

## **Mode d'emploi**

**RealStar<sup>®</sup>**

**Parvovirus B19 PCR Kit 1.2**

11/2017 FR



# RealStar<sup>®</sup>

## Parvovirus B19 PCR Kit 1.2

Pour utilisation avec

SmartCycler<sup>®</sup> II (Cepheid)

LightCycler<sup>®</sup> 1.2/1.5/2.0 Instruments (Roche)



101212



48



11 2017



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

## Sommaire

<b>1.</b>	<b>Usage prévu.....</b>	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>Composants du kit.....</b>	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>Conservation .....</b>	<b>6</b>
<b>4.</b>	<b>Matériel requis non fourni .....</b>	<b>7</b>
<b>5.</b>	<b>Informations générales.....</b>	<b>8</b>
<b>6.</b>	<b>Description du produit.....</b>	<b>8</b>
6.1	Instruments de PCR en temps réel .....	10
<b>7.</b>	<b>Mises en garde et précautions.....</b>	<b>10</b>
<b>8.</b>	<b>Mode d'emploi .....</b>	<b>12</b>
8.1	Préparation du prélèvement.....	12
8.2	Préparation du Mastermix.....	13
8.3	Préparation de la réaction.....	15
<b>9.</b>	<b>Programmation des instruments de PCR en temps réel.....</b>	<b>15</b>
9.1	Paramètres.....	16
9.2	Marqueurs de fluorescence (fluorophores) .....	16
9.3	Profil de température et acquisition du fluorophore .....	17
<b>10.</b>	<b>Analyse des données .....</b>	<b>17</b>
10.1	Validation des tests de diagnostic.....	17
10.1.1	Validité des tests de diagnostic (qualitatif) .....	17
10.1.2	Invalidité des tests de diagnostic (qualitatif).....	18
10.1.3	Validité des tests de diagnostic (quantitatif) .....	18
10.1.4	Invalidité des tests de diagnostic (quantitatif) .....	19
10.2	Interprétation des résultats.....	19
10.2.1	Analyse qualitative .....	19

10.2.2 Analyse quantitative .....	20
<b>11. Evaluation des performances .....</b>	<b>21</b>
11.1 Sensibilité analytique .....	21
11.2 Spécificité analytique .....	22
11.3 Gamme de linéarité.....	23
11.4 Précision .....	25
<b>12. Limites.....</b>	<b>26</b>
<b>13. Contrôle qualité.....</b>	<b>26</b>
<b>14. Assistance technique .....</b>	<b>27</b>
<b>15. Bibliographie .....</b>	<b>27</b>
<b>16. Marques déposées et responsabilité .....</b>	<b>27</b>
<b>17. Explications des symboles .....</b>	<b>29</b>

## 1. Usage prévu

Le kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.2 est un test de diagnostic *in vitro*, basé sur la technologie de PCR en temps réel, pour la détection et la quantification de l'ADN spécifique du parvovirus B19.

## 2. Composants du kit

Couleur du bouchon	Composants	Nombre de tubes	Volume [µL/tube]
Bleu	Master A	4	60
Violet	Master B	4	120
Vert	Internal Control	1	1000
Rouge	QS1-4*	4	250
Blanc	Water (PCR grade)	1	500

\* Le kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.2 contient des étalons de quantification (QS) à quatre concentrations différentes (voir le chapitre 6. Description du produit)

Internal Control = Contrôle interne

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

## 3. Conservation

- Le kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.2 est expédié sous glace carbonique. Les composants du kit doivent arriver congelés. Si un ou plusieurs composants ne sont pas congelés à réception, ou si l'un des tubes a été endommagé pendant le transport, merci de contacter altona Diagnostics GmbH pour assistance.
- Tous les composants doivent être conservés entre -25°C et -15°C dès leur livraison.
- Il convient d'éviter des cycles répétés de congélation-décongélation (plus de deux) car cela peut affecter les performances du test. Les réactifs doivent être congelés en aliquots en cas d'utilisation occasionnelle.

- La conservation entre +2°C et +8°C ne doit pas excéder une période de deux heures.
- Le Master A et le Master B doivent être conservés à l'abri de la lumière.

#### 4. Matériel requis non fourni

- Instrument adapté à la PCR en temps réel (Chapitre 6.1 Instruments de PCR en temps réel)
- Système ou kit approprié à l'extraction des acides nucléiques (voir chapitre 8.1 Préparation du prélèvement)
- Centrifugeuse de paillasse avec rotor pour des tubes réactionnels de 2 mL
- Mini Centrifugeuse avec un rotor destiné à des tubes de réaction Céphéide
- Vortex
- LightCycler® capillaires a avec le matériel correspondante
- Des tubes de réaction de Cepheid pour le SmartCycler® II
- Pipettes (réglables)
- Cônes avec filtres (jetables)
- Gants non talqués (jetables)

#### NOTE



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

## 5. Informations générales

Le Parvovirus B19, également appelé *érythrovirus B19*, fut le premier virus humain connu dans la famille des parvovirus et du genre *érythrovirus*. Il s'agit d'un virus icosaoédrique non-enveloppé, qui contient un génome d'ADN à simple brin linéaire.

Le Parvovirus B19 provoque une éruption cutanée de l'enfance appelée la cinquième maladie ou érythème infectieux qui est communément nommé syndrome de la joue giflée. Le Parvovirus B19 est une cause majeure de la crise aplasique chez les patients atteints d'anémie hémolytique. De graves complications foetales peuvent être observées, notamment à la suite des infections maternelles durant les deuxième et troisième trimestres.

Trois génotypes distincts de Parvovirus B19 ont été identifiés, dont l'identité des nucléotides peut varier jusqu'à 15%. Basé sur l'analyse de séquences et des propriétés biologiques, le Comité international de taxonomie des virus a classé les représentants des trois génotypes (génotype I-III) comme espèces du Parvovirus B19. En Europe, les exigences réglementaires précisent que les pools de plasma utilisés dans la production d'immunoglobulines anti-D et le plasma traité pour l'inactivation des virus sont testés quant aux taux en ADN du Parvovirus B19. Ces pools de plasma ne doivent pas dépasser un seuil de concentration de 10 UI/µl en ADN du Parvovirus B19, tels que défini par l'OMS (2<sup>ème</sup> code NIBSC 99/802).

## 6. Description du produit

Le kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.2 est un test de diagnostic *in vitro*, basé sur la technologie de PCR en temps réel, pour la détection et la quantification de l'ADN spécifique du parvovirus B-19.

Le kit comprend un système d'amplification hétérologue (contrôle interne) afin d'identifier d'éventuelles inhibitions de la PCR et de confirmer l'intégrité des réactifs du kit.

Le test repose sur la technologie de PCR en temps réel, utilisant une réaction en



chaîne par polymérase (PCR) pour l'amplification de séquences cibles spécifiques et de sondes cibles spécifiques pour la détection de l'ADN amplifié. Les sondes sont marquées avec un marqueur fluorescent (reporter) et un désactivateur (quencher).

Les sondes spécifiques de l'ADN du PVB-19 sont marquées par le fluorophore FAM™. La sonde spécifique du contrôle interne est marquée par un fluorophore qui montrent les mêmes caractéristiques que le Cy®3.

L'utilisation de sondes associées à des fluorophores différents permet la détection en parallèle de l'ADN spécifique du PVB-19 et du contrôle interne dans les canaux correspondants de l'instrument de PCR en temps réel.

Le test consiste en deux processus réalisés dans un même tube réactionnel:

- L'amplification par PCR de l'ADN et du contrôle interne
- La détection simultanée des amplicons de PCR par des sondes marquées par un fluorophore

Le kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.2 est composé de:

- Deux Masters (Master A et Master B)
- Un contrôle interne
- Quatre étalons (QS1 - QS4)
- De l'eau ultra-pure (pour biologie moléculaire)

Les réactifs du Master A et du Master B contiennent tous les composants nécessaires (tampon PCR, ADN Polymérase, sel de magnésium, amorces et sondes) afin de réaliser l'amplification par PCR et la détection de la cible ADN spécifique du PVB-19 ainsi que du contrôle interne en une seule étape de réaction.

Les étalons contiennent des concentrations standardisées en ADN spécifique du PVB-19. Ces étalons ont été calibrés selon le 2<sup>ème</sup> standard international de l'OMS pour les techniques d'amplification des acides nucléiques du parvovirus B-19 (code NIBSC: 99/802). Les étalons de quantification peuvent être utilisés séparément

comme contrôles positifs, ou ensemble pour générer une **courbe d'étalonnage**, afin de déterminer la concentration en ADN spécifique du PVB-19.

Les concentrations suivantes sont utilisées:

Étalon	Concentration [UI/μL]
QS1	1,00E+04
QS2	1,00E+03
QS3	1,00E+02
QS4	1,00E+01

### 6.1 Instruments de PCR en temps réel

Le kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.2 a été développé et validé pour être utilisé avec les instruments de PCR en temps réel suivants:

- SmartCycler® II (Cepheid)
- LightCycler® 1.2/1.5/2.0 Instruments (Roche)

## 7. Mises en garde et précautions

*Lire attentivement le manuel d'utilisation avant d'utiliser le produit.*

- Avant toute utilisation, veuillez vérifier que le produit et ses composants:
  - Ne sont pas endommagés,
  - Sont complets: nombre, type et volume (voir le chapitre 2. Composants du kit)
  - Sont correctement étiquetés,
  - Sont congelés à la réception

- L'utilisation de ce produit est limitée au personnel qualifié et formé aux techniques de PCR en temps réel et aux procédures de diagnostic *in vitro*.
- Manipuler les échantillons comme s'ils étaient infectieux et/ou dangereux, en accord avec les procédures de sécurité en vigueur dans le laboratoire.
- Porter des gants jetables non talqués, une blouse de laboratoire et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons.
- Éviter les contaminations microbiennes et nucléaires (par ADNase/ARNase) de l'échantillon et des composants du kit.
- Toujours utiliser des pipettes à cônes jetables avec filtre, non contaminées par de l'ADNase et de l'ARNase.
- Toujours porter des gants de protection non talqués lors de la manipulation des composants du kit.
- Utiliser des zones de travail séparées les unes des autres pour les différentes activités de (i) préparation des échantillons, (ii) préparation de la réaction et (iii) les étapes d'amplification/détection. Le sens de travail dans le laboratoire doit être unidirectionnel. Porter des gants dans chaque zone de travail et les changer avant d'entrer dans une zone différente.
- Dédier des fournitures et du matériel pour chaque zone de travail et ne pas les déplacer d'une zone à une autre.
- Conserver le matériel positif et/ou potentiellement positif séparément des autres composants du kit.
- Des témoins additionnels peuvent devoir être testés selon les directives des organisations locales/gouvernementales ou des organismes d'accréditation.
- Ne pas ouvrir les tubes/plaques de réaction après l'amplification afin d'éviter les contaminations avec les amplicons.
- Ne pas autoclaver des tubes réactionnels après une PCR, car ceci ne dégrade pas les acides nucléiques amplifiés et risque de contaminer le laboratoire.
- Ne pas utiliser les composants au-delà de leur date de péremption.
- Éliminer les échantillons et les déchets de l'essai conformément aux règles de sécurité locales.

## 8. Mode d'emploi

### 8.1 Préparation du prélèvement

L'ADN extrait constitue le matériel de départ pour le kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.2.

La qualité de l'ADN extrait a un impact significatif sur la performance de l'ensemble du test. Il est important de s'assurer que le système d'extraction des acides nucléiques utilisé est compatible avec la technologie de PCR en temps réel. Les kits et systèmes suivants sont compatibles pour l'extraction des acides nucléiques:

- QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIAasymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

D'autres kits ou systèmes d'extraction des acides nucléiques peuvent être appropriés. L'aptitude de la procédure d'extraction des acides nucléiques à utiliser avec RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.2 doit être validé par l'utilisateur.

Si la préparation des échantillons s'effectue sur une colonne comportant des tampons de lavage à l'éthanol, une étape de centrifugation supplémentaire de 10 minutes à environ 17000 x g (~ 13000 tr/min), dans un nouveau tube à essai, est vivement recommandée avant l'élution des acides nucléiques.

**ATTENTION**

*L'éthanol est un fort inhibiteur de la PCR en temps réel. Si votre système de préparation des échantillons utilise des tampons de lavage à l'éthanol, assurez-vous d'éliminer toute trace d'éthanol avant de procéder à l'élution des acides nucléiques.*

**ATTENTION**

*L'utilisation d'ARN porteur (carrier) est crucial pour l'efficacité de l'extraction et la stabilité des acides nucléiques extraits.*

Pour toute information complémentaire ou assistance technique sur le prétraitement et la préparation des échantillons, merci de contacter notre support technique (voir chapitre 14. Assistance technique).

## 8.2 Préparation du Mastermix

Tous les réactifs doivent être complètement décongelés, homogénéisés (par pipetage ou léger vortexage) et brièvement centrifugés avant utilisation.

Le kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.2 contient un contrôle interne hétérologue pouvant être utilisé soit comme contrôle d'inhibition de la PCR soit comme contrôle de la préparation de l'échantillon (extraction des acides nucléiques) et de l'inhibition de la PCR.

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

Nombre de réactions (rxns)	1	12
Master A	5 µL	60 µL
Master B	10 µL	120 µL
Internal Control (contrôle interne)	1 µL	12 µL
<b>Volume de Mastermix</b>	<b>16 µL</b>	<b>192 µL</b>

- ▶ Si le contrôle interne est utilisé comme contrôle de préparation de l'échantillon, et d'inhibition de la PCR, le contrôle interne doit être ajouté au moment de la procédure d'extraction des acides nucléiques.
- ▶ Quelque soit la méthode ou le système utilisé pour l'extraction des acides nucléiques, le contrôle interne ne doit **jamais** être ajouté directement à l'échantillon. Le contrôle interne doit toujours être ajouté au mélange échantillon/ tampon de lyse. Le volume du contrôle interne à ajouter dépend toujours et uniquement du volume d'élution, dont il représente 10%. Par exemple si les acides nucléiques doivent être élués dans 60 µL de tampon d'élution ou d'eau, 6 µL de contrôle interne par échantillon doivent être ajoutés au mélange échantillon/tampon de lyse.
- ▶ Si le contrôle interne a été ajouté pendant la phase de préparation de l'échantillon, le Mastermix doit être préparé selon le schéma de pipetage suivant:

Nombre de réactions (rxns)	1	12
Master A	5 µL	60 µL
Master B	10 µL	120 µL
<b>Volume de Mastermix</b>	<b>15 µL</b>	<b>180 µL</b>

**ATTENTION**



*Si le contrôle interne a été ajouté pendant la phase de préparation de l'échantillon, au moins le contrôle négatif doit inclure le contrôle interne.*

**ATTENTION**



*Ne jamais ajouter le contrôle interne directement à l'échantillon.*

### 8.3 Préparation de la réaction

- ▶ Pipeter 15 µL de Mastermix dans chaque tubes capillaire du LightCycler® ou dans les tubes de réaction pour le Smart Cycler® II.
- ▶ Ajouter 10 µL d'échantillon (éluat issu de l'extraction des acides nucléiques) ou 10 µL des contrôles (étalons, contrôles positifs ou négatifs).

Préparation de la réaction	
Mastermix	15 µL
Echantillon ou contrôle	10 µL
<b>Volume total</b>	<b>25 µL</b>

- ▶ S'assurer qu'au moins un contrôle positif (QS) et un contrôle négatif sont utilisés par essai.
- ▶ Pour une quantification, tous les étalons (QS1-4) doivent être utilisés.
- ▶ Homogénéiser avec soin les échantillons et les contrôles avec le Mastermix par pipetage.
- ▶ Couvrir les capillaires ou les tubes de réaction e utilisant les bouchons convenables.
- ▶ Centrifugez les capillaires de LightCycler® ou les tubes de réaction de Smart Cycler® II, en utilisant une centrifuge appropriée pendant 30 secondes à environ ~ 400 x g (~ 2000 rpm).

## 9. Programmation des instruments de PCR en temps réel

Pour obtenir des informations générales sur la préparation et la programmation des différents instruments de PCR en temps réel, veuillez consulter les manuels d'utilisation des instruments respectifs.

Pour des instructions sur la programmation relative à l'utilisation du kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.2 avec un instrument de PCR en temps réel spécifique, merci de contacter notre support technique (voir chapitre 14. Assistance technique).

## 9.1 Paramètres

- Définir les paramètres suivants:

Paramètres	
Volume de réaction	25 µL *
Vitesse de la rampe	par défaut

\* Le volume de réaction doit être défini comme 20µL, si vous utilisez un instrument LightCycler® 2.0 (Roche).

## 9.2 Marqueurs de fluorescence (fluorophores)

- Définir les marqueurs de fluorescence (fluorophores):

Cible	LightCycler® 1.2/1.5	LightCycler® 2.0	SmartCycler® II
ADN spécifique du PVB-19	F1	530	FAM™
Internal Control (contrôle interne)	F2	610	Cy®3

### ATTENTION



*Pour une analyse précise des données sur les instruments LightCycler®, un fichier de compensation de couleur spécifique peut être nécessaire. Veuillez contacter Altona Diagnostics GmbH pour obtenir de l'aide.*

### ATTENTION



*Si vous utilisez l'instrument LightCycler® 2.0, seuls les canaux de détection 530 et 610 doivent être activés pour la correction des couleurs.*



### 9.3 Profil de température et acquisition du fluorophore

- Définir le profil de température et l'acquisition du fluorophore:

	Mode d'analyse	Répétitions de cycle	Acquisition	Température [°C]	Durée [min:sec]
Dénaturation	aucun	1	-	95	02:00
Amplification	Quantification	45	aucun	95	00:05
			unique	60	00:30
			aucun	72	00:10
Refroidissement	aucun	1	-	40	00:30

## 10. Analyse des données

Pour des informations de base concernant l'analyse des données sur un instrument de PCR en temps réel spécifique, merci de se référer au manuel de l'instrument concerné.

Pour des informations détaillées concernant l'analyse des données générées avec le kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.2 sur différents instruments de PCR en temps réel, merci de contacter notre support technique (voir chapitre 14. Assistance technique).

### 10.1 Validation des tests de diagnostic

#### 10.1.1 Validité des tests de diagnostic (qualitatif)

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

Nom du Contrôle	Canal de détection	
	FAM™/F1/530	Cy®3/F2/610
Contrôle positif (QS)	+	+/-*
Contrôle négatif	-	+

\* La présence ou l'absence d'un signal dans le canal Cy®3/F2/610 n'est pas pertinente pour la validité de l'essai

### 10.1.2 Invalidité des tests de diagnostic (qualitatif)

Un test de diagnostic **qualitatif** est **invalide**, (i) si l'essai n'est pas complet ou (ii) si l'ensemble des conditions de contrôle pour un test de diagnostics **valide** n'est pas obtenu.

En cas d'**invalidité** du test de diagnostic, répéter le test avec les acides nucléiques purifiés restants ou recommencer depuis l'échantillon de départ.

### 10.1.3 Validité des tests de diagnostic (quantitatif)

La **validité quantitative** des tests de diagnostic est assurée, si toutes les conditions de contrôle d'un test de diagnostic qualitatif valide sont 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 doivent être obtenus:

Paramètres de contrôle	Valeur valide
R carré (R <sup>2</sup> )	≥ 0,98

**NOTE**

*Tous les instruments de PCR en temps réel ne présentent pas la valeur R carré ( $R^2$ ). Pour plus d'information, merci de vous référer aux manuels d'utilisation des instruments respectifs.*

**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 l'ensemble des conditions de contrôle pour un test de diagnostic valide ne sont pas obtenus.

En cas d'**invalidité** du test de diagnostic, répéter le test avec les acides nucléiques purifiés restant ou recommencer depuis l'échantillon de départ.

**10.2 Interprétation des résultats****10.2.1 Analyse qualitative**

Canal de détection		Interprétation des résultats
FAM™/F1/530	Cy®3/F2/610	
<b>+</b>	<b>+*</b>	ADN spécifique du PVB-19 détecté.
<b>-</b>	<b>+</b>	ADN spécifique du PVB-19 non détecté. L'échantillon ne contient pas de quantités détectables d'ADN du PVB-19.
<b>-</b>	<b>-</b>	Inhibition de la PCR ou défaillance des réactifs. Répéter le test à partir de l'échantillon d'origine ou bien prélever et tester un nouvel échantillon.

\* La détection du contrôle interne dans le canal de détection Cy®3/F2/610 n'est pas requise pour des résultats positifs dans le canal de détection FAM™/F1/530. De fortes charges en ADN spécifique du PVB-19 dans l'échantillon peuvent conduire à des signaux absents ou très faibles pour le contrôle interne.

## 10.2.2 Analyse quantitative

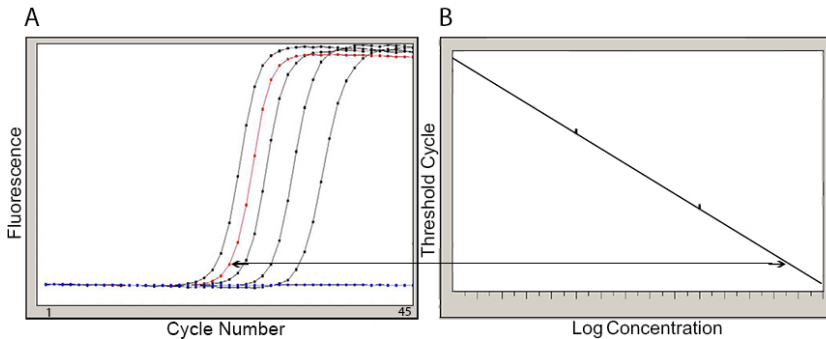
Le kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.2 fournit quatre étalons (QS). Afin de générer une **courbe d'étalonnage** pour les analyses quantitatives, les QS doivent être définis comme des **standards** de concentrations définies (Chapitre 6. Description du Produit), afin de générer la courbe d'étalonnage.

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

$C_t$  = Cycle seuil  
 $m$  = Pente  
 $N_0$  = Concentration initiale  
 $b$  = interception

A partir de la courbe d'étalonnage, la concentration des échantillons inconnus peut être déterminée avec la formule suivante:

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



**Figure 1:** [A] Etalons de quantification (en noir), un échantillon positif (en rouge) et un échantillon négatif (en bleu) dans l'écran d'amplification; [B] analyse de la courbe d'étalonnage

**NOTE**

**La concentration de "l'échantillon" est affichée en UI/μL et se réfère à la concentration dans l'éluat.**

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

$$\text{Charge Virale (échantillon) [UI/ mL]} = \frac{\text{Volume (Eluat) [\mu L]} \cdot \text{Charge Virale (Eluat) [UI/\mu L]}}{\text{Volume d'échantillon [mL]}}$$

## 11. Evaluation des performances

L'évaluation des performances du kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.2 a été effectuée en utilisant de l'ADN du PVB-19 quantifié en utilisant le 2<sup>eme</sup> WHO International Standard for Parvovirus B19 (NIBSC code: 99/802).

### 11.1 Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.2 est définie comme étant la concentration (UI/μL d'éluat) de molécules d'ADN spécifique du PVB-19 qui peuvent être détectées avec un taux supérieur à 95%. La sensibilité analytique a été déterminée en analysant des dilutions en série d'une concentration définie en ADN spécifique du PVB-19.

**Tableau 1:** Résultats de PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique concernant la détection de l'ADN spécifique du PVB-19

[C] initiale [UI/μL]	Nombre de répétitions	Nombre de Positifs	Taux de réussite [%]
3,162	12	12	100
1,000	12	12	100
0,316	12	11	92
0,100	12	11	92
0,032	12	6	50
0,010	12	6	50
0,003	12	2	17
0,001	12	2	17
0,0003	12	0	0

La sensibilité analytique du kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.2 a été déterminée par analyse Probit.

- Pour la détection de l'ADN spécifique du PVB-19, la sensibilité analytique est de 0,36 UI/μL [95% intervalle de confiance (CI) : 0,14–1,81 UI/μL]

## 11.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.2 est assurée par une sélection minutieuse des oligonucléotides (amorces et sondes). Les séquences de ces derniers ont été comparées aux séquences publiques disponibles afin de s'assurer que toutes les souches intéressantes du parvovirus B-19 seront détectées.

La spécificité analytique du kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.2 a été évaluée en testant un panel d'ADN/ARN génomique extrait d'autres virus sanguins ou d'autres pathogènes chez les patients immunodéprimés.

Le kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.2 n'a présenté aucune réaction croisée

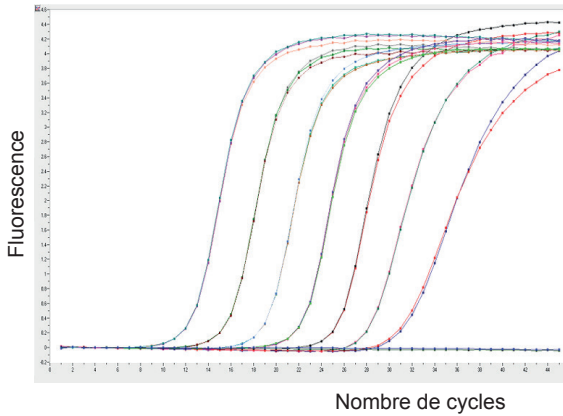
avec l'un des pathogènes spécifiés ci-dessous:

- Virus BK
- Cytomégalovirus
- Virus d'Epstein-Barr
- Virus de l'hépatite A
- Virus de l'hépatite B
- Virus de l'hépatite C
- Virus de l'herpès simplex 1
- Virus de l'herpès simplex 2
- Herpèsvirus humain 6A
- Herpèsvirus humain 6B
- Herpèsvirus humain 7
- Herpèsvirus humain 8
- Virus de l'immunodéficience humaine 1
- JC virus
- Virus de la varicelle et du zona

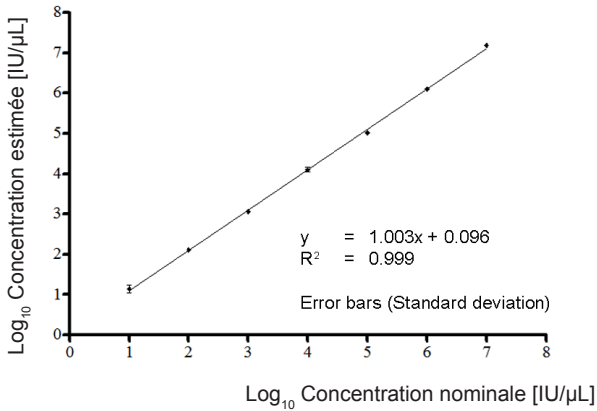
### **11.3 Gamme de linéarité**

La gamme de linéarité du kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.2 a été évaluée par l'analyse d'une série de dilutions logarithmiques d'ADN spécifique du PVB-19 en utilisant des concentrations variant de 1,00E+07 à 1,00E+01 UI/μL. Au moins huit réplicats par dilution ont été analysés.

**A**



**B**



**Figure 2:** Courbes d'amplification **[A]** et régression linéaire **[B]** des dilutions en série analysées de l'ADN spécifique du la PVB-19

La gamme de linéarité du kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.2 s'étend sur un intervalle d'au moins **sept** ordres de grandeur.



## 11.4 Précision

Les données de précision du kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.2 ont été déterminées comme étant la variabilité intra-essai (variabilité au sein d'une expérience), la variabilité inter-essai (variabilité entre différentes expériences) et la variabilité interlot (variabilité entre différents lots de production). La variabilité totale a été calculée en combinant les trois analyses.

La variabilité des données est exprimée en terme d'écart type et de coefficient de variation. Les données sont basées sur l'analyse quantitative des concentrations définies en ADN spécifique du PVB-19 et sur la valeur seuil du cycle ( $C_t$ ) du Contrôle interne. Pour déterminer la variabilité intra-essai, la variabilité inter-essai et la variabilité inter-lot, au moins six réplicats par échantillon ont été analysés.

**Tableau 2:** Données de précision pour l'ADN spécifique du Parvovirus B19

PVB-19	Conc. moyenne [UI/ $\mu$ L]	Ecart type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	105,55	3,35	3,18
Variabilité inter-essai	105,49	5,43	5,15
Variabilité inter-lot	103,77	3,83	3,69
Variabilité totale	104,32	5,09	4,88

**Tableau 3:** Données de précision pour le Contrôle interne

Internal Control	Valeurs $C_t$ moyennes	Ecart type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	24,96	0,10	0,40
Variabilité inter-essai	24,79	0,20	0,79
Variabilité inter-lot	25,22	0,28	1,12
Variabilité totale	25,02	0,37	1,47

## 12. Limites

- Une stricte conformité aux instructions d'utilisation est nécessaire afin d'obtenir les meilleurs résultats.
- L'utilisation de ce produit est limitée au personnel qualifié et formé aux techniques de PCR en temps réel et aux procédures de diagnostic *in vitro*.
- Le respect des bonnes pratiques de laboratoire est essentiel pour garantir le bon fonctionnement de ce test. Une attention particulière doit être apportée à la préparation des échantillons afin de préserver la pureté des composants du kit. Tous les réactifs doivent faire l'objet d'une surveillance étroite afin d'éviter des impuretés et des contaminations. Tout réactif suspect doit être éliminé.
- Il est nécessaire de respecter les procédures de prélèvement, de transport, de conservation et de traitement des échantillons afin d'assurer les performances optimales du test.
- Ce test n'est pas destiné à être utilisé directement sur l'échantillon. Des méthodes appropriées d'extraction des acides nucléiques doivent être employées avant son utilisation.
- La présence d'inhibiteurs de PCR (p.ex. héparine) peuvent induire une sous-quantification, des résultats faussement positifs ou invalides.
- De potentielles mutations dans les zones cibles du génome du PVB-19 couvertes par les amorces et/ou sondes utilisées dans ce kit peuvent induire une sous-quantification et/ou une détection erronée de la présence du pathogène.
- Le RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.2 est un test de diagnostic. En conséquence, ses résultats doivent être interprétés en prenant en considération l'ensemble des symptômes cliniques et des résultats obtenus en laboratoire.

### 13. Contrôle qualité

Conformément au système de management de la qualité d'Altona Diagnostics GmbH, certifié ISO EN 13485, chaque lot du RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.2 est testé selon des spécifications prédéfinies afin de garantir une qualité constante des produits.

### 14. Assistance technique

Pour obtenir une assistance sur nos produits, merci de contacter notre support technique:

**e-mail:**                    **support@altona-diagnostics.com**

**téléphone:**                **+49-(0)40-5480676-0**

### 15. Bibliographie

Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Third Edition. Mosby, 2010.

## 16. Marques déposées et responsabilité

RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); SmartCycler® (Cepheid); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, MinElute®, QIASymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

Les noms et marques déposés cités dans ce document, même si non mentionnés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.
















Le kit RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.2 est un kit de diagnostic *in vitro* marqué CE conformément à la Directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs de diagnostic *in vitro*

Produit non homologué pour la vente par Santé Canada et n'ayant pas fait l'objet d'une notification (510(k)) ou d'une approbation (PMA) de pré-commercialisation par la FDA.

Produit distribué dans certains pays uniquement.

© 2017 altona Diagnostics GmbH; tous droits réservés.

## 17. Explications des symboles

Symbole	Explication
	Dispositif médical de diagnostic <i>In vitro</i>
	Numéro de lot
	Couleur du bouchon
	Référence produit
	Contenu
	Nombre
	Composant
	Code article international
	Lire les instructions d'utilisation
	Contient la quantité suffisante pour réaliser "n" tests (rxns)
	Limites de température
	À utiliser avant
	Fabricant
	Attention
	Note
	Version

**Notes:**

**Notes:**

**always a drop ahead.**

altona Diagnostics GmbH  
Mörkenstr. 12  
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0  
fax +49 40 548 0676 10  
e-mail [info@altona-diagnostics.com](mailto:info@altona-diagnostics.com)

[www.altona-diagnostics.com](http://www.altona-diagnostics.com)

