'ADN spécifique du HSV-1 et du HSV-2 en utilisant des concentrations comprises entre 10^8 copies/ μ l et 10 copies/ μ l (figure 10) et entre 10^7 et 10 copies/ μ l (HSV-2). Au moins 6 réplicats ont été analysés par dilution.

A



B

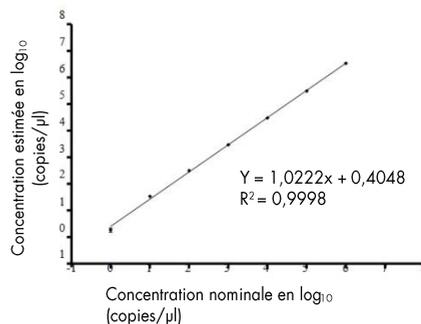
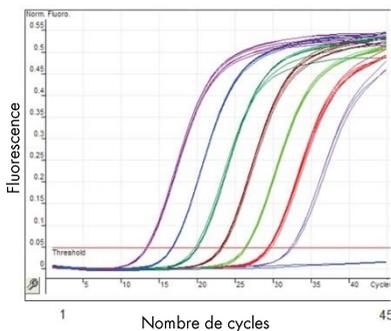


Figure 10. Courbes d'amplification et analyse de régression linéaire d'une série de dilutions de (A) l'ADN spécifique du HSV-1 et (B) l'ADN spécifique du HSV-2.

La plage linéaire du kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR s'étend sur au moins 7 ordres de grandeur pour l'ADN spécifique du HSV-1 et sur au moins 6 ordres de grandeur pour l'ADN spécifique du HSV-2.

Précision

La précision du kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR a été déterminée par la variabilité intradosage (variabilité au sein d'un même essai), la variabilité interdosage (variabilité entre différents essais) et la variabilité interlot (variabilité entre différents lots de production).

Les données de variabilité sont exprimées en écart-type, variance et coefficient de variation. Les données sont basées sur l'analyse de quantification de concentrations définies de l'ADN spécifique du HSV-1 et du HSV-2 et les valeurs du cycle seuil (C_T), sur le contrôle interne (tableaux 10-13). Au moins 6 réplicats par échantillon ont été analysés pour la variabilité intradosage, interdosage et interlot. La variance totale a été calculée en combinant les trois analyses.

Tableau 10. Précision de l'amplification de l'ADN spécifique du HSV-1

Système spécifique du HSV-1	Conc. moyenne (copies/µl)	Écart-type	Variance	Coefficient de variation (%)
Variabilité intradosage	91	5,3	29	5,9
	8,8	1,5	2,2	16,7
Variabilité interdosage	94,2	5,3	29,3	5,7
	8,9	1,2	1,4	13,1
Variabilité interlot	90,3	5,1	25,5	5,6
	8,7	1,2	1,5	14,2
Variance totale	92,7	5,5	30,7	6,0
	8,8	1,1	1,2	12,7

Tableau 11. Précision de l'amplification du contrôle interne pour le HSV-1

Contrôle interne	Cycle seuil moyen (C_T)	Écart-type	Variance	Coefficient de variation (%)
Variabilité intradosage	23,0	0,05	0,003	0,23
Variabilité interdosage	22,9	0,12	0,01	0,51
Variabilité interlot	23,5	0,61	0,37	2,6

Contrôle interne	Cycle seuil moyen (C_T)	Écart-type	Variance	Coefficient de variation (%)
Variance totale	23,3	0,61	0,37	2,6

Tableau 12. Précision de l'amplification de l'ADN spécifique du HSV-2

Système spécifique du HSV-2	Conc. moyenne (copies/μl)	Écart-type	Variance	Coefficient de variation (%)
Variabilité intradosage	108	5,9	35	5,5
	9,8	1,8	3,4	18,0
Variabilité interdosage	99,2	9,4	87,7	9,4
	10	2,0	4,15	20,4
Variabilité interlot	102,5	9,5	90,8	9,3
	9,0	2,0	4,0	22,2
Variance totale	99,6	9,0	81,7	9,1
	9,5	2,1	4,5	22,3

Tableau 13. Précision de l'amplification du contrôle interne pour le HSV-2

Contrôle interne	Cycle seuil moyen (C_t)	Écart-type	Variance	Coefficient de variation (%)
Variabilité intradosage	24,0	0,1	0,004	0,43
Variabilité interdosage	23,8	0,3	0,13	1,27
Variabilité interlot	24,0	0,14	0,02	0,59
Variance totale	23,9	0,25	0,06	1,03

Répétabilité

La spécificité, la sensibilité et la précision de quantification du kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR ont été évaluées par l'analyse de panels de compétence établis pour le HSV. Pour garantir la répétabilité du kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR, la spécificité et la sensibilité

sont évaluées par l'analyse régulière de panels de compétence établis pour le HSV-1 et le HSV-2 ainsi que d'échantillons diagnostiques caractérisés (un exemple est fourni dans le tableau 15).

Tableau 15. Résultats de l'analyse d'un panel de compétence pour le HSV (QCMD)

Panel de compétence			Kit <i>artus</i> HSV-1/2 Quant RG PCR		
Échantillon	Contenu de l'échantillon	Conc. attendue (copies/ml)	Conc. détectée de HSV-1 (copies/ml)	Conc. détectée de HSV-2 (copies/ml)	Contrôle interne
HSVDNA14-01	HSV-1	5 408	2 460	–	Valide
HSVDNA14-02	Négatif pour le HSV	–	–	–	Valide
HSVDNA14-03	HSV-1	1 135	855	–	Valide
HSVDNA14-04	HSV-1	213	44	–	Valide
HSVDNA14-05	HSV-1	12 794	8 490	–	Valide
HSVDNA14-06	HSV-2	1 982	–	1 881	Valide
HSVDNA14-07	HSV-2	275	–	525	Valide
HSVDNA14-08	HSV-2	5 023	–	11 370	Valide
HSVDNA14-09	HSV-1	341	70	–	Valide
HSVDNA14-10	VZV	–	–	–	Valide

Symboles

Les symboles figurant dans le tableau suivant sont utilisés dans cette notice d'utilisation.

Symbole

Définition des symboles



96

Contient suffisamment de réactifs pour 96 tests



Dispositif médical de diagnostic in vitro



Référence



Numéro de lot



Limites de température



Fabricant

Symbole

Définition des symboles



Utiliser jusqu'au



Référence du matériel



Référence marché international



Consulter la notice d'utilisation

Résolution des principaux problèmes rencontrés

Les scientifiques des services techniques de QIAGEN seront ravis de répondre à toutes les questions sur les informations et protocoles figurant dans ce manuel ou sur les technologies d'échantillons et de dosage (pour les coordonnées, visiter le site www.qiagen.com).

Pour commander

Produit	Contenu	Référence
<i>artus</i> HSV-1/2 Quant RG PCR Kit (96)	Pour 96 réactions : Master A, Master B, 4 étalons de quantification du HSV-1, 4 étalons de quantification du HSV-2, contrôle interne, H ₂ O (eau de qualité PCR)	4515265
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Pour 50 préparations d'ADN : 50 colonnes QIAamp Mini Spin, protéinase K, réactifs, tampons, tubes de prélèvement (2 ml)	51304
QIAamp DNA Mini Kit (250)	Pour 250 préparations d'ADN : 250 colonnes QIAamp Mini Spin, protéinase K, réactifs, tampons, tubes de prélèvement (2 ml)	51306
Rotor-Gene Q et accessoires		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Thermocycleur de PCR en temps réel à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main d'œuvre, installation et formation comprises	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Thermocycleur de PCR en temps réel à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main d'œuvre, installation et formation non comprises	9002022

Produit	Contenu	Référence
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package Plus	Thermocycleur de PCR en temps réel à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires : inclut le progiciel prioritaire avec logiciel, installation, formation, garantie 3 ans pièces et main d'œuvre et 3 visites de maintenance préventive	9001866
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package	Thermocycleur de PCR en temps réel à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires : inclut le progiciel prioritaire avec logiciel, installation, formation, garantie 2 ans pièces et main d'œuvre et 2 visites de maintenance préventive	9001865
Rotor-Gene Q 5plex System	Thermocycleur de PCR en temps réel à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main d'œuvre, installation et formation comprises	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Platform	Thermocycleur de PCR en temps réel à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main d'œuvre, installation et formation non comprises	9001570

Produit	Contenu	Référence
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package Plus	Appareil de PCR en temps réel à 6 canaux (bleu, vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires : inclut le progiciel prioritaire avec logiciel, installation, formation, garantie 3 ans pièces et main d'œuvre et 3 visites de maintenance préventive	9001870
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package	Appareil de PCR en temps réel à 6 canaux (bleu, vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires : inclut le progiciel prioritaire avec logiciel, installation, formation, garantie 2 ans pièces et main d'œuvre et 2 visites de maintenance préventive	9001869
Rotor-Gene Q 6plex System	Appareil de PCR en temps réel à 6 canaux (bleu, vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main d'œuvre, installation et formation comprises	9001660
Rotor-Gene Q 6plex Platform	Appareil de PCR en temps réel à 6 canaux (bleu, vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main d'œuvre, installation et formation non comprises	9001590

Produit	Contenu	Référence
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloc en aluminium pour la préparation manuelle des tubes réactionnels à l'aide d'une pipette monocanal dans 72 tubes de 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 rangées de 4 tubes et bouchons pour 1 000 réactions	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 rangées de 4 tubes et bouchons pour 10 000 réactions	981106

Page laissée volontairement vierge

Page laissée volontairement vierge

Accord de licence limitée pour le kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur du produit accepte les conditions suivantes :

1. Le produit ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis et à ce manuel, et avec les composants fournis à l'intérieur du kit. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce kit avec tout autre composant non fourni dans ce kit, à l'exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit, le présent manuel et les autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com. Certains de ces protocoles supplémentaires ont été fournis par des utilisateurs QIAGEN pour les utilisateurs QIAGEN. Ces protocoles n'ont pas été testés de manière approfondie ni optimisés par QIAGEN. QIAGEN n'offre aucune garantie sur eux ni aucune garantie qu'ils n'enfreignent pas les droits de tiers.
2. Hormis les licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou son(ses) utilisation(s) ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce kit et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette notamment toute licence, expresse ou tacite, autre que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du kit consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits dans les conditions précédentes. QIAGEN peut faire appliquer les interdictions de cet Accord de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de cet Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

Pour accéder aux conditions de licence mises à jour, voir www.qiagen.com.

L'achat de ce produit permet à l'acheteur de l'utiliser pour poser des diagnostics humains in vitro. Aucun brevet général ni licence d'aucune sorte autre que ce droit spécifique d'utilisation à l'achat n'est accordé par la présente.

Marques de commerce : QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, *artus*®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group) ; ATCC® (American Type Culture Collection) ; FAM™, JOE™ (Life Technologies Corporation) ; Cy® (GE Healthcare).

HB-2016-001

© 2015, Altona Diagnostics GmbH, tous droits réservés.

Pour commander www.qiagen.com/contact | Support technique support.qiagen.com | Site Web www.qiagen.com