

Novembre 2019

Manuel d'artus[®] HHV-6 RG PCR Kit



96

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

IVD

CE

REF

4521265



altona Diagnostics GmbH,
Mörkenstraße 12, 22767 Hamburg, ALLEMAGNE

R5 MAT

1117341-FR

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

Sommaire

Utilisation prévue.....	4
Résumé et explication.....	4
Informations sur l'agent pathogène.....	4
Principe de la technique.....	5
Contenu du kit.....	6
Matériel nécessaire, mais non fourni.....	7
Avertissements et précautions.....	8
Avertissements.....	8
Précautions d'emploi.....	8
Stockage et manipulation des réactifs.....	9
Composants du kit.....	9
Procédure.....	11
Extraction de l'ADN.....	11
Protocole : Détection de l'ADN spécifique du HHV-6A et du HHV-6B.....	13
Interprétation des résultats.....	24
Validité du cycle.....	24
Analyse qualitative.....	25
Analyse quantitative.....	27
Limitations.....	29
Contrôle qualité.....	30
Caractéristiques de performance.....	30
Sensibilité analytique.....	30

Spécificité analytique.....	31
Plage linéaire.....	32
Précision	33
Évaluation diagnostique	35
Répétabilité	36
Symboles.....	37
Guide de résolution des problèmes.....	39
Référence	39
Pour commander	40

Utilisation prévue

artus HHV-6 RG PCR Kit (96) est un test diagnostique *in vitro* utilisant la technologie de real-time PCR pour détecter, différencier et quantifier l'ADN spécifique de l'herpèsvirus humain 6A (HHV-6A) et de l'herpèsvirus humain 6B (HHV-6B).

Résumé et explication

artus HHV-6 RG PCR Kit constitue un système prêt à l'emploi pour la détection de l'ADN spécifique du HHV-6A et du HHV-6B à l'aide de la technique de real-time PCR sur les appareils Rotor-Gene Q. Le dosage comporte un système d'amplification hétérologue (contrôle interne) qui permet d'identifier une possible inhibition de la PCR et de vérifier l'intégrité des réactifs du kit.

Informations sur l'agent pathogène

HHV-6 désigne collectivement deux virus étroitement apparentés, le HHV-6A et le HHV-6B. Ce sont deux des neuf herpèsvirus identifiés comme étant infectieux pour l'homme. Ils appartiennent au genre *Roseolovirus*, dans la sous-famille des *Betaherpesvirinae*. La primo-infection par le HHV-6 survient généralement pendant l'enfance, avant l'âge de deux ans. Les symptômes incluent fièvre, diarrhée et exanthème subit, une éruption cutanée plus connue sous le nom de roséole. Dans certains cas, l'infection initiale peut également entraîner des convulsions fébriles, une encéphalite ou des convulsions rebelles. Après la primo-infection, le virus persiste dans le corps à l'état latent.

Le virus HHV-6 latent peut se réactiver ultérieurement. Les manifestations cliniques de la réactivation peuvent affecter diverses zones du corps, telles que le cerveau, les poumons, le cœur, les reins et le tractus gastro-intestinal. La réactivation du HHV-6 dans les tissus cérébraux est associée à des troubles neurologiques et peut provoquer, dans de rares cas, altération cognitive, invalidité permanente et décès.

Alors que le HHV-6B provoque des manifestations cliniques chez les patients immunocompromis et chez les enfants aux États-Unis, au Japon et en Europe, le HHV-6A est prédominant chez les enfants en Afrique. Le HHV-6A est fréquemment retrouvé chez les patients atteints de maladies neurologiques chroniques, en particulier de maladies neuro-inflammatoires telles que la sclérose en plaques (SEP) et la rhomboencéphalite.

Principe de la technique

Les mélanges maîtres HHV-6 RG Master A et HHV-6 RG Master B contiennent des réactifs et des enzymes permettant d'amplifier spécifiquement des régions cibles présentes dans le génome du HHV-6A et du HHV-6B et de détecter directement l'amplicon spécifique dans les canaux de fluorescence Cycling Green et Cycling Red des appareils Rotor-Gene Q.

En outre, *artus* HHV-6 RG PCR Kit contient un système d'amplification hétérologue permettant d'identifier d'éventuels dysfonctionnements pendant le processus de dosage. Cette détection se fait sous la forme d'un contrôle interne (Internal Control, IC) dans le canal de fluorescence Cycling Yellow des appareils Rotor-Gene Q.

Les sondes spécifiques de l'ADN HHV-6A sont marquées avec le fluorochrome FAM™, tandis que les sondes spécifiques de l'ADN HHV-6B sont marquées avec un fluorochrome qui présente les mêmes caractéristiques que Cy®5. La sonde spécifique du contrôle interne est marquée avec le fluorochrome JOE™. L'utilisation de sondes marquées avec des fluorochromes spectralement différenciables permet de détecter et de quantifier simultanément l'ADN spécifique du HHV-6A et l'ADN spécifique du HHV-6B, ainsi que de détecter le contrôle interne dans les canaux correspondants de l'appareil Rotor-Gene Q.

Contenu du kit

artus HHV-6 RG PCR Kit		(96)
Numéro de référence		4521265
Nombre de réactions		96
Bleu	HHV-6 RG Master A	8 x 60 µl
Violet	HHV-6 RG Master B	8 x 180 µl
Vert	HHV-6 RG IC	1 x 1 000 µl
Rouge	HHV-6 RG QS*	4 x 250 µl
Blanc	H ₂ O	1 x 500 µl
	Manuel	1

*artus HHV-6 RG PCR Kit contient 4 étalons de quantification (Quantification Standards, QS1–QS4).

Matériel nécessaire, mais non fourni

Avant utilisation, s'assurer que les instruments ont été vérifiés et calibrés conformément aux recommandations du fabricant.

Réactifs

- QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, référence 51304 ou 51306 ; voir « Extraction de l'ADN », page 11)

Consommables

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

Équipement

- Appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex, Rotor-Gene Q 5plex ou Rotor-Gene Q 6plex
- Logiciel Rotor-Gene Q version 2.3.1 ou ultérieure
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, bloc en aluminium pour la préparation manuelle des tubes réactionnels (QIAGEN, référence 9018901)
- Pipettes réglables dédiées à la préparation des échantillons
- Pipettes réglables dédiées à la préparation du mélange maître de PCR
- Pipettes réglables dédiées à la distribution de l'ADN matriciel
- Agitateur vortex
- Centrifugeuse de paillasse avec rotor pour tubes réactionnels de 2 ml

Avertissements et précautions

Pour utilisation diagnostique *in vitro*.

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

Avertissements

Lors de la manipulation de produits chimiques, porter systématiquement une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats.

Précautions d'emploi

- L'utilisation de ce produit est réservée au personnel ayant reçu les instructions et la formation adéquates concernant les procédures de real-time PCR et de diagnostic *in vitro*.
- Les spécimens doivent toujours être traités comme infectieux et/ou présentant un risque biologique, conformément aux procédures de laboratoire habituelles.
- Porter des gants de protection jetables non poudrés, une blouse de laboratoire et des lunettes de protection lors de la manipulation des spécimens.
- Éviter toute contamination du spécimen et des composants du kit par les agents microbiens et les nucléases (DNase/RNase).
- Utiliser systématiquement des cônes de pipettes jetables exempts de DNase/RNase munis de barrières à aérosol.
- Porter systématiquement des gants de protection jetables non poudrés lors de la manipulation des composants du kit.
- Utiliser des zones de travail distinctes et isolées pour les tâches de préparation des spécimens, de préparation des tubes réactionnels et d'amplification/détection. Au laboratoire, le flux de travaux doit progresser dans une seule direction. Porter

systématiquement des gants jetables dans chaque zone et en changer avant d'entrer dans une autre zone.

- Dédier des consommables et un équipement aux différentes zones de travail et ne pas les déplacer d'une zone à une autre.
- Conserver les matières positives et/ou susceptibles de l'être séparées de tous les autres composants du kit.
- Ne pas ouvrir les tubes réactionnels/plaques après l'amplification afin d'éviter toute contamination des amplicons.
- Des contrôles supplémentaires peuvent être testés en fonction des directives ou exigences de réglementations locales, étatiques et/ou fédérales ou d'organismes d'accréditation.
- Ne pas utiliser les composants du kit ayant dépassé la date d'expiration.
- Mettre au rebut les déchets d'échantillons et de dosages conformément aux règles de sécurité locales.

Stockage et manipulation des réactifs

Composants du kit

artus HHV-6 RG PCR Kit est expédié sur carboglace. Les composants du kit doivent être livrés congelés. Si un ou plusieurs composants ne sont pas congelés à réception ou si des tubes ont été endommagés pendant le transport, contacter les services techniques de QIAGEN pour obtenir une assistance. Dès réception, conserver tous les composants du kit à une température comprise entre -30 °C et -15 °C.

Éviter de décongeler puis de recongeler les réactifs maîtres plus de deux fois, car cela peut nuire aux performances du dosage. Congeler les réactifs par aliquotes s'ils doivent être utilisés de manière intermittente. Ne pas conserver les réactifs à une température de 4 °C pendant plus de 2 heures. Conserver le mélange maître HHV-6 RG Master A et le mélange maître HHV-6 RG Master B à l'abri de la lumière.

artus HHV-6 RG PCR Kit comprend :

- Deux mélanges maîtres (HHV-6 RG Master A et HHV-6 RG Master B)
- Un contrôle interne de la matrice (HHV-6 RG IC)
- Quatre étalons de quantification (HHV-6 RG QS1–QS4)
- De l'eau de qualité PCR (H₂O)

Les étalons de quantification contiennent des concentrations normalisées d'ADN HHV-6. Ces étalons de quantification ont été étalonnés conformément à la première norme internationale de l'OMS pour l'ADN de l'herpèsvirus humain 6B (HHV-6B) (code NIBSC : 15/266) concernant les analyses avec technique d'amplification des acides nucléiques (NAT) (1).

Pour étalonner le matériel positif spécifique du HHV-6A de l'*artus* HHV-6 RG PCR Kit (96), un dosage de détection des acides nucléiques ne différenciant pas le HHV-6A et le HHV-6B (RealStar® HHV-4/-5/-6 PCR Kit 1.0) a été utilisé. L'étalonnage a été effectué avec un dosage en parallèle avec le matériel positif spécifique de HHV-6A et la première norme internationale de l'OMS concernant l'ADN de l'herpèsvirus humain 6B (HHV-6B). L'étalonnage a été confirmé avec l'*artus* HHV-6 RG PCR Kit (96).

Ces étalons de quantification peuvent être utilisés séparément en tant que contrôles positifs ou ensemble afin de générer une **courbe d'étalonnage**, qui peut servir à déterminer la concentration en ADN spécifique du HHV-6A et/ou du HHV-6B dans l'échantillon. La concentration des différents étalons de quantification est présentée dans le tableau 1.

Tableau 1. Concentration des étalons de quantification

Étalons de quantification	Concentration (UI/ μ l)	
	HHV-6A	HHV-6B
QS1	10 000	10 000
QS2	1000	1000
QS3	100	100
QS4	10	10

Procédure

Extraction de l'ADN

Les séquences cibles spécifiques du HHV-6A et du HHV-6B sont amplifiées à partir de l'ADN. Les performances du dosage étant tributaires de la qualité de l'ADN matriciel, veiller à utiliser un kit de préparation d'échantillons qui fournit de l'ADN adapté à la PCR en aval.

Le QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, référence 51304 ou 51306) est recommandé pour la purification de l'ADN en vue d'une utilisation avec *artus* HHV-6 RG PCR Kit. Effectuer la purification de l'ADN selon les instructions figurant dans le manuel du *QIAamp DNA Mini*.

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

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

Important : L'éthanol est un fort inhibiteur du processus de real-time PCR. Si le kit de préparation des échantillons utilise des tampons de lavage à base d'éthanol, veiller à éliminer toute trace d'éthanol avant l'élution des acides nucléiques.

Contrôle interne

L'*artus* HHV-6 RG PCR Kit contient un contrôle interne hétérologue qui peut être utilisé soit en tant que contrôle d'inhibition de la PCR, soit en tant que contrôle de la procédure de préparation des échantillons (extraction des acides nucléiques) et contrôle d'inhibition de la PCR (étape 2a, page 13).

Si le contrôle interne est utilisé en tant que contrôle d'inhibition de la PCR, mais pas en tant que contrôle de la procédure de préparation des échantillons, ajouter le contrôle interne directement dans le mélange de HHV-6 RG Master A et de HHV-6 RG Master B, comme décrit dans l'étape 2b du protocole (page 14).

Quels que soient la méthode ou le système utilisés pour extraire les acides nucléiques, le contrôle interne ne doit pas être ajouté directement au spécimen. Le contrôle interne doit toujours être ajouté au mélange spécimen/tampon de lyse. Le volume de contrôle interne à ajouter au mélange spécimen/tampon de lyse dépend uniquement du volume d'élution et représente 10 % de celui-ci. Par exemple, avec le QIAamp DNA Mini Kit, l'ADN est élué dans 60 µl de Buffer AE. Par conséquent, ajouter 6 µl de contrôle interne au mélange spécimen/tampon de lyse pour chaque échantillon.

Important : Ne pas ajouter le contrôle interne et l'ARN entraîneur (CARRIER) directement au spécimen.

Protocole : Détection de l'ADN spécifique du HHV-6A et du HHV-6B

Points importants avant de commencer

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

À faire avant de commencer

- Veiller à ce que le bloc réfrigérant (accessoire de l'appareil Rotor-Gene Q) ait été préalablement refroidi à 2–8 °C.
- Avant le début du test, décongeler complètement tous les réactifs à température ambiante, bien les mélanger (aspirer et rejeter plusieurs fois à l'aide de la pipette ou agiter brièvement à l'aide d'un vortex) et les centrifuger brièvement.

Procédure

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

Important : Si le contrôle interne a été ajouté pendant la procédure de préparation de l'échantillon, alors le contrôle négatif – qui n'est pas un échantillon négatif – doit inclure le contrôle interne au minimum.

- 2a. Le contrôle interne a déjà été ajouté au milieu d'isolement (voir « Contrôle interne », page 11). Dans ce cas, préparer un mélange maître, tel que décrit dans le tableau 2. Le mélange réactionnel contient typiquement tous les composants nécessaires à la PCR, à l'exception de l'échantillon.

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

Composant	1 réaction	12 réactions
HHV-6 RG Master A	5 µl	60 µl
HHV-6 RG Master B	15 µl	180 µl
Volume total	20 µl	240 µl

- 2b. Le contrôle interne doit être ajouté directement au mélange de HHV-6 RG Master A et de HHV-6 Master B. Dans ce cas, préparer un mélange maître conformément au tableau 3. Le mélange réactionnel contient typiquement tous les composants nécessaires à la PCR, à l'exception de l'échantillon.

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

Composant	1 réaction	12 réactions
HHV-6 RG Master A	5 µl	60 µl
HHV-6 RG Master B	15 µl	180 µl
HHV-6 RG IC	1 µl	12 µl
Volume total	21 µl	252 µl

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

- Distribuer 20 µl de mélange maître dans chaque tube de PCR. Ajouter ensuite 10 µl d'ADN de l'échantillon élué et bien mélanger en aspirant et rejetant le mélange plusieurs fois. De la même manière, ajouter 10 µl d'un contrôle positif ou d'un étalon de quantification ou 10 µl d'eau (de qualité PCR) en tant que contrôle négatif. S'assurer que chaque cycle intègre au moins un contrôle positif et un contrôle négatif. Utiliser les 4 étalons de quantification (QS1–QS4) pour la quantification.
- Fermer les tubes de PCR. S'assurer que l'anneau de blocage (accessoire de l'appareil Rotor-Gene) est placé en haut du rotor.
- Pour détecter l'ADN spécifique du HHV-6A et du HHV-6B, créer un profil de températures en respectant les étapes suivantes.

Définition des paramètres généraux de dosage	Figures 1, 2, 3, 4
Activation initiale de l'enzyme hot-start	Figure 5
Amplification de l'ADN	Figure 6
Réglage de la sensibilité des canaux de fluorescence	Figure 7
Démarrage du cycle	Figure 8

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

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

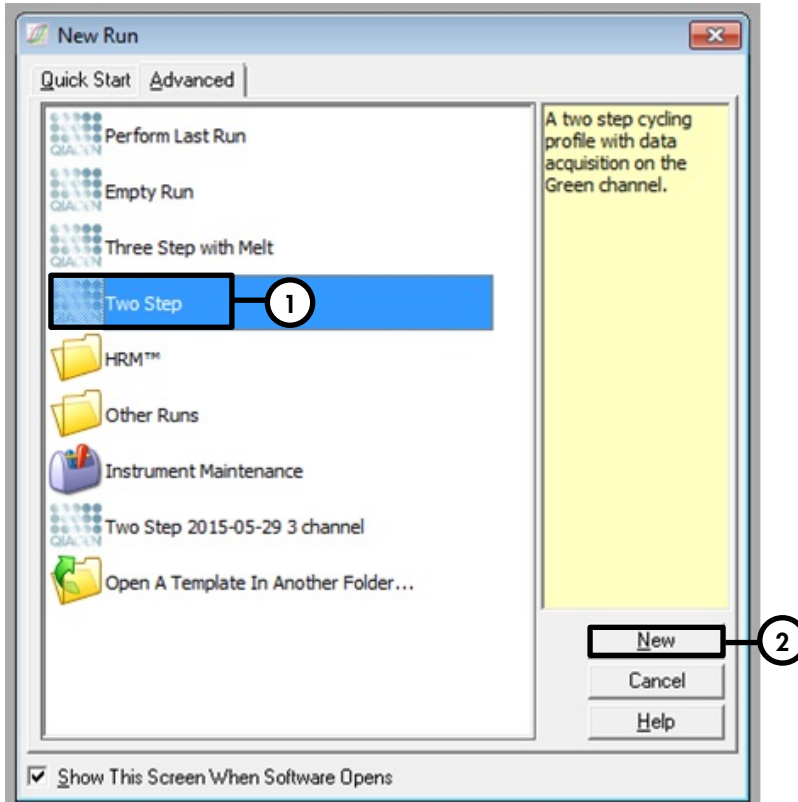


Figure 1. Boîte de dialogue New Run (Nouveau cycle).

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

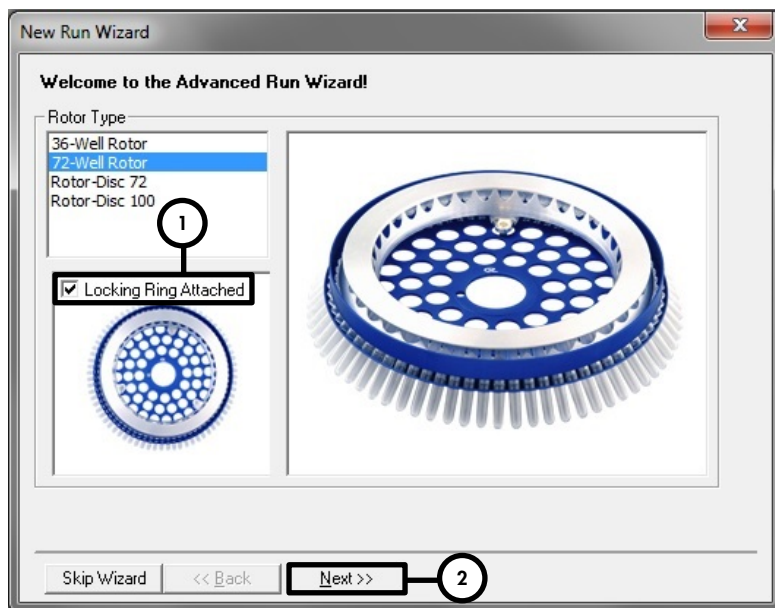


Figure 2. Boîte de dialogue New Run Wizard (Assistant nouveau cycle).

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

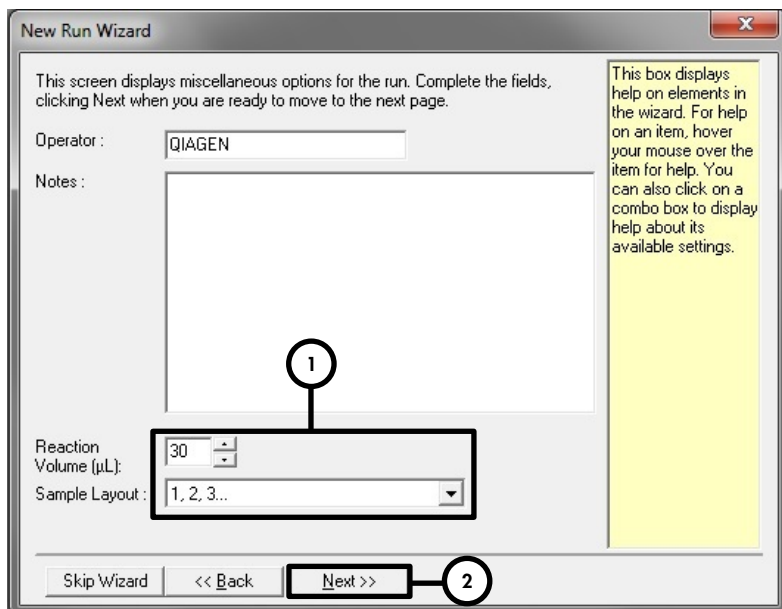


Figure 3. Définition des paramètres généraux de dosage

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

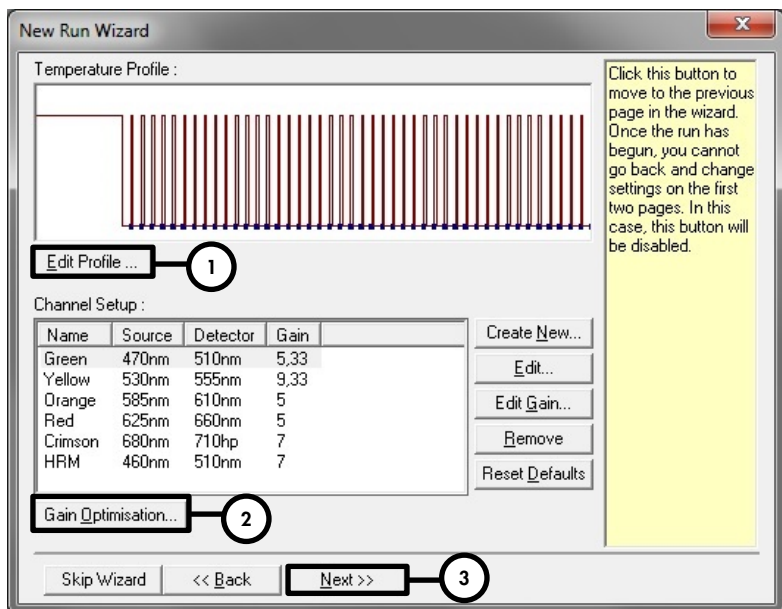


Figure 4. Modification du profil.

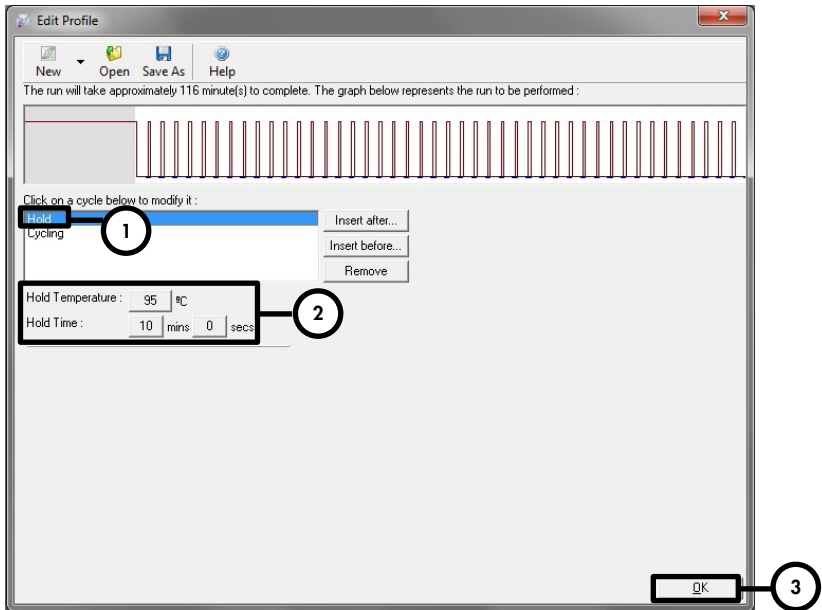


Figure 5. Activation initiale de l'enzyme hot-start.

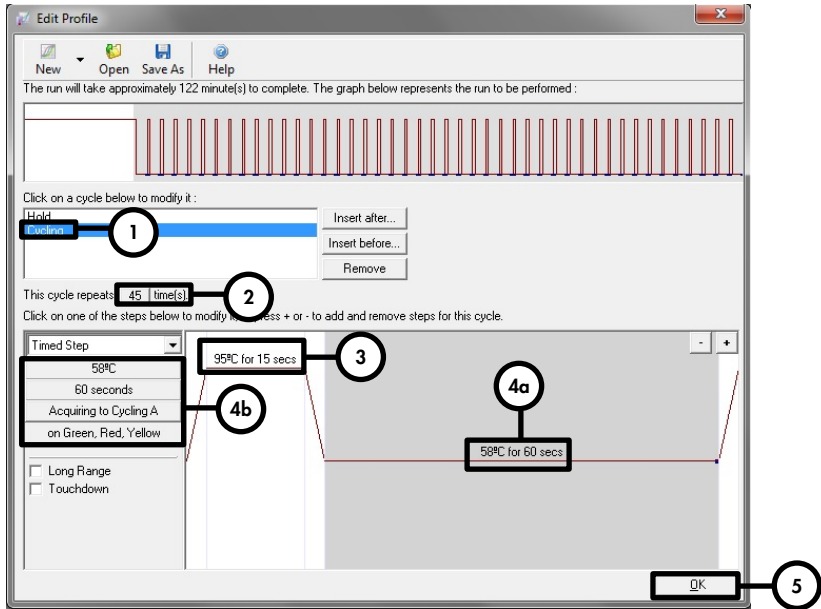


Figure 6. Amplification de l'ADN.

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

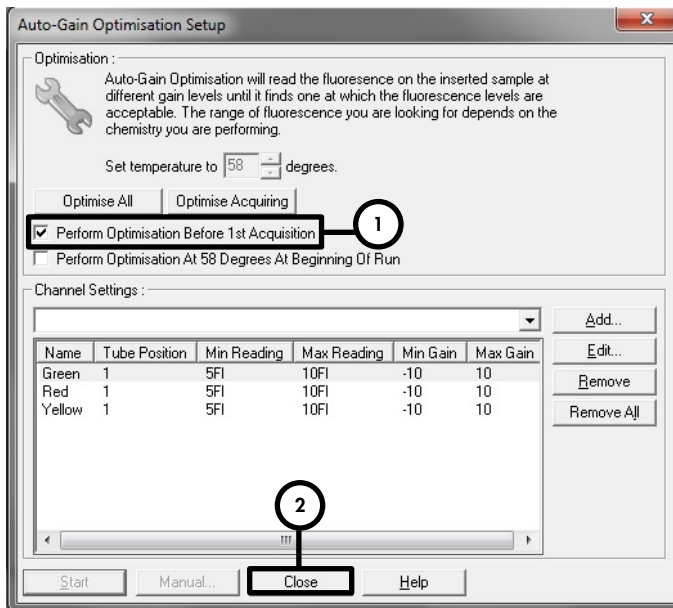


Figure 7. Réglage de la sensibilité des canaux de fluorescence.

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

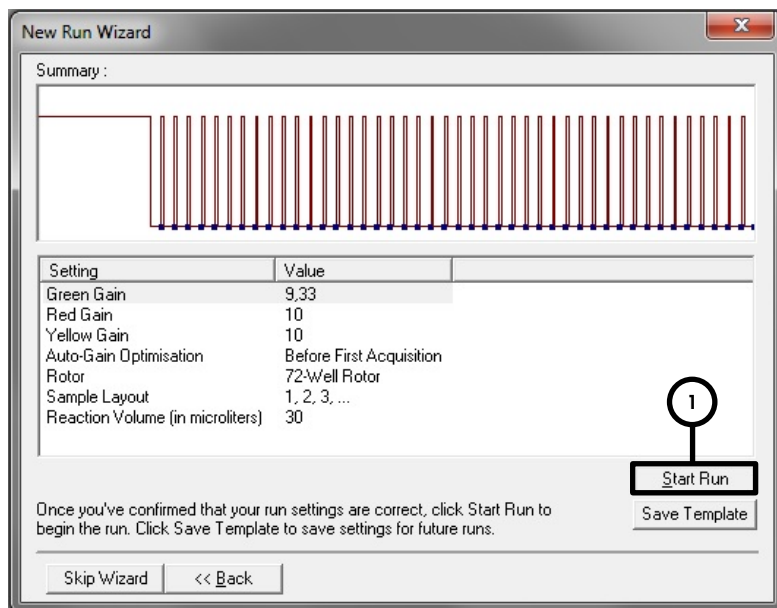


Figure 8. Démarrage du cycle.

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

Interprétation des résultats

Validité du cycle

Cycle qualitatif valide

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

Tableau 4. Conditions de contrôle pour un cycle qualitatif valide

ID de contrôle	Canal de détection		
	Cycling Green	Cycling Red	Cycling Yellow
Contrôle positif (QS)	POSITIVE (POSITIF)	POSITIVE (POSITIF)	POSITIVE (POSITIF)
Contrôle négatif	NEGATIVE (NÉGATIF)	NEGATIVE (NÉGATIF)	POSITIVE (POSITIF)

Cycle qualitatif non valide

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

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

Cycle quantitatif valide

Un cycle quantitatif est valide si toutes les conditions de contrôle d'un cycle qualitatif valide sont remplies (voir tableau 4 ci-dessus). Par ailleurs, pour obtenir des résultats de quantification précis, une courbe d'étalonnage valide doit être générée. Pour un cycle quantitatif valide, la courbe d'étalonnage doit comporter les valeurs de contrôle suivantes (tableau 5).

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

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

Cycle quantitatif non valide

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

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

Analyse qualitative

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

Tableau 6. Résumé de l'interprétation des résultats

ID de l'échantillon	Canal de détection			Interprétation des résultats
	Cycling Green	Cycling Red	Cycling Yellow	
A	POSITIVE (POSITIF)	POSITIVE (POSITIF)*	POSITIVE (POSITIF)†	ADN spécifique du HHV-6A et du HHV-6B détecté.
B	POSITIVE (POSITIF)	NEGATIVE (NEGATIF)*	POSITIVE (POSITIF)†	ADN spécifique du HHV-6A détecté.
C	NEGATIVE (NEGATIF)	POSITIVE (POSITIF)	POSITIVE (POSITIF)†	ADN spécifique du HHV-6B détecté.
D	NEGATIVE (NEGATIF)	NEGATIVE (NEGATIF)	POSITIVE (POSITIF)	Absence de détection de l'ADN spécifique du HHV-6A et du HHV-6B. L'échantillon ne contient pas d'ADN du HHV-6A ou du HHV-6B en quantité détectable.
E	NEGATIVE (NEGATIF)	NEGATIVE (NEGATIF)	NEGATIVE (NEGATIF)	Inhibition de la PCR ou dysfonctionnement du réactif. Répéter la procédure en utilisant l'échantillon d'origine ou prélever et tester un nouvel échantillon.

* En raison des nouvelles données de séquence, une réactivité croisée du système de détection spécifique du HHV-6B avec certaines souches de HHV-6A ne peut pas être exclue. Ces souches donneront un signal faible sur le canal de détection du HHV-6B (Cycling Red) en plus du signal sur le canal de détection du HHV-6A (Cycling Green).

† La détection du contrôle interne dans le canal Cycling Yellow n'est pas obligatoire si des résultats positifs ont été obtenus dans le canal de détection Cycling Green ou Cycling Red. De fortes charges virales de HHV-6A ou de HHV-6B dans l'échantillon peuvent entraîner une réduction ou une absence des signaux du contrôle interne.

Analyse quantitative

artus HHV-6 RG PCR Kit contient 4 étalons de quantification (Quantification Standard, QS). Pour générer une courbe d'étalonnage en vue de l'analyse quantitative, ces étalons doivent être définis avec les concentrations adéquates (voir tableau 1, page 10). Une courbe d'étalonnage peut être générée en vue de l'analyse quantitative en utilisant des étalons de concentrations connues.

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

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

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

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

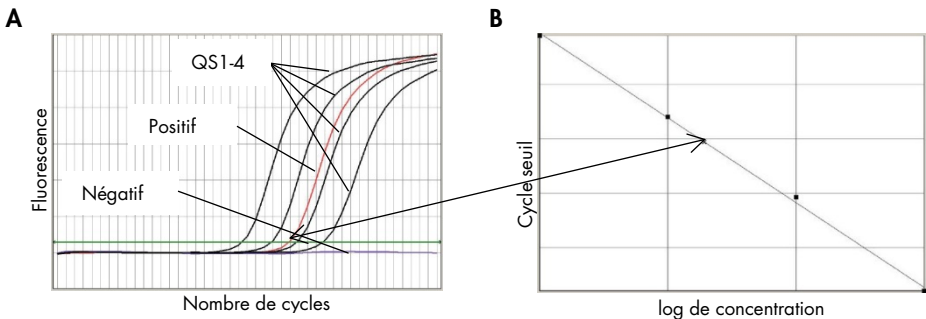


Figure 9. Étalons de quantification, un échantillon positif et un échantillon négatif affichés sur (A) un tracé d'amplification et (B) l'analyse de la courbe d'étalonnage.

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

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

$$\text{Charge virale (échantillon) [UI/ml]} = \frac{\text{Volume (éluat) } [\mu\text{l}] \times \text{charge virale (éluat) [UI}/\mu\text{l}]}{\text{Données d'entrée d'échantillon [ml]}}$$

Limitations

- L'utilisation de ce produit est réservée au personnel ayant reçu les instructions et la formation adéquates concernant les procédures de real-time PCR et de diagnostic *in vitro*.
- Le respect des bonnes pratiques de laboratoire est essentiel pour que ce dosage fonctionne correctement.
- Il est impératif de maintenir la pureté des composants du kit et des préparations de tubes réactionnels. Surveiller étroitement tous les réactifs pour détecter des impuretés et une contamination. Mettre au rebut tout réactif dans lequel une contamination est soupçonnée.
- Des procédures appropriées de prélèvement, transport, conservation et traitement des spécimens sont essentielles pour que ce dosage fonctionne de manière optimale.
- Ne pas utiliser ce dosage directement sur le spécimen. Réaliser les procédures pertinentes d'extraction des acides nucléiques avant d'utiliser ce dosage.
- La présence d'inhibiteurs de PCR peut entraîner des résultats faux négatifs ou non valides.
- Des mutations potentielles dans les régions cibles du génome du HHV-6A et/ou du HHV-6B couvertes par les amorces et/ou les sondes utilisées dans le kit peuvent empêcher de détecter la présence des agents pathogènes.
- Comme pour tout test diagnostique, interpréter les résultats obtenus avec *artus* HHV-6 RG PCR Kit en tenant compte de toutes les données cliniques et biologiques.
- En raison des nouvelles données de séquence, une réactivité croisée du système de détection spécifique du HHV-6B avec certaines souches de HHV-6A ne peut pas être exclue. Ces souches donneront un signal faible sur le canal de détection du HHV-6B (Cycling Red) en plus du signal sur le canal de détection du HHV-6A (Cycling Green).

Contrôle qualité

Chaque lot d'*artus* HHV-6 RG PCR Kit est testé sur la base de spécifications prédéterminées pour garantir une qualité de produit homogène.

Caractéristiques de performance

Les caractéristiques de performance particulières d'*artus* HHV-6 RG PCR Kit ont été déterminées à l'aide d'ADN spécifique du HHV-6A (souche GS) et d'ADN spécifique du HHV-6B (souche Z-29) de concentrations connues.

Sensibilité analytique

La sensibilité analytique d'*artus* HHV-6 RG PCR Kit est définie comme la concentration (copies par μ l d'éluat) de l'ADN spécifique du HHV-6A ou du HHV-6B pouvant être détectée avec une probabilité ≥ 95 %. La sensibilité analytique a été déterminée par l'analyse d'une série de dilutions de l'ADN du HHV-6A et de l'ADN du HHV-6B de concentration connue (tableaux 7 et 8).

Tableau 7. Résultats de PCR utilisés pour calculer la sensibilité analytique de l'amplification spécifique du HHV-6A

Concentration d'entrée (copies/ μ l)	Nombre de réplicats	Nombre de positifs	Pourcentage de détection (%)
3,33	18	18	100
1,05	18	18	100
0,33	18	11	61
0,11	18	10	56
0,03	18	3	17
0,01	18	1	6
0,003	18	1	6
0,001	18	0	0

Tableau 8. Résultats de PCR utilisés pour calculer la sensibilité analytique de l'amplification spécifique du HHV-6B

Concentration d'entrée (copies/ μ l)	Nombre de réplicats	Nombre de positifs	Pourcentage de détection (%)
10,50	18	18	100
3,33	36	36	100
1,05	18	16	89
0,33	18	8	44
0,11	18	1	6
0,03	18	3	17
0,01	18	1	6
0,003	18	0	0

La sensibilité analytique d'*artus* HHV-6 RG PCR Kit, déterminée par analyse de probabilité, pour la détection de l'ADN spécifique du HHV-6A est de 1,46 copie/ μ l d'éluat [intervalle de confiance (IC) à 95 % : 0,72–4,57 copies/ μ l] et la sensibilité analytique pour la détection de l'ADN spécifique du HHV-6B est de 2,58 copies/ μ l d'éluat (IC 95 % : 1,44–6,30 copies/ μ l).

Spécificité analytique

La spécificité analytique d'*artus* HHV-6 RG PCR Kit est garantie par la sélection rigoureuse des oligonucléotides (amorces et sondes). Les oligonucléotides sont vérifiés au moyen d'une analyse par comparaison de séquences avec les séquences disponibles dans le domaine public afin de s'assurer que tous les génotypes pertinents du HHV-6 sont détectés. Par ailleurs, la spécificité d'*artus* HHV-6 RG PCR Kit a été évaluée en testant un panel d'ADN/ARN génomique extrait d'autres herpèsvirus ou d'autres agents pathogènes pertinents pour les patients immunocompromis (tableau 9).

Tableau 9. Microorganismes testés pour la réactivité croisée

Organisme	Canal de détection		
	Cycling Green (HHV-6A)	Cycling Red (HHV-6B)	Cycling Yellow (IC)
Virus herpes simplex 1	Négatif	Négatif	Valide
Virus herpes simplex 2	Négatif	Négatif	Valide
Virus varicella-zoster	Négatif	Négatif	Valide
Virus d'Epstein-Barr	Négatif	Négatif	Valide
Cytomégalovirus	Négatif	Négatif	Valide
Herpèsvirus humain 7	Négatif	Négatif	Valide
Herpèsvirus humain 8	Négatif	Négatif	Valide
Virus BK	Négatif	Négatif	Valide
Virus JC	Négatif	Négatif	Valide
Parvovirus B19	Négatif	Négatif	Valide
Virus de l'hépatite A	Négatif	Négatif	Valide
Virus de l'hépatite B	Négatif	Négatif	Valide
Virus de l'hépatite C	Négatif	Négatif	Valide
Virus de l'immunodéficience humaine 1	Négatif	Négatif	Valide

artus HHV-6 RG PCR Kit n'a réagi avec aucun de ces microorganismes spécifiés.

Plage linéaire

La plage linéaire d'*artus* HHV-6 RG PCR Kit a été évaluée par analyse d'une série de dilutions logarithmique de l'ADN spécifique du HHV-6A et du HHV-6B en utilisant des concentrations comprises entre 1×10^8 et 10^0 copies/ μ l (figure 10). Au moins 6 réplicats ont été analysés par dilution.

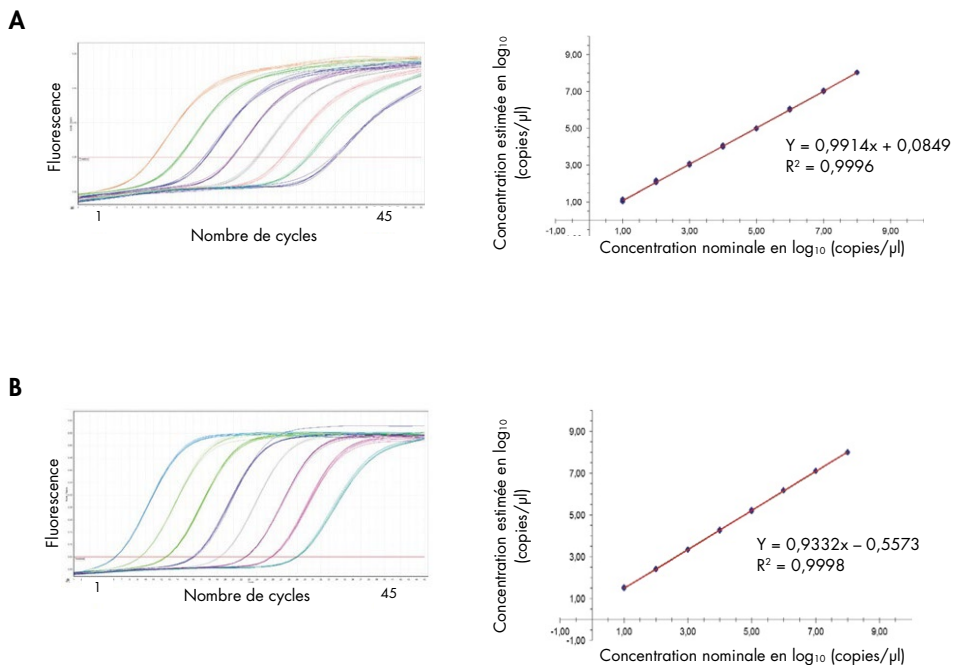


Figure 10. Courbes d'amplification et analyse de régression linéaire d'une série de dilutions de (A) l'ADN spécifique du HHV-6A et (B) l'ADN spécifique du HHV-6B.

La plage linéaire d'*artus* HHV-6 RG PCR Kit s'étend sur au moins 7 ordres de grandeur pour l'ADN spécifique du HHV-6A et du HHV-6B.

Précision

La précision d'*artus* HHV-6 RG PCR Kit a été déterminée par la variabilité intradosage (variabilité au sein d'un même essai), la variabilité interdosage (variabilité entre différents essais) et la variabilité interlot (variabilité entre différents lots de production).

Les données de variabilité sont exprimées en écart-type, variance et coefficient de variation. Les données sont basées sur l'analyse de quantification de concentrations définies de l'ADN génomique du HHV-6 et sur les valeurs du cycle seuil (C_T), sur le contrôle interne (tableaux 10–12). Au moins 6 réplicats par échantillon ont été analysés pour la variabilité intradosage, interdosage et interlot. La variance totale a été calculée en combinant les trois analyses.

Tableau 10. Précision de l'amplification du HHV-6A

Système spécifique au HHV-6A	Conc. moyenne (copies/ μ l)	Écart-type	Variance	Coefficient de variation (%)
Variabilité intradosage	22,07	2,75	7,56	12,50
Variabilité interdosage	23,32	2,88	8,28	12,34
Variabilité interlot	23,63	3,02	9,10	12,76
Variance totale	23,94	2,85	8,12	11,90

Tableau 11. Précision de l'amplification du HHV-6B

Système spécifique au HHV-6B	Conc. moyenne (copies/ μ l)	Écart-type	Variance	Coefficient de variation (%)
Variabilité intradosage	21,58	4,83	23,32	22,37
Variabilité interdosage	25,55	3,62	13,10	14,17
Variabilité interlot	24,54	4,63	21,44	18,87
Variance totale	24,23	4,36	19,04	18,01

Tableau 12. Précision de l'amplification du contrôle interne

Contrôle interne	Cycle seuil moyen (C _T)	Écart-type	Variance	Coefficient de variation (%)
Variabilité intradosage	21,97	0,11	0,01	0,51
Variabilité interdosage	21,98	0,09	0,01	0,40
Variabilité interlot	21,97	0,10	0,01	0,44
Variance totale	21,97	0,09	0,01	0,39

Évaluation diagnostique

La sensibilité et la spécificité diagnostiques d'*artus* HHV-6 RG PCR Kit sont régulièrement évaluées par l'analyse d'échantillons de référence et de diagnostic précédemment analysés par des méthodes de référence (tableau 13).

Tableau 13. Évaluation diagnostique d'*artus* HHV-6 RG PCR Kit

		<i>artus</i> HHV-6 RG PCR Kit		
		HHV-6A	HHV-6B	NÉGATIF
Méthode de référence	HHV-6A	8	0	0
	HHV-6B	0	19	0
	NÉGATIF	0	0	3

Répétabilité







La spécificité, la sensibilité et la précision de la quantification d'*artus* HHV-6 RG PCR Kit ont été évaluées par l'analyse de panels de compétence établis pour le HHV-6. Pour garantir la répétabilité d'*artus* HHV-6 RG PCR Kit, la spécificité et la sensibilité sont évaluées par l'analyse régulière de panels de compétence établis pour le HHV-6 ainsi que d'échantillons diagnostiques caractérisés (tableau 14).





Tableau 14. Résultats de l'analyse d'un panel de compétence pour le HHV-6 (QCMD)

Panel de compétence			<i>artus</i> HHV-6 RG PCR Kit		
ID de l'échantillon	Contenu de l'échantillon	Conc. attendue (copies/ml)	Conc. détectée de HHV-6A (copies/ml)	Conc. détectée de HHV-6B (copies/ml)	Contrôle interne
HHV6DNA14-01	HHV-6B	1002	–	474	Valide
HHV6DNA14-02	HHV-6A	596	94	–	Valide
HHV6DNA14-03	HHV-6A	3020	522	–	Valide
HHV6DNA14-04	HHV-6A	171	66	–	Valide
HHV6DNA14-05	HHV-6B	10 000	–	6330	Valide
HHV6DNA14-06	HHV-6B	294	–	93	Valide
HHV6DNA14-07	HCMV	–	–	–	Valide
HHV6DNA14-08	Négatif pour le HHV-6	–	–	–	Valide
HHV6DNA14-09	HHV-6B	843	–	894	Valide
HHV6DNA14-10	HHV-6B	8954	–	9300	Valide

Symboles

Les symboles figurant dans le tableau suivant sont utilisés dans ce mode d'emploi.

Symbole	Définition du symbole
 96	Contient suffisamment de réactifs pour 96 tests
	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Numéro de référence
	Numéro de lot
	Limite de température
	Fabricant

Symbole	Définition du symbole
	À utiliser avant
	Référence produit
	Code article international (Global Trade Item Number, GTIN)
	Consulter le mode d'emploi

Guide de résolution des problèmes

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

Référence

1. Govind, S., Hockley, J., Morris, C., and the Collaborative Study Group. Collaborative Study to establish the 1st WHO International Standard for Human Herpes Virus 6B (HHV-6B) DNA for nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays. WHOECBS Report, 2017. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/260259/WHO-BS-2017.2321-eng.pdf>.

Pour commander

Produit	Sommaire	Réf.
<i>artus</i> HHV-6 RG PCR Kit (96)	Pour 96 réactions : Master A, Master B, 4 étalons de quantification, contrôle interne, H ₂ O (eau de qualité PCR)	4521265
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Pour 50 préparations d'ADN : 50 colonnes de centrifugation QIAamp Mini, protéinase K, réactifs, tampons, Collection Tubes (2 ml)	51304
QIAamp DNA Mini Kit (250)	Pour 250 préparations d'ADN : 250 colonnes de centrifugation QIAamp Mini, protéinase K, réactifs, tampons, Collection Tubes (2 ml)	51306
Rotor-Gene Q et accessoires		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Thermocycleur de real-time PCR à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires ; inclut garantie 1 an pièces et main-d'œuvre, installation et formation	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Thermocycleur de real-time PCR à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires ; inclut garantie 1 an pièces et main-d'œuvre, installation et formation non comprises	9002022

Produit	Sommaire	Réf.
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package Plus	Thermocycleur de real-time PCR à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires ; inclut le progiciel prioritaire avec logiciel, installation, formation, garantie 3 ans pièces et main-d'œuvre et 3 visites de maintenance préventive	9001866
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package	Thermocycleur de real-time PCR à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires ; inclut le progiciel prioritaire avec logiciel, installation, formation, garantie 2 ans pièces et main-d'œuvre et 2 visites de maintenance préventive	9001865
Rotor-Gene Q 5plex System	Thermocycleur de real-time PCR à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires ; inclut garantie 1 an pièces et main-d'œuvre, installation et formation	9001640
Plate-forme Rotor-Gene Q 5plex	Thermocycleur de real-time PCR à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires ; inclut garantie 1 an pièces et main-d'œuvre, installation et formation non comprises	9001570

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

Produit	Sommaire	Réf.
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloc en aluminium pour la préparation manuelle des tubes réactionnels à l'aide d'une pipette monocanal dans 72 tubes de 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 rangées de 4 tubes et bouchons pour 1 000 réactions de 10–50 µl	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 rangées de 4 tubes et bouchons pour 10 000 réactions de 10–50 µl	981106

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Historique des révisions du document

Date	Modifications
R4, septembre 2018	Modification des unités de rapport sur les dosages de copies à unités internationales (UI).
R5, novembre 2019	Suppression d'une remarque relative au facteur de conversion pour les normes de quantification de l'artus HHV-6 RG PCR Kit (96) dans l'historique des révisions du manuel. Révision de la section Informations sur l'agent pathogène pour y inclure des informations sur les virus HHV-6A et HHV-6B.

Accord de licence limitée pour *artus* HHV-6 RG PCR Kit

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

1. Le produit ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis et à ce manuel et uniquement avec les composants contenus dans ce kit. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce kit avec tout autre composant non fourni dans ce kit, à l'exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit, dans ce manuel et dans d'autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com. Parmi ces protocoles supplémentaires, certains ont été fournis par des utilisateurs QIAGEN pour des utilisateurs QIAGEN. Ces protocoles n'ont pas été rigoureusement testés ou optimisés par QIAGEN. QIAGEN ne saurait être tenu pour responsable de leur utilisation et n'offre aucune garantie que ces protocoles ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
2. En dehors des licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou son ou ses utilisations 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 les 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 conditions précédentes. QIAGEN peut faire appliquer les interdictions de cet Accord de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de cet Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

Pour les termes de licence mis à jour, voir www.qiagen.com.

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

Marques déposées : QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, Rotor-Gene®, Sample to Insight® (QIAGEN Group) ; FAM™, JOE™ (Thermo Fisher Scientific ou ses filiales) ; Cy® (GE Healthcare). Les noms déposés, marques commerciales, etc. cités dans ce document, même s'ils ne sont pas spécifiquement signalés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

1117341 11-19 HB-1996-005 © 2019 altona Diagnostics GmbH, tous droits réservés.

