



ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185
10149 Torino ITALIA

Uffici: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11
E-mail: emd.support@elitechgroup.com
Sito internet: www.elitechgroup.com

NOTICE of CHANGE dated 14/11/2023

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«High Risk HPV ELITe Panel» Ref. RTK402ING

This new revision of the Instruction for Use (IFU) contains the following changes:

- *Updating of matrix description*

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

PLEASE NOTE



LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT



THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT



CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT



LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT



A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT



DIESE FASSUNG DER GEBRAUCHSANLEITUNG IST KOMPATIBEL MIT DER VORHERIGEN VERSION DES TESTKITS



High Risk HPV ELITE Panel

réactifs pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTK402ING



TABLE DES MATIÈRES

APPLICATION	page 1
PRINCIPES DU TEST	page 2
DESCRIPTION DU PRODUIT	page 2
MATÉRIEL FOURNI	page 3
MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI	page 3
AUTRES PRODUITS REQUIS	page 3
AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS	page 4
ELITE INGENIUS®	
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	page 5
PROCÉDURE	page 6
CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE	page 12
7500, 7500 Fast Real-Time PCR System / CFX96™ Real-Time PCR Detection System–IVD	
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	page 14
PROCÉDURE	page 14
CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE	page 21
BIBLIOGRAPHIE	page 21
LIMITES DE LA PROCÉDURE	page 22
PROBLÈMES ET SOLUTIONS	page 23
LÉGENDE DES SYMBOLES	page 25
NOTE POUR L'ACQUÉREUR : LICENCE LIMITÉE	page 26
COORDONNÉES	page 26

APPLICATION

Le produit « High Risk HPV ELITE Panel » est un test qualitatif d'amplification en temps réel des acides nucléiques multiplexe pour la détection et la différenciation de l'ADN des **14 types du papillomavirus humain à haut risque** dans des échantillons d'ADN extraits d'échantillons cervicaux collectés en milieu UTM et de cellules provenant d'échantillons cervicaux collectés en milieu UTM.

Le test identifie spécifiquement les types HPV16 et HPV18 tout en détectant simultanément les autres types à haut risque (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 et 68).

Le produit est destiné à une utilisation diagnostique *in vitro* pour faciliter le diagnostic des infections par le HPV, en association avec les données cliniques du patient et d'autres résultats d'analyse de laboratoire.

High Risk HPV ELITE Panel
réactifs pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTK402ING

PRINCIPES DU TEST

Le test consiste en une réaction d'amplification en temps réel multiplexe effectuée par un thermostat programmable doté d'un système optique de détection de la fluorescence (thermocycleur d'amplification en temps réel).

Dans chaque puits, différentes réactions d'amplification sont réalisées à partir de l'ADN extrait de chaque échantillon testé, afin d'amplifier les cibles HPV-HR :

- HPV16, révélé par une sonde spécifique détectée par l'instrument en temps réel dans le canal pour FAM,
- HPV18, révélé par une sonde spécifique détectée par l'instrument en temps réel dans le canal pour JOE/HEX,
- HR-HPV (HPV31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68), révélés par une sonde spécifique détectée par l'instrument en temps réel dans le canal pour Texas red/Cal Fluor Red 610.

Le kit amplifie également un contrôle interne endogène basé sur le gène ABL, détecté par l'instrument en temps réel dans le canal pour Cy5/Quasar 670.

L'ADN cible spécifique est amplifié par des amorces sens, antisens, et une Taq polymérase. Dans une PCR en temps réel, le produit amplifié est détecté via un colorant fluorescent. La méthode repose sur une sonde à base d'ADN comportant un rapporteur fluorescent à une extrémité, et un désactivateur de fluorescence à l'autre extrémité de la sonde. L'étroite proximité du rapporteur et du désactivateur empêche la détection de la fluorescence ; la dégradation de la sonde par l'activité exonucléase 5' vers 3' de la Taq polymérase inhibe la proximité rapporteur-désactivateur et permet ainsi une émission de fluorescence non désactivée, qui peut être détectée.

L'émission de la fluorescence augmente au fur et à mesure que les produits spécifiques de la réaction d'amplification augmentent et elle est mesurée par l'instrument pendant le cycle de PCR en temps réel.

Le test a été validé avec les systèmes décrits dans le présent mode d'emploi.

DESCRIPTION DU PRODUIT

Le kit « High Risk HPV ELITE Panel » fournit les composants suivants :

• HR-HPV Reaction Mix

Un mélange d'enzymes pour une région spécifique du papillomavirus humain et un tampon, aliquoté dans trois tubes à essai (capuchon JAUNE). Le mélange fournit une UNG (Uracile N-glycosidase) pour empêcher toute contamination par effet de transfert.

Chaque tube contient 550 µl de solution, un volume suffisant pour effectuer **32 tests** en association avec le système **ELITE InGenius** au cours de 4 sessions d'analyse et **33 tests** en association avec d'autres systèmes.

• HR-HPV Probe Mix

Un mélange d'amorces/sondes spécifiques pour le HPV et un contrôle interne, aliquoté dans trois tubes à essai (capuchon ROUGE).

Chaque tube contient 320 µl de solution, un volume suffisant pour effectuer 32 tests en association avec le système **ELITE InGenius** au cours de 4 sessions d'analyse et **33 tests** en association avec d'autres systèmes.

• HR-HPV Positive Control

Une solution de plasmides pour le HPV dans une solution stabilisée, aliquotée dans deux tubes à essai (capuchon BLEU).

Chaque tube contient 100 µl de solution, un volume suffisant pour effectuer **4 sessions d'analyse** (mode d'analyse « Extraction + PCR » [Extract + PCR]) en association avec le système « **ELITE InGenius** » et **10 sessions d'analyse** en association avec les autres systèmes validés.

Le produit permet d'effectuer **96 tests en association avec le système « ELITE InGenius »**, en incluant les contrôles.

Le produit permet d'effectuer **100 tests en association avec d'autres systèmes**, en incluant les contrôles.

MATÉRIEL FOURNI

Composant	Description	Quantité	Classification des risques
HR-HPV Reaction Mix	Mélange d'enzymes capuchon JAUNE	3 x 550 µl	-
HR-HPV Probe Mix	Mélange d'amorces et de sondes capuchon ROUGE	3 x 320 µl	-
HR-HPV Positive Control	Plasmides pour les cibles capuchon BLEU	2 x 100 µl	-

MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI

- Hotte à flux laminaire.
- Gants non poudrés en nitrile jetables ou matériel similaire.
- Agitateur de type vortex.
- Microcentrifugeuse de paillasse (12 000 - 14 000 tr/min).
- Micropipettes et cônes stériles avec filtre pour les aérosols ou à déplacement positif (2-20 µl, 5-50 µl, 50-200 µl, 200-1 000 µl).
- Eau de qualité biologie moléculaire.
- Tube Sarstedt de 2,0 ml à capuchon vissant, à collerette (Sarstedt Réf. 72.694.005).
- Thermocycleur programmable avec système de détection optique de fluorescence, 7500, 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems Inc) ou système de détection par PCR en temps réel CFX96™-DIV (Bio-Rad Laboratories, Inc.) étalonné selon les instructions du fabricant.

AUTRES PRODUITS REQUIS

Les réactifs pour l'extraction de l'ADN des échantillons à analyser et les consommables ne sont **pas** inclus dans ce produit.

Pour l'extraction automatique de l'ADN, la PCR en temps réel et l'interprétation des résultats des échantillons, l'instrument « **ELITe InGenius** » (ELITechGroup S.p.A., réf. INT030) et les protocoles de test spécifiques (ELITechGroup S.p.A) suivants sont requis.

- paramètres pour le contrôle positif d'amplification « **HR-HPV ELITe_PC** »,
- paramètres pour le contrôle négatif d'amplification « **HR-HPV ELITe_NC** »,
- paramètres pour les échantillons prélevés à l'écouvillon à analyser « **HR-HPV ELITe_CS_200_100** ».

Les produits génériques suivants sont requis avec l'instrument « **ELITe InGenius** » :

- cartouches d'extraction « **ELITe InGenius® SP 200** » (ELITechGroup S.p.A., réf. INT032SP200),
- consommables pour l'extraction « **ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set** » (ELITechGroup S.p.A., réf. INT032CS),
- cartouches d'amplification « **ELITe InGenius® PCR Cassette** » (ELITechGroup S.p.A., réf. INT035PCR),
- cônes « **300 µL Filter tips Axygen** » (Axygen BioSciences Inc., CA, réf. TF-350-L-R-S),
- conteneurs « **ELITe InGenius® Waste Box** » (ELITechGroup S.p.A., réf. F2102-000).

Pour l'extraction manuelle de l'ADN des échantillons à analyser, il est recommandé d'utiliser le produit commercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Allemagne, Réf. 51304) pour l'extraction de l'ADN des échantillons cellulaires et acellulaires.

Avec un 7500 ou 7500 Fast Real-Time PCR System, il est nécessaire d'utiliser le produit générique « **Q - PCR Microplates** » (ELITechGroup S.p.A., réf. RTSACC01), des microplaques dotées de puits de 0,2 ml et des feuilles de scellage adhésives pour l'amplification en temps réel, ou équivalent.

Avec un CFX96™ Dx System, il est nécessaire d'utiliser les produits génériques tels que les microplaques « **Hard-Shell 96-Well PCR Plates, low profile, thin wall, skirted, white/clear** » (Bio-Rad, réf. HSP9601) et des feuilles de scellage adhésives pour l'amplification en temps réel « **MICROSEAL B ADHES SEAL,100/PK** » (Bio-Rad, réf. MSB1001), ou équivalent.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Ce produit est exclusivement réservé à une utilisation *in vitro*.

Avertissements et précautions d'ordre général

Manipuler et mettre au rebut tous les échantillons biologiques comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des agents infectieux. Éviter tout contact direct avec les échantillons biologiques. Éviter de provoquer des éclaboussures ou des pulvérisations. Le matériel qui a été en contact avec les échantillons biologiques doit être traité pendant au moins 30 minutes avec de l'hypochlorite de sodium à 3 % ou autoclavé pendant une (1) heure à 121 °C avant d'être mis au rebut.

Manipuler et mettre au rebut tous les réactifs et l'ensemble du matériel qui ont été utilisés pour réaliser le test comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des agents infectieux. Éviter tout contact direct avec les réactifs. Éviter de provoquer des éclaboussures ou des pulvérisations. Les déchets doivent être manipulés et éliminés dans le respect des normes de sécurité adéquates. Le matériel combustible jetable doit être incinéré. Les déchets liquides contenant des acides ou des bases doivent être neutralisés avant d'être éliminés.

Porter des vêtements et des gants de protection appropriés et se protéger les yeux et le visage.

Ne jamais pipeter les solutions avec la bouche.

Ne pas manger, ni boire, ni fumer, ni appliquer de produits cosmétiques dans les zones de travail.

Se laver soigneusement les mains après toute manipulation des échantillons et des réactifs.

Éliminer les réactifs restants et les déchets conformément aux réglementations en vigueur.

Lire attentivement toutes les instructions fournies avec le produit avant d'exécuter le test.

Lors de l'exécution du test, suivre les instructions fournies avec le produit.

Ne pas utiliser le produit au-delà de la date de péremption indiquée.

Utiliser uniquement les réactifs fournis avec le produit et ceux recommandés par le fabricant.

Ne pas utiliser de réactifs provenant de lots différents.

Ne pas utiliser de réactifs commercialisés par d'autres fabricants.

Avertissements et précautions pour la biologie moléculaire

Les procédures de biologie moléculaire, telles que l'extraction des acides nucléiques, l'amplification et la détection, exigent du personnel qualifié et dûment formé pour éviter tout risque de résultats erronés, en particulier ceux dus à la dégradation des acides nucléiques contenus dans les échantillons ou à la contamination des échantillons par les produits d'amplification.

Lorsque la session d'amplification est paramétrée manuellement, il est nécessaire de disposer de zones distinctes pour l'extraction/la préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification/la détection des produits d'amplification. Ne jamais introduire un produit d'amplification dans la zone réservée à l'extraction/la préparation des réactions d'amplification.

Lorsque la session d'amplification est paramétrée manuellement, il est nécessaire de disposer de blouses de laboratoire, de gants et d'outils utilisés exclusivement pour l'extraction/la préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification/la détection des produits d'amplification. Ne jamais transférer de blouses, de gants ni d'outils de laboratoire de la zone désignée pour l'amplification/la détection des produits d'amplification vers la zone désignée pour l'extraction/la préparation des réactions d'amplification.

Lorsque la session d'extraction/d'amplification est paramétrée avec l'instrument intégré, il est nécessaire de disposer de blouses, gants et instruments dédiés.

Les échantillons doivent être exclusivement utilisés pour ce type d'analyse. Les échantillons doivent être manipulés sous une hotte à flux laminaire. Les tubes contenant différents échantillons ne doivent jamais être ouverts en même temps. Les pipettes utilisées pour manipuler les échantillons doivent être exclusivement utilisées à cette fin spécifique. Les pipettes doivent être de type à déplacement positif ou doivent être utilisées avec des cônes dotés d'un filtre pour les aérosols. Les cônes utilisés doivent être stériles, exempts de DNases et de RNases, et exempts d'ADN et d'ARN.

Les réactifs doivent être manipulés sous une hotte à flux laminaire. Les réactifs nécessaires à l'amplification doivent être préparés de manière à pouvoir être utilisés au cours d'une seule session. Les pipettes utilisées pour la manipulation des réactifs doivent être utilisées exclusivement à cette fin. Les pipettes doivent être de type à déplacement positif ou doivent être utilisées avec des cônes dotés d'un filtre pour les aérosols. Les cônes utilisés doivent être stériles, exempts de DNases et de RNases, et exempts d'ADN et d'ARN.

Les produits d'amplification doivent être manipulés de manière à réduire au maximum la dispersion dans l'environnement afin d'éviter tout risque de contamination. Les pipettes utilisées pour la manipulation des produits d'amplification doivent être exclusivement utilisées à cette fin.

Les cassettes de PCR doivent être manipulées de sorte à réduire au maximum la diffusion des produits d'amplification dans l'environnement, afin d'éviter toute contamination des échantillons et des réactifs.

Avertissements et précautions spécifiques pour les composants

- **HR-HPV Reaction Mix**

Le mélange **HR-HPV Reaction Mix** doit être conservé à -20 °C.
Le mélange **HR-HPV Reaction Mix** peut être congelé et décongelé 10 fois au maximum : des cycles de congélation/décongélation supplémentaires risquent d'entraîner une réduction des performances du produit.

- **HR-HPV Probe Mix**

Le mélange **HR-HPV Probe Mix** doit être conservé à -20 °C dans l'obscurité.
Le mélange **HR-HPV Probe Mix** peut être congelé et décongelé 10 fois au maximum : des cycles de congélation/décongélation supplémentaires risquent d'entraîner une réduction des performances du produit.

- **HR-HPV Positive Control**

Le **HR-HPV Positive Control** doit être conservé à -20 °C.
Le **HR-HPV Positive Control** peut être congelé et décongelé 10 fois au maximum : des cycles de congélation/décongélation supplémentaires risquent d'entraîner une réduction des performances du produit.

ELITe InGenius®

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES

Échantillons

Ce produit doit être utilisé avec les échantillons cliniques suivants :

Échantillons cervicaux collecté dans un milieu UTM

Les échantillons cervicaux pour l'extraction de l'ADN doivent être collectés dans un milieu UTM et identifiés conformément aux directives du laboratoire, puis transportés et conservés à température ambiante (+18/+25 °C) ou réfrigérés à +2/+8 °C pendant deux jours au maximum.

Les échantillons cervicaux peuvent être congelés et conservés à -20 °C pendant deux mois au maximum ou à -70 °C pendant deux ans au maximum. Éviter les cycles de congélation/décongélation. La congélation risque de provoquer une précipitation d'inhibiteurs, une lyse cellulaire et une dégradation de l'acide nucléique de l'agent pathogène.

Pour effectuer l'analyse avec ce produit, un volume de 0,2 ml d'échantillon remis en suspension doit être transféré dans le « **tube de sonication** » inclus dans le « **ELITe InGenius SP 200 Consumable Set** ».

Substances interférentes

Les données disponibles relatives à l'inhibition provoquée par les médicaments et d'autres substances sont indiquées au paragraphe « Substances interférentes » du chapitre « Caractéristiques de performance ».

Contrôles d'amplification

Avant d'analyser un échantillon, il est absolument indispensable de générer et d'approuver les contrôles d'amplification pour le lot de réactifs d'amplification qui sera utilisé pendant le test :

- à titre de contrôle positif d'amplification, utiliser le réactif **HR-HPV Positive Control** (inclus dans ce kit) en association avec le protocole **HR-HPV ELITe_PC**,
- à titre de contrôle négatif d'amplification, utiliser de l'eau de qualité biologique moléculaire (non incluse dans ce kit) en association avec le protocole **HR-HPV ELITe_NC**.

Remarque : le système **ELITe InGenius** exige que les résultats des contrôles d'amplification soient approuvés et valides pour chaque lot de réactifs d'amplification stocké dans sa base de données.

Les résultats des contrôles d'amplification, approuvés et stockés dans la base de données, expirent **au bout de 15 jours**. À la date d'expiration, il est nécessaire de réanalyser les contrôles positif et négatif en association avec le lot de réactifs d'amplification utilisé.

En outre, les contrôles d'amplification doivent être réanalysés lorsque :

- un nouveau lot de réactifs d'amplification est utilisé,
- les résultats des contrôles de qualité (voir le paragraphe suivant) sont en dehors des spécifications,
- l'instrument **ELITe InGenius** subit une procédure de maintenance majeure.

Contrôles de qualité

Il est recommandé de planifier la validation de la procédure d'extraction et d'amplification. À cette fin, il est possible d'utiliser les échantillons testés ou un matériel de référence certifié.

PROCÉDURE

La procédure d'utilisation du produit **High Risk HPV ELITe Panel** avec le système **ELITe InGenius** comprend trois étapes :

- Vérification de la préparation du système,
- Paramétrage de la session,
- Examen et approbation des résultats.

Vérification de la préparation du système

Avant de commencer la session, en se reportant à la documentation de l'instrument, il est nécessaire de :

- mettre l'instrument **ELITe InGenius** sous tension et de sélectionner le mode de connexion « **FERMÉ** » (CLOSED),
- vérifier que les contrôles d'amplification (Controls, HR-HPV Positive Control, HR-HPV Negative Control) ont été analysés en association avec le lot de réactifs d'amplification à utiliser, et que les résultats sont approuvés et valides (Statut [Status]). En l'absence de résultats des contrôles d'amplification approuvés ou valides, il est nécessaire de les générer tel que décrit aux paragraphes suivants.
- choisir le type d'analyse, en suivant les instructions de l'interface graphique (GUI) pour le paramétrage de la session et l'utilisation des protocoles de test fournis par ELITechGroup S.p.A. Ces protocoles de DIV ont été spécifiquement validés avec les kits **ELITe**, l'instrument **ELITe InGenius** et la matrice indiquée.

Le protocole de test disponible pour tester des échantillons avec le produit **High Risk HPV ELITe Panel** est décrit dans le tableau ci-dessous :

Protocole de test pour le High Risk HPV ELITe Panel			
Nom	Matrice	Rapport	Caractéristiques
HR-HPV ELITe_CS_200_100	Échantillons cervicaux	Positif/ Négatif	Volume d'extraction initial : 200 µl Volume d'élution extrait : 100 µl Contrôle interne : NON Sonication : NON Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µl Volume initial de PCR de l'échantillon : 5 µl

Si le protocole de test d'intérêt n'est pas chargé dans le système, contacter le service clientèle ELITechGroup local.

Paramétrage de la session

Le produit **High Risk HPV ELITe Panel** peut être utilisé avec le système **ELITe InGenius** pour les opérations suivantes :

- A. Analyse intégrée (Extraction + PCR),
- B. Analyse d'amplification (PCR uniquement),
- C. Analyse d'amplification du contrôle positif et du contrôle négatif (PCR uniquement),

Tous les paramètres nécessaires pour la session d'analyse sont inclus dans le protocole de test disponible sur l'instrument et sont automatiquement rappelés lorsque le protocole de test est sélectionné.

Remarque : le système **ELITe InGenius** peut être connecté au « Serveur d'informations de localisation (LIS) qui permet de charger les informations relatives à la session de travail. Se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument pour plus de détails.

Les principales étapes du paramétrage des trois types d'analyse sont décrites ci-dessous.

A. Analyse intégrée

Avant de commencer la session d'analyse, il est important de procéder comme suit :

1. Si nécessaire, décongeler à température ambiante (+18/25 °C) les tubes à essai contenant les échantillons à analyser, et les manipuler conformément aux directives du laboratoire et au paragraphe « Échantillons et contrôles » ;
2. Décongeler à température ambiante (+18/25 °C) les tubes à essai de HR-HPV Reaction Mix (capuchon JAUNE) nécessaires pour la session d'analyse, en se rappelant que le contenu de chaque tube à essai est suffisant pour effectuer 32 réactions. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis procéder au test immédiatement.
3. Décongeler à température ambiante (+18/25 °C) les tubes de HR-HPV Probe Mix (capuchon ROUGE) nécessaires pour la session d'analyse, en se rappelant que le contenu de chaque tube est suffisant pour effectuer 32 réactions. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis procéder au test immédiatement.

Remarque : décongeler le HR-HPV Probe Mix dans l'obscurité, car ce réactif est sensible à la lumière.

4. Préparer un tube à capuchon vissant de 2 ml (Sarstedt réf. 72.694.005, non inclus dans le kit) pour le mélange réactionnel complet HR-HPV PCR Mix et le marquer de manière reconnaissable avec un marqueur permanent,
5. Calculer les volumes des deux composants inclus dans le kit, qui sont nécessaires à la préparation du mélange réactionnel complet HR-HPV PCR Mix, sur la base du nombre d'échantillons à analyser, comme décrit dans le tableau suivant.

Remarque : pour calculer les volumes des deux composants, il est nécessaire de définir le nombre d'échantillons (N) à tester au cours de la session d'analyse et de suivre le tableau ci-dessous.

Nombre d'échantillons (N)	HR-HPV Reaction Mix	HR-HPV Probe Mix
1 ≤ N ≤ 4	(N + 1) x 12,5 µl	(N + 1) x 7,5 µl
5 ≤ N ≤ 8	(N + 2) x 12,5 µl	(N + 2) x 7,5 µl
9 ≤ N ≤ 12	(N + 3) x 12,5 µl	(N + 3) x 7,5 µl

6. Préparer le mélange réactionnel complet HR-HPV PCR Mix en ajoutant les volumes calculés des deux composants au tube dédié de 2 ml.

Remarque : préparer le mélange réactionnel complet immédiatement avant le chargement dans l'instrument.

Remarque : le mélange réactionnel complet **ne peut pas** être stocké ; il est stable pendant deux analyses consécutives (le jour même de la reconstitution du mélange réactionnel), s'il est chargé dans l'instrument dans la « Zone inventaire » (Inventory Area), mais il est important de le mélanger entre les analyses.

Remarque : ne pas immerger la totalité du cône dans le liquide lors du pipetage pour éviter le gaspillage de matière et obtenir des volumes précis ; le pipetage doit être effectué très lentement pour éviter les bulles d'air ; essuyer le cône contre le bord du récipient pour éliminer l'excès de liquide à l'extérieur du cône avant la distribution ; veiller à changer les cônes après chaque étape de pipetage.

7. Mélanger délicatement, centrifuger le tube pendant 5 secondes pour amener le contenu au fond et conserver le tube sur de la glace.

Pour paramétrer une analyse intégrée avec une extraction et une amplification d'échantillon, effectuer les étapes suivantes comme indiqué par la GUI :

8. Sélectionner « Exécuter l'analyse » (Perform Run) dans l'écran « Accueil » (Home).
9. Vérifier que le « Volume d'extraction initial » (Extraction Input Volume) est de 200 µl et que le « Volume d'éluat extrait » (Extracted Elute Volume) est de 100 µl.
10. Pour chaque « Position » (Track) d'intérêt, renseigner l'« ID échantillon » (SampleID - SID) en le saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.
11. Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Test » (Assay) (c'est-à-dire HR-HPV ELITe_CS_200_100).
12. Vérifier que le « Protocole » (Protocol) affiché est : « Extraction + PCR » (Extract + PCR).

13. Sélectionner la position de chargement de l'échantillon dans la colonne « Position de l'échantillon » (Sample Position) et sélectionner « Tube de sonication » (Sonication Tube). Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
14. Charger le mélange HR-HPV PCR Mix sur le « Bloc inventaire » (Inventory Block) sélectionné en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur le bouton « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
15. Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la « Zone inventaire » (Inventory Area) sélectionnée en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur le bouton « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
16. Charger les « Cassettes de PCR » (PCR Cassettes), les cartouches d'extraction « ELITe InGenius SP 200 », tous les consommables requis et les échantillons à extraire en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
17. Fermer le tiroir de l'instrument.
18. Appuyer sur « Démarrer » (Start) pour lancer l'analyse.

Au terme du processus, le système **ELITe InGenius** permet aux utilisateurs de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, puis d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

Remarque : au terme de l'analyse, l'échantillon extrait restant dans le « Tube d'éluat » (Elution Tube) doit être retiré de l'instrument, bouché, identifié et conservé à -20 °C. Éviter tout déversement de l'échantillon extrait.

Remarque : au terme de l'analyse, les cassettes de PCR contenant les produits de réaction et les autres consommables doivent être retirés de l'instrument et mis au rebut en évitant toute contamination environnementale. Éviter tout déversement des produits de la réaction.

B. Analyse d'amplification

1. Décongeler à température ambiante (+18/25 °C) les tubes à essai contenant les échantillons extraits. Mélanger délicatement, centrifuger les tubes pendant 5 secondes pour amener le contenu au fond et conserver les tubes sur de la glace.
2. Préparer le mélange réactionnel complet HR-HPV PCR Mix dans un volume suffisant pour la session d'analyse, comme décrit au paragraphe A. Analyse intégrée (du point 2 à 7).

Pour paramétrer une analyse d'amplification à partir d'acides nucléiques extraits, effectuer les étapes suivantes comme indiqué par la GUI :

3. Sélectionner « Exécuter l'analyse » (Perform Run) dans l'écran « Accueil » (Home).
4. Même si aucune extraction ne sera réalisée, vérifier que le « Volume d'extraction initial » (Extraction Input Volume) est de 200 µl et que le « Volume d'éluat extrait » (Extracted Elute Volume) est de 100 µl.
5. Pour chaque « Position » (Track) d'intérêt, renseigner le SID en le saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.
6. Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Test » (Assay) (c'est-à-dire HR-HPV ELITe_CS_200_100).
7. Sélectionner « PCR uniquement » (PCR Only) dans la colonne « Protocole » (Protocol).
8. Vérifier que la position de chargement de l'échantillon dans la colonne « Position échantillons » (Sample Position) est « Tube d'éluat (ligne inférieure) » [Elution Tube (bottom row)]. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
9. Charger le mélange HR-HPV PCR Mix sur le « Bloc inventaire » (Inventory Block) sélectionné en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
10. Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la « Zone inventaire » (Inventory Area) sélectionnée en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
11. Charger les « Cassettes de PCR » (PCR Cassettes) et les échantillons d'acide nucléique extraits en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
12. Fermer le tiroir de l'instrument.
13. Appuyer sur « Démarrer » (Start) pour lancer l'analyse.

Au terme du processus, le système **ELITe InGenius** permet aux utilisateurs de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, puis d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

Remarque : au terme de l'analyse, l'échantillon extrait restant dans le « Tube d'élution » (Elution Tube) doit être retiré de l'instrument, bouché et conservé à -20 °C. Éviter tout déversement de l'échantillon extrait.

Remarque : au terme de l'analyse, les cassettes de PCR contenant les produits de réaction et les autres consommables doivent être retirés de l'instrument et mis au rebut en évitant toute contamination environnementale. Éviter tout déversement des produits de la réaction.

C. Analyse d'amplification du contrôle positif et du contrôle négatif

1. Préparer le mélange réactionnel complet HR-HPV PCR Mix dans un volume suffisant pour la session d'analyse, comme décrit au paragraphe A. Analyse intégrée (du point 2 à 7).
2. Décongeler à température ambiante (+18/25 °C) les tubes à essai contenant le HR-HPV Positive Control. Mélanger au vortex pendant 10 secondes, puis centrifuger les tubes pendant 5 secondes pour amener le contenu au fond et conserver sur de la glace ;
3. Transférer au minimum 50 µl d'eau de qualité biologie moléculaire dans un (1) « Tube d'élution » (Elution tube) inclus dans le « ELITe InGenius SP 200 Consumable Set ».

Pour paramétrer l'analyse d'amplification du contrôle positif et du contrôle négatif, effectuer les étapes suivantes comme indiqué par la GUI :

4. Sélectionner « Exécuter l'analyse » (Perform Run) dans l'écran « Accueil » (Home).
5. Même si aucune extraction ne sera réalisée, vérifier que le « Volume d'extraction initial » (Extraction Input Volume) est de 200 µl et que le « Volume d'élution extrait » (Extracted Elute Volume) est de 100 µl.
6. Dans la « Position » (Track) d'intérêt, sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Test » (Assay).
7. Pour le contrôle positif, sélectionner « HR-HPV ELITe_PC » dans la colonne « Test » (Assay) et renseigner le numéro de lot et la date de péremption du HR-HPV Positive Control.
8. Pour le contrôle négatif, sélectionner « HR-HPV ELITe_NC » dans la colonne « Test » (Assay) et renseigner le numéro de lot et la date de péremption de l'eau de qualité biologie moléculaire.
9. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
10. Charger le mélange HR-HPV PCR Mix sur le « Bloc inventaire » (Inventory Block) sélectionné en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
11. Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la « Zone inventaire » (Inventory Area) sélectionnée en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
12. Charger les « Cassettes de PCR » (PCR Cassettes), le tube de HR-HPV Positive Control et le tube contenant de l'eau pour biologie moléculaire (HR-HPV Negative Control) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
13. Fermer le tiroir de l'instrument.
14. Appuyer sur « Démarrer » (Start) pour lancer l'analyse.

Au terme du processus, le système **ELITe InGenius** permet aux utilisateurs de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, puis d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

Remarque : au terme de l'analyse, le contrôle positif restant doit être retiré de l'instrument, bouché et conservé à -20 °C. Éviter tout déversement du contrôle positif. Le contrôle négatif restant doit être mis au rebut.

Remarque : au terme de l'analyse, les cassettes de PCR contenant les produits de réaction et les autres consommables doivent être retirés de l'instrument et mis au rebut en évitant toute contamination environnementale. Éviter tout déversement des produits de la réaction.

Examen et approbation des résultats

Au terme de l'analyse, l'écran « Affichage des résultats » (Results Display) s'affiche automatiquement. Dans cet écran, les résultats de l'échantillon/des contrôles et les informations concernant l'analyse sont affichés. À partir de cet écran, il est possible d'approuver le résultat, d'imprimer ou d'enregistrer les rapports (« Rapport échantillons » (Sample Report) ou « Rapport des positions » (Track Report). Se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument pour plus de détails.

Remarque : le système **ELITe InGenius** peut être connecté au « Système de gestion des informations de laboratoire » (LIS) qui permet d'envoyer les résultats de la session de travail au centre de données du laboratoire. Se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument pour plus de détails.

Le système **ELITe InGenius** génère les résultats obtenus avec le produit **High Risk HPV ELITe Panel** par la procédure suivante :

- A. Validation des résultats du contrôle positif et du contrôle négatif d'amplification,
- B. Validation des résultats de l'échantillon,
- C. Rapport des résultats de l'échantillon.

A. Validation des résultats du contrôle positif et du contrôle négatif d'amplification

Les signaux de fluorescence émis par les sondes des gènes cibles (« g16 », « g18 » et « HR ») dans les réactions d'amplification du contrôle positif et du contrôle négatif sont analysés automatiquement et interprétés par le logiciel de l'instrument avec les paramètres inclus dans les protocoles de test « HR-HPV ELITe_PC » et « HR-HPV ELITe_NC ».

Les résultats du contrôle positif et du contrôle négatif d'amplification, spécifiques au lot de réactifs d'amplification utilisé, sont enregistrés dans la base de données (Contrôles [Controls]). Ils peuvent être visualisés et approuvés par du personnel qualifié disposant des privilèges « Administrateur » (Administrator) ou « Analyste » (Analyst), en suivant les instructions de la GUI.

Les résultats de l'amplification du contrôle positif et du contrôle négatif, spécifiques au lot de réactif d'amplification, expirent **au bout de 15 jours**.

Les résultats des analyses de l'amplification du contrôle positif et du contrôle négatif sont utilisés par le logiciel de l'instrument pour paramétrer les « Graphiques de contrôle » (Control Charts) et sont utilisés pour surveiller les performances de l'étape d'amplification. Se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument pour plus de détails.

Remarque : si les résultats du contrôle positif ou du contrôle négatif d'amplification ne satisfont pas les critères d'acceptation, le message « Échec » (Failed) s'affiche dans l'écran « Contrôles » (Controls) et il ne peuvent pas être approuvés. Dans ce cas, les réactions d'amplification du contrôle positif et du contrôle négatif doivent être répétées.

Remarque : si le contrôle positif ou le contrôle négatif est analysé avec des échantillons à tester et que son résultat est non valide, l'intégralité de la session est non valide. Dans ce cas, l'amplification de tous les échantillons doit être également répétée.

B. Validation des résultats de l'échantillon

Les signaux de fluorescence émis par les sondes des gènes cibles (« g16 », « g18 » et « HR ») et par la sonde du contrôle interne (« IC ») endogène dans les réactions d'amplification de l'échantillon sont analysés automatiquement et interprétés par le logiciel de l'instrument avec les paramètres inclus dans le protocole de test HR-HPV ELITe_CS_200_100.

Remarque : avant d'analyser un échantillon, vérifier que les contrôles d'amplification ont été analysés avec le lot de réactifs d'amplification à utiliser, et que les résultats sont approuvés et valides. La disponibilité des résultats du contrôle d'amplification dont le statut est « Approuvé » (Approved) est indiquée dans la fenêtre « Contrôles » (Controls) de la GUI. Si les résultats du contrôle d'amplification sont manquants, les générer comme décrit ci-dessus.

Les résultats sont présentés dans les rapports générés par l'instrument (« Affichage des résultats » [Results Display]).

L'analyse de l'échantillon peut être approuvée lorsque les deux conditions indiquées dans le tableau ci-dessous sont satisfaites.

1) Contrôle positif	Statut
HR-HPV Positive Control	APPROUVÉ
2) Contrôle négatif	Statut
HR-HPV Negative Control	APPROUVÉ

Pour chaque échantillon, le résultat du test est automatiquement interprété par le système tel qu'établi par l'algorithme du **logiciel ELITe® InGenius** et les paramètres du protocole de test.

Les messages des résultats possibles d'un échantillon sont répertoriés dans le tableau ci-dessous. Pour chaque échantillon, le système génère une combinaison des messages suivants afin de spécifier si les ADN de l'agent pathogène sont détectés ou non détectés.

Résultat de l'analyse de l'échantillon	Interprétation
g16 : ADN détecté (g16: DNA Detected).	L'ADN du HPV16 a été détecté dans l'échantillon.
g18 : ADN détecté (g18: DNA Detected).	L'ADN du HPV18 a été détecté dans l'échantillon.
HR : ADN détecté (HR: DNA Detected).	L'ADN du HR-HPV a été détecté dans l'échantillon.
g16 : ADN non détecté ou inférieur à la LoD (g16: DNA Not Detected or below the LoD).	L'ADN du HPV16 n'a pas été détecté dans l'échantillon. L'échantillon est valide et négatif pour cet agent pathogène ou sa concentration est inférieure à la limite de détection du test.
g18 : ADN non détecté ou inférieur à la LoD (g18: DNA Not Detected or below the LoD).	L'ADN du HPV18 n'a pas été détecté dans l'échantillon. L'échantillon est valide et négatif pour cet agent pathogène ou sa concentration est inférieure à la limite de détection du test.
HR : ADN non détecté ou inférieur à la LoD (HR: DNA Not Detected or below the LoD).	L'ADN du HR-HPV n'a pas été détecté dans l'échantillon. L'échantillon est valide et négatif pour cet agent pathogène ou sa concentration est inférieure à la limite de détection du test.
Non valide - Tester à nouveau l'échantillon (Invalid - Retest Sample).	Résultat de test non valide en raison d'un échec du contrôle interne dû à une extraction incorrecte, une contamination par des inhibiteurs (ou à une erreur d'échantillonnage en cas d'utilisation d'un contrôle interne endogène). Le test doit être répété.

Les échantillons rapportés comme « Non valide - Tester à nouveau l'échantillon » (Invalid - Retest Sample) par le logiciel ELITe InGenius ne sont pas appropriés pour l'interprétation des résultats. Dans ce cas, l'ADN du contrôle interne n'a pas été efficacement détecté en raison de problèmes lors de l'étape d'amplification ou d'extraction (dégradation d'ADN, perte d'ADN pendant l'extraction ou contamination par des inhibiteurs dans l'éluat), ce qui peut générer des résultats incorrects.

Remarque : si le contrôle interne endogène est utilisé avec des échantillons cervicaux, tenir compte du fait que le nombre de cellules dans l'échantillon pourrait être insuffisant en raison d'un échantillonnage incorrect.

Lorsque le volume d'éluat est suffisant, l'échantillon extrait peut être à nouveau testé par une analyse d'amplification en mode « PCR uniquement » (PCR Only). Si le deuxième résultat est non valide, l'échantillon doit être à nouveau testé en procédant à l'extraction d'une nouvelle aliquote à l'aide du mode « Extraction + PCR » (Extract + PCR).

Les échantillons rapportés comme « g16 : ADN non détecté ou inférieur à la LoD (g16: DNA Not Detected or below the LoD), « g18 : ADN non détecté ou inférieur à la LoD » (g18: DNA Not Detected or below the LoD) et « HR-HPV : ADN non détecté ou inférieur à la LoD » (HR-HPV: DNA Not Detected or below the LoD) sont appropriés pour l'analyse mais il n'a pas été possible de détecter l'ADN des cibles. Dans ce cas, il n'est pas possible d'exclure le fait que l'ADN des cibles soit présent à une concentration inférieure à la limite de détection du test (se reporter à la section « Caractéristiques de performance »).

Remarque : les résultats obtenus avec ce test doivent être interprétés en tenant compte de l'ensemble des données cliniques et des autres résultats d'analyse de laboratoire du patient.

Les résultats de l'analyse des échantillons sont stockés dans la base de données et, s'ils sont valides, peuvent être approuvés (Affichage des résultats [Result Display]) par du personnel qualifié disposant des privilèges « Administrateur » (Administrator) ou « Analyste » (Analyst) en suivant les instructions de la GUI. Dans la fenêtre « Affichage des résultats » (Result Display), il est possible d'imprimer et d'enregistrer les résultats de l'analyse de l'échantillon sous forme de « Rapport échantillons » (Sample Report) et « Rapport des positions » (Track Report).

C. Rapport des résultats de l'échantillon

Les résultats de l'échantillon sont stockés dans la base de données et peuvent être exportés sous forme de « Rapport échantillons » (Sample Report) et « Rapport des positions » (Track Report).

Le « Rapport échantillons » (Sample Report) présente les détails d'une session de travail triés par échantillon sélectionné (SID).

Le « Rapport des positions » (Track Report) présente les détails d'une session de travail triés par position sélectionnée.

Le « Rapport échantillons » (Sample Report) et « Rapport des positions » (Track Report) peuvent être imprimés et signés par le personnel agréé.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Limite de détection (LoD)

La sensibilité analytique de ce test, en tant que limite de détection, permet de détecter la présence d'environ 10 copies dans 5 µl d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La sensibilité analytique de ce test, en tant que limite de détection, a été testée en utilisant un ADN plasmidique contenant le produit d'amplification à différentes concentrations.

Répétabilité

La répétabilité de ce test, en tant qu'imprécision intra-analyse, utilisé en association avec le système ELITe InGenius, a été évaluée en analysant 3 réplicats du contrôle positif, testés au moyen d'un processus de PCR lors d'une même session d'analyse (1 analyse/instrument, avec un échantillon en trois réplicats/analyse). Le test a été effectué sur quatre instruments différents.

Les valeurs Ct de chaque cible ont été utilisées pour calculer le % CV afin d'évaluer la répétabilité en tant qu'imprécision intra-analyse et inter-analyses.

Un résumé des résultats est présenté dans les tableaux ci-dessous.

Répétabilité intra-analyse										
Échantillon	Session	Cible g16			Cible g18			Cible HR		
		Ct moyen	EC	% CV	Ct moyen	EC	% CV	Ct moyen	EC	% CV
PC	Instrument 1	19,83	0,11	0,53	20,61	0,21	1,01	21,66	0,08	0,37
PC	Instrument 2	19,15	0,03	0,16	20,14	0,05	0,26	20,96	0,05	0,23
PC	Instrument 3	19,25	0,08	0,40	20,58	0,02	0,10	21,20	0,05	0,24
PC	Instrument 4	20,02	0,13	0,63	21,72	0,23	1,04	22,26	0,18	0,81

La répétabilité de ce test, en tant que % CV intra-analyse, n'a pas dépassé 2 % pour toutes les cibles.

La répétabilité de ce test, en tant qu'imprécision inter-analyses, en association avec le système ELITe InGenius, a été évaluée en analysant 3 réplicats du contrôle positif, testés au moyen d'un processus de PCR par le même opérateur, avec le même lot de réactifs, sur le même instrument, dans le même environnement et sur deux jours différents (1 analyse/jour pendant 2 jours avec un échantillon en trois réplicats/analyse). Le test a été effectué dans deux laboratoires différents.

Les valeurs Ct de chaque cible ont été utilisées pour calculer le % CV afin d'évaluer la répétabilité en tant qu'imprécision intra-analyse et inter-analyses.

Un résumé des résultats est présenté dans les tableaux ci-dessous.

Répétabilité inter-analyses										
Échantillon	Session	Cible g16			Cible g18			Cible HR		
		Ct moyen	EC	% CV	Ct moyen	EC	% CV	Ct moyen	EC	% CV
PC	analyse 1 + analyse 2	19,49	0,38	1,94	20,38	0,29	1,43	21,31	0,39	1,81
PC	analyse 3 + analyse 4	19,91	0,22	1,10	21,56	0,25	1,15	22,24	0,20	0,88

La répétabilité de ce test, en tant que % CV inter-analyses, n'a pas dépassé 2 % pour toutes les cibles.

Reproductibilité

La reproductibilité de ce test, en tant que variabilité inter-instruments, utilisé en association avec le système ELITe InGenius, a été évaluée en analysant 6 réplicats du contrôle positif, testés au moyen d'un processus de PCR avec le même lot de réactifs, différents opérateurs, dans deux laboratoires différents, sur différents jours et avec deux instruments différents (2 analyses/instrument pour 2 instruments, avec un échantillon en 3 réplicats/analyse).

Les valeurs Ct de chaque cible ont été utilisées pour calculer le % CV afin d'évaluer la reproductibilité en tant qu'imprécision inter-instruments.

Un résumé des résultats est présenté dans les tableaux ci-dessous.

Reproductibilité inter-instruments									
Échantillon	Cible g16			Cible g18			Cible HR		
	Ct moyen	EC	% CV	Ct moyen	EC	% CV	Ct moyen	EC	% CV
PC	19,85	0,17	0,84	20,99	0,55	2,62	21,82	0,33	1,49

La reproductibilité de ce test, en tant que % CV inter-instruments, n'a pas dépassé 3 % pour toutes les cibles.

Spécificité diagnostique : confirmation des échantillons négatifs

La spécificité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons cliniques négatifs, a été évaluée en analysant :

- 143 échantillons cervicaux qui étaient négatifs pour le HPV16,
- 151 échantillons cervicaux qui étaient négatifs pour le HPV18,
- 92 échantillons cervicaux qui étaient négatifs pour le HR-HPV.

Les échantillons, qui ont été préalablement testés par une amplification en temps réel certifiée par le MFDS (Ministry of Food and Drug Safety) (OmniPlex-HPV, Genematrix, Corée), ont été analysés à l'aide du test en association avec le système ELITe InGenius en mode « Extraction + PCR » (Extract + PCR).

Les résultats, après résolution des échantillons non valides et discordants, sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs	non valides
échantillons cervicaux négatifs pour le HPV16	143	0	143	0
échantillons cervicaux négatifs pour le HPV18	151	0	151	0
échantillons cervicaux négatifs pour le HR-HPV	92	1	91	0

Dans ce test, un échantillon cervical a généré un résultat positif discordant. Ce résultat peut être expliqué par le faible titre de l'agent pathogène qui pourrait être inférieur à la LoD de la méthode de référence.

Dans ce test, la spécificité diagnostique était de 100 % pour le HPV16, 100 % pour le HPV18 et 98,9 % pour le HR-HPV.

La valeur seuil du contrôle interne Ct (IC Ct) est fixée à 35 pour chaque matrice validée.

Sensibilité diagnostique : confirmation des échantillons positifs

La sensibilité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons cliniques positifs, a été évaluée en analysant :

- 29 échantillons cervicaux qui étaient positifs pour le HPV16,
- 21 échantillons cervicaux qui étaient positifs pour le HPV18,
- 76 échantillons cervicaux qui étaient positifs pour le HR-HPV.

Les échantillons, qui ont été préalablement testés par une amplification en temps réel certifiée par le MFDS (Ministry of Food and Drug Safety) (OmniPlex-HPV, Genematrix, Corée), ont été analysés à l'aide du test en association avec le système ELITe InGenius en mode « Extraction + PCR » (Extract + PCR).

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs	non valides
échantillons cervicaux positifs pour le HPV16	29	29	0	0
échantillons cervicaux positifs pour le HPV18	21	21	0	0
échantillons cervicaux positifs pour le HR-HPV	76	76	0	0

Dans ces tests, la sensibilité diagnostique était de 100 % pour toutes les cibles.

7500, 7500 Fast Real-Time PCR System CFX96™ Real-Time PCR Detection System–IVD

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES

Échantillons

Ce produit doit être utilisé avec les échantillons cliniques suivants :

Échantillons cervicaux

Les échantillons cervicaux pour l'extraction de l'ADN doivent être prélevés dans un milieu UTM et les cellules des échantillons cervicaux prélevés dans un milieu UTM être identifiés conformément aux directives du laboratoire, puis transportés et conservés à température ambiante (+18/+25 °C) pendant deux jours au maximum ou à +2/+8 °C pendant deux jours au maximum.

Les échantillons cervicaux prélevés à l'écouvillon peuvent être congelés et conservés à -20 °C pendant deux mois au maximum ou à -70 °C pendant deux ans au maximum. Éviter les cycles de congélation/décongélation. La congélation risque de provoquer une précipitation d'inhibiteurs, une lyse cellulaire et une dégradation de l'acide nucléique de l'agent pathogène.

Remarque : en cas d'extraction de l'ADN des échantillons cervicaux à l'aide du **QIAamp DNA Mini Kit**, suivre le mode d'emploi correspondant.

Substances interférentes

Les données disponibles relatives à l'inhibition provoquée par les médicaments et d'autres substances sont indiquées au paragraphe « Substances interférentes » du chapitre « Caractéristiques de performance ».

Contrôles d'amplification

Il est absolument indispensable de valider chaque session d'amplification avec une réaction de contrôle négatif et une réaction de contrôle positif.

- à titre de contrôle positif d'amplification, utiliser le réactif **HR-HPV Positive Control** (fourni avec ce kit).
- à titre de contrôle négatif d'amplification, utiliser de l'eau de qualité biologique moléculaire (non fournie dans ce kit).

Contrôles de qualité

Il est recommandé de valider la procédure d'analyse complète de chaque session d'extraction et d'amplification en analysant un échantillon testé négatif et un échantillon testé positif ou un matériel de référence étalonné.

PROCÉDURE

Paramétrage de la session d'amplification en temps réel

(À effectuer dans la zone dédiée à l'amplification/la détection des produits d'amplification)

Avec un instrument **7500 ou 7500 Fast Real-Time PCR System**:

- Avant de commencer la session, en se reportant à la documentation de l'instrument, il est nécessaire de :
- mettre le thermocycleur en temps réel en marche, puis l'ordinateur, et lancer le logiciel dédié ;
 - paramétrer (à l'aide du « Gestionnaire de détecteur » [Detector Manager]) : le « détecteur » (détecteur) pour la sonde *g16* avec le « rapporteur » (reporter) = « FAM » et le « désactivateur » (quencher) = « aucun » (none) (non fluorescent) et le nommer « g16 » ;
 - paramétrer (à l'aide du « Gestionnaire de détecteur » [Detector Manager]) : le « détecteur » (détecteur) pour la sonde *g18* avec le « rapporteur » (reporter) = « JOE » et le « désactivateur » (quencher) = « aucun » (none) (non fluorescent) et le nommer « g18 » ;
 - paramétrer (à l'aide du « Gestionnaire de détecteur » [Detector Manager]) : le « détecteur » (détecteur) pour la sonde *HR* avec le « rapporteur » (reporter) = « Texas Red » et le « désactivateur » (quencher) = « aucun » (none) (non fluorescent) et le nommer « HR » ;
 - paramétrer (à l'aide du « Gestionnaire de détecteur » [Detector Manager]) : le « détecteur » (détecteur) pour la sonde du contrôle interne avec le « rapporteur » (reporter) = « Cy5 » et le « désactivateur » (quencher) = « aucun » (none) (non fluorescent) et le nommer « IC ».

Avec un instrument CFX96™ Real-Time PCR Detection System–IVD:

Avant de commencer la session, en se reportant à la documentation de l'instrument, il est nécessaire de :

- mettre le thermocycleur en temps réel en marche, puis l'ordinateur, et lancer le logiciel dédié ;
- paramétrer (à l'aide du « Gestionnaire de détecteur » [Detector Manager]) : le « détecteur » (detector) pour la sonde *g16* avec le « rapporteur » (reporter) = « FAM » et le nommer « g16 » ;
- paramétrer (à l'aide du « Gestionnaire de détecteur » [Detector Manager]) : le « détecteur » (detector) pour la sonde *g18* avec le « rapporteur » (reporter) = « HEX » et le nommer « g18 » ;
- paramétrer (à l'aide du « Gestionnaire de détecteur » [Detector Manager]) : le « détecteur » (detector) pour la sonde *HR* avec le « rapporteur » (reporter) = « Cal Fluor Red 610 » et le nommer « HR » ;
- paramétrer (à l'aide du « Gestionnaire de détecteur » [Detector Manager]) : le « détecteur » (detector) pour la sonde du contrôle interne avec le « rapporteur » (reporter) = « Quasar 670 » et le nommer « IC ».

Ajouter ces informations à la **Fiche de travail** (Work Sheet) jointe à la fin du présent manuel ou imprimer la configuration de la microplaque. La **Fiche de travail** (Work Sheet) doit être scrupuleusement suivie pendant le transfert du mélange réactionnel complet et des échantillons dans les puits.

Le paramétrage de l'analyse qualitative de 12 échantillons est présenté ci-dessous à titre d'exemple.

S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
NC	PC										

Légende : S1 - S12 : échantillons à analyser ; NC : contrôle négatif d'amplification ; PC : contrôle positif d'amplification.

En se reportant à la documentation de l'instrument, définir les paramètres du **cycle thermique** sur le logiciel dédié (Instrument > Protocole du thermocycleur [Thermal Cycler Protocol] > Profil thermique [Thermal Profile]) :

- à l'étape d'amplification, ajouter l'étape (Ajouter étape [Add Step]) d'**élongation à 72 °C** ;

Cycle thermique				
Étape	Températures	Temps	Cycle	
1	Réaction UDG	50 °C	2 min.	1 cycle
2	Pré-dénaturation	95 °C	10 min.	1 cycle
3	Dénaturation	95 °C	15 s	45 cycles
	Annelage	54 °C	60 s	
	Élongation*	72 °C	30 s	

* réglage des instruments : pour 7500, 7500 Fast- sélectionner ON pour la collecte des données
Pour CFX- sélectionner 'Add plate Read to Step'

Paramétrage de l'amplification

(À effectuer dans la zone dédiée à l'extraction/la préparation de la réaction d'amplification)

Avant de commencer la session, il est nécessaire de :

- sortir et décongeler les tubes à essai contenant les échantillons à analyser. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ;

- sortir et décongeler à température ambiante les tubes contenant le mélange **HR-HPV Reaction Mix** requis pour la session d'analyse, en se rappelant que le contenu de chaque tube est suffisant pour préparer **32 réactions**. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis procéder au test immédiatement ;

- sortir et décongeler à température ambiante les tubes contenant le mélange **HR-HPV Probe Mix** requis pour la session d'analyse, en se rappelant que le contenu de chaque tube est suffisant pour préparer **32 réactions**. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis procéder au test immédiatement ;

- sortir et décongeler à température ambiante le tube contenant le **HR-HPV Positive Control**. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis procéder au test immédiatement ;

- se munir de la **microplaque d'amplification** qui sera utilisée pendant la session d'analyse, en veillant à la manipuler avec des gants non poudrés et à ne pas endommager les puits.

- se munir de la **feuille de scellage d'amplification** qui sera utilisée pendant la session d'analyse, en veillant à la manipuler avec des gants non poudrés et à ne pas l'endommager,

- préparer un tube en polypropylène de 2 ml contenant de l'eau pour biologie moléculaire (non incluse dans ce produit) pour le mélange réactionnel complet **HR-HPV PCR Mix** et le marquer de manière reconnaissable avec un marqueur permanent,

- calculer les volumes des deux composants inclus dans le kit, qui sont nécessaires à la préparation du mélange réactionnel complet **HR-HPV PCR Mix**, sur la base du nombre d'échantillons à analyser, comme décrit dans le tableau suivant.

Remarque : pour calculer les volumes des deux composants, il est nécessaire de définir le nombre de réactions (N) de la session d'analyse en comptant le nombre d'échantillons à tester, un contrôle positif et un contrôle négatif plus au moins une réaction supplémentaire (marge de sécurité).

Nombre d'échantillons (N)	HR-HPV Reaction Mix	HR-HPV Probe Mix
N	(N + 1) x 12,5 µl	(N + 1) x 7,5 µl

- préparer le mélange réactionnel complet **HR-HPV PCR Mix** en ajoutant au tube dédié les volumes calculés des deux composants.

- mélanger par pipetage sans introduire de bulles ;

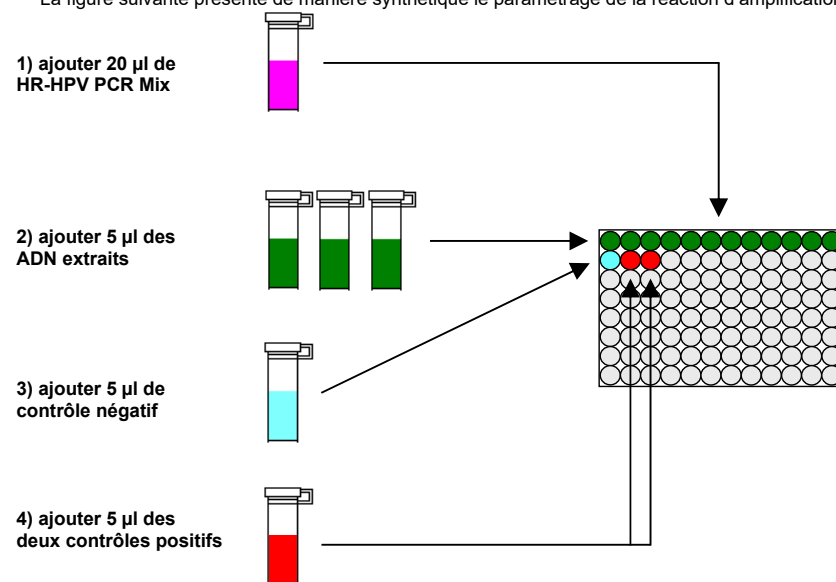
Paramétrer les réactions comme décrit ci-dessus :

1. Pipeter avec précision **20 µl** de mélange **HR-HPV PCR Mix** au fond des puits de la **microplaque d'amplification**, comme précédemment établi dans la **Fiche de travail** (Work Sheet). Éviter d'introduire des bulles.
2. En le déposant dans le mélange réactionnel, pipeter avec précision **5 µl** de l'**ADN extrait** du premier échantillon dans le puits correspondant de la **microplaque d'amplification**, comme précédemment établi dans la **Fiche de travail** (Work Sheet). Bien mélanger l'échantillon en pipetant l'**ADN extrait** à trois reprises dans le mélange réactionnel. Éviter d'introduire des bulles. Procéder de la même manière avec les autres échantillons d'**ADN extrait**.
3. En le déposant dans le mélange réactionnel, pipeter avec précision **5 µl** d'**eau de qualité biologie moléculaire** (non incluse dans le produit) dans le puits de la **microplaque d'amplification** destiné au contrôle négatif d'amplification, comme précédemment établi dans la **Fiche de travail** (Work Sheet). Bien mélanger le contrôle négatif en pipetant l'**eau de qualité biologie moléculaire** à trois reprises dans le mélange réactionnel. Éviter d'introduire des bulles.
4. En le déposant dans le mélange réactionnel, pipeter avec précision **5 µl** de **HR-HPV Positive Control** dans le puits correspondant de la **microplaque d'amplification**, comme précédemment établi dans la **Fiche de travail** (Work Sheet). Bien mélanger le contrôle positif en pipetant le **HR-HPV Positive Control** à trois reprises dans le mélange réactionnel. Éviter d'introduire des bulles.
5. Sceller avec précision la **microplaque d'amplification** à l'aide de la **feuille de scellage d'amplification**.

6. Transférer la **microplaque d'amplification** dans le thermocycleur en temps réel placé dans la zone d'amplification/de détection des produits d'amplification, et lancer le cycle thermique d'amplification en enregistrant les paramètres de la session d'analyse avec un nom de fichier univoque et reconnaissable.

Remarque : à la fin du cycle thermique, la **microplaque d'amplification** contenant les produits de la réaction doit être retirée de l'instrument et mise au rebut en évitant toute contamination environnementale. Afin d'éviter de renverser les produits de la réaction, la **feuille de scellage d'amplification ne doit pas être retirée de la microplaque d'amplification**.

La figure suivante présente de manière synthétique le paramétrage de la réaction d'amplification.



Analyse qualitative des résultats

Les valeurs enregistrées de la fluorescence émise par les sondes des cibles spécifiques (« g16 », « g18 », « HR ») et par la sonde du contrôle interne spécifique (« IC ») dans les réactions d'amplification doivent être analysées par le logiciel de l'instrument.

Remarque : l'analyse des données est réalisée avec le logiciel système de l'instrument, et selon les instructions du fabricant.

Avant de commencer l'analyse, paramétrer la valeur seuil et la valeur de référence de la manière suivante. Les valeurs de la fluorescence émise par les sondes spécifiques dans la réaction d'amplification et la valeur **Seuil** (Threshold) de la fluorescence permettent de déterminer le **Cycle seuil (Ct)**, (Threshold Cycle [Ct]), le cycle pendant lequel la fluorescence atteint la valeur **Seuil** (Threshold).

Avec un **7500, 7500Fast Real-Time PCR System** :

Cible	Paramétrage de la valeur seuil	Valeur de référence	
		Début	Fin
HPV Type 16	20 000	3	15
HPV Type 18	20 000	3	15
HPV à haut risque	20 000	10	15
IC	10 000	3	15

Avec un **système de détection par PCR en temps réel CFX96™-DIV** :

Cible	Paramétrage de la valeur seuil	Valeur de référence	
		Début	Fin
HPV Type 16	300	3	15
HPV Type 18	300	3	15
HPV à haut risque	300	10	15
IC	100	3	15

Contrôle positif

Dans les réactions d'amplification du HR-HPV Positive Control, les valeurs Ct sont utilisées pour valider l'amplification et la détection, comme décrit dans le tableau suivant :

Réaction du HR-HPV Positive Control détecteur FAM « g16 »	Résultat de l'analyse	Amplification/Détection
22 ± 3	POSITIF	CORRECTE

Réaction du HR-HPV Positive Control détecteur JOE « g18 »	Résultat de l'analyse	Amplification/Détection
22 ± 3	POSITIF	CORRECTE

Réaction du HR-HPV Positive Control détecteur Texas Red « HR »	Résultat de l'analyse	Amplification/Détection
22 ± 3	POSITIF	CORRECTE

Réaction du HR-HPV Positive Control détecteur Cy5 « HR »	Résultat de l'analyse	Amplification/Détection
*U.D ou N/A	-	CORRECTE

Si le résultat de la réaction d'amplification du **contrôle positif** est **Ct valeurs dépassent les fourchettes standard** ou **Ct indéterminé**, l'ADN cible n'a pas été correctement détecté. Cela signifie que des problèmes sont survenus pendant l'étape d'amplification ou de détection (distribution incorrecte du mélange réactionnel ou des contrôles positifs, dégradation du mélange réactionnel ou des contrôles positifs, paramétrage incorrect de la position du contrôle positif, paramétrage incorrect du cycle thermique), ce qui peut générer des résultats incorrects. La session d'analyse n'est pas valide et doit être répétée en commençant par l'étape d'amplification.

Contrôle négatif

Dans la réaction d'amplification du contrôle négatif, la valeur Ct du HR-HPV est utilisée pour valider l'amplification et la détection, comme décrit dans le tableau suivant :

Réaction du HR-HPV Negative Control détecteur FAM « g16 »	Résultat de l'analyse	Amplification/Détection
*U.D ou N/A	NÉGATIF	CORRECTE

Réaction du HR-HPV Negative Control détecteur JOE « g18 »	Résultat de l'analyse	Amplification/Détection
*U.D ou N/A	NÉGATIF	CORRECTE

Réaction du HR-HPV Negative Control détecteur Texas Red « HR »	Résultat de l'analyse	Amplification/Détection
*U.D ou N/A	NÉGATIF	CORRECTE

Réaction du HR-HPV Positive Control détecteur Cy5 « HR »	Résultat de l'analyse	Amplification/Détection
*U.D ou N/A	-	CORRECTE

L'utilisation du **contrôle négatif** est recommandée à l'étape d'isolement de l'ADN pour valider la procédure. L'intégralité du signal ne devrait pas être détecté.

Remarque : si le résultat de l'amplification du contrôle négatif est différent de « U.D ou N/A », cela signifie que des problèmes sont survenus pendant l'amplification. La session d'analyse n'est pas valide et doit être répétée en commençant par l'étape d'amplification.

Échantillons

Les résultats, en tant que valeur Ct des réactions d'amplification de chaque **échantillon**, sont utilisés comme décrit dans le tableau suivant :

N°	Valeur Ct				Positif ou Négatif				Résultats
	g16	g18	HR	IC	g16	g18	HR	IC	
1	≤ 45	≤ 45	≤ 45	≤ 35	+	+	+	+	Positif pour g16, g18 et HR
2	≤ 45	≤ 45	≤ 45	*U.D ou N/A	+	+	+	-	**Positif pour g16, g18 et HR
3	≤ 45	≤ 45	U.D ou N/A	≤ 35	+	+	-	+	Positif pour g16 et g18
4	≤ 45	≤ 45	U.D ou N/A	U.D ou N/A	+	+	-	-	Positif pour g16 et g18
5	≤ 45	U.D ou N/A	≤ 45	≤ 35	+	-	+	+	Positif pour g16 et HR
6	≤ 45	U.D ou N/A	≤ 45	U.D ou N/A	+	-	+	-	Positif pour g16 et HR
7	≤ 45	U.D ou N/A	U.D ou N/A	≤ 35	+	-	-	+	Positif pour g16
8	≤ 45	U.D ou N/A	U.D ou N/A	U.D ou N/A	+	-	-	-	Positif pour g16
9	U.D ou N/A	≤ 45	≤ 45	≤ 35	-	+	+	+	Positif pour g18 et HR
10	U.D ou N/A	≤ 45	≤ 45	U.D ou N/A	-	+	+	-	Positif pour g18 et HR
11	U.D ou N/A	≤ 45	U.D ou N/A	≤ 35	-	+	-	+	Positif pour g18
12	U.D ou N/A	≤ 45	U.D ou N/A	U.D ou N/A	-	+	-	-	Positif pour g18
13	U.D ou N/A	U.D ou N/A	≤ 45	≤ 35	-	-	+	+	Positif pour HR
14	U.D ou N/A	U.D ou N/A	≤ 45	U.D ou N/A	-	-	+	-	Positif pour HR
15	U.D ou N/A	U.D ou N/A	U.D ou N/A	≤ 39	-	-	-	+	Négatif
16	U.D ou N/A	U.D ou N/A	U.D ou N/A	U.D ou N/A	-	-	-	-	***Non valide

Remarque :

*U.D : Indéterminé

N/A : Non applicable

** Lorsque l'ADN cible est détecté dans une réaction d'amplification d'échantillon, le contrôle interne (IC) peut générer le résultat en tant que Ct Non applicable (N/A). En fait, la réaction d'amplification de faible efficacité du contrôle interne peut être déplacée par compétition avec la réaction d'amplification hautement efficace du gène cible. Dans ce cas, l'échantillon reste néanmoins adéquat et le résultat positif du test est valide.

*** Cela signifie que des problèmes qui peuvent générer des résultats incorrects sont survenus. Le test n'est pas valide et doit être répété.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Sensibilité analytique : limite de détection

La sensibilité analytique de ce test, en tant que limite de détection, permet de détecter la présence d'environ 10 copies dans 5 µl d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La sensibilité analytique de ce test, en tant que limite de détection, a été testée en utilisant un ADN plasmidique contenant le produit d'amplification à différentes concentrations.

Spécificité analytique : réactivité croisée

Un total de 80 souches de micro-organismes de référence (bactéries, levure, virus, etc.), qui ne présentent aucun problème avec les cibles de détection des kits, a été utilisé pour évaluer la réactivité croisée de ce test. Tous les échantillons étaient négatifs avec le test.

Interférence

Le potentiel d'interférence de ce test a été évalué avec des substances qui peuvent être présentes dans des échantillons cervicaux (érythrocytes, lubrifiant vaginal, lavement, gelée contraceptive, crème antifongique, spermicide, mucus). Les substances potentielles ont été dopées dans un échantillon clinique. Aucune interférence avec les performances de ce test n'a été observée en présence des substances.

Sensibilité et spécificité diagnostiques

La sensibilité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons cliniques positifs, et la spécificité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons négatifs, ont été testées en analysant un total de 265 échantillons cliniques dont les résultats étaient connus (105 échantillons positifs et 160 échantillons négatifs).

Tous les échantillons positifs pour le type HR-HPV ont été confirmés comme positifs et tous les échantillons négatifs ont été confirmés comme négatifs.

Reproductibilité

La reproductibilité de ce test a été testée pour les différentes conditions suivantes : lots, opérateurs, dates d'utilisation et lieux d'utilisation.

14 types d'ADN de référence ont été testés selon les conditions ci-dessus. Il a été déterminé que les résultats des tests répondaient aux critères d'acceptation.

Répétabilité

Afin d'évaluer la précision de ce test, les résultats obtenus avec plusieurs réplicats du même échantillon d'ADN de référence ont été analysés. Tous les résultats obtenus étaient positifs à 100 %.

BIBLIOGRAPHIE

Anco Molijn, Bernhard Kleter, Wim Quint, Leen-Jan van Doorn (2005) *Journal of Clinical Virology* 32S S43–S51, Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections.

Tibor Takács, Csaba Jeney, Laura Kovács, Johanna Mőzes, Márta Benczik, Attila Sebe. (2008) *Journal of Virological Methods* 149 153–162, Molecular beacon-based real-time PCR method for detection of 15 high-risk and 5 low-risk HPV types.

P. E. Gravitt, C. L. Peyton, T. Q. Alessi, C. M. Wheeler, F. Coutlée, A. Hildesheim, M. H. Schiffman, D. R. Scott, and R. J. Apple (Jan. 2000) *Journal of Clinical Microbiology*, p. 357–361, Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses

Nicholas R Herrel, Nadia L Johnson, Jennifer E Cameron, Janet Leigh and Michael E Hagensee (2009) *Virology Journal*, 6:90, Development and Validation of a HPV-32 Specific PCR Assay

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Utiliser ce produit uniquement avec des échantillons cliniques cervicaux collectés en milieu UTM et des cellules d'échantillons cervicaux collectés en milieu UTM.

Ne pas utiliser ce produit avec des échantillons contenant de la mucine à une concentration élevée : la mucine inhibe la réaction d'amplification des acides nucléiques et peut générer des résultats non valides.

Les résultats obtenus avec ce produit dépendent de l'identification, du prélèvement, du transport, de la conservation et du traitement corrects des échantillons. Afin d'éviter tout résultat incorrect, il est par conséquent nécessaire de prendre des précautions particulières pendant ces étapes et de suivre scrupuleusement le mode d'emploi fourni avec les produits pour l'extraction des acides nucléiques.

La méthode d'amplification en temps réel utilisée dans ce produit présente une sensibilité analytique élevée qui la rend sensible aux contaminations croisées par les échantillons positifs, les contrôles positifs et les produits d'amplification eux-mêmes. Les contaminations croisées peuvent générer des résultats faux-positifs. Le format du produit est capable de limiter les contaminations croisées. Toutefois, les contaminations croisées ne peuvent être évitées qu'en respectant les bonnes pratiques de laboratoire et en suivant le présent mode d'emploi.

Ce produit doit être manipulé par du personnel qualifié et dûment formé au traitement des échantillons biologiques potentiellement infectieux et des préparations chimiques classifiées comme dangereuses, afin de prévenir les accidents pouvant avoir des conséquences potentiellement graves pour l'utilisateur et les autres personnes.

Ce produit exige de porter des vêtements de travail et de disposer de zones appropriées dédiées au traitement des échantillons biologiques potentiellement infectieux et des préparations chimiques classifiées comme dangereuses, afin de prévenir les accidents pouvant avoir des conséquences potentiellement graves pour l'utilisateur et les autres personnes.

Afin d'éviter des résultats incorrects, le produit doit être manipulé par du personnel qualifié formé aux techniques de biologie moléculaire telles que l'extraction, l'amplification et la détection d'acides nucléiques.

Il est nécessaire de disposer de zones distinctes pour l'extraction/la préparation des réactions d'amplification et l'amplification/la détection des produits d'amplification afin d'éviter d'obtenir des résultats faux-positifs.

Ce produit nécessite d'utiliser des vêtements et des instruments uniquement pour l'extraction/la préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification/la détection des produits d'amplification afin d'éviter d'obtenir des résultats faux-positifs.

En raison de différences intrinsèques entre les technologies, il est recommandé aux utilisateurs d'effectuer des études de corrélation des méthodes afin d'évaluer les différences de technologie avant d'envisager d'en utiliser une nouvelle.

Un résultat négatif obtenu avec ce produit signifie que l'ADN cible n'est pas détecté dans l'ADN extrait à partir de l'échantillon. Il n'est toutefois pas possible d'exclure le fait que l'ADN cible présente un titre plus faible que la limite de détection du produit (voir la section « Caractéristiques de performance »). Dans ce cas, le résultat pourrait être un faux-négatif.

En cas de co-infections, la sensibilité d'une cible peut être affectée par l'amplification d'une seconde cible. Les résultats obtenus avec ce produit peuvent parfois être non valides en raison d'un échec du contrôle interne. Dans ce cas, l'échantillon doit être testé à nouveau, en commençant par l'extraction, ce qui peut entraîner des retards d'obtention des résultats finaux.

D'éventuels polymorphismes au sein de la région de l'ADN cible couverte par les amorces et les sondes du produit peuvent affecter la détection de l'ADN cible.

Comme avec tout autre dispositif médical de diagnostic, les résultats obtenus avec ce produit doivent être interprétés en tenant compte de l'ensemble des données cliniques et des autres analyses de laboratoire effectuées chez le patient.

Comme avec tout autre dispositif médical de diagnostic, il existe un risque résiduel d'obtention de résultats non valides, faux-positifs et faux-négatifs avec ce produit. Ce risque résiduel ne peut pas être éliminé ni réduit par la suite. Dans certains cas, ce risque résiduel pourrait contribuer à prendre de mauvaises décisions, avec des effets potentiellement dangereux pour le patient.

PROBLÈMES ET SOLUTIONS

ADN cible non détecté dans les réactions du contrôle positif	
Causes possibles	Solutions
Distribution incorrecte dans les puits de la microplaque	Faire attention lors de la distribution des réactifs dans les puits de la microplaque et respecter la fiche de travail. Vérifier le volume du mélange réactionnel distribué. Vérifier le volume du contrôle positif distribué.
Paramétrage incorrect de la session sur le système ELITe InGenius	Vérifier la position du PCR Mix et du contrôle positif. Vérifier le volume du PCR Mix et du contrôle positif.
Dégradation de la sonde	Utiliser une nouvelle aliquote du mélange réactionnel.
Dégradation de l'étalon	Utiliser une nouvelle aliquote du contrôle positif.
Erreur de paramétrage de l'instrument	Vérifier le paramétrage des positions pour les réactions du contrôle positif sur l'instrument. Vérifier le paramétrage du cycle thermique sur l'instrument.

ADN cible détecté dans la réaction du contrôle négatif	
Causes possibles	Solutions
Distribution incorrecte dans les puits de la microplaque.	Éviter de renverser le contenu des tubes à essai d'échantillon. Toujours changer les cônes entre les échantillons. Faire attention lors de la distribution des échantillons, du contrôle négatif et du contrôle positif dans les puits de la microplaque, et respecter la fiche de travail.
Paramétrage incorrect de la session sur le système ELITe InGenius.	Vérifier la position du PCR Mix et du contrôle négatif. Vérifier le volume du PCR Mix et du contrôle négatif.
Erreur lors du réglage de l'instrument.	Vérifier le paramétrage des positions des échantillons, du contrôle négatif et du contrôle positif sur l'instrument.
Microplaque mal scellée.	Faire attention lors du scellage de la microplaque.
Contamination de l'eau stérile doublement distillée.	Utiliser une nouvelle aliquote d'eau stérile.
Contamination du mélange réactionnel.	Utiliser une nouvelle aliquote du mélange réactionnel.
Contamination de la zone d'extraction/de préparation des réactions d'amplification.	Nettoyer les surfaces et les instruments avec des détergents aqueux, laver les blouses de laboratoire, remplacer les tubes à essai et les cônes utilisés.

Fluorescence de bruit de fond irrégulière ou élevée dans les réactions	
Causes possibles	Solutions
Distribution incorrecte de l'échantillon.	Veiller à bien mélanger les échantillons, le contrôle négatif et le contrôle positif avec le mélange réactionnel en pipetant à trois reprises. Éviter d'introduire des bulles.
Erreur de paramétrage de la référence.	Paramétrer la plage de calcul de la référence dans les cycles au cours desquels la fluorescence de bruit de fond s'est déjà stabilisée (vérifier les données « Résultats » [Results], « Composant » [Component]) et dans lesquels la fluorescence du signal n'a pas encore commencé à augmenter. Utiliser le calcul automatique de la référence en activant l'option « Référence auto » (Auto Baseline).

Réaction de l'échantillon non valide	
Causes possibles	Solutions
Paramétrage incorrect de la session sur le système ELITe InGenius	Vérifier la position du PCR Mix et de l'échantillon. Vérifier le volume du PCR Mix et de l'échantillon.
Dégradation du contrôle interne.	Utiliser de nouvelles aliquotes du contrôle interne.
Inhibition due à des substances interférentes dans l'échantillon.	Répéter l'amplification avec une dilution à 1:2 de l'échantillon élué dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, lors d'une session « PCR uniquement » (PCR Only). Répéter l'extraction avec une dilution à 1:2 de l'échantillon dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, au cours d'une session « Extraction + PCR » (Extract + PCR).
Dégradation du PCR Mix.	Utiliser une nouvelle aliquote du PCR Mix.
Erreur de l'instrument.	Contacteur le service technique d'ELITechGroup.

Erreur 30103 sur le système ELITe InGenius	
Causes possibles	Solutions
Concentration trop élevée de la cible dans l'échantillon.	En cas d'observation d'une amplification significative sur la courbe de PCR : - sélectionner la position associée à l'échantillon et approuver manuellement le résultat. Si une valeur Ct est requise : - répéter l'amplification avec une dilution à 1:10 de l'échantillon élué dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, lors d'une session « PCR uniquement » (PCR Only) ou - répéter l'extraction avec une dilution à 1:10 de l'échantillon, dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, au cours d'une session « Extraction + PCR » (Extract + PCR).

LÉGENDE DES SYMBOLES

REF

Numéro de référence.



Limite supérieure de température.

LOT

Code de lot.



Date de péremption (dernier jour du mois).

IVD

Dispositif médical de diagnostic *in vitro*.



Conforme aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*.



Contenu suffisant pour « N » tests.



Attention, consulter le mode d'emploi.

CONT

Contenu.



Tenir à l'abri de la lumière du soleil.



Fabricant.



Représentant agréé dans l'Union européenne

NOTE POUR L'ACQUÉREUR : LICENCE LIMITÉE

ELITe InGenius® est une marque déposée de ELITechGroup au sein de l'Union européenne.

COORDONNÉES

Distributeur :

ELITechGroup S.p.A.

C.so Svizzera, 185

10149 Torino ITALIE

Bureaux : Tél. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11

E-mail : emd.support@elitechgroup.com

Site internet : www.elitechgroup.com

Fabricant :

OSANG Healthcare Co., Ltd

132, Anyangcheondong-ro, Dongan-gu, Anyang-si, Gyeonggi-do, 14040, Corée

Tél. : +82-31-460-9937

Fax : +82-31-460-9933

Site internet : http://www.osanghc.com

Représentant agréé dans l'Union européenne

Obelis S.A

Bd. General Wahis 53,1030 Bruxelles, Belgique

Tél. : +32-2-732-59-54

Fax : +32-2-732-60-03

E-mail : mail@obelis.net

High Risk HPV ELITE Panel used with ELITE InGenius®

Ref.: RTK402ING



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The «High Risk HPV ELITE Panel» product is a qualitative multiplex nucleic acids real time amplification assay for the detection and differentiation of the DNA of Human Papilloma Virus 14 high-risk types in DNA samples extracted from **cervical specimens collected in UTM medium and cell from cervical specimens collected in UTM medium**.

The test specifically identifies types HPV16 and HPV18 while concurrently detects the rest of the high-risk types (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68). The assay is CE-IVD validated in combination with the instrument **ELITE InGenius**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
HPV16	HPV16	FAM
HPV18	HPV18	JOE/HEX
HR-HPV	HPV31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	Texas red/Cal fluor red 610
Internal Control	ABL gene	Cy5/Quasar 670

C. Validated matrix

- Cervical specimens collected in UTM medium and cell from cervical specimens collected in UTM medium

D. Kit content

HR-HPV Reaction Mix	HR-HPV Probe Mix	HR-HPV Positive Control
		
3 tubes of 550 µL 96 reactions per kit 10 freeze-thaw cycles per tube	3 tubes of 320 µL 96 reactions per kit 10 freeze-thaw cycles per tube	2 tubes of 100 µL 96 reactions per kit 10 freeze-thaw cycles per tube

- Maximum shelf-life: 18 months Storage: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- ELITE InGenius instrument: INT030
- ELITE InGenius SP200 Extraction Cartridge: INT032SP200
- ELITE InGenius PCR Cassette amplification cartridges: INT035PCR
- ELITE InGenius SP200 Consumable Set consumables for extraction: INT032CS
- ELITE InGenius Waste Box: F2102-000
- 300 µL Filter Tips: TF-350-L-R-S
- 2 ml tube Sarstedt: 72.694.005

F. ELITE InGenius protocol

Sample volume	200 µL	Unit of qualitative result	cp/reaction
Total eluate volume	100 µL	Frequency of controls	15 days
Sample PCR input volume	5 µL		
PCR Mix volume	20 µL		

G. Performance

Matrix	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Cervical Specimen	HPV16	10 copies/reaction	100% (29/29)*	100% (143/143)*
	HPV18	10 copies/reaction	100% (21/21)*	100% (151/151)*
	HR-HPV	10 copies/reaction	100% (76/76)*	98.9% (91/92)*

*confirmed samples/ tested samples

H. Sample preparation

Sample Number (N)	HR-HPV Reaction Mix	HR-HPV Probe Mix
1 ≤ N ≤ 4	(N + 1) x 12.5 µL	(N + 1) x 7.5 µL
5 ≤ N ≤ 8	(N + 2) x 12.5 µL	(N + 2) x 7.5 µL
9 ≤ N ≤ 12	(N + 3) x 12.5 µL	(N + 3) x 7.5 µL

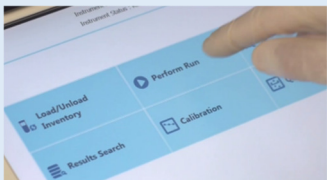
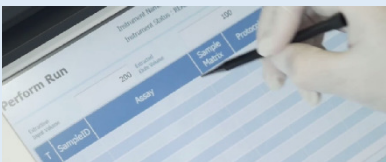
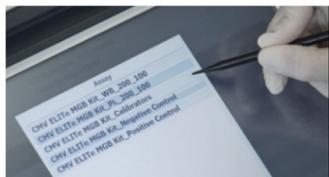
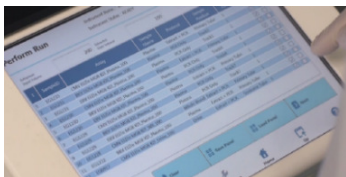
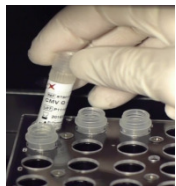
I. Procedures

The user is guided step-by-step by the ELITE InGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"	2. Verify controls: HR-HPV ELITE Pos. and neg. controls in the "Control menu" NB: Both have been run, approved and not expired NB: Both have been run, approved and not expired	3. Thaw the HR-HPV PCR Mix components. Prepare the complete reaction mixture as described in the paragraph H Vortex gently Spin down 5 sec
---	---	---

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen 	2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", eluate: "100 µL" 	3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID 
4. Select the "Assay protocol" of interest 	5. Select the sample position: Extraction tube 	6. Load the complete reaction mixture HR-HPV PCR Mix in the inventory block 
7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, Extraction tube racks 	8. Close the door Start the run 	9. View, approve and store the results 

Procedure 2 - PCR only

1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above	5. Select the protocol "PCR only" and set the sample position "Extra tube"	6. Load the extracted nucleic acid tubes in the rack n°4
7. Load the PCR cassette rack HR-HPV Reconstitution PCR-Mix in the inventory block	8. Close the door Start the run	9. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above	5. Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position: Extraction tube	6. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, Extraction tube racks
7. Close the door Start the run	8. Archive the eluate sample	

High Risk HPV ELITe Panel used with Open Platforms

Ref. RTK402ING



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The «**High Risk HPV ELITe Panel**» product is a qualitative multiplex nucleic acids real time amplification assay for the detection and differentiation of the DNA of Human Papilloma Virus 14 high-risk types in DNA samples extracted from **cervical specimens collected in UTM medium and cell from cervical specimens collected in UTM medium**.

The test specifically identifies types HPV16 and HPV18 while concurrently detects the rest of the high-risk types (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68). The assay is CE-IVD validated in combination with the instruments **7500, 7500 Fast Real-Time PCR System and CFX96™ Real-Time PCR Detection System–IVD**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
HPV16	HPV16	FAM
HPV18	HPV18	JOE/HEX
HR-HPV	HPV31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	Texas red/Cal fluor red 610
Internal Control	ABL gene	Cy5/Quasar 670

C. Validated matrix

› Cervical specimens collected in UTM medium and cell from cervical specimens collected in UTM medium

D. Kit content

HR-HPV Reaction Mix	HR-HPV Probe Mix	HR-HPV Positive Control
		
3 tubes of 550 µL 100 reactions per kit 10 freeze-thaw cycles per tube	3 tubes of 320 µL 100 reactions per kit 10 freeze-thaw cycles per tube	2 tubes of 100 µL 100 reactions per kit 10 freeze-thaw cycles per tube

Maximum shelf-life: 18 months

Storage: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- › 7500 RT PCR System ref: 4351105
- › 7500 Fast RT PCR System ref: 4351106
- › Biorad CFX96: Ref.1845097
- › 2 mL Sarstedt tube (Ref. 72694005)
- › Molecular biology grade water
- › MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode
- › 0.1 mL Hard-Shell 96-Well PCR Plates: Bio-Rad, code HSP9601
- › Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film: Bio-Rad, code MSB1001

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
ABI 7500, 7500 Fast	Cervical specimens	10 copies/reaction	100% (105/105)*	100% (160/160)*
CFX96	Cervical specimens	10 copies/reaction	100% (105/105)*	100% (160/160)*

*confirmed samples/tested samples

G. Sample preparation

Sample Number (N)	HR-HPV Reaction Mix	HR-HPV Probe Mix
N	(N + 1) x 12.5 µL	(N + 1) x 7.5 µL

H. Procedure

The procedure below summarized the main steps of the sample analysis with conventional PCR workflow: validated extraction systems, PCR instrument settings, PCR set-up and result interpretation.

Amplification - Settings of 7500, 7500 Fast Real-Time PCR System.

1. Switch on the thermal cycler
2. Set "g16" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "g18" detector with "JOE" and quencher "none"
4. Set "HR" detector with "Texas Red" and quencher "none"
5. Set "IC" detector with "Cy5" and quencher "none"
6. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during Elongationstep at 72°C

Stage	Temperature	Timing
UDG-reaction	50°C	2 min
Pre-Denaturation	95°C	10 min
Denaturation	95°C	15 sec
Annealing	54°C	60 sec
Elongation	72°C	30 sec
45 cycles		

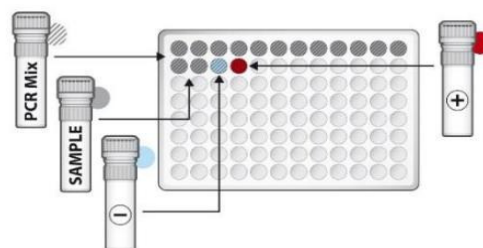
Amplification - Settings of CFX96™ Real-Time PCR Detection System–IVD.

1. Switch on the thermal cycler
2. Set "g16" detector with "FAM"
3. Set "g18" detector with "HEX"
4. Set "HR" detector with "Cal fluor red 610"
5. Set "IC" detector with "Quasar 670"
6. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during Elongationstep at 72°C

Stage	Temperature	Timing
UDG-reaction	50°C	2 min
Pre-Denaturation	95°C	10 min
Denaturation	95°C	15 sec
Annealing	54°C	60 sec
Elongation	72°C	30 sec
45 cycles		

Amplification - PCR Set-up

1. Thaw the HR-HPV PCR Mix components.
2. Prepare the complete reaction mixture HR-HPV PCR Mix as described in the paragraph G
3. Mix gently and spin-down
4. Pipet 20 µL of HR-HPV PCR Mix in all microplate wells in use
5. Add 5 µL of extracted DNA in sample wells, 5 µL of molecular grade water in Negative Control well, and 5 µL of the HR-HPV Positive Controls
Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
6. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
7. Transfer the microplate in the thermal cycler and start



Amplification - Threshold for qualitative analysis 7500, 7500 Fast Real-Time PCR System

Target	Threshold setting	Baseline	
		Start	End
HPV Type #16	20,000	3	15
HPV Type #18	20,000	3	15
HPV High Risk	20,000	10	15
IC	10,000	3	15

Amplification - Threshold for qualitative analysis CFX96™ Real-Time PCR Detection System–IVD

Target	Threshold setting	Baseline	
		Start	End
HPV Type #16	300	3	15
HPV Type #18	300	3	15
HPV High Risk	300	10	15
IC	100	3	15

Interpretation - Qualitative results

#	Ct value				Positive or Negative				Results
	g16	g18	HR	IC	g16	g18	HR	IC	
1	≤45	≤45	≤45	≤35	+	+	+	+	g16, g18 and HR Positive
2	≤45	≤45	≤45	*U.D or N/A	+	+	+	-	**g16, g18 and HR Positive
3	≤45	≤45	U.D or N/A	≤35	+	+	-	+	g16 and g18 Positive
4	≤45	≤45	U.D or N/A	U.D or N/A	+	+	-	-	g16 and g18 Positive
5	≤45	U.D or N/A	≤45	≤35	+	-	+	+	g16 and HR Positive
6	≤45	U.D or N/A	≤45	U.D or N/A	+	-	+	-	g16 and HR Positive
7	≤45	U.D or N/A	U.D or N/A	≤35	+	-	-	+	g16 Positive
8	≤45	U.D or N/A	U.D or N/A	U.D or N/A	+	-	-	-	g16 Positive
9	U.D or N/A	≤45	≤45	≤35	-	+	+	+	g18 and HR Positive
10	U.D or N/A	≤45	≤45	U.D or N/A	-	+	+	-	g18 and HR Positive
11	U.D or N/A	≤45	U.D or N/A	≤35	-	+	-	+	g18 Positive
12	U.D or N/A	≤45	U.D or N/A	U.D or N/A	-	+	-	-	g18 Positive
13	U.D or N/A	U.D or N/A	≤45	≤35	-	-	+	+	HR Positive
14	U.D or N/A	U.D or N/A	≤45	U.D or N/A	-	-	+	-	HR Positive
15	U.D or N/A	U.D or N/A	U.D or N/A	≤39	-	-	-	+	Negative
16	U.D or N/A	U.D or N/A	U.D or N/A	U.D or N/A	-	-	-	-	***Invalid

Note:

*U.D: Undetermined

N/A: Not applicable

** When the target DNA is detected in a sample amplification reaction, the internal control (IC) may give the result as Ct Not applicable (N/A).

In fact, the low-efficiency amplification reaction for the internal control may be displaced by competition from the high-efficiency amplification reaction for Target gene. In such a case, the sample is nevertheless suitable, and the positive result of the assay is valid.

*** This means that problems have occurred which may lead to incorrect results. It is not valid and the test needs to be repeated.