

artus[®] HSV-1/2 LC PCR Kit

Manuel



24 (réf. catalogue 4500063)



96 (réf. catalogue 4500065)

Diagnostic in vitro quantitatif

Pour une utilisation avec le système *LightCycler*[®]

Version 1



4500063, 4500065



1046888FR



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALLEMAGNE

R2

MAT

1046888FR



Technologies d'échantillons et d'analyses QIAGEN

QIAGEN est le premier fournisseur de technologies novatrices d'échantillons et d'analyses, permettant d'isoler et de détecter le contenu de n'importe quel échantillon biologique. Nos produits et services ultramodernes de grande qualité garantissent un succès total, de l'échantillon jusqu'au résultat.

QIAGEN fixe les normes en matière de :

- purification d'ADN, d'ARN et de protéines ;
- analyses d'acides nucléiques et de protéines ;
- recherche micro-ARN et interférence ARN ;
- automatisation des technologies d'échantillons et d'analyses.

Notre mission est de permettre à notre clientèle de réussir et d'accomplir des progrès décisifs. Pour plus d'informations, visiter www.qiagen.com.

Table des matières

1. Contenu	4
2. Conservation	5
3. Matériel nécessaire et non fourni.....	5
4. Précautions générales.....	5
5. Informations sur le pathogène.....	6
6. Principe de la PCR en temps réel	6
7. Description du produit	7
8. Protocole	8
8.1 Extraction de l'ADN	8
8.2 Contrôle interne.....	11
8.3 Quantification.....	12
8.4 Préparation de la PCR.....	13
8.5 Programmation du système LightCycler	17
9. Interprétation.....	20
10. Aide au dépannage.....	25
11. Spécifications.....	27
11.1 Sensibilité analytique	27
11.2 Spécificité	28
11.3 Précision	29
11.4 Robustesse	32
11.5 Reproductibilité.....	32
11.6 Évaluation diagnostique	32
12. Remarques particulières concernant l'utilisation du produit	33
13. Informations de sécurité	33
14. Contrôle qualité.....	33
15. Références bibliographiques.....	33
16. Explication des symboles	34

artus HSV 1/2 LC PCR Kit

Pour une utilisation avec le système *LightCycler*.

1. Contenu

	Étiquetage et contenu	Réf. 4500063 24 réactions	Réf. 4500065 96 réactions
Bleu	HSV LC Master	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
Rouge	HSV1 LC/RG/TM QS 1 [□] 1 x 10 ⁴ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Rouge	HSV1 LC/RG/TM QS 2 [□] 1 x 10 ³ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Rouge	HSV1 LC/RG/TM QS 3 [□] 1 x 10 ² cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Rouge	HSV1 LC/RG/TM QS 4 [□] 1 x 10 ¹ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Rouge	HSV2 LC/RG/TM QS 1 [□] 1 x 10 ⁴ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Rouge	HSV2 LC/RG/TM QS 2 [□] 1 x 10 ³ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Rouge	HSV2 LC/RG/TM QS 3 [□] 1 x 10 ² cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Rouge	HSV2 LC/RG/TM QS 4 [□] 1 x 10 ¹ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Vert	HSV LC IC [□]	1 x 1 000 μl	2 x 1 000 μl
Blanc	Water (PCR grade)	1 x 1 000 μl	1 x 1 000 μl

□ QS = Standard de quantification

IC = Contrôle interne

2. Conservation

Les composants de l'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit doivent être stockés entre –30 et –15 °C et peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Éviter de répéter les étapes de congélation/décongélation (> 2 x) qui pourraient réduire la sensibilité. En cas d'utilisation occasionnelle, répartir les réactifs en aliquotes. Si les composants sont placés à +4°C, la durée du stockage ne doit pas dépasser cinq heures.

3. Matériel nécessaire et non fourni

- Gants de laboratoire sans talc
- Kit d'extraction d'ADN (voir **8.1 Extraction de l'ADN**)
- Pipettes (réglables)
- Pointes de pipette stériles avec filtre
- Mixeur Vortex
- Micro-centrifugeuse avec rotor pour tubes de réaction de 2 ml
- Color Compensation Set (Roche Diagnostics, réf. cat. 2 158 850)
pour la création d'un fichier Crosstalk Color Compensation
- Capillaires *LightCycler* (20 µl)
- « Cooling Block » *LightCycler*
- Système *LightCycler*
- « Capping Tool » *LightCycler*

4. Précautions générales

L'utilisateur doit toujours respecter les mesures suivantes :

- Utiliser des pointes de pipette stériles avec filtre.
- Conserver et purifier les éléments positifs (échantillons, contrôles, amplicons) séparément des autres réactifs et les ajouter au mélange réactionnel dans une autre pièce.
- Décongeler complètement tous les composants à température ambiante avant le début de l'essai.

- Mélanger ensuite soigneusement les composants et les centrifuger brièvement.
- Toujours travailler dans de la glace ou dans le « Cooling Block » *LightCycler*.

5. Informations sur le pathogène

Le virus herpès simplex (HSV) se retrouve dans la partie liquidienne des lésions, dans la salive et les sécrétions vaginales et se transmet par contact direct avec les lésions ainsi que par voie sexuelle et périnatale. Dans une majeure partie des infections à HSV, le tableau clinique dominant est celui de la formation de vésicules sur la peau et au niveau des muqueuses (bouche et appareil génital). L'infection à HSV peut survenir en tant que primo-infection, qui est asymptomatique dans > 90 % des cas ou en tant qu'infection récurrente. Parmi les primo-infections dues au HSV-1 figurent la gingivostomatite, l'eczéma herpétique, la kératoconjonctivite et l'encéphalite. Les formes prises par la primo-infection à HSV-2 comprennent entre autres la vulvovaginite, la méningite et l'herpès généralisé du nouveau-né. La récurrence de l'infection à HSV entraîne principalement la formation de vésicules dans les zones cutanées entourant le nez, les lèvres et la région génitale. Les formes plus sévères sont la kératoconjonctivite récidivante et la méningite.

6. Principe de la PCR en temps réel

Lors du diagnostic par amplification en chaîne par polymérase (PCR), des régions spécifiques du génome pathogène sont amplifiées. La détection a lieu à l'aide de marqueurs fluorescents au cours de la PCR en temps réel. Ceux-ci sont généralement couplés à des sondes oligonucléotidiques, qui se lient spécifiquement à l'amplicon de la PCR. La détection des intensités de fluorescence durant la PCR en temps réel permet de détecter et de quantifier les produits amplifiés sans avoir à ré-ouvrir les tubes d'échantillon après la PCR (Mackay, 2004).

7. Description du produit

L'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit est une trousse prête à l'emploi pour détecter et différencier l'ADN du virus herpès simplex de type 1 et 2 par une amplification en chaîne par polymérase (PCR) suivie d'une courbe de fusion sur le système *LightCycler*. L'HSV LC Master comprend les réactifs et les enzymes nécessaires à l'amplification spécifique d'une séquence de 148 pb du génome du virus herpès simplex ainsi qu'à la détection directe de l'amplicon dans le canal de fluorimétrie F2 du système *LightCycler*. L'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit comprend en outre un deuxième système d'amplification hétérologue pour signaler une éventuelle inhibition de la PCR. Celui-ci est détecté en tant que *Contrôle interne* (IC) dans le canal de fluorimétrie F3. Ceci n'a aucune influence négative sur la limite de détection de la PCR analytique d'HSV (voir 11.1 **Sensibilité analytique**). Pour déterminer les sous-types, le système utilise la température de fusion spécifique aux sondes, qui produisent au cours de l'étape de courbe de fusion un signal dans le canal de fluorimétrie F2 à 69°C pour l'HSV-1 et à 66°C pour l'HSV-2. Selon les conditions d'extraction et l'emploi de différents tampons qui en résulte, il est possible d'obtenir des déviations de 1°- 2°C, qui se rapportent alors de façon équivalente aux amplicons HSV-1 et HSV-2. Des Standards de quantification externes (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4* & *HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*) sont fournis, permettant de déterminer la charge virale. Lire à ce sujet le paragraphe

8.3 Quantification.

Important : Le profil de thermocyclage pour la détection de l'ADN du virus herpès simplex avec l'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit correspond à celui des kits *artus* EBV LC PCR Kit, *artus* VZV LC PCR Kit et *artus* CMV LC PCR Kit. Par conséquent, il est possible d'effectuer et d'analyser les réactions PCR de ces systèmes *artus* au cours du même essai. Tenir compte des recommandations particulières concernant l'interprétation au paragraphe 8.3 Quantification et au chapitre 9. Interprétation.

8. Protocole

8.1 Extraction de l'ADN

Différents fabricants proposent des kits d'extraction d'ADN. Procéder à l'extraction d'ADN conformément aux instructions, tel que le préconise le fabricant, en utilisant la quantité indiquée d'échantillon. Les kits d'extraction suivants sont recommandés :

Échantillon	Kit d'extraction	Référence du catalogue	Fabricant	ARN entraîneur
Sérum, plasma, LCR, écouvillon,	QIAamp® UltraSens Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	inclus
	QIAamp® DNA Mini Kit	51 304	QIAGEN	non inclus
LCR	EZ1® DSP Virus Kit (48)*	62 724	QIAGEN	inclus

*A utiliser en combinaison avec l'instrument BioRobot® EZ1 DSP Workstation (réf. cat. 9001360) et la carte EZ1 DSP Virus Card (réf. cat. 9017707).

Note importante pour l'utilisation des troussees QIAamp UltraSens Virus

Kit et QIAamp DNA Mini Kit:

- L'emploi d'un **ARN entraîneur** est d'une importance déterminante pour l'efficacité de l'extraction et par conséquent pour le rendement en ADN/ARN. Dans le cas d'une extraction d'acides nucléiques à partir de milieu sans cellule ou de matériel pauvre en ADN/ARN (p.ex. LCR), si le kit d'extraction utilisé ne contient aucun ARN entraîneur, il est vivement recommandé d'ajouter un ARN entraîneur (RNA-Homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, réf. cat. 27-4110-01). Procéder alors selon les instructions suivantes:
 - a) Resuspendre l'ARN entraîneur lyophilisé dans le tampon d'élution (mais pas dans le tampon de lyse) du kit d'extraction (p.ex. : le tampon AE du QIAamp DNA Mini Kit) et diluer la solution jusqu'à une concentration de 1 µg/µl. Répartir cette solution d'ARN entraîneur en un nombre d'aliquotes adaptés au besoin. Ces aliquotes devront être stockés à -20°C.

Éviter de répéter les étapes de congélation/décongélation (> 2 x) d'une fraction aliquote d'ARN entraîneur.

- b) Pour chaque extraction, utiliser 1 μg d'ARN entraîneur par 100 μl de tampon de lyse. Si le protocole d'extraction prévoit par exemple 200 μl de tampon de lyse par échantillon à purifier, ajouter alors 2 μl d'ARN entraîneur (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) directement au tampon de lyse. Avant le début de chaque extraction, un mélange de tampon de lyse et d'ARN entraîneur (et éventuellement de Contrôle interne, voir **8.2 Contrôle interne**) doit être préparé extemporanément selon le schéma de pipetage suivant.

Nombre d'échantillons	1	12
Tampon de lyse	p. ex. 200 μl	p. ex. 2 400 μl
ARN entraîneur (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	2 μl	24 μl
Volume total	202 μl	2 424 μl
Volume pour l'extraction	200 μl	200 μl chacune

- c) Utiliser immédiatement le mélange de tampon de lyse et d'ARN entraîneur préparé extemporanément pour l'extraction. Il est impossible de conserver ce mélange.
- L'emploi d'un **ARN entraîneur** est d'une importance déterminante pour l'efficacité de l'extraction et par conséquent pour le rendement en ADN/ARN. Afin d'obtenir une plus grande stabilité de l'ARN entraîneur inclus dans le QIAamp UltraSens Virus Kit, il est recommandé de procéder selon les instructions suivantes, qui diffèrent des instructions du manuel du kit d'extraction :
 - a. Avant la première utilisation du kit d'extraction, resuspendre l'ARN entraîneur lyophilisé dans 310 μl de tampon d'élution inclus dans le kit (concentration finale 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, ne pas utiliser le tampon de lyse) et répartir cette solution d'ARN entraîneur en un nombre d'aliquotes adaptés au besoin. Ces aliquotes devront être stockés à -20°C . Éviter de répéter les étapes de congélation/décongélation (> 2 x) d'une fraction aliquote d'ARN entraîneur.
 - b. Avant le début de chaque extraction, un mélange de tampon de lyse et d'ARN entraîneur (et éventuellement de Contrôle interne, voir

8.2 Contrôle interne) doit être préparé extemporanément selon le schéma de pipetage suivant.

Nombre d'échantillons	1	12
Tampon de lyse AC	800 µl	9 600 µl
ARN entraîneur (1 µg/µl)	5,6 µl	67,2 µl
Volume total	805,6 µl	9 667,2 µl
Volume pour l'extraction	800 µl	800 µl chacune

- c. Utiliser immédiatement le mélange de tampon de lyse et d'ARN entraîneur préparé extemporanément pour l'extraction. Il est impossible de conserver ce mélange.
- L'utilisation du **QIAamp UltraSens Virus Kit** permet d'obtenir une concentration de l'échantillon. Si la nature de l'échantillon n'est ni du sérum ni du plasma, ajouter au moins 50 % (v/v) de plasma humain négatif à l'échantillon.
 - Dans le cas d'extractions utilisant des tampons de lavage contenant de l'**éthanol**, s'assurer impérativement qu'une étape de centrifugation supplémentaire (trois minutes, 13 000 tr/min) est effectuée avant l'élution pour éliminer les résidus d'éthanol. Cela permet de prévenir d'éventuelles inhibitions de la PCR.
 - L'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit ne convient pas aux procédés d'extraction à base de **phénol**.

Note importante pour l'utilisation de la trousse EZ1 DSP Virus Kit:

- L'emploi d'un **ARN entraîneur** est d'une importance déterminante pour l'efficacité de l'extraction et par conséquent pour le rendement en ADN/ARN. Ajouter la quantité correspondante d'ARN entraîneur à chaque extraction selon les instructions du manuel EZ1 DSP Virus Kit Handbook.

Important : Le *Contrôle interne* de l'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit peut être directement utilisé pendant la procédure d'extraction (voir **8.2 Contrôle interne**).

8.2 Contrôle interne

Un Contrôle interne (HSV LC IC) est inclus dans le kit. Celui-ci vous permet de contrôler **aussi bien la procédure d'extraction d'ADN qu'une éventuelle inhibition de la PCR** (voir Fig. 1). En cas d'utilisation de la trousse **EZ1 DSP Virus Kit**, le *Contrôle interne* doit être ajouté selon les instructions du manuel EZ1 DSP Virus Kit Handbook. En employant le **QIAamp UltraSens Virus Kit** ou le **QIAamp DNA Mini Kit**, ajouter le Contrôle interne dans un rapport de 0,1 μ l par 1 μ l de volume d'élution de la procédure d'extraction. Utiliser par exemple le kit QIAamp DNA Mini Kit et éluer l'ADN dans 200 μ l de tampon AE, puis utiliser 20 μ l de Contrôle interne de l'étape d'extraction. Si par exemple l'élution est de 100 μ l, utiliser par conséquent 10 μ l. La quantité de Contrôle interne utilisée dépend **uniquement** du volume d'élution. Le Contrôle interne et l'ARN entraîneur (voir **8.1 Extraction de l'ADN**) doivent être ajoutés uniquement

- au mélange de tampon de lyse et d'échantillon ou
- directement au tampon de lyse.

Le Contrôle interne ne doit pas être directement ajouté à l'échantillon. En ajoutant le tampon de lyse, noter que ce mélange de Contrôle interne et de tampon de lyse/ARN entraîneur doit être préparé extemporanément et pour une utilisation immédiate. (La conservation de ce mélange à température ambiante ou au réfrigérateur, même pour quelques heures, peut avoir pour conséquence une défaillance du Contrôle interne et ainsi diminuer l'efficacité de l'extraction).

Il est aussi possible d'utiliser le Contrôle interne **exclusivement pour mettre en évidence une éventuelle inhibition de la PCR** (voir Fig. 2). Pour cela, ajouter par réaction 0,5 μ l de Contrôle interne directement dans 15 μ l d'HSV LC Master. Pour chaque réaction PCR, utiliser 15 μ l de mélange réactionnel* ainsi préparé et ajouter ensuite 5 μ l d'échantillon purifié. En cas de

* L'augmentation du volume due à l'addition du Contrôle interne est négligeable lors de la mise en oeuvre de la réaction PCR. Il n'y a pas de répercussion sur la sensibilité du système de détection.

préparation d'une série de plusieurs échantillons, augmenter la quantité d'HSV LC Master et de *Contrôle interne* en fonction du nombre d'échantillons (voir **8.4 Préparation de la PCR**).

Les troussees *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit et *artus* VZV LC PCR Kit contiennent un *Contrôle interne* (IC) identique. Les troussees *artus* EBV LC PCR Kit et *artus* CMV LC PCR Kit aussi contiennent un *Contrôle interne* identique.

8.3 Quantification

Les Standards de quantification fournis (HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4) doivent être manipulés comme des échantillons purifiés et utilisés avec le même volume (5 µl). Pour établir une courbe d'étalonnage dans le système *LightCycler*[®], utiliser aussi bien pour HSV-1 que pour HSV-2 tous les quatre Standards de quantification fournis, les définir comme standard dans le Sample Loading Screen et saisir les concentrations

correspondantes (voir *LightCycler Operator's Manual*, Version 3.5, Chapter B, 2.4. Sample Data Entry). Cette courbe d'étalonnage peut également être utilisée pour des quantifications ultérieures, si au moins un standard **d'une** concentration définie est intégré dans la série en cours. Pour cela, il est nécessaire d'importer la courbe d'étalonnage établie précédemment (voir *LightCycler Operator's Manual*, Version 3.5, Chapter B, 4.2.5. Quantification with an External Standard Curve). Toutefois, pour cette forme de quantification, il convient de tenir compte du fait que la variabilité d'une série d'essais PCR à l'autre peut entraîner des écarts dans le résultat.

Si plusieurs systèmes Herpès *artus* ont été intégrés à votre essai, s'assurer d'analyser chaque système avec ses propres Standards de quantification séparément des autres systèmes.

Attention : Les Standards de quantification sont exprimés en copies/µl. Pour convertir les valeurs déterminées à l'aide de la courbe d'étalonnage en copies/ml d'échantillon, utiliser la formule suivante :

$$\text{Résultat (copies/ml)} = \frac{\text{résultat (copies/}\mu\text{l)} \times \text{volume d'élution (}\mu\text{l)}}{\text{volume d'échantillon (ml)}}$$

Noter qu'il faut utiliser le volume d'échantillon initial dans la formule mentionnée ci-dessus. Ceci est à considérer lorsque le volume d'échantillon a été modifié avant l'extraction d'acides nucléiques (p. ex. concentration par centrifugation ou augmentation du volume au moment de l'extraction).

Important : Un guide pour l'analyse quantitative des systèmes *artus* sur le système *LightCycler* est disponible sur le site Internet www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX (Technical Note for Quantitation on the *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 or *LightCycler* 2.0 Instrument).

8.4 Préparation de la PCR

S'assurer que le « Cooling Block » et les adaptateurs (accessoires du système *LightCycler*[®]) sont refroidis à environ +4°C. Placer le nombre de capillaires *LightCycler*[®] correspondant au nombre de réactions prévues dans les adaptateurs du « Cooling Block ». S'assurer qu'au moins un Standard de quantification (HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4) ainsi qu'un contrôle négatif (Water, PCR grade) sont ajoutés parallèlement à chaque série de PCR. Pour établir une courbe d'étalonnage, utiliser à chaque série de PCR tous les Standards de quantification fournis (HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4). Avant le début du test, décongeler complètement tous les réactifs à température ambiante, bien les mélanger (à l'aide de la pipette ou vortexer brièvement) et immédiatement après les centrifuger brièvement.

Pour contrôler à l'aide du Contrôle interne **aussi bien la procédure d'extraction d'ADN qu'une éventuelle inhibition de la PCR**, le *Contrôle interne* doit être ajouté au début de la procédure d'extraction (voir

8.2 Contrôle interne). Utiliser dans ce cas le tableau de pipetage suivant (voir également la représentation schématique à la Fig. 1) :

	Nombre d'échantillons	1	12
1. Préparation du mélange réactionnel	HSV LC Master	15 µl	180 µl
	HSV LC IC	0 µl	0 µl
	Volume total	15 µl	180 µl
2. Préparation de la réaction PCR	Mélange réactionnel	15 µl	15 µl chacune
	Échantillon	5 µl	5 µl chacune
	Volume total	20 µl	20 µl chacune

Si le *Contrôle interne* est utilisé uniquement **pour mettre en évidence une éventuelle inhibition de la PCR**, il doit être ajouté directement au HSV LC Master. Utiliser dans ce cas le tableau de pipetage suivant (voir également la représentation schématique à la Fig. 2) :

	Nombre d'échantillons	1	12
1. Préparation du mélange réactionnel	HSV LC Master	15 µl	180 µl
	HSV LC IC	0,5 µl	6 µl
	Volume total	15,5 µl*	186 µl*
2. Préparation de la réaction PCR	Mélange réactionnel	15 µl*	15 µl* chacune
	Échantillon	5 µl	5 µl chacune
	Volume total	20 µl	20 µl chacune

Pipeter 15 µl de mélange réactionnel dans le réservoir en plastique de chaque capillaire. Ajouter ensuite 5 µl de l'éluat d'extrait d'ADN. De la même manière, utiliser 5 µl d'au moins un des *Standards de quantification* de chacune des séries de *Standards de quantification (HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 – 4)* comme contrôle positif et 5 µl d'eau pour le contrôle négatif (*Water, PCR grade*). Fermer les capillaires. Pour transférer le mélange du réservoir en plastique aux capillaires, centrifuger les adaptateurs contenant les capillaires dans une micro-centrifugeuse pendant dix secondes à 400 x g (2 000 tr/min) maximum.

* L'augmentation du volume due à l'addition du *Contrôle interne* est négligeable lors de la mise en oeuvre de la réaction PCR. Il n'y a pas de répercussion sur la sensibilité du système de détection.

Addition du *Contrôle interne* à la procédure d'extraction

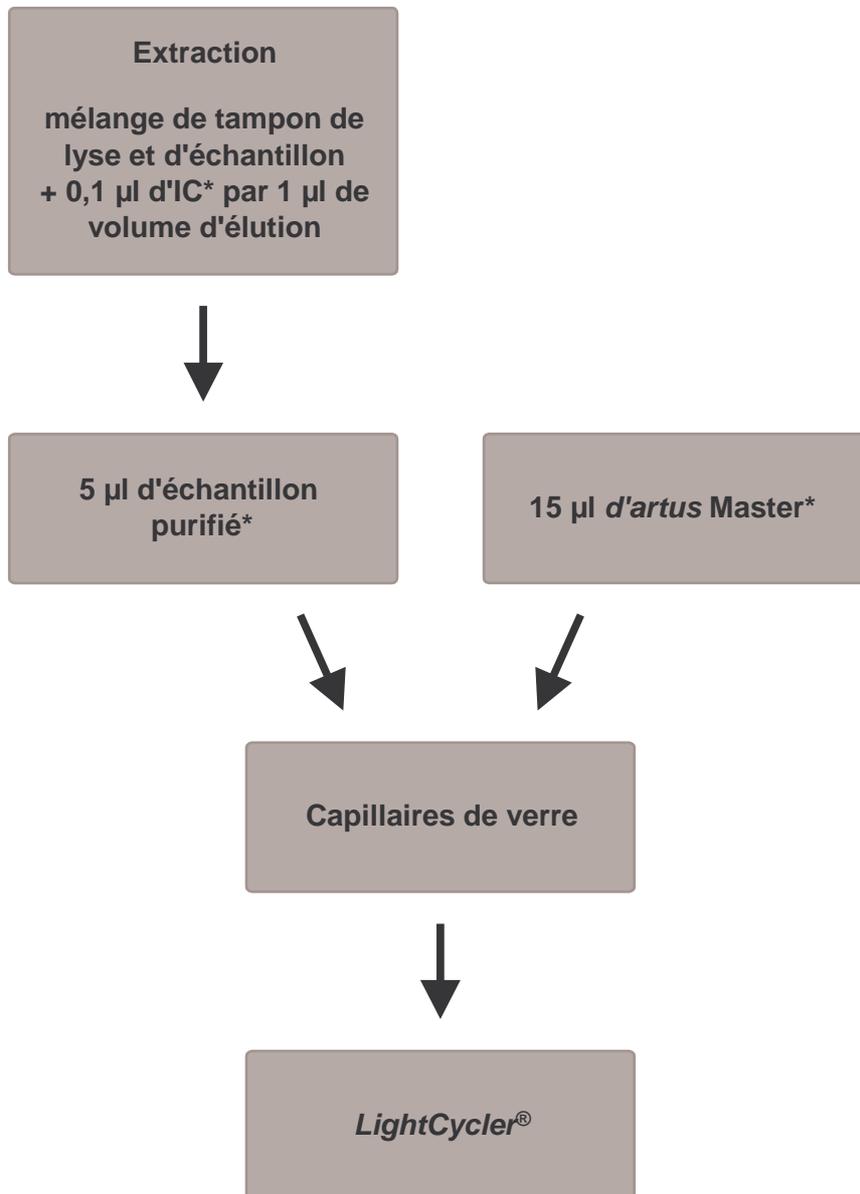


Fig. 1 : Processus d'addition du *Contrôle interne* pour contrôler la procédure d'extraction et une éventuelle inhibition de la PCR.

* A chaque pipetage, s'assurer impérativement que les solutions à utiliser sont complètement décongelées, bien mélangées et brièvement centrifugées.

Addition du *Contrôle interne* à l'*artus* Master

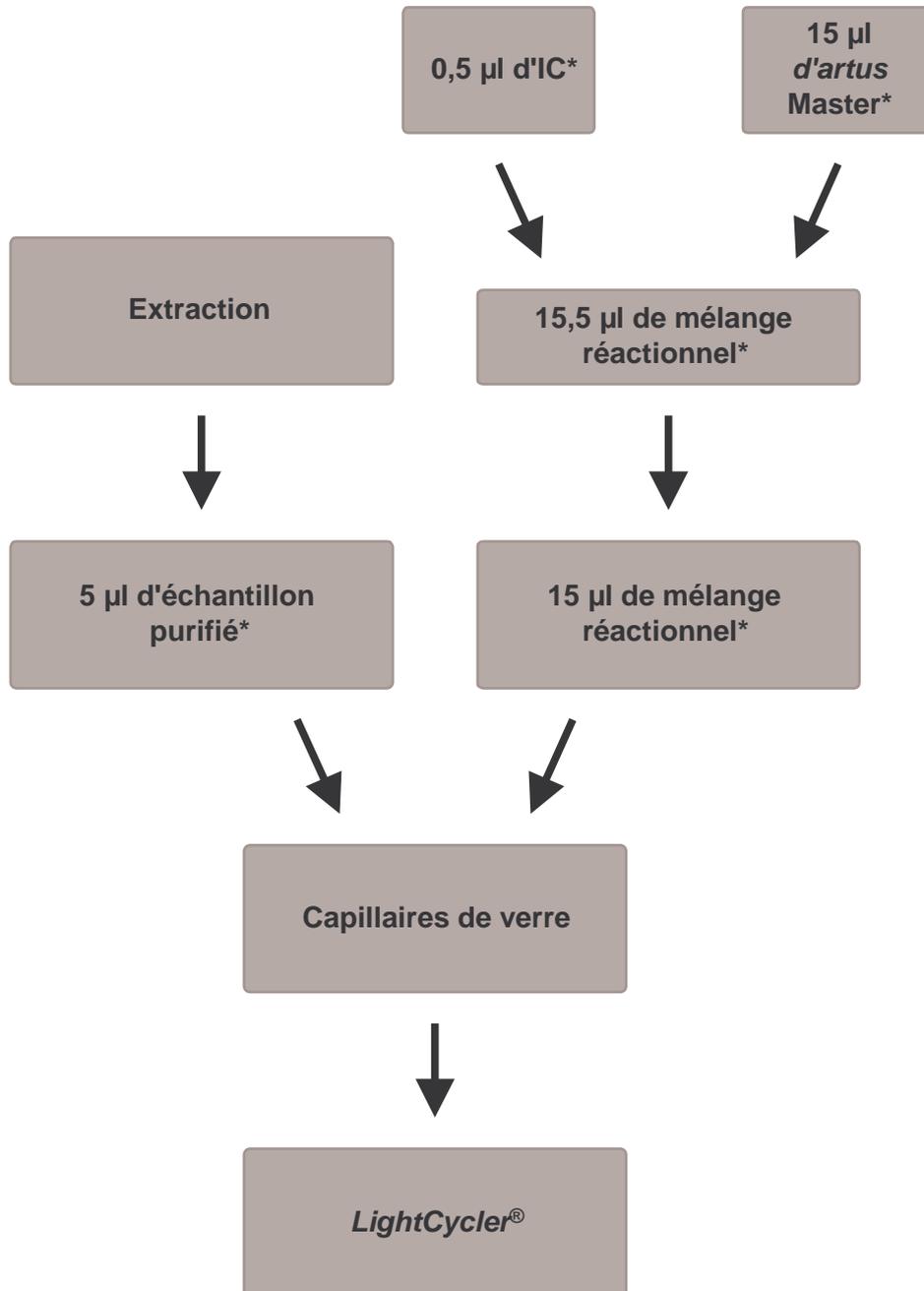


Fig. 2 : Processus d'addition du *Contrôle interne* pour contrôler une éventuelle inhibition de la PCR.

* A chaque pipetage, s'assurer impérativement que les solutions à utiliser sont complètement décongelées, bien mélangées et brièvement centrifugées.

8.5 Programmation du système LightCycler

Pour détecter l'ADN du virus herpès simplex, créer un profil de thermocyclage sur votre système *LightCycler*, conformément aux cinq étapes suivantes (voir Fig. 3 - 7).

- | | | |
|----|---|--------|
| A. | Activation initiale de l'enzyme « Hot Start » | Fig. 3 |
| B. | Étape « Touch Down » | Fig. 4 |
| C. | Amplification de l'ADN | Fig. 5 |
| D. | Courbe de fusion | Fig. 6 |
| E. | Refroidissement | Fig. 7 |

Bien tenir compte des paramètres pour *Analysis Mode*, *Cycle Program Data* et *Temperature Targets*. Pour plus de clarté, les paramétrages à effectuer sont encadrés en noir dans les figures. Pour plus de détails sur la programmation du système *LightCycler*, se reporter au guide *LightCycler Operator's Manual*.

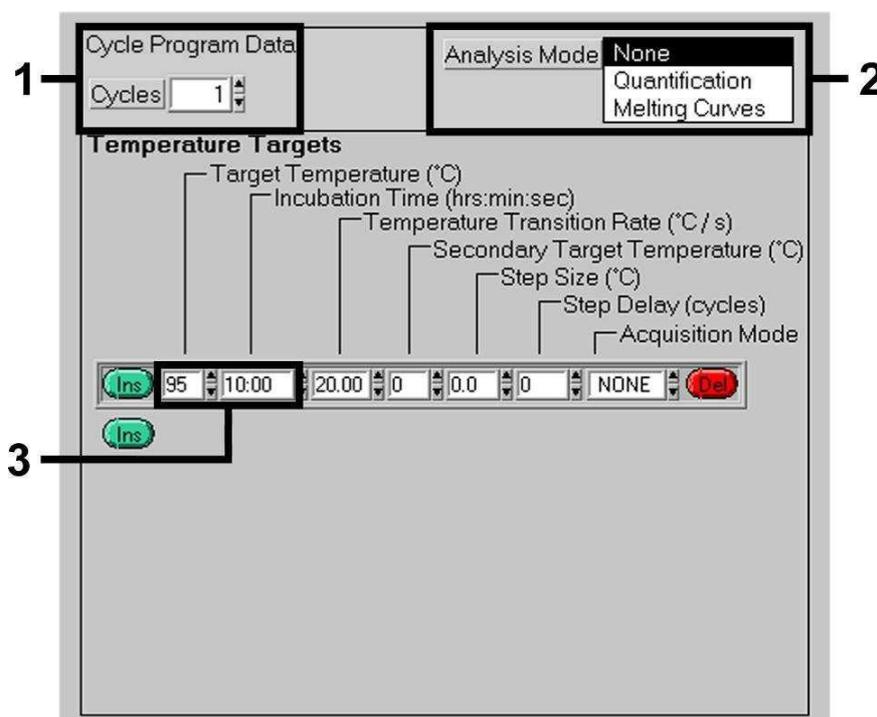


Fig. 3 : Activation initiale de l'enzyme « Hot Start ».

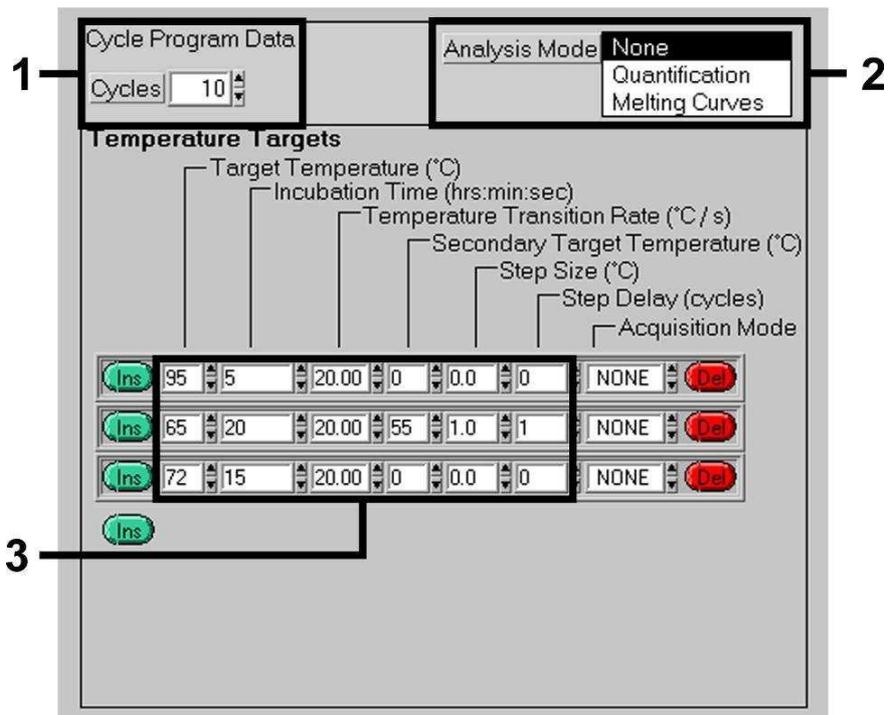


Fig. 4 : Étape « Touch Down ».

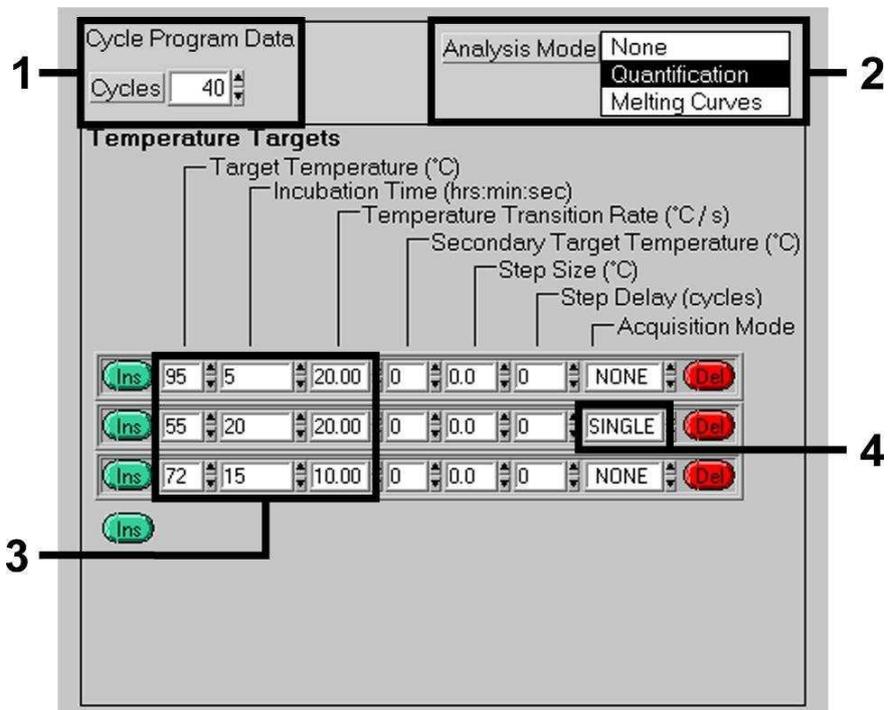


Fig. 5 : Amplification de l'ADN.

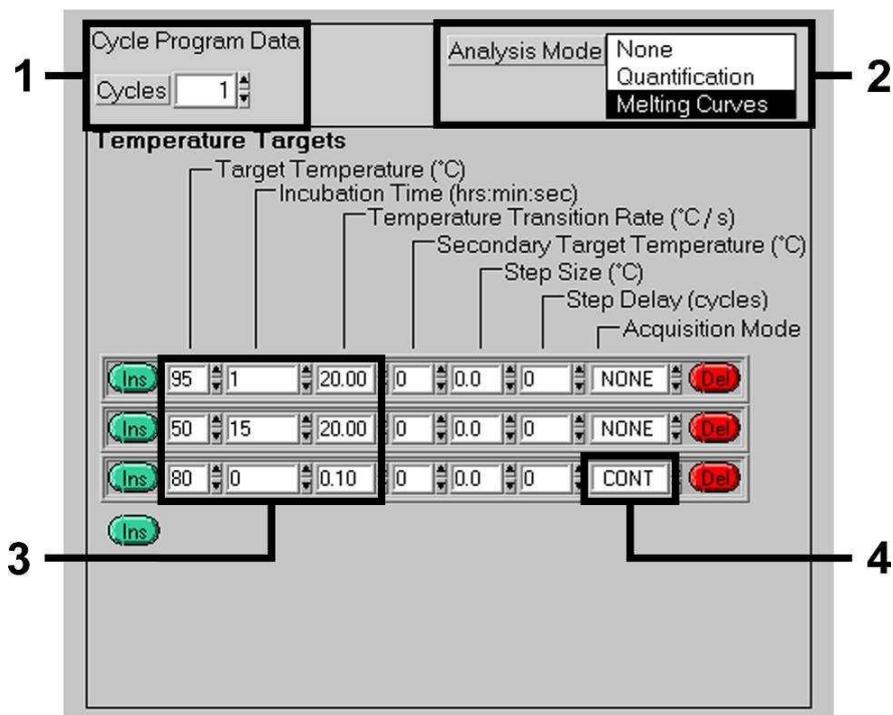


Fig. 6 : Courbe de fusion.

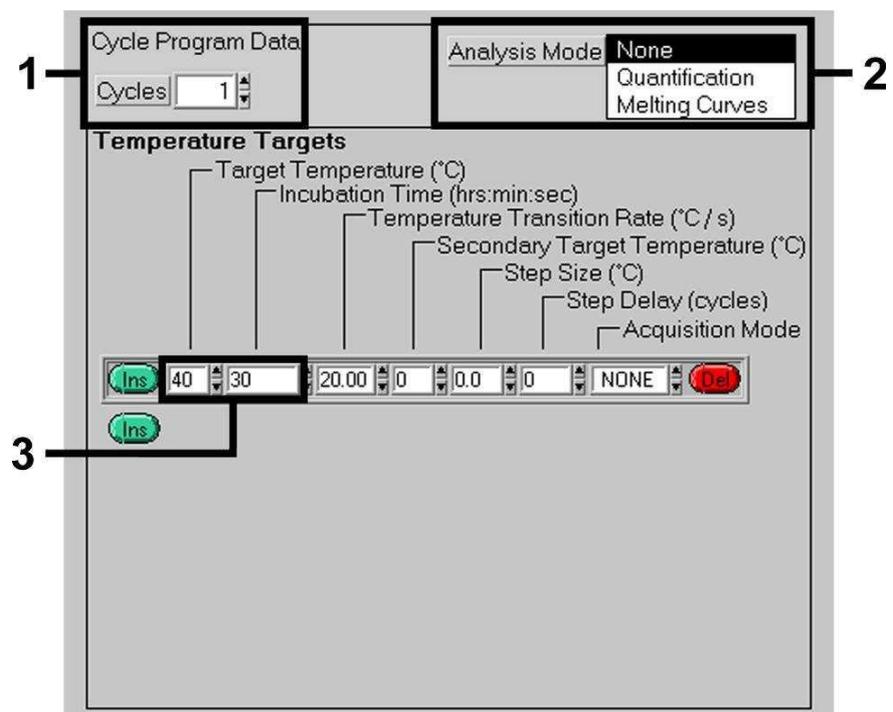


Fig. 7 : Refroidissement.

9. Interprétation

Lors d'analyses multi-couleurs, il peut y avoir des interférences entre les canaux de fluorimétrie. Le logiciel du système *LightCycler* comprend un fichier appelé *Color Compensation File* qui compense ces interférences. Ouvrir ce fichier avant, pendant ou à l'issue de la série de PCR, en activant l'onglet *Choose CCC File* ou *Select CC Data*. Si aucun fichier *Color Compensation File* n'est installé, créer le fichier en respectant les instructions du guide *LightCycler Operator's Manual*. Une fois le fichier *Color Compensation File* activé, des signaux apparaissent séparément dans les canaux de fluorimétrie F1, F2 et F3. Pour interpréter les résultats de la PCR obtenus avec l'*artus HSV-1/2 LC PCR Kit*, sélectionner les fonctions d'affichage F2/Back-F1 pour la PCR analytique d'HSV ou F3/Back-F1 pour la PCR du *Contrôle interne*. Pour interpréter les séries quantitatives, tenir impérativement compte du paragraphe **8.3 Quantification**, ainsi que de la note **Technical Note for Quantitation on the *LightCycler 1.1/1.2/1.5* or *LightCycler 2.0* Instrument** sur le site Internet : www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

Si plusieurs systèmes *Herpès artus* ont été intégrés à votre essai, bien s'assurer d'analyser les échantillons HSV avec leurs propres courbes d'étalonnage, indépendamment de tous les autres systèmes. Noter que les échantillons HSV-1 seront analysés avec la courbe d'étalonnage des standards correspondant à l'HSV-1 (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4*) et les échantillons HSV-2 avec la courbe d'étalonnage des standards correspondant à l'HSV-2 (*HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*).

Les résultats suivants peuvent se produire :

1. Un signal est détecté dans le canal de fluorimétrie F2/Back-F1.

Le résultat de l'analyse est positif : l'échantillon contient l'ADN d'HSV.

Le cas échéant, la détection d'un signal dans le canal F3/Back-F1 est négligeable, car de fortes concentrations initiales en ADN d'HSV (signal positif dans le canal F2/Back-F1) peuvent entraîner un signal fluorescent du *Contrôle interne* réduit, voire absent dans le canal F3/Back-F1 (inhibition par compétition).

La différenciation peut être effectuée à l'aide des points de fusion (canal F2/Back-F1, programme Melting Curve) de 69°C pour l'amplicon HSV-1 et de 66°C pour l'amplicon HSV-2. Selon les conditions d'extraction et l'emploi de différents tampons qui en résulte, il est possible d'obtenir des déviations de 1°- 2°C, qui se rapportent alors de façon équivalente aux amplicons HSV-1 et HSV-2.

2. Aucun signal n'est détecté dans le canal de fluorimétrie F2/Back-F1. Simultanément, un signal apparaît dans le canal F3/Back-F1 (signal du *Contrôle interne*).

Aucun ADN d'HSV ne peut être détecté dans l'échantillon. Il peut donc être considéré comme négatif.

En cas de PCR HSV négative, la détection du signal du *Contrôle interne* exclut toute possibilité d'inhibition de la PCR.

3. Aucun signal n'est détecté ni dans le canal F2/Back-F1 ni dans le canal F3/Back-F1.

Un diagnostic n'est pas possible.

Des remarques relatives aux sources d'erreur et à leur traitement figurent au chapitre 10. **Aide au dépannage.**

Des exemples de réactions PCR positives et négatives ainsi que d'une analyse de la courbe de fusion sont illustrés dans les Fig. 8 - 12.

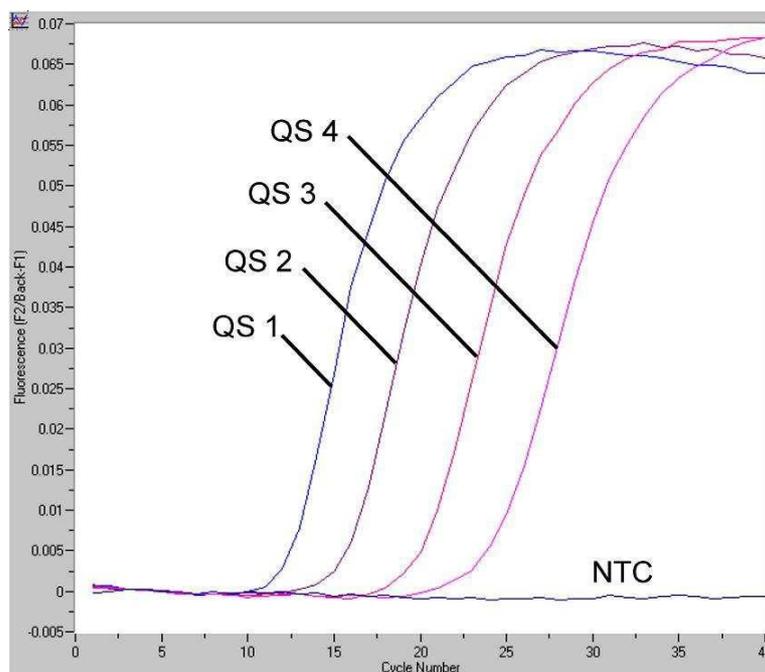


Fig. 8 : Détection des *Standards de quantification (HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4)* dans le canal de fluorimétrie F2/Back-F1. NTC : non-template control (contrôle négatif).

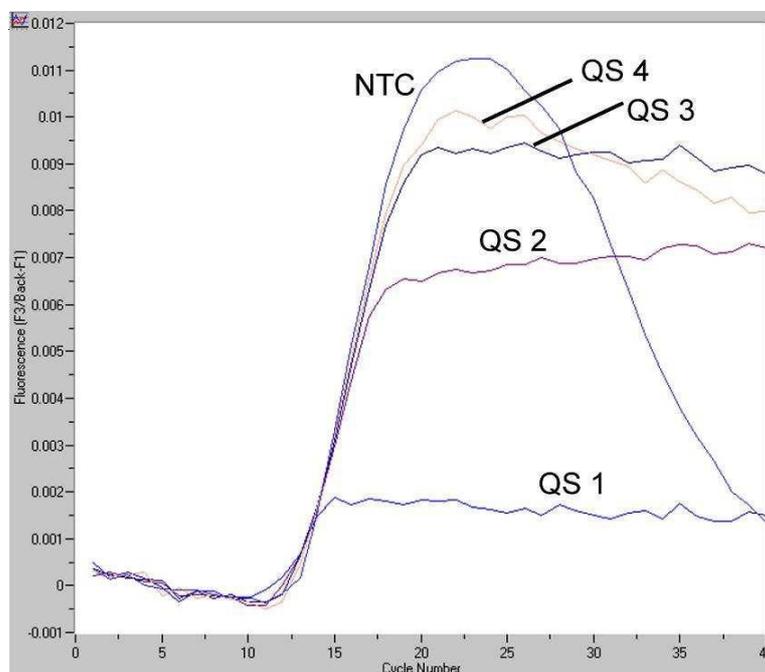


Fig. 9 : Détection du *Contrôle interne (IC)* dans le canal de fluorimétrie F3/Back-F1 lors de l'amplification simultanée des *Standards de quantification (HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4)*. NTC : non-template control (contrôle négatif).

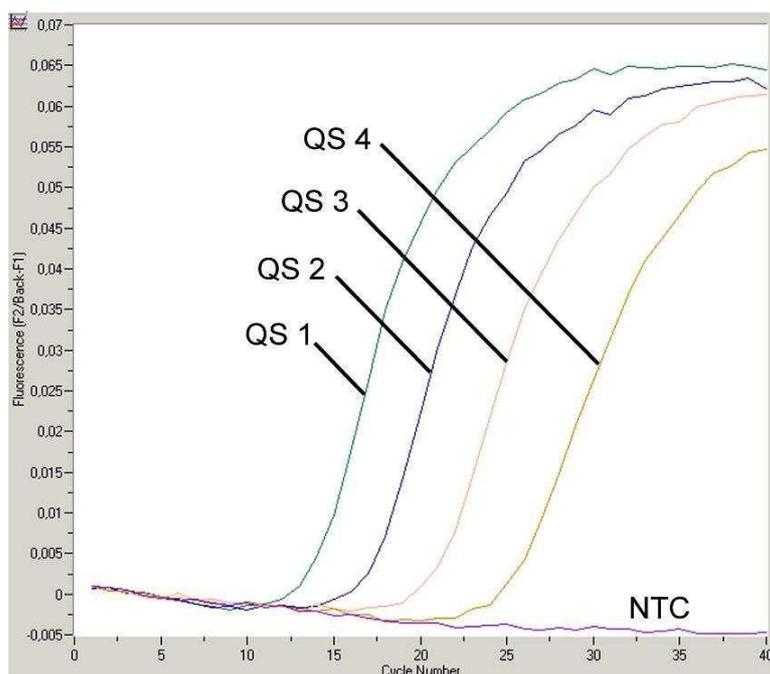


Fig. 10 : Détection des *Standards de quantification (HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4)* dans le canal de fluorimétrie F2/Back-F1. NTC : non-template control (contrôle négatif).

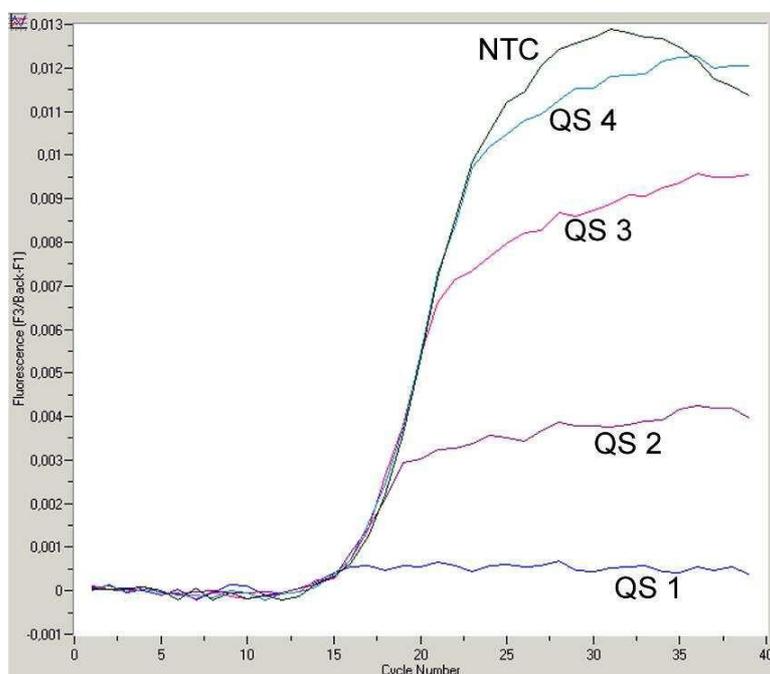


Fig. 11 : Détection du *Contrôle interne (IC)* dans le canal de fluorimétrie F3/Back-F1 lors de l'amplification simultanée des *Standards de quantification (HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4)*. NTC : non-template control (contrôle négatif).

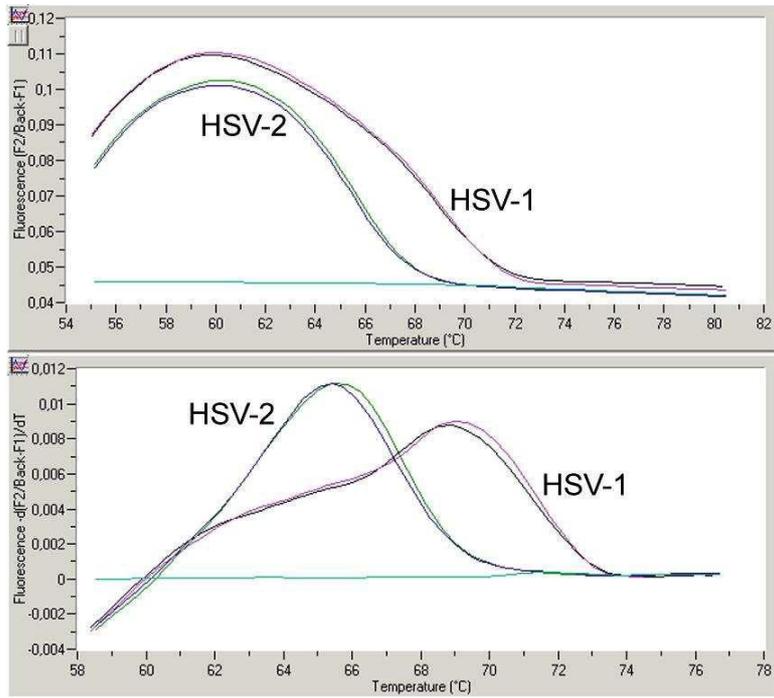


Fig. 12 : Différenciation entre HSV-1 et HSV-2 dans le canal de fluorimétrie F2/Back-F1 (Programm *Melting Curve*).

10. Aide au dépannage

Aucun signal pour les contrôles positifs (HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4) dans le canal de fluorimétrie F2/Back-F1 :

- La sélection du canal de fluorimétrie pour l'analyse des données PCR n'est pas conforme aux instructions du protocole.
→ Pour l'analyse des données, sélectionner le canal de fluorimétrie F2/Back-F1 pour la PCR analytique de l'HSV et le canal de fluorimétrie F3/Back-F1 pour la PCR du Contrôle interne.
- Il y a une erreur de programmation du thermocyclage du système *LightCycler*.
→ Comparer le profil de thermocyclage avec les instructions du protocole (voir **8.5 Programmation du système *LightCycler***).
- Il y a une erreur de composition de la réaction PCR.
→ Vérifier les étapes de pipetage à l'aide du schéma de pipetage (voir **8.4 Préparation de la PCR**) et si nécessaire, répéter la PCR.
- Les conditions de conservation d'un ou plusieurs composants du kit ne sont pas conformes aux directives précisées en **2. Conservation** ou la date de péremption de l'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit a été dépassée.
→ Vérifier aussi bien les conditions de conservation que la date de péremption des réactifs (voir l'étiquette du kit) et si nécessaire, employer un nouveau kit.

Signal faible ou absent du Contrôle interne dans le canal de fluorimétrie F3/Back-F1 et absence simultanée de signal dans le canal F2/Back-F1 :

- Les conditions de la PCR ne sont pas conformes au protocole.
→ Vérifier les conditions de la PCR (voir ci-dessus) et si nécessaire, répéter la PCR après correction des paramètres.
- Il y a eu inhibition de la PCR.
→ S'assurer que l'un des kits d'extraction recommandés (voir **8.1 Extraction de l'ADN**) est utilisé et respecter scrupuleusement les instructions du fabricant.
→ S'assurer que lors de l'extraction d'ADN, l'étape de centrifugation supplémentaire recommandée est effectuée avant l'élution pour

éliminer complètement les résidus d'éthanol (voir **8.1 Extraction de l'ADN**).

- Il y a eu perte d'ADN lors de l'extraction.
 - En cas d'addition du *Contrôle interne* à la procédure d'extraction, l'absence du signal du *Contrôle interne* peut signifier qu'il y a eu une perte d'ADN au cours de l'extraction. S'assurer que l'un des kits d'extraction recommandés (voir **8.1 Extraction de l'ADN**) est utilisé et respecter scrupuleusement les instructions du fabricant.
- Les conditions de conservation d'un ou plusieurs composants du kit ne sont pas conformes aux directives précisées en **2. Conservation** ou la date de péremption de l'*artus HSV-1/2 LC PCR Kit* a été dépassée.
 - Vérifier aussi bien les conditions de conservation que la date de péremption des réactifs (voir l'étiquette du kit) et si nécessaire, employer un nouveau kit.

Présence de signal des contrôles négatifs dans le canal de fluorimétrie F2/Back-F1 de la PCR analytique.

- Il y a eu contamination pendant la préparation de la PCR.
 - Répéter la PCR avec des réactifs encore non utilisés en double.
 - Lorsque c'est possible, fermer chacun des tubes PCR immédiatement après chaque ajout de l'échantillon à analyser.
 - Toujours pipeter le contrôle positif en dernier.
 - S'assurer que les surfaces de travail et les appareils sont décontaminés régulièrement.
- Il y a eu contamination lors de l'extraction.
 - Répéter la procédure d'extraction et la PCR des échantillons à analyser en utilisant des réactifs encore non utilisés.
 - S'assurer que les surfaces de travail et les appareils sont décontaminés régulièrement.

Pour toute autre question ou en cas de problèmes, merci de contacter notre service technique.

11. Spécifications

11.1 Sensibilité analytique

Pour déterminer la sensibilité analytique de l'artus HSV-1/2 LC PCR Kit, une série de dilutions d'un standard a été effectuée de 31,6 jusqu'à 0,01 équivalents copie d'HSV-1 ou HSV-2*/ μl nominal, puis analysée avec l'artus HSV-1/2 LC PCR Kit. Les essais ont été effectués sur trois jours différents à raison de huit séries par jour. Le résultat a été déterminé à l'aide d'une analyse probit, représentée graphiquement aux Fig. 13 et Fig. 14. La limite de détection de l'artus HSV-1/2 LC PCR Kit se situe donc à 1 copie/ μl ($p = 0,05$), autant pour HSV-1 que pour HSV-2. Ceci signifie que 1 copie/ μl peut être détectée avec une probabilité de 95 %.

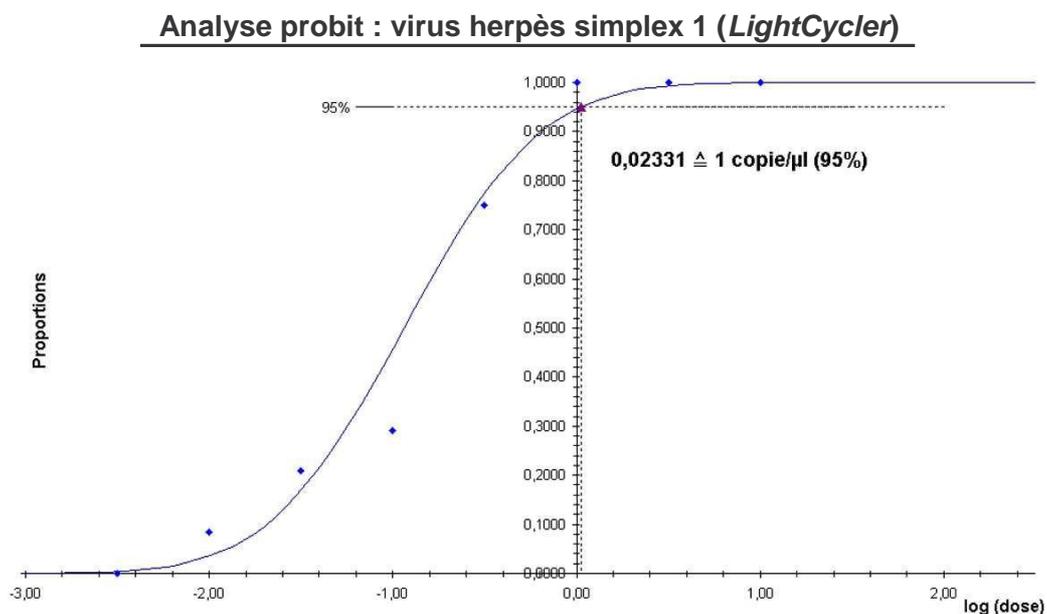


Fig. 13 : Sensibilité analytique de l'artus HSV-1/2 LC PCR Kit (HSV-1).

* Le standard utilisé ici est un produit de PCR cloné, dont la concentration a été déterminée par spectroscopie d'absorbance et de fluorescence.

Analyse probit : virus herpès simplex 2 (*LightCycler*)

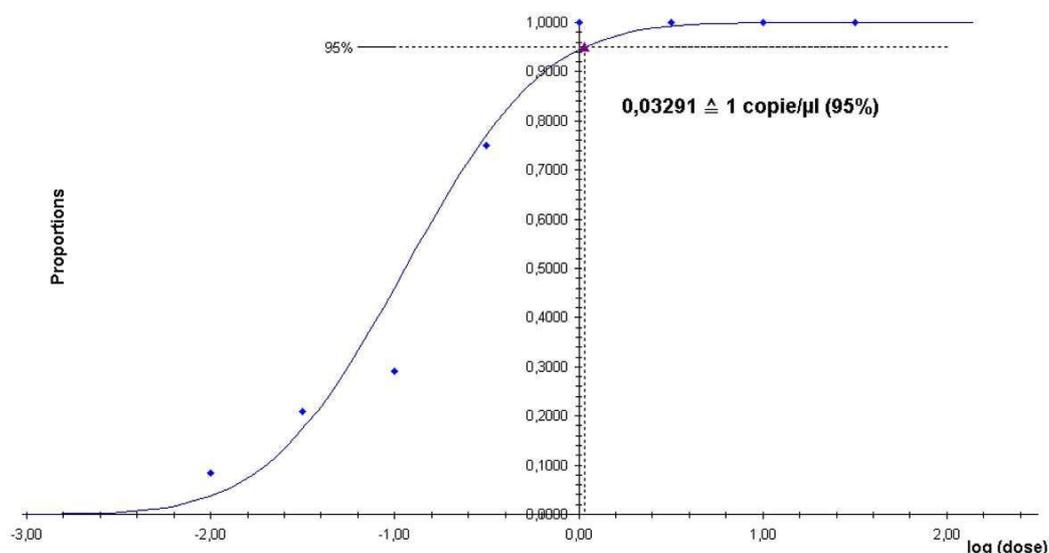


Fig. 14 : Sensibilité analytique e l'artus HSV-1/2 LC PCR Kit (HSV-2).

11.2 Spécificité

La spécificité de l'artus HSV-1/2 LC PCR Kit est garantie en premier lieu par la sélection des amorces et des sondes ainsi que des conditions de réaction des plus strictes. Une analyse par comparaison de séquences des amorces et des sondes a été effectuée afin de rechercher d'éventuelles homologues avec toutes les séquences représentées dans les banques génétiques. De cette façon, la détectabilité de toutes les souches importantes a également été garantie.

La validation de la spécificité a en outre été effectuée avec 30 échantillons différents de LCR, négatifs pour HSV, n'ayant généré aucun signal avec les amorces et les sondes spécifiques à l'HSV intégrées dans l'HSV LC Master.

Pour déterminer la spécificité de l'artus HSV-1/2 LC PCR Kit, le groupe contrôle indiqué dans le Tableau 1 a été analysé pour rechercher une éventuelle réaction croisée. Aucun des agents pathogènes analysés n'a été positif.

Tableau 1 : Test de spécificité du kit avec un pathogène éventuellement apte à une réaction croisée.

Groupe contrôle	HSV 1/2 (F2/Back-F1)	Contrôle interne (F3/Back-F1)
Herpesvirus humain 3 (virus de la varicella-zona)	-	+
Herpesvirus humain 4 (virus d'Epstein-Barr)	-	+
Herpesvirus humain 5 (cytomégalovirus)	-	+
Herpesvirus humain 6 A	-	+
Herpesvirus humain 6 B	-	+
Herpesvirus humain 7	-	+
Herpesvirus humain 8 (herpèsvirus associé au sarcome de Kaposi)	-	+

11.3 Précision

Les données de précision de l'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit permettent de déterminer la variance totale du système. Cette variance totale est composée de la **variabilité intra-essai** (variabilité des résultats obtenus avec des échantillons de même concentration au sein du même essai), de la **variabilité inter-essai** (variabilité des résultats générés par différents appareils de même type utilisés par différentes personnes à l'intérieur d'un laboratoire) et de la **variabilité inter-lot** (variabilité des différents lots utilisés). Pour ce faire, l'écart type, la variance et le coefficient de variation sont calculés respectivement aussi bien pour la PCR spécifique du pathogène que pour la PCR du *Contrôle interne*.

Pour l'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit, ces données ont été déterminées au moyen du *Standard de quantification* ayant la plus faible concentration (QS 4;

10 copies/ μ l). Les essais ont été effectués en huit séries. L'interprétation des résultats a été effectuée à partir des valeurs Ct des courbes d'amplification (Ct : threshold cycle, voir Tableau 2/Tableau 4) et des valeurs quantitatives exprimées en copies/ μ l qui en résultent (voir Tableau 3/Tableau 5). La variance totale d'un échantillon de concentration donnée est donc de 1,67 % (Ct, HSV-1) et de 1,95 % (Ct, HSV-2) ou 20,66 % (conc., HSV-1) et 22,42 % (conc., HSV-2) et pour la détection du *Contrôle interne*, de 1,23 % (Ct, HSV-1) et de 1,04 % (Ct, HSV-2).

Ces valeurs sont basées sur l'ensemble de chacune des valeurs des variabilités déterminées.

Tableau 2 : Données de précision pour HSV-1 à partir des valeurs Ct.

	Écart type	Variance	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai : <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,27	0,07	1,13
Variabilité intra-essai : <i>Contrôle interne</i>	0,03	0,00	0,23
Variabilité inter-essai : <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,39	0,15	1,66
Variabilité inter-essai : <i>Contrôle interne</i>	0,12	0,01	0,99
Variabilité inter-lot : <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,41	0,17	1,72
Variabilité inter-lot : <i>Contrôle interne</i>	0,17	0,03	1,40
Variance totale : <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,39	0,15	1,67
Variance totale : <i>Contrôle interne</i>	0,15	0,02	1,23

Tableau 3 : Données de précision pour HSV-1 à partir des valeurs quantitatives (en copies/ μ l).

	Écart type	Variance	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai : <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	1,76	3,08	17,34
Variabilité inter-essai : <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	2,02	4,08	19,82
Variabilité inter-lot : <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	2,37	5,64	23,10
Variance totale : <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	2,11	4,46	20,66

Tableau 4 : Données de précision pour HSV-2 à partir des valeurs Ct.

	Écart type	Variance	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai : <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,22	0,05	0,90
Variabilité intra-essai : <i>Contrôle interne</i>	0,04	0,00	0,33
Variabilité inter-essai : <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,62	0,38	2,51
Variabilité inter-essai : <i>Contrôle interne</i>	0,12	0,01	0,98
Variabilité inter-lot : <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,38	0,14	1,52
Variabilité inter-lot : <i>Contrôle interne</i>	0,14	0,02	1,12
Variance totale : <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,48	0,23	1,95
Variance totale : <i>Contrôle interne</i>	0,13	0,02	1,04

Tableau 5 : Données de précision pour HSV-2 à partir des valeurs quantitatives (en copies/ μ l).

	Écart type	Variance	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai : <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	1,39	1,94	13,82
Variabilité inter-essai : <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	2,86	8,20	27,46
Variabilité inter-lot : <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	1,96	3,85	19,27
Variance totale : <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	2,30	5,31	22,42

11.4 Robustesse

La vérification de la robustesse permet de déterminer le taux d'échec total de l'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit. Pour ce faire, 30 échantillons de LCR, négatifs pour HSV, ont chacun été mélangés à 3 copies/ μ l de volume d'élution d'ADN contrôle d'HSV-1 (à la concentration trois fois supérieure au seuil de sensibilité analytique), purifiés avec le QIAamp DNA Mini Kit (voir **8.1 Extraction de l'ADN**) et analysés avec l'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit. L'essai pour l'HSV-2 a été effectué selon la même procédure (30 échantillons de LCR, 3 copies/ μ l d'ADN contrôle d'HSV-2). Le taux d'échec était de 0 % pour la totalité des échantillons, autant pour HSV-1 que pour HSV-2. En outre, la robustesse du *Contrôle interne* a été vérifiée par la procédure d'extraction et par l'analyse des 30 échantillons de LCR négatifs pour HSV. Le taux d'échec total était de 0 %. Aucune inhibition n'a été observée. La robustesse de l'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit est donc ≥ 99 %.

11.5 Reproductibilité

Les données de reproductibilité sont fournies par le biais d'une participation à des essais inter-laboratoires dans le but de procéder à une évaluation régulière de la performance de l'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit ainsi qu'à une comparaison de performance avec d'autres produits.

11.6 Évaluation diagnostique

L'évaluation de l'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit est actuellement encore en cours dans le cadre de plusieurs études.

12. Remarques particulières concernant l'utilisation du produit

- Tous les réactifs doivent être utilisés exclusivement pour le diagnostic *in vitro*.
- L'utilisation est réservée aux personnes spécialement formées aux procédés de diagnostic *in vitro*.
- Le protocole doit impérativement être respecté scrupuleusement, afin d'optimiser les résultats PCR.
- Respecter les dates de péremption figurant sur l'emballage et les étiquettes de chacun des composants. Ne pas utiliser les réactifs dont la date de péremption est dépassée.

13. Informations de sécurité

Pour obtenir des informations relatives à la sécurité de l'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit, consulter la fiche de données de sécurité correspondante (safety data sheets, SDS), disponible sur notre site Internet www.qiagen.com/safety au format PDF, un format compact et convivial.

14. Contrôle qualité

En accord avec le système de gestion de la qualité de QIAGEN certifié ISO 9001 et ISO 13485, chaque lot de l'*artus* HSV-1/2 LC PCR Kit a été testé conformément aux spécifications prédéterminées afin d'assurer une qualité constante du produit.

15. Références bibliographiques

- (1) Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 - 212.
- (2) Whiley DM, Syrmis MW, Mackay IM, Sloots TP. Preliminary comparison of three *LightCycler* PCR assays for the detection of Herpes Simplex virus in swab specimens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22: 764 - 767.

16. Explication des symboles

	Utiliser jusqu'à
	Code du lot
	Fabricant
	Référence du catalogue
	Référence du matériel
	Manuel
	Dispositif medical de diagnostic in vitro
	Éthanol
	Code article international (GTIN)
 Σ	Kit contient des réactifs pour <N> tests
	Limites de température
QS	<i>Standard de quantification</i>
IC	<i>Contrôle interne</i>

artus HSV-1/2 LC PCR Kit

Marques et clause de non-responsabilité

QIAGEN®, QIAamp®, artus®, BioRobot®, EZ1®, UltraSens® (Groupe QIAGEN) ; LightCycler (Roche Diagnostics).

Les noms enregistrés, les marques déposées, etc. cités dans ce document ne peuvent être considérés comme juridiquement non-protégés, même si non identifiés comme tel.

L'artus HSV-1/2 LC PCR Kit, la BioRobot EZ1 DSP Workstation et les EZ1 DSP Virus Kit et Card sont des instruments et trousse diagnostiques conformes au marquage CE selon la directive européenne 98/79/CE sur les dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. Ces produits ne sont pas disponibles dans tous les pays.

Les trousse QIAamp ne sont prévues que pour un usage général en laboratoire. Les données ou les représentations du produit ne sont pas conçues dans le but de fournir des informations sur le diagnostic, la prévention ou le traitement d'une maladie.

L'acquisition des trousse PCR artus inclut une licence limitée à leur utilisation lors d'une amplification en chaîne par polymérase (PCR) dans les domaines du diagnostic in vitro human et vétérinaire en utilisant un thermocycleur, dont l'emploi pour une application automatisée de la PCR est couvert par des redevances forfaitaires payables à Applied Biosystems ou par acquisition d'un thermocycleur autorisé. Le procédé de PCR est protégé par les équivalents nationaux des brevets US no. 5.219.727 et 5.332.770 et 5.210.015 et 5.176.995 et 6.040.166 et 6.197.563 et 5.994.056 et 6.171.785 et 5.487.972 et 5.804.375 et 5.407.800 et 5.310.652 et 5.994.056 ;

Propriété de F. Hoffmann-La Roche Ltd.

© 2007-2015 QIAGEN, tous droits réservés.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

