



PlexPCR[®] VHS

Test de PCR multiplexe en temps réel pour la détection du virus Herpes simplex 1, du virus Herpes simplex 2, du virus Varicella zoster et de *Treponema pallidum*



IVDR Certified

Produit	Plateforme	Taille (réactions)	Référence
<i>PlexPCR</i> [®] VHS ₍₆₁₀₎	LC480 II	100	REF 1121001
<i>PlexPCR</i> [®] VHS ₍₅₅₀₎	ABI 7500 Fast	100	REF 1123001
<i>PlexPCR</i> [®] VHS ₍₆₇₅₎	CFX96 Dx CFX96 Touch	100	REF 1125001

Produits accessoires – Logiciel d'analyse

<i>PlexPCR</i> [®] VHS (LC480)	REF 99005
<i>PlexPCR</i> [®] VHS (7500)	REF 99004
<i>PlexPCR</i> [®] VHS (CFX)	REF 99006



MedEnvoy Global B.V.
Princesses Margrietplantsoen 33
Suite 123
2595 AM La Haye
Les Pays-Bas



SpeedX Pty Ltd
Suite 102, National Innovation Centre
4 Cornwallis Street, Eveleigh,
NSW 2015, Australie
Tél. : +61 2 9209 4170, E-mail : tech@speedx.com.au

RÉSERVÉ À UN USAGE PROFESSIONNEL*

Non destiné à la vente aux États-Unis

Contenus

1	Description du produit	4
2	Utilisation prévue	4
3	Informations sur les pathogènes	4
4	Contenu du kit.....	5
5	Expédition et stockage	6
6	Avertissements et précautions	6
6.1	Avertissements et précautions d'ordre général	6
6.2	Laboratoire	6
6.3	Manipulation des échantillons.....	6
6.4	Test.....	7
6.5	Précautions de sécurité.....	7
6.6	Plug-in de test : Avertissements/Précautions/Limitations	7
7	Produits et consommables associés	7
8	Principe technologique.....	9
9	Aperçu de la procédure.....	10
10	Procédure détaillée	11
10.1	Prélèvement, transport et stockage des échantillons	11
10.1.1	Dispositifs de prélèvement d'échantillons approuvés	11
10.1.2	Écouvillon sec en milieu de transport viral, prélèvement, transport et conservation	11
10.1.3	Prélèvement, transport et stockage du FLOQSwab™ standard stérile en tube sec (Copan, Cat. n° 552C)	11
10.1.4	Écouvillon sec suspendu dans 1 mL de milieu UTM (Copan, Cat. n° 350C) : prélèvement, transport et stockage.....	11
10.2	Traitement des échantillons.....	11
10.3	<i>Internal Control</i> (IC) (Contrôle interne (CI)).....	12
10.3.1	Contrôle interne sur le QIASymphony SP.....	12
10.3.2	Contrôle interne sur le QIAcube HT	13
10.3.3	Contrôle interne sur le MagNA Pure 96	13
10.4	Préparation de la PCR en temps réel	14
10.4.1	Préparation du mélange de solution-mère	14
11	Programmation et analyse	15
12	Interprétation des résultats.....	15
13	Limitations.....	15
14	Contrôle de qualité.....	16
15	Instructions concernant le contrôle positif HSV/VZV/TP	16
15.1	Instructions d'utilisation	16
16	Caractéristiques de performance	17
16.1	Performance clinique.....	17
16.1.1	Étude clinique 1.....	17
16.1.2	Étude clinique 2.....	18
16.2	Performance analytique.....	18
16.2.1	Reproductibilité et répétabilité.....	18
16.2.2	Sensibilité analytique	20
16.2.3	Spécificité analytique.....	20
16.2.4	Interférence compétitive	21

16.2.5	Substances potentiellement interférentes	22
17	Service clients et assistance technique	23
18	Références	23
19	Annexe 1 : LightCycler® 480 Instrument II	24
19.1	Programmation du LightCycler® 480 Instrument II (LC480 II).....	24
19.2	Compensation des couleurs pour LightCycler® 480 Instrument II.....	31
19.3	Interprétation des résultats	32
20	Annexe 2 : Applied Biosystems® 7500 Fast.....	33
20.1	Programmation du système Applied Biosystems® 7500 Fast.....	33
20.2	Interprétation des résultats	36
21	Annexe 3 : Systèmes de PCR en temps réel Bio-Rad CFX96 Dx™ et CFX96 Touch™	37
21.1	Programmation des systèmes de PCR en temps réel CFX96 Dx et CFX96 Touch	37
21.2	Interprétation des résultats	39
22	Annexe A : Interprétation des résultats avec le logiciel d'analyse <i>PlexPCR</i> ® VHS	40
22.1	Plateforme FastFinder – Exigences informatiques minimales	40
22.2	Plug-in d'analyse (nouvel utilisateur)	41
22.3	Attribution de nom à l'échantillon	42
22.4	Analyse	42
22.5	Résultats	44
22.5.1	Onglet Summary (Résumé)	44
22.5.2	Onglet Details	46
22.6	Courbe de référence	47
22.7	Exportation des résultats	47
22.8	Récupération des analyses autorisées	47
22.9	Exemples de graphiques de contrôle	47
22.9.1	Contrôle négatif (Na)	48
22.9.2	Contrôle du réactif d'amplification (Nb)	48
22.9.3	Contrôle positif (toutes les cibles) (Pa).....	49
22.10	Exemples	50
22.10.1	Exemple 1. Échantillon positif – cible unique détectée	50
22.10.2	Exemple 2. Échantillon positif – plusieurs cibles détectées	51
22.10.3	Exemple 3. Échantillon négatif.....	52
22.10.4	Exemple 4. Échantillon non valide	53
23	Glossaire	55

1 Description du produit

Le kit **PlexPCR**[®] VHS est un test qualitatif par PCR (qPCR) en temps réel pour la détection du virus Herpes simplex 1 (HSV-1), du virus Herpes simplex 2 (HSV-2), du virus Varicella zoster (VZV) et de *Treponema pallidum*. Le test est validé sur des échantillons extraits en utilisant le système MagNA Pure 96 (Roche), le QIAAsymphony[®] SP (QIAGEN) et le QIAcube HT (QIAGEN) ainsi que la détection en temps réel par PCR sur les systèmes Applied Biosystems[®] 7500 Fast (7500 Fast), Roche LightCycler[®] 480 Instrument II (LC480 II) et Bio-Rad CFX96 Dx[™] (CFX96 Dx) et CFX96 Touch[™] (CFX96 Touch).

2 Utilisation prévue

Le kit **PlexPCR**[®] VHS est un test de diagnostic *in vitro* par PCR en temps réel pour la détection et la différenciation qualitatives des virus HSV-1, HSV-2, VZV et de *T. pallidum*.

Le kit **PlexPCR**[®] VHS est destiné à être utilisé pour le diagnostic des virus HSV-1, HSV-2, VZV et de *T. pallidum* à partir d'échantillons d'écouvillons génitaux, non génitaux, anaux/rectaux et oraux.

Les résultats négatifs n'excluent pas les infections HSV-1, HSV-2, VZV et *T. pallidum* et ne doivent pas être utilisés comme la seule justification pour des décisions de diagnostic, de traitement ou de toute autre prise en charge de patient.

Le kit **PlexPCR**[®] VHS doit être utilisé dans des structures professionnelles, telles que des hôpitaux ou des laboratoires de référence ou d'État. Il n'est pas destiné à un auto-test, un usage à domicile ou un usage sur le lieu des soins.

AVERTISSEMENT : Le kit **PlexPCR[®] VHS ne doit pas être utilisé avec le liquide céphalo-rachidien ou pour une utilisation en dépistage prénatal.**

3 Informations sur les pathogènes

Le virus Herpes simplex, sérotype 1 et 2 (HSV-1 et HSV-2), et le virus Varicella zoster (VZV) sont des virus à ADN double brin appartenant à la famille des herpesviridæ¹. Les infections à HSV-1 et HSV-2 chez les humains peuvent provoquer des lésions dans divers sites, y compris oro-facial, génital, oculaire, cutané et le système nerveux central. Les lésions peuvent être le résultat d'une infection primaire ou de la réactivation d'une infection latente. HSV-1 provoque essentiellement des infections oro-faciales tandis que HSV-2 est couramment associé aux infections sexuellement transmissibles². Une infection primaire au VZV provoque la varicelle et sa réactivation ultérieure dans le système nerveux engendre l'herpès zoster³. Les échantillons cutanés incluent la peau et le pénis et les échantillons mucocutanés incluent les yeux et les sites oraux et vaginaux. Les virus de l'herpès sont également, plus rarement, associés à l'encéphalite virale et la méningite ainsi qu'aux infections néo-natales provoquées par la transmission périnatale.

Treponema pallidum sous-espèce *pallidum* (*T. pallidum*) est une bactérie spirochète qui est l'agent responsable de la syphilis, une maladie sexuellement transmissible capable d'infecter divers tissus et organes. Le signe typique de la syphilis primaire est l'apparition d'une lésion cutanée appelée chancre sur le site de l'infection⁴. Ce chancre apparaît habituellement dans les régions génitales mais peut également apparaître dans sites d'inoculation extra-génitaux, y compris les sites oro-faciaux. La syphilis secondaire est caractérisée par une éruption cutanée diffuse sur le tronc et les extrémités et peut également se manifester sous forme de lésions muqueuses sur des sites oraux et génitaux⁵. La syphilis tertiaire peut déclencher, si elle n'est pas traitée, des pathologies plus sérieuses y compris l'hépatite, l'arthrite, la neurosyphilis, la syphilis cardiovasculaire et la syphilis granulomateuse⁴.

4 Contenu du kit

Nombre de tests : Suffisant pour 100 réactions (réactions de 20 µL)

Tableau 1. Contenu du kit <i>PlexPCR</i> [®] VHS ₍₆₁₀₎ (réf. 1121001)			
Couleur du capuchon	Contenus	Description	Quantité
Bleu	<i>Plex</i> Mastermix, 2x	Mélange de solution-mère contenant les composants requis pour la qPCR, notamment des dNTP, de l'ADN polymérase et du tampon	1 x 1 mL
Vert	VHS Mix, 20x	Mélange contenant des oligonucléotides [^] pour l'amplification et la détection du HSV-1, HSV-2, VZV et de <i>T. pallidum</i>	1 x 100 µL
Blanc	Control Mix 1 (Mélange de contrôle 1), 20x	Mélange contenant des oligonucléotides [^] pour l'amplification et la détection du test de contrôle interne pour LC480 II	1 x 100 µL
Rouge	Internal Control Cells (Cellules de contrôle interne) [#]	Cellules de contrôle interne contenant la matrice d'ADN de contrôle interne pour surveiller l'efficacité de l'extraction et de l'amplification	1 x 500 µL
Neutre	Nuclease Free Water	Eau de qualité PCR	1 x 1 mL

[#] Conserver les tubes de matrices dans un endroit différent des mélanges d'oligonucléotides, c.-à-d. une salle de manipulation de matrice ou d'acide nucléique

[^] Les oligonucléotides sont des paires d'amorce PCR, des enzymes *PlexZyme*[®] et des sondes fluorescentes

Tableau 2. Contenu du kit <i>PlexPCR</i> [®] VHS ₍₅₅₀₎ (réf. 1123001)			
Couleur du capuchon	Contenus	Description	Quantité
Bleu	<i>Plex</i> Mastermix, 2x	Mélange de solution-mère contenant les composants requis pour la qPCR, notamment des dNTP, de l'ADN polymérase et du tampon	1 x 1 mL
Vert	VHS Mix, 20x	Mélange contenant des oligonucléotides [^] pour l'amplification et la détection du HSV-1, HSV-2, VZV et de <i>T. pallidum</i>	1 x 100 µL
Blanc	Control Mix 2 (Mélange de contrôle 2), 20x	Mélange contenant des oligonucléotides [^] pour l'amplification et la détection du test de contrôle interne pour 7500 Fast	1 x 100 µL
Rouge	Internal Control Cells (Cellules de contrôle interne) [#]	Cellules de contrôle interne contenant la matrice d'ADN de contrôle interne pour surveiller l'efficacité de l'extraction et de l'amplification	1 x 500 µL
Neutre	Nuclease Free Water	Eau de qualité PCR	1 x 1 mL

[#] Conserver les tubes de matrices dans un endroit différent des mélanges d'oligonucléotides, c.-à-d. une salle de manipulation de matrice ou d'acide nucléique

[^] Les oligonucléotides sont des paires d'amorce PCR, des enzymes *PlexZyme*[®] et des sondes fluorescentes

Tableau 3. Contenu du kit *PlexPCR*[®] VHS₍₆₇₅₎ (réf. 1125001)

Couleur du capuchon	Contenus	Description	Quantité
Bleu	<i>Plex</i> Mastermix, 2x	Mélange de solution-mère contenant les composants requis pour la qPCR, notamment des dNTP, de l'ADN polymérase et du tampon	1 x 1 mL
Vert	VHS Mix, 20x	Mélange contenant des oligonucléotides [^] pour l'amplification et la détection du HSV-1, HSV-2, VZV et de <i>T. pallidum</i>	1 x 100 µL
Blanc	Control Mix 3 (Mélange de contrôle 3), 20x	Mélange contenant des oligonucléotides [^] pour l'amplification et la détection du test de contrôle interne dans le système CFX96 Dx et pour CFX96 Touch	1 x 100 µL
Rouge	Internal Control Cells (Cellules de contrôle interne) [#]	Cellules de contrôle interne contenant la matrice d'ADN de contrôle interne pour surveiller l'efficacité de l'extraction et de l'amplification	1 x 500 µL
Neutre	Nuclease Free Water	Eau de qualité PCR	1 x 1 mL

Conserver les tubes de matrices dans un endroit différent des mélanges d'oligonucléotides, c.-à-d. une salle de manipulation de matrice ou d'acide nucléique

[^] Les oligonucléotides sont des paires d'amorce PCR, des enzymes *PlexZyme*[®] et des sondes fluorescentes

5 Expédition et stockage

- La livraison des composants des kits *PlexPCR*[®] VHS se fait sur des blocs de carboglace ou de gel de glace. Après réception, il convient de conserver tous les composants entre -25 °C et -15 °C. Il est recommandé de ne pas dépasser 15 cycles de congélation/décongélation.
- Quand le kit est conservé conformément aux conditions recommandées et qu'il est manipulé correctement, il conserve son activité jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Ne pas l'utiliser après la date de péremption.

6 Avertissements et précautions

6.1 Avertissements et précautions d'ordre général

- Destiné exclusivement à un usage de diagnostic *in vitro*.
- Lire attentivement ce mode d'emploi avant l'utilisation. Respecter rigoureusement les procédures décrites pour garantir la fiabilité des résultats de test. Toute déviation de ces procédures peut affecter la performance du test.
- Les utilisateurs doivent avoir suivi une formation adéquate dans l'utilisation du test *PlexPCR*[®] VHS.
- Tout incident grave doit être signalé au fabricant et à l'autorité compétente de l'État membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

6.2 Laboratoire

- Il est recommandé d'effectuer la préparation/l'extraction des échantillons, la préparation du mélange de solution-mère, l'ajout des échantillons et le thermocyclage dans des zones séparées spatialement. Au minimum, l'instrument de PCR doit, idéalement, être situé dans une salle distincte des zones où les réactions sont préparées.
- Il est recommandé de suivre les précautions de laboratoire habituelles. Porter un équipement de protection individuelle approprié, comme des gants, des lunettes de protection et une blouse de laboratoire pour manipuler les réactifs.
- Des organismes pathogènes sont susceptibles d'être présents dans les échantillons cliniques. Traiter tous les échantillons cliniques comme étant potentiellement infectieux et respecter les procédures de sécurité de votre organisation en matière de manipulation des échantillons chimiques et biologiques.
- Respecter les procédures d'élimination des déchets dangereux de votre organisation pour l'élimination correcte des échantillons, des réactifs et d'autres matières potentiellement contaminées.

6.3 Manipulation des échantillons

- Les échantillons doivent être recueillis, transportés et stockés en utilisant les techniques de laboratoire standard ou conformément aux instructions des kits de prélèvement.

6.4 Test

- Les précautions de base pour prévenir la contamination des réactions de PCR comprennent l'utilisation d'embouts de pipette à filtre stériles, l'utilisation d'un nouvel embout de pipette pour chaque action de pipetage et la séparation des flux de travail.
- Les tests de PCR sont sujets à la contamination par les produits de PCR précédents. Ne jamais ouvrir les tubes de réaction après l'achèvement de la PCR.
- Les réactifs de dosage contiennent du tampon IDTE susceptible de provoquer une grave irritation oculaire. Il est recommandé de l'utiliser dans une pièce bien ventilée et de porter l'équipement de protection individuelle adapté, tel que des gants, des lunettes de protection et une blouse de laboratoire lors de la manipulation des réactifs.

6.5 Précautions de sécurité

- Des fiches de données de sécurité (FDS) sont disponibles sur demande. Contacter tech@speedx.com.au pour de plus amples informations.

6.6 Plug-in de test : Avertissements/Précautions/Limitations

- Le logiciel SpeedX ne peut contrôler que l'analyse des données brutes générées par le kit de test lorsqu'il est utilisé avec l'instrument de PCR correspondant. Il ne contrôle pas la préparation des échantillons, les réactions, la programmation de l'équipement ou l'administration du traitement.
- Les utilisateurs doivent être dûment formés à l'utilisation du logiciel d'analyse **PlexPCR**[®] VHS, et l'accès doit être réservé à chaque utilisateur assigné.
- Il est recommandé de mettre en place des contrôles de cybersécurité et des accès par authentification des utilisateurs, notamment en utilisant un logiciel antivirus ou un pare-feu au sein du système informatique et de l'infrastructure qui utilise le logiciel.
- En cas d'incident de cybersécurité tel qu'un accès non autorisé ou une attaque par ransomware, veuillez contacter tech@speedx.com.au pour obtenir de l'aide.

7 Produits et consommables associés

Matériel de contrôle positif

- Positive Control HSV/VZV/TP (SpeedX, n° cat. 95007). Se référer à la **Section 15.1** pour les instructions d'utilisation.

Dispositifs de prélèvement des échantillons

- FLOQSwab™ standard stérile dans un tube sec (Copan, Cat. n° 552C)
- Écouvillon sec suspendu dans 1 mL de milieu UTM (Copan, Cat. n° 350C)

Consommables de laboratoire généraux

- Gants et blouses de laboratoire propres
- Mélangeur vortex
- Centrifugeuse de paillasse pour tubes de 0,5 et 1,5 mL
- Micro-pipeteurs
- Embouts de pipette résistants aux aérosols, stériles
- Tubes de 0,5 mL ou de 1,5 mL (qualité PCR)
- Tubes de 2,0 mL (pour la dilution préalable des cellules de contrôle interne)
- Milieu de transport universel (UTM) pour la préparation du contrôle positif HSV/VZV/TP. Se référer à la **Section 15.1** pour plus de détails

Pour le MagNA Pure 96 Instrument

- Phosphate Buffered Saline (PBS) (Tampon phosphate salin) 1x
- MagNA Pure 96 Internal Control Tube (Tube de contrôle interne, Roche, réf. 06374905001)
- MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (kit petit volume, Roche, réf. 06543588001)
- MagNA Pure 96 System Fluid (external) (Système de fluide externe, Roche, réf. 06640729001)
- MagNA Pure 96 Processing Cartridge (Cartouche de traitement, Roche, réf. 06241603001)
- MagNA Pure 96 Pure tip 1000 µL (Embout, Roche, réf. 6241620001)
- MagNA Pure 96 Output Plate (plaque de sortie, Roche, réf. 06241611001)
- MagNA Pure Sealing Foil (feuille d'hermétisation, Roche, réf. 06241638001)

Pour l'instrument QIASymphony® SP

- Phosphate Buffered Saline (PBS) (Tampon phosphate salin) 1x
- Cartouches de préparation d'échantillon, 8 puits (Qiagen, réf. 997002)
- Manchons 8 barreaux (Qiagen, réf. 997004)
- Pointes de filtre, 200 µL et 1500 µL (Qiagen, réf. 990332 et 997024)
- Tubes de 2 mL (utilisés pour la préparation du mélange de contrôle interne) (Sarstedt, réf. 72.639 ou 72.694)
- Tubes de polystyrène de 14 mL (utilisés pour la préparation du mélange de contrôle interne) (Corning, réf. 352051)

Pour l'instrument QIAcube HT

- Phosphate Buffered Saline (PBS) (Tampon phosphate salin) 1x
- QIAamp 96 Virus QIAcube HT kit (Qiagen, réf. 57731)
- Pipettes et embouts de pipettes jetables avec barrières anti-aérosols (20-1 000 µL)
- Isopropanol
- Éthanol (96-100 %)
- QIAcube HT Reagent troughs (Cuvettes de réactifs)
- Buffer ATL (Tampon ATL, Qiagen, réf. 19076)
- QIAGEN Proteinase K (Protéinase K, Qiagen, réf. 19131 ou 19133)

Pour le système Applied Biosystems® 7500 Fast

- MicroAmp® Optical 96-well reaction plates (plaques de réaction à 96 puits, ThermoFisher Scientific, réf. 4316813)
- MicroAmp® Optical Adhesive Film (film optique adhésif, ThermoFisher Scientific, réf. 4360954)

Pour le LightCycler® 480 Instrument II

- **PlexPCR**® Colour Compensation (CC) kit (kit de compensation de couleur, SpeedX, réf. 90001)
- LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 (plaque à 96 puits, Roche, réf. 04729692001)
- LightCycler® 480 Sealing Foil (feuille d'hermétisation, Roche, réf. 04729757001)

Pour les systèmes de détection par PCR en temps réel Bio-Rad CFX96 Dx et CFX96 Touch™

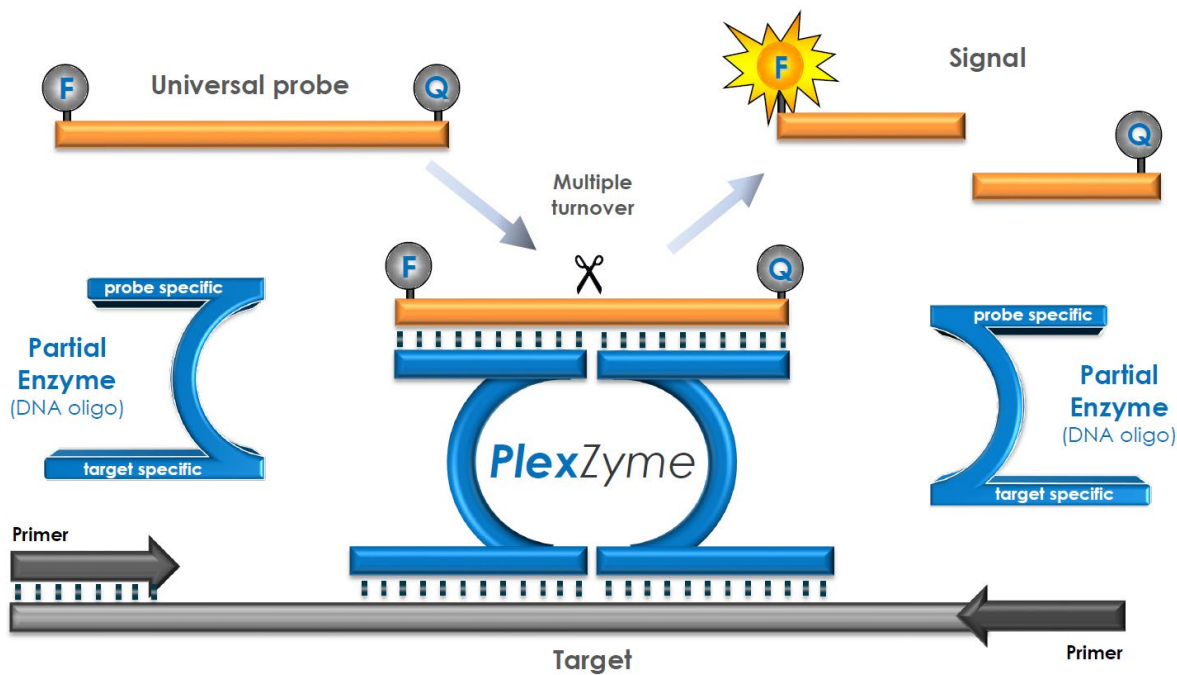
- Multiplate® 96-well PCR plates (plaques PCR à 96 puits, Bio-Rad, réf. MLP9601)
- Microseal® PCR Plate sealing Film (film adhésif d'hermétisation de plaque, Bio-Rad, réf. MSB1001)

8 Principe technologique

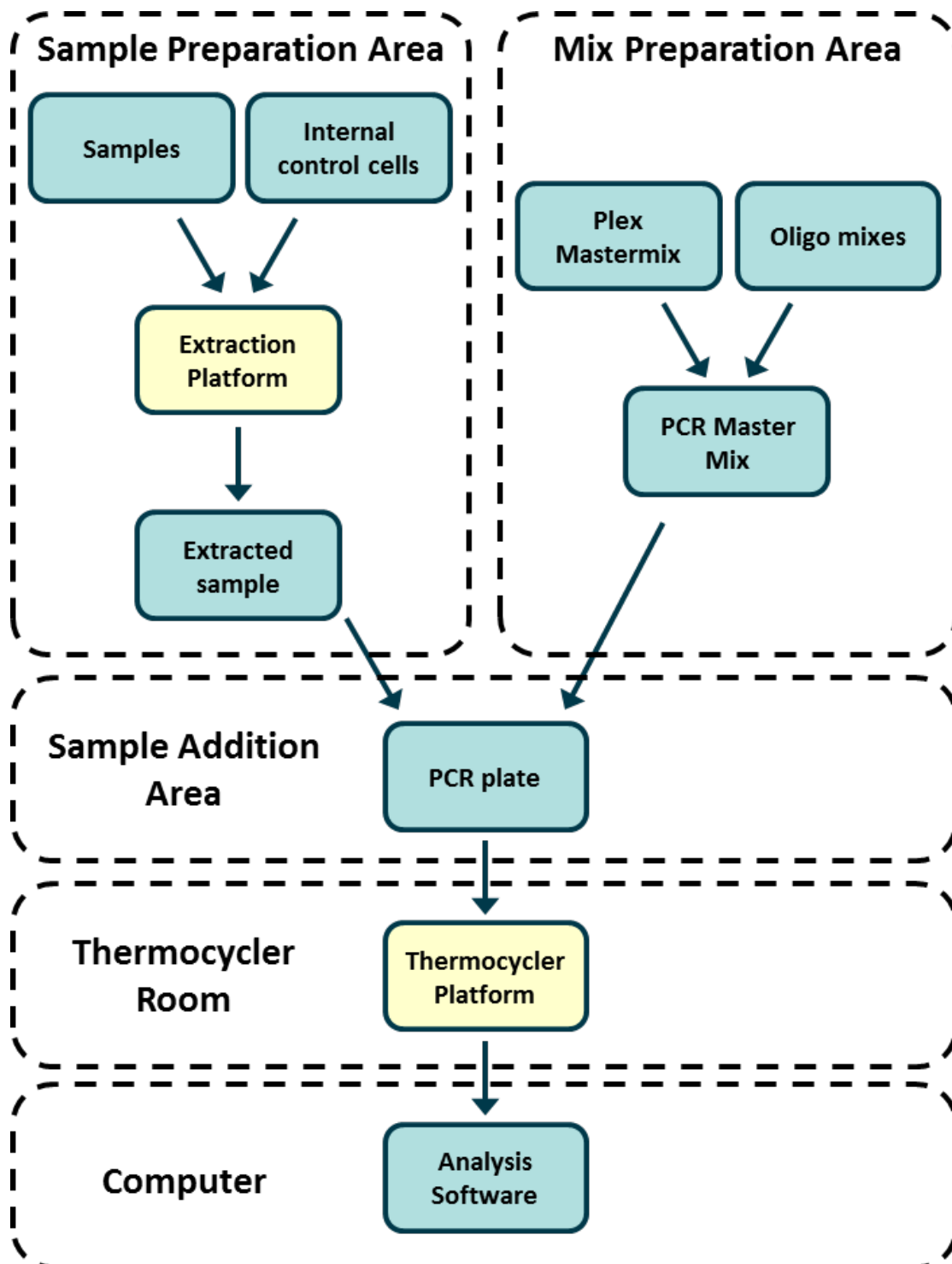
La PCR en temps réel (qPCR) sert à amplifier et détecter les acides nucléiques de pathogènes spécifiquement ciblés. **PlexPCR**[®] est une technologie de qPCR utilisant les enzymes **PlexZyme**[®] qui détectent et signalent la présence du produit amplifié en générant un signal fluorescent (**Figure 1**).

Les enzymes **PlexZyme**[®] sont des complexes ADN catalytiques composés de deux oligonucléotides d'ADN, appelés « enzymes partielles ». Chaque enzyme partielle possède une région spécifique à la cible, un noyau catalytique et une région universelle de liaison à la sonde. En présence du produit cible, les deux enzymes partielles se lient de manière adjacente afin de former la **PlexZyme**[®] active, qui possède l'activité nécessaire pour cliver une sonde marquée. Ce clivage sépare le fluophore et les quencheurs, produisant un signal fluorescent qui peut être surveillé en temps réel. Les enzymes **PlexZyme**[®] offrent davantage de spécificité que les autres technologies de détection, étant donné que la liaison de deux enzymes partielles est nécessaire pour permettre la détection. Les enzymes **PlexZyme**[®] sont également des enzymes à renouvellement multiple, il est donc possible de cliver plusieurs sondes lors de chaque cycle de PCR, ce qui aboutit à un signal fort et sensible. Les tests **PlexZyme**[®] sont hautement sensibles et spécifiques. Ils sont idéalement adaptés à la détection multiplexée d'agents pathogènes.

Figure 1. Représentation schématique de la détection et de la signalisation universelle de *PlexZyme*[®]



9 Aperçu de la procédure



10 Procédure détaillée

Remarque : les réactifs fournis sont cités en italiques et la couleur du capuchon du tube est indiquée entre parenthèses.

10.1 Prélèvement, transport et stockage des échantillons

Les échantillons de lésions génitales, extra-génitales, non-génitales, anorectales et orales masculines et féminines doivent être prélevés, transportés et conservés en appliquant les techniques de laboratoire standard ou en suivant les instructions qui accompagnent les kits de prélèvement.

10.1.1 Dispositifs de prélèvement d'échantillons approuvés

Un prélèvement, un stockage et un transport inadéquats ou inappropriés des échantillons peuvent entraîner de faux résultats. Une formation appropriée au prélèvement des échantillons est fortement recommandée pour garantir la qualité et la stabilité des échantillons.

Les dispositifs de prélèvement d'échantillons qui ont été approuvés avec le kit *PlexPCR*[®] VHS sont mentionnés ci-après avec de brèves consignes concernant la notice du fabricant du dispositif pour le prélèvement, la manipulation et le transport. Ces consignes ne visent pas à remplacer ou à se substituer à la notice fournie par le fabricant. Se reporter toujours à la notice d'information du fabricant du dispositif de prélèvement des échantillons pour connaître les méthodes de prélèvement appropriées.

Avant toute méthode de prélèvement, le personnel qualifié doit s'assurer de la bonne compréhension du dispositif et de la méthodologie. Il faut au moins examiner la description du test pour connaître les éléments suivants : indication du type d'échantillon, volume suffisant, procédure(s), matériel de prélèvement nécessaire, préparation du patient et consignes de manipulation et de stockage appropriées.

10.1.2 Écouvillon sec en milieu de transport viral, prélèvement, transport et conservation

Les écouvillons secs peuvent être utilisés pour le prélèvement de différents types d'échantillons par les professionnels de santé et les patients. Compte tenu de cette variabilité, il convient de se reporter à la notice du fabricant pour connaître les types d'échantillons et les méthodes de prélèvement appropriés.

10.1.3 Prélèvement, transport et stockage du FLOQSwab[™] standard stérile en tube sec (Copan, Cat. n° 552C)

1. Ouvrir la pochette du côté indiqué par la flèche et retirer l'écouvillon en veillant à ne rien toucher avec l'embout de l'écouvillon.
2. Prélever l'échantillon. Pendant le prélèvement, l'extrémité de l'écouvillon ne doit entrer en contact qu'avec la zone sur laquelle l'échantillon doit être prélevé, afin de réduire les risques de contamination.
3. Procéder au frottis conformément à la procédure interne du laboratoire.
4. Conserver à une température de 4 °C pendant 24 heures maximum. Pour toute conservation de longue durée, conserver à une température inférieure ou égale à -80 °C.

10.1.4 Écouvillon sec suspendu dans 1 mL de milieu UTM (Copan, Cat. n° 350C) : prélèvement, transport et stockage

1. Ouvrir l'emballage du kit UTM et retirer l'éprouvette de milieu et le sac interne contenant l'écouvillon stérile.
2. Sortir l'écouvillon stérile de son sachet et prélever l'échantillon clinique ; pour éviter tout risque de contamination, veiller à ce que l'extrémité de l'écouvillon soit uniquement en contact avec le site de prélèvement.
3. Après avoir prélevé l'échantillon, dévisser et retirer le bouchon de l'éprouvette en veillant à ne pas renverser le milieu.
4. Insérer l'écouvillon dans l'éprouvette jusqu'à ce que le point de rupture soit au niveau de l'ouverture de l'éprouvette.
5. Plier et casser l'écouvillon au point de rupture en tenant l'éprouvette éloignée de votre visage et jeter l'excédent.
6. Revisser le bouchon sur l'éprouvette et la fermer hermétiquement.
7. Traiter l'échantillon contenu dans le milieu de transport universel (UTM) dans les 48 heures suivant le prélèvement en conservant le tube à essai à une température de 4 °C pendant 24 heures maximum. Pour toute conservation de longue durée, conserver à une température inférieure ou égale à -80 °C.
8. Avant le traitement, agiter au vortex pendant 20 secondes afin de favoriser la libération de l'échantillon de l'écouvillon et d'homogénéiser le milieu.

10.2 Traitement des échantillons

La validation du kit *PlexPCR*[®] VHS a été effectuée sur les instruments d'extraction énumérés dans le **Tableau 4**.

Voir la **Section 10.3** pour les consignes d'utilisation du Contrôle interne (*Internal Control Cells*).

Tableau 4. Protocoles d'extraction validés

Instrument	Kit d'extraction	Volume d'échantillon	Protocole	Volume d'élution
QIASymphony SP ^a	DSP Virus/Pathogen Minikit	200 µL	Cellfree200_V7_DSP	85 µL
QIAcube HT ^b	QIAamp [®] 96 Virus QIAcube [®] HT kit	200 µL	QIAamp 96 Virus QIAcube HT.QSP	60 µL
MagNA Pure 96 ^c	MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit	200 µL	Pathogen Universal 200	100 µL

^a Voir **10.3.1** pour les consignes d'utilisation du contrôle interne sur le QIASymphony SP

^b Voir **10.3.2** pour les consignes d'utilisation du contrôle interne sur le QIAcube HT

^c Voir la rubrique **10.3.3**, pour les instructions d'utilisation du contrôle interne sur MagNA Pure 96. L'extraction d'acide nucléique pour le milieu liquide provenant de l'écouvillon de Positive Control HSV/VZV/TP élué a été vérifiée avec cette méthode. Se référer à la **Section 15.1** pour plus de détails.

10.3 Internal Control (IC) (Contrôle interne (CI))

Le kit comprend un contrôle interne pour surveiller l'efficacité de l'extraction et l'inhibition de la qPCR. Le test du contrôle interne est fourni sous forme d'un *Control Mix (mélange de contrôle)* (**BLANC**) et de *Internal Control cells (cellules de contrôle interne)* (**ROUGES**). Le *Control Mix (mélange de contrôle)* est ajouté au PCR Master Mix (mélange de solution-mère PCR) (**Tableau 10**). Les *Internal Control cells (cellules de contrôle interne)* contiennent la matrice d'ADN de contrôle interne. Les *Internal Control cells (cellules de contrôle interne)* sont diluées et traitées selon les indications ci-dessous pour les instruments d'extraction spécifiques. La matrice d'ADN de contrôle interne est donc co-extraite avec l'échantillon et co-amplifiée dans la réaction.

10.3.1 Contrôle interne sur le QIASymphony SP

Pour des informations détaillées, veuillez consulter le document « QIASymphony DSP Virus/Pathogen Instructions for Use (Handbook) ». Le mélange tampon AVE/vecteur ARN/contrôle interne doit être préparé immédiatement avant de commencer la série. L'extraction doit être effectuée conformément aux consignes du fabricant.

Diluer les *Internal Control cells (cellules de contrôle interne)* (**ROUGES**) au 1/50 dans du PBS 1x (**Tableau 5**). Ajuster le volume comme requis en utilisant le même facteur de dilution conformément au nombre d'échantillons requis.

Remarque : NE PAS stocker les *Internal Control Cells* (cellules de contrôle interne) diluées.

Tableau 5. Dilution des Internal Control cells (cellules de contrôle interne) pour le QIASymphony (dilution au 1/50)

<i>Internal Control cells (Cellules de contrôle interne)</i> (ROUGES) (µL)	PBS 1x (µL)	Volume total (µL)
40	1960	2000

Les *Internal Control Cells* (cellules de contrôle interne) diluées sont ensuite utilisées pour préparer un mélange tampon AVE/vecteur ARN/contrôle interne, comme indiqué dans le **Tableau 6** ci-dessous. Ajuster le volume selon les besoins en utilisant le même facteur de dilution pour le nombre d'échantillons requis (consulter le manuel du kit d'extraction pour le volume minimum pour le nombre d'échantillons requis).

Les tubes contenant le mélange tampon AVE/vecteur ARN/contrôle interne sont ensuite placés dans un porte-tube et chargés dans la fente A du tiroir d'échantillons dans le QIASymphony SP. 120 µL (par défaut) du mélange sont ajoutés à chaque échantillon.

Tableau 6. Préparation du mélange tampon AVE/vecteur ARN/contrôle interne pour le QIAAsymphony

Type de tube	Nombre d'échantillons	Volume de cellules de CI diluées (µL)	Vecteur ARN du stock (µL)	Tampon AVE (µL)	Volume total (µL)
-	1	10	3	107	120
2 mL	1 + volume mort [^]	40	12	428	480
14 mL	1 + volume mort [#]	60	18	642	720

[^] Le tube de 2 mL nécessite 3 échantillons supplémentaires (360 µL) pour tenir compte du volume mort.

[#] Le tube de 14 mL nécessite 5 échantillons supplémentaires (600 µL) pour tenir compte du volume mort.

10.3.2 Contrôle interne sur le QIAcube HT

Diluer les *Internal Control cells* (cellules de contrôle interne) (**ROUGES**) au 1/10 dans du PBS 1x (voir le **Tableau 7** en guise d'exemple). Ajuster le volume comme requis en utilisant le même facteur de dilution conformément au nombre d'échantillons requis.

Remarque : NE PAS stocker les *Internal Control Cells* (cellules de contrôle interne) diluées.

Tableau 7. Dilution des Internal Control cells (cellules de contrôle interne) pour le QIAcube HT (dilution au 1/10)

<i>Internal Control cells</i> (Cellules de contrôle interne) (ROUGES) (µL)	PBS 1x (µL)	Volume total (µL)
30	270	300

Les *Internal Control Cells* (cellules de contrôle interne) diluées sont ensuite utilisées pour préparer le mélange du tampon ACL, vecteur ARN et cellules de contrôle interne. Les volumes requis par échantillon sont indiqués dans le mode d'emploi du QIAcube HT ; voir le **Tableau 8** en guise d'exemple.

Le logiciel QIAcube HT calcule les volumes de réactif et le nombre d'embouts requis pour terminer le protocole. Ces valeurs sont affichées dans la disposition de la table de travail dans l'espace de travail de QIAcube HT. Pour des informations détaillées, voir le mode d'emploi du QIAcube HT. Le mélange ACL doit être préparé et ajouté à la cuve appropriée immédiatement avant le démarrage de la série. L'extraction doit être effectuée conformément aux consignes du fabricant.

Tableau 8. Préparation du tampon ACL, du vecteur ARN et du contrôle interne

Nombre d'échantillons	Volume de cellules de CI diluées (µL)	Vecteur ARN du stock (µL)	Tampon ACL (mL)
24	280	140	4,5

Ouvrir le fichier de série QIAcube HT approprié correspondant au protocole QIAamp 96 Virus QIAcube HT.QSP. Cliquer sur le bouton **RUN** (Exécuter) pour démarrer la série.

10.3.3 Contrôle interne sur le MagNA Pure 96

Diluer les *Internal Control cells* (cellules de contrôle interne) (**ROUGES**) au 1/200 dans du PBS 1x (**Tableau 9**). Ajuster le volume selon les besoins en utilisant le même facteur de dilution (consulter le manuel du kit d'extraction pour le volume minimum pour le nombre requis d'échantillons). Les cellules de contrôle interne diluées sont chargées dans le Internal Control Tube (tube de contrôle interne) sur le MagNA Pure 96 et 20 µL sont automatiquement ajoutés à chaque échantillon (par défaut).

Remarque : NE PAS stocker les *Internal Control Cells* (cellules de contrôle interne) diluées.

Tableau 9. Dilution des cellules de contrôle interne pour le MagNA Pure 96 (dilution au 1/200)

<i>Internal Control cells (Cellules de contrôle interne) (ROUGES) (µL)</i>	PBS 1x (µL)	Volume total (µL)	Volume ajouté à l'échantillon (µL)
18	3582	3600	20

10.4 Préparation de la PCR en temps réel

Remarque : Avant d'utiliser les réactifs, les décongeler complètement et les homogénéiser soigneusement par bref passage au vortex.

Consulter les **Tableau 1** à **Tableau 3** pour la description du contenu du kit.

10.4.1 Préparation du mélange de solution-mère

Pour un volume de réaction de 20 µL, 15 µL de mélange de solution-mère et 5 µL d'extrait sont requis. Préparer le mélange de solution-mère comme décrit dans le **Tableau 10**.

- Pipeter le mélange de solution-mère dans la plaque de PCR puis ajouter l'échantillon extrait à la réaction.
- Des contrôles positifs et négatifs doivent être effectués sur chaque plaque.
- Sceller la plaque, la centrifuger et la transférer au thermocycleur.

Tableau 10. Mélange de solution-mère

Réactif	Concentration	Volume par réaction de 20 µL (µL)
Nuclease Free Water (Eau exempte de nucléase) (Neutre)	S.O.	3,0
Plex Mastermix (BLEU)	2x	10,0
VHS mix, 20x (VERT)	20x	1,0
Control Mix (Mélange de contrôle)* (BLANC)	20x	1,0
Volume total (µL)		15,0
Ajouter un échantillon de 5 µL pour un volume final de 20 µL		

* Les mélanges de contrôle sont spécifiques aux instruments qPCR. Voir la **Section 4** pour le mélange de contrôle fourni.

11 Programmation et analyse

Les **Sections 19 à 21** détaillent la programmation et l'analyse.

Le kit **PlexPCR® VHS** utilise cinq canaux pour la détection des virus HSV-1, HSV-2, VZV et *T. pallidum* et pour le contrôle interne (**Tableau 11**).

Tableau 11. Canaux pour les cibles <i>PlexPCR® VHS</i>					
Instrument qPCR	HSV-2	HSV-1	VZV	Contrôle interne	<i>T. pallidum</i>
LC480 II	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660
7500 Fast	FAM	JOE	Texas Red	TAMRA	Cy5
CFX96 Dx et CFX96 Touch	FAM	HEX	Texas Red	Quasar 705	Cy5

12 Interprétation des résultats

L'interprétation des données nécessite le logiciel d'analyse **PlexPCR® VHS**. Les logiciels d'analyse **PlexPCR® VHS** automatisent l'interprétation des données des résultats d'amplification et rationalisent le flux de travail. Des instructions sur l'utilisation du logiciel d'analyse sont décrites dans la **Section 22**.

Voir le **Tableau 12** pour le logiciel d'analyse approprié pour chaque instrument de PCR en temps réel. Le logiciel d'analyse peut être fourni sur demande. Contacter tech@speedx.com.au pour de plus amples informations.

Tableau 12. Logiciel d'analyse		
Réf.	Logiciel d'analyse	Instrument qPCR
99005	<i>PlexPCR® VHS</i> (LC480)	LC480 II
99004	<i>PlexPCR® VHS</i> (7500)	7500 Fast
99006	<i>PlexPCR® VHS</i> (CFX)	CFX96 Dx et CFX96 Touch

Consulter le site Web <https://www.plexpcr.com/plexpcr-vhs/resources> pour s'assurer d'utiliser la toute dernière version de logiciel d'analyse.

13 Limitations

- Le test **PlexPCR® VHS** ne doit être effectué que par du personnel formé et conformément au présent mode d'emploi.
- La fiabilité des résultats dépend du respect des procédures de prélèvement, de transport, de stockage et de traitement des échantillons. Le non-respect des procédures adéquates à chacune de ces étapes risque d'entraîner des résultats erronés.
- Le test **PlexPCR® VHS** est un test qualitatif et ne fournit aucune valeur quantitative ni aucune information à propos de la charge de l'organisme.
- Les résultats du test doivent être corrélés avec l'historique clinique, les données épidémiologiques, les données de laboratoire et toutes les autres données à la disposition du clinicien.
- Les résultats négatifs n'excluent pas la possibilité d'infection imputable à un prélèvement incorrect d'échantillons, une erreur technique, la présence d'inhibiteurs, une confusion d'échantillons ou un faible nombre d'organismes dans l'échantillon clinique.
- Les résultats faussement positifs peuvent survenir suite à une contamination croisée par des organismes cibles, leurs acides nucléiques ou un produit amplifié.
- Le kit **PlexPCR® VHS** ne doit pas être utilisé avec le liquide céphalo-rachidien ou pour une utilisation en dépistage prénatal.

14 Contrôle de qualité

Le kit **PlexPCR**[®] VHS comprend un contrôle interne pour surveiller l'efficacité de l'extraction et l'inhibition de la qPCR (**Section 10.3**).

Le Positive Control HSV/VZV/TP (SpeedX, n° cat. 95007) est recommandé comme contrôle positif externe. Les contrôles positifs externes sont utilisés pour les tests de contrôle qualité de routine afin d'aider l'utilisateur à détecter des conditions inattendues pouvant entraîner des erreurs de test. Les instructions détaillées sont fournies dans la **section 15.1** pour le Positive Control HSV/VZV/TP (SpeedX, n° cat. 95007). Il est recommandé d'utiliser un échantillon négatif confirmé en tant que contrôle négatif.

15 Instructions concernant le contrôle positif HSV/VZV/TP

Le Positive Control HSV/VZV/TP (SpeedX, n° cat. 95007) est le contrôle positif externe recommandé qui a été validé pour une utilisation comme contrôle positif externe avec le kit **PlexPCR**[®] VHS. Les contrôles positifs externes sont utilisés pour les tests de contrôle qualité de routine afin d'aider l'utilisateur à détecter des conditions inattendues pouvant entraîner des erreurs de test.

Le Positive Control HSV/VZV/TP (SpeedX, n° cat. 95007) doit être conservé entre 2 °C et 30 °C jusqu'à utilisation. Une fois ouvert, le Positive Control HSV/VZV/TP (SpeedX, n° cat. 95007) ne doit pas être réutilisé.

Veuillez consulter la notice du Positive Control HSV/VZV/TP pour plus d'informations concernant le stockage et les restrictions.

15.1 Instructions d'utilisation

Préparez le Positive Control HSV/VZV/TP dans le milieu de transport universel (UTM) en immergeant l'embout de l'écouvillon dans 3 mL de UTM, puis en cassant l'écouvillon au point de rupture avant de fixer le bouchon à vis et d'incuber à température ambiante pendant une minute. Agitez le flacon au vortex avec l'embout immergé pendant 45 s (ne retirez pas l'embout).

L'extraction d'acide nucléique a été vérifiée pour le milieu liquide provenant de l'écouvillon de Positive Control HSV/VZV/TP avec MagNA Pure 96. Traitez le milieu liquide provenant de l'écouvillon de Positive Control HSV/VZV/TP pour l'étape d'extraction d'acide nucléique avec MagNA Pure 96 comme décrit dans la **Section 10.2** et la **Section 10.3.3**.

Préparez les réactions qPCR comme décrit dans la **Section 10.4** en utilisant le matériau de contrôle positif comme échantillon.

Une fois le contrôle positif (CP) préparé dans 3 mL de milieu UTM, il peut être aliquoté en volumes à usage unique (volume d'aliquote recommandé : 210 µL), et il est stable entre -25 °C et -15 °C pendant 30 jours.

Une fois le sachet en aluminium ouvert, l'écouvillon de Positive Control HSV/VZV/TP doit être utilisé immédiatement.

16 Caractéristiques de performance

16.1 Performance clinique

16.1.1 Étude clinique 1

Une étude clinique rétrospective a été effectuée au Public Health Laboratory (PHL) à Bristol en Angleterre. Les échantillons ont été recueillis entre janvier et mars 2017 et d'après les résultats cliniques de laboratoire, 222 échantillons d'écouvillon positifs et 205 échantillons d'écouvillon négatifs ont été sélectionnés pour inclusion dans l'étude. Les 222 échantillons comprenaient 161 écouvillons génitaux, 14 écouvillons anaux/rectaux, 46 écouvillons non génitaux et 1 écouvillon (aucun site spécifié). Les échantillons ont été extraits avec la plate-forme d'extraction QIASymphony SP (Qiagen), le minikit virus/pathogène DSP (Qiagen) et le protocole acellulaire 200. 200 µL d'échantillon ont été extraits et le volume d'éluion final était 85 µL. Les échantillons ont été testés dans des réactions de 20 µL avec l'instrument 7500 Fast et le kit **PlexPCR[®] VHS₍₅₅₀₎**.

La performance du kit **PlexPCR[®] VHS** a été comparé aux résultats cliniques de laboratoire, obtenus avec une PCR en temps réel effectuée en interne par le laboratoire PHL de Bristol, qui ont été considérés comme les résultats avérés. La sensibilité et la spécificité du kit **PlexPCR[®] VHS** sont indiquées dans le **Tableau 13**. L'analyse des résultats selon le type de prélèvement est présentée dans le **Tableau 14**.

Tableau 13. Comparaison entre le kit PlexPCR[®] VHS₍₅₅₀₎ et les tests PHL par PCR en temps réel internes									
		Tests PHL par PCR en temps réel internes							
		Résultat HSV-1		Résultat HSV-2		Résultat VZV		Résultat <i>T. pallidum</i>	
		Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif
PlexPCR[®] VHS₍₅₅₀₎	Positif	83	1	70	1	47	1	21	0
	Négatif	2	341	0	356	0	379	0	406
Total		85	342	70	357	47	380	21	406
Sensibilité		97,7% (IC à 95 % 91,8-99,7 %)		100,0% (IC à 95 % 94,9-100,0%)		100,0% (IC à 95 % 92,5-100,0%)		100,0% (IC à 95 % 83,9-100%)	
Spécificité		99,7% (IC à 95 % 98,4-100,0%)		99,7% (IC à 95 % 98,5-100,0%)		99,7% (IC à 95 % 98,5-100,0%)		100,0% (IC à 95 % 99,1-100,0%)	

IC à 95 % – Intervalle de confiance à 95 %

Tableau 14. Analyse des résultats cliniques selon le type d'échantillon					
Échantillon	HSV-1	HSV-2	VZV	<i>T. pallidum</i>	Négatif
Génital	73/75	66/66	0/0	21/21	190/190
Anal/rectal	10/10	3/3	1/1	0/0	12/13
Non génital	0/0	0/0	46/46	0/0	0/0

16.1.2 Étude clinique 2

Une étude clinique prospective-rétrospective a été effectuée par le Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory (VIDRL) à Melbourne en Australie. Les échantillons ont été recueillis entre janvier et avril 2018 et d'après les résultats cliniques de laboratoire, 156 échantillons d'écouvillon positifs et 54 échantillons d'écouvillon négatifs ont été sélectionnés pour inclusion dans l'étude. Les 210 échantillons comprenaient 52 écouvillons anaux/rectaux, 131 écouvillons génitaux, 2 écouvillons génitaux/anaux/rectaux, 1 écouvillon génital/non génital, 1 écouvillon génital/non génital/oral, 3 écouvillons génitaux/oraux, 9 écouvillons non génitaux, 10 écouvillons oraux et 1 écouvillon « aucun site spécifié ». Les échantillons ont été extraits avec la plate-forme d'extraction QIAcube HT (Qiagen) en utilisant le kit QIAamp 96 Virus QIAcube HT et le protocole QIAamp 96 Virus QIAcube HT.QSP. 200 µL d'échantillon ont été extraits et le volume d'éluion final était 60 µL. Les échantillons ont été testés dans des réactions de 20 µL sur l'instrument LC480 II en utilisant le kit **PlexPCR**[®] VHS₍₆₁₀₎.

La performance du kit **PlexPCR**[®] VHS a été comparée aux résultats cliniques de laboratoire, obtenus avec une PCR en temps réel effectuée en interne par le VIDRL, qui ont été considérés comme les résultats avérés. La sensibilité et la spécificité du kit **PlexPCR**[®] VHS sont indiquées dans le **Tableau 15**. L'analyse des résultats selon le type de prélèvement est présentée dans le **Tableau 16**.

Tableau 15. Comparaison entre le kit PlexPCR [®] VHS ₍₆₁₀₎ et les tests VIDRL par PCR en temps réel internes									
		Tests VIDRL par PCR en temps réel internes							
		Résultat HSV-1		Résultat HSV-2		Résultat VZV		Résultat <i>T. pallidum</i>	
		Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif
PlexPCR [®] VHS ₍₆₁₀₎	Positif	56	2	48	2	2	0	50	0
	Négatif	0	152	2	158	0	208	0	160
Total		56	154	50	160	2	208	50	160
Sensibilité		100,0% (IC à 95 % 93,6-100,0%)		96,0% (IC à 95 % 86,3-99,5%)		100,0% (IC à 95 % 15,8-100,0%)		100,0% (IC à 95 % 92,9-100,0%)	
Spécificité		98,7% (IC à 95 % 95,4-99,8%)		98,8% (IC à 95 % 95,6-99,8%)		100,0% (IC à 95 % 98,2-100,0%)		100,0% (IC à 95 % 97,7-100,0%)	

IC à 95 % – Intervalle de confiance à 95 %

Tableau 16. Analyse des résultats cliniques selon le type d'échantillon					
Échantillon	HSV-1	HSV-2	VZV	<i>T. pallidum</i>	Négatif
Anal/rectal	16/16	13/13	0/0	9/9	15/15
Génital	34/34	31/32	1/1	31/31	33/34
Génital/anal/rectal	0/0	0/0	0/0	2/2	0/0
Génital/non génital	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0
Génital/non génital/oral	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0
Génital/oral	0/0	0/0	0/0	3/3	0/0
Non génital	2/2	3/3	0/0	1/1	3/3
Oral	4/4	0/1	0/0	3/3	2/2

16.2 Performance analytique

16.2.1 Reproductibilité et répétabilité

La reproductibilité et la répétabilité du kit **PlexPCR**[®] VHS ont été évaluées en utilisant des matrices synthétiques quantifiées pour HSV-1, HSV-2, VZV et *T. pallidum* à 3 fois la LOD de copies par réaction. Les expériences ont été effectuées avec le 7500 Fast.

Pour déterminer la variabilité inter-lots, deux lots ont été testés, traités sur un seul instrument par un seul technicien (**Tableau 17**). Les deux lots ont montré une bonne reproductibilité avec un coefficient de variation (% CV) compris entre 1,56 % et 1,94 %.

Tableau 17. Variabilité inter-lots				
	Cq moyen	É-T	% CV	Nbre d'échantillons
HSV-1 12 copies	26,0	0,50	1,94	12/12
HSV-2 36 copies	25,0	0,43	1,71	12/12
VZV 48 copies	24,0	0,37	1,56	12/12
<i>T. pallidum</i> 24 copies	25,2	0,47	1,87	12/12

Pour déterminer la variabilité journalière, les tests ont été effectués sur trois jours par un technicien sur le même instrument (**Tableau 18**). Les trois séries ont montré une bonne reproductibilité entre les différents jours, avec un coefficient de variation compris entre 1,45 % et 2,33 %.

Tableau 18. Variabilité journalière				
	Cq moyen	Écart-Type	% CV	Nbre d'échantillons
HSV-1 12 copies	26,2	0,60	2,29	18/18
HSV-2 36 copies	24,7	0,36	1,45	18/18
VZV 48 copies	24,1	0,40	1,64	18/18
<i>T. pallidum</i> 24 copies	25,1	0,58	2,33	18/18

Pour déterminer la variabilité inter-séries, trois séries de qPCR ont été comparées, traitées le même jour par le même technicien (**Tableau 19**). Les trois séries ont montré une bonne reproductibilité avec un coefficient de variation compris entre 0,88 % et 2,05 %.

Tableau 19. Variabilité inter-séries				
	Cq moyen	Écart-Type	% CV	Nbre d'échantillons
HSV-1 12 copies	26,5	0,50	1,89	18/18
HSV-2 36 copies	24,7	0,22	0,88	18/18
VZV 48 copies	24,1	0,37	1,53	18/18
<i>T. pallidum</i> 24 copies	25,1	0,51	2,05	18/18

Pour déterminer la variabilité liée au technicien, deux séries ont été comparées, traitées par deux techniciens (**Tableau 20**). Les deux séries traitées par des techniciens différents ont montré une bonne reproductibilité avec un coefficient de variation compris entre 0,96 % et 2,73 %.

Tableau 20. Variabilité liée au technicien				
	Cq moyen	Écart-Type	% CV	Nbre d'échantillons
HSV-1 12 copies	25,9	0,71	2,73	12/12
HSV-2 36 copies	24,8	0,24	0,96	12/12
VZV 48 copies	24,1	0,45	1,86	12/12
<i>T. pallidum</i> 24 copies	25,2	0,30	1,18	12/12

Pour déterminer la variabilité liée à l'instrument, deux séries de deux instruments ont été comparées, traitées par le même technicien (**Tableau 21**). Les séries traitées sur des instruments différents ont montré une bonne reproductibilité avec un coefficient de variation compris entre 1,27 % et 3,49 %.

Tableau 21. Variabilité liée à l'instrument				
	Cq moyen	Écart-Type	% CV	Nbre d'échantillons
HSV-1 12 copies	26,1	0,91	3,49	12/12
HSV-2 36 copies	24,9	0,32	1,27	12/12
VZV 48 copies	24,1	0,41	1,69	12/12
<i>T. pallidum</i> 24 copies	25,0	0,38	1,53	12/12

Pour déterminer la variabilité intra-série, trois expériences ont été comparées, préparées séparément par le même technicien traitant chaque cible sur la même plaque (**Tableau 22**). Les trois expériences ont montré une bonne reproductibilité avec un coefficient de variation compris entre 1,28 % et 2,54 %.

Tableau 22. Variabilité intra-série				
	Cq moyen	Écart-Type	% CV	Nbre d'échantillons
HSV-1 12 copies	25,9	0,66	2,54	18/18
HSV-2 36 copies	24,4	0,31	1,28	18/18
VZV 48 copies	24,3	0,42	1,74	18/18
<i>T. pallidum</i> 24 copies	25,0	0,37	1,47	18/18

16.2.2 Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du kit **PlexPCR**[®] VHS sur le 7500 Fast a été déterminée en réalisant des dilutions en série limitées à l'aide d'une matrice synthétique pour HSV-1, HSV-2, VZV et *T. pallidum*. La sensibilité pour chaque cible a été déterminée comme le nombre de copies par réaction ayant une détection ≥ 95 % et est indiquée dans le **Tableau 23**.

Tableau 23. Sensibilité analytique	
	Sensibilité analytique (copies/réaction)
HSV-1	4
HSV-2	12
VZV	20
<i>T. pallidum</i>	8

16.2.3 Spécificité analytique

Le kit **PlexPCR**[®] VHS a été conçu pour être spécifique aux organismes cibles en vérifiant l'homologie par rapport aux organismes non cibles dans des bases de données de séquences publiques. Les tests de spécificité pour les organismes sélectionnés n'ont pas montré de réactivité croisée (**Tableau 24**). Les expériences ont été effectuées avec le 7500 Fast.

Tableau 24. Spécificité analytique		
Organisme	Source	Concentration test (copies par réaction)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> souche FA 1090	ATCC	10 ⁶
<i>Mycoplasma hominis</i> , souche ZK-CU2	Vircell	10 ⁴
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Vircell	10 ⁴
<i>Chlamydia trachomatis</i> LGV, souche 434	Vircell	10 ⁴
<i>Ureaplasma parvum</i>	Isolat clinique	10 ⁴
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Isolat clinique	10 ⁴
<i>Haemophilus influenzae</i> , souche Rd KW20	ATCC	10 ⁶
<i>Neisseria meningitidis</i> , souche MC58	ATCC	10 ⁶
<i>Enterococcus faecalis</i> , souche V583	ATCC	10 ⁶
<i>Escherichia coli</i> , souche Crooks	ATCC	10 ⁶
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , souche MGH78578	ATCC	10 ⁶
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , souche PAO1-LAC	ATCC	10 ⁶
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> , souche CM-1	Vircell	10 ⁴
<i>Streptococcus pneumoniae</i> , souche R6	ATCC	10 ⁶
<i>Haemophilus ducreyi</i> , souche 35000 HP	ATCC	10 ⁶
Virus de l'herpès humain 6	Vircell	10 ⁴
Virus Epstein-Barr (virus de l'herpès humain 4)	Vircell	10 ⁴
Cytomegalovirus (virus de l'herpès humain 5)	Vircell	10 ⁴

16.2.4 Interférence compétitive

Afin d'étudier l'interférence compétitive, la détection de cibles par le kit **PlexPCR**[®] VHS a été testée dans des échantillons modifiés simulant des co-infections. La détection d'un modèle synthétique pour HSV-1, HSV-2, VZV et *T. pallidum* à faibles concentrations (3 fois la LOD de copies par réaction) a été comparée à la détection dans des échantillons mélangés avec une forte concentration d'une autre cible. Les expériences ont été effectuées avec le 7500 Fast. Toutes les cibles ont été correctement détectées et aucune interférence compétitive n'a été observée (**Tableau 25**).

Tableau 25. Interférence compétitive							
Cible à faible concentration		Interférent compétitif (forte concentration)		Nbre d'échantillons détectés			
Cible	Concentration (copies par réaction)	Cible	Concentration (copies par réaction)	HSV-1	HSV-2	VZV	<i>T. pallidum</i>
HSV-1	12	--	--	3/3	0/3	0/3	0/3
		HSV-2	10 000	3/3	3/3	0/3	0/3
		VZV	10 000	3/3	0/3	3/3	0/3
		<i>T. pallidum</i>	10 000	3/3	0/3	0/3	3/3
HSV-2	36	--	--	0/3	3/3	0/3	0/3
		HSV-1	10 000	3/3	3/3	0/3	0/3
		VZV	10 000	0/3	3/3	3/3	0/3
		<i>T. pallidum</i>	10 000	0/3	3/3	0/3	3/3
VZV	48	--	--	0/3	0/3	3/3	0/3
		HSV-1	10 000	3/3	0/3	3/3	0/3
		HSV-2	10 000	0/3	3/3	3/3	0/3
		<i>T. pallidum</i>	10 000	0/3	0/3	3/3	3/3
<i>T. pallidum</i>	24	--	--	0/3	0/3	0/3	3/3
		HSV-1	10 000	3/3	0/3	0/3	3/3
		HSV-2	10 000	0/3	3/3	0/3	3/3
		VZV	10 000	0/3	0/3	3/3	3/3

16.2.5 Substances potentiellement interférentes

L'effet de potentielles substances interférentes sur le kit **PlexPCR**[®] VHS a été évalué dans des échantillons préparés en traitant le *Internal Control* (contrôle interne), qui vérifie l'extraction et l'inhibition de la qPCR. Trois substances ont été ajoutées aux échantillons négatifs (PBS uniquement), extraites avec les *Internal Control Cells* (cellules de contrôle interne). Un léger écart ($\Delta Cq < 0,5$) du signal du *Internal Control* (contrôle interne) a été observé en présence des substances, ce qui n'a pas affecté la détection (**Tableau 26**).

Tableau 26. Substances potentiellement interférentes					
Substance	Concentration	CI Cq moyen	Écart-Type	ΔCq	Nbre d'échantillons détectés
--	--	26,6	0,78	--	4/4
Albumine	10 mg/mL	26,9	0,31	0,31	3/3
Sang total	10 % (v/v)	27,0	0,14	0,38	3/3
EDTA	3 mM	27,0	0,35	0,43	3/3

17 Service clients et assistance technique

Contactez l'assistance technique pour toute question relative à la configuration des réactions, aux conditions pour le cyclage et pour les autres demandes.

Tél. : +61 2 9209 4170, E-mail : tech@speedx.com.au

18 Références

1. Fan F, Day S, Lu X, Tang Y. Laboratory diagnosis of HSV and varicella zoster virus infections. *Future medicine*. 2014, 9(8):721-731.
2. Garland S, Eundem F, Steben M. Genital herpes. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 2014, 28:1098-1110.
3. Heaton P, Espy M, Binnicker M. Evaluation of 2 multiplex real-time PCR assays for the detection of HSV-1/2 and Varicella zoster virus directly from clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2015, 81:168-170.
4. Klein J, McLaud M, Rogers D. Syphilis on the rise: diagnosis, treatment, and prevention. *The Journal for Nurse Practitioners*. 2015, 11(1):49-55.
5. Smith N, Dhillon S, Cotter J, Ahmed Z. Syphilis: an atypical case of sepsis and multiple anogenital lesions in secondary syphilis. *Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives*. 2016, 6:32495.

19 Annexe 1 : LightCycler® 480 Instrument II

Les informations suivantes sont basées sur le logiciel LightCycler 480 (version 1.5).

Le kit **PlexPCR®** VHS₍₆₁₀₎ contient les fluorophores pour le LightCycler® 480 Instrument II. Le kit **PlexPCR®** Colour Compensation (Compensation de couleur) (réf. 90001) doit être traité et appliqué pour l'analyse de LC480 II (voir la **Section 19.2**) Ce kit peut être fourni sur demande.

19.1 Programmation du LightCycler® 480 Instrument II (LC480 II)

Format de détection

Créer un **Format de détection** personnalisé

Ouvrir **Tools (Outils) > Detection Formats (Formats de détection)**

Créer un nouveau format de détection et le nommer « SpeedX PlexPCR » (peut être fait durant la création du fichier SpeedX Colour Compensation [Compensation de couleur]) (voir la **Figure 2**).

Pour **Sélection de la combinaison de filtres**, sélectionnez ce qui suit (excitation-émission) comme indiqué dans le **Tableau 27**:

Tableau 27. Combinaisons de filtres[^]

LC480 II	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660

[^] Ces combinaisons de filtres sont les noms par défaut des canaux

Régler **Selected Filter Combination List (Liste des combinaisons de filtres sélectionnées)** pour tous les canaux comme suit :

Melt Factor (Facteur de fusion) : 1

Quant Factor (Facteur de quantification) : 10

Max Integration Time (sec) (Temps d'intégration max (s)) : 1

Figure 2. Format de détection SpeedX personnalisé

Excitation Filter	Emission Filter	Name	Melt Factor	Quant Factor	Max Integration Time (Sec)
440	488	440-488	1	10	1
465	510	465-510	1	10	1
533	580	533-580	1	10	1
533	610	533-610	1	10	1
533	640	533-640	1	10	1
618	660	618-660	1	10	1

Paramètres de l'instrument

Créer un **Format de détection** personnalisé

Ouvrir **Tools (Outils) > Instruments**

Sous **Instrument Settings (Paramètres de l'instrument)** > sélectionner **Barcode Enabled (Code barres activé)**

Configuration de l'expérience

Sélectionnez **New Experiment - (Nouvelle expérience)**

Dans l'onglet **Run Protocol (Exécuter le protocole)**

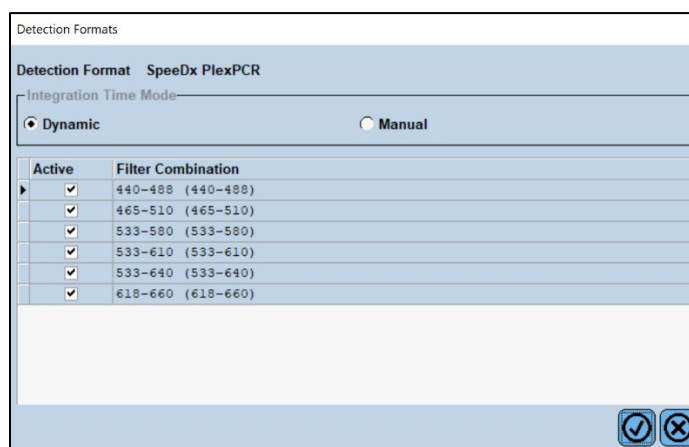
Pour **Detection Format (Format de détection)**, sélectionnez le format personnalisé « SpeedX PlexPCR » (**Figure 3**)

Sélectionnez **Customize (Personnaliser)** >

Sélectionnez **Integration Time Mode > Dynamic (Mode de temps d'intégration > Dynamique)**

Sélectionnez toutes les **Combinaisons de filtres** actives comme indiqué en **Figure 3**

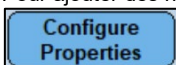
Figure 3. Personnaliser le format de détection



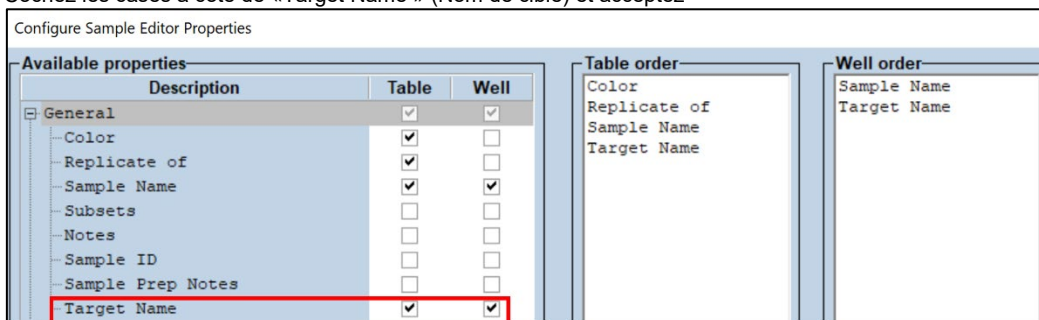
Pour activer la détection automatisée des échantillons dans le logiciel d'analyse, ajoutez des noms de cibles et attribuez des étiquettes aux puits de la plaque

Ouvrez le module **Sample Editor (Éditeur d'échantillons)**

Pour ajouter des noms de cibles, sélectionnez **Configure Properties (Configurer les propriétés)**



Cochez les cases à côté de «Target Name» (Nom de cible) et acceptez



Modifiez le **Nom de cible** pour chaque canal afin qu'il corresponde à la Target Instrument Reference (Référence de la cible sur l'instrument) définie dans le menu Lab Configuration > Assays (Configuration du laboratoire > Tests) du logiciel d'analyse et affichée dans le **Tableau 28**.

Tableau 28. Canaux et noms de cibles pour les cibles PlexPCR® VHS

Nom de cible	HSV-2	HSV-1	VZV	IC	<i>T. pallidum</i>
Canal LC480 II	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660

Pour attribuer des nametags (étiquettes), sélectionnez le puits

Modifiez le **Sample Name (Nom de l'échantillon)** pour qu'il corresponde à l'étiquette définie dans le menu Lab Configuration > Assays du logiciel d'analyse (voir la **Section 22.3**)

Les échantillons doivent comporter l'étiquette comme préfixe. Des préfixes par défaut sont fournis pour les réactions de contrôle (comme indiqué dans le **Tableau 29** et **Figure 4**). Des préfixes supplémentaires peuvent être définis pour les échantillons classiques et les contrôles dans le logiciel d'analyse ou dans un logiciel modifié pour correspondre au logiciel de l'instrument.

Remarque : le préfixe doit correspondre exactement à celui attribué dans le fichier d'exécution.

Tableau 29. Étiquettes d'échantillons pour le logiciel d'analyse

Type d'échantillon	Préfixe par défaut (dans le logiciel d'analyse)
Échantillon classique	Aucune valeur par défaut – définie par l'utilisateur
Contrôle négatif	NC
Contrôle du réactif d'amplification	NTC
Contrôle positif (toutes les cibles) (Pa) Remarque : à utiliser pour le Positive Control HSV/VZV/TP (SpeedX, n° cat. 95007)	PA
Contrôle positif (HSV-1) (Pb)	PB
Contrôle positif (HSV-2) (Pc)	PC
Contrôle positif (VZV) (Pd)	PD
Contrôle positif (<i>T. pallidum</i>) (Pe)	PE

Figure 4. Éditeur d'échantillons – Attribution de noms de cibles et d'étiquettes d'échantillons aux puits

Pos	Filter combination	Color	Sample Name	Repl Of	Target Name
A1	465-510 (465)	Blue	NC		HSV-2
A1	533-580 (533)	Blue	NC		HSV-1
A1	533-610 (533)	Blue	NC		VZV
A1	533-640 (533)	Blue	NC		Internal Control
A1	618-660 (618)	Blue	NC		T. pallidum
A2	465-510 (465)	Red	NTC		HSV-2
A2	533-580 (533)	Red	NTC		HSV-1
A2	533-610 (533)	Red	NTC		VZV
A2	533-640 (533)	Red	NTC		Internal Control
A2	618-660 (618)	Red	NTC		T. pallidum
A3	465-510 (465)	Green	Pa		HSV-2
A3	533-580 (533)	Green	Pa		HSV-1
A3	533-610 (533)	Green	Pa		VZV
A3	533-640 (533)	Green	Pa		Internal Control
A3	618-660 (618)	Green	Pa		T. pallidum
A4	465-510 (465)	Magenta	Pb		HSV-2
A4	533-580 (533)	Magenta	Pb		HSV-1
A4	533-610 (533)	Magenta	Pb		VZV
A4	533-640 (533)	Magenta	Pb		Internal Control
A4	618-660 (618)	Magenta	Pb		T. pallidum
A5	465-510 (465)	Grey	Pc		HSV-2
A5	533-580 (533)	Grey	Pc		HSV-1
A5	533-610 (533)	Grey	Pc		VZV
A5	533-640 (533)	Grey	Pc		Internal Control
A5	618-660 (618)	Grey	Pc		T. pallidum
A6	465-510 (465)	Yellow	Pd		HSV-2
A6	533-580 (533)	Yellow	Pd		HSV-1
A6	533-610 (533)	Yellow	Pd		VZV
A6	533-640 (533)	Yellow	Pd		Internal Control
A6	618-660 (618)	Yellow	Pd		T. pallidum
A7	465-510 (465)	Dark Red	Pe		HSV-2
A7	533-580 (533)	Dark Red	Pe		HSV-1
A7	533-610 (533)	Dark Red	Pe		VZV
A7	533-640 (533)	Dark Red	Pe		Internal Control
A7	618-660 (618)	Dark Red	Pe		T. pallidum

Définir le **Volume de réaction** > 20 µL

Créez le programme suivant dans le **Tableau 30** (illustré plus en détail dans la **Figure 5 – Figure 8**) :

Tableau 30. Thermocycling Program (Programme de thermocyclage)				
Nom du programme	Cycles	Target °C (Cible °C)	Hold (Maintien)	Ramp Rate (Montée en température) (°C/s) [≠]
Polymerase activation (Activation de la polymérase)	1	95 °C	2 minutes	4,4
Touch down cycling (Cyclage Touchdown) [⊖] : Step down -0,5 C/cycle	10	95 °C	5 s	4,4
		61 °C – 56,5 °C [⊖]	30 s	2,2
Quantification cycling (Cyclage par quantification) ⁺ : Acquisition/Détection	40	95 °C	5 s	4,4
		52 °C ⁺	40 s	2,2
Cooling (Refroidissement)	1	40 °C	30 s	2,2

[≠] Montée en température par défaut (plaque 96 puits)

[⊖] **Step size (incrément)** : -0.5 °C/Cycle, **Sec Target (Cible s)** : 56 °C

⁺ **Analysis mode (Mode d'analyse)** : Quantification, **Acquisition mode (Mode d'acquisition)** : Single (unique)

Figure 5. Programme de thermocyclage – Activation de la polymérase

The screenshot shows the 'Programs' table with the following data:

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Polymerase activation	1	None
Touchdown cycling	10	None
Quantification cycling	40	Quantification
Cooling	1	None

The 'Polymerase activation Temperature Targets' table is also visible:

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:02:00	4.4	0	0	0	0

Figure 6. Programme de thermocyclage – Cyclage Touch down

The screenshot shows the 'Programs' table with the following data:

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Polymerase activation	1	None
Touchdown cycling	10	None
Quantification cycling	40	Quantification
Cooling	1	None

The 'Touchdown cycling Temperature Targets' table is also visible:

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:05	4.4	0	0	0	0
61	None	00:00:30	2.2	56	0.5	0	0

Figure 7. Programme de thermocyclage – Cyclage de quantification

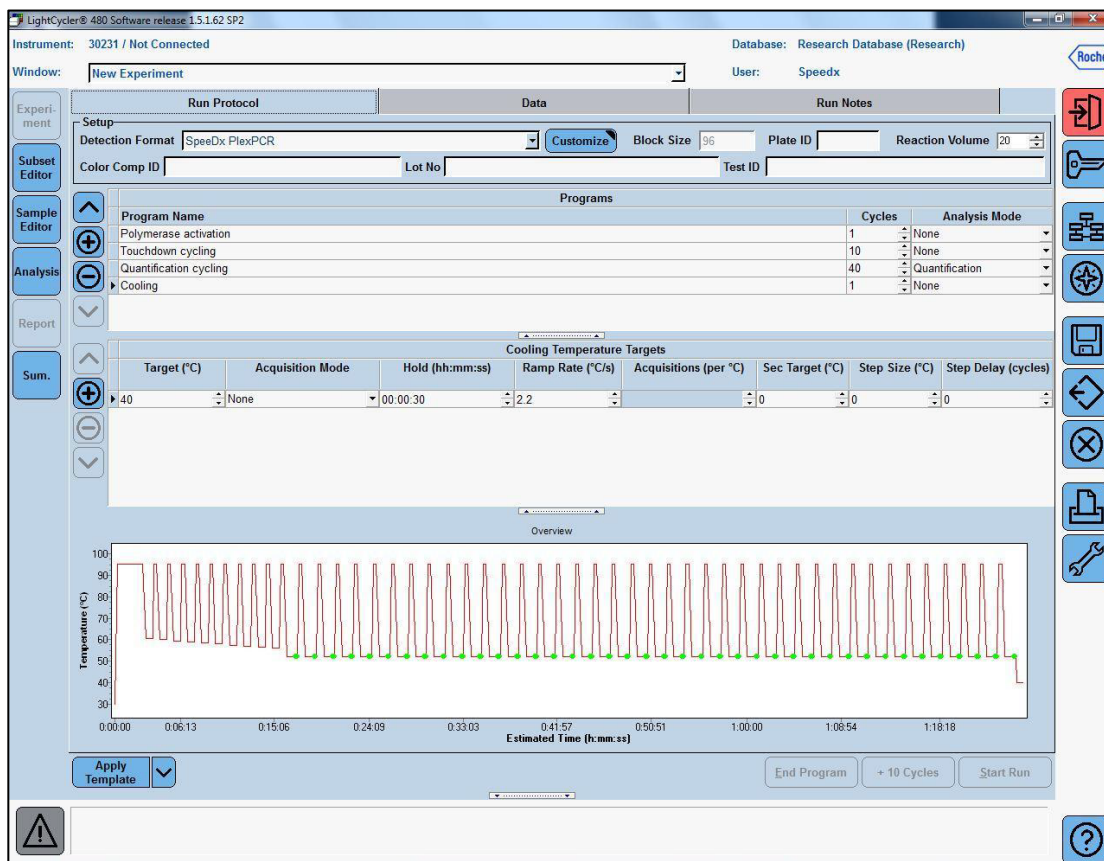
The screenshot shows the 'Programs' table with the following data:

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Polymerase activation	1	None
Touchdown cycling	10	None
Quantification cycling	40	Quantification
Cooling	1	None

The 'Quantification cycling Temperature Targets' table is also visible:

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:05	4.4	0	0	0	0
52	Single	00:00:40	2.2	0	0	0	0

Figure 8. Programme de thermocyclage – Refroidissement



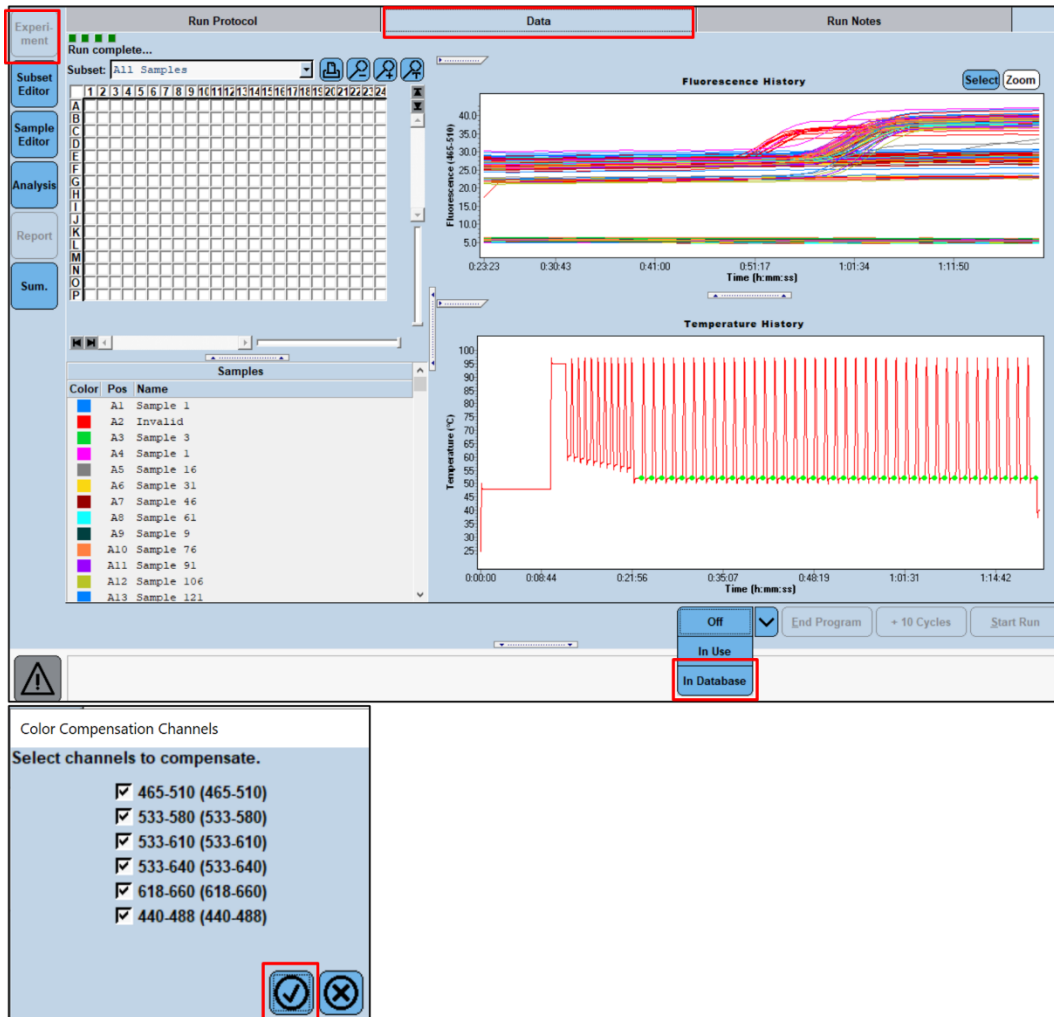
> Start Run (Lancer la série)

Une fois le programme de cyclage terminé, joignez l'objet CC au fichier d'exécution comme indiqué dans la **Figure 9** et exportez-le sous forme de fichier .IXO pour analyse dans le logiciel d'analyse **PlexPCR®** VHS. Se référer à la **Section 19.2** pour obtenir des instructions sur la façon de créer l'objet CC et de le stocker dans la base de données du logiciel LightCycler 480.

Sélectionnez **Experiment (Expérience) > Data (Données)**

Cliquez sur la flèche déroulante à côté de **Colour Comp (Off) (Comp. couleur [Désactivé])** et sélectionnez **In Database (Dans la base de données)**

Figure 9. Joindre l'objet CC au fichier d'exécution



Sélectionnez l'objet CC approprié, assurez-vous que tous les canaux sont sélectionnés et sélectionnez l'icône avec la coche

Sélectionnez l'icône **Save (Sauvegarder)**

Sélectionnez l'icône **Export (Exporter)**

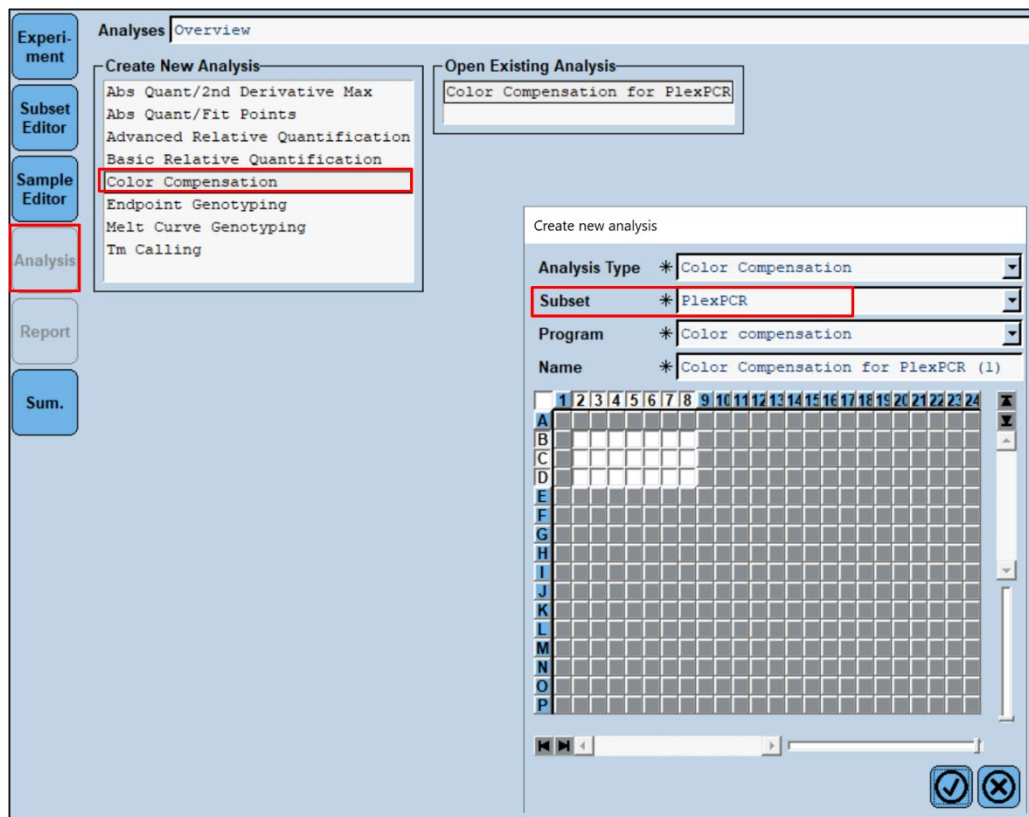
Sauvegardez dans un endroit facilement identifiable

19.2 Compensation des couleurs pour LightCycler® 480 Instrument II

REMARQUE : le kit *PlexPCR*® Colour Compensation (n° cat. 90001) doit être exécuté et appliqué pour l'analyse LC480 II. Ce kit peut être fourni sur demande.

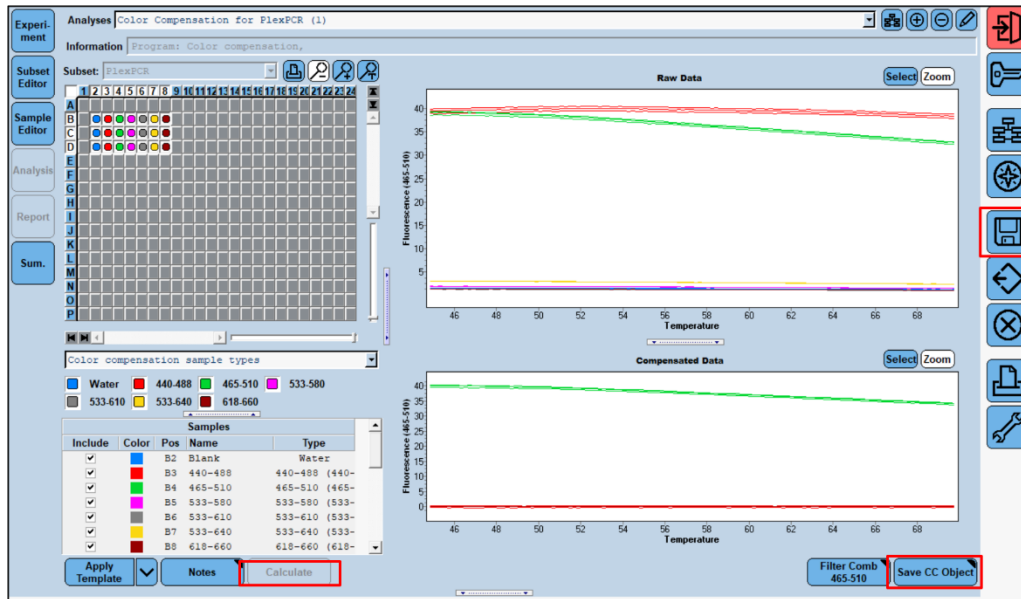
Analysez le fichier de compensation des couleurs via **Analysis (Analyser) > Colour Compensation (Compensation des couleurs)** et sélectionnez le subset (sous-ensemble) approprié, comme illustré à la **Figure 10**.

Figure 10. Analyse – Compensation des couleurs



Sélectionnez **Calculate (Calculer)** (Figure 11).

Figure 11. Calculer et enregistrer l'objet CC



Se référer aux instructions d'utilisation de *PlexPCR Colour Compensation* (IF-IV0001) pour en savoir plus afin de garantir que le fichier de compensation des couleurs a été créé correctement.

Sélectionnez **Save (Sauvegarder)**



19.3 Interprétation des résultats

Le logiciel d'analyse *PlexPCR® VHS (LC480)* est nécessaire pour interpréter les données. Le logiciel d'analyse peut être fourni sur demande. Contactez tech@speedx.com.au pour plus d'informations.

Se référer à la **Section 22** pour obtenir des instructions sur l'utilisation du logiciel d'analyse *PlexPCR® VHS (LC480)*.

20 Annexe 2 : Applied Biosystems® 7500 Fast

Les informations suivantes sont basées sur le 7500 Software v2.3.

Le kit **PlexPCR® VHS₍₅₅₀₎** contient les fluorophores pour le système Applied Biosystems® (ABI) 7500 Fast. Les étalonnages par défaut sont utilisés pour tous les canaux. Aucun étalonnage personnalisé n'est requis.

20.1 Programmation du système Applied Biosystems® 7500 Fast

Sélectionner **Advanced Setup (Configuration avancée)**

Dans **Setup (Configuration)** > ouvrir **Experiment Properties (Propriétés de l'expérience)** et sélectionner les options suivantes

Nommer l'expérience

Instrument > 7500 Fast (96 puits)

Type of experiment (Type d'expérience) > Quantitation – Standard Curve (Analyse quantitative - Courbe standard)

Reagents (Réactifs) > Other (Autre)

Ramp Speed (Vitesse de rampe) > Standard

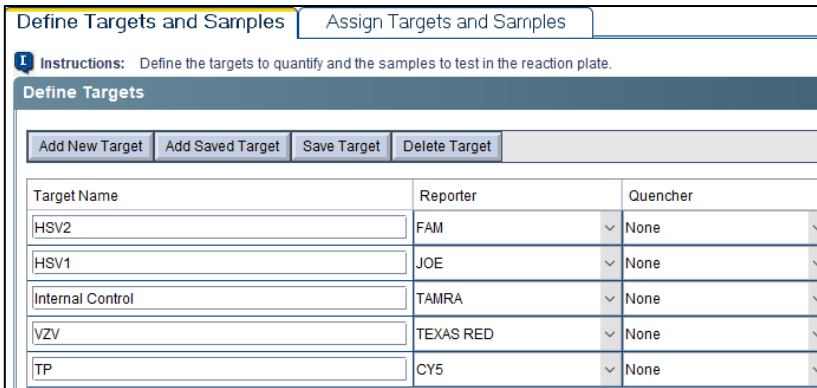
Dans **Setup (Configuration)** > ouvrir **Plate Setup (Configuration plaque)**

Dans l'onglet **Define Targets and Samples (Définir cibles et échantillons)** >

Définissez les cibles comme indiqué ci-dessous dans le **Tableau 31** et la **Figure 12** définissez les couleurs selon les besoins)

Tableau 31. Définir des cibles		
Target Name (Nom de cible)	Reporter (Émetteur)	Quencher (Suppresseur)
HSV-2	FAM	None
HSV-1	JOE	None
VZV	Texas Red	None
IC	TAMRA	None
<i>T. pallidum</i>	Cy5	None

Figure 12. Définir les cibles et les échantillons



Définir les échantillons (définir les couleurs selon les besoins)

Pour activer la détection automatisée des échantillons dans le logiciel d'analyse, assurez-vous que le Target Name (Nom de cible, indiqué dans le **Tableau 32**) correspond à la Target Instrument Reference (Référence de la cible sur l'instrument) définie dans le menu **Configuration > Assays (Configuration de laboratoire > Tests)** du logiciel d'analyse

De plus, des **sample nametags** (étiquettes d'échantillons) devront également être attribuées aux puits de la plaque

Dans **Setup (Configuration)** > ouvrez **Plate Setup (Configuration de la plaque)**

Dans l'onglet **Define Targets and Samples (Définir les cibles et les échantillons)** >

Define Samples (Définir les échantillons)

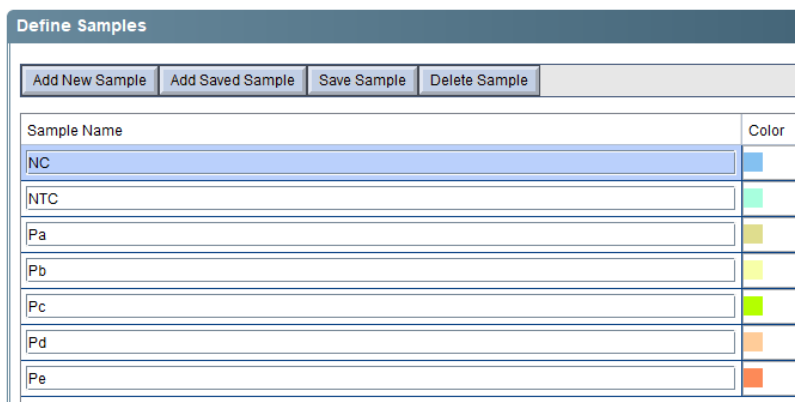
Modifiez le **Sample Name (Nom de l'échantillon)** pour qu'il corresponde à l'étiquette définie dans le menu **Lab Configuration > Assays (Configuration de laboratoire) > Tests** du logiciel d'analyse (voir la **Section 22.3**)

Les échantillons doivent comporter l'étiquette comme préfixe. Des étiquettes par défaut sont fournies pour les réactions de contrôle (comme indiqué dans le **Tableau 32** et la **Figure 13**). Des étiquettes supplémentaires peuvent être définies pour les échantillons classiques et les contrôles dans le logiciel d'analyse ou dans un logiciel modifié pour correspondre au logiciel de l'instrument.

Remarque : l'étiquette doit correspondre exactement à celle attribuée dans le fichier d'exécution.

Tableau 32. Étiquettes d'échantillons pour le logiciel d'analyse	
PlexPCR® VHS (7500)	
Type d'échantillon	Préfixe par défaut (dans le logiciel d'analyse)
Échantillon classique	Aucune valeur par défaut – définie par l'utilisateur
Contrôle négatif	NC
Contrôle du réactif d'amplification	NTC
Contrôle positif (toutes les cibles) (Pa) Remarque : à utiliser pour le Positive Control HSV/VZV/TP (SpeedX, n° cat. 95007)	PA
Contrôle positif (HSV-1) (Pb)	PB
Contrôle positif (HSV-2) (Pc)	PC
Contrôle positif (VZV) (Pd)	PD
Contrôle positif (<i>T. pallidum</i>) (Pe)	PE

Figure 13. Définition des échantillons – Attribution de noms de cibles et d'étiquettes d'échantillons aux puits



Dans l'onglet **Assign Targets and Samples (Attribuer les cibles et les échantillons)** >

Sélectionnez les puits et attribuez des cibles et des échantillons aux puits sélectionnés

Sélectionnez **Passive reference > None (Référence passive > Aucune)**

Dans **Setup (Configuration)** > ouvrez **Run Method (Exécuter la méthode)**

Définir **Reaction Volume Per Well (Volume de réaction par puits)** > 20 µL

Créez le programme suivant dans **Tableau 33** (affiché plus en détail dans la vue graphique (**Figure 14** et **Figure 15**) et la vue tabulaire (**Figure 16**) :

Tableau 33. Thermocycling Program (Programme de thermocyclage)				
Program name (Nom du programme)	Cycles	Target °C (Cible °C)	Hold (Temps d'arrêt)	Ramp (Vitesse de rampe)*
Polymerase activation (Activation de la polymérase)	1	95 °C	2 min	100 %
Touch down cycling (Cyclage Touchdown) : Step down (Cyclage par essais : Incrément) -0,5 °C/cycle [⊖]	10	95 °C	5 s	100 %
		61 °C – 56,5 °C [⊖]	30 s	100 %
Quantification cycling (Cyclage par quantification)* : Acquisition/Détection	40	95 °C	5 s	100 %
		52 °C ⁺	40 s	100 %

* Vitesse de rampe par défaut

⊖ Enable AutoDelta (Activer AutoDelta) : -0,5 °C/cycle

+ Collect data on hold (Rassembler données en temps d'arrêt)

Figure 14. Méthode de traitement – Graphical View (Vue graphique)

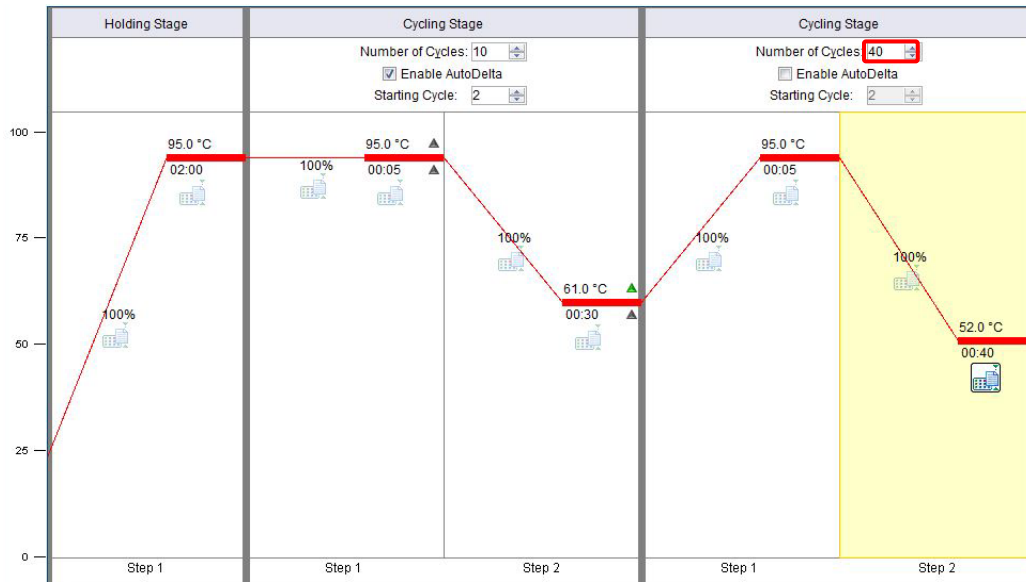


Figure 15. Méthode de traitement – Graphical View (Vue graphique) – Enable AutoDelta (Activer AutoDelta)

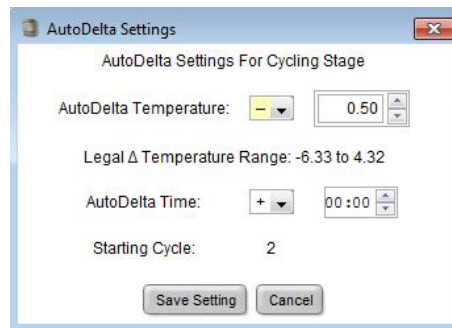


Figure 16. Méthode de traitement – Tabular View (Vue tabulaire)

	Holding Stage	Cycling Stage		Cycling Stage	
		Number of Cycles: 10 <input checked="" type="checkbox"/> Enable AutoDelta Starting Cycle: 2		Number of Cycles: 40 <input type="checkbox"/> Enable AutoDelta Starting Cycle: 2	
Ramp Rate (%)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Temperature (°C)	95.0	95.0	61.0	95.0	52.0
Time	02:00	00:05	00:30	00:05	00:40
AutoDelta Temp:		+ 0.00	- 0.50		
AutoDelta Time:		+ 00:00	+ 00:00		
Collect Data on Ramp:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Collect Data on Hold:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Step 1	Step 1	Step 2	Step 1	Step 2

Dans **Setup (Configuration)** > ouvrir **Run Method (Méthode de traitement)**

Sélectionner **Start Run (Lancer la série)**

20.2 Interprétation des résultats

L'interprétation des données nécessite le logiciel d'analyse **PlexPCR® VHS (7500)**. Le logiciel d'analyse peut être fourni sur demande. Contacter tech@speedx.com.au pour de plus amples informations.

Voir la **Section 22** pour les consignes d'utilisation du logiciel d'analyse **PlexPCR® VHS (7500)**.

21 Annexe 3 : Systèmes de PCR en temps réel Bio-Rad CFX96 Dx™ et CFX96 Touch™

Les informations suivantes reposent sur le système Bio-Rad CFX Manager v3.1

Le kit **PlexPCR®** VHS₍₆₇₅₎ contient les fluorophores pour le système de PCR en temps réel CFX96. Les étalonnages de coloration par défaut sont utilisés pour tous les canaux. Aucun étalonnage personnalisé n'est requis.

21.1 Programmation des systèmes de PCR en temps réel CFX96 Dx et CFX96 Touch

Sélectionner **View (Afficher)** > ouvrir **Run Setup (Configuration série)**

Dans **Run Setup (Configuration série)** > onglet **Protocol (Protocole)** > sélectionner **Create New (Créer)**

Dans **Protocol Editor (Éditeur de protocole)** (voir la **Figure 17**):

Régler **Sample Volume (Volume d'échantillon)** > 20 µL

Créez le programme de cyclage thermique suivant dans le **Tableau 34** et enregistrez-le sous « SpeedX PCR ». Ce protocole peut être sélectionné pour les exécutions futures.

Pour le Touch down cycling (Cyclage Touchdown), sélectionner l'étape 3 puis **Step options (Options d'étape)** > Increment (Incrément) : -0,5 °C/cycle (présenté plus en détail dans la **Figure 18**).

Tableau 34. Thermocycling Program (Programme de thermocyclage)			
Program name (Nom du programme)	Cycles	Target °C (Cible °C)	Hold (Temps d'arrêt)
Polymerase activation (Activation de la polymérase)	1	95 °C	2 min
Touch down cycling (Cyclage Touchdown) ^δ : Step down (Cyclage par essais : Incrément) -0,5 °C/cycle	10	95 °C	5 s
		61 °C – 56,5 °C ^δ	30 s
Quantification cycling (Cyclage par quantification) ⁺ : Acquisition/Détection	40	95 °C	5 s
		52 °C ⁺	40 s

^δ **Step options (Options d'étape)** > Increment (Incrément) : -0,5 °C/cycle

⁺ **Add Plate Read to Step (Ajouter lecture de plaque à l'étape)**

Figure 17. Éditeur de protocole

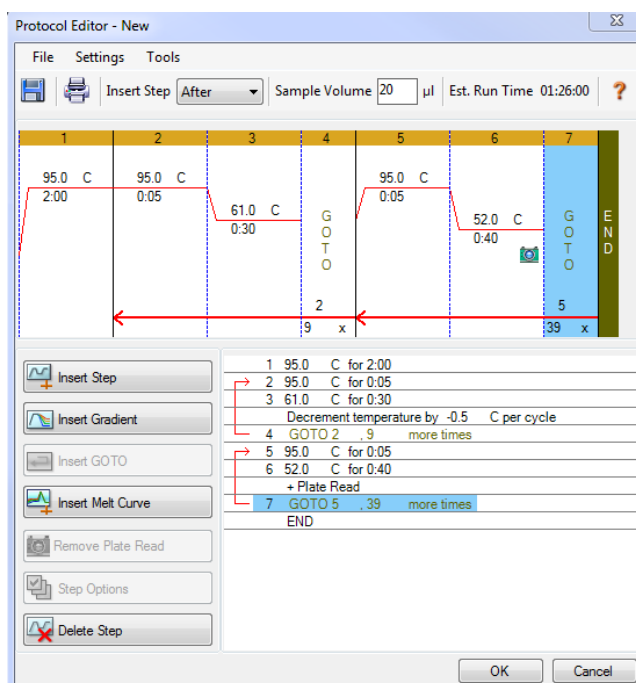
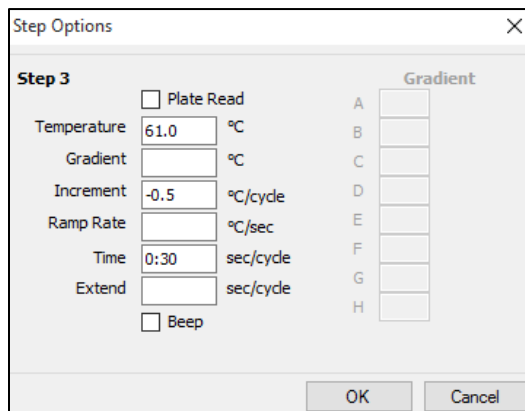


Figure 18. Éditeur de protocole – Options d'étape



Dans **Run Setup (Configuration série)** > onglet **Plate (Plaque)**

Sélectionner **Create New (Créer)**

Sélectionner **Settings (Paramètres)** > **Plate Type (Type de plaque)** > sélectionner **BR Clear (BR transparente)**

Régler **Scan mode (Mode balayage)** > All channels (Tous les canaux)

Select Fluorophores (Sélectionner Fluorophores) > FAM, HEX, Texas Red, Quasar 705, Cy5 (voir le **Tableau 35**)

Sélectionner les puits contenant des échantillons et assigner le **Sample Type (Type d'échantillon)** puis cocher **Load (Charger)** pour les fluorophores (FAM, HEX, Texas Red, Quasar 705, Cy5)

Enregistrer la plaque

Tableau 35. Canaux pour les cibles *PlexPCR*[®] VHS

Target Name (Nom de cible)	HSV-2	HSV-1	VZV	Contrôle interne	<i>T. pallidum</i>
Canal CFX96	FAM	HEX	Texas Red	Quasar 705	Cy5

Dans **Run Setup (Configuration série)** > onglet **Start Run (Lancer la série)**

Sélectionner le bloc

Start Run (Lancer la série)

Pour activer la détection automatisée des échantillons dans le logiciel d'analyse, assurez-vous que le **Target Name (Nom de cible)** et le canal (indiqués dans le **Tableau 35**) correspondent à la Target Instrument Reference (Référence de la cible sur l'instrument) définie dans le menu **Lab Configuration > Assays (Configuration de laboratoire > Tests)** du logiciel d'analyse.

De plus, des nametags (étiquettes d'échantillons) devront également être attribuées aux puits de la plaque

Ouvrez le module **Plate Setup (Configuration de la plaque)**

Sélectionnez le puits

Modifiez le **Sample Name (Nom de l'échantillon)** pour qu'il corresponde à l'étiquette définie dans le module **Lab Configuration > Assays (Configuration de laboratoire > Tests)** du logiciel d'analyse (voir la **Section 22.3**)

Les échantillons doivent comporter l'étiquette comme préfixe. Des étiquettes par défaut sont fournies pour les réactions de contrôle (comme indiqué dans le **Tableau 36** et la **Figure 19**). Des étiquettes supplémentaires peuvent être définies pour les échantillons classiques et les contrôles dans le logiciel d'analyse ou dans un logiciel modifié pour correspondre au logiciel de l'instrument.

REMARQUE : l'étiquette doit correspondre exactement à celle attribuée dans le fichier d'exécution.

Tableau 36. Étiquettes d'échantillons pour le logiciel d'analyse	
PlexPCR® VHS (CFX)	
Type d'échantillon	Préfixe par défaut (dans le logiciel d'analyse)
Échantillon classique	Aucune valeur par défaut – définie par l'utilisateur
Contrôle négatif	NC
Contrôle du réactif d'amplification	NTC
Contrôle positif (toutes les cibles) (Pa) Remarque : à utiliser pour le Positive Control HSV/VZV/TP (SpeedX, n° cat. 95007)	PA
Contrôle positif (HSV-1) (Pb)	PB
Contrôle positif (HSV-2) (Pc)	PC
Contrôle positif (VZV) (Pd)	PD
Contrôle positif (<i>T. pallidum</i>) (Pe)	PE

Figure 19. Éditeur de plaques – Attribution de noms de cibles et d'étiquettes d'échantillons aux puits

	1	2
A	Pos HSV-2 HSV-1 VZV T. pallidum IC Pa	Neg HSV-2 HSV-1 VZV T. pallidum IC NC
	Pos HSV-2 HSV-1 VZV T. pallidum IC Pb	NTC HSV-2 HSV-1 VZV T. pallidum IC NTC
	Pos HSV-2 HSV-1 VZV T. pallidum IC Pc	Unk HSV-2 HSV-1 VZV T. pallidum IC Sample 1
	Pos HSV-2 HSV-1 VZV T. pallidum IC Pd	Unk HSV-2 HSV-1 VZV T. pallidum IC Sample 2
	Pos HSV-2 HSV-1 VZV T. pallidum IC Pe	Unk HSV-2 HSV-1 VZV T. pallidum IC Sample 3

21.2 Interprétation des résultats

Le logiciel d'analyse **PlexPCR® VHS (CFX)** est nécessaire pour interpréter les données. Le logiciel d'analyse peut être fourni sur demande. Contactez tech@speedx.com.au pour plus d'informations.

Se référer à la **Section 22** pour obtenir des instructions sur l'utilisation du logiciel d'analyse **PlexPCR® VHS (CFX)**.

22 Annexe A : Interprétation des résultats avec le logiciel d'analyse *PlexPCR*® VHS

L'interprétation des données nécessite FastFinder avec le logiciel d'analyse *PlexPCR*® VHS.

Voir le **Tableau 37** pour le logiciel d'analyse approprié pour permettre le compte rendu de HSV-1, HSV-2, VZV et de *T. pallidum* avec le kit *PlexPCR*® VHS. Le logiciel d'analyse peut être fourni sur demande. Contacter tech@speedx.com.au pour de plus amples informations.

Tableau 37. Logiciel d'analyse		
Réf.	Logiciel d'analyse*	Instrument qPCR
99004	<i>PlexPCR</i> ® VHS (7500)	7500 Fast
99005	<i>PlexPCR</i> ® VHS (LC480)	LC480 II
99006	<i>PlexPCR</i> ® VHS (CFX)	CFX96 Dx et CFX96 Touch

* Consulter le site Web <https://www.plexpcr.com/plexpcr-vhs/resources> pour s'assurer d'utiliser la toute dernière version de logiciel d'analyse.

REMARQUE : Observer les pratiques de laboratoire standard pour le transfert, le signalement et le stockage des résultats afin de prévenir la perte des informations relatives aux échantillons.

22.1 Plateforme FastFinder – Exigences informatiques minimales

Le logiciel d'analyse est disponible sur la plateforme FastFinder (<https://www.ugentec.com/fastfinder/analysis>). Il est recommandé aux clients d'accéder à la plateforme logicielle à partir d'un réseau et d'un ordinateur sécurisés et fiables. Les exigences informatiques minimales concernant l'accès à la plateforme FastFinder et son utilisation sont répertoriées ci-dessous.

Exigences relatives au matériel

Connexion Internet Câble ou DSL

Résolution d'écran minimale : 1 366 x 768 pixels, optimale : 1 920 x 1 080 pixels ou plus

Navigateurs pris en charge

- Microsoft Edge 88 ou plus récent
- Firefox 83 ou plus récent
- Google Chrome 88 ou plus récent.

Exigences relatives au pare-feu

Les hôtes suivants doivent être accessibles via HTTPS (port 443) :

- *.ugentec.app
- *.fastfinder.app
- *.pendo.io
- *.fonts.gstatic.com
- *.googleapis.com
- *.msecnd.net
- *.visualstudio.com
- *.browser-update.org
- *.blob.core.windows.net
- *.powerbi.com
- *.analysis.windows.net

*.pbideldicated.windows.net

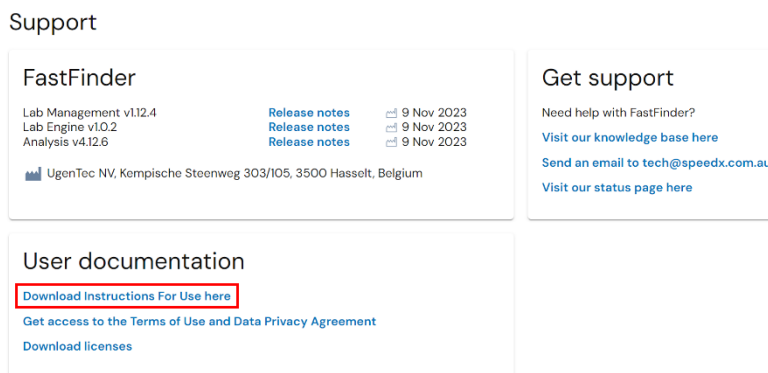
*.content.powerapps.com

Si nécessaire, des exceptions de pare-feu devront être configurées pour ces hôtes. Afin d'accéder à tout le contenu des guides d'utilisation intégrés à l'application, l'hôte *.player.vimeo.com doit également être accessible.

Pour des instructions plus détaillées sur la plateforme **FastFinder**, se référer aux instructions d'utilisation de FastFinder accessibles depuis le menu **Support**.

Pour accéder au menu **Support**

- Sélectionnez **Support** dans la liste des options de menu située dans le panneau de gauche
- Sélectionnez **Download Instructions For Use here (Télécharger les instructions d'utilisation ici)** dans la section **User Documentation (Documentation utilisateur)**




22.2 Plug-in d'analyse (nouvel utilisateur)

Se référer aux **Instructions d'utilisation de FastFinder** pour obtenir des instructions détaillées sur la configuration des tests, accessibles depuis le **menu Support**

Vous pouvez accéder à FastFinder directement via un navigateur Web en vous connectant avec votre nom d'utilisateur et votre mot de passe uniques sur <https://customer.fastfinder.app>.

- Sélectionnez **Lab Configuration > Assays (Configuration du laboratoire > Tests)** dans le menu de gauche
- Sélectionnez **Add New Assay (Ajouter un nouveau test)**
 - > Pour LC480 II > Sélectionnez **PlexPCR VHS (LC480)** dans la liste
 - > Pour 7500 Fast > Sélectionnez **PlexPCR VHS (7500)** dans la liste
 - > Pour CFX96 Dx et CFX96 Touch > Sélectionnez **PlexPCR VHS (CFX)** dans la liste
- Sélectionnez **Import Selected (Importer la sélection)**



Pour activer ou désactiver les versions du plug-in d'analyse

- > Dans l'**onglet General**
- > Accédez au Statut
- > Sélectionnez  **Active** pour activer ou désactiver la version du test

22.3 Attribution de nom à l'échantillon

Des étiquettes d'échantillon peuvent être attribuées à un plug-in de test pour automatiser la détection des puits et des types d'échantillons à analyser.

Sélectionnez **Lab Configuration > Assays (Configuration de laboratoire > Tests)** dans le menu de gauche

- Dans l'**onglet General**, accédez aux étiquettes (préfixes) du tableau **Sample types (Types d'échantillons)** et sélectionnez  pour ajouter une nouvelle étiquette
 - > Ajoutez le mot, l'acronyme ou la lettre souhaité à la zone de texte
 - > Des étiquettes par défaut sont fournies pour les contrôles. Celles-ci peuvent être supprimées en sélectionnant le  à côté de l'étiquette
- Dans le logiciel de l'instrument (avant ou après la fin de l'exécution), attribuez la même étiquette aux puits appropriés
 - > Pour **LC480 II**, voir la **Section 19** pour obtenir des instructions sur les étiquettes d'échantillons de paramétrage dans le fichier d'exécution
 - > Pour **7500 Fast**, voir la **section 20** pour obtenir des instructions sur les étiquettes d'échantillons de paramétrage dans le fichier d'exécution
 - > Pour **CFX96 Dx** et **CFX96 Touch**, voir la **section 21** pour obtenir des instructions sur les étiquettes d'échantillons de paramétrage dans le fichier d'exécution

REMARQUE : les étiquettes d'échantillons sont sensibles à la casse. L'étiquette doit correspondre exactement à celle attribuée dans le fichier d'exécution.

22.4 Analyse

Sélectionnez **Analyses** dans le menu de gauche pour démarrer une nouvelle analyse

Sélectionnez **+ Create New Analysis (Créer une nouvelle analyse)** en haut à droite de l'écran

Recherchez le fichier à charger pour analyse à partir d'un répertoire spécifié

- Sélectionnez le fichier d'exécution (données) dans le dossier correspondant
 - > Sélectionnez **Open (Ouvrir)**

L'analyse apparaîtra dans l'**onglet Open (Ouvert)** sous la forme d'une nouvelle ligne dans le tableau

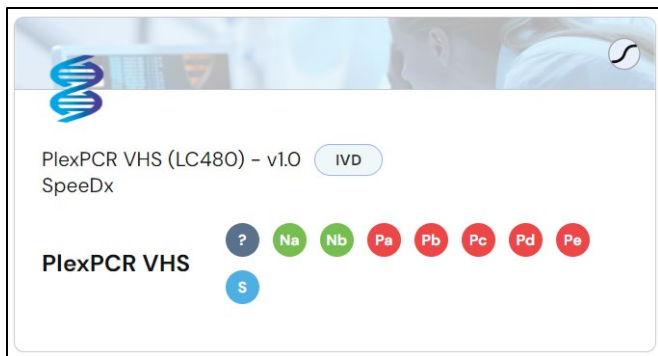
- Si toutes les étiquettes ont été appliquées et lues correctement, le statut affiché sera **Ready for review (Prêt pour révision)**
- Si les informations relatives au test doivent être attribuées manuellement aux puits, le statut affiché sera **Manual PCR setup required (Configuration PCR manuelle requise)**

Attribuez manuellement à la plaque les informations relatives au test si la dénomination de l'échantillon n'a pas été configurée dans le menu **Lab Configuration > Assays (Configuration de laboratoire > Tests)** ou si les noms des échantillons/cibles n'ont pas été appliqués dans le logiciel de l'instrument

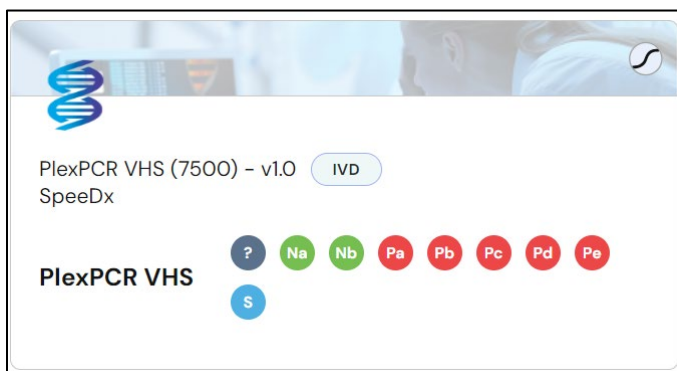
Sélectionnez le fichier d'exécution dans l'**onglet Ouvrir** du menu **Analyses**

La configuration de la plaque sera affichée dans l'**onglet Configuration PCR** pour l'analyse ouverte

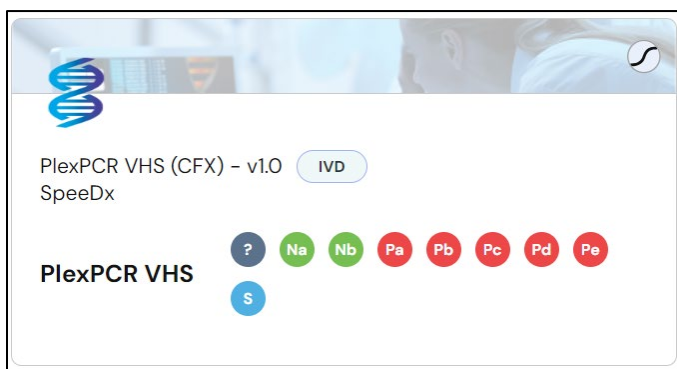
- Pour **LC480 II** > Sélectionnez **PlexPCR VHS (LC480)**



- Pour **7500 Fast** > Sélectionnez **PlexPCR VHS (7500)**



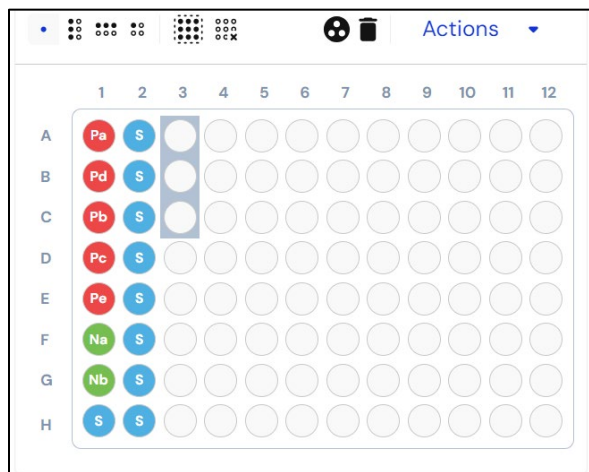
- Pour **CFX96 Dx** et **CFX96 Touch** > Sélectionnez **PlexPCR VHS (CFX)**



- Sélectionnez les puits et attribuez-les comme suit :
 - > Échantillon classique (S)
 - > Contrôle négatif (Na)
 - > Contrôle du réactif d'amplification (Nb)
 - > Contrôle positif (toutes cibles) (Pa) – à utiliser pour le Positive Control HSV/VZV/TP (SpeedX, n° cat. 95007)
 - > Contrôle positif (HSV-1) (Pb)
 - > Contrôle positif (HSV-2) (Pc)
 - > Contrôle positif (VZV) (Pd)
 - > Contrôle positif (*T. pallidum*) (Pe)

Pour attribuer les puits sur la plaque :

- Cliquez et faites glisser les symboles colorés pour les placer sur la plaque, ou
- Sélectionnez un ou plusieurs puits (utilisez les touches Ctrl et Maj), puis cliquez sur les symboles colorés correspondants à attribuer à la sélection.



- Sélectionnez **Analyser (Analyser)**

22.5 Résultats

Voir le **Tableau 39** pour un résumé des résultats d'échantillons possibles présentés.

Remarque : il est fortement recommandé d'inspecter visuellement les courbes d'amplification et de les confirmer pour tous les échantillons positifs.

22.5.1 Onglet Summary (Résumé)

Les résultats de contrôle pour chaque test sont affichés en haut à gauche de l'onglet Summary, ce qui permet d'évaluer la validité du contrôle pour l'exécution. En développant ce bloc, de nouveaux détails apparaîtront pour chaque contrôle.

Control Results					
	Pos_VHS	Tp_VHS	HSV1_VHS	HSV2_VHS	VZV_VHS
	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
	VALID	VALID	VALID	VALID	VALID
HSV-2	⊕ Detected	⊖ Not detected	⊖ Not detected	⊕ Detected	⊖ Not detected
HSV-1	⊕ Detected	⊖ Not detected	⊕ Detected	⊖ Not detected	⊖ Not detected
VZV	⊕ Detected	⊖ Not detected	⊖ Not detected	⊖ Not detected	⊕ Detected
T. pallidum	⊕ Detected	⊕ Detected	⊖ Not detected	⊖ Not detected	⊖ Not detected








Si un contrôle n'est pas valide, tous les échantillons peuvent être marqués comme des échecs en sélectionnant **Fail all samples for this assay** (Échec de tous les échantillons pour ce test)

Fail all samples for this assay

Failure reason ▼

Un motif d'échec doit être choisi dans le menu déroulant










Les résultats des échantillons sont affichés en bas à gauche de l'onglet Résumé. À côté de l'en-tête, des icônes supplémentaires peuvent fournir un aperçu de haut niveau des résultats d'analyse et indiquer le nombre total d'échantillons correspondant à une icône particulière.

-  • Containing an error notification
-  • Containing a warning notification
-  • Marked for retest
-  • Containing at least one detected assay result
-  • Containing at least one not detected assay result
-  • Containing at least one invalid assay result
-  • Containing at least one inconclusive assay result

Chaque échantillon est affiché sous forme de ligne dans le tableau des résultats des échantillons.

▼ Sample Results ▲ 1 ⊕ 10 ⊖ 1 ⊗ 1

Filters | ⚙

			Sample	Assay	Result
▶	<input type="checkbox"/>		Sample_VHS 	PlexPCR VHS (CFX)	Invalid: HSV-2, HSV-1, VZV, T. pallidum
▶	<input type="checkbox"/>		Sample_VHS 	PlexPCR VHS (CFX)	Detected: VZV
▶	<input type="checkbox"/>		Sample_VHS 	PlexPCR VHS (CFX)	Detected: HSV-2, HSV-1
▶	<input type="checkbox"/>		Sample_VHS 	PlexPCR VHS (CFX)	Detected: T. pallidum
▶	<input type="checkbox"/>		Sample_VHS 	PlexPCR VHS (CFX)	Detected: HSV-2, HSV-1
▶	<input type="checkbox"/>		Sample_VHS 	PlexPCR VHS (CFX)	Not detected
▶	<input type="checkbox"/>		Sample_VHS 	PlexPCR VHS (CFX)	Detected: T. pallidum
▶	<input type="checkbox"/>		Sample_VHS 	PlexPCR VHS (CFX)	Detected: VZV

Items per page: 250 1 – 12 of 12+
|< < > |>

Le menu déroulant offre plus de détails sur chaque résultat cible et Cq par échantillon (se référer aux exemples présentés dans la **Section 22.10**).

Des échantillons individuels peuvent être marqués comme des échecs si vous le souhaitez (par exemple, si l'échantillon n'est pas valide) en sélectionnant **Fail this sample for this assay** (Échec de cet échantillon pour ce test)

Fail this sample for this assay

Failure reason ▼

Un motif d'échec doit être choisi dans le menu déroulant

Les graphiques de fluorescence peuvent être visualisés en haut à droite de l'onglet Résumé

Une disposition des plaques peut être visualisée en bas à droite de l'onglet Summary

Des exemples d'informations et de notifications d'avertissement sont résumés ci-dessous dans le **Tableau 38**.

Tableau 38. Exemples d'informations et de notifications d'avertissement pour le logiciel d'analyse PlexPCR® VHS*		
Type d'échantillon	Erreur	Notification
Notifications de cibles de test		
Échantillon classique	Non valide – Échec CI	Warning: IC invalid. Re-extract and re-test sample.
	Valide mais contrôle non valide – Avertissement de contrôle non valide sur un échantillon classique avec un résultat valide	Warning: Invalid control present. Re-extract and re-test the sample..
Contrôle négatif	Non valide - Contamination	Warning: Possible contamination detected.
Contrôle du réactif d'amplification		
Notifications de cibles génétiques		
Échantillon classique	Cq cible en dehors de la limite	Info: Cq outside cutoff
Contrôle positif	Non valide – Cible non détectée	Warning: Expected reaction did not occur in control.
Contrôle négatif	Non valide - Contamination	Warning: Possible contamination
	Non valide – CI non détecté	Warning: IC not detected
	Non valide – CI Cq en dehors de la limite	Warning: Cq outside cutoff
Contrôle du réactif d'amplification	Non valide - Contamination	Warning: Possible contamination
Échantillon classique ou contrôle	Signal de fluorescence incertain	Warning: Uncertain fluorescence signal. Review required.
	Cq détecté avec une faible fluorescence	dRn end fluorescence below cut-off

*Les exemples répertoriés ici peuvent ne pas être applicables à tous les plug-ins de test. Se référer aux instructions d'utilisation de FastFinder pour découvrir toutes les notifications possibles, accessibles depuis le menu Assistance

22.5.2 Onglet Details

Toutes les cibles sont affichées pour chaque échantillon sous forme de lignes distinctes dans le tableau sur le côté gauche. La sélection d'une ou plusieurs lignes affichera les courbes de fluorescence correspondantes sur le graphique en haut à droite et mettra également en évidence les puits dans la disposition de plaque affichée en bas à droite.

Sélectionnez **Filters (Filtres)** pour afficher les résultats en fonction de paramètres tels que le nom du test, le type d'échantillon, la cible et le résultat.


Pour finaliser l'analyse et empêcher d'autres modifications de la part des utilisateurs

- > Sélectionnez **Authorize (Autoriser)**
- > Sélectionnez à nouveau **Authorize** pour confirmer
- Pour attribuer une deuxième révision
 - > Sélectionnez **Actions, Assign label (Attribuer une étiquette)** et **Second Review (Deuxième révision)**
- Pour attribuer l'analyse à un autre utilisateur
 - > Sélectionner **Actions** et **Assign User (Attribuer un utilisateur)**
 - > Sélectionnez l'utilisateur approprié dans la liste déroulante

- Pour rejeter l'analyse
 - > Sélectionnez **Actions** et **Discard Analysis (Ignorer l'analyse)**
 - > Ajoutez un commentaire et sélectionnez **Discard (Ignorer)** pour confirmer

22.6 Courbe de référence

Une courbe de référence peut être enregistrée et utilisée pour comparer des échantillons sur la même plaque ou sur des plaques différentes

- Sélectionnez l'échantillon qui vous intéresse dans l'onglet **Summary** ou **Details**
- Depuis le menu **Amplification graph** (graphique d'amplification) > Sélectionnez 
 - > Cochez la case correspondant à la courbe d'intérêt et sélectionnez **Mark as reference (Marquer comme référence)**

Cette courbe de référence apparaîtra désormais liée au test dans le menu **Lab Configuration > Assays (Configuration de laboratoire > Tests)** dans l'onglet **PCR** et peut être désactivée à tout moment.

22.7 Exportation des résultats

- Pour exporter les résultats d'une exécution individuelle autorisée sous forme de fichier CSV ou PDF :
 - > Sélectionnez **Actions > Downloads (Téléchargements)** dans le coin supérieur droit
 - > Sélectionnez l'un des types de rapport suivants : **Analysis (CSV)** ou **Analysis (PDF)**
- Pour exporter les résultats de plusieurs exécutions autorisées précédemment sous forme de fichier CSV :
 - > Accédez au menu **Archive > Sample Results (Résultats des échantillons)**
 - > Utilisez les filtres en haut de la page pour afficher les résultats qui vous intéressent (le fichier CSV est limité à un maximum de 10 000 résultats)
 - > Sélectionnez **Export CSV** dans le coin supérieur droit

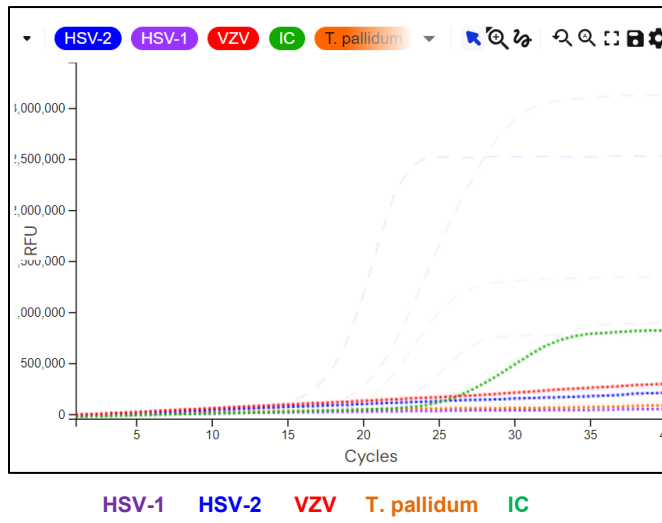
22.8 Récupération des analyses autorisées

- Toutes les analyses autorisées sont disponibles en sélectionnant **Archive > Analysis Results (Résultats d'analyse)**. Sélectionnez une ligne pour retourner à l'aperçu des résultats de cette analyse particulière
- Tous les échantillons classiques autorisés sont stockés dans le menu **Archive > Sample Results (Résultats des échantillons)**. La sélection d'un échantillon affichera des informations supplémentaires, notamment le nom de l'analyse et les détails du résultat
- Les résultats cibles individuels pour tous les échantillons classiques autorisés et les contrôles sont stockés dans le menu **Archive > Target Results (Résultats par cibles)**. La sélection d'une cible la mettra en évidence sur le graphique de fluorescence. En sélectionnant le nom de l'analyse, vous retournerez à l'aperçu des résultats pour cette analyse particulière.

22.9 Exemples de graphiques de contrôle

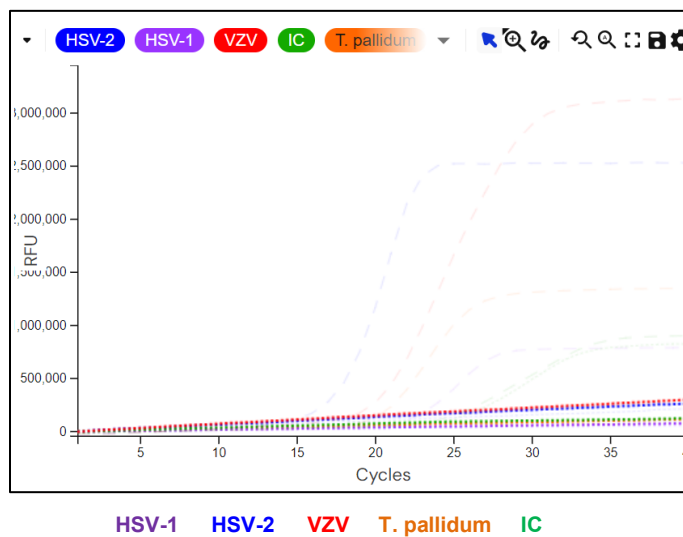
Les exemples suivants montrent les courbes d'amplification (courbes d'amplification corrigées en fonction de la base de référence) et l'aperçu des résultats du logiciel d'analyse **PlexPCR VHS (7500)** pour les types d'échantillons de contrôle.

22.9.1 Contrôle négatif (Na)



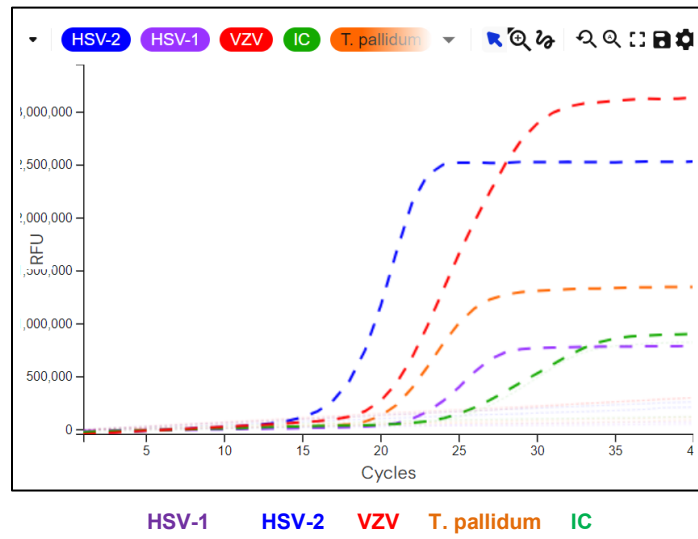
Échantillon	Test	Résultat
Na	PlexPCR VHS (7500)	Valid
	HSV-2	⊖ Not detected
	HSV-1	⊖ Not detected
	VZV	⊖ Not detected
	T. pallidum	⊖ Not detected

22.9.2 Contrôle du réactif d'amplification (Nb)



Échantillon	Test	Résultat
Nb	PlexPCR VHS (7500)	Valid
	HSV-2	⊖ Not detected
	HSV-1	⊖ Not detected
	VZV	⊖ Not detected
	T. pallidum	⊖ Not detected

22.9.3 Contrôle positif (toutes les cibles) (Pa)




Échantillon	Test	Résultat
Pa	PlexPCR VHS (7500)	Valid
	HSV-2	⊕ Detected
	HSV-1	⊕ Detected
	VZV	⊕ Detected
	T. pallidum	⊕ Detected

22.10 Exemples

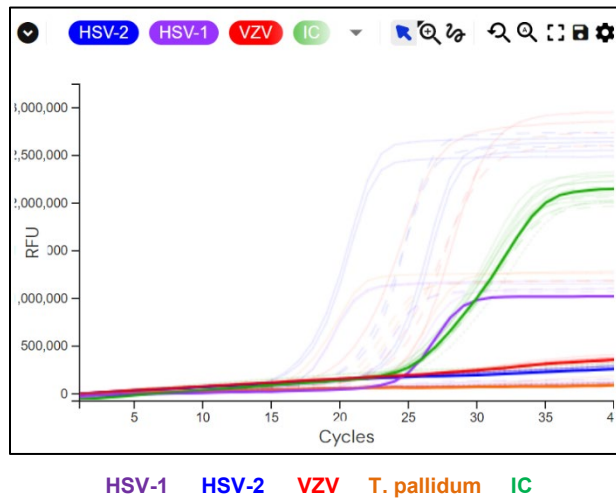
Des exemples de résultats pour le logiciel d'analyse **PlexPCR®** VHS sont présentés dans le **Tableau 39**.

Tableau 39. Exemples de résultats pour l'interprétation du logiciel d'analyse PlexPCR® VHS			
	Échantillon	Test	Résultat
	Échantillon 101	PlexPCR VHS (7500)	Not detected
	Échantillon 102	PlexPCR VHS (7500)	Detected: HSV-2
	Échantillon 103	PlexPCR VHS (7500)	Detected: HSV-1
	Échantillon 104	PlexPCR VHS (7500)	Detected: VZV
	Échantillon 105	PlexPCR VHS (7500)	Detected: T. pallidum
¹	Échantillon 106	PlexPCR VHS (7500)	Invalid: HSV-2, HSV-1, VZV, T. pallidum

¹ Un échantillon interprété comme non valide sera signalé par 

Les résultats d'échantillons suivants montrent les courbes d'amplification corrigées en fonction de la ligne de base linéaire et l'aperçu des résultats du plug-in de test **PlexPCR®** VHS (7500).

22.10.1 Exemple 1. Échantillon positif – cible unique détectée



Échantillon	Test	Résultat
Échantillon 107	PlexPCR VHS (7500)	Detected : HSV-1

Assay results

HSV-2	⊖ Not detected
HSV-1	⊕ Detected
VZV	⊖ Not detected
T. pallidum	⊖ Not detected

HSV-2
↳ E2 ● Not detected

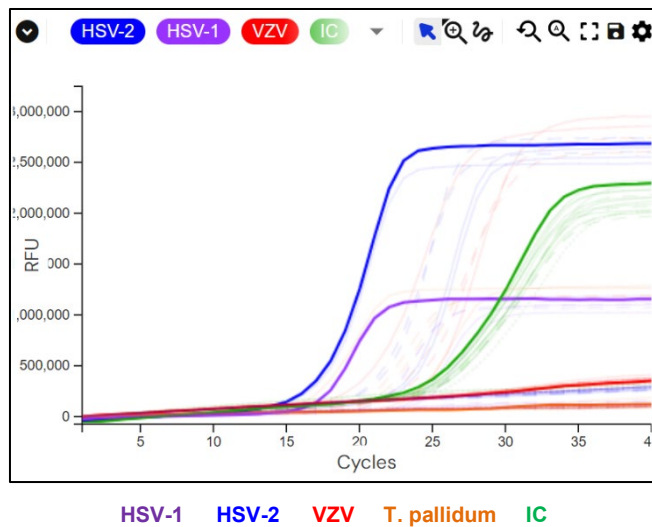
HSV-1
↳ E2 ● Detected 23.968

VZV
↳ E2 ● Not detected

IC
↳ E2 ● Detected 26.162

T. pallidum
↳ E2 ● Not detected

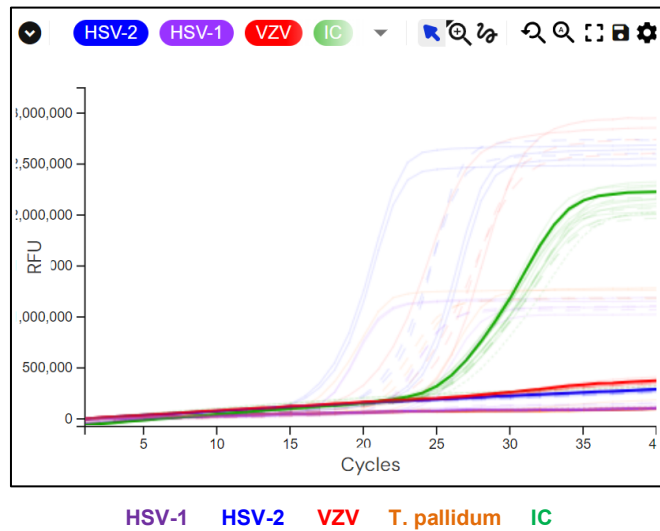
22.10.2 Exemple 2. Échantillon positif – plusieurs cibles détectées



Échantillon	Test	Résultat
Échantillon 108	PlexPCR VHS (7500)	Detected : HSV-2, HSV-1

<p>Assay results</p> <p>HSV-2 ⊕ Detected</p> <p>HSV-1 ⊕ Detected</p> <p>VZV ⊖ Not detected</p> <p>T. pallidum ⊖ Not detected</p>		<p>HSV-2</p> <p>↳ B3 ● Detected 17.277</p> <hr/> <p>HSV-1</p> <p>↳ B3 ● Detected 16.924</p> <hr/> <p>VZV</p> <p>↳ B3 ● Not detected</p> <hr/> <p>IC</p> <p>↳ B3 ● Detected 25.742</p> <hr/> <p>T. pallidum</p> <p>↳ B3 ● Not detected</p>
---	--	---

22.10.3 Exemple 3. Échantillon négatif

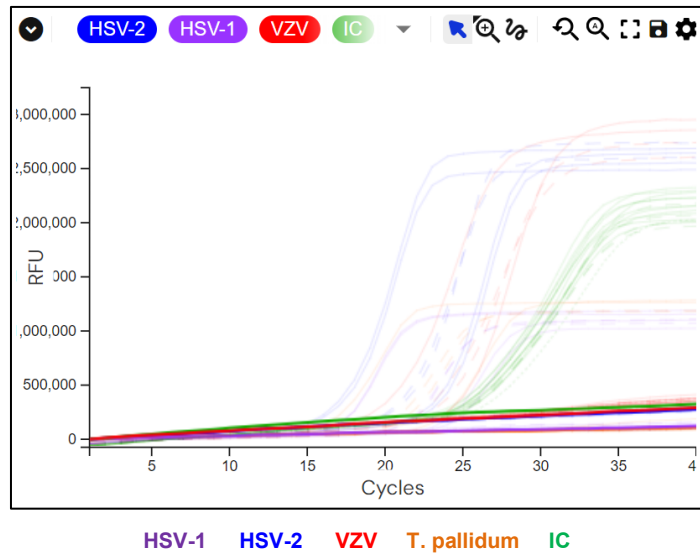


Échantillon	Test	Résultat
Échantillon 109	PlexPCR VHS (7500)	Not detected

Assay results	Result
HSV-2	Not detected
HSV-1	Not detected
VZV	Not detected
T. pallidum	Not detected

HSV-2	C2	Not detected
HSV-1	C2	Not detected
VZV	C2	Not detected
IC	C2	Detected 25.869
T. pallidum	C2	Not detected

22.10.4 Exemple 4. Échantillon non valide



Échantillon	Test	Résultat
Échantillon 110	PlexPCR VHS (7500)	Invalid: HSV-2, HSV-1, VZV, T.pallidum

Assay results

HSV-2	Invalid	Warning: IC invalid. Re-extract and re-test sample.
HSV-1	Invalid	Warning: IC invalid. Re-extract and re-test sample.
VZV	Invalid	Warning: IC invalid. Re-extract and re-test sample.
T. pallidum	Invalid	Warning: IC invalid. Re-extract and re-test sample.

Retest this sample for this assay

HSV-2

↳ G2 ● Not detected ▼

HSV-1

↳ G2 ● Not detected ▼

VZV

↳ G2 ● Not detected ▼

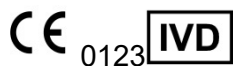
IC

↳ G2 ● Not detected ▼

T. pallidum

↳ G2 ● Not detected ▼

23 Glossaire



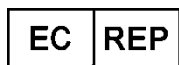
Conformité européenne
Pour usage de diagnostic *in vitro*



Référence



Code de lot



Représentant autorisé
Dans la Communauté européenne



Fabricant



Date de fabrication



Limite de température



Quantité suffisante pour
xxx déterminations



Date de péremption



Importateur européen



Marque d'évaluation de la
conformité au Royaume-Uni

Les produits SpeedX peuvent être couverts par un ou plusieurs brevets locaux ou étrangers. Consulter www.plexpcr.com/patents pour obtenir des informations complètes sur les brevets.

PlexPCR[®], **ResistancePlus**[®], **PlexPrime**[®] et **PlexZyme**[®] sont des marques de commerce appartenant à SpeedX. Les autres droits d'auteur et marques de commerce appartiennent à leurs détenteurs respectifs.

© Copyright 2026 SpeedX Pty. Ltd.