

HPV Screening Real Time PCR Kit

Kit pour la détection de 14 génotypes de HPV à haut risque par PCR
en temps réel

REF Réf. MAD-003949M-W

 100 déterminations

Pour le diagnostic in vitro uniquement
Directive 98/79/CE



TABLE DES MATIÈRES

1	UTILISATION PRÉVUE	3
2	PRINCIPE DE LA MÉTHODE	3
3	COMPOSANTS	4
4	MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE REQUIS NON FOURNI	5
4.1	Réactifs et matériaux	5
4.2	Équipement	5
5	CONDITIONS DE STOCKAGE ET DE STABILITÉ	5
6	AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS	6
7	PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON CLINIQUE POUR L'ANALYSE	7
7.1	Collecte d'échantillons	7
8	PROTOCOLE PCR	8
8.1	Préparation du mélange réactionnel	8
8.2	Configuration de l'instrument pour la PCR en temps réel	8
9	INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS	9
10	CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE	11
10.1	Sensibilité analytique	11
10.2	Spécificité analytique	15
10.3	Répétabilité	17
10.4	Reproductibilité	17
10.5	Plage de mesure	17
10.6	Sensibilité et spécificité cliniques	18
11	LIMITES DU TEST	19
12	BIBLIOGRAPHIE	20
13	SYMBOLES D'ÉTIQUETTES ET DE BOÎTES	20
14	SUIVI DES MOFICIATIONS	20



1 UTILISATION PRÉVUE

HPV Screening Real Time PCR Kit est un kit de diagnostic *in vitro* pour la détection qualitative de l'ADN de 14 génotypes du papillomavirus humain (HPV) considérés comme présentant un risque oncogène élevé (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 et 68) à partir d'ADN purifié provenant d'échantillons cliniques humains de différentes origines tels que la cytologie en milieu liquide et les écouvillons vaginaux et rectaux. Il est basé sur la technique de PCR multiplex en temps réel et utilise des amorces et des sondes fluorescentes pour une région conservée du gène cible L1 des génomes HPV. Le test permet l'identification spécifique des génotypes HPV 16 et 18 et la détection simultanée des génotypes 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 et 68 à des niveaux d'infection cliniquement pertinents.

Des amorces spécifiques et une sonde fluorescente sont incluses pour la détection simultanée du gène de la Bêta-globine humaine comme contrôle de qualité interne du matériel de départ et de l'amplification. Les canaux de détection des différentes cibles sont :

Cible	Fluorophore
HPV 16	ROX
HPV 18	Cy5
HR	FAM
Bêta-globine	HEX/JOE/VIC

Tableau 1. Canaux de détection pour les différentes cibles du **HPV Screening Real Time PCR Kit**.

Ce test doit être réalisé au niveau hospitalier dans les laboratoires de microbiologie clinique chez les patients qui présentent des symptômes compatibles avec une infection par le HPV. L'utilisation finale prévue est l'aide au diagnostic de cette infection en combinaison avec le risque clinique et les facteurs épidémiologiques.

Statut microbiologique : Produit non stérile.

2 PRINCIPE DE LA MÉTHODE

HPV Screening Real Time PCR Kit est un test multiplex basé sur la réaction en chaîne par polymérase en temps réel. Le mélange réactionnel ou Master Mix contient un ensemble d'amorces et de sondes qui permettent la détection de l'ADN des génotypes 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 et 68 du papillomavirus humain. Il comprend également un ensemble d'amorces et une sonde pour la détection du gène de la Bêta-globine humaine dans des spécimens cliniques ou de contrôle. Les oligonucléotides utilisés comme amorces et sondes ont été sélectionnés dans des régions du génome viral conservées au cours de l'évolution.

En présence de l'un de ces génotypes de HPV dans les spécimens cliniques, l'ADN viral est amplifié par réaction en chaîne par polymérase (PCR). La détection des amplicons obtenus est basée sur la technologie des sondes TaqMan. Ces sondes sont des oligonucléotides d'ADN simple brin modifiés qui possèdent un fluorophore (rapporteur ou reporter en anglais) fixé de manière covalente à l'extrémité 5' et un désactivateur (quencher) fixé à l'extrémité 3'. Si les acides nucléiques cibles sont présents, ils sont amplifiés et, pendant le processus de PCR, les sondes se lient spécifiquement dans les régions complémentaires situées entre l'amorce sens (forward) et l'amorce anti-sens (reverse).

Pendant la phase d'extension de la PCR, l'activité nucléasique 5' de l'ADN polymérase dégrade les sondes liées spécifiquement à leurs cibles, provoquant la séparation entre le rapporteur et le désactivateur, et un signal fluorescent sera généré. Les sondes spécifiques pour le HPV 16, le HPV 18, les autres génotypes à haut risque et le contrôle interne sont marquées avec différents fluorophores, de sorte que dans chaque cas un signal fluorescent sera généré à différentes longueurs d'onde, ce qui permet à la plateforme PCR en temps réel de détecter et de différencier simultanément les différents signaux dans une seule réaction. À chaque cycle de dénaturation-élongation, la division de nouvelles molécules de rapporteur se produit et, par conséquent, l'intensité du signal fluorescent augmente. L'intensité de la fluorescence est contrôlée sur les instruments de PCR en temps réel dans chacun des cycles et les données sont analysées avec un logiciel d'analyse spécifique à chaque plateforme.

La détection de l'ADN viral est d'une grande utilité dans le diagnostic et le suivi des infections causées par ces micro-organismes.

3 COMPOSANTS

HPV Screening Real Time PCR Kit est commercialisé sous la forme d'un Master Mix prêt à l'emploi qui comprend tous les réactifs nécessaires à la réalisation de la PCR en temps réel.

En outre, afin d'éviter toute contamination avec les produits PCR précédents, le Mix contient l'enzyme Uracile - ADN Glycosylase (Cod-UNG), qui dégrade les produits PCR contenant du dUTP.

Un contrôle positif (PC) et de l'eau traitée par DEPC exempte de DNase/RNase à inclure dans les contrôles négatifs (NTC) sont fournis avec le mélange PCR en temps réel.

Composants du kit pour 100 tests :

RÉFÉRENCE (DESCRIPTION)		CONTENU	AMOUNT
MAD-003949M-100-W (HPV Screening MMIX)	MAD-003949-MIX-W (HPV Screening MMix)	Hot Start Polymerase (125 U/mL), Uracile ADN glycosylase (50 U/mL), 0.1-0.4 µM d'amorces, 0.1 - 0.4 µM de sondes fluorescentes, 2x tampon de réaction, 1 mM de dUTP, 1.3 mM de dNTPs (A, C, G, T)	2 flacons avec 50 tests / flacons
	MAD-DDW-DEPC (RNase/DNase - free water)	---	1 flacon (200 µl)
MAD-HPV (HPV Screening PC)		ADN synthétique non infectieux contenant une partie du génome de HPV 16, HPV 18, HPV 45 (12500 copies/µL) et de l'ADN humain (0,625 ng/µL)	1 flacon (100 µl)

Tableau 2. Réactifs et concentrations des substances actives fournies dans le **HPV Screening Real Time PCR Kit**.

4 MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE NÉCESSAIRE NON FOURNI

4.1 Réactifs et matériaux

- Gants jetables.
- Embouts de pipette filtrants sans DNase/RNase.
- Kit d'extraction d'ADN.
- Bandelettes de tubes/plaques/films adhésifs optiques spécifiques pour chaque équipement de PCR en temps réel.

4.2 Équipement

- Armoire à flux laminaire.
- Microcentrifugeuse pour tubes de 1.5ml.
- Microcentrifugeuses de tubes PCR à barrettes ou de plaques à 96 puits.
- Vortex.
- Micropipettes automatiques : P1000, P200, P20 et P2.
- Instrument de PCR en temps réel.

5 CONDITIONS DE STOCKAGE ET DE STABILITÉ

Le **HPV Screening Real Time PCR Kit** doit être transporté et conservé à -20 °C^{*1} . Néanmoins, outre le transport recommandé à -20 °C , il est également possible de le transporter à une température de réfrigération (2 °C - 8 °C), à condition que la période de transit n'excède pas un maximum de dix jours. Dans tous les cas, le kit doit être conservé à une température de -20 °C dès sa réception.

HPV Screening MMix est sensible aux changements d'état physique et il a été prouvé qu'il supporte jusqu'à cinq cycles de congélation-décongélation. Si une série est effectuée avec un faible nombre d'échantillons, il est recommandé d'aliquoter le réactif à l'avance.

Le HPV Screening MMix est stable pendant 29 jours à température ambiante. Si l'on applique l'équation d'Arrhenius en utilisant un Q_{10} égal à 2,2 pour estimer la durée de conservation du produit, cela équivaut à une stabilité dans le temps de 4 mois stockés à $+4\text{ °C}$, et d'au moins 2 ans stockés à -20 °C .

Les tests de stabilité dans le temps du produit sont actuellement en cours. Par conséquent, le MMix est stocké à -20 °C et sa stabilité est déterminée après 2, 4, 6, 8, 10 et 12 mois.

Le mélange réactionnel contient des molécules fluorescentes et doit être conservé à l'abri de la lumière directe.

Le contrôle positif est sensible aux changements d'état physique et les cycles répétés de congélation-décongélation sont à éviter. Il est conseillé de manipuler le flacon de contrôle positif séparément des échantillons cliniques afin d'éviter toute contamination potentielle qui pourrait donner de faux positifs.

S'ils sont stockés à la température recommandée, les réactifs PCR sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée. Les réactifs PCR doivent être stockés dans des endroits exempts de contamination par l'ADN ou les produits de PCR.

*¹Un indicateur de température est inclus dans l'emballage pour contrôler les conditions pendant l'expédition. Au cas où la chaîne du froid est interrompue, il est recommandé de contacter le fabricant avant d'utiliser les réactifs.



6 AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- Lisez le mode d'emploi avant d'utiliser ce produit.
- Le kit doit être manipulé par des techniciens qualifiés pour les techniques de biologie moléculaire appliquées au diagnostic.
- N'utilisez aucun des composants du kit après la date d'expiration.
- Le HPV Screening MMix doit être décongelé avant utilisation et manipulé sur de la glace ou une plaque froide et à l'abri de la lumière. Mélanger les solutions en inversant plusieurs fois les tubes sans les agiter avec un vortex, et centrifuger brièvement.
- Le contrôle positif doit être décongelé à température ambiante, bien mélangé et brièvement centrifugé avant utilisation.
- Les précautions de sécurité et d'élimination sont décrites dans la fiche de données de sécurité de ce produit. Ce produit est uniquement destiné à un usage professionnel en laboratoire, et n'est pas destiné à un usage pharmacologique, domestique ou tout autre type d'usage. La version actuelle de la fiche de données de sécurité de ce produit peut être téléchargée sur la page web www.vitro.bio ou demandée à regulatory@vitro.bio.
- Le kit PCR en temps réel pour le dépistage du HPV utilise des acides nucléiques préalablement extraits et purifiés comme matériel de départ. Il est de la responsabilité du client d'inclure les contrôles nécessaires pour vérifier que le système d'extraction du matériel génétique utilisé fonctionne correctement.

- **Considérations générales pour éviter la contamination par les produits de PCR**

La source de contamination la plus importante est généralement le même produit de PCR amplifié. Par conséquent, il est recommandé de réaliser l'amplification et la manipulation des produits amplifiés dans une zone différente de celle où l'extraction de l'ARN et la préparation de la PCR sont effectuées. Il est recommandé de travailler dans des zones pré et post-PCR différentes où la manipulation de l'ARN à tester et la préparation des tubes PCR (pré-PCR), et l'amplification et la manipulation des produits amplifiés (post-PCR) sont effectuées. Ces zones doivent être physiquement séparées et du matériel de laboratoire différent doit être utilisé (blouses de laboratoire, pipettes, embouts, etc.) pour éviter la contamination des échantillons par l'ADN amplifié, ce qui pourrait entraîner des diagnostics faussement positifs. Le flux de travail doit toujours aller dans une seule direction, de la zone pré-PCR à la zone post-PCR et jamais dans le sens inverse. Le flux de matériel et de personnel de la zone post-PCR vers la zone pré-PCR doit être évité. En outre, afin d'éviter la contamination avec les produits de PCR précédents, l'enzyme *Uracile-ADN Glycosylase (Cod-UNG)*, qui dégrade les produits de PCR contenant du dUTP, est incluse dans le kit.

Il est recommandé d'inclure des contrôles d'amplification négatifs remplaçant l'échantillon d'ADN par de l'eau exempte de RNase/DNase, afin de détecter et de contrôler toute contamination éventuelle des réactifs par des échantillons de test ou des produits amplifiés.

- **Élimination des déchets**

La manipulation des déchets générés par l'utilisation des produits commercialisés par Vitro S.A. doit être effectuée conformément à la loi applicable dans le pays dans lequel ces produits sont utilisés. À titre de référence, le tableau suivant indique la classification des déchets générés par ce kit selon la loi européenne, plus précisément selon la décision de la Commission européenne du 18 décembre 2014 modifiant la décision 2000/532/CE relative à la liste des déchets conformément à la directive 2008/98/CE du Parlement européen et du Conseil :



DÉCHETS POTENTIELS GÉNÉRÉS PAR L'UTILISATION DE CE PRODUIT	CODE ELW* ²	TYPE DE DÉCHETS SELON L'ELW* ²
1. Élimination des déchets liquides	161001	"Déchets liquides aqueux contenant des substances dangereuses" après ajout de 10% du volume total d'un agent désinfectant. Si la désinfection n'est pas effectuée, ces déchets doivent être considérés comme des "déchets dont le stockage et l'élimination sont soumis à des exigences particulières afin de prévenir les infections".
2. Matériel périssable (tubes, embouts, etc.) 3. Tout élément qui a été en contact avec le matériel génétique de départ.	180103	"Déchets dont la collecte et l'élimination sont soumises à des exigences particulières afin de prévenir les infections".
4. Récipient pour les réactifs utilisés classés comme dangereux (selon la fiche de données sécurité).	150110	"Récipients contenant des déchets ou contaminés par des substances dangereuses".

Tableau 3. Classification des déchets générés par ce kit selon la législation européenne. *²ELW : *European Legislation of Waste*.

*²Note : Cette classification est incluse comme une directive générale d'action, étant sous la responsabilité finale de l'utilisateur l'accomplissement de toutes les réglementations locales, régionales et nationales sur l'élimination de ce type de matériaux.

7 PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON CLINIQUE POUR L'ANALYSE

7.1 Collecte d'échantillons

Le HPV Screening Real Time PCR Kit a été validé pour son utilisation à partir de matériel génétique purifié provenant de différents types d'échantillons cliniques, tels que les cytologies en milieu liquide et les écouvillons vaginaux et rectaux.

Ce kit a été validé avec du matériel génétique de départ obtenu à partir des kits de purification d'ADN/ARN et des équipements d'extraction suivants*³ en commençant par **200 µl** d'échantillon clinique et en éluant dans **100 µl** de tampon d'éluion (pour la purification avec **Opentrons**, commencer par **92 µl** d'échantillon clinique et éluer dans **60 µl** de solution d'éluion) :

KITS D'EXTRACTION	ÉQUIPEMENT D'EXTRACTION
Maxwell® 16 FFPE Tissue LEV ADN Purification Kit (Promega)	Maxwell® 16 (Promega)
NX48S - Urine/Swab DNA Kit (Genolution)	Nextractor NX-48S (Genolution)
RNA/DNA pathogen extraction kit (Robot Opentrons OT2) (Vitro, réf. MAD-003955M)	Opentrons OT-2

Tableau 4. Kits d'extraction et instruments utilisés pour la purification de l'ADN/ARN à partir d'échantillons cliniques.

*³Note : Le système n'a pas été validé avec d'autres systèmes d'extraction d'ADN/ARN. Par conséquent, si un autre système de purification est utilisé, cela doit être vérifié au préalable.



8 PROTOCOLE PCR

8.1 Préparation du mélange réactionnel

La PCR est réalisée dans un volume final de **20 µl**. Préparer le Master Mix comme indiqué ci-dessous :

1. Décongeler et homogénéiser le **HPV Screening MMix** (ne pas utiliser de vortex). Une fois qu'il est décongelé, centrifuger brièvement.
2. Mélangez dans chaque tube PCR les volumes suivants pour chaque échantillon :

Réactif	V/test
HPV Screening MMix	12 µl
Echantillon	8 µl

3. Inclure un **contrôle négatif** en ajoutant **8 µl** de l'**eau incluse** dans le kit.
4. Inclure un **contrôle positif** en ajoutant **8 µl** du contrôle ADN positif **HPV Screening PC** inclus dans le kit.
5. Centrifuger brièvement pour s'assurer qu'il n'y a pas de bulles d'air dans les puits.

Il est recommandé de conserver le MMix sur une plaque froide pendant la préparation des échantillons et de ne pas décongeler le flacon plus de cinq fois.

8.2 Configuration de l'instrument pour la PCR en temps réel

Entrez les différentes cibles et les canaux de détection pour chacune d'entre elles dans le logiciel de l'instrument. Créez les échantillons, le contrôle positif (PC), le contrôle non template (NTC) et attribuez les positions des échantillons dans la plaque PCR.

Réglez l'instrument de PCR en temps réel en suivant les étapes ci-dessous :

PROGRAMME PCR		
25°C	5 min	1 cycle
95°C	5 min	1 cycle
95°C	15 secondes	5 cycles
42°C	15 secondes	
72°C	30 secondes	
95°C	15 secondes	45 cycles
60°C* ⁴	40 secondes	

Tableau 5. Programme PCR du kit PCR en temps réel pour le dépistage du VPH

*⁴ Les données de fluorescence doivent être recueillies pendant la phase d'extension (*⁴) par les canaux ROX (HPV 16), Cy5 (HPV 18), FAM (HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 et 68) et HEX, JOE ou VIC (Internal Control).

Ce kit a été validé avec les plateformes :



- **QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System** (Applied Biosystems)
- **CFX96™ Real-Time PCR Detection System** (Bio-Rad)
- **VitroCycler** (Vitro S.A.)

Pour son utilisation dans d'autres plateformes, il est recommandé de vérifier la compatibilité des fluorochromes avec les canaux de détection de chaque instrument. Bien que les fluorochromes inclus dans le kit soient compatibles avec la majorité des instruments en temps réel les plus utilisés disponibles sur le marché. Dans les thermocycleurs Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System, l'option de contrôle passif ROX doit être désactivée.

Dans les thermocycleurs Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System et Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, sélectionnez Ramp Speed Standard dans le menu "Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties".

9 L'INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Avant d'interpréter les résultats des échantillons cliniques, il est nécessaire de suivre le guide d'interprétation des contrôles positifs et négatifs comme dans le tableau ci-dessous :

	RÉSULTAT	INTERPRÉTATION
Contrôle positif HPV	Signal pour les canaux FAM, ROX, Cy5 et JOE* ⁵	Le contrôle/la réaction est correct(e)
	Aucun signal pour FAM et/ou ROX et/ou Cy5 et/ou JOE	Problème dans l'amplification : analyse répétée
Contrôle négatif	Signal pour les canaux FAM et/ou ROX et/ou Cy5 et/ou JOE	Contamination, répétition de l'analyse
	Pas de signal	Le contrôle/la réaction est correct(e)

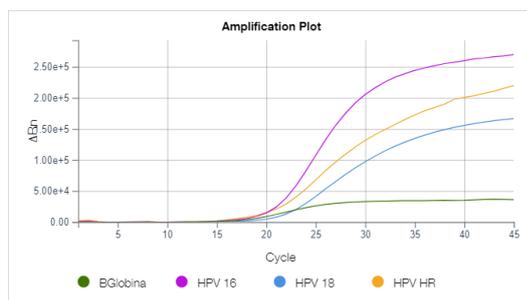
Tableau 6. Guide d'interprétation des contrôles positifs et négatifs.

*⁵Le signal d'amplification doit être déterminé par une augmentation rapide et régulière des valeurs de fluorescence et non par des phénomènes de pic ou une augmentation progressive du signal de fond (fond irrégulier ou augmentation du bruit de fond) (Fig 1).

L'essai est considéré comme valide lorsque des résultats adéquats ont été obtenus pour tous les contrôles de réaction et que les valeurs de Cts obtenues dans le contrôle positif pour les différentes cibles se situent dans la fourchette des valeurs attendues, à savoir celles-ci :

- 20±2 pour HPV 16 (ROX)
- 20±2 pour le HPV 18 (Cy5)
- 20±2 pour HPV HR (FAM)
- 20±2 pour la Bêta-globine (JOE)

A



B

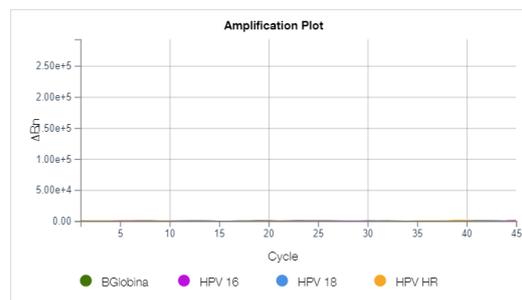


Figure 1 : Graphiques d'amplification du contrôle positif PC (A) et d'un contrôle négatif avec de l'eau NTC (B). (Valeurs Cts attendues pour le PC : HPV 16 (ROX) 20±2 ; HPV 18 (Cy5) 20±2 ; HPV HR (FAM) 20±2, Bêta-globine (JOE) 20±2. Expérience réalisée sur l'Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System.

Si la série a été validée, interprétez les résultats des échantillons cliniques selon le tableau suivant :

HPV Screening Real Time PCR				INTERPRÉTATION
HPV 16 (ROX)	HPV 18 (Cy5)	HPV HR (FAM)	Bêta-globine (JOE)	
Signal	Pas de signal	Pas de signal	Signal	Échantillon positif pour le HPV 16
			Pas de signal	
Pas de signal	Signal	Pas de signal	Signal	Echantillon positif pour le HPV 18
			Pas de signal	
Pas de signal	Pas de signal	Signal	Signal	Échantillon positif pour d'autres génotypes de HPV à haut risque (types 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)
			Pas de signal	
Signal	Signal	Pas de signal	Signal	Echantillon positif pour HPV 16 et HPV 18
			Pas de signal	
Signal	Pas de signal	Signal	Signal	Échantillon positif pour le HPV 16 et les autres génotypes à haut risque (types 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)
			Pas de signal	
Pas de signal	Signal	Signal	Signal	Échantillon positif pour le HPV 18 et d'autres génotypes à haut risque (types 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)
			Pas de signal	
Signal	Signal	Signal	Signal	Echantillon positif pour le HPV 16, le HPV 18 et d'autres génotypes à haut risque (types 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)
			Pas de signal	
Pas de signal	Pas de signal	Pas de signal	Signal	Résultat négatif ⁽¹⁾
			Pas de signal	Invalide ⁽²⁾ ; Problèmes dans l'extraction ou l'amplification

Tableau 7. Guide d'interprétation des résultats.



- (1) Négatif ou inférieur à la limite de détection du kit.
 (2) Il est recommandé de répéter la PCR ou de commencer par une nouvelle extraction d'ADN.

Il est recommandé d'utiliser la ligne de seuil par défaut établie automatiquement par l'instrument. Si nécessaire, la ligne de seuil peut être ajustée manuellement jusqu'à ce qu'elle se situe dans la phase exponentielle des courbes de fluorescence et au-dessus de tout signal de bruit de fond.

Un échantillon est positif si la valeur Ct obtenue est ≤ 38 , même si le contrôle interne ne présente pas de graphique d'amplification. Parfois, il peut arriver que le contrôle interne ne soit pas amplifié correctement en raison de la présence d'un nombre initial élevé de copies de l'acide nucléique bactérien cible, ce qui peut entraîner une amplification préférentielle de ce dernier.

Un échantillon est négatif si une courbe d'amplification n'est pas détectée au-delà de la valeur seuil, et si le contrôle interne la présente. L'inhibition de la réaction PCR peut être exclue par l'amplification du contrôle interne.

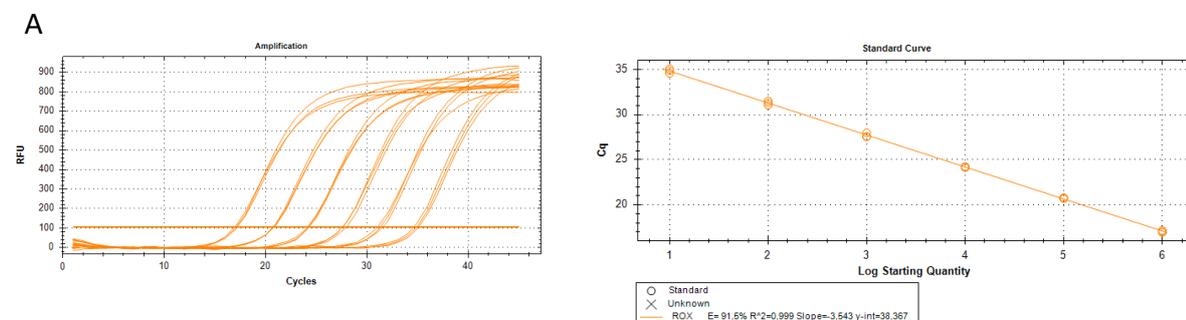
10 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

10.1 Sensibilité analytique

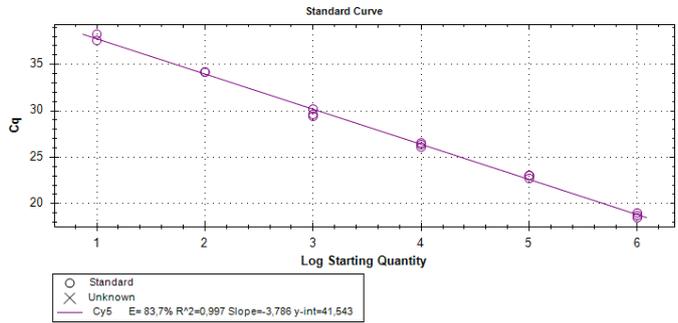
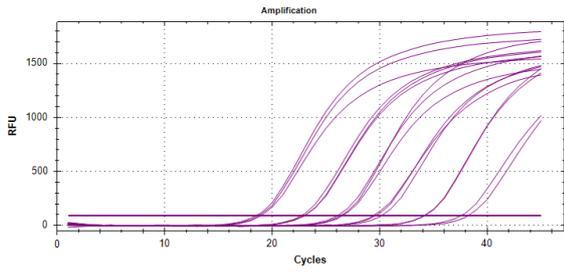
La sensibilité analytique du **HPV Screening Real Time PCR Kit** a été déterminée en effectuant trois répétitions de dilutions en série de fragments synthétiques de chacune des cibles de 10^6 copies/rxn à 10 copies/rxn. En ajustant les données Cts obtenues à une ligne, l'efficacité de l'amplification, R^2 et la pente ont été déterminés pour chacun des gènes.

Il a été établi que la trousse **HPV Screening Real Time PCR Kit** a une limite de détection de 10 copies/réaction pour les génotypes VPH 16, VPH 18, VPH 31, VPH 33, VPH 35, VPH 39, VPH 45, VPH 51, VPH 52, VPH 56, VPH 58, HPV 59, HPV 66 et HPV 68 (figure 2).

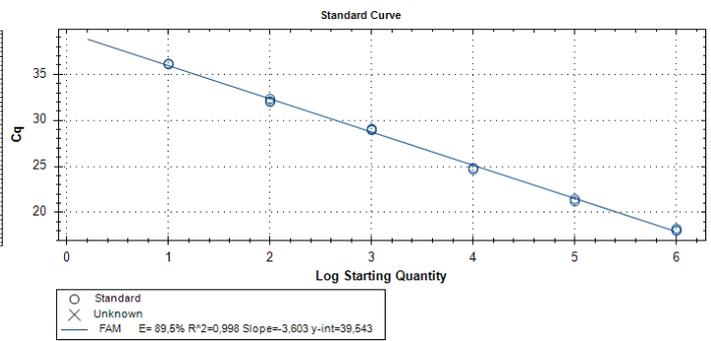
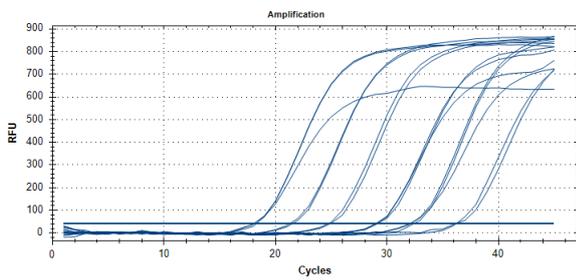
L'efficacité d'amplification de chaque cible ainsi que le R^2 et la pente de la ligne obtenue sont présentés dans le tableau 8.



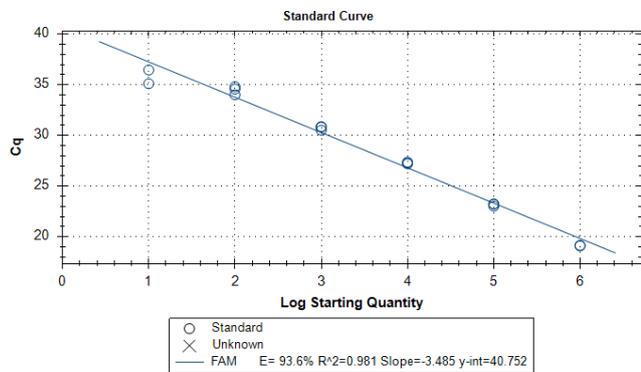
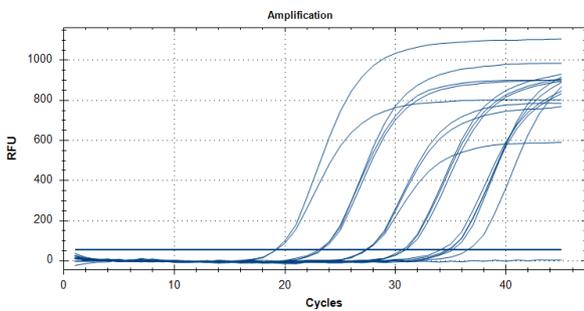
B



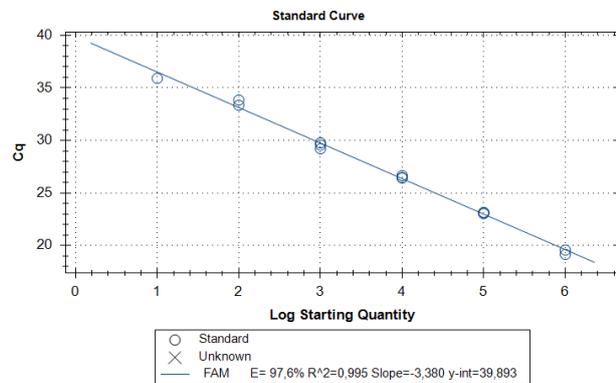
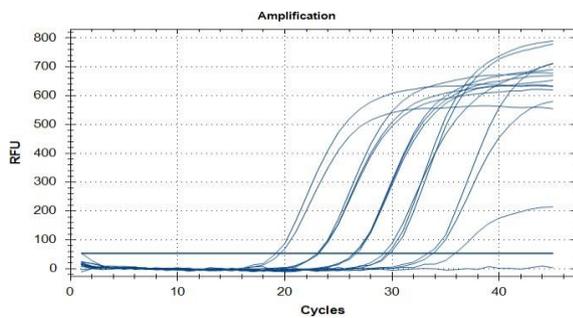
C



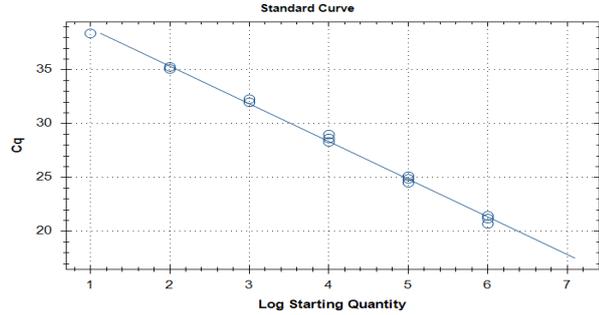
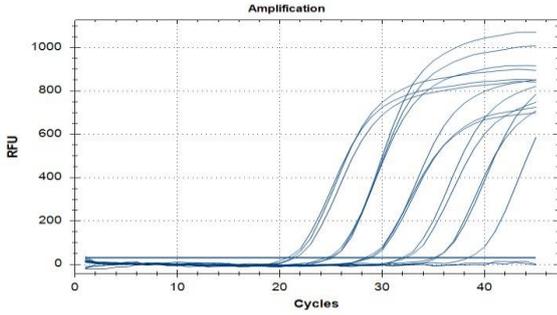
D



E

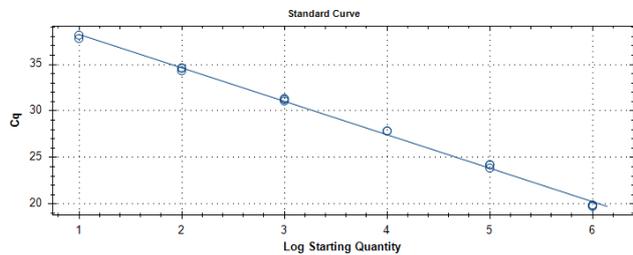
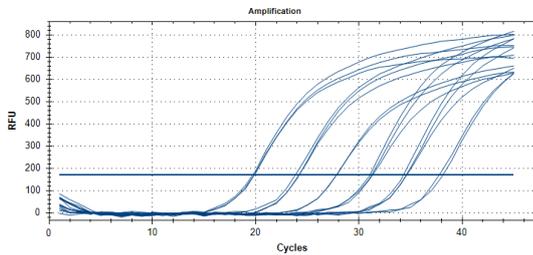


F



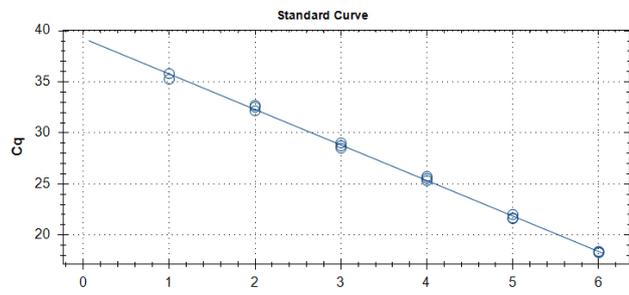
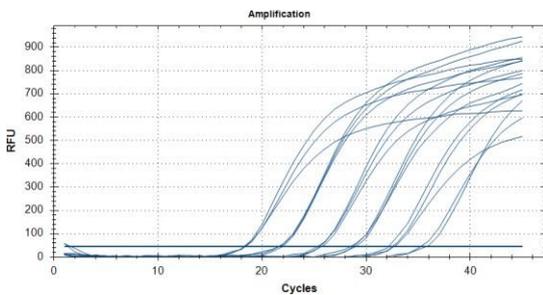
○ Standard
× Unknown
— FAM E= 93,1% R²=0,996 Slope=-3,499 y-int=42,333

G



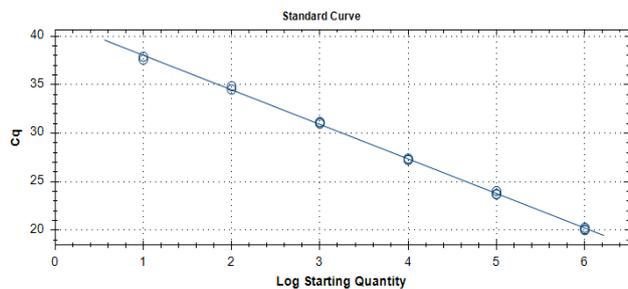
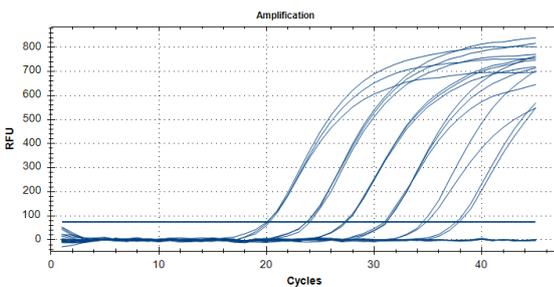
○ Standard
× Unknown
— FAM E= 88,6% R²=0,997 Slope=-3,600 y-int=41,845

H



○ Standard
× Unknown
— FAM E= 93,9% R²=0,998 Slope=-3,477 y-int=39,253

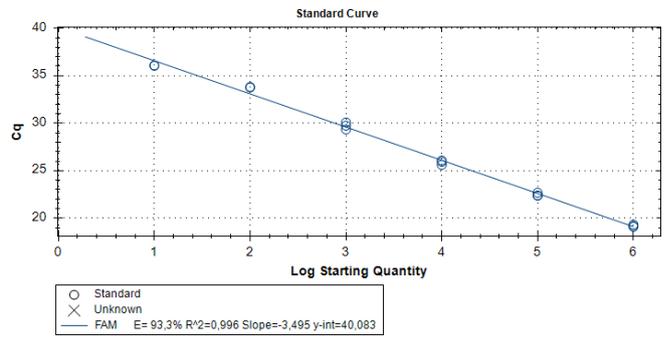
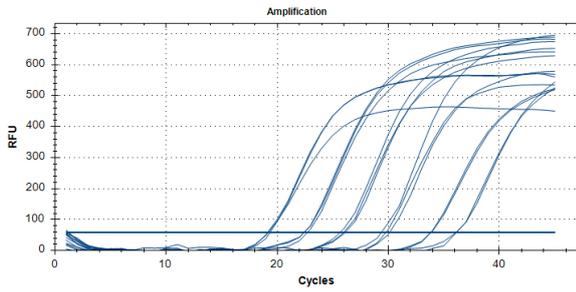
I



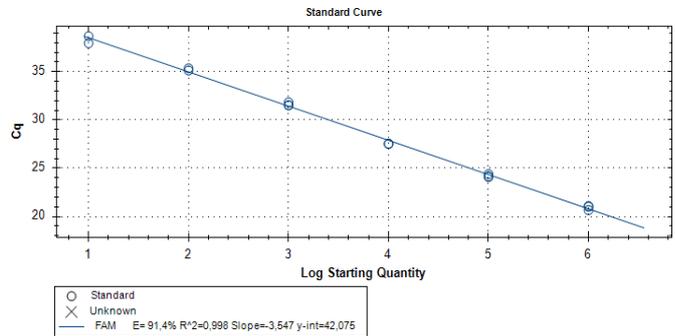
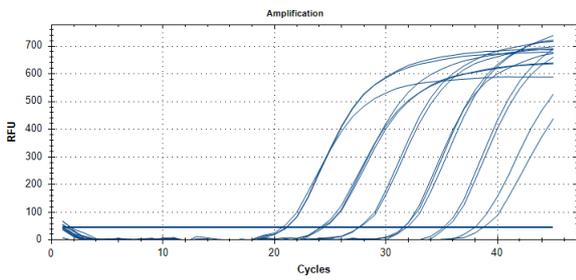
○ Standard
× Unknown
— FAM E= 90,9% R²=0,999 Slope=-3,561 y-int=41,594



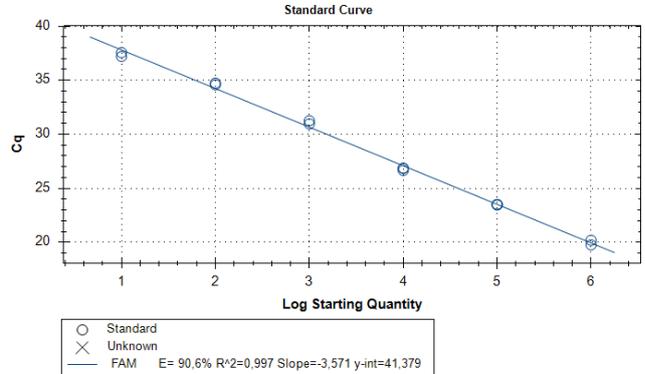
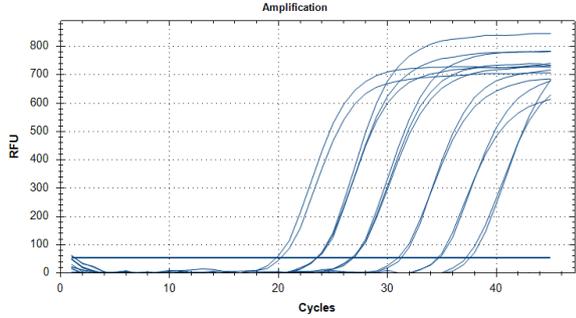
J



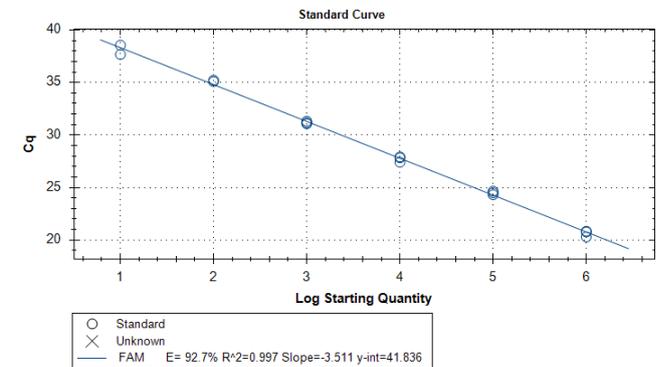
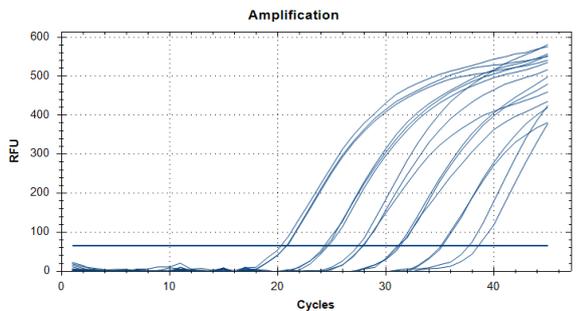
K



L



M



N

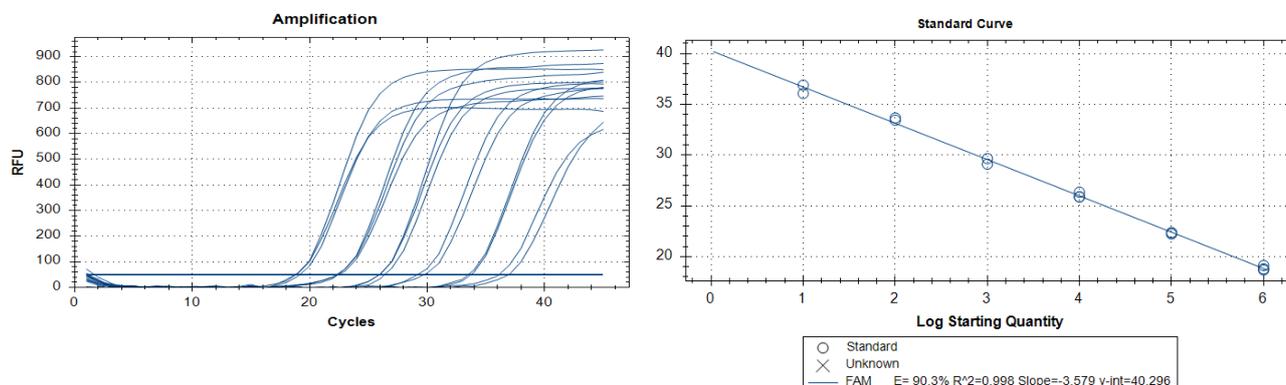


Figure 2 : A gauche : Dilutions en série de 10^6 copies/réaction à 10 copies/réaction de fragments synthétiques de HPV 16 dans le canal ROX (A), HPV 18 dans le canal Cy5 (B) et HPV 31 (C), HPV 33 (D), HPV 35 (E), HPV 39 (F), HPV 45 (G), HPV 51 (H), HPV 52 (I), HPV 56 (J), HPV 58 (K), HPV 59 (L), HPV 66 (M) et HPV 68 (N) dans le canal FAM. A droite : Lignes de calibration obtenues pour chaque cible. Expériences réalisées sur le CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

HPV génotype	Efficacité	R ²	Pente
HPV 16	91.5%	0.999	-3.543
HPV 18	83.7%	0.997	-3.786
HPV 31	89.5%	0.998	-3.063
HPV 33	93.6%	0.981	-3.485
HPV 35	97.6%	0.995	-3.380
HPV 39	93.1%	0.996	-3.499
HPV 45	89.6%	0.997	-3.600
HPV 51	93.9%	0.998	-3.477
HPV 52	90.9%	0.999	-3.561
HPV 56	93.3%	0.996	-3.495
HPV 58	91.4%	0.998	-3.547
HPV 59	90.6%	0.997	-3.571
HPV 66	92.7%	0.997	-3.511
HPV 68	90.3%	0.998	-3.579

Tableau 8. Efficacité d'amplification, R² et pente des lignes droites obtenues avec des dilutions en série de fragments synthétiques de chaque cible.

10.2 Spécificité analytique

La spécificité du **HPV Screening Real Time PCR Kit** a été confirmée en testant des échantillons cliniques positifs pour d'autres agents pathogènes liés aux maladies sexuellement transmissibles. En outre, des tests de spécificité ont également été réalisés contre des génotypes potentiels à haut risque et à faible risque du papillomavirus humain et contre d'autres bactéries qui partagent une niche écologique. La liste complète des organismes testés pour la réactivité croisée est présentée dans le tableau suivant.



Test de réactivité croisée	
Micro-organisme	Résultats
<i>Candida albicans</i>	Négatif
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Négatif
<i>Enterobacter cloacae</i>	Négatif
<i>Enterococcus faecium</i>	Négatif
<i>Enterococcus faecalis</i>	Négatif
<i>Escherichia coli</i>	Négatif
<i>Haemophilus ducrey</i>	Négatif
Génotype HR HR 26	Négatif
Génotype HR HR 53	Négatif
Génotype HR HR 73	Négatif
Génotype HR HR 82	Négatif
Génotype LR HR 11	Négatif
Génotype LR HR 42	Négatif
Génotype LR HR 43	Négatif
Génotype LR HR 54	Négatif
Génotype LR HR 6	Négatif
Génotype LR HR 61	Négatif
Génotype LR HR 62	Négatif
Génotype LR HR 67	Négatif
Génotype LR HR 70	Négatif
Génotype LR HR 71	Négatif
Génotype LR HR 72	Négatif
Génotype LR HR 81	Négatif
Génotype LR HR 84	Négatif
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Négatif
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Négatif
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Négatif
<i>Mycoplasma hominis</i>	Négatif
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Négatif
<i>Proteus mirabilis</i>	Négatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif
<i>Staphylococcus aureus</i>	Négatif
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Négatif
<i>Staphylococcus aureus</i>	Négatif
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Négatif
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Négatif
<i>Treponema pallidum</i>	Négatif
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Négatif
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Négatif



Virus respiratoire syncytial-1	Négatif
Virus respiratoire syncytial-2	Négatif

Tableau 9. Micro-organismes testés dans le cadre du test de spécificité.

Aucune réaction croisée n'a été détectée avec l'un des agents pathogènes testés.

10.3 Répétabilité

La répétabilité a été analysée en testant la méthode 6 fois pour chacune des cibles incluses dans le panel. À cette fin, une concentration connue de fragments d'ADN synthétique imitant chacune des cibles à amplifier a été utilisée. Le test a été réalisé par le même opérateur, dans un seul endroit et en utilisant le même lot de réactifs et la même plateforme. La plateforme utilisée était l'Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System et les résultats ont été analysés avec la version v. 2.4.3 du logiciel "Design and Analysis" (Applied Biosystems). La variabilité entre les essais a été déterminée à partir des valeurs de Cts obtenues à partir des répétitions et le coefficient de variation (CV) a été calculé comme l'écart type divisé par la moyenne des Cts, soit 0,35 % pour le HPV 16, 0,93 % pour le HPV 18 et 1,43 % pour le HPV HR.

10.4 Reproductibilité

La reproductibilité de la méthode a été analysée en simulant la variabilité inter-laboratoire, en changeant l'opérateur, les équipements utilisés dans le processus et les lots de mélange réactionnel PCR. 40 échantillons d'ADN purifié ont été testés avec le RNA/DNA pathogen extraction kit (Robot Opentrons OT2), (Vitro, réf. MAD-003955M) en utilisant le système d'extraction automatisé Opentrons OT2. Sur les 40 échantillons, 24 étaient positifs pour le HPV 16, le HPV 18, le HPV 31, le HPV 33, le HPV 35, le HPV 39, le HPV 45, le HPV 51, le HPV 52, le HPV 56, le HPV 58, le HPV 59, le HPV 66 et/ou le HPV 68 et 16 échantillons étaient négatifs.

La concordance a été calculée avec un indice kappa de 1,00, une erreur standard de 0 et un IC à 95 % de 1,000-1,000, ce qui montre une très bonne concordance pour le **HPV Screening Real Time PCR Kit**.

Laboratoire 2	Laboratoire 1		
	positif	négatif	Total
positif	24	0	24
négatif	0	16	16
Total	24	16	40

Tableau 10. Test de reproductibilité pour les cibles incluses dans le HPV Screening Real Time PCR Kit.

10.5 Plage de mesure

La plage de mesure du test a été déterminée en utilisant des fragments d'ADN synthétique pour chacune des cibles incluses dans le MMix of HPV Screening Real Time PCR Kit.

Il a été démontré que le HPV Screening Real Time PCR Kit fonctionne correctement en présence de fragments synthétiques de chacune des cibles de 10^6 copies/réaction à 10 copies/réaction. (Voir section 10.1 Sensibilité analytique).



Pour déterminer la limite supérieure, des dilutions en série de 10^9 copies/réaction à 10^7 copies/réaction de fragments synthétiques de chaque cible ont été testées. Trois répliques ont été testées à chaque niveau.

Toutes les réactions ont été réalisées avec le QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System et analysées avec QuantStudio™ 2.4.3 Design and Analysis Software.

Il a été établi que le HPV Screening Real Time PCR Kit a une plage de mesure de 10^9 copies/réaction à 10 copies/réaction pour le HPV 16 et le HPV 18 ; de 10^6 copies/réaction à 10 copies/réaction pour le HPV 31, HPV 33, HPV 35, HPV 45, HPV 51, HPV 52, HPV 56, HPV 59, HPV 66 et HPV 68 et 10^7 copies/réaction à 10 copies/réaction pour le HPV 39 et le HPV 58.

10.6 Sensibilité et spécificité cliniques

Le **HPV Screening Real Time PCR Kit** a été validé à partir d'ADN purifié par l'une des méthodes d'extraction susmentionnées. La capacité de diagnostic du HPV Screening Real Time PCR Kit a été évaluée en étudiant sa sensibilité et sa spécificité de diagnostic. Ces deux paramètres sont définis et calculés comme suit :

- La **spécificité diagnostique** est exprimée en pourcentage (fraction numérique multipliée par 100), calculée comme suit : $100 \times \frac{\text{nombre de valeurs négatives vraies (TN)}}{\text{nombre de valeurs négatives vraies (TN)} + \text{nombre de valeurs faussement positives (FP)}}$, ou $100 \times \text{TN} / (\text{TN} + \text{FP})$.
- La **sensibilité diagnostique** est exprimée en pourcentage (fraction numérique multipliée par 100), calculée comme suit : $100 \times \frac{\text{nombre de valeurs positives vraies (TP)}}{\text{nombre de valeurs positives vraies (TP)} + \text{nombre de valeurs négatives fausses (FN)}}$, ou $100 \times \text{TP} / (\text{TP} + \text{FN})$.

Un total de 266 échantillons cliniques de différentes origines provenant de différents hôpitaux et laboratoires ont été analysés dans une étude rétrospective : Hôpital Costa de la Luz (Huelva), Hôpital Universitaire de la Clinique de San Cecilio (Grenade), Laboratoire Dr. Aneiros (Grenade), Laboratoire Dra. Lasso (Madrid), Institut Jiménez Ayala (Madrid), Laboratoire Dra. Maestro, Laboratoire Dr. Cueva S.L. (Jaén), Laboratoire de pathologie anatomique Luresa (Lugo) et Bioportugal (Porto). Parmi ces échantillons, 101 étaient positifs pour un ou plusieurs des génotypes détectés par le kit et 165 étaient négatifs. L'étude comparative a été réalisée en utilisant comme méthode de référence le HPV Direct Flow Chip Kit (Vitro S.A.) marqué CE-IVD. L'ADN des échantillons a été extrait avec le RNA/DNA pathogen extraction kit (Robot Opentrans OT2) (Vitro, réf. MAD-003955M).

Les tableaux 11 et 12 montrent la sensibilité et la spécificité diagnostiques du HPV Screening Real Time PCR Kit ainsi que sa valeur prédictive positive et négative.

Organisme	TN	FP	TP	FN	Spécificité du diagnostic	IC À 95	Sensibilité du diagnostic	IC À 95
HPV 16	248	0	18	0	100%	98.09 - 100 %	100%	78.12 - 100 %
HPV 18	256	0	10	0	100%	98.16 - 100 %	100%	65.54 - 100 %
HPV HR	187	0	77	2	100%	97.49 - 100 %	97.5%	90.31 - 99.56 %

Tableau 11. Résultats de sensibilité et de spécificité obtenus avec le HPV Screening Real Time PCR Kit.

Organisme	TN	FP	TP	FN	PPV	IC À 95	NPV	IC À 95
HPV 16	248	0	18	0	100%	78.12 - 100 %	100%	98.09 - 100 %
HPV 18	256	0	10	0	100%	65.54 - 100 %	100%	98.16 - 100 %
HPV HR	187	0	77	2	100%	94.08 - 100 %	98.94%	95.83 - 99.82 %

Tableau 12. Valeur prédictive positive et valeur prédictive négative du HPV Screening Real Time PCR Kit.

11 LIMITES DE L'ESSAI

1. Les résultats du test doivent être évalués par un professionnel de la santé dans le contexte des antécédents médicaux, des symptômes cliniques et des autres tests de diagnostic.
2. Utilisation d'échantillons inadéquats : Les types de spécimens cliniques qui ont été validés sont les cytologies en milieu liquide et les écouvillons vaginaux et rectaux. La méthode a été validée sur la base de matériel génétique purifié provenant de ceux-ci. L'analyse de tout autre type de spécimen non indiqué peut conduire à des résultats erronés ou non concluants en raison de l'inhibition de la réaction PCR par des agents chimiques inhibiteurs.
3. Le bon fonctionnement du test dépend de la qualité de l'échantillon ; l'acide nucléique doit être correctement extrait des échantillons cliniques. Un prélèvement, un stockage et/ou un transport inappropriés des échantillons peuvent entraîner des faux négatifs.
4. Un faible nombre de copies de la cible, inférieur à la limite de détection, peut être détecté, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
5. Un test positif pour le HPV n'exclut pas la possibilité que d'autres agents pathogènes soient présents dans l'échantillon clinique.
6. Un résultat négatif du test n'exclut pas l'existence d'une infection par le HPV et il ne doit pas être utilisé comme seule méthode de diagnostic pour établir un traitement ou un programme de prise en charge du patient.
7. Un résultat négatif du test doit être analysé dans le contexte de l'historique médical du patient et de l'épidémiologie.



12 BIBLIOGRAPHIE

- Attempts to detect virus specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. zur Hausen, H., Meinhof, W., Scheiber, W., Bornkamm, G.W. 1974. Int J Cancer 13: 650-6.
- Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C.J. and Muñoz, N. 1999. J Pathol 189: 12-9.
- Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. Biochim Biophys Acta 1288: F55-78.
- Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. zur Hausen, H. 2002. Nat Rev Cancer 2: 342-50.
- Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. Muñoz, N., Bosch, F.X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K.V., Snijders, P.J., Meijer, C.J. 2003. N Engl J Med 348 (6): 518-27.

13 SYMBOLES D'ÉTIQUETTES ET DE BOÎTES

	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> .		Date d'expiration
	Référence catalogue		Limite de température
	Numéro de lot		Fabricant
	Se référer aux instructions d'utilisation		Contenu suffisant pour <n>essais
	Fiche de données de sécurité		Tenir à l'écart de la lumière du soleil

14 SUIVI DES MODIFICATIONS

Date	Description
2021/07/22	Création du document.
2022/03/08	Ajout de l'explication du pictogramme "Tenir à l'écart de la lumière du soleil".