

RealStar® HSV PCR Kit 1.0

11/2012



altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg
Germany

phone +49 40 548 06 76 - 0
fax +49 40 548 06 76 - 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com

always a drop ahead.

RealStar[®]

HSV PCR Kit 1.0

Pour utilisation avec

m2000rt (Abbott Diagnostics)

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)

VERSANT™ kPCR Molecular System AD (Siemens)

ABI Prism[®] 7500 SDS and 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)

LightCycler[®] 480 Instrument II (Roche)

Rotor-Gene™ 3000/6000 (Corbett Research)

Rotor-Gene Q5/6 plex Platform (QIAGEN)



Usage de diagnostic *in vitro*



Référence: 061013



96 tests



Conserver à -25°C ... -15°C



Novembre 2012



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstraße 12 • D-22767 Hamburg

Conten

1. Usage prévu	6
2. Composants du kit	6
3. Conservation	6
4. Matériels requis non fournis	7
5. Informations générales	8
6. Description du produit	8
7. Mises en garde et précautions	11
8. Mode d'emploi	12
8.1 Préparation de l'échantillon	12
8.2 Préparation du Mastermix	13
8.3 Préparation de la réaction	15
9. Programmation des instruments de PCR en temps réel	15
9.1 Paramètres	16
9.2 Traceurs de fluorescents (fluorophores)	16
9.3 Profil de température et acquisition des fluorophores	16
10. Analyse des données	17
10.1 Validité des tests de diagnostic	17
10.1.1 Validité des tests de diagnostic (qualitatif)	17
10.1.2 Invalidité des tests de diagnostic (qualitatif)	17
10.1.3 Validité des tests de diagnostic (quantitatif)	18
10.1.4 Invalidité des tests de diagnostic (quantitatif)	18
10.2 Interprétation des résultats	19

10.2.1 Analyse qualitative	19
10.2.2 Analyse quantitative	20
11. Evaluation des performances	21
11.1 Sensibilité analytique	21
11.2 Spécificité analytique	23
11.3 Gamme linéaire	25
11.4 Précision	27
11.5 Répétabilité	29
12. Limites et précautions	30
13. Contrôle de qualité	31
14. Assistance technique	31
15. Marques déposées et responsabilité	31
16. Explications des symboles	32

1. Usage prévu

Le kit RealStar® HSV PCR 1.0 est un test de diagnostic *in vitro*, basé sur la technologie PCR en temps réel, pour la détection et la quantification simultanées de l'ADN spécifique du virus herpes simplex de type 1 (HSV-1) et herpes simplex de type 2 (HSV-2).

2. Composants du kit

Couleur de couvercle	Bleu	Violet	Vert	Rouge	Orange	Blanc
Composants	Mastermix A	Mastermix B	Contrôle interne	HSV-1 Calibrateurs* (QS)	HSV-2 Calibrateurs* (QS)	Eau de qualité PCR
Nombre de flacons	8	8	1	4	4	1
Volume [µl/Vial]	60	180	1000	250	250	500

*Le kit RealStar® HSV PCR 1.0 contient quatre calibrateurs du HSV-1 (QS1-QS4) ainsi que quatre du HSV-2 (QS1-QS4).

3. Conservation

- Le kit RealStar® HSV PCR 1.0 est expédié sous carboglace. Les composants du kit doivent arriver congelés. Si un ou plusieurs composants ne sont pas congelés au moment de la réception, ou si l'un des tubes a été abîmé lors de la livraison, contacter Altona Diagnostics GmbH pour demander conseil.
- Tous les composants doivent être conservés à -20°C dès la livraison.

- Des cycles répétés de décongélation et de congélation des réactifs (plus de deux) doivent être évités car ils peuvent affecter les performances du dosage. Les réactifs doivent être séparés en aliquotes et congelés, si elles doivent être utilisés de façon intermittente.
- La conservation à +4°C ne doit pas excéder une durée de 2 heures.
- Protéger les Mastermix A et B de la lumière.

4. Matériels requis non fournis

- Instrument adapté à la PCR en temps réel (Chapitre 6: Description du produit)
- Système ou kit approprié à l'extraction des acides nucléiques
- Centrifugeuse de bureau avec rotor adapté à des tubes de 2 ml
- Centrifugeuse avec rotor pour plaques de microdosage, si vous utilisez des plaques de 96 puits de réaction
- Vortex
- Plaques de 96 puits de réaction ou tubes de réaction avec le matériel correspondant pour leur fermeture (optique)
- Pipettes (réglables)
- Cones de pipettes avec filtres (jetables)
- Gants non talqués (jetables)

NOTE

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

5. Informations générales

Les virus de l'herpes-simplex virus de type 1 et 2 (HSV-1 et HSV-2) sont membres de la famille Herpesviridae, et ainsi que le VZV sont classés dans la famille des alphaherpesviridae. Le HSV-1 et le HSV-2 ont un génome linéaire double brin d'environ 150 kpb. Les deux virus HSV-1 et HSV-2 partagent plus de 80% de nucléotides identiques dans leur région codant pour les protéines.

Les infections par le virus de l'herpès simplex se produisent partout dans le monde, sans qu'il y ait de saison particulière. Le virus est propagé par contact direct avec des sécrétions infectées. La prévalence des infections au HSV-1 augmente graduellement depuis l'enfance jusqu'à atteindre 80% et plus lors de la croissance. La prévalence du HSV-2 quant à elle reste basse jusqu'à l'adolescence. La plupart des infections primaires au HSV-1 sont acquises comme les infections subcliniques ou non reconnues. Les premières infections avec le HSV-2 sont classiquement des herpès génitaux. Une première infection par le HSV-1 ou le HSV-2 est suivie par l'établissement d'une phase de latence dans les ganglions de la racine dorsale. Périodiquement, le virus se réactive et se déplace par l'intermédiaire de l'axone jusqu'aux voies génitales ou buccales, ce qui induit une infection par le virus, et dans certains cas la formation de lésions. Bien que généralement asymptomatique, les infections par l'HSV peuvent causer un large spectre de manifestations cliniques, qui incluent des herpès buccaux, génitaux, des maux de tête et des herpès oculaires.

6. Description du produit

Le kit RealStar® HSV PCR 1.0 est un test de diagnostic *in vitro*, basé sur la technologie PCR en temps réel, pour la détection et la quantification de l'ADN spécifique de l'HSV-1 et de l'HSV-2. Le dosage 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 est basé sur la technologie de la PCR en temps réel, utilisant une réaction en chaîne par polymérase (PCR) pour l'amplification de séquences de cibles spéci-

fiques et les sondes cibles spécifiques pour la détection de l'ADN amplifié. Les sondes sont marquées avec un marqueur fluorescent et un quencher.

Les sondes spécifiques à l'ADN de l'HSV-1 sont marquées avec le fluorophore FAM tandis que les sondes spécifiques au HSV-2 sont marquées avec un fluorophore présentant les mêmes caractéristiques que le Cy5. La sonde spécifique au Contrôle interne (CI) est marquée avec le fluorophore JOE. L'utilisation de sondes spécifiques liées à des dyes distingués permet la détection en parallèle de l'ADN spécifique de HSV-1 et de HSV-2 et du contrôle interne dans les différents canaux correspondant de l'instrument de PCR en temps réel.

Le test consiste en deux procédures réalisées dans un même tube à essai:

- l'amplification par PCR de l'ADN cible et le Contrôle interne
- Détection simultanée des amplicons par des sondes marquées par fluorescence

Le kit RealStar® HSV PCR 1.0 a été développé et validé pour être utilisé avec les instruments de PCR suivants:

- m2000rt (Abbott Diagnostics)
- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT™ kPCR Molecular System AD (Siemens)
- ABI Prism® 7500 SDS and 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene™ 3000/6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene Q 5/6 plex Platform (QIAGEN)

Le kit RealStar® HSV PCR 1.0 est composé de:

- Deux Mastermix: (Mastermix A et Mastermix B)
- Modèle de Contrôle interne (CI)
- Quatre calibrateurs (QS1-QS4) spécifiques du HSV-1
- Quatre calibrateurs (QS1-QS4) spécifiques du HSV-2
- Eau de qualité PCR

Les réactifs du Mastermix A et du Mastermix B contiennent tous les composants (tampon, enzyme, amorces, sondes) nécessaires à la réalisation de l'amplification par PCR, à la détection spécifique de l'ADN de HSV-1 et de HSV-2 ainsi que le contrôle interne, le tout en une seule mise en place de réaction.

Les calibrateurs contiennent des concentrations standardisées d'ADN spécifique de HSV-1 et de HSV-2. virus specific DNA. Par conséquent les calibrateurs peuvent être utilisés individuellement comme des contrôles positifs ou bien tous ensemble pour réaliser une **courbe étalon**, si la quantification de HSV-1 et/ou du HSV-2 dans l'échantillon le requiert.

Les concentrations suivantes sont utilisées:

Calibrateurs	Concentration [copies/μl]
QS1	1.00E+04
QS2	1.00E+03
QS3	1.00E+02
QS4	1.00E+01

7. Mises en garde et précautions

- L'utilisation de ce produit est limitée au personnel qualifié et formé pour les techniques de PCR en temps réel et aux procédures de diagnostic *in vitro*.
- Les échantillons doivent être manipulés 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 ADN/ARN) de l'échantillon et des composants du kit.
- Toujours utiliser avec les aérosols des cônes de pipettes jetables non contaminés par l'ADNase et l'ARNase.
- Toujours porter des gants de protection non talqués lors de la manipulation des composants des kits.
- Utiliser des aires de travail séparées les unes des autres pour (i) la préparation des échantillons, (ii) la préparation de la réaction et (iii) l'amplification et la détection de l'activité. Le flux de travail dans le laboratoire doit être unidirectionnel. Porter des gants dans chaque aire de travail et les changer avant d'entrer dans une aire différente.
- Consacrer les fournitures et le matériel aux différentes aires de travail et ne pas les déplacer d'une aire à une autre.
- Conserver le matériel positif ou bien potentielle positif séparé des autres composants du kit.
- Ne pas ouvrir les tubes/plaques de réaction après l'amplification afin d'éviter les contaminations avec les amplicons.
- Des contrôles additionnels doivent être faits en accord avec les lignes directrices, aux exigences locales ou gouvernementales ou des organismes d'accréditation.
- Ne pas utiliser des composants au delà de leur date d'expiration.
- Éliminer les échantillons et les déchets d'essai selon la réglementation de sécurité locales.

8. Mode d'emploi

8.1 Préparation de l'échantillon

L'ADN extrait est le matériel de départ pour le kit RealStar® HSV PCR 1.0. La qualité de l'ADN extrait a un impact important sur la performance de l'intégralité 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 systèmes d'extraction nucléiques et les kits suivants sont recommandés:

- VERSANT™ Molecular System SP (Siemens)
- HighPure® Viral Nucleic Acid Kit (Roche)
- QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN)

Si pour la préparation des échantillons vous utilisez une colonne comportant des tampons de lavage avec de l'éthanol, une étape de centrifugation supplémentaire de 10 minutes à environ 17000 x g (~ 13000 rpm), en utilisant un nouveau tube à essai, est recommandé avant l'élution des acides nucléiques.

NOTE

⚠ L'utilisation d'ARN porteur est crucial pour l'efficacité de l'extraction et la stabilité de l'acide nucléique extrait.

⚠ L'éthanol est un fort inhibiteur de la PCR en temps réel. Si votre système de préparation de l'échantillon utilise des tampons de lavage contenant de l'éthanol, assurez vous d'éliminer toutes les traces d'éthanol avant de procéder à l'élution de l'acide nucléique.

Pour de plus amples informations ou un support technique concernant le pré-traitement et la préparation des échantillons, merci de contacter notre support technique:

e-mail: support@altona-diagnostics.com
téléphone: +49-(0)40-5480676-0

8.2 Préparation du Mastermix

Tous les réactifs doivent être complètement décongelés, homogénéisés (à la pipette ou vortexés doucement) et brièvement centrifugés avant leur utilisation.

Le kit RealStar® HSV PCR 1.0 contient un contrôle interne hétérologue, peut être utilisé aussi bien comme un contrôle d'inhibition de la PCR ou comme un contrôle lors de la préparation de l'échantillon (extraction de l'acide nucléique) et aussi comme un contrôle de l'inhibition de la PCR.

- Si le contrôle interne est utilisé comme un contrôle d'inhibition de la PCR, mais pas comme un contrôle lors de la procédure de préparation de l'échantillon, alors le Mastermix doit être préparé comme décrit par le schéma de pipetage ci dessous:

Nombre de réactions (rxns)	1	12
Mastermix A	5 µl	60 µl
Mastermix B	15 µl	180 µl
Contrôle interne	1 µl	12 µl
Volume Mastermix	21 µl	252 µl

- Si le contrôle interne est utilisé comme un contrôle lors de la procédure de préparation de l'échantillon et comme un contrôle d'inhibition de la PCR, le contrôle interne doit être ajouté au moment de la procédure d'extraction de l'acide nucléique.
- Peu importe la méthode ou le système utilisé pour l'extraction de l'acide nucléique, le contrôle interne **ne doit pas** être ajouté directement à l'échantillon. Le CI doit toujours être ajouté au mélange échantillon/tampon de lyse. Le volume de CI à ajouter dépend toujours et uniquement du volume d'élution. Il représente 10 % du volume d'élution. Par exemple si l'acide nucléique va être élué dans 60 µl de tampon d'élution ou de tampon, 6 µl de CI par échantillon doivent être ajoutés au mélange échantillon/tampon de lyse.

NOTE

⚠ Ne jamais ajouter le Contrôle Interne directement avec l'échantillon!

- Si le CI 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
Mastermix A	5 µl	60 µl
Mastermix B	15 µl	180 µl
Volume Mastermix	20 µl	240 µl

8.3 Préparation de la réaction

- Pipeter 20 µl de Mastermix dans chacun des puits nécessaires de la plaque 96 puit ou d'un tube à essai permettant les réactions optiques.
- Ajouter 10 µl de l'échantillon (élué à partir de l'extraction d'acide nucléique) ou 10 µl des contrôles (contrôle positif ou négatif).
- Assurez vous qu'il y a au moins un contrôle positif et un négatif par essai.
- Pour une détermination quantitative, tous les calibrateurs (QS1 à to QS4) doivent être utilisés.
- Homogénéiser avec soin les échantillons et les contrôles avec le Mastermix en pipétant.
- Couvrir la plaque de 96 puits avec un film adhésif opaque approprié et les tubes à essai avec un couvercle approprié.
- Centrifuger les plaque de 96 puits avec un rotor à microplaque pendant 30 secondes à environ 1000 x g (~ 3000 rpm).

Préparation de la réaction

Mastermix	20 µl
Echantillon ou contrôle	10 µl
Volume total	30 µl

9. Programmation des instruments de PCR en temps réel

Pour des informations basiques concernant l'installation et la programmation des différents instruments de PCR en temps réel, merci de vous référer au manuel d'utilisation des différents instruments. Pour des instructions de programmation détaillées concernant l'utilisation du kit RealStar® HSV PCR 1.0 sur un instrument de PCR en temps réel spécifique, merci de contacter notre support technique.

9.1 Paramètres

- Définir les paramètres suivants:

Paramètres	
Volume de réaction	30 µl
Taux de rampe	par défaut
Référence passive	ROX

9.2 Traçeurs de fluorescents (fluorophores)

- Définir les traçeurs fluorescents (fluorophores):

Détection	Nom de traçeur	Reporteur	Quencher
ADN spécifique HSV-1	HSV-1	FAM	(rien)
ADN spécifique HSV-2	HSV-2	Cy5	(rien)
Contrôle interne (CI)	CI	JOE	(rien)

9.3 Profil de température et acquisition des fluorophores

- Définir le profil de température et l'acquisition des fluorophores:

	Etape	Nombre cycles	Aquisition	Température	Durée
Dénaturation	Tenu	1	-	95 °C	10:00 min
Amplification	Cyclique	45	-	95 °C	0:15 min
			√	58 °C	1:00 min

10. Analyse des données

Pour des informations basiques concernant l'analyse des données sur des instruments spécifiques de PCR en temps réel, merci de se référer au manuel concerné. Pour des informations détaillées concernant l'analyse des données avec le kit RealStar® HSV PCR 1.0 sur différents instruments de PCR en temps réel, merci de contacter notre support technique.

10.1 Validité des tests de diagnostic

10.1.1 Validité des tests de diagnostic (qualitatif)

Pour un test de diagnostic **valide (qualitatif)**, les valeurs suivantes des contrôles doivent être respectés:

Nom du Contrôle	Canal de détection FAM	Canal de détection Cy5	Canal de détection JOE
Contrôle positif HSV-1	POSITIF	NEGATIF	POSITIF
Contrôle positif HSV-2	NEGATIF	POSITIF	POSITIF
Contrôle négatif	NEGATIF	NEGATIF	POSITIF

10.1.2 Invalidité des tests de diagnostic (qualitatif)

Un test de diagnostic **qualitatif** est **invalide**, (i) si l'essai n'a pas été réalisé complètement ou (ii) si l'une des conditions de contrôle pour l'un des tests de validité du test de diagnostic n'est pas respecté.

En cas de test de diagnostic **invalide**, répéter le test en utilisant les acides nucléiques purifiés restants ou recommencer avec l'échantillon de départ.

10.1.3 Validité des tests de diagnostic (quantitatif)

Pour la **validité quantitative** des tests de diagnostic, toutes les conditions de contrôle doivent être respectées [Chapitre 10.1.1: Validité des tests de diagnostic (qualitatif)]. De plus, pour des résultats quantitatifs précis, il est nécessaire de s'assurer de la validité de la **courbe étalon** générée. Pour un test de diagnostic quantitatif valide, les paramètres de contrôles suivants doit être obtenue:

Paramètres de contrôle	Valeur valide
Pente	- 3.00 / - 3.74
Efficacité de la PCR	85 % / 115 %
R square (R ²)	> 0.98

NOTE

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

10.1.4 Invalidité des tests de diagnostic (quantitatif)

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

En cas d'**invalidité** du test de diagnostic, répéter le test avec l'acide nucléique purifié restant ou bien en recommençant avec l'échantillon de départ.

10.2 Interprétation des résultats

10.2.1 Analyse qualitative

No. de échantillon	Canal de détection FAM	Canal de détection Cy5	Canal de détection JOE	Interprétation résultats
A	POSITIF	NEGATIF	POSITIF*	ADN spécifique de HSV-1 détecté.
B	NEGATIF	POSITIF	POSITIF*	ADN spécifique de HSV-2 détecté.
C	NEGATIF	NEGATIF	POSITIF	Pas d'ADN de HSV-1 ou de HSV-2 détecté. L'échantillon ne contient pas de quantité détectable de ces ADN spécifiques.
D	NEGATIF	NEGATIF	NEGATIF	Inhibition ou échec de la réactif. Répéter le test à partir de l'échantillon original ou bien en prélever un nouveau.

* La détection du contrôle interne dans la chaîne de détection JOE n'est pas requise, ni celle des résultats positifs dans la chaîne de détection FAM ou dans la Cy5. De fortes charges en HSV-1 ou en HSV-2 dans l'échantillon peut conduire à des signaux réduits ou absents du contrôle interne.

10.2.2 Analyse quantitative

Le kit RealStar® HSV PCR 1.0 fournit quatre calibrateurs (QS) pour le HSV-1 et quatre autres pour le HSV-2. Afin de générer une courbe étalon pour les analyses quantitatives, les QS doivent être définis comme des standards avec des concentrations appropriées (chapitre 6 : description du produit). En utilisant ces étalons, la charge en HSV peut être déterminée.

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

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

A partir de la courbe étalon, la concentration des échantillons inconnus peut être déterminée.

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

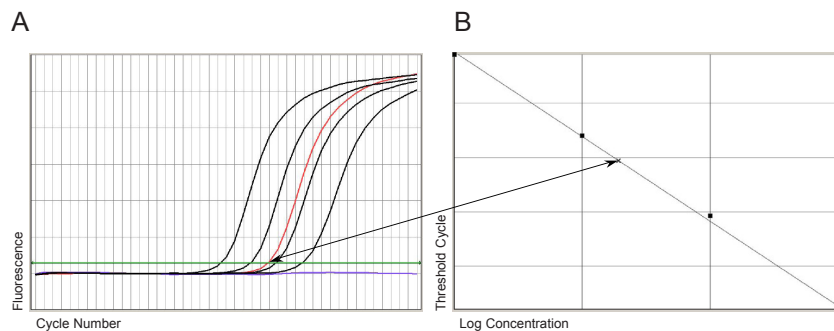


Figure 1: Les calibrateurs (noirs), un échantillon positif (rouge) et négatif (bleu) sont affichés dans l'écran d'amplification (A) et l'analyse de la courbe étalon (B).

NOTE

! La concentration de „l'échantillon“ est affichée en copies/ μ l et se réfère la concentration dans l'éluat.

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

$$\text{Charge Virale (échantillon) [copies/ml]} = \frac{\text{Volume (Eluate) } [\mu\text{l}] \times \text{Charge viral (Eluate) [copies}/\mu\text{l}]}{\text{Quantité d'échantillon [ml]}}$$

11. Evaluation des performances

Etant donné qu'il n'y a pas d'étalons internationaux disponibles pour HSV-1 et/ou HSV-2, l'évaluation des performances du kit RealStar® HSV PCR 1.0 a été effectuée en utilisant de l'ADN spécifique d'HSV-1 (ATCC® Numéro:VR-1493) et d'HSV-2 (ATCC® Numéro:VR-540)].

11.1 Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du kit RealStar® HSV PCR 1.0 est définie comme étant la concentration (copies par μ l d'éluat) de molécules d'ADN spécifique du virus HSV-1 ou HSV-2 qui peuvent être détectées avec un taux supérieur à $\geq 95\%$. La sensibilité analytique a été déterminée en analysant les dilutions en série d'ADN quantifié de d'HSV-1 et d'HSV-2.

Table 1: Résultats de PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique du système spécifique au HSV-1 du kit RealStar® HSV PCR 1.0

[C] initiale [copies/μl]	Nombre de cycles	Nombre de positifs	Taux de succes [%]
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

Table 2: Résultats de PCR pour le calcul de la sensibilité analytique du système spécifique au HSV-2 du kit RealStar® HSV PCR 1.0

[C] initiale [copies/μl]	Nombre de cycles	Nombre de positifs	Taux de succes [%]
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 RealStar® HSV PCR 1.0 déterminée par analyse Probit pour l'HSV-1 est 0.33 copies/μl d'éluat [intervalle de confiance à 95% (CI): 0.16 – 1.3 copies/μl] et pour la détection de l'ADN spécifique d'HSV-2 à 1.2 copies/μl éluat [intervalle de confiance à 95% (CI): 0.7–3.5 copies/μl].

11.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du kit RealStar® HSV PCR 1.0 est assurée par la sélection approfondie des oligonucléotides (amorces et sondes). Les oligo nucléotides sont vérifiés par comparaison de leur séquence avec les séquences publiques disponibles pour s'assurer que toutes les souches intéressantes de HSV seront détectées.

La spécificité analytique du kit RealStar® HSV PCR 1.0 a été évaluée en testant un panel d'ADN/ARN génomique extrait d'autres virus de l'herpès ou d'autres pathogènes significatifs chez les patients immunodéprimés.

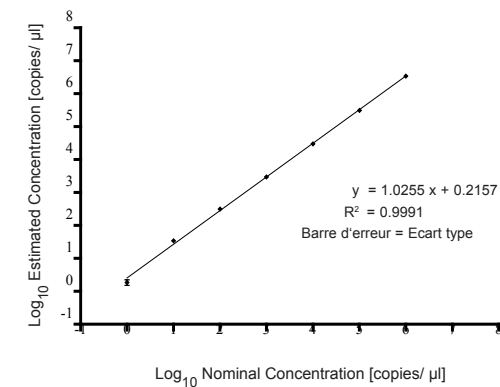
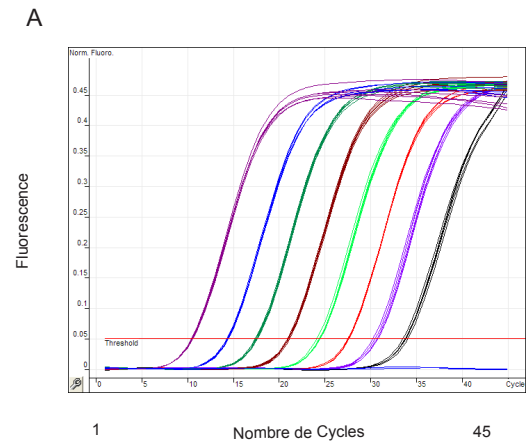
Table 3: Les organismes testés afin de démontrer la spécificité analytique du kit RealStar® HSV PCR 1.0

Organismes	RealStar® HSV PCR Kit 1.0		
	Canal FAM (HSV-1)	Canal Cy5 (HSV-2)	Canal JOE (CI)
Herpes Simplex Virus 1	Positif	Negatif	Valide
Herpes Simplex Virus 2	Negatif	Positif	Valide
Varicella Zoster Virus	Negatif	Negatif	Valide
Epstein-Barr Virus	Negatif	Negatif	Valide
Cytomegalovirus	Negatif	Negatif	Valide
Human Herpesvirus 6	Negatif	Negatif	Valide
Human Herpesvirus 7	Negatif	Negatif	Valide
Human Herpesvirus 8	Negatif	Negatif	Valide
BK Virus	Negatif	Negatif	Valide
JC Virus	Negatif	Negatif	Valide
Parvovirus B19	Negatif	Negatif	Valide
Hepatitis B Virus	Negatif	Negatif	Valide
Hepatitis C Virus	Negatif	Negatif	Valide
Human Immunodeficiency Virus 1	Negatif	Negatif	Valide

Le kit RealStar® HSV PCR 1.0 n'a présenté aucune réaction croisée avec des organismes spécifiés ci dessus.

11.3 Gamme linéaire

La gamme linéaire du kit RealStar® HSV PCR 1.0 a été évaluée en analysant une dilution en série logarithmique d'ADN spécifique d'HSV1 et d'HSV2 à partir de concentrations allant de 1E+08 à 1E+01 copies/µl (HSV-1) et de 1E+07 à 1E+01 copies/µl (HSV-2). Au moins six réplicats ont été analysés par dilution.



B

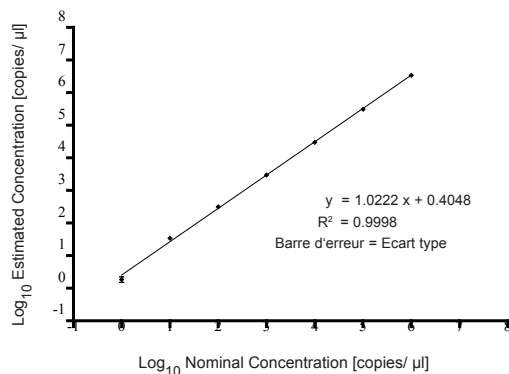
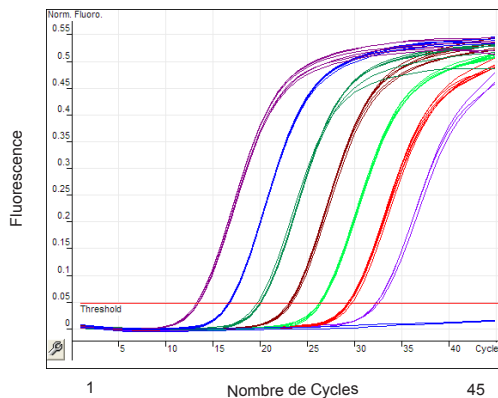


Figure 2: Courbes d'amplification et régressions linéaires des dilutions en série analysées de l'ADN spécifique d'HSV1 [A] et d'HSV2 [B].

La gamme linéaire du kit RealStar® HSV PCR 1.0 s'étend sur un intervalle d'au moins **huit** ordres de grandeur pour l'ADN spécifique d'HSV-1 et sur **sept** ordres de grandeur pour l'ADN spécifique d'HSV-2.

11.4 Précision

Les données de précision pour le kit RealStar® HSV PCR 1.0 ont été déterminées comme la variabilité intra dosage (variabilité à l'intérieur d'un seul essai), la variabilité inter dosage (variabilité entre différents essais) et la variabilité inter lot (variabilité entre des lots de productions différentes).

La variabilité des données est exprimée en terme d'écart type, de variance et de coefficient de variation. Les données sont basées sur l'analyse quantitative des concentrations définies d'ADN spécifique de HSV-1-, et de HSV-2 et sur la valeur seuil du cycle (Ct) en terme de contrôle interne. Au moins six répétitions par échantillon ont été analysées pour la variabilité intra dosage, inter dosage et inter lot. La variance totale a été calculée en combinant les trois analyses.

Table 4: Précision des données pour le système spécifique HSV-1 du kit RealStar® HSV PCR 1.0

Système spécifique HSV	[C] moyenne (copies/µl)	Ecart type	Variance	Coefficient de Variation (%)
Variabilité Intra-dosage	91	5.3	29	5.9
	8.8	1.5	2.2	16.7
Variabilité Inter-dosage	94.2	5.3	29.3	5.7
	8.9	1.2	1.4	13.1
Variabilité Inter-Lot	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

Table 5: Précision des données du contrôle interne pour le système spécifique au HSV-1 du kit RealStar® HSV PCR 1.0 (C_t-values)

Contrôle interne	Cycle seuil moyen (C _t)	Ecart type	Variance	Coefficient de Variation (%)
Variabilité Intra-dosage	23.0	0.05	0.003	0.23
Variabilité Inter-dosage	22.9	0.12	0.01	0.51
Variabilité Inter-Lot	23.5	0.61	0.37	2.6
Variance totale	23.3	0.61	0.37	2.6

Table 6: Précision des données pour le système spécifique HSV-2 du kit RealStar® HSV PCR 1.0

Système spécifique HSV	[C] moyenne (copies/μl)	Ecart type	Variance	Coefficient de Variation (%)
Variabilité Intra-dosage	108	5.9	35	5.5
	9.8	1.8	3.4	18.0
Variabilité Inter-dosage	99.2	9.4	87.7	9.4
	10	2.0	4.15	20.4
Variabilité Inter-Lot	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

Table 7: Précision des données du contrôle interne pour le système spécifique au HSV-2 du kit RealStar® HSV PCR 1.0 (C_t-values)

Contrôle interne	Cycle seuil moyen (C _t)	Ecart type	Variance	Coefficient de Variation (%)
Variabilité Intra-dosage	24.0	0.1	0.004	0.43
Variabilité Inter-dosage	23.8	0.3	0.13	1.27
Variabilité Inter-Lot	24.0	0.14	0.02	0.59
Variance totale	23.9	0.25	0.06	1.03

11.5 Répétabilité

La spécificité et la sensibilité du kit RealStar® HSV PCR 1.0 ont été évaluées en analysant des panels compétents établis pour le HSV-1 and HSV-2. Afin de s'assurer de la répétabilité du kit RealStar® HSV PCR 1.0, la spécificité et la sensibilité sont évaluées en analysant des panels compétente ainsi que des échantillons de diagnostic analysées sur une base régulière.

12. Limites et précautions

- 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 assurer la performance du dosage. Une attention particulière doit être donnée à la préparation des échantillons afin de préserver la pureté des composants du kit. Tous les réactifs doivent être minutieusement suivis afin d'éviter les impuretés et les contaminations. Le moindre réactif douteux doit être écarté.
- Il est nécessaire de respecter les procédures de prélèvement de l'échantillon, de transport et de conservation afin d'assurer les performances optimales du test.
- Ce dosage n'est pas destiné à être réalisé directement sur l'échantillon. L'extraction des acides nucléiques doit avoir été réalisée au préalable.
- La présence des inhibiteurs de PCR peut être une cause de faux négatifs ou de résultats erronés.
- De potentielles mutations dans les régions du génome du HSV-1 et/ou HSV-2 couvertes par les amorces et/ou les sondes peuvent conduire à de mauvais résultats pour la détection du virus.
- Comme avec tous les tests de diagnostic, les résultats du kit RealStar® HSV PCR 1.0 doivent être interprétés en prenant en considération tous les symptômes cliniques.

13. Contrôle de qualité

D'après le système de management de la qualité d'Altona Diagnostics GmbH selon ISO EN 13485, chaque lot du kit RealStar® HSV PCR 1.0 est testé selon les spécifications prédéfinies afin d'assurer la qualité constante du produit.

14. Assistance technique

Pour le support client, merci de contacter notre support technique:

e-mail: support@altona-diagnostics.com
téléphone: +49-(0)40-5480676-0

15. Marques déposées et responsabilité

RealStar® (Altona Diagnostics GmbH); Mx 3005P™ (Stratagene); ABI Prism® (Applied Biosystems); HighPure®, LightCycler® (Roche); Rotor-Gene™, QIAamp® (QIAGEN); VERSANT™ (Siemens).

Les noms déposés, les marques déposées, etc. utilisées dans ce document, même si ils ne sont pas spécifiés comme tels ne doivent pas être considérées comme non protégées par la loi.

Le kit RealStar® HSV PCR 1.0 est un test de diagnostic *in vitro*, marqué CE, en accord avec la Directive européenne 98/79/EC.

N'est pas disponible dans tous les pays.

© 2012 Altona Diagnostics GmbH; tous droits réservés.

16. Explications des symboles



Dispositif medical de diagnostic *in vitro*



Référence produit



Numéro de lot



Contient le nombre suffisant pour réaliser „n“ tests (rxns)



Limites de température



Version



Utiliser avant



Attention



Se reporter au manuel d'utilisation



Fabricant

NOTES