

Manuel du kit *artus*[®] CMV LC PCR

 24 (référence 4503063)

 96 (référence 4503065)

Diagnostics in vitro quantitatifs

Pour une utilisation avec les appareils

LightCycler[®] 1.1/1.2/1.5 et *LightCycler* 2.0

Décembre 2014 — Version 1



4503063, 4503065



1046903FR



QIAGEN GmbH, QIAGEN Straße 1, 40724 Hilden, ALLEMAGNE

R4

MAT

1046903FR



QIAGEN Sample and Assay Technologies

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 ;
- analyse d'acides nucléiques et de protéines ;
- recherche de microARN 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, visitez le site www.qiagen.com.

Table des matières

1. Contenu	5
2. Conservation	5
3. Matériel nécessaire et non fourni	6
4. Précautions générales	6
5. Informations sur l'agent pathogène	7
6. Principe de la PCR en temps réel	7
7. Description du produit	7
8. Protocole	9
8.1 Pré-analytique : Prélèvement, stockage et transport des échantillons	9
8.1.1 Prélèvement des échantillons	10
8.1.2 Conservation des échantillons	10
8.1.3 Transport des échantillons.....	10
8.1.4 Substances interférentes	11
8.2 Extraction de l'ADN.....	11
8.3 Contrôle interne	12
8.4 Quantification.....	14
8.5 Préparation de la PCR.....	15
8.6 Programmation des appareils <i>LightCycler</i>	21
8.6.1 Programmation de l'appareil <i>LightCycler 1.1/1.2/1.5</i>	21
8.6.2 Programmation de l'appareil <i>LightCycler 2.0</i>	25
9. Analyse des données	29
9.1 Analyse des données de PCR sur l'appareil <i>LightCycler 1.1/1.2/1.5</i>	29
9.2 Analyse des données de PCR sur l'appareil <i>LightCycler 2.0</i>	33

10. Résolution des principaux problèmes rencontrés	38
11. Spécifications	40
11.1 Sensibilité analytique	40
11.2 Spécificité	44
11.3 Précision.....	45
11.4 Fiabilité	47
11.5 Reproductibilité.....	47
11.6 Évaluation diagnostique.....	48
12. Limites d'utilisation.....	49
13. Informations de sécurité.....	49
14. Contrôle qualité	49
15. Références	49
16. Symboles.....	51

Kit *artus* CMV LC PCR

Pour une utilisation avec l'appareil *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ou *LightCycler 2.0* pour une détection quantitative de l'ADN du CMV à partir de plasma sur EDTA.

1. Contenu

	Étiquettes et contenu	Référence 4503063 24 réactions	Référence 4503065 96 réactions
Bleu	<i>CMV LC Master</i>	2 x 12 réactions	8 x 12 réactions
Jaune	<i>CMV Mg-Sol^a</i>	1 x 600 µl	1 x 600 µl
Rouge	<i>CMV QS 1^a</i> <i>1 x 10⁴ copies/µl</i>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rouge	<i>CMV QS 2^a</i> <i>1 x 10³ copies/µl</i>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rouge	<i>CMV QS 3^a</i> <i>1 x 10² copies/µl</i>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rouge	<i>CMV QS 4^a</i> <i>1 x 10¹ copies/µl</i>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Vert	<i>CMV LC IC^a</i>	1 x 1 000 µl	2 x 1 000 µl
Blanc	<i>Water (PCR grade) (eau, grade PCR)</i>	1 x 1 000 µl	1 x 1 000 µl

- ^a QS = Norme de quantification
IC = Contrôle interne
Mg-Sol = Solution de magnésium

2. Conservation

Les composants du kit *artus* CMV LC PCR doivent être stockés à une température de -15 °C à -30 °C et sont stables jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'étiquette. Éviter de répéter les étapes de congélation/décongélation (> 2 x) qui pourraient réduire la sensibilité. En cas d'utilisation occasionnelle, congeler les réactifs en aliquotes. Si les composants doivent être stockés à 4 °C, la période de conservation ne doit pas dépasser cinq heures.

3. Matériel nécessaire et non fourni

- Gants de laboratoire sans talc
- Kit d'extraction d'ADN (voir **8.2 Extraction de l'ADN**)
- Pipettes (réglables)
- Cônes de pipettes stériles munis de filtres
- Mixeur Vortex
- Micro-centrifugeuse avec rotor pour tubes de réaction de 2 ml
- *Color Compensation Set* (Roche Diagnostics, référence 2 158 850) pour la création d'un fichier *Crosstalk Color Compensation* pour l'appareil *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ou *LightCycler 2.0*
- *LightCycler Multicolor Demo Set* (référence 03 624 854 001) pour la création d'un fichier *Crosstalk Color Compensation* pour l'appareil *LightCycler 2.0*
- Capillaires *LightCycler* (20 µl)
- Bloc réfrigérant *LightCycler*
- Appareil *LightCycler 1.1/1.2/1.5* (logiciel version 3.5) ou *LightCycler 2.0* (logiciel version 4.0)
- Dispositif de fermeture *LightCycler* (Capping Tool)

4. Précautions générales

L'utilisateur doit toujours respecter les mesures suivantes :

- Utiliser des cônes 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 du test.
- Mélanger ensuite soigneusement les composants et les centrifuger brièvement.
- Toujours travailler dans de la glace ou le bloc réfrigérant du *LightCycler*.

5. Informations sur l'agent pathogène

Le cytomégalo­virus humain (CMV) est détecté dans le sang, les tissus et presque tous les liquides de sécrétion des personnes infectées. La transmission peut se faire par voie orale, sexuelle, intra-utérine ou périnatale ou encore par transfusion sanguine ou transplantation d'organe. L'infection par le CMV provoque fréquemment une infection asymptomatique suivie d'une persistance à vie du virus dans l'organisme. Si des symptômes apparaissent, chez l'adolescent ou l'adulte, ils ressemblent à ceux de la mononucléose avec fièvre, hépatite faible et indisposition générale. Plusieurs évolutions de l'infection par le CMV ont été observées, en particulier chez les personnes infectées par voie intra-utérine et chez les patients immunodéficients.

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 rouvrir les tubes réactionnels à la fin du cycle de PCR (Mackay, 2004).

7. Description du produit

Le kit *artus* CMV LC -PCR constitue un système prêt à l'emploi pour la détection de l'ADN du CMV par le biais d'une amplification en chaîne par polymérase (PCR) sur l'appareil *LightCycler*. Le *CMV LC Master* contient des réactifs et des enzymes pour l'amplification spécifique d'un fragment de génome du CMV de 105 bp et pour la détection directe de l'amplicon spécifique avec l'appareil *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ou *LightCycler 2.0*. Le kit

artus CMV LC PCR comprend en outre un deuxième système d'amplification hétérologue pour détecter une éventuelle inhibition de la PCR.

Produit de PCR	Sélection des canaux de fluorescence	
	Appareil <i>LightCycler 1.1/1.2/1.5</i>	Appareil <i>LightCycler 2.0</i>
CMV	F1	530
CMV LC IC	F3/Back-F1	705/Back 530

L'amplification et la détection de ce *contrôle interne (IC)* n'ont aucune influence négative sur la limite de détection de la PCR analytique du CMV (voir **11.1 Sensibilité analytique**). Des contrôles positifs externes (*CMV QS 1 - 4*) sont fournis, permettant de déterminer la charge virale. Pour plus d'informations, veuillez vous référer à la section **8.4 Quantification**.

Attention : Le profil de thermocyclage permettant la détection du cytomégalo virus à l'aide du kit *artus* CMV LC PCR correspond aux profils des kits *artus* EBV LC PCR, *artus* HSV-1/2 LC PCR et *artus* VZV LC PCR. En conséquence, les tests de PCR de ces systèmes *artus* peuvent être effectués et analysés dans le cadre d'un cycle unique. Veuillez tenir compte des recommandations sur l'analyse par PCR fournies dans les chapitres **8.4 Quantification** et **9. Analyse des données**.

8. Protocole

8.1 Pré-analytique : Prélèvement, stockage et transport des échantillons

Attention : Tous les échantillons doivent être considérés comme potentiellement infectieux.

Attention : Les données disponibles jusqu'à présent indiquent que le plasma recueilli sur EDTA ou sur citrate est le matériel de prélèvement le plus approprié pour la détection du CMV. Il est donc recommandé d'utiliser ce prélèvement avec le kit *artus* CMV LC PCR.

La validation interne du kit *artus* CMV LC PCR a été effectuée avec du plasma humain prélevé sur EDTA. Les autres prélèvements ne sont pas validés. Utiliser uniquement les kits d'extraction d'ADN recommandés pour la préparation des échantillons (voir **8.2 Extraction de l'ADN**).

Les prescriptions suivantes de prélèvement, de conservation et de transport doivent impérativement être respectées.

8.1.1 Prélèvement des échantillons

Chaque prise de sang représente une blessure des vaisseaux sanguins (artères, veines, capillaires). N'utiliser que du matériel stérile et sans danger. Des seringues jetables pour les prélèvements sanguins sont disponibles. Pour la ponction veineuse, il est recommandé de ne pas utiliser de canules trop fines. Le prélèvement sanguin veineux devrait avoir lieu à un endroit approprié dans le pli du coude, de l'avant-bras ou sur le dos de la main. Le sang doit être recueilli dans des tubes standard (bouchon rouge, Sarstedt ou tubes équivalents d'un autre fabricant). Un volume de 5 - 10 ml de sang sur EDTA doit être prélevé. Les tubes avec additifs devraient être mélangés immédiatement après prélèvement en les inversant plusieurs fois (8 fois, sans agiter).

Attention : Ne pas utiliser de prélèvements provenant de patients traitées par héparine (voir **8.1.4 Substances interférentes**).

8.1.2 Conservation des échantillons

Le sang total devrait être séparé en plasma et constituants cellulaires dans un délai de six heures par centrifugation à 800 – 1600 x g pendant 20 minutes. Le plasma doit être transféré dans un tube de polypropylène stérile. Une congélation/décongélation répétée ou une conservation trop prolongée des échantillons peut nuire à la performance du test.

8.1.3 Transport des échantillons

Par principe, le matériel de prélèvement devrait être envoyé dans un récipient incassable. Ceci permettrait d'éviter un danger éventuel d'infection ou une perte d'échantillon en cas de fuite. Les échantillons doivent être envoyés

conformément aux réglementations locales et nationales en vigueur en matière de transport de matériel potentiellement contaminé.*

Le temps de transport ne doit pas excéder six heures. Une conservation sur place est à déconseiller. Il est possible d'envoyer les échantillons par voie postale, si les réglementations prescrites par la loi sont respectées. Nous recommandons d'expédier l'échantillon par courrier express. Les échantillons sanguins doivent être expédiés sous forme réfrigérée (+2 °C à +8 °C) et le plasma congelée à basse température (-20 °C).

8.1.4 Substances interférentes

Des valeurs élevées de bilirubine ($\leq 4,5$ mg/dl) et de lipides (≤ 1100 mg/dl), ainsi que des échantillons hémolytiques n'ont aucune influence sur le système d'analyse du CMV. L'héparine peut nuire à la PCR. Il est déconseillé d'utiliser des échantillons qui ont été prélevés dans des tubes contenant de l'héparine comme anticoagulant. De même, les échantillons de patients héparinés ne doivent pas être utilisés.

8.2 Extraction de l'ADN

Les kits d'extraction suivants sont recommandés pour isoler l'ADN du CMV :

Matériel de prélèvement	Kit d'extraction d'acides nucléiques	Référence	Fabricant	ARN entraîneur
Plasma sur EDTA	QIAamp [®] DSP Virus Kit (50)	60704	QIAGEN	inclus
Plasma sur EDTA	EZ1 [®] DSP Virus Kit (48)*	62724	QIAGEN	inclus

*À utiliser avec l'appareil EZ1 Advanced (référence 9001411) et la carte EZ1 Advanced DSP Virus Card (référence 9018306) ou l'appareil BioRobot[®] EZ1 DSP (référence 9001360) et la carte EZ1 DSP Virus Card (référence 9017707). Le kit EZ1 DSP Virus est également disponible sous forme de kits EASY^{artus}[®] CMV LC PCR homologués CE-IVD, associés au kit *artus* CMV LC PCR (références EA10303 et EA10304).

* International Air Transport Association (Association internationale du transport aérien). Dangerous Goods Regulations (Règlement sur le transport des matières dangereuses), 41ème édition, 2000.704.

- L'utilisation d'**ARN entraîneur** est déterminante pour l'efficacité de l'extraction et, en conséquence, pour le rendement d'ADN/ARN. Pour améliorer la stabilité de l'ARN entraîneur fourni dans le kit QIAamp DSP Virus et le kit EZ1 DSP Virus, veuillez suivre les instructions relatives à la manipulation et à la conservation de l'ARN entraîneur dans le manuel du kit *QIAamp DSP Virus (QIAamp DSP Virus Kit Handbook)* ou le manuel du kit *EZ1 DSP Virus (EZ1 DSP Virus Kit Handbook)*.

Important : Le *contrôle interne* du kit *artus CMV LC PCR* peut être directement utilisé pendant la procédure d'extraction. Veuillez à ajouter un échantillon de plasma négatif à la procédure d'extraction. Le signal correspondant au *contrôle interne* constitue le signal de base de l'évaluation de l'extraction (voir **8.3 Contrôle interne**).

8.3 Contrôle interne

Un *contrôle interne (CMV LC IC)* est fourni. Cela permet à l'utilisateur à **la fois de contrôler la procédure d'extraction de l'ADN et de vérifier une éventuelle inhibition de la PCR** (voir Fig. 1). Pour cette application, ajouter le *contrôle interne* dans le rapport de 0,1 µl pour 1 µl de volume d'élution pendant la procédure d'extraction. Par exemple, avec le kit QIAamp DSP Virus, l'ADN est élué dans 60 µl de tampon AVE. Il convient donc d'ajouter 6 µl de *contrôle interne*. Si l'extraction est effectuée avec le kit EZ1 DSP Virus, le *contrôle interne* doit être ajouté selon les instructions figurant dans le manuel du kit *EZ1 DSP Virus (EZ1 DSP Virus Kit Handbook)*. La quantité de *contrôle interne* utilisée dépend **uniquement** du volume d'élution. Le *contrôle interne* et l'ARN entraîneur (voir **8.2 Extraction de l'ADN**) doivent être ajoutés en respectant rigoureusement les instructions figurant dans le manuel du kit *QIAamp DSP Virus (QIAamp DSP Virus Kit Handbook)* ou le manuel du kit *EZ1 DSP Virus (EZ1 DSP Virus Kit Handbook)*.

Le *contrôle interne* ne doit pas être ajouté directement à l'échantillon. En l'ajoutant au tampon de lyse, veuillez noter que le mélange de *contrôle interne* et de tampon de lyse/ARN entraîneur doit être préparé fraîchement et utilisé immédiatement (toute conservation du mélange à température ambiante ou au réfrigérateur, même pour quelques heures, peut altérer le *contrôle interne*

et diminuer l'efficacité de l'extraction). **Ne pas** ajouter le *contrôle interne* et l'ARN entraîneur directement à l'échantillon.

Pour considérer une purification comme réussie, la valeur Ct du *contrôle interne* d'un échantillon de plasma négatif soumis à la procédure de purification doit atteindre la valeur Ct indiquée dans le tableau 1. La déviation donnée est due à la variabilité des instruments et des extractions. Une déviation supérieure indique que des difficultés sont survenues lors de l'extraction. Dans ce cas, il faut vérifier la procédure d'extraction et si nécessaire, la valider à nouveau. Pour toute autre question ou en cas de problèmes, merci de contacter notre service technique.

Tableau 1: Plage de valeurs Ct acceptées pour le *contrôle interne* d'un échantillon de plasma négatif.

Kit de purification	Appareil	Canal de fluorescence	Méthode d'analyse	Valeur Ct
Kit QIAamp DSP Virus	<i>LightCycler</i> 1.1/1.2/1.5	F3/Back-F1	<i>Maximum de la dérivée seconde</i>	14 ± 3
Kit QIAamp DSP Virus	<i>LightCycler</i> 2.0	705/Back 530	<i>Automatique</i>	14 ± 3
Kit EZ1 DSP Virus	<i>LightCycler</i> 1.1/1.2/1.5	F3/Back-F1	<i>Maximum de la dérivée seconde</i>	15 ± 3
Kit EZ1 DSP Virus	<i>LightCycler</i> 2.0	705/Back 530	<i>Automatique</i>	15 ± 3

Le *contrôle interne* peut éventuellement être utilisé **exclusivement pour vérifier une possible inhibition de la PCR** (voir Fig. 2). Pour la présente application, ajouter 1 µl de *contrôle interne* et 2,5 µl de *CMV Mg-Sol* par réaction directement à 12,5 µl de *CMV LC Master*. Pour chaque réaction de PCR, utiliser 15 µl du mélange réactionnel (Master Mix) obtenu comme décrit ci-dessus* et ajouter 10 µl de l'échantillon purifié. En cas de préparation d'un cycle de PCR sur plusieurs échantillons, augmenter le volume de *CMV LC Master*, de *CMV Mg-Sol* et de *contrôle interne* en fonction du nombre d'échantillons (voir **8.5 Préparation de la PCR**).

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

Les kits *artus* EBV LC PCR et les kits *artus* CMV LC PCR contiennent le même *contrôle interne* (IC). Les kits *artus* HSV-1/2 LC PCR et les kits *artus* VZV LC PCR contiennent également le même *contrôle interne* (IC).

8.4 Quantification

Les *normes de quantification* fournies (CMV QS 1 - 4) doivent être manipulées comme des échantillons purifiés et utilisées avec le même volume (10 µl). Pour créer une courbe standard sur l'appareil *LightCycler*, les quatre *normes de quantification* doivent être utilisées de la manière suivante :

Appareil *LightCycler* 1.1/1.2/1.5

Définir les CMV QS 1 – 4 comme normes dans le *Sample Loading Screen* (Écran de chargement d'échantillon) en spécifiant les concentrations (voir le manuel d'utilisation du *LightCycler* (*LightCycler Operator's Manual*), version 3.5, chapitre B, 2.4. Sample Data Entry).

Appareil *LightCycler* 2.0

Pour définir les normes, activer la fonction *Analysis Type* (Type d'analyse) dans le menu de la fenêtre *Samples* (échantillons) et sélectionner *Absolute Quantification* (Quantification absolue). Vous pouvez désormais définir les CMV QS 1 – 4 comme normes et saisir les concentrations correspondantes pour chaque norme (voir le manuel d'utilisation du *LightCycler* (*LightCycler Operator's Manual*), version 4.0, chapitre 2.2 Entering Sample Information). Vérifier que la fonction *Enable Controls* (Activer les contrôles) **n'est pas** activée. Autrement, la sélection des options d'analyse pour l'analyse des données sera restreinte (voir **9.2 Analyse des données de PCR sur l'appareil *LightCycler* 2.0**).

Si plusieurs troupes herpes *artus* ont été intégrées au cycle de PCR, veuillez analyser ces différents systèmes séparément en utilisant les normes de quantification correspondantes.

Attention : Pour garantir une quantification précise, il est vivement recommandé de compléter le mélange réactionnel utilisé pour les *normes de*

quantification avec la quantité correspondante de *contrôle interne*. À cette fin, ajouter pour chaque *norme de quantification* (CMV QS 1 – CMV QS 4), 1 µl de *contrôle interne* et 2,5 µl de *CMV Mg-Sol*, directement à 12,5 µl de *CMV LC Master* (pour une présentation schématique, voir Fig. 2). Ce schéma de pipetage est généralement applicable aux *normes de quantification* du CMV et ne dépend pas du nombre de *normes de quantification* utilisé.

Les *normes de quantification* sont exprimées en copies/µl. L'équation suivante doit être appliquée pour convertir les valeurs déterminées par le biais de la courbe standard en copies/ml de matériel de prélèvement :

$$\text{Résultat (copies/ml)} = \frac{\text{Résultat (copies/}\mu\text{l)} \times \text{volume d'élu\textit{tion}} (\mu\text{l})}{\text{Volume d'échantillon (ml)}}$$

Veillez noter qu'en principe le volume initial de l'échantillon doit être saisi dans l'équation ci-dessus. Ceci est à considérer lorsque le volume d'échantillon a été modifié avant l'extraction d'acides nucléiques (par ex. concentration par centrifugation ou augmentation du volume au moment de l'extraction).

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

8.5 Préparation de la PCR

S'assurer que le bloc réfrigérant et les adaptateurs de capillaires (accessoires de l'appareil *LightCycler*) sont préalablement refroidis à +4 °C. Placer le nombre de capillaires *LightCycler* requis dans les adaptateurs du bloc réfrigérant. S'assurer que chaque cycle de PCR contienne au moins une *norme de quantification* et un contrôle négatif (eau de grade *PCR*). Pour établir une courbe standard, utiliser toutes les *normes de quantification*

(CMV QS 1 – 4) à chaque cycle de PCR. 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, immédiatement après, les centrifuger brièvement.

Si vous souhaitez utiliser le *contrôle interne* **pour surveiller la procédure d'extraction d'ADN et déceler une éventuelle inhibition de la PCR**, ce contrôle a déjà été ajouté à la procédure d'extraction (voir **8.3 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	<i>CMV LC Master</i>	12,5 µl	150 µl
	<i>CMV Mg-Sol</i>	2,5 µl	30 µl
	<i>CMV LC IC</i>	0 µl	0 µl
	Volume total	15 µl	180 µl
2. Préparation de la réaction de PCR	Mélange réactionnel	15 µl	15 µl chacun
	Échantillon	10 µl	10 µl chacun
	Volume total	25 µl	25 µl chacun

Pour utiliser le *contrôle interne* **exclusivement pour mettre en évidence une éventuelle inhibition de la PCR**, l'ajouter directement au *CMV 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	<i>CMV LC Master</i>	12,5 µl	150 µl
	<i>CMV Mg-Sol</i>	2,5 µl	30 µl
	<i>CMV LC IC</i>	1 µl	12 µl
	Volume total	16 µl*	192 µl
2. Préparation de la réaction de PCR	Mélange réactionnel	15 µl	15 µl chacun
	Échantillon/ <i>CMV QS 1 – 4</i>	10 µl	10 µl chacun
	Volume total	25 µl	25 µl chacun

Pipeter 15 µl de mélange réactionnel dans le réservoir en plastique de chaque capillaire. Ajouter ensuite 10 µl d'ADN de l'échantillon élué. De manière correspondante, il convient d'utiliser 10 µl d'au moins l'une des *normes de quantification* (*CMV QS 1 – 4*) comme contrôle positif et 10 µl d'eau (*grade PCR*) comme contrôle négatif. Fermer les capillaires. Pour créer la courbe standard, il est vivement recommandé de compléter le mélange réactionnel utilisé pour les *normes de quantification* avec la quantité correspondante de

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

contrôle interne (voir **8.4 Quantification**). 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 (2000 tr/min) maximum.

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

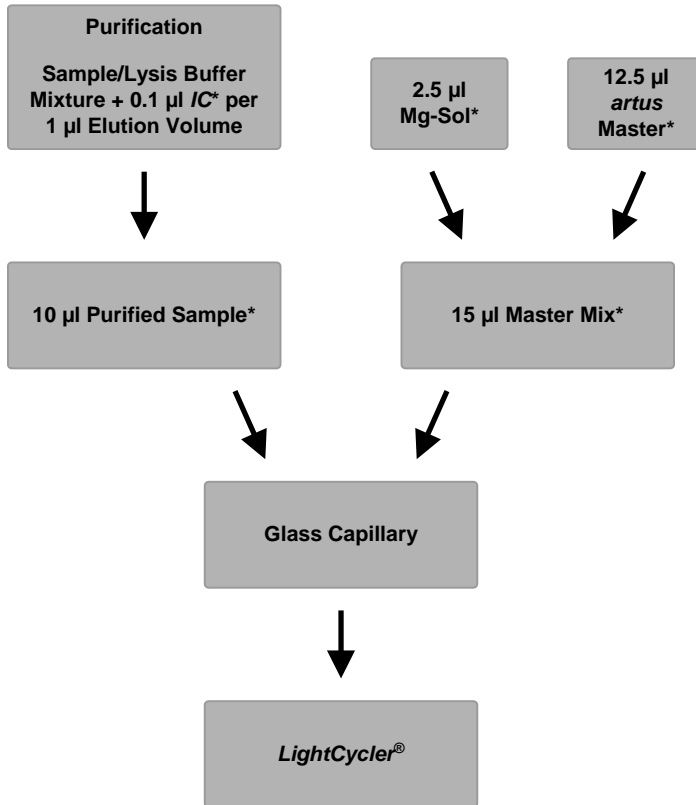


Fig. 1: Processus d'addition du contrôle interne pour contrôler l'étape d'extraction et une éventuelle inhibition de la PCR.

*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

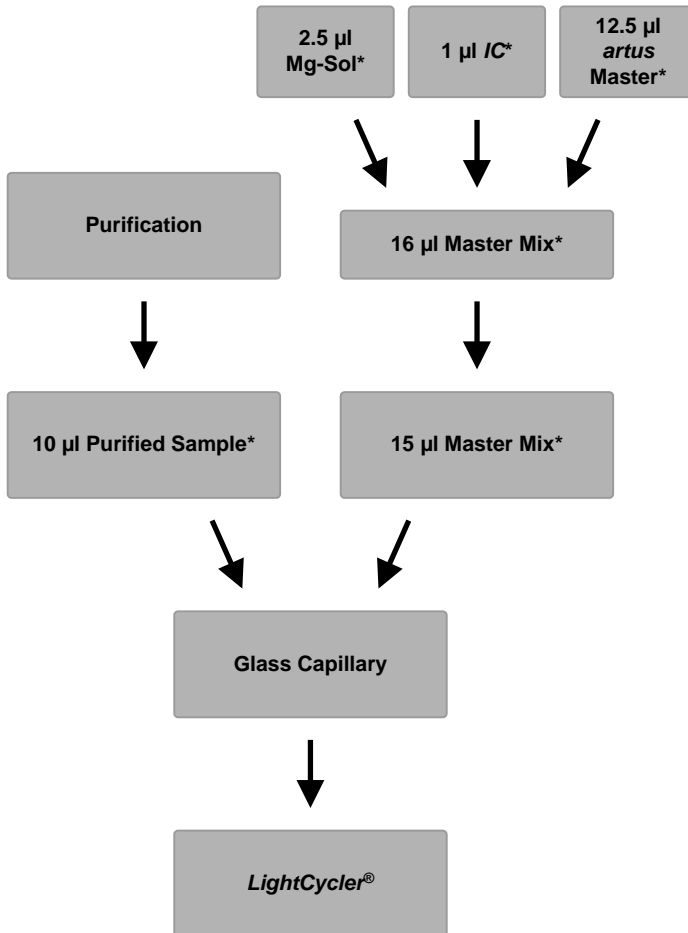


Fig. 2: Processus d'addition du contrôle interne pour contrôler une éventuelle inhibition de la PCR.

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

8.6 Programmation des appareils *LightCycler*

8.6.1 Programmation de l'appareil *LightCycler 1.1/1.2/1.5*

Pour détecter l'ADN du CMV, créer un profil de thermocyclage sur votre appareil *LightCycler 1.1/1.2/1.5* selon les 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 (facultative) | Fig. 6 |
| E. | Refroidissement | Fig. 7 |

Prêter particulièrement attention aux paramètres *Analysis Mode* (Mode d'analyse), *Cycle Program Data* (Données du programme de cycles) et *Temperature Targets* (Températures cibles). Dans les images suivantes, ces réglages sont encadrés en noir et en gras. Vous trouverez de plus amples informations sur la programmation de l'appareil *LightCycler 1.1/1.2/1.5* dans le manuel d'utilisation du *LightCycler (LightCycler Operator's Manual)*. L'étape D (Courbe de fusion) du programme de PCR est **facultative** et est seulement nécessaire pour différencier HSV1 et HSV2 lors de l'utilisation du kit *artus HSV-1/2 LC PCR*.

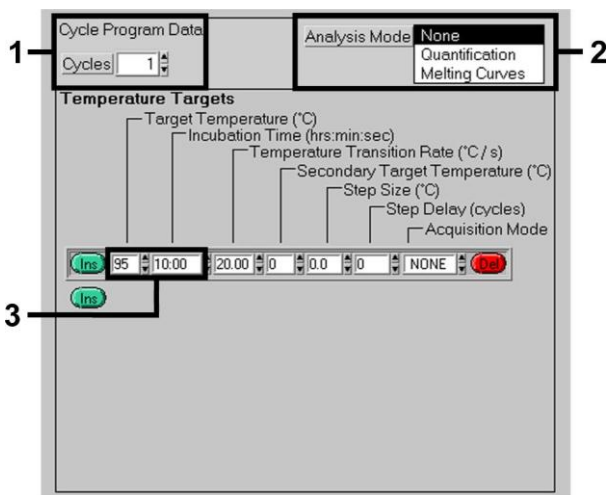


Fig. 3: Activation initiale de l'enzyme Hot Start.

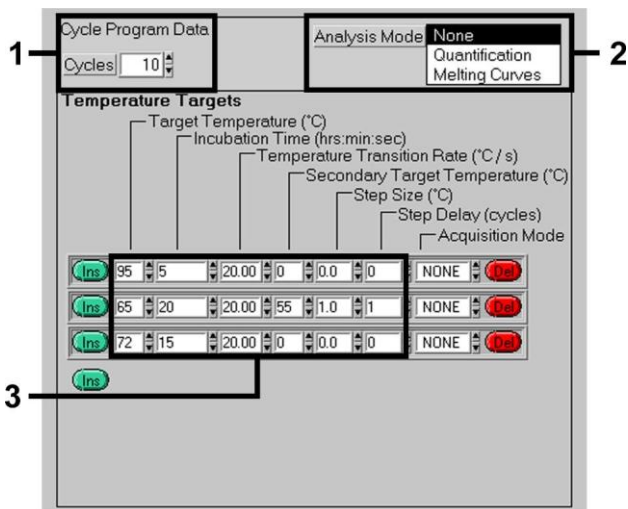


Fig. 4: Étape Touch Down.

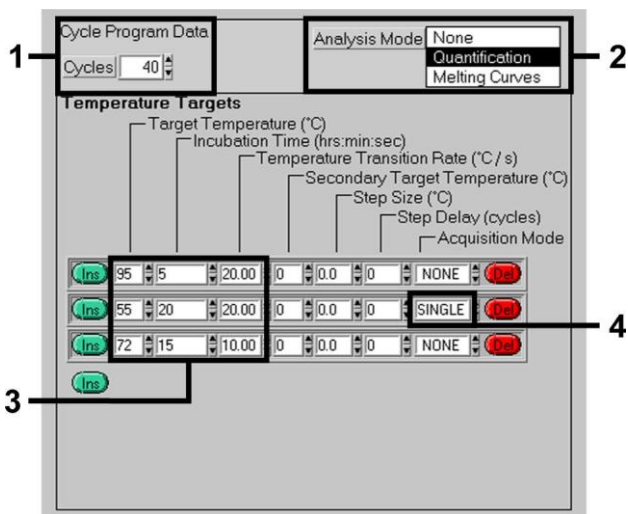


Fig. 5: Amplification de l'ADN.

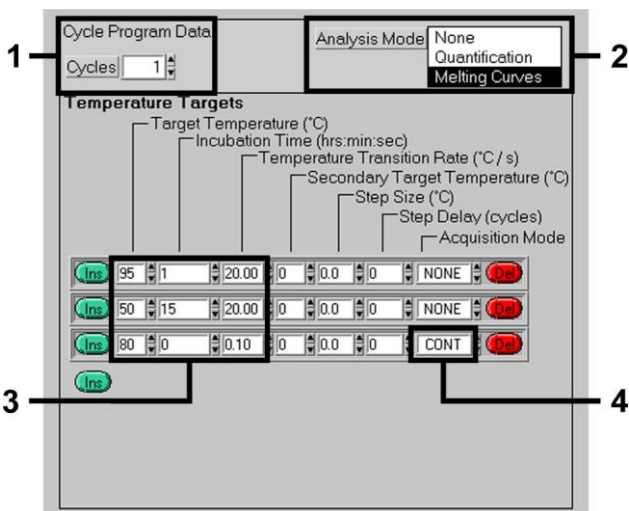


Fig. 6: Courbe de fusion (applicable uniquement si le kit *artus* HSV-1/2 LC PCR est utilisé en parallèle).

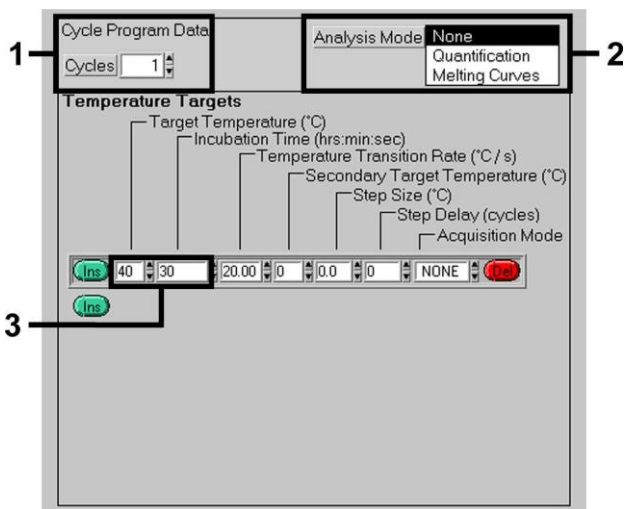


Fig. 7: Refroidissement.

8.6.2 Programmation de l'appareil *LightCycler 2.0*

Pour programmer un cycle de PCR avec l'appareil *LightCycler 2.0*, veuillez activer l'option *New* (Nouveau) dans le menu principal et sélectionner *LightCycler Experiment* (Expérience LightCycler).

Ensuite, pour détecter l'ADN du CMV, créer un profil de thermocyclage sur votre appareil *LightCycler 2.0* selon les cinq étapes suivantes (voir Fig. 8 -- 12).

- | | | |
|----|---|---------|
| A. | Activation initiale de l'enzyme Hot Start | Fig. 8 |
| B. | Étape Touch Down | Fig. 9 |
| C. | Amplification de l'ADN | Fig. 10 |
| D. | Courbe de fusion (facultative) | Fig. 11 |
| E. | Refroidissement | Fig. 12 |

L'étape D du programme de PCR est **facultative** et est seulement nécessaire pour différencier HSV1 et HSV2 lors de l'utilisation du kit *artus HSV1/2 LC PCR*.

Veillez à saisir d'abord le nombre de capillaires préparés pour ce cycle de PCR (*Max. Seek Pos.* (pos. recherchées max.), voir Fig. 8).

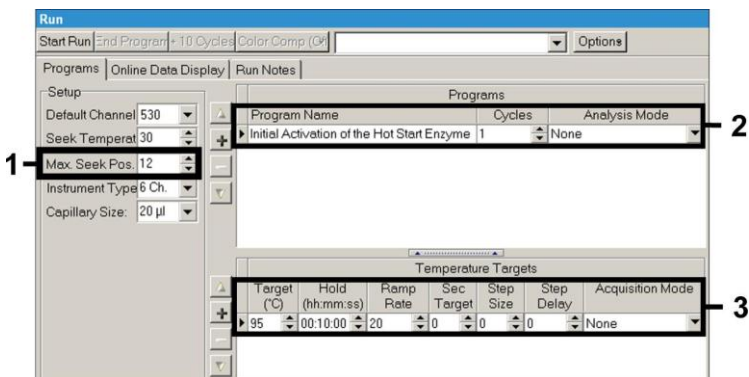


Fig. 8: Activation initiale de l'enzyme Hot Start.

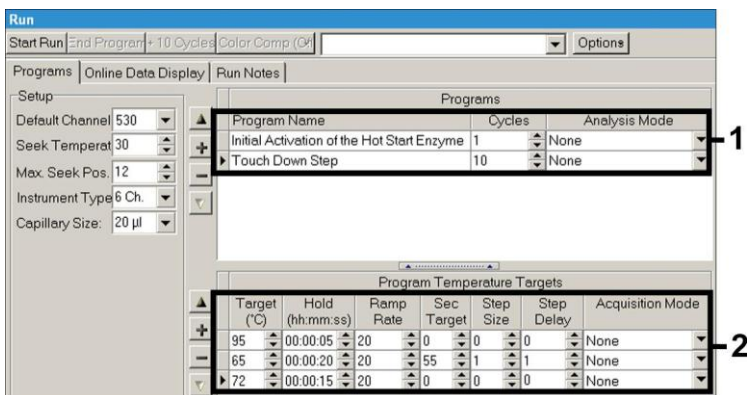


Fig. 9: Étape Touch Down.

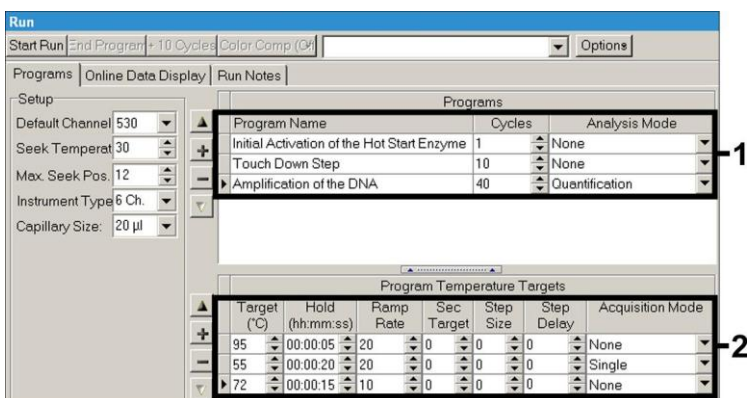


Fig. 10: Amplification de l'ADN.

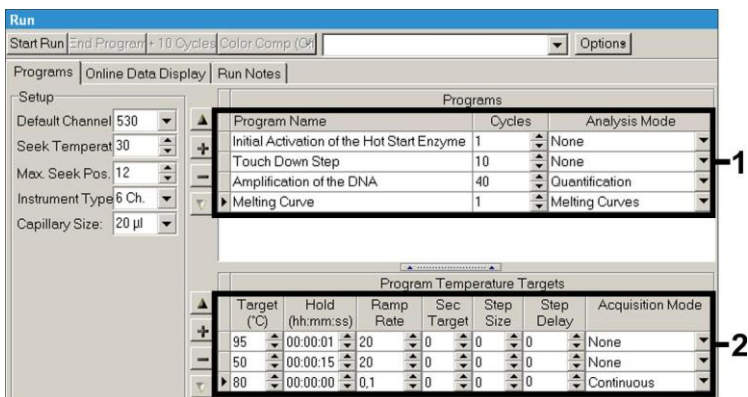


Fig. 11: Courbe de fusion (applicable uniquement si le kit *artus HSV-1/2 LC PCR* est utilisé en parallèle).

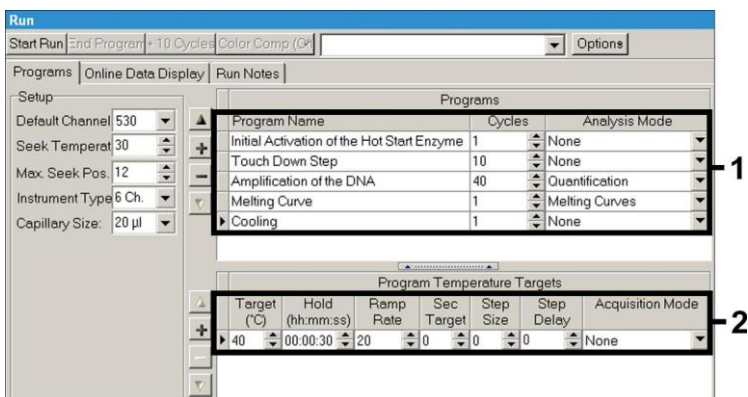


Fig. 12: Refroidissement.

Pour saisir les spécifications des échantillons, veuillez activer le bouton *Samples* (Échantillons).

- Dans le fenêtre *Capillary View* (Vue des capillaires), saisir d'abord le nombre total de préparations de PCR prévues pour le cycle de PCR (*Sample Count* (Nombre d'échantillons)).

- Ensuite, vous pouvez attribuer des noms aux échantillons sous *Sample Name* (Nom des échantillons).
- Sous l'option *Selected Channels* (Canaux sélectionnés), sélectionner également les canaux de fluorescence 530 pour la détection de la PCR analytique du CMV et 705 pour la détection de la PCR du *contrôle interne*.
- Pour définir les normes et attribuer les concentrations correspondantes, veuillez sélectionner l'option *Absolute Quantification* sous *Analysis Type* (voir **8.4 Quantification**).
- Vérifier que la fonction *Enable Controls* **n'est pas** activée. Autrement, la sélection des options d'analyse pour l'analyse des données sera restreinte (le mode *Fit Points* (Ajuster les points) n'est pas disponible, voir **9.2 Analyse des données de PCR sur l'appareil LightCycler 2.0**). Sous *Target Name* (Nom des cibles), vous pouvez attribuer les séquences des cibles à détecter (CMV ou *contrôle interne*) dans les canaux de fluorescence sélectionnés 530 et 705. Le remplissage de la colonne *Target Name* peut être simplifié à l'aide de la fonction *Auto Copy* (*Copie automatique*). La définition de l'option *Target Name* permet d'obtenir un meilleur aperçu, mais n'est pas absolument nécessaire à l'analyse des données.
- Pour établir une courbe standard permettant d'analyser les données, il convient de définir les *normes de quantification* avec les concentrations correspondantes. Veuillez donc sélectionner *Standard* (Norme) sous *Sample Type* (Type d'échantillon) et saisir la concentration correspondante pour chaque norme sous *Concentration* (Concentration).
- Le profil de thermocyclage programmé peut être enregistré sur le disque dur de l'ordinateur, afin de pouvoir le réutiliser lors de cycles ultérieurs. À cette fin, activer la fonction *Save As* (Enregistrer sous) dans le menu *File* (Fichier), après quoi une nouvelle fenêtre apparaît. Sous *Templates and Macros* (Modèles et macros), veuillez sélectionner le sous-menu *Run Templates* (Modèles de cycles) et enregistrer les données avec un nom approprié.
- Pour démarrer le cycle de PCR, passer au champ *Run* (Cycle) et activer la fonction *Start Run* (Démarrer le cycle) (voir Fig. 13). Le programme de

PCR démarrera une fois saisi l'emplacement de l'enregistrement des données.

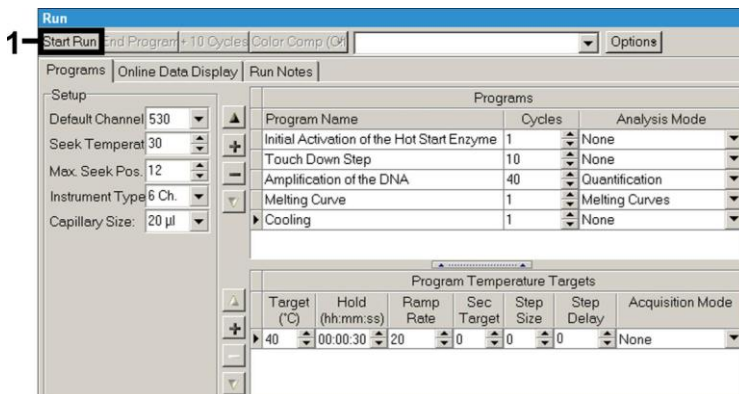


Fig. 13: Démarrage du cycle de PCR.

9. Analyse des données

9.1 Analyse des données de PCR sur l'appareil *LightCycler 1.1/1.2/1.5*

Pour l'analyse des données de PCR recueillies sur l'appareil *LightCycler 1.1/1.2/1.5*, nous recommandons d'utiliser le logiciel *LightCycler* de version 3.5.

Lors d'analyses multi-couleurs, des interférences apparaissent entre les divers canaux de fluorescence. Le logiciel de l'appareil *LightCycler 1.1/1.2/1.5* contient un fichier intitulé *Color Compensation File* qui corrige ces interférences. Ouvrir ce fichier avant, pendant ou après le cycle de PCR en activant le fichier *Choose CCC File* ou le bouton *Select CC Data*. Si aucun fichier *Color Compensation File* n'est installé, générer le fichier en suivant les instructions du manuel d'utilisation du *LightCycler (LightCycler Operator's Manual)*. Une fois le fichier *Color Compensation File* activé, des signaux distincts sont émis dans les canaux de fluorescence F1, F2 et F3. Pour

interpréter les résultats de la PCR obtenus avec le kit *artus* CMV LC PCR, veuillez sélectionner les options d'affichage de fluorescence F1 pour la PCR analytique du CMV et F3/Back-F1 pour la PCR du *contrôle interne*, respectivement. Pour analyser les cycles quantitatifs, veuillez suivre les instructions présentées dans **8.4 Quantification** et dans la **Technical Note for quantitation on the *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 or *LightCycler* 2.0 Instrument (Note technique pour la quantification sur l'appareil *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 ou *LightCycler* 2.0)** à l'adresse www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

Si plusieurs troussees herpes *artus* ont été intégrées au cycle de PCR, veuillez analyser ces différents systèmes séparément en utilisant les normes de quantifications correspondantes. Veuillez sélectionner les positions du carrousel appropriées pour l'analyse.

Les résultats suivants peuvent être obtenus :

1. Un signal est détecté dans le canal de fluorescence F1.

Le résultat de l'analyse est positif : L'échantillon contient de l'ADN de CMV.

Dans ce cas, la détection d'un signal dans le canal F3/Back-F1 est superflue car de fortes concentrations initiales d'ADN de CMV (signal positif du canal F1) peuvent entraîner la réduction ou la disparition du signal de fluorescence du *contrôle interne* du canal F3/Back-F1 (compétition).

2. Aucun signal n'est détecté dans le canal de fluorescence F1. Simultanément, un signal provenant du *contrôle interne* apparaît dans le canal F3/Back-F1.

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

En cas de PCR négative pour le CMV, le signal détecté pour le *contrôle interne* exclut toute possibilité d'inhibition de la PCR.

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

Un diagnostic n'est pas possible.

Des informations sur les sources d'erreurs et sur leur résolution figurent dans **10. Résolution** des principaux problèmes rencontrés.

Des exemples de réactions de PCR positives et négatives sont présentés dans les Fig. 14 et Fig. 15.

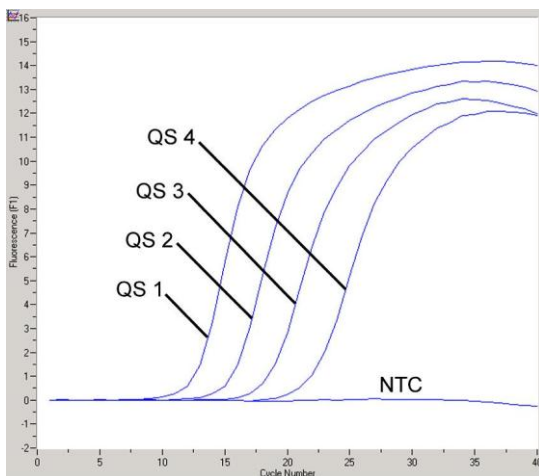


Fig. 14: Détection des *normes de quantification* (CMV QS 1 – 4) dans le canal de fluorescence F1 de l'appareil *LightCycler 1.1/1.2/1.5*. NTC : contrôle sans matrice (contrôle négatif).

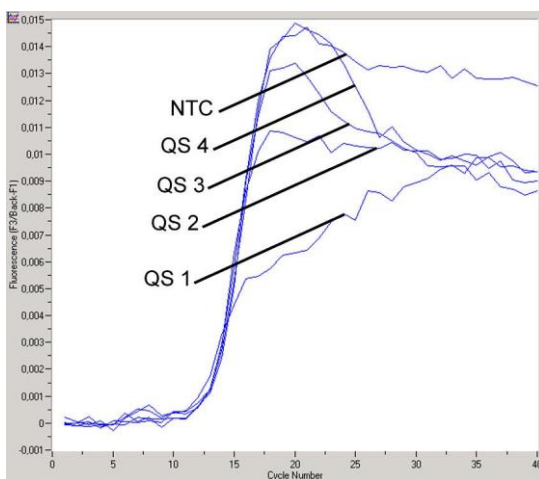


Fig. 15: Détection du *contrôle interne* (IC) dans le canal de fluorescence F3/Back-F1 de l'appareil *LightCycler 1.1/1.2/1.5* avec amplification simultanée des *normes de quantification* (CMV QS 1 – 4). NTC : contrôle sans matrice (contrôle négatif).

9.2 Analyse des données de PCR sur l'appareil *LightCycler 2.0*

Pour l'analyse des données de PCR recueillies sur l'appareil *LightCycler 2.0*, nous recommandons d'utiliser le logiciel *LightCycler* de version 4.0. Veuillez suivre les instructions fournies dans le manuel d'utilisation de l'appareil *LightCycler 2.0 (LightCycler 2.0 Instrument Operator's Manual) version 4.0*.

Pour l'analyse des données de PCR, veuillez procéder de la manière suivante (voir Fig. 16) :

- Activer la fonction *Analysis* (Analyse) dans la barre de menu et sélectionner l'option *Absolute Quantification*. En principe, toutes les données d'amplification générées avec le kit *artus LC PCR* doivent être analysées en utilisant cette fonction.
- Le logiciel *LightCycler* version 4.0 contient un fichier intitulé *Color Compensation File* qui corrige les interférences d'analyse multi-couleurs entre les divers canaux de fluorescence. Ouvrir ce fichier au cours du cycle de PCR ou une fois le cycle achevé en activant l'option *Color Comp (On/Off)* (comp. couleur (marche/arrêt)), puis le bouton *Select Color Compensation* (Sélectionner la compensation des couleurs) (voir Fig. 16). Si aucun fichier *Color Compensation File* n'est installé, générer le fichier en suivant les instructions du manuel d'utilisation du *LightCycler (LightCycler Operator's Manual)*.
- Une fois le fichier *Color Compensation File* activé, des signaux distincts sont émis dans les canaux de fluorescence. Pour interpréter les résultats de la PCR obtenus avec le kit *artus CMV LC PCR*, veuillez sélectionner les options d'affichage de fluorescence 530 pour la PCR analytique du CMV et 705/Back-530 pour la PCR du *contrôle interne*, respectivement.

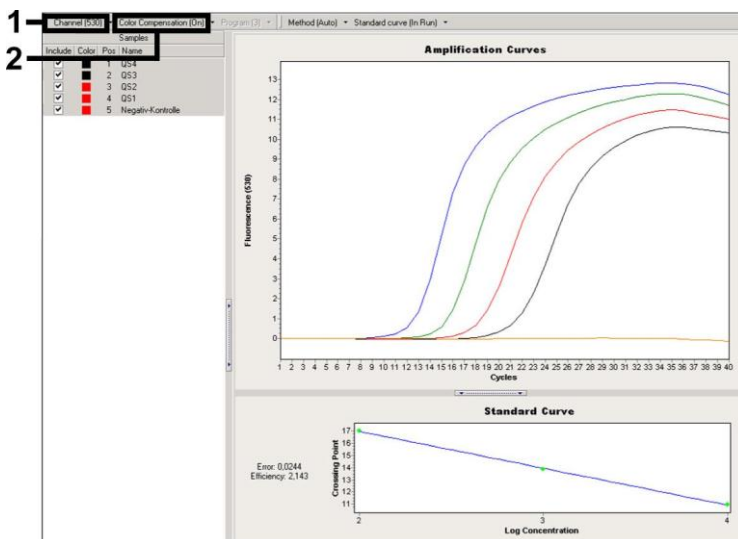


Fig. 16: Activation du fichier *Color Compensation File* et sélection du canal de fluorescence.

Pour analyser les cycles quantitatifs, veuillez suivre les instructions présentées dans **8.4 Quantification** et dans la **Technical Note for quantitation on the *LightCycler 1.1/1.2/1.5* or *LightCycler 2.0* Instrument** (Note technique pour la quantification sur l'appareil *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ou *LightCycler 2.0*) à l'adresse www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

Une fois les réglages des options d'analyses terminés, les résultats suivants peuvent être obtenus :

1. Un signal est détecté dans le canal de fluorescence 530.

Le résultat de l'analyse est positif : L'échantillon contient de l'ADN de CMV.

Dans ce cas, la détection d'un signal dans le canal 705/Back 530 est superflue car de fortes concentrations initiales d'ADN de CMV (signal positif du canal 530) peuvent entraîner la réduction ou la disparition du signal de fluorescence du *contrôle interne* du canal 705/Back 530 (compétition).

2. Aucun signal n'est détecté dans le canal de fluorescence 530. En même temps, un signal provenant du *contrôle interne* apparaît dans le canal 705/Back 530.

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

En cas de PCR négative pour le CMV, le signal détecté pour le *contrôle interne* exclut toute possibilité d'inhibition de la PCR.

3. Aucun signal n'est détecté dans le canal 530 ou 705/Back 530.

Un diagnostic n'est pas possible.

Des informations sur les sources d'erreurs et sur leur résolution figurent dans **10. Résolution** des principaux problèmes rencontrés.

Des exemples de réactions de PCR positives et négatives sont présentés dans les Fig. 17 et Fig. 18.

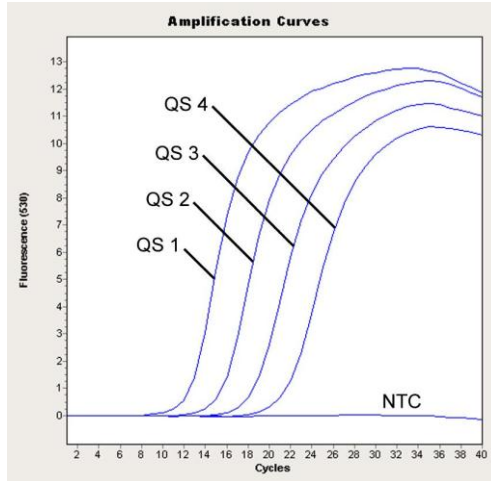


Fig. 17: Détection des *normes de quantification* (CMV QS 1 – 4) dans le canal de fluorescence 530 de l'appareil *LightCycler 2.0*. NTC : contrôle sans matrice (contrôle négatif).

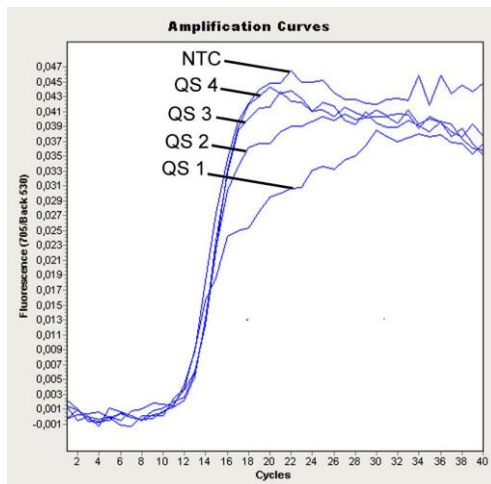


Fig. 18: Détection du *contrôle interne* (IC) dans le canal de fluorescence 705/Back 530 de l'appareil *LightCycler 2.0* avec amplification simultanée des *normes de quantification*

(*CMV QS 1 – 4*). NTC : contrôle sans matrice (contrôle négatif).

10. Résolution des principaux problèmes rencontrés

Aucun signal pour les contrôles positifs (*CMV QS 1 – 4*) dans le canal de fluorescence F1 ou 530 :

- Le canal de fluorescence sélectionné pour l'analyse des données de PCR ne respecte pas le protocole.
 - Pour l'analyse des données, sélectionner le canal de fluorescence F1 ou 530 pour la PCR analytique du CMV et le canal de fluorescence F3/Back--F1 ou 705/Back 530 pour la PCR du *contrôle interne*.
- Erreur de programmation du profil de thermocyclage de l'appareil *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ou *LightCycler 2.0*.
 - Comparer le profil de thermocyclage au protocole (voir **8.6 Programmation de l'appareil *LightCycler***).
- Mauvaise configuration de la réaction de PCR.
 - Vérifier les étapes de la procédure à l'aide d'un schéma de pipetage (voir **8.5 Préparation de la PCR**) et recommencer la PCR si nécessaire.
- Les conditions de stockage d'un ou plusieurs composants du kit ne respectaient pas les instructions fournies dans **2. Conservation** ou la date de péremption du kit *artus CMV LC PCR* a expirée.
 - Vérifier les conditions de conservation et 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* d'un des échantillons de plasma négatifs extraits en parallèle (déviations supérieures à $Ct = 14 \pm 3$ avec le kit QIAamp DSP Virus ; déviations supérieures à $Ct = 15 \pm 3$ avec le kit EZ1 DSP Virus ; voir le tableau 1) et absence simultanée de signal dans le canal F1 ou 530:

- Les conditions de PCR ne sont pas conformes au protocole.

- Vérifier les conditions de PCR (cf. ci-dessus) et si besoin, répéter la PCR avec les réglages corrigés.
- Il y a eu inhibition de la PCR.
 - S'assurer de l'utilisation des kits d'extraction que nous recommandons (voir **8.2 Extraction de l'ADN**) 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 **8.2 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 **8.2 Extraction de l'ADN**) est utilisé et respecter scrupuleusement les instructions du fabricant.
- Les conditions de stockage d'un ou plusieurs composants du kit ne respectaient pas les instructions fournies dans **2. Conservation** ou la date de péremption du kit *artus* CMV LC PCR a expirée.
 - Vérifier les conditions de conservation et la date de péremption des réactifs (voir l'étiquette du kit) et, si nécessaire, employer un nouveau kit.

Signaux avec les contrôles négatifs du canal de fluorescence F1 ou 530 de la PCR analytique.

- Il y a eu contamination pendant la préparation de la PCR.
 - Répéter la PCR en double avec des réactifs encore non utilisés.
 - Si possible, fermer les tubes de PCR juste après l'addition de l'échantillon à tester.
 - 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

La limite de détection analytique ainsi que la limite de détection analytique tenant compte de la purification (seuils de sensibilité) ont été évaluées pour le kit *artus* CMV LC PCR. La limite de détection analytique tenant compte de la purification a été calculée à partir d'échantillons cliniques positifs pour le CMV et pour une méthode d'extraction particulière. En revanche, la limite de détection analytique a été déterminée en utilisant de l'ADN de CMV de concentration connue, en l'absence d'échantillon clinique et indépendamment de la méthode d'extraction.

Pour déterminer la **limite de détection analytique** du kit *artus* CMV LC PCR, une série de dilutions d'ADN génomique de CMV a été effectuée de 10 à 0,00316 copies nominales de CMV/ μ l, et analysée avec le kit *artus* CMV LC PCR sur l'appareil **LightCycler 1.1/1.2/1.5**. Les essais ont été exécutés sur trois jours différents à raison de huit séries par jour. Les résultats ont été déterminés à l'aide d'une analyse probit. La limite de détection analytique du kit *artus* CMV LC PCR associé à l'appareil **LightCycler 1.1/1.2/1.5** est de 0,49 copie/ μ l ($p = 0,05$). Cela signifie que la probabilité de détecter 0,49 copie/ μ l est de 95 %.

La **sensibilité analytique tenant compte de la purification (kit QIAamp DSP Virus)** du kit *artus* CMV LC PCR a été déterminée sur l'appareil **LightCycler 1.1/1.2/1.5** par le biais d'une série de dilutions de matière virale de CMV, dans la plage de 1 000 à 0,316 copies nominales de CMV/ml,

inoculées dans des échantillons cliniques de plasma. Ceux-ci ont été soumis à une extraction de l'ADN à l'aide du kit QIAamp DSP Virus (volume d'extraction : 0,5 ml, volume d'éluion : 60 µl). Chacune des huit dilutions a été analysée en utilisant le kit *artus* CMV LC PCR sur trois jours différents à raison de huit séries par jour. Le résultat a été déterminé par analyse probit. Une illustration graphique de l'analyse probit est présentée dans Fig. 19. La limite de détection analytique tenant compte de la purification du kit *artus* CMV LC PCR associé à l'appareil *LightCycler 1.1/1.2/1.5* est de 64,9 copies/ml ($p = 0,05$). Cela signifie que la probabilité de détecter 64,9 copies/ml est de 95 %.

Analyse probit : Cytomégalo virus (*LightCycler 1.1/1.2/1.5*)

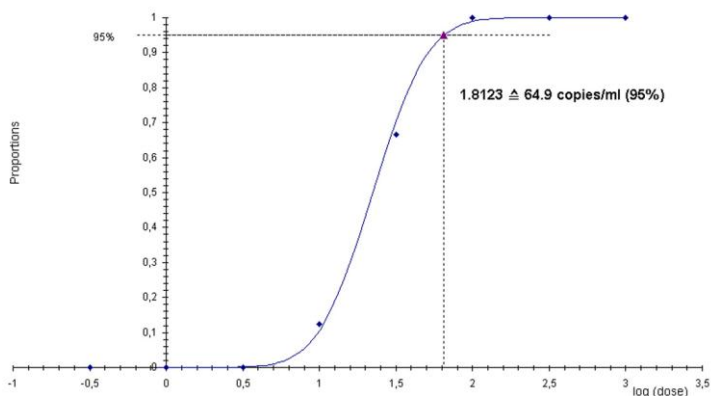


Fig. 19: Sensibilité analytique tenant compte de la purification (kit QIAamp DSP Virus) du kit *artus* CMV LC PCR sur l'appareil *LightCycler 1.1/1.2/1.5*.

Pour déterminer la **limite de détection analytique** du kit *artus* CMV LC PCR, une série de dilutions d'ADN génomique de CMV a été effectuée de 10 à 0,00316 copies nominales de CMV/µl et analysée avec le kit *artus* CMV LC PCR sur l'appareil *LightCycler 2.0*. Les essais ont été exécutés sur trois jours différents à raison de huit séries par jour. Le résultat a

été déterminé par analyse probit. La limite de détection analytique du kit *artus* CMV LC PCR associé à l'appareil *LightCycler 2.0* est de 0,65 copie/ μ l ($p = 0,05$). Cela signifie que la probabilité de détecter 0,65 copie/ μ l est de 95 %.

La **sensibilité analytique tenant compte de la purification (kit QIAamp DSP Virus)** du kit *artus* CMV LC PCR a été déterminée sur l'appareil **LightCycler 2.0** par le biais d'une série de dilutions de matière virale de CMV dans la plage de 1 000 à 0,316 copies nominales de CMV/ml inocuées dans des échantillons cliniques de plasma. Ceux-ci ont été soumis à une extraction de l'ADN à l'aide du kit QIAamp DSP Virus (volume d'extraction : 0,5 ml, volume d'éluion : 60 µl). Chacune des huit dilutions a été analysée en utilisant le kit *artus* CMV LC PCR sur trois jours différents à raison de huit séries par jour. Le résultat a été déterminé par analyse probit. Une illustration graphique de l'analyse probit est présentée dans Fig. 20. La limite de détection analytique tenant compte de la purification du kit *artus* CMV LC PCR associé à l'appareil *LightCycler 2.0* est de 78,9 copies/ml ($p = 0,05$). Cela signifie que la probabilité de détecter 78,9 copies/ml est de 95 %.

Analyse probit : Cytomégalo­virus (LightCycler 2.0)

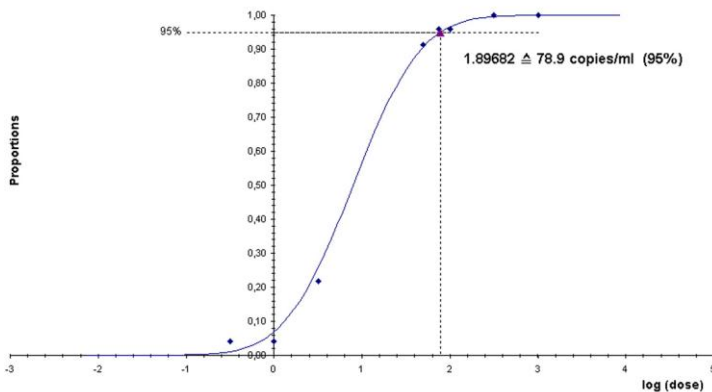


Fig. 20: Sensibilité analytique tenant compte de la purification (kit QIAamp DSP Virus) du kit *artus* CMV LC PCR sur l'appareil *LightCycler 2.0*.

La limite de détection analytique tenant compte de la purification du kit *artus* CMV LC PCR associé à l'appareil *LightCycler 1.1/1.2/1.5/2.0* et au kit

EZ1 DSP Virus (volume d'extraction : 0,4 ml, volume d'élution : 60 µl) sur l'appareil EZ1 Advanced ou l'appareil BioRobot EZ1 DSP est de 67,2 copies/ml ($p = 0,05$). Cela signifie que la probabilité de détecter 67,2 copies/ml est de 95 %.

11.2 Spécificité

La spécificité du kit *artus* CMV LC PCR est garantie en premier lieu par la sélection des amorces et des sondes ainsi que de conditions de réaction strictes. Une analyse par comparaison de séquences des amorces et des sondes a été effectuée afin de rechercher d'éventuelles homologies avec toutes les séquences représentées dans les banques génétiques. De cette façon, la détectabilité de toutes les souches importantes a également été garantie.

De plus, la spécificité a été validée avec 100 échantillons de plasma différents négatif pour le CMV. Ceux-ci n'ont généré aucun signal avec les amorces et les sondes spécifiques au CMV intégrées au *CMV LC Master*.

Pour déterminer la spécificité du kit *artus* CMV LC -PCR, le groupe contrôle indiqué dans le tableau suivant (voir Tableau 2) a été analysé pour rechercher une éventuelle réaction croisée. Aucun des agents pathogènes testés n'a été positif. Aucune réactivité croisée n'est apparue avec les infections mixtes.

Tableau 2 : Test de spécificité du kit avec un pathogène éventuellement apte à une réaction croisée.

Groupe contrôle	CMV (F1)	Contrôle interne (F3/Back-F1)
Herpèsvirus humain 1 (virus herpès simplex 1)	–	+
Herpèsvirus humain 2 (virus herpès simplex 2)	–	+
Herpèsvirus humain 3 (virus de la varicella-zona)	–	+
Herpèsvirus humain 4 (virus d'Epstein-Barr)	–	+
Herpèsvirus humain 6A	–	+
Herpèsvirus humain 6B	–	+
Herpèsvirus humain 7	–	+
Herpèsvirus humain 8 (virus herpès associé au sarcome de Kaposi)	–	+
Virus de l'hépatite A	–	+
Virus de l'hépatite B	–	+
Virus de l'hépatite C	–	+
Virus de l'immunodéficience humaine 1	–	+
Virus humain de la leucémie à cellules T 1	–	+
Virus humain de la leucémie à cellules T 2	–	+
Virus du Nil occidental	–	+
Entérovirus	–	+
Parvovirus B 19	–	+

11.3 Précision

Les données de précision du kit *artus* CMV LC PCR ont été recueillies à l'aide de l'appareil *LightCycler 1.1/1.2/1.5* et permettent de déterminer la variance totale de l'essai. 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). Les données obtenues ont été utilisées pour déterminer l'écart-type, la variance et le coefficient de variation

aussi bien pour la PCR spécifique du pathogène que pour la PCR du *Contrôle interne*.

Les données de précision du kit *artus* CMV LC PCR ont été recueillies à l'aide de la *norme de quantification* ayant la plus faible concentration (QS 4 ; 10 copies/ μ l). Les essais ont été exécutés en huit séries. L'interprétation des résultats a été effectuée à partir des valeurs Ct des courbes d'amplification (Ct : *cycle de seuil*, voir Tableau 3). En outre, les données de précision des résultats quantitatifs en copies/ μ l ont été établies à partir des valeurs Ct correspondantes (voir Tableau 4). Sur la base de ces résultats, la variance totale d'un échantillon de concentration donnée est donc de 2,47 % (Ct) ou 14,06 % (conc.), et pour la détection du *contrôle interne* de 5,31 % (Ct). Ces valeurs sont basées sur l'ensemble de chacune des valeurs des variabilités déterminées.

Tableau 3: Données de précision à partir des valeurs Ct.

	Écart type	Variance	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai : <i>CMV QS 4</i>	0,14	0,02	0,68
Variabilité intra-essai : <i>Contrôle interne</i>	0,04	0,00	0,32
Variabilité inter-essai : <i>CMV QS 4</i>	0,21	0,04	1,00
Variabilité inter-essai : <i>Contrôle interne</i>	0,14	0,02	1,18
Variabilité inter-lot : <i>CMV QS 4</i>	0,54	0,30	2,50
Variabilité inter-lot : <i>Contrôle interne</i>	0,72	0,52	5,73
Variance totale : <i>CMV QS 4</i>	0,53	0,28	2,47
Variance totale : <i>Contrôle interne</i>	0,64	0,41	5,31

Tableau 4 : Données de précision à partir des résultats quantitatifs (en copies/ μ l).

	Écart type	Variance	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai : CMV QS 4	1,02	1,05	10,18
Variabilité inter-essai : CMV QS 4	1,35	1,81	13,35
Variabilité inter-lot : CMV QS 4	1,64	2,69	16,19
Variance totale : CMV QS 4	1,42	2,02	14,06

11.4 Fiabilité

La vérification de la fiabilité permet de déterminer le taux d'échec total du kit *artus* CMV LC PCR. Dans 100 échantillons de plasma négatifs pour le CMV, on inocule de l'ADN de CMV à la concentration finale de 170 copies/ml (environ trois fois la concentration de la limite de sensibilité analytique). Après extraction avec le kit QIAamp DSP Virus (voir **8.2 Extraction de l'ADN**), ces échantillons sont analysés avec le kit *artus* CMV LC PCR. Le taux d'échec pour le CMV était de 0 % pour la totalité des échantillons. En outre, la fiabilité du *contrôle interne* a été vérifiée par la procédure d'extraction et par l'analyse de 100 échantillons de plasma négatifs pour le CMV. La fiabilité du kit *artus* CMV LC PCR est donc de ≥ 99 %.

11.5 Reproductibilité

Les données de reproductibilité sont fournies dans le but de procéder à une évaluation régulière de la performance du kit *artus* CMV LC PCR et d'en comparer l'efficacité avec d'autres produits. Ces données proviennent de programmes d'étude de performance établis.

11.6 Évaluation diagnostique

Le kit *artus* CMV LC PCR a fait l'objet d'une étude d'évaluation. En comparant le kit *artus* CMV LC PCR au test COBAS® AMPLICOR® CMV MONITOR® Test, 177 échantillons cliniques de plasma sur EDTA ont été soumis à une étude rétrospective et prospective. Dans un premier temps, tous les échantillons ont été évalués positifs ou négatifs à l'aide du test COBAS AMPLICOR CMV MONITOR dédié aux diagnostics de routine.

Les échantillons destinés au kit *artus* CMV LC PCR ont été isolés en ajoutant le *contrôle interne* du kit *artus* CMV LC PCR et en utilisant le kit QIAamp DSP Virus, puis analysés sur l'appareil *LightCycler*. Les échantillons destinés au test COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test ont été isolés et analysés selon les instructions du fabricant fournies dans la notice d'emballage.

Les 11 échantillons définis comme positifs avec le test COBAS AMPLICOR CMV MONITOR étaient également évalués positifs avec le kit *artus* CMV LC PCR. Les 144 échantillons définis comme négatifs avec le test COBAS AMPLICOR CMV MONITOR étaient également évalués négatifs avec le kit *artus* CMV LC PCR. 22 résultats discordants ont été obtenus. Les résultats sont présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Résultats de l'étude comparative de validation.

Test COBAS AMPLICOR CMV MONITOR				
		+	-	Total
Kit <i>artus</i> CMV LC PCR	+	11	22	33
	-	0	144	144

En utilisant les résultats du test COBAS AMPLICOR CMV MONITOR comme référence, la sensibilité diagnostique du kit *artus* CMV LC PCR est de 100 % pour tous les échantillons, et la spécificité diagnostique de 86,7%.

Une analyse complémentaire portant sur 22 échantillons discordants confirme les résultats obtenus avec les kits de PCR *artus*. Il peut donc être déduit que cette discordance est attribuable à la plus grande sensibilité du kit *artus* CMV LC PCR.

12. Limites d'utilisation

- L'utilisation de ce produit est uniquement réservée à un personnel spécialement formé aux procédures de diagnostic in vitro.
- Il faut se conformer strictement au manuel d'utilisation pour obtenir des résultats de PCR optimaux.
- Il convient de porter une attention particulière aux dates limites d'utilisation imprimées sur la boîte et les étiquettes de tous les composants. Ne pas utiliser de composants ayant expiré.
- Bien que rares, les mutations au sein des zones hautement conservées du génome viral traitées par les amorces et/ou la sonde du kit peuvent entraîner une sous-quantification ou un échec de la détection du virus dans ces cas-là. La validité et la performance du format d'analyse sont contrôlées à intervalles réguliers.

13. Informations de sécurité

Lors de la manipulation de produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, veuillez consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Elles sont disponibles en ligne au format PDF à l'adresse www.qiagen.com/safety où vous pouvez trouver, consulter et imprimer les FDS de chaque kit et composant de kit QIAGEN®.

Mettre au rebut les déchets d'échantillons et de tests conformément aux règles de sécurité locales.

14. Contrôle qualité

En accord avec le Quality Management System QIAGEN certifié ISO, chaque lot de kit *artus* CMV LC PCR a été testé conformément aux spécifications prédéterminées afin d'assurer une qualité constante du produit.

15. Références

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.

16. Symboles



À utiliser avant



Numéro de lot



Fabricant



Référence



Référence du matériel



Manuel



Dispositif médical de diagnostic in vitro



Composants



Contient



Nombre



Code d'article international



<N>

Contient suffisamment de réactifs pour <N> tests



Limite de température



Lire les informations dans le manuel

QS

Norme de quantification

IC

Contrôle interne

Mg-Sol

Solution de magnésium

Page laissée volontairement vierge

Kit *artus* CMV LC PCR

Marques de commerce et clauses de responsabilité
 QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, BioRobot®, EASY*artus*®, EZ1® (Groupe QIAGEN) ; *LightCycler*®,
 AMPLICOR®, COBAS®, MONITOR® (Roche Diagnostics GmbH).

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.

L'ACHAT DE CE PRODUIT CONCÈDE À L'ACHETEUR, DANS LE CADRE DES BREVETS AMERICAINS n° 6 174 670, n° 7 160 998, n° 6 569 627 ET n° 6 245 514 ET DE LEURS CONTREPARTIES ÉTRANGÈRES, LE DROIT DE L'UTILISER UNIQUEMENT EN VUE D'OFFRIR DES SERVICES DE DIAGNOSTIC HUMAIN ET ANIMAL 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.

Pour obtenir les dernières informations sur la licence et les clauses de responsabilité spécifiques des produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN approprié. Les manuels des kits et manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès des Services techniques QIAGEN ou du distributeur local.

Accord de licence limitée

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur du kit *artus* CMV LC PCR consent aux termes suivants :

1. Le kit *artus* CMV LC PCR ne doit être utilisé que conformément au manuel du kit *artus* CMV LC PCR (*artus* CMV LC PCR Kit Handbook) et uniquement 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 le manuel du kit *artus* CMV LC PCR (*artus* CMV LC PCR Kit Handbook) et autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com.
2. Hormis les licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou son(s) 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 toutes autres licences, expresses ou tacites, autres 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 par les termes précédents. QIAGEN peut faire appliquer des 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 les termes de licence mis à jour, voir www.qiagen.com .

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

1046903FR 148051746



Sample & Assay Technologies