ELITechGroup
EMPOWERING IVD

ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185
10149 Torino ITALY
Offices: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11
E. mail: emd.support@elitechgroup.com
WEB site: www.elitechgroup.com

NOTICE of CHANGE dated 15/02/2023

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«VZV ELITe MGB® Kit»
Ref. RTS035PLD

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

- *Update for the use of the product in association with «ELITe BeGenius» instrument (REF INT040) and CSF matrix.*
- *Description of IC cut off value already adopted in the Assay protocol of the product (section "Diagnostic specificity: confirmation of negative samples")*
- *"Performance Characteristics ELITe InGenius and ELITe BeGenius" paragraph updated as per:*
  - *confirmed LoD value calculated on CSF matrix*
  - *typos.*

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
	DIE REVIEW VON DIESER IFU IST KOMPATIBLE MIT DER VORIGE VERSION VON DEM TEST-KIT

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

VZV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS035PLD CE IVD -20 °C

TABLE DES MATIÈRES

APPLICATION	page 2
PRINCIPES DU TEST	page 2
DESCRIPTION DU PRODUIT	page 3
MATÉRIEL FOURNI	page 3
MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI	page 3
AUTRES PRODUITS REQUIS	page 3
AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS	page 5
ELITE INGENIUS	page 6
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	page 6
PROCÉDURE AVEC LE SYSTÈME ELITE INGENIUS	page 8
ELITe BEGENIUS	page 16
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	page 16
PROCÉDURE AVEC LE SYSTÈME ELITe BEGENIUS	page 18
CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE DES SYSTÈMES ELITE INGENIUS et ELITe BEGENIUS	page 24
ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ABI 7300 Real-Time System	page 34
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	page 34
PROCÉDURE	page 37
CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE	page 45
Roche cobas z 480 analyzer	page 51
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	page 51
PROCÉDURE	page 52
CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE	page 57
BIBLIOGRAPHIE	page 60
LIMITES DE LA PROCÉDURE	page 60
PROBLÈMES ET SOLUTIONS	page 61
LÉGENDE DES SYMBOLES	page 63
NOTE POUR L'ACQUÉREUR : LICENCE LIMITÉE	page 64

APPLICATION

Le produit **VZV ELITe MGB® Kit** fait partie d'un test qualitatif et quantitatif d'amplification des acides nucléiques pour la **détection et la quantification de l'ADN de l'herpèsvirus humain de la varicelle et du zona (VZV)** dans des échantillons d'ADN extraits de liquide céphalorachidien (LCR), sang total prélevé sur EDTA et plasma prélevé sur EDTA.

Le produit est destiné à être utilisé dans le diagnostic et la surveillance des infections par le VZV, en association avec les données cliniques du patient et d'autres résultats d'analyse de laboratoire.

PRINCIPES DU TEST

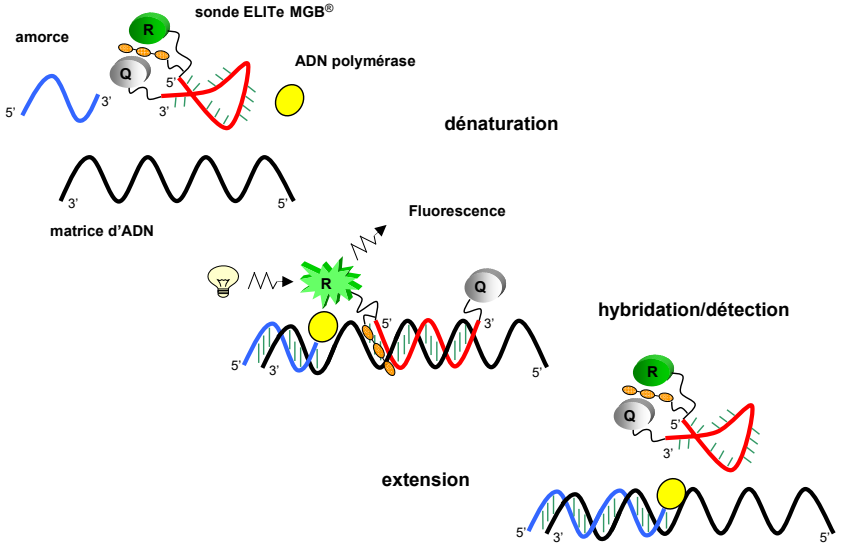
Le test consiste en une réaction d'amplification en temps réel effectuée par un thermostat programmable doté d'un système optique de détection de la fluorescence (thermocycleur d'amplification en temps réel).

Dans chaque puits, deux réactions d'amplification sont effectuées à partir de l'ADN extrait des échantillons à tester : une réaction spécifique pour une région du gène de la **protéine majeure de liaison à l'ADN** (ORF 29) du VZV et une réaction spécifique pour une région du gène de la **bêta-globine** humaine (contrôle interne d'inhibition). La sonde spécifique au VZV dotée de la technologie ELITe MGB®, marquée par le fluorophore FAM, est activée lorsqu'elle s'hybride avec le produit spécifique de la réaction d'amplification du VZV. La sonde spécifique au contrôle interne dotée de la technologie ELITe MGB®, marquée par le fluorophore AP525 (analogue à VIC), est activée lorsqu'elle s'hybride avec le produit spécifique de la réaction d'amplification du contrôle interne. Lorsque le produit spécifique de la réaction d'amplification augmente, l'émission de fluorescence augmente également et est mesurée et enregistrée par l'instrument. Le traitement des données permet de détecter la présence et le titre de l'ADN du VZV dans l'échantillon de départ.

À la fin de la session d'amplification, une analyse de la courbe de dissociation (courbe de fusion) peut être effectuée afin de déterminer la température de dissociation (température de fusion) et de confirmer la présence de la cible correcte ou d'identifier la présence de mutations.

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

L'image suivante présente le mécanisme d'activation et d'émission de fluorescence de la sonde utilisant la technologie ELITe MGB®. Noter que la sonde n'est pas hydrolysée pendant le cycle d'amplification si bien qu'elle peut être utilisée pour l'analyse de la courbe de dissociation.



DESCRIPTION DU PRODUIT

Le produit **VZV ELITe MGB® Kit** fournit le mélange complet **prêt à l'emploi** VZV Q - PCR Mix pour l'amplification en temps réel dans une solution de stabilisation, **aliquoté dans quatre tubes à essai jetables**. Chaque tube contient **540 µL** de solution, un volume suffisant pour effectuer **24 tests** en association avec les systèmes **ELITe InGenius®** et **ELITe BeGenius®** et **25 tests** en association avec d'autres systèmes.

Les amorces et la sonde spécifique au VZV (stabilisées par le groupe MGB®, marquées par le fluorophore FAM et désactivées par une molécule non fluorescente) sont spécifiques à une région du gène de la **protéine majeure de liaison à l'ADN** (ORF 29) du VZV.

Les amorces et la sonde spécifique au contrôle interne (stabilisées par le groupe MGB®, marquées par le fluorophore AP525, analogue à VIC, et désactivées par une molécule non fluorescente) sont spécifiques au **promoteur et à la région UTR 5'** du gène de la **bêta-globine** humaine.

Le mélange réactionnel fournit un tampon, du chlorure de magnésium, des nucléotides triphosphates, le fluorophore AP593 (utilisé à la place de ROX ou CY5) en tant que référence passive pour la normalisation de la fluorescence, l'enzyme uracile N-glycosidase (UNG) pour inactiver toute contamination par le produit d'amplification et l'enzyme ADN polymérase « hot start » (démarrage à chaud).

Le produit permet d'effectuer **96 tests en association avec les systèmes ELITe InGenius®** et **ELITe BeGenius®**, en incluant les étalons et les contrôles.

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

MATÉRIEL FOURNI

Composant	Description	Quantité	Classification des risques
VZV Q - PCR Mix	mélange réactionnel complet	**4 x 540 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.
- Thermostat programmable avec système de détection optique de fluorescence 7300 Real Time PCR System ou 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument étalonné selon les instructions du fabricant.
- Thermostat programmable avec système de détection optique de fluorescence cobas z 480 analyzer, étalonné selon les instructions du fabricant.

AUTRES PRODUITS REQUIS

Les réactifs pour l'extraction de l'ADN des échantillons, le contrôle positif d'extraction, le contrôle positif de l'amplification, les étalons d'ADN en quantité connue et les consommables **ne sont pas** inclus dans ce produit.

Pour l'analyse automatique d'échantillons avec l'instrument **ELITe InGenius** (ELITechGroup S.p.A., réf. INT030), les produits génériques suivants sont requis : les cartouches d'extraction **ELITe InGenius SP 200** (ELITechGroup S.p.A., réf. INT032SP200), les consommables pour l'extraction et l'amplification des acides nucléiques dans des échantillons biologiques **ELITe InGenius SP 200 Consumable Set** (ELITechGroup S.p.A, réf. INT032CS), le conteneur à déchets **ELITe InGenius Waste Box** (ELITechGroup S.p.A, réf. F2102-000), la cassette de PCR **ELITe InGenius PCR Cassette** (ELITechGroup S.p.A, réf. INT035PCR) et les cônes de 300 µL **Filter tips 300** (Axygen BioScience Inc., CA, États-Unis, réf. TF-350-L-R-S).

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS035PLD

Pour l'extraction automatique de l'ADN, l'amplification en temps réel et l'interprétation des résultats des échantillons avec l'instrument **ELITe InGenius**, les protocoles de test spécifiques suivants (ELITechGroup S.p.A) sont requis :

- paramètres pour les calibrateurs **VZV ELITe_STD**,
- paramètres pour le contrôle positif d'amplification **VZV ELITe_PC**,
- paramètres pour le contrôle négatif d'amplification **VZV ELITe_NC**,
- paramètres pour l'analyse des échantillons **VZV ELITe_WB_200_100**, **VZV ELITe_PL_200_100** et **VZV ELITe_CSF_200_100**.

Pour l'analyse automatique d'échantillons avec l'instrument **ELITe BeGenius** (ELITechGroup S.p.A., réf. INT040), les produits génériques suivants sont requis : les cartouches d'extraction **ELITe InGenius® SP 200** (ELITechGroup S.p.A., réf. INT032SP200), les consommables pour l'extraction et l'amplification des acides nucléiques dans des échantillons biologiques **ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set** (ELITechGroup S.p.A, réf. INT032CS), le conteneur à déchets **ELITe InGenius® Waste Box** (ELITechGroup S.p.A, réf. F2102-000), la cassette de PCR **ELITe InGenius® PCR Cassette** (ELITechGroup S.p.A, réf. INT035PCR) et les cônes de 1000 µL **1000 µL Filter Tips Tecan** (Tecan, Suisse, réf. 30180118).

Pour l'extraction automatique de l'ADN, l'amplification en temps réel et l'interprétation des résultats des échantillons avec l'instrument **ELITe BeGenius** (ELITechGroup S.p.A., réf. INT040), les protocoles de test spécifiques suivants (ELITechGroup S.p.A) sont requis :

paramètres pour les calibrateurs **VZV ELITe_Be_STD**,

paramètres pour le contrôle positif d'amplification **VZV ELITe_Be_PC**,

paramètres pour le contrôle négatif d'amplification **VZV ELITe_Be_NC**,

paramètres pour l'analyse des échantillons **VZV ELITe_Be_WB_200_100, VZV ELITe_Be_PL_200_100** et **VZV ELITe_Be_CSF_200_100**.

Pour l'extraction automatique de l'ADN des échantillons à analyser, le produit générique suivant a été validé : le kit d'extraction **ELITe STAR 200 Extraction Kit** (ELITechGroup S.p.A., réf. INT011EX), un kit pour l'extraction des acides nucléiques dans des échantillons biologiques à l'aide de l'instrument **ELITe STAR** (ELITechGroup S.p.A., réf. INT010).

Pour l'extraction automatique de l'ADN et la préparation des microplaques pour l'amplification des échantillons à analyser, le produit générique suivant a été validé : le kit d'extraction **ELITe GALAXY 300 Extraction Kit** (ELITechGroup S.p.A., réf. INT021EX), un kit pour l'extraction de l'ADN et de l'ARN dans des échantillons acellulaires et cellulaires à l'aide de l'instrument **ELITe GALAXY** (ELITechGroup S.p.A., réf. INT020).

Pour l'extraction automatique de l'ADN des échantillons à analyser, les produits génériques suivants ont également été validés : les kits d'extraction **NucliSENS® easyMAG® Reagents** (bioMérieux SA, réf. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135), des kits pour l'extraction des acides nucléiques dans des échantillons biologiques, à l'aide de l'instrument **NucliSENS® easyMAG®** (bioMérieux SA, réf. 200111).

Pour l'extraction automatique de l'ADN des échantillons à analyser, les produits suivants ont également été validés : les kits **QIAsymphony® DNA Mini Kit** (QIAGEN GmbH, réf. 931236) et **QIAsymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit** (QIAGEN GmbH, réf. 37055), des kits pour l'extraction des acides nucléiques dans des échantillons biologiques, à l'aide de l'instrument **QIAsymphony® SP/AS** (QIAGEN GmbH, réf. 9001297, 9001301) et des produits génériques apparentés.

Pour l'extraction automatique de l'ADN des échantillons à analyser, le produit suivant a également été validé : le kit **MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit** (Roche, réf. 07658036001), un kit pour l'extraction des acides nucléiques dans des échantillons biologiques, à l'aide de l'instrument **MagNA Pure 24 System** (Roche, réf. 07290519001).

À titre de contrôle positif d'extraction des acides nucléiques d'échantillons acellulaires et de contrôle d'inhibition, il est nécessaire d'utiliser le produit générique **CPE - Internal Control** (ELITechGroup S.p.A., réf. CTRCPE), une solution stabilisée contenant deux ADN plasmidiques et l'ARN génomique du phage MS2.

Lorsque le système 7300 Real-Time PCR System est utilisé pour l'amplification de l'ADN, il est nécessaire d'utiliser le produit générique **MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate** (Life Technologies, réf. N8010560), des microplaques comprenant des puits de 0,2 mL et des feuilles de scellage adhésives pour l'amplification en temps réel.

Lorsque l'instrument 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument est utilisé pour l'amplification de l'ADN, il est nécessaire d'utiliser le produit générique **MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL** (Life Technologies, réf. 43469062), des microplaques comprenant des puits de 0,1 mL et des feuilles de scellage adhésives pour l'amplification en temps réel.

Lorsque l'analyseur cobas z 480 analyzer est utilisé, il est nécessaire d'utiliser le produit générique **AD-plate 0.3ml** (Roche, réf. 05232724001), des microplaques comprenant des puits de 0,3 mL et des feuilles de scellage adhésives pour l'amplification en temps réel.

Si la détection de l'ADN du VZV est requise pour une analyse qualitative, utiliser le produit **VZV - ELITe Positive Control** (ELITechGroup S.p.A., réf. CTR035PLD) ou le produit **VZV - ELITe Positive Control RF** (ELITechGroup S.p.A., réf. CTR035PLD-R) spécifique pour une utilisation avec l'analyseur cobas z 480 analyzer, un contrôle positif composé d'ADN plasmidique.

Si la détection et la quantification de l'ADN du VZV est requise pour une analyse quantitative, utiliser le produit **VZV ELITe Standard** (ELITechGroup S.p.A., réf. STD035PLD), quatre dilutions d'ADN plasmidique en quantité connue, afin d'obtenir la courbe d'étalonnage.

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 % (eau de Javel) ou autoclavé pendant une heure à 121 °C avant d'être éliminé. Éviter tout contact des réactifs d'extraction avec l'hypochlorite de sodium (eau de Javel).

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, boire, fumer ou 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 de l'analyse, 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 mélanger des 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.

Il est nécessaire d'utiliser des blouses de laboratoire, des gants et des instruments dédiés à la session de travail.

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

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF **RTS035PLD**

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.

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

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.

Avertissements et précautions spécifiques pour les composants

Le mélange **VZV Q - PCR Mix** doit être conservé à une température inférieure à -20 °C et à l'abri de la lumière.

Le mélange **VZV Q - PCR Mix** doit être utilisé dans le mois qui suit sa première ouverture.

Le **VZV Q - PCR Mix** peut être congelé et décongelé **cinq fois** au maximum : des cycles de congélation/décongélation supplémentaires risqueraient d'entraîner une réduction des performances du produit.

Le **VZV Q - PCR Mix** peut être utilisé pendant 5 sessions de travail indépendantes de 3 heures chacune ou peut être conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant un maximum de 3 sessions de travail consécutives de 3 heures chacune. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes avant de commencer la session d'analyse suivante.

ELITe InGenius

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES

Échantillons

Ce produit doit être utilisé avec les échantillons cliniques suivants :

Sang total prélevé sur EDTA

Les échantillons de sang total pour l'extraction de l'ADN doivent être prélevés sur de l'EDTA et être identifiés conformément aux directives de laboratoire. Ils doivent être transportés entre +2 et +8 °C et conservés entre +2 et +8 °C pendant trois jours au maximum. Sinon, ils doivent être congelés et conservés à -20 °C pendant trente jours au maximum ou à -70 °C pour des périodes plus longues.

Il est recommandé de diviser les échantillons en aliquotes avant la congélation afin d'éviter des cycles répétés de congélation et de décongélation. En cas d'utilisation d'échantillons congelés, les décongeler juste avant l'extraction afin d'éviter une éventuelle dégradation des acides nucléiques.

Remarque : lorsque l'extraction de l'ADN à partir de sang total est effectuée à l'aide du système **ELITe InGenius** et du **logiciel ELITe InGenius** version 1.3 (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **VZV ELITe_WB_200_100**. Ce protocole comprend le traitement de 200 µL d'échantillon, l'ajout du **CPE** à 10 µL/extraction et l'élution des acides nucléiques dans 100 µL.

Lorsque le tube primaire est utilisé, le volume de l'échantillon varie en fonction du type de tube chargé. Se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction pour obtenir de plus amples informations.

Plasma prélevé sur EDTA

Les échantillons de plasma pour l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés sur de l'EDTA conformément aux directives de laboratoire. Ils doivent être transportés entre +2 et +8 °C et conservés

entre +2 et +8 °C pendant trois jours au maximum. Sinon, ils doivent être congelés et conservés à -20 °C pendant trente jours au maximum ou à -70 °C pour des périodes plus longues.

Il est recommandé de diviser les échantillons en aliquotes avant la congélation afin d'éviter des cycles répétés de congélation et de décongélation. En cas d'utilisation d'échantillons congelés, les décongeler juste avant l'extraction afin d'éviter une éventuelle dégradation des acides nucléiques.

Remarque : lorsque l'extraction de l'ADN à partir de plasma est effectuée à l'aide du système **ELITe InGenius** et du **logiciel ELITe InGenius** version 1.3 (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **VZV ELITe_PL_200_100.** Ce protocole comprend le traitement de 200 µL d'échantillon, l'ajout du **CPE** Internal Control (contrôle interne) à 10 µL/extraction et l'élution des acides nucléiques dans 100 µL.

Lorsque le tube primaire est utilisé, le volume de l'échantillon varie en fonction du type de tube chargé. Se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction pour obtenir de plus amples informations.

Liquide céphalorachidien (LCR)

Les échantillons de LCR pour l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés conformément aux directives de laboratoire en évitant toute contamination par le sang du patient. Ils doivent être transportés entre +2° et +8 °C et conservés entre +2° et +8 °C pendant quatre heures au maximum. Sinon, ils doivent être congelés et conservés à -20 °C pendant trente jours au maximum ou à -70 °C pour des périodes plus longues.

Il est recommandé de diviser les échantillons en aliquotes avant la congélation afin d'éviter des cycles répétés de congélation et de décongélation. En cas d'utilisation d'échantillons congelés, les décongeler juste avant l'extraction afin d'éviter une éventuelle dégradation des acides nucléiques.

Remarque : lorsque l'extraction de l'ARN à partir de liquide céphalorachidien est effectuéeà l'aide du système **ELITe InGenius** et du **logiciel ELITe InGenius** version 1.3 (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **VZV ELITe_CSF_200_100**. Ce protocole traite 200 µL d'échantillon, ajoute le **CPE Internal Control** (contrôle interne) à 10 µL/extraction et effectue l'élution des acides nucléiques dans 100 µL.

Pour effectuer l'analyse avec ce produit, 0,2 mL d'échantillon remis en suspension doit être transféré dans un **Extraction tube** (Tube d'extraction) inclus dans le **ELITe InGenius SP 200 Consumable Set** ou un **2 mL Tube** (Tube de 2 mL) (Sarstedt, réf. 72.694.005).

Remarque : le pipetage des échantillons à partir du tube primaire dans le **Extraction tube** (Tube d'extraction) peut **entraîner une contamination.** Utiliser les pipettes appropriées et suivre toutes les recommandations indiquées à la section « **Avertissements et précautions** ».

Autres échantillons :

Il n'existe actuellement aucune donnée disponible concernant les performances du produit avec l'ADN extrait des échantillons cliniques suivants : échantillons de lésions mucocutanées prélevés à l'écouvillon, liquide amniotique.

Substances interférentes

L'échantillon ne doit pas contenir d'héparine afin de prévenir le problème d'inhibition et la possibilité de génération fréquente de résultats non valides.

Il n'existe actuellement aucune donnée disponible en ce qui concerne l'inhibition provoquée par des médicaments antiviraux, antibiotiques, de chimiothérapie ou immunosuppresseurs.

Calibrateurs et contrôles d'amplification

Une validation des réactifs doit être générée et approuvée pour chaque lot de réactifs de PCR.

- pour l'étalonnage, utiliser les quatre niveaux de concentration du **VZV ELITe Standard**, avec le protocole de test **VZV ELITe_STD**,
- pour le Contrôle positif, utiliser le **VZV - ELITe Positive Control**, avec le protocole de test **VZV ELITe_PC**,
- pour le Contrôle négatif, utiliser de l'eau de qualité biologie moléculaire (non incluse dans ce kit) avec le protocole de test **VZV ELITe_NC**.

Remarque : le système **ELITe InGenius** permet de générer et de stocker la courbe d'étalonnage et de valider les contrôles de la PCR pour chaque lot de réactifs de PCR.
Les résultats de la courbe d'étalonnage expirent au bout de **60 jours**, après quoi il est nécessaire de réanalyser les étalons Q-PCR Standards en association avec le lot de réactifs d'amplification.
Les résultats des contrôles de la PCR expirent au bout de **15 jours**, après quoi il est nécessaire de réanalyser les Contrôles positif et négatif en association avec le lot de réactifs d'amplification.

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS035PLD

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

- un nouveau lot de réactifs est utilisé,
- les résultats de l'analyse du contrôle de qualité (se reporter au paragraphe suivant) sont en dehors des spécifications,
- l'instrument subit une procédure de maintenance ou d'entretien 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. Les contrôles externes doivent être utilisés conformément aux exigences des organismes d'accréditation locaux, régionaux et nationaux en vigueur.

PROCÉDURE AVEC LE SYSTÈME ELITe InGenius

L'utilisation du **VZV ELITe MGB® Kit** avec le système ELITe InGenius comporte trois étapes :

- Vérification de la préparation du système,
- Paramétrage de la session d'analyse,
- Examen et exportation des résultats.

Vérification de la préparation du système

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

- mettre le système **ELITe InGenius** en marche et se connecter en mode « **CLOSED** » (FERMÉ) ;
- vérifier que les calibrateurs (**VZV Q - PCR Standard**) sont approuvés et valides (Status [Statut]) pour le lot de **VZV Q - PCR Mix** à utiliser. Si aucun calibrateur d'amplification valide n'est disponible pour le lot de **VZV Q - PCR Mix**, analyser les calibrateurs d'amplification comme décrit ci-dessous,
- vérifier que les contrôles d'amplification (**VZV - Positive Control**, **VZV Negative Control**) sont approuvés et valides (Status [Statut]) pour le lot de **VZV Q - PCR Mix** à utiliser. Si aucun contrôle d'amplification valide n'est disponible pour le lot de **VZV Q - PCR Mix**, analyser les contrôles d'amplification comme décrit ci-dessous,
- choisir le type d'analyse et paramétrer l'analyse, en suivant les instructions de l'interface graphique utilisateur (GUI) concernant le paramétrage de la session d'analyse et en utilisant les protocoles de test fournis par ELITechGroup. Ces protocoles de DIV ont été spécifiquement validés avec les kits ELITe MGB et l'instrument ELITe InGenius et les matrices indiquées.

Les protocoles de test disponibles pour tester des échantillons à l'aide du produit **VZV ELITe MGB Kit** sont décrits dans le tableau ci-dessous :

Protocole de test pour le VZV ELITe MGB Kit			
Nom	**Matrice**	**Unités du rapport**	**Caractéristiques**
VZV ELITe_WB_200_100	Sang total	copies/mL	Volume d'extraction initial : 200 µL Volume d'élution extrait : 100 µL Contrôle Interne : 10 µL Sonication : NON Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de l'échantillon PCR : 20 µL
VZV ELITe_PL_200_100	Plasma	copies/mL	Volume d'extraction initial : 200 µL Volume d'élution extrait : 100 µL Contrôle Interne : 10 µL Sonication : NON Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de l'échantillon PCR : 20 µL
VZV ELITe_CSF_200_100	LCR	copies/mL	Volume d'extraction initial : 200 µL Volume d'élution extrait : 100 µL Contrôle Interne : 10 µL Sonication : NON Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de l'échantillon PCR : 20 µL

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

Des protocoles d'analyse qualitative sont disponibles sur demande.

Paramétrage de la session d'analyse

Le **VZV ELITe MGB Kit**, en association avec le système **ELITe InGenius** peut être utilisé afin d'effectuer les opérations suivantes :

A. Analyse intégrée (« Extract + PCR » [Extraction + PCR]),
B. Analyse d'amplification (« PCR Only » [PCR uniquement]),
C. Analyse d'étalonnage (« PCR Only » [PCR uniquement]),
D. Analyse d'amplification du contrôle positif et négatif (« PCR Only » [PCR uniquement]).

Tous les paramètres requis sont inclus dans les protocoles de test disponibles sur l'instrument et sont chargés automatiquement lorsque le protocole de test est sélectionné.

Remarque : le système ELITe InGenius peut être connecté au « système de gestion des informations de laboratoire » (LIS) qui permet de charger les informations relatives à la session d'analyse. Pour plus de détails, voir le manuel de l'instrument.

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

A. Analyse intégrée

Pour paramétrer une analyse intégrée avec une extraction et une amplification d'échantillon, suivre les étapes ci-dessous tout en se reportant à la GUI :

1. Décongeler les échantillons à température ambiante (environ +25 °C) et les manipuler conformément aux directives du laboratoire et à la section « Échantillons et contrôles ».
2. Décongeler les tubes de VZV Q - PCR Mix nécessaires à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes. Chaque tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions optimisées (2 tests ou plus par session d'analyse). Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.

Remarque : garder le **VZV Q - PCR Mix** à l'abri de la lumière lors de la décongélation car ce réactif est photosensible.

3. Décongeler les tubes de CPE pour la session d'analyse. Chaque tube permet d'effectuer 12 extractions. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
4. Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
5. Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initial) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élution extrait) est de 100 µL.

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF **RTS035PLD**

6. Pour chaque « Track » (Position) d'intérêt, renseigner le « SampleID » (SID) (ID échantillon) en le saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.
7. Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (c'est-à-dire VZV ELITe_PL_200_100).
8. Vérifier que le « Protocol » (Protocole) affiché est : « Extract + PCR » (Extraction + PCR).
9. Sélectionner la position de chargement de l'échantillon dans la colonne « Sample Position » (Position de l'échantillon) :
   si un tube primaire est utilisé, sélectionner « Primary Tube » (Tube primaire),
   si un tube secondaire est utilisé, sélectionner « Extraction Tube » (Tube d'extraction).
   Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
10. Charger le CPE et le VZV Q-PCR Mix sur le Inventory Block (Bloc inventaire) en se reportant à la Load List (Liste de chargement) et saisir le numéro de lot et la date de péremption du réactif ainsi que le nombre de réactions pour chaque tube. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
11. Vérifier les cônes dans les « Tip Racks » (Portoirs de cônes) de la « Inventory Area » (Zone inventaire) et remplacer le(s) portoir(s) de cônes si nécessaire. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
12. Charger les « **PCR Cassettes** »(Cassettes de PCR), 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 « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
13. Fermer le tiroir de l'instrument.
14. Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

Au terme de la session d'analyse, 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 : à la fin de l'analyse, l'échantillon extrait restant peut être retiré de l'instrument, bouché, identifié et conservé à -20 °C. Éviter tout déversement de l'échantillon extrait.

Remarque : à la fin de l'analyse, les PCR Cassettes (Cassettes de PCR) contenant les produits de réaction et les autres consommables doivent être éliminés conformément à toutes les réglementations gouvernementales et environnementales. Éviter de renverser les produits de réaction.

Remarque : le PCR Mix peut être utilisé pendant 5 sessions de travail indépendantes de 3 heures chacune ou peut être conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant un maximum de 3 sessions de travail consécutives de 3 heures chacune. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes avant de commencer la session d'analyse suivante.

B. Analyse d'amplification

Pour paramétrer l'analyse d'amplification à partir des échantillons élués, suivre les étapes ci-dessous tout en se reportant à la GUI.

1. Si nécessaire, décongeler les échantillons d'acide nucléique extraits à température ambiante (environ +25 °C).
2. Décongeler les tubes de VZV Q - PCR Mix nécessaires à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer 24 réactions dans des conditions optimisées (2 tests ou plus par session d'analyse). Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.

Remarque : garder le VZV Q - PCR Mix à l'abri de la lumière lors de la décongélation car ce réactif est photosensible.

3. Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
4. Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initial) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élution extrait) est de 100 µL.
5. Pour chaque « Track » (Position) d'intérêt, renseigner le « SampleID » (SID) (ID échantillon) en le saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.
6. Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (c'est-à-dire VZV ELITe_PL_200_100).
7. Sélectionner « PCR Only » (PCR uniquement) dans la colonne « Protocol » (Protocole).
8. Vérifier que la position de chargement de l'échantillon élué dans la colonne « Sample Position » (Position échantillons) est « Extra Tube (bottom row) » (Tube supplémentaire [ligne du bas]). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
9. Charger le VZV Q-PCR Mix sur le Inventory Block (Bloc inventaire) en se reportant à la Load List (Liste de chargement) et saisir le numéro de lot et la date de péremption du réactif ainsi que le nombre de réactions pour chaque tube. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
10. Vérifier les cônes dans les « Tip Racks » (Portoirs de cônes) de la « Inventory Area » (Zone inventaire) et remplacer le(s) portoir(s) de cônes si nécessaire. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
11. Charger les « **PCR Cassettes** » (Cassettes de PCR) et les échantillons d'acide nucléique extraits en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
12. Fermer le tiroir de l'instrument.
13. Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

Au terme de la session d'analyse, 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 : à la fin de l'analyse, l'échantillon extrait restant peut être retiré de l'instrument, bouché et conservé à -20 °C. Éviter tout déversement de l'échantillon extrait.

Remarque : à la fin de l'analyse, les PCR Cassettes (Cassettes de PCR) et les consommables doivent être mis au rebut conformément à l'ensemble des réglementations gouvernementales et environnementales. Éviter tout déversement des produits de la réaction.

Remarque : le PCR Mix peut être utilisé pendant 5 sessions de travail indépendantes de 3 heures chacune ou peut être conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant un maximum de 3 sessions de travail consécutives de 3 heures chacune. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes avant de commencer la session d'analyse suivante.

C. Analyse d'étalonnage

Pour paramétrer l'analyse d'amplification des calibrateurs, suivre les étapes ci-dessous tout en se reportant à la GUI :

1. Décongeler les tubes de VZV Q - PCR Mix nécessaires à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes. Chaque tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions optimisées (2 tests ou plus par session d'analyse). Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.

Remarque : garder le VZV Q - PCR Mix à l'abri de la lumière lors de la décongélation car ce réactif est photosensible.

2. Décongeler les tubes de VZV Q - PCR Standard (Cal1 : VZV Q - PCR Standards 10^2, Cal2 : VZV Q - PCR Standards 10^3, Cal3 : VZV Q - PCR Standards 10^4, Cal4 : VZV Q - PCR Standards 10^5) à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer 4 sessions d'analyse. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
3. Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
4. Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initial) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élution extrait) est de 100 µL.
5. Attribuer la position, sélectionner le protocole de test « VZV ELITe_STD » dans la colonne « Assay » (Test) et saisir le numéro de lot et la date de péremption du réactif. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
6. Charger le VZV Q-PCR Mix sur le « Inventory Block » (Bloc inventaire) en se reportant à la Load List (Liste de chargement) et saisir le numéro de lot et la date de péremption du réactif ainsi que le nombre de réactions pour chaque tube. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
7. Vérifier les cônes dans les « Tip Racks » (Portoirs de cônes) de la « Inventory Area » (Zone inventaire) et remplacer le(s) portoir(s) de cônes si nécessaire. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
8. Charger les tubes de **Calibrator** (Calibrateur) et les **PCR Cassettes** (Cassettes de PCR) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage. Veiller à charger les tubes de PCR Standard aux positions correctes comme indiqué par la GUI.
9. Fermer le tiroir de l'instrument.
10. Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

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

Lorsque le système est inactif, il est possible d'ouvrir le tiroir (Fin de l'analyse) et de retirer les consommables de l'instrument.

Remarque : à la fin de l'analyse, les calibrateurs restants peuvent être retirés de l'instrument, bouchés et conservés à -20 °C.

Remarque : les calibrateurs peuvent être utilisés pendant 4 sessions d'analyse distinctes de 3 heures chacune.

Remarque : à la fin de l'analyse, les PCR Cassettes (Cassettes de PCR) et les autres consommables doivent être éliminés conformément à toutes les réglementations gouvernementales et environnementales. Éviter de renverser les produits de réaction.

Remarque : le PCR Mix peut être utilisé pendant 5 sessions de travail indépendantes de 3 heures chacune ou peut être conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant un maximum de 3 sessions de travail consécutives de 3 heures chacune. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes avant de commencer la session d'analyse suivante.

D. Analyse d'amplification du Contrôle positif et du Contrôle négatif

Pour paramétrer l'analyse d'amplification du Contrôle positif et du Contrôle négatif, suivre les étapes ci-dessous tout en se reportant à la GUI :

1. Décongeler les tubes de VZV Q - PCR Mix nécessaires à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes. Chaque flacon permet d'effectuer 24 réactions dans des conditions optimisées (2 tests ou plus par session d'analyse). Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.

Remarque : garder le VZV Q - PCR Mix à l'abri de la lumière lors de la décongélation car ce réactif est photosensible.

2. Décongeler le produit VZV - Positive Control à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer 4 sessions d'analyse. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
3. Préparer le VZV Negative Control en transférant au minimum 50 µL d'eau de qualité biologie moléculaire dans un « Elution tube » (Tube d'élution) fourni avec le ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
4. Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
5. Pour le contrôle positif, attribuer la position, sélectionner le protocole de test « VZV ELITe_PC » dans la colonne « Assay » (Test) et saisir le numéro de lot et la date de péremption du réactif.
6. Pour le contrôle négatif, attribuer la position, sélectionner le protocole de test « VZV ELITe_NC » dans la colonne « Assay » (Test) et saisir le numéro de lot et la date de péremption du réactif.

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS035PLD

Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.

7. Charger le VZV Q-PCR Mix sur le Inventory Block (Bloc inventaire) sélectionné en se reportant à la Load List (Liste de chargement) et saisir le numéro de lot et la date de péremption du réactif ainsi que le nombre de réactions pour chaque tube. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
8. Vérifier les cônes dans les « Tip Racks » (Portoirs de cônes) de la « Inventory Area » (Zone inventaire) et remplacer le(s) portoir(s) de cônes si nécessaire. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
9. Charger la **PCR cassette** (Cassette de PCR), le tube **Positive Control** (Contrôle positif) et le tube **Negative Control** (Contrôle négatif) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
10. Fermer le tiroir de l'instrument.
11. Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

Au terme de la session d'analyse, le système **ELITe InGenius** permet de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, puis d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

Remarque : le contrôle positif doit être analysé en tant que contrôle d'amplification, pour paramétrer le « Control Chart » (Graphique de contrôle). Quatre (4) valeurs de contrôle positif, provenant de 4 analyses différentes, sont requises pour configurer le graphique. Ensuite, les valeurs du contrôle positif sont utilisées pour surveiller l'étape d'amplification. Se reporter au manuel d'utilisation de instrument pour plus de détails.

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

Remarque : le Contrôle positif peut être utilisé pendant 4 sessions d'analyse distinctes de 3 heures chacune.

Remarque : à la fin de l'analyse, les PCR Cassettes (Cassettes de PCR) et les autres consommables doivent être éliminés conformément à toutes les réglementations gouvernementales et environnementales. Éviter de renverser les produits de réaction.

Remarque : le PCR Mix peut être utilisé pendant 5 sessions de travail indépendantes de 3 heures chacune ou peut être conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant un maximum de 3 sessions de travail consécutives de 3 heures chacune. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes avant de commencer la session d'analyse suivante.

Examen et approbation des résultats

Le système **ELITe InGenius** surveille les signaux de fluorescence cibles et du contrôle interne pour chaque réaction et applique automatiquement les paramètres du protocole de test pour générer des courbes de PCR qui sont ensuite interprétées en résultats.

À la fin de l'analyse, l'écran « Results Display » (Affichage des résultats) s'affiche automatiquement. Dans cet écran, les résultats de l'échantillon/du calibrateur/des contrôles et les informations concernant l'analyse sont affichés. À partir de cet écran, les résultats peuvent être approuvés et les rapports imprimés ou enregistrés (« Sample Report » [Rapport échantillons] ou « Track Report » [Rapport des positions]). Pour plus de détails, voir le manuel de l'instrument.

Remarque : le système **ELITe InGenius** peut être connecté au « Système de gestion des informations de laboratoire » (LIS) qui permet de charger les résultats de la session d'analyse pour les transmettre au centre de données du laboratoire. Pour plus de détails, voir le manuel de l'instrument.

Remarque : pour obtenir des informations détaillées, se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument **ELITe InGenius**.

L'instrument **ELITe InGenius** génère les résultats à l'aide du produit **VZV ELITe MGB® Kit** en exécutant la procédure suivante :

A. Validation de la courbe d'étalonnage,
B. Validation des résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif d'amplification,
C. Validation des résultats de l'échantillon,
D. Rapport des résultats de l'échantillon.

A. Validation de la courbe d'étalonnage

Le **logiciel ELITe InGenius** interprète les résultats de la PCR pour la sonde spécifique au VZV (« VZV ») et la sonde du contrôle interne spécifique (« IC ») dans la réaction d'amplification des calibrateurs avec les paramètres de protocole de test VZV ELITe_STD. Les valeurs Ct résultantes sont utilisées pour valider le système (lots de réactifs et instrument).

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS035PLD

La courbe d'étalonnage, spécifique au lot de réactifs de PCR, est enregistrée dans la base de données (Controls [Contrôles]). Ils peuvent être visualisés et approuvés par des utilisateurs « Administrator » (Administrateur) ou « Analyst » (Analyste) en suivant les instructions de la GUI.

Les résultats de la courbe d'étalonnage expirent **au bout de 60 jours**.

Avant d'analyser un échantillon, il est indispensable de vérifier que la courbe d'étalonnage est approuvée et valide pour le lot de réactifs de PCR. Le statut des résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif pour chaque lot de réactifs de PCR est affiché dans le module « Controls » (Contrôles). Si les résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif sont manquants ou ont expiré, analyser le(s) contrôle(s) comme décrit ci-dessus.

Remarque : si la courbe d'étalonnage ne répond pas aux critères d'acceptation, le message « Failed » (Échec) s'affiche dans l'écran « Calibration » (Étalonnage). Dans ce cas, les résultats ne peuvent pas être approuvés et les réactions d'amplification du calibrateur doivent être répétées.

Remarque : si la courbe d'étalonnage est analysée avec des échantillons et que son résultat est non valide, l'intégralité de la session d'analyse est non valide et l'amplification de tous les échantillons doit être répétée.

B. Validation des résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif d'amplification

Le **logiciel ELITe InGenius** interprète les résultats de la PCR pour la sonde spécifique au VZV (« VZV ») et la sonde du contrôle interne spécifique (« IC ») dans la réaction d'amplification du Contrôle positif et Contrôle négatif avec les paramètres des protocoles de test VZV ELITe_PC et VZV ELITe_NC. Les valeurs Ct résultantes sont utilisées pour valider le système (lots de réactifs et instrument).

Les résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif, spécifiques au lot de réactifs de PCR, sont enregistrés dans la base de données (Controls [Contrôles]). Ils peuvent être visualisés et approuvés par des utilisateurs « Administrator » (Administrateur) ou « Analyst » (Analyste) en suivant les instructions de la GUI.

Les résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif expirent au bout de **15 jours**.

Avant d'analyser un échantillon, il est indispensable de vérifier que les résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif sont approuvés et valides pour le lot de réactifs de PCR. Le statut des résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif pour chaque lot de réactifs de PCR est affiché dans le module « Controls » (Contrôles). Si les résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif sont manquants ou ont expiré, analyser le(s) contrôle(s) comme décrit ci-dessus.

Le **logiciel ELITe InGenius** traite les résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif et génère des graphiques de contrôle. Quatre résultats de Contrôle positif et de Contrôle négatif approuvés sont utilisés pour configurer le tableau de contrôle initial. Pour les contrôles ultérieurs, les résultats sont analysés par le logiciel pour s'assurer que les performances du système sont conformes aux critères d'acceptation, indiqués dans les tracés du tableau de contrôle. Pour plus de détails, voir le manuel de l'instrument.

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

Remarque : si le résultat du Contrôle positif ou du Contrôle négatif n'est pas valide et que des échantillons ont été inclus dans la même analyse, les échantillons peuvent être approuvés mais leurs résultats ne sont pas validés. Dans ce cas, le(s) contrôle(s) en échec et les échantillons doivent tous être répétés.

C. Validation des résultats des échantillons

Le logiciel ELITe InGenius interprète les résultats de la PCR pour la sonde VZV (canal « VZV ») et la sonde de contrôle interne (canal « IC ») avec les paramètres de protocole de test VZV ELITe_WB_200_100, VZV ELITe_PL_200_100 et VZV ELITe_CSF_200_100 Les valeurs Ct du VZV résultantes sont converties en concentration.

Les résultats sont présentés dans le module « Result Display » (Affichage des résultats).

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

1) Courbe d'étalonnage	Statut
VZV Q - PCR Standard	APPROUVÉ
2) Contrôle positif	**Statut**
VZV - Positive Control	APPROUVÉ
3) Contrôle négatif	**Statut**
VZV - Negative Control	APPROUVÉ

Les résultats des échantillons sont automatiquement interprétés par le **logiciel ELITe InGenius** en utilisant les paramètres du protocole de test. Les messages de résultat possibles sont répertoriés dans le tableau ci-dessous.

Résultat de l'analyse de l'échantillon	Interprétation
VZV: DNA Detected, quantity equal to XXX copies / mL (VZV : ADN détecté, quantité égale à XXX copies/mL)	**L'ADN du VZV a été détecté** dans la plage de mesure du test ; la quantité est celle affichée.
VZV: DNA Detected, quantity below LLoQ copies / mL (VZV : ADN détecté, quantité inférieure au nombre de copies/mL de la LLoQ)	**L'ADN du VZV a été détecté** en une quantité inférieure à la limite inférieure de quantification du test.
VZV: DNA Detected, quantity beyond ULoQ copies / mL (VZV : ADN détecté, quantité supérieure au nombre de copies/mL de la ULoQ)	**L'ADN du VZV a été détecté** en une quantité supérieure à la limite supérieure de quantification du test.
VZV: DNA Not Detected or below LoD copies / mL (VZV : ADN non détecté ou inférieur au nombre de copies/mL de la LoD)	**L'ADN du VZV n'a pas été détecté** dans l'échantillon. L'échantillon est négatif pour l'ADN du VZV ou sa concentration est inférieure à la limite de détection du test.
Non valide - Tester à nouveau l'échantillon (Invalid - Retest Sample)	**Résultat d'analyse non valide** en raison d'un échec du Contrôle Interne (en raison, par exemple, d'une extraction incorrecte, d'un transfert d'inhibiteurs). Le test doit être répété.

Les échantillons rapportés comme « VZV: DNA Detected, quantity below LLoQ » (VZV : ADN détecté, quantité inférieure à la LLoQ) ne sont pas appropriés pour une quantification. La concentration de l'ADN du VZV détecté dans l'échantillon est inférieure au niveau auquel il peut être précisément quantifié. Si l'échantillon a été dilué avant l'extraction ou la PCR, il peut être à nouveau testé sans dilution.

Les échantillons rapportés comme « VZV: DNA Detected, quantity beyond ULoQ » (VZV : ADN détecté, quantité supérieure à la ULoQ) ne sont pas appropriés pour une quantification. La concentration de l'ADN du VZV détecté dans l'échantillon est supérieure au niveau auquel il peut être précisément quantifié. L'échantillon peut être dilué avant l'extraction ou la PCR pour être testé à nouveau afin de générer des résultats compris dans la plage linéaire du test.

Les échantillons rapportés comme « VZV DNA Not Detected or below LoD » (ADN du VZV non détecté ou inférieur à la LoD) sont appropriés pour l'analyse mais il n'a pas été possible de détecter l'ADN du VZV. Dans ce cas, l'échantillon peut être négatif pour l'ADN du VZV ou l'ADN du VZV est présent à une concentration inférieure à la limite de détection du test (se reporter à la section « Caractéristiques de performance »).

Les échantillons positifs pour l'ADN du VZV à une concentration inférieure à la LoD, s'ils sont détectés, sont rapportés comme « VZV: DNA Detected, quantity below LLoQ » (VZV : ADN détecté, quantité inférieure à la LLoQ) (se reporter à la section « Caractéristiques de performance »).

Les échantillons rapportés comme « Non valide - Tester à nouveau l'échantillon » (Invalid - Retest Sample) ne sont pas appropriés pour l'interprétation des résultats. Dans ce cas, l'ADN du Contrôle Interne n'a pas été efficacement détecté, ce qui peut être dû à des problèmes lors de l'étape de PCR ou d'extraction (dégradation ou perte d'ADN pendant l'extraction ou inhibiteurs dans l'éluat), ce qui peut générer des résultats incorrects.

S'il reste un volume d'éluat suffisant, l'éluat peut être à nouveau testé (pur ou dilué), par une analyse d'amplification en mode « PCR Only » (PCR uniquement). Si le deuxième résultat est non valide, l'échantillon doit être à nouveau testé en procédant à l'extraction d'un nouvel échantillon en utilisant le mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

N.B. : 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 (Result Display [Affichage des résultats]) par du personnel disposant des privilèges « Administrator » (Administrateur) ou « Analyst » (Analyste) en suivant les instructions de la GUI. Dans la fenêtre « Result Display » (Affichage des résultats), il est possible d'imprimer et d'enregistrer les résultats de l'analyse des échantillons sous forme de « Sample Report » (Rapport échantillons) et « Track Report » (Rapport des positions).

D. Rapport des résultats des échantillons

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

Le « Sample Report » (Rapport échantillons) présente les détails d'une analyse d'échantillons triés par ID échantillon (SID).

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

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

ELITe BeGenius

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES

Échantillons

Ce produit doit être utilisé avec les échantillons cliniques suivants :

Sang total prélevé sur EDTA

Les échantillons de sang total pour l'extraction de l'ADN doivent être prélevés sur de l'EDTA et être identifiés conformément aux directives de laboratoire. Ils doivent être transportés entre +2 et +8 °C et conservés entre +2 et +8 °C pendant trois jours au maximum. Sinon, ils doivent être congelés et conservés à -20 °C pendant trente jours au maximum ou à -70 °C pour des périodes plus longues.

Il est recommandé de diviser les échantillons en aliquotes avant la congélation afin d'éviter des cycles répétés de congélation et de décongélation. En cas d'utilisation d'échantillons congelés, les décongeler juste avant l'extraction afin d'éviter une éventuelle dégradation des acides nucléiques.

Remarque : lorsque l'extraction d'ADN à partir de sang total est effectuée avec l'instrument **ELITe BeGenius** et avec le **logiciel ELITe BeGenius** version **2.0.0** (ou versions équivalentes ultérieures), utiliser le protocole d'extraction **VZV ELITe_Be_WB_200_100.** Ce protocole comprend le traitement de 200 µL d'échantillon, l'ajout du **CPE** Internal Control (contrôle interne) à 10 µL/extraction et l'élution des acides nucléiques dans 100 µL.

Lorsque le tube primaire est utilisé, le volume de l'échantillon varie en fonction du type de tube chargé. Se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction pour obtenir de plus amples informations.

Plasma prélevé sur EDTA

Les échantillons de plasma pour l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés sur de l'EDTA conformément aux directives de laboratoire. Ils doivent être transportés entre +2 et +8 °C et conservés entre +2 et +8 °C pendant trois jours au maximum. Sinon, ils doivent être congelés et conservés à -20 °C pendant trente jours au maximum ou à -70 °C pour des périodes plus longues.

Il est recommandé de diviser les échantillons en aliquotes avant la congélation afin d'éviter des cycles répétés de congélation et de décongélation. En cas d'utilisation d'échantillons congelés, les décongeler juste avant l'extraction afin d'éviter une éventuelle dégradation des acides nucléiques.

Remarque : lorsque l'extraction d'ADN à partir de sang total est effectuée avec l'instrument **ELITe BeGenius** et avec le **logiciel ELITe BeGenius** version **2.0.0** (ou versions équivalentes ultérieures), utiliser le protocole d'extraction **VZV ELITe_Be_PL_200_100.** Ce protocole comprend le traitement de 200 µL d'échantillon, l'ajout du **CPE** Internal Control (contrôle interne) à 10 µL/extraction et l'élution des acides nucléiques dans 100 µL.

Lorsque le tube primaire est utilisé, le volume de l'échantillon varie en fonction du type de tube chargé. Se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction pour obtenir de plus amples informations.

Liquide céphalorachidien

Les échantillons de LCR pour l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés conformément aux directives de laboratoire en évitant toute contamination par le sang du patient. Ils doivent être transportés entre +2° et +8 °C et conservés entre +2° et +8 °C pendant quatre heures au maximum. Sinon, ils doivent être congelés et conservés à -20 °C pendant trente jours au maximum ou à -70 °C pour des périodes plus longues.

Il est recommandé de diviser les échantillons en aliquotes avant la congélation afin d'éviter des cycles répétés de congélation et de décongélation. En cas d'utilisation d'échantillons congelés, les décongeler juste avant l'extraction afin d'éviter une éventuelle dégradation des acides nucléiques.

Remarque : lorsque l'extraction de l'ARN à partir de liquide céphalorachidien est effectuéeà l'aide du système **ELITe BeGenius** et du **logiciel ELITe BeGenius** version **2.0.0** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **VZV ELITe_Be_CSF_200_100**. Ce protocole traite 200 µL d'échantillon, ajoute le **CPE Internal Control** (contrôle interne) à 10 µL/extraction et effectue l'élution des acides nucléiques dans 100 µL.

Autres échantillons :
Il n'existe actuellement aucune donnée disponible en ce qui concerne les performances du produit avec d'autres échantillons cliniques, par exemple échantillons de lésions mucocutanées prélevés à l'écouvillon, liquide amniotique.

Substances interférentes

L'échantillon ne doit pas contenir d'héparine afin de prévenir le problème d'inhibition et la possibilité de génération fréquente de résultats non valides.

Il n'existe actuellement aucune donnée disponible en ce qui concerne l'inhibition provoquée par des médicaments antiviraux, antibiotiques, de chimiothérapie ou immunosuppresseurs.

Calibrateurs et contrôles d'amplification

Une validation des réactifs doit être générée et approuvée pour chaque lot de réactifs de PCR.

- Pour le jeu de calibrateurs, utiliser les quatre niveaux de concentration du **VZV ELITe Standard**, avec le protocole de test **VZV ELITe_Be_STD** pour le système **ELITe BeGenius,**
- pour le Contrôle positif, utiliser le **VZV - ELITe Positive Control**, avec le protocole de test **VZV ELITe_Be_PC** pour le système **ELITe BeGenius,**
- pour le Contrôle négatif, utiliser de l'eau de qualité biologie moléculaire (non incluse dans ce kit) avec le protocole de test **VZV ELITe_Be_NC** pour le système **ELITe BeGenius.**

Remarque : le système **ELITe BeGenius** permet de générer et de stocker la courbe d'étalonnage et de valider les contrôles de la PCR pour chaque lot de réactifs de PCR.
Les résultats de la courbe d'étalonnage expirent au bout de **60 jours**, après quoi il est nécessaire de réanalyser les étalons Q-PCR Standards en association avec le lot de réactifs d'amplification.
Les résultats des contrôles d'amplification expirent au bout de **15 jours**, après quoi il est nécessaire de réanalyser les étalons Q-PCR Standards en association avec le lot de réactifs d'amplification.
En outre, les calibrateurs et les contrôles d'amplification doivent être réanalysés lorsque :

- un nouveau lot de réactifs est utilisé,
- les résultats de l'analyse du contrôle de qualité (se reporter au paragraphe suivant) sont en dehors des spécifications,
- l'instrument 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. Les contrôles externes doivent être utilisés conformément aux exigences des organismes d'accréditation locaux, régionaux et nationaux en vigueur.

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS035PLD

PROCÉDURE AVEC LE SYSTÈME ELITe BeGenius

L'utilisation du **VZV ELITe MGB Kit** avec le système **ELITe BeGenius** comprend trois étapes :

- Vérification de la préparation du système
- Paramétrage de la session d'analyse
- Examen et exportation des résultats.

Vérification de la préparation du système

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

- mettre le système **ELITe BeGenius** en marche et se connecter en mode « **CLOSED** » (FERMÉ) ;
- vérifier que les calibrateurs d'amplification (**VZV Q-PCR Standard**) sont approuvés et valides (Status [Statut]) pour le lot de **VZV Q-PCR Mix** à utiliser. Si aucun calibrateur valide n'est disponible pour le lot de **VZV Q-PCR Mix**, effectuer une calibration comme décrit ci-dessous,
- vérifier que les contrôles d'amplification (**VZV Positive Control**, **VZV Negative Control**) sont approuvés et valides (Status [Statut]) pour le lot de **VZV PCR Mix** à utiliser. Si aucun contrôle d'amplification valide n'est disponible pour le lot de **VZV Q-PCR Mix**, analyser les contrôles comme décrit ci-dessous,
- choisir le type d'analyse, suivre les instructions de l'interface graphique (GUI) pour le paramétrage de la session d'analyse et utiliser les protocoles de test fournis par ELITechGroup S.p.A. Ces protocoles de DIV ont été spécifiquement validés avec les kits ELITe MGB, l'instrument **ELITe BeGenius** et les matrices indiquées.

Les protocoles de test disponibles pour tester des échantillons à l'aide du produit **VZV ELITe MGB Kit** sont décrits dans le tableau ci-dessous :

Protocoles de test pour le VZV ELITe MGB Kit avec le système ELITe BeGenius

Nom	Matrice	Unités du rapport	Caractéristiques
VZV ELITe_Be_WB_200_100	Sang total	copies/mL	Volume d'extraction initial : 200 µL Volume d'élution extrait : 100 µL Contrôle Interne : 10 µL Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de l'échantillon PCR : 20 µL
VZV ELITe_Be_PL_200_100	Plasma	copies/mL	Volume d'extraction initial : 200 µL Volume d'élution extrait : 100 µL Contrôle Interne : 10 µL Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de l'échantillon PCR : 20 µL
VZV ELITe_Be_CSF_200_100	LCR	copies/mL	Volume d'extraction initial : 200 µL Volume d'élution extrait : 100 µL Contrôle Interne : 10 µL Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de l'échantillon PCR : 20 µL

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

Des protocoles d'analyse qualitative sont disponibles sur demande.

Paramétrage de la session d'analyse

Le produit **VZV ELITe MGB Kit** peut être utilisé sur le système **ELITe BeGenius** pour les opérations suivantes :

A. Analyse intégrée (« Extract + PCR » [Extraction + PCR]),
B. Analyse d'amplification (« PCR Only » [PCR uniquement]),
C. Analyse d'étalonnage (« PCR Only » [PCR uniquement]),
D. Analyse d'amplification du Contrôle positif et du Contrôle négatif (« PCR Only » [PCR uniquement]).

Tous les paramètres requis 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 BeGenius** peut être connecté au « système de gestion des informations de laboratoire » (LIS) qui permet de charger les informations relatives à la session d'analyse. Se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument pour plus de détails.

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

A. Analyse intégrée (« Extract + PCR » [Extraction + PCR])

Pour paramétrer l'analyse intégrée avec une extraction et une amplification d'échantillon, suivre les étapes ci-dessous tout en se reportant à la GUI :

1. Identifier les échantillons nécessaires et les manipuler conformément aux directives du laboratoire et à la section « Échantillons et contrôles ».
2. Décongeler les tubes de **VZV Q-PCR Mix** nécessaires à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer 24 réactions dans des conditions optimisées (2 tests ou plus par session d'analyse). Mélanger délicatement puis centrifuger le contenu pendant 5 secondes.

Remarque : garder le VZV Q - PCR Mix à l'abri de la lumière lors de la décongélation car ce réactif est photosensible.

3. Décongeler les tubes de CPE nécessaires à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer 12 extractions. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
4. Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
5. Retirer les portoirs de la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement) et les placer sur la table de préparation.
6. Sélectionner le mode d'analyse : « Extract + PCR » (Extraction + PCR).
7. Charger les échantillons dans le « **Sample Rack** » (Portoir d'échantillons).

Remarque : lorsque des tubes secondaires « **2 mL Tube** » (Tube de 2 mL) sont chargés, utiliser les adaptateurs bleus pour le « **Sample Rack** » (Portoir d'échantillons).

8. Insérer le « **Sample Rack** » (Portoir d'échantillons) dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement), en commençant par la « Lane 5 » (Piste 5) (L5), en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
9. Si nécessaire, insérer le « Sample ID » (ID échantillon) (SID) pour chaque « Position » utilisée.

Remarque : si des tubes secondaires sont chargés, les marquer « **2 mL Tube** ». Si les tubes secondaires ne portent pas de codes-barres, saisir manuellement le « Sample ID » (ID échantillon).

10. Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initial) est de 200 µL et que le « Extraction Elution Volume » (Volume d'élution extrait) est de 100 µL.
11. Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (c'est-à-dire **VZV ELITe_Be_WB_200_100**). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
12. Charger les **« Elution tubes »** (Tubes d'élution) dans le **« Elution Rack »** (Portoir d'élution).

Remarque : les tubes d'élution peuvent être étiquetés avec un code-barres pour améliorer la traçabilité.

13. Insérer le **« Elution Rack »** (Portoir d'élution) dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement), en commençant par la « Lane 3 » (Piste 3) (L3), en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
14. Charger le **CPE** et le **VZV Q-PCR Mix** dans le **« Reagent/Elution Rack »** (Portoir de réactifs/d'élution).

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS035PLD

15. Insérer le **« Reagent/Elution Rack »** (Portoir de réactifs/d'élution) dans la « Lane 2 » (Piste 2) (L2) de la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
16. Si nécessaire, pour chaque réactif PCR Mix, saisir le « S/N » (numéro de série), le « Lot No. » (numéro de lot), la « Exp. Date » (date de péremption) et le « T/R » (nombre de réactions).
17. Vérifier les cônes dans les **« Tip Racks »** (Portoirs de cônes) de la « Inventory Area » (Zone inventaire) et remplacer le(s) portoir(s) de cônes si nécessaire. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
18. Charger le **« PCR Basket »** (Panier de PCR) avec la **« PCR Cassette »** (Cassette de PCR) dans la Inventory Area (Zone inventaire) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
19. Charger le **« Extraction Basket »** (Panier d'extraction) avec les cartouches d'extraction **ELITe InGenius SP 200** et les consommables d'extraction requis en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
20. Fermer le tiroir de l'instrument.
21. Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

Au terme de la session d'analyse, le système **ELITe BeGenius** permet aux utilisateurs de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, puis d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

Remarque : à la fin de l'analyse, l'échantillon extrait restant dans le « Elution tube » (Tube d'élution) doit être retiré de l'instrument, bouché, identifié et conservé à -20 °C.

Remarque : à la fin de l'analyse, la **PCR Cassette** (Cassette de PCR) et les consommables doivent être éliminés conformément à toutes les réglementations gouvernementales et environnementales. Éviter tout déversement des produits de la réaction.

Remarque : le PCR Mix peut être utilisé pendant 5 sessions de travail indépendantes de 3 heures chacune ou peut être conservé dans la Cooler Unit (Unité de refroidissement) de l'instrument pendant un maximum de 3 sessions de travail consécutives de 3 heures chacune. Avant de commencer une nouvelle session d'analyse, mélanger délicatement et centrifuger le contenu pendant 5 secondes.

B. Analyse d'amplification (« PCR Only » [PCR uniquement])

Pour paramétrer l'analyse d'amplification avec des échantillons élués, effectuer les étapes suivantes tout en se reportant à la GUI :

1. Si nécessaire, décongeler les échantillons élués à température ambiante (environ +25 °C). Mélanger délicatement puis centrifuger le contenu pendant 5 secondes.
2. Décongeler les tubes de **VZV Q - PCR Mix** nécessaires à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer 24 réactions dans des conditions optimisées (2 tests ou plus par session d'analyse). Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.

Remarque : garder le **VZV Q - PCR Mix** à l'abri de la lumière lors de la décongélation car ce réactif est photosensible.

3. Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
4. Retirer les « **Racks** » (Portoirs) des « Lane 1, 2 and 3 » (Pistes 1, 2 et 3) (L1, L2, L3) de la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement) et les placer sur la table de préparation.
5. Sélectionner le « Run mode: PCR Only » (Mode d'analyse : PCR uniquement).
6. Charger les échantillons dans le « **Elution Rack** » (Portoir d'élution).
7. Insérer le « **Elution Rack** » (Portoir d'élution) dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement), en commençant par la « Lane 3 » (Piste 3) (L3), en suivant les instructions de la GUI.
8. Si nécessaire, pour chaque position, saisir le « Sample ID » (ID de l'échantillon), la « Sample Matrix » (Matrice d'échantillon), le « Extraction kit » (Kit d'extraction) et le « Extracted eluate vol. » (Volume d'éluat extrait).
9. Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initial) est de 200 µL et que le « Extraction Elution Volume » (Volume d'élution extrait) est de 100 µL, même si aucune extraction n'est réalisée.
10. Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (par ex. **VZV ELITe_Be_WB_200_100**). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
11. Charger le **VZV Q-PCR Mix** dans le « Reagent/Elution Rack » (Portoir de réactifs/d'élution).

12. Insérer le « **Reagent/Elution Rack** » (Portoir de réactifs/d'élution) dans la « Lane 2 » (Piste 2) (L2) de la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
13. Si nécessaire, pour chaque réactif PCR Mix, saisir le « S/N » (numéro de série), le « Lot No. » (numéro de lot), la « Exp. Date » (date de péremption) et le « T/R » (nombre de réactions).
14. Vérifier les cônes dans les « **Tip Racks** » (Portoirs de cônes) de la « Inventory Area » (Zone inventaire) et remplacer le(s) portoir(s) de cônes si nécessaire. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
15. Charger le **« PCR Basket »** (Panier de PCR) avec la **« PCR Cassette »** (Cassette de PCR) dans la Inventory Area (Zone inventaire) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
16. Fermer le tiroir de l'instrument.
17. Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

Au terme de la session d'analyse, le système **ELITe BeGenius** permet aux utilisateurs de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, puis d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

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

Remarque : à la fin de l'analyse, les **PCR Cassettes** (Cassettes de PCR) et les consommables doivent être éliminés conformément à toutes les réglementations gouvernementales et environnementales. Éviter tout déversement des produits de la réaction.

Remarque : le PCR Mix peut être utilisé pendant 5 sessions de travail indépendantes de 3 heures chacune ou peut être conservé dans la Cooler Unit (Unité de refroidissement) de l'instrument pendant un maximum de 3 sessions de travail consécutives de 3 heures chacune. Avant de commencer une nouvelle session d'analyse, mélanger délicatement et centrifuger le contenu pendant 5 secondes.

C. Analyse d'étalonnage (« PCR Only » [PCR uniquement])

Pour paramétrer l'analyse d'étalonnage avec les étalons Q-PCR Standards, effectuer les étapes suivantes comme indiqué par la GUI :

1. Décongeler les étalons **VZV Q - PCR Standards** (Cal1 : VZV Q-PCR Standards 10^2, Cal2 : VZV Q-PCR Standards 10^3, Cal3 : VZV Q-PCR Standards 10^4, Cal4 : VZV Q-PCR Standards 10^5) à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer 4 sessions d'analyse. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
2. Décongeler les tubes de **VZV Q-PCR Mix** nécessaires à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer 24 réactions dans des conditions optimisées (2 tests ou plus par session d'analyse). Mélanger délicatement puis centrifuger le contenu pendant 5 secondes.

Remarque : garder le **VZV Q-PCR Mix** à l'abri de la lumière lors de la décongélation car ce réactif est photosensible.

1. Retirer les « **Racks** » (Portoirs) des « Lane 1, 2 and 3 » (Pistes 1, 2 et 3) (L1, L2, L3) de la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement) et les placer sur la table de préparation.
2. Sélectionner le « Run mode: PCR Only » (Mode d'analyse : PCR uniquement).
3. Charger les étalons de calibration dans le « **Elution Rack** » (Portoir d'élution).
4. Insérer le « **Elution Rack** » (Portoir d'élution) dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement), en commençant par la « Lane 3 » (Piste 3) (L3), en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
5. Si nécessaire, pour chaque « Position », saisir le « Reagent name » (Nom du réactif) et le « S/N » (numéro de série), le « Lot No. » (numéro de lot), la « Exp. Date » (date de péremption) et le « T/R » (nombre de réactions).
6. Même si aucune extraction n'est réalisée, vérifier le Extraction Input Volume (Volume d'extraction initial) (200 µL) et le Extracted Elute Volume (Volume d'élution extrait) (100 µL).
7. Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (**VZV ELITe_Be_STD**). Cliquer sur le bouton « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
8. Charger le **VZV Q-PCR Mix** dans le « **Reagent/Elution Rack** » (Portoir de réactifs/d'élution).
9. Insérer le « **Reagent/Elution Rack** » (Portoir de réactifs/d'élution) dans la « Lane 2 » (Piste 2) (L2) de la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS035PLD

10. Vérifier les cônes dans les « **Tip Racks** » (Portoirs de cônes) de la « Inventory Area » (Zone inventaire) et remplacer le(s) portoir(s) de cônes si nécessaire. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
11. Charger le « **PCR Basket** » (Panier de PCR) avec la **« PCR Cassette »** (Cassette de PCR) dans la Inventory Area (Zone inventaire) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
12. Fermer le tiroir de l'instrument.
13. Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

Au terme de la session d'analyse, le système **ELITe BeGenius** permet aux utilisateurs de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, puis d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

Remarque : à la fin de l'analyse, les calibrateurs restants peuvent être retirés de l'instrument, bouchés et conservés à -20 °C. Éviter tout déversement des étalons Q-PCR Standards.

Remarque : à la fin de l'analyse, la **PCR Cassette** (Cassette de PCR) contenant les produits de réaction doit être retirée de l'instrument et mise au rebut en évitant toute contamination environnementale. Éviter tout déversement des produits de la réaction.

Remarque : le Q-PCR Mix peut être utilisé pendant 5 sessions de travail indépendantes de 3 heures chacune ou peut être conservé dans l'unité de refroidissement de l'instrument pendant un maximum de 3 sessions de travail consécutives de 3 heures chacune. Avant de commencer une nouvelle session d'analyse, mélanger délicatement et centrifuger le contenu pendant 5 secondes.

D. Analyse d'amplification du Contrôle positif et du Contrôle négatif (« PCR Only » [PCR uniquement]).

Pour paramétrer l'analyse d'amplification du Contrôle positif et du Contrôle négatif, suivre les étapes ci-dessous tout en se reportant à la GUI :

1. Décongeler le tube de **VZV - ELITe Positive Control** à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer 4 réactions. Mélanger délicatement puis centrifuger le contenu pendant 5 secondes.
2. Transférer au minimum 50 µL d'eau de qualité biologie moléculaire (à titre de contrôle négatif) pour la session d'analyse dans un (1) « Elution tube » (Tube d'élution) fourni dans le kit de consommables **ELITe InGenius SP Consumable Set**.
3. Décongeler les tubes de **VZV Q-PCR Mix** nécessaires à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer 24 réactions dans des conditions optimisées (2 tests ou plus par session d'analyse). Mélanger délicatement puis centrifuger le contenu pendant 5 secondes.

Remarque : garder le **VZV Q - PCR Mix** à l'abri de la lumière lors de la décongélation car ce réactif est photosensible.

4. Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
5. Retirer les « **Racks** » (Portoirs) des « Lane 1, 2 and 3 » (Pistes 1, 2 et 3) (L1, L2, L3) de la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement) et les placer sur la table de préparation.
6. Sélectionner le « Run mode: PCR Only » (Mode d'analyse : PCR uniquement).
7. Charger les tubes de contrôle positif et de contrôle négatif dans le « **Elution Rack** » (Portoir d'élution).
8. Insérer le « **Elution Rack** » (Portoir d'élution) dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement), en commençant par la « Lane 3 » (Piste 3) (L3), en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
9. Si nécessaire, pour chaque « Position », saisir le « Reagent name » (Nom du réactif) et le « S/N » (numéro de série), le « Lot No. » (numéro de lot), la « Exp. Date » (date de péremption) et le « T/R » (nombre de réactions).
10. Même si aucune extraction n'est réalisée, vérifier le Extraction Input Volume (Volume d'extraction initial) (200 µL) et le Extracted Elute Volume (Volume d'élution extrait) (100 µL).
11. Sélectionner le protocole de test **VZV ELITe_Be_PC** et **VZV ELITe_Be_NC** à utiliser dans la colonne « Assay » (Test). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
12. Charger le **VZV Q-PCR Mix** dans le « **Reagent/Elution Rack** » (Portoir de réactifs/d'élution).

13. Insérer le « **Reagent/Elution Rack** » (Portoir de réactifs/d'élution) dans la « Lane 2 » (Piste 2) (L2) de la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
14. Vérifier les cônes dans les « **Tip Racks** » (Portoirs de cônes) de la « Inventory Area » (Zone inventaire) et remplacer le(s) portoir(s) de cônes si nécessaire. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
15. Charger le « **PCR Basket** » (Panier de PCR) avec la **« PCR Cassette »** (Cassette de PCR) dans la Inventory Area (Zone inventaire) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
16. Fermer le tiroir de l'instrument.
17. Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

Au terme de la session d'analyse, le système **ELITe BeGenius** permet aux utilisateurs de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, puis d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

Remarque : à la fin de l'analyse, le Contrôle positif restant peut être retiré de l'instrument, bouché et conservé à -20 °C. Éviter tout déversement des contrôles positifs. Le Contrôle négatif restant doit être jeté.

Remarque : à la fin de l'analyse, les PCR Cassettes (Cassettes de PCR) et les autres consommables doivent être éliminés conformément à toutes les réglementations gouvernementales et environnementales. Éviter de renverser les produits de réaction.

Remarque : le Q-PCR Mix peut être utilisé pendant 5 sessions de travail indépendantes de 3 heures chacune ou peut être conservé dans l'unité de refroidissement de l'instrument pendant un maximum de 3 sessions de travail consécutives de 3 heures chacune. Avant de commencer une nouvelle session d'analyse, mélanger délicatement et centrifuger le contenu pendant 5 secondes.

Examen et approbation des résultats

À la fin de l'analyse, l'écran « Results Display » (Affichage des résultats) s'affiche automatiquement. Cet écran présente les résultats et les informations de l'analyse. À partir de cet écran, les résultats peuvent être approuvés et les rapports imprimés ou enregistrés (« Sample Report » [Rapport échantillons] ou « Track Report » [Rapport des positions]). Pour plus de détails, voir le manuel de l'instrument.

Remarque : le système **ELITe BeGenius** peut être connecté au « Laboratory Information System » (système de gestion des informations de laboratoire) (LIS) qui permet de charger les résultats de la session d'analyse pour les transmettre au centre de données du laboratoire. Pour plus de détails, voir le manuel de l'instrument.

L'instrument **ELITe BeGenius** génère les résultats à l'aide du produit **VZV ELITe MGB Kit** en exécutant les procédures suivantes :

A. Validation de la courbe d'étalonnage,
B. Validation des résultats du Contrôle Positif et du Contrôle Négatif,
C. Validation des résultats de l'échantillon,
D. Rapport des résultats de l'échantillon.

Remarque : pour connaître les détails concernant le système ELITe InGenius, se reporter aux chapitres correspondants relatifs à ce système.

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS035PLD

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE
Systèmes ELITe InGenius et ELITe BeGenius

Sensibilité analytique : Limite de détection (LoD)

La sensibilité analytique de ce test, en tant que limite de détection (LoD) de l'amplification de l'ADN, permet de détecter la présence d'environ 10 copies dans 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La LoD de ce test a été testée en utilisant un ADN plasmidique contenant le produit d'amplification dont la concentration initiale a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. L'ADN plasmidique a été dilué à un titre d'environ 10 copies/20 µL en présence d'ADN plasmidique contenant le contrôle interne à un titre de 150 000 copies/20 µL. Cet échantillon a été testé en 24 réplicats (mode « PCR Only » [PCR uniquement]) en effectuant l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A sur deux instruments différents.
Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
10 copies d'ADN plasmidique + 500 ng d'ADN génomique humain	24	24	0

La limite de détection (LoD) du VZV ELITe MGB Kit a été vérifiée en association avec des échantillons de **plasma**, de **sang total** prélevés sur EDTA et de **LCR** et les systèmes **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** (Mode Extr + PCR)

Pour le sang total :

La LoD de ce test a été vérifiée en testant 20 réplicats d'échantillons de sang total dopés à 117 copies/mL sur les systèmes **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR). Les échantillons ont été dopés en utilisant le matériel de référence certifié du VZV (Acrometrix pour l'ADN du virus de la varicelle et du zona (réf. 954530)).

La LoD était confirmée si au moins 18 des 20 réplicats généraient un résultat positif.
Les résultats sont présentés dans les tableaux suivants.

Limite de détection pour des échantillons de sang total avec le système ELITe InGenius					
Échantillon	**LoD**	**N**	**Valide**	**Positif**	**Négatif**
Sang total prélevé sur EDTA	100 copies/mL	20	20	20	0

Limite de détection pour des échantillons de sang total avec le système ELITe BeGenius					
Échantillon	**LoD**	**N**	**Valide**	**Positif**	**Négatif**
Sang total prélevé sur EDTA	100 copies/mL	20	20	20	0

La valeur de la LoD pour la cible VZV a été confirmée à 100 copies/mL pour le sang total prélevé sur EDTA.

Pour le plasma :

La LoD de ce test a été vérifiée en testant 20 réplicats d'échantillons de plasma dopés à 69 copies/mL sur les systèmes **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR). Les échantillons ont été dopés en utilisant le matériel de référence certifié du VZV (Acrometrix pour l'ADN du virus de la varicelle et du zona (réf. 954530)).

La LoD était confirmée si au moins 18 des 20 réplicats généraient un résultat positif. Les résultats sont présentés dans les tableaux suivants.

Limite de détection pour des échantillons de plasma avec le système ELITe InGenius					
Échantillon	**LoD**	**N**	**Valide**	**Positif**	**Négatif**
Plasma prélevé sur EDTA	69 copies/mL	20	20	20	0

Limite de détection pour des échantillons de plasma avec le système ELITe BeGenius					
Échantillon	**LoD**	**N**	**Valide**	**Positif**	**Négatif**
Plasma prélevé sur EDTA	69 copies/mL	20	20	20	0

La valeur de la LoD pour la cible VZV a été confirmée à 69 copies/mL pour le plasma prélevé sur EDTA.

Pour le liquide céphalorachidien (LCR) :

La LoD de ce test a été vérifiée en testant 20 réplicats d'échantillons de LCR dopés à 69 copies/mL sur les systèmes **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR). Les échantillons ont été dopés en utilisant le matériel de référence certifié du VZV (Zeptometrix pour l'ADN du virus de la varicelle et du zona (réf. 954530)).

La LoD était confirmée si au moins 18 des 20 réplicats généraient un résultat positif.
Les résultats sont présentés dans les tableaux suivants.

Limite de détection pour des échantillons de LCR avec le système ELITe InGenius					
Échantillon	**LoD**	**N**	**Valide**	**Positif**	**Négatif**
LCR	69 copies/mL	20	20	19	1

Limite de détection pour des échantillons de LCR avec le système ELITe BeGenius					
Échantillon	**LoD**	**N**	**Valide**	**Positif**	**Négatif**
LCR	69 copies/mL	20	20	20	0

La valeur de la LoD pour la cible VZV a été confirmée à 69 copies/mL pour le liquide céphalorachidien.

Plage de mesure linéaire et limites de quantification

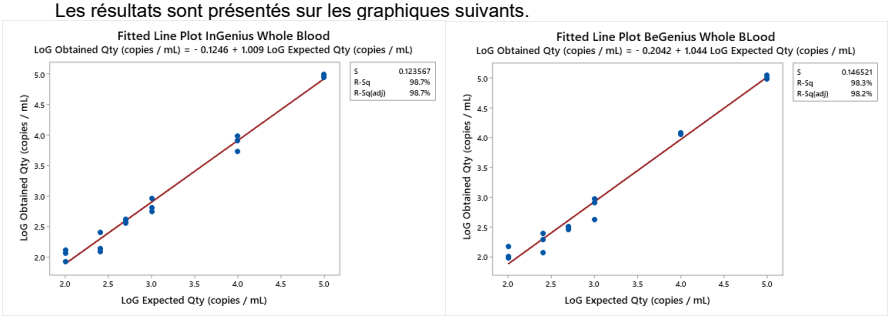
La plage de mesure linéaire du VZV ELITe MGB Kit utilisé en association avec du **sang total**, du **plasma** prélevé sur EDTA et du **LCR** et les systèmes **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** a été vérifiée avec un panel de dilutions du VZV. Le panel a été préparé en utilisant un matériel de référence certifié du VZV (Acrometrix et Zeptometrix pour l'ADN du virus de la varicelle et du zona) dans des matrices négatives pour l'ADN du VZV.

Pour le sang total :

Le panel consistait en six points de dilution à partir de 1 x 10^5 copies/mL jusqu'à environ 1 x 10^2 copies/mL. Chaque échantillon du panel a été testé en 3 réplicats en utilisant un panel préparé à l'aide d'un matériel de référence (Acrometrix pour l'ADN du virus de la varicelle et du zona (réf. 954530)).

L'analyse des données obtenues, utilisant une analyse de régression linéaire, a démontré que le test effectué en association avec des échantillons de sang total présentait une réponse linéaire pour toutes les dilutions avec un coefficient de corrélation R-carré (R2) de 0,987 pour l'instrument **ELITe InGenius** et de 0,983 pour l'instrument **ELITe BeGenius**.

Les résultats sont présentés sur les graphiques suivants.

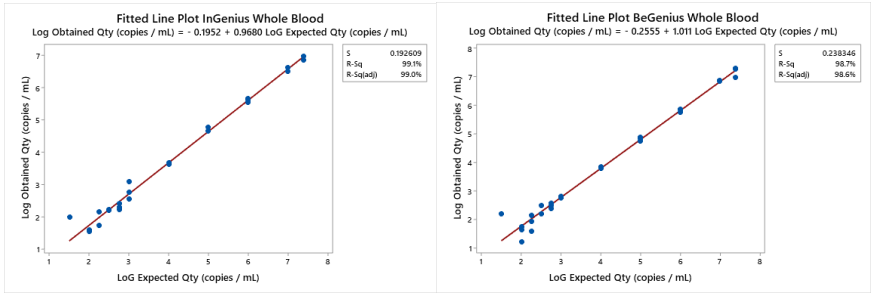


La plage de mesure linéaire du produit VZV ELITe MGB Kit, utilisé en association avec du sang total et les instruments ELITe InGenius et ELITe BeGenius, a été testée sur une plus grande plage de concentrations en utilisant un panel préparé en diluant un ADN plasmidique contenant le produit d'amplification du VZV dans une matrice négative pour l'ADN du VZV. Le panel consistait en dix points de dilution (étapes de dilution de 1 log) à partir de 2,5 x 10^7 à 100 copies/mL pour le sang total. Chaque échantillon du panel a été testé en 3 réplicats.

L'analyse des données obtenues, utilisant une analyse de régression linéaire, a démontré que le test effectué en association avec des échantillons de sang total présentait une réponse linéaire pour toutes les dilutions avec un coefficient de corrélation R-carré (R2) de 0,991 pour l'instrument **ELITe InGenius** et de 0,987 pour l'instrument **ELITe BeGenius**.

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS035PLD



La limite inférieure de quantification (LLoQ) a été définie à la concentration de la LoD qui génère des résultats quantitatifs précis (écart-type égal à 0,2215 log copies/mL pour l'instrument **ELITe InGenius** et à 0,3219 log copies/mL pour l'instrument **ELITe BeGenius**) et exacts (biais égal à 0,1038 log copies/mL pour l'instrument **ELITe InGenius** et à 0,2149 log copies/mL pour l'instrument **ELITe BeGenius**) : 100 copies/mL.

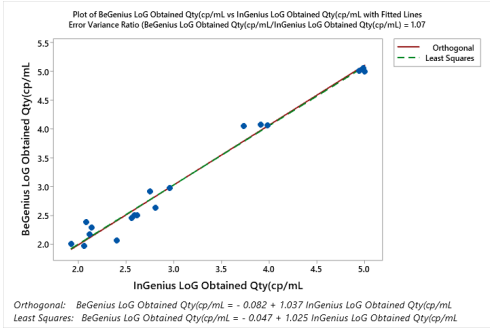
La limite supérieure de quantification (ULoQ) a été définie à la concentration la plus élevée testée qui génère des résultats quantitatifs précis (écart-type égal à 0,0626 log copies/mL pour l'instrument **ELITe InGenius** et à 0,1790 log copies/mL pour l'instrument **ELITe BeGenius**) et exacts (biais égal à 0,4509 log copies/mL pour l'instrument **ELITe InGenius** et à 0,2062 log copies/mL pour l'instrument **ELITe BeGenius**) : 25 000 000 copies/mL.

Les résultats finaux sont résumés dans le tableau suivant.

Plage de mesure linéaire pour les échantillons de sang total avec les instruments ELITe InGenius et ELITe BeGenius		
Unité de mesure	limite inférieure	limite supérieure
copies/mL	**100**	**25 000 000**

Les résultats obtenus avec les instruments **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** ont été analysés par une régression orthogonale et linéaire afin de calculer la corrélation entre les méthodes.

Les résultats sont résumés sur la figure suivante.



Dans ce test, l'analyse de régression orthogonale a été effectuée et générait une ordonnée à l'origine de -0,082 (IC à 95 % : - 0,3286 ; 0,1652) et une pente de 1,037 (IC à 95 % : 0,9608 ; 1,1126). L'analyse de régression linéaire générait un R2 de 0,978.

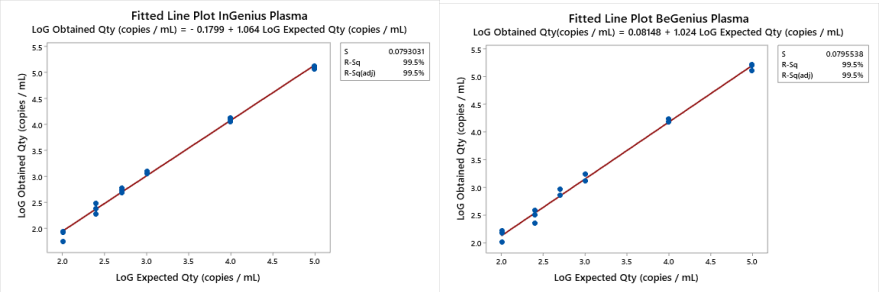
Pour le plasma :

Le panel consistait en six points de dilution à partir de 1 x 10^5 copies/mL jusqu'à environ 1 x 10^2 copies/mL. Chaque échantillon du panel a été testé en 3 réplicats en utilisant un panel préparé à l'aide d'un matériel de référence (Acrometrix pour l'ADN du virus de la varicelle et du zona (réf. 954530)).

L'analyse des données obtenues, utilisant une analyse de régression linéaire, a démontré que le test effectué en association avec des échantillons de plasma présentait une réponse linéaire pour toutes les

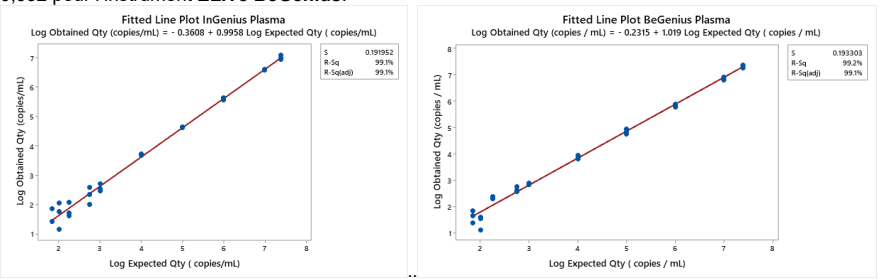
dilutions avec un coefficient de corrélation R-carré (R2) de 0,995 pour l'instrument **ELITe InGenius** et de 0,995 pour l'instrument **ELITe BeGenius**.

Les résultats sont présentés sur les graphiques suivants.



La plage de mesure linéaire du produit VZV ELITe MGB Kit, utilisé en association avec du plasma et les instruments ELITe InGenius et ELITe BeGenius, a été testée sur une plus grande plage de concentrations en utilisant un panel préparé en diluant un ADN plasmidique contenant le produit d'amplification du VZV dans une matrice négative pour l'ADN du VZV. Le panel consistait en dix points de dilution (étapes de dilution de 1 log) à partir de 2,5 x 10^7 à 69 copies/mL. Chaque échantillon du panel a été testé en 3 réplicats.

L'analyse des données obtenues, utilisant une analyse de régression linéaire, a démontré que le test effectué en association avec des échantillons de plasma présentait une réponse linéaire pour toutes les dilutions avec un coefficient de corrélation R-carré (R2) de 0,991 pour l'instrument **ELITe InGenius** et de 0,992 pour l'instrument **ELITe BeGenius**.



La limite inférieure de quantification (LLoQ) a été définie à la concentration de la LoD qui génère des résultats quantitatifs précis (écart-type égal à 0,2005 log copies/mL pour l'instrument **ELITe InGenius** et à 0,2048 log copies/mL pour l'instrument **ELITe BeGenius**) et exacts (biais égal à 0,1384 log copies/mL pour l'instrument **ELITe InGenius** et à 0,2513 log copies/mL pour l'instrument **ELITe BeGenius**) : 69 copies/mL.

La limite supérieure de quantification (ULoQ) a été définie à la concentration la plus élevée testée qui génère des résultats quantitatifs précis (écart-type égal à 0,0831 log copies/mL pour l'instrument **ELITe InGenius** et à 0,0444 log copies/mL pour l'instrument **ELITe BeGenius**) et exacts (biais égal à 0,3828 log copies/mL pour l'instrument **ELITe InGenius** et à 0,0775 log copies/mL pour l'instrument **ELITe BeGenius**) : 25 000 000 copies/mL.

Les résultats finaux sont résumés dans le tableau suivant.

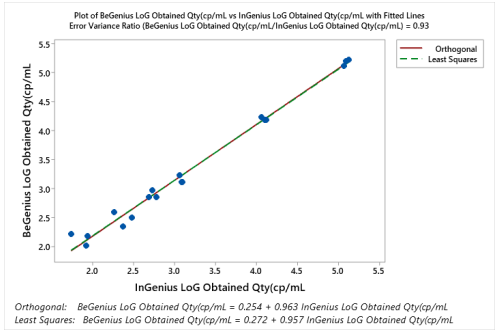
Plage de mesure linéaire pour les échantillons de plasma avec les instruments ELITe InGenius et ELITe BeGenius		
Unité de mesure	limite inférieure	limite supérieure
copies/mL	**69**	**25 000 000**

Les résultats obtenus avec les instruments **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** ont été analysés par une régression orthogonale et linéaire afin de calculer la corrélation entre les méthodes.

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS035PLD

Les résultats sont résumés sur la figure suivante.



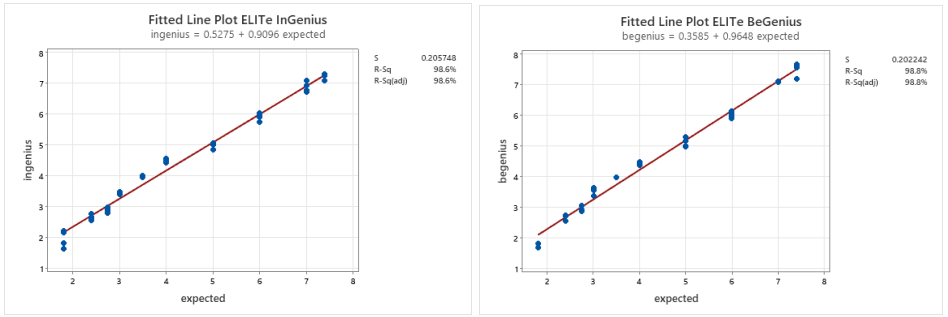
Dans ce test, l'analyse de régression orthogonale a été effectuée et générait une ordonnée à l'origine de 0,254 (IC à 95 % : 0,082 ; 0,425) et une pente de 0,963 (IC à 95 % : 0,912 ; 1,013). L'analyse de régression linéaire générait un R2 de 0,989.

Pour le liquide céphalorachidien (LCR) :

Le panel consistait en dix points de dilution à partir de 2,5 x 10^7 à 69 copies/mL. Chaque échantillon du panel a été testé en 4 réplicats en utilisant un panel préparé à l'aide d'un matériel de référence (Zeptometrix, Virus de la varicelle et du zona (VZV) souche : Ellen Culture Fluid (1 mL), (0810171CF)).

L'analyse des données obtenues, utilisant une analyse de régression linéaire, a démontré que le test effectué en association avec des échantillons de LCR présentait une réponse linéaire pour toutes les dilutions avec un coefficient de corrélation R-carré (R2) de 0,986 pour l'instrument **ELITe InGenius** et de 0,988 pour l'instrument **ELITe BeGenius**.

Les résultats sont présentés sur les graphiques suivants.



La limite inférieure de quantification (LLoQ) a été définie à la concentration de la LoD qui génère des résultats quantitatifs précis (écart-type égal à 0,2816 log copies/mL pour l'instrument **ELITe InGenius** et à 0,0787 log copies/mL pour l'instrument **ELITe BeGenius**) et exacts (biais égal à 0,1127 log copies/mL pour l'instrument **ELITe InGenius** et à 0,0902 log copies/mL pour l'instrument **ELITe BeGenius**) : 69 copies/mL.

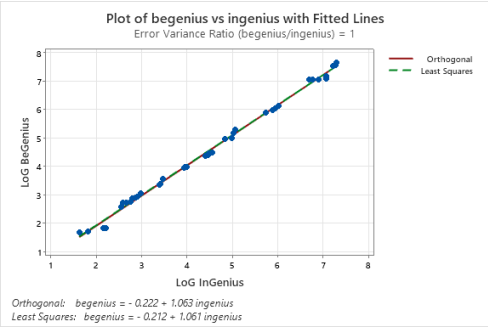
La limite supérieure de quantification (ULoQ) a été définie à la concentration la plus élevée testée qui génère des résultats quantitatifs précis (écart-type égal à 0,1005 log copies/mL pour l'instrument **ELITe InGenius** et à 0,2102 log copies/mL pour l'instrument **ELITe BeGenius**) et exacts (biais égal à 0,1803 log copies/mL pour l'instrument **ELITe InGenius** et à 0,0936 log copies/mL pour l'instrument **ELITe BeGenius**) : 25 000 000 copies/mL.

Les résultats finaux sont résumés dans le tableau suivant.

Plage de mesure linéaire pour les échantillons de LCR avec les instruments ELITe InGenius et ELITe BeGenius		
Unité de mesure	limite inférieure	limite supérieure
copies/mL	**69**	**25 000 000**

Les résultats obtenus avec les instruments **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** ont été analysés par une régression orthogonale et linéaire afin de calculer la corrélation entre les méthodes.

Les résultats sont résumés sur la figure suivante.



Dans ce test, l'analyse de régression orthogonale a été effectuée et générait une ordonnée à l'origine de -0,222 (IC à 95 % : -0,3241, -0,1196) et une pente de 1,063 (1,0418, 1,0847). L'analyse de régression linéaire générait un R2 de 0,996.

Répétabilité

La répétabilité des résultats obtenus avec le produit VZV ELITe MGB Kit en association avec les instruments **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** a été testée en analysant un panel d'échantillons de sang total prélevé sur EDTA. Le panel incluait un échantillon négatif et deux échantillons dopés avec un matériel de référence certifié du VZV (Acrometrix pour l'ADN du virus de la varicelle et du zona (réf. 954530)) à une concentration de 3 x la LoD (environ 300 copies/mL) et de 10 x la LoD (environ 1 000 copies/mL).

Les résultats de la répétabilité intra-session sur l'instrument **ELITe InGenius** ont été obtenus en analysant les échantillons du panel en huit réplicats, à raison de deux analyses par jour, avec le même lot de produit, sur le même instrument, par le même opérateur, et le même jour. Les échantillons ont été traités à des positions aléatoires.

Les résultats de la répétabilité inter-sessions sur l'instrument **ELITe InGenius** ont été obtenus en analysant les échantillons du panel en huit réplicats, à raison de deux analyses par jour, avec le même lot de produit, sur le même instrument, par le même opérateur, et sur deux jours différents. Les échantillons ont été traités à des positions aléatoires.

Les valeurs Ct de la cible et du contrôle interne ont été utilisées pour calculer le % CV afin d'évaluer la répétabilité en tant qu'imprécision.

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

Répétabilité intra-session, ELITe InGenius								
Échantillon	**VZV**				**Contrôle Interne**			
	Pos./Rép.	**Ct moyenne**	**EC**	**% CV**	**Pos./Rép.**	**Ct moyenne**	**EC**	**% CV**
Négatif	0/8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	23,76	0,38	1,58
3 x la LoD	8/8	36,53	0,21	0,57				
10 x la LoD	8/8	34,78	0,21	0,61				

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS035PLD

Répétabilité inter-sessions, ELITe InGenius								
Échantillon	**VZV**				**Contrôle Interne**			
	Pos./Rép.	**Ct moyenne**	**EC**	**% CV**	**Pos./Rép.**	**Ct moyenne**	**EC**	**% CV**
Négatif	0/16	N.A.	N.A.	N.A.	48/48	23,85	0,48	2,01
3 x la LoD	16/16	36,67	0,43	1,17				
10 x la LoD	16/16	34,77	0,32	0,91				

Dans le test de répétabilité sur l'instrument **ELITe InGenius**, l'analyse détectait la cible VZV comme attendu et montrait des valeurs Ct avec un % CV inférieur à 5 % pour le VZV et pour le Internal Control.

Les résultats de la répétabilité intra-session sur l'instrument **ELITe BeGenius** ont été obtenus en analysant les échantillons du panel en huit réplicats, à raison d'une analyse par jour, avec le même lot de produit, sur le même instrument, et le même jour. Les échantillons ont été traités à des positions aléatoires.

Les résultats de la répétabilité inter-sessions sur l'instrument **ELITe BeGenius** ont été obtenus en analysant les échantillons du panel en huit réplicats, à raison d'une analyse par jour, avec le même lot de produit, sur le même instrument, et sur deux jours différents. Les échantillons ont été traités à des positions aléatoires.

Les valeurs Ct de la cible et du contrôle interne ont été utilisées pour calculer le % CV afin d'évaluer la répétabilité en tant qu'imprécision.

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

Répétabilité intra-session, ELITe BeGenius								
Échantillon	**VZV**				**Contrôle Interne**			
	Pos./Rép.	**Ct moyenne**	**EC**	**% CV**	**Pos./Rép.**	**Ct moyenne**	**EC**	**% CV**
Négatif	0/8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	27,33	0,60	2,21
3 x la LoD	8/8	37,49	0,74	1,97				
10 x la LoD	8/8	35,38	0,35	0,98				

Répétabilité inter-sessions, ELITe BeGenius								
Échantillon	**VZV**				**Contrôle Interne**			
	Pos./Rép.	**Ct moyenne**	**EC**	**% CV**	**Pos./Rép.**	**Ct moyenne**	**EC**	**% CV**
Négatif	0/16	N.A.	N.A.	N.A.	48/48	26,67	0,60	2,25
3 x la LoD	16/16	37,32	0,69	1,84				
10 x la LoD	16/16	35,39	0,31	0,87				

Dans le test de répétabilité sur l'instrument **ELITe BeGenius**, l'analyse détectait la cible VZV comme attendu et montrait des valeurs Ct avec un % CV inférieur à 5 % pour le VZV et pour le Internal Control.

Reproductibilité

La reproductibilité des résultats obtenus avec le produit VZV ELITe MGB Kit en association avec les instruments **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** a été testée en analysant un panel d'échantillons de sang total prélevé sur EDTA. Le panel incluait un échantillon négatif et deux échantillons dopés avec un matériel de référence certifié du VZV (Acrometrix pour l'ADN du virus de la varicelle et du zona (réf. 954530)) à une concentration de 3 x la LoD (environ 300 copies/mL) et de 10 x la LoD (environ 1 000 copies/mL).

Les résultats de la reproductibilité inter-instruments sur l'instrument **ELITe InGenius** ont été obtenus en analysant les échantillons du panel en huit réplicats, à raison d'une analyse par jour, sur deux jours et en utilisant le même lot, avec deux instruments différents utilisés par deux opérateurs différents. Les échantillons ont été traités à des positions aléatoires sur le système **ELITe InGenius** en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

Les résultats de la reproductibilité inter-lots sur l'instrument **ELITe InGenius** ont été obtenus en analysant les échantillons du panel en huit réplicats, à raison de deux analyses par jour, en utilisant deux lots différents, avec le même instrument utilisé par le même opérateur. Les échantillons ont été traités à des positions aléatoires sur le système **ELITe InGenius** en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

Les valeurs Ct de la cible et du Contrôle Interne ont été utilisées pour calculer le % CV afin d'évaluer la reproductibilité en tant qu'imprécision.

Un résumé des résultats est présenté dans le tableau ci-dessous.

Reproductibilité inter-instruments, ELITe InGenius								
Échantillon	**VZV**				**Contrôle Interne**			
	Pos./Rép.	**Ct moyenne**	**EC**	**% CV**	**Pos./Rép.**	**Ct moyenne**	**EC**	**% CV**
Négatif	0/8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	22,76	0,61	2,69
3 x la LoD	8/8	36,47	0,32	0,86				
10 x la LoD	8/8	34,87	0,34	0,99				

Répétabilité inter-lots, ELITe InGenius								
Échantillon	**VZV**				**Contrôle Interne**			
	Pos./Rép.	**Ct moyenne**	**EC**	**% CV**	**Pos./Rép.**	**Ct moyenne**	**EC**	**% CV**
Négatif	0/8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	23,07	0,58	2,54
3 x la LoD	8/8	36,78	0,27	0,75				
10 x la LoD	8/8	35,06	0,31	0,88				

Dans le test de reproductibilité sur l'instrument **ELITe InGenius**, l'analyse détectait la cible VZV comme attendu et montrait des valeurs Ct avec un % CV inférieur à 5 % pour le VZV et pour le Internal Control.

Les résultats de la reproductibilité inter-instruments sur l'instrument **ELITe BeGenius** ont été obtenus en analysant les échantillons du panel en huit réplicats, à raison d'une analyse par jour, sur deux jours, avec deux instruments différents utilisés par deux opérateurs différents. Les échantillons ont été traités à des positions aléatoires sur le système **ELITe BeGenius** en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

Les résultats de la reproductibilité inter-lots sur l'instrument **ELITe BeGenius** ont été obtenus en analysant les échantillons du panel en huit réplicats, à raison de deux analyses par jour, avec deux lots différents et le même instrument. Les échantillons ont été traités à des positions aléatoires sur le système **ELITe BeGenius** en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

Les valeurs Ct de la cible et du Contrôle Interne ont été utilisées pour calculer le % CV afin d'évaluer la reproductibilité en tant qu'imprécision.

Un résumé des résultats est présenté dans le tableau ci-dessous.

Répétabilité inter-instruments, ELITe BeGenius								
Échantillon	**VZV**				**Contrôle Interne**			
	Pos./Rép.	**Ct moyenne**	**EC**	**% CV**	**Pos./Rép.**	**Ct moyenne**	**EC**	**% CV**
Négatif	0/8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	26,22	0,67	2,55
3 x la LoD	8/8	37,05	0,47	1,26				
10 x la LoD	8/8	35,18	0,43	1,21				

Répétabilité inter-lots, ELITe BeGenius								
Échantillon	**VZV**				**Contrôle Interne**			
	Pos./Rép.	**Ct moyenne**	**EC**	**% CV**	**Pos./Rép.**	**Ct moyenne**	**EC**	**% CV**
Négatif	0/8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	26,43	0,99	3,73
3 x la LoD	8/8	37,11	0,45	1,21				
10 x la LoD	8/8	35,05	0,36	1,03				

Dans le test de reproductibilité sur l'instrument **ELITe BeGenius**, l'analyse détectait la cible VZV comme attendu et montrait des valeurs Ct avec un % CV inférieur à 5 % pour le VZV et pour le Internal Control.

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS035PLD

Sensibilité analytique : reproductibilité avec un matériel de référence certifié

La sensibilité analytique du test, en tant que reproductibilité de la valeur d'un matériel de référence étalonné, a été évaluée en utilisant, à titre de matériel de référence, le panel étalonné VZV Molecular "Q" Panel (Qnostics, Ltd). Chaque échantillon du panel a été testé en 2 réplicats en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction, l'amplification, la détection et l'interprétation des résultats, à l'aide du système **ELITe InGenius** et des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tests avec un matériel de référence étalonné et le système ELITe InGenius				
Échantillon	Titre nominal copies/mL	Titre nominal log_{10} copies/mL	Positifs/Réplicats	Résultats moyens Log_{10} copies/mL
VZVMQP01-High (concentration élevée)	10^5	5,000	2/2	5,138
VZVMQP01-Medium (concentration moyenne)	10^4	4,000	2/2	4,312
VZVMQP01-Low (faible concentration)	10^3	3,000	2/2	3,340
VZVMQP01-Negative (négatif)	négatif	-	0/2	-

Tous les échantillons positifs ont été détectés comme positifs, avec un titre qui était à la valeur attendue ± 0,5 log.

Des tests supplémentaires ont été réalisés en utilisant, à titre de matériel de référence, le panel « QCMD 2014 Varicella Zoster Virus DNA EQA Panel » (Qnostics Ltd, Royaume-Uni), un panel de dilutions du VZV dans la plage de la concentration limite. Chaque échantillon du panel a été testé en 2 réplicats en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction, l'amplification, la détection et l'interprétation des résultats, à l'aide du système **ELITe InGenius** et des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tests avec un matériel de référence étalonné et le système ELITe InGenius				
Échantillon	Conc. consensus Log_{10} copies/mL	Écart-type	Positifs/Réplicats	Résultats moyens Log_{10} copies/mL
VZVDNA14-01	3,267	0,438	2/2	3,674
VZVDNA14-02	3,339	0,520	2/2	3,713
VZVDNA14-03	2,465	0,491	2/2	2,768
VZVDNA14-04	Négatif	N.A.	0/2	Non détecté
VZVDNA14-05	2,716	0,377	2/2	3,317
VZVDNA14-06	1,980	0,411	½	1,994
VZVDNA14-07	Négatif	N.A.	0/2	Non détecté
VZVDNA14-08	3,475	0,678	2/2	3,870
VZVDNA14-09	3,918	0,653	2/2	4,306
VZVDNA14-10	2,071	0,428	2/2	1,949

Tous les échantillons négatifs ont été correctement détectés comme négatifs et tous les échantillons positifs ont été correctement détectés comme positifs, conformément aux résultats quantitatifs définis par le consensus EQA. Sur les 2 réplicats, l'échantillon VZVDNA14-06 n'a généré qu'un seul résultat positif. Ce résultat peut s'expliquer par le titre de l'échantillon qui était inférieur à la limite de détection. Sept échantillons ont été quantifiés dans la plage définie par le consensus de l'étude ± 1 écart-type (EC), et un échantillon a été quantifié dans la plage définie par le consensus de l'étude ± 2 EC.

Sensibilité diagnostique : confirmation des échantillons positifs

Sang total et plasma

La sensibilité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons cliniques positifs, a été évaluée en analysant quelques échantillons cliniques de sang total prélevé sur EDTA et de plasma prélevé sur EDTA qui étaient positifs pour l'ADN du VZV, en association avec le système ELITe InGenius. Étant donné que les performances analytiques du système **ELITe BeGenius** sont équivalentes à celles du système **ELITe InGenius**, les performances diagnostiques du test effectué sur les deux instruments sont également

considérées comme équivalentes. En conséquence, la sensibilité diagnostique du test obtenue en association avec le système **ELITe InGenius** s'applique également au système **ELITe BeGenius**.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant 28 échantillons de sang total prélevé sur EDTA négatifs pour l'ADN du VZV, qui avaient été dopés avec de l'ADN du VZV en ajoutant l'échantillon VZV07-04 , issu du panel « QCMD 2007 Varicella-Zoster virus DNA EQA Panel » (Qnostics Ltd, Royaume-Uni) à un titre de 750 copies/mL et 30 échantillons de plasma prélevé sur EDTA négatifs pour l'ADN du VZV, qui avaient été dopés avec de l'ADN du VZV en ajoutant le « VZV ELITe-IQC High Run Control » (ELITech Group S.p.A.) à un titre de 750 copies/mL

Chaque échantillon a été testé en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction, l'amplification, la détection et l'interprétation des résultats, à l'aide du système **ELITe InGenius** et des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé sur EDTA dopé avec de l'ADN du VZV	28	27	1
Plasma prélevé sur EDTA dopé avec de l'ADN du VZV	30	30	0

Tous les échantillons de plasma étaient valides et positifs.

Dans ce test, la sensibilité diagnostique de l'analyse en association avec les échantillons de plasma était de 100 %.

Tous les échantillons de sang total étaient valides et 27 échantillons sur 28 ont été confirmés comme positifs. Un échantillon de sang total a généré un résultat négatif ; cet échantillon discordant n'était plus disponible pour l'analyse des échantillons discordants.

Dans ce test, la sensibilité diagnostique de l'analyse en association avec les échantillons de sang total était de 96,4 %.

Liquide céphalorachidien

La sensibilité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons cliniques positifs, a été évaluée en analysant quelques échantillons cliniques de liquide céphalorachidien qui étaient positifs pour l'ADN du VZV en association avec l'instrument **ELITe InGenius** Étant donné que les performances analytiques du système **ELITe BeGenius** sont équivalentes à celles du système **ELITe InGenius**, les performances diagnostiques du test effectué sur les deux instruments sont également considérées comme équivalentes. En conséquence, la sensibilité diagnostique du test obtenue en association avec le système **ELITe InGenius** s'applique également au système **ELITe BeGenius**.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant 20 échantillons de liquide céphalorachidien négatifs pour l'ADN du VZV, qui avaient été dopés avec de l'ADN du VZV en ajoutant le « VZV ELITe-IQC High Run Control » (ELITech Group S.p.A.) à un titre de 750 copies/mL.

Chaque échantillon a été testé en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction, l'amplification, la détection et l'interprétation des résultats, à l'aide du système **ELITe InGenius** et des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Liquide céphalorachidien dopé avec de l'ADN du VZV	20	20	0

Tous les échantillons de liquide céphalorachidien étaient valides et positifs.

Dans ce test, la sensibilité diagnostique de l'analyse était de 100 %.

Spécificité diagnostique : confirmation des échantillons négatifs

Sang total et plasma

La spécificité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons cliniques négatifs, a été évaluée en analysant quelques échantillons cliniques de sang total prélevé sur EDTA et de plasma prélevé sur EDTA qui étaient négatifs pour l'ADN du VZV, en association avec le système ELITe InGenius. Étant donné que les performances analytiques du système **ELITe BeGenius** sont équivalentes à celles du système **ELITe InGenius**, les performances diagnostiques du test effectué sur les deux instruments sont également considérées comme équivalentes. En conséquence, la sensibilité diagnostique du test obtenue en association avec le système **ELITe InGenius** s'applique également au système **ELITe BeGenius**.

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS035PLD

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant 34 échantillons de sang total prélevé sur EDTA issus de donneurs en bonne santé qui étaient présumés négatifs pour l'ADN du VZV et 30 échantillons de plasma prélevé sur EDTA issus de donneurs en bonne santé qui étaient présumés négatifs pour l'ADN du VZV.

Chaque échantillon a été testé en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction, l'amplification, la détection et l'interprétation des résultats, à l'aide du système **ELITe InGenius** et des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du VZV	34	0	34
Plasma prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du VZV	30	0	30

Tous les échantillons de sang total et de plasma étaient valides et négatifs.

Dans ce test, la spécificité diagnostique de l'analyse était de 100 % pour les deux matrices.

Liquide céphalorachidien

La spécificité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons cliniques négatifs, a été évaluée en analysant quelques échantillons cliniques de liquide céphalorachidien qui étaient négatifs pour l'ADN du VZV en association avec l'instrument **ELITe InGenius** Étant donné que les performances analytiques du système **ELITe BeGenius** sont équivalentes à celles du système **ELITe InGenius**, les performances diagnostiques du test effectué sur les deux instruments sont également considérées comme équivalentes. En conséquence, la spécificité diagnostique du test obtenue en association avec le système **ELITe InGenius** s'applique également au système **ELITe BeGenius**.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant 22 échantillons de liquide céphalorachidien provenant de donneurs normaux qui étaient présumés négatifs pour l'ADN du VZV.

Chaque échantillon a été testé en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction, l'amplification, la détection et l'interprétation des résultats, à l'aide du système **ELITe InGenius** et des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Liquide céphalorachidien négatif pour l'ADN du VZV	22	0	22

Tous les échantillons de liquide céphalorachidien étaient valides et négatifs. Dans ce test, la spécificité diagnostique de l'analyse était de 100 %.

La valeur seuil Ct du Contrôle Interne (Ct de l'IC) est définie à 35 pour chaque matrice validée.

ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument
ABI 7300 Real-Time System

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES

Échantillons

Ce produit doit être utilisé avec de **l'ADN extrait** des échantillons cliniques suivants : liquide céphalorachidien (LCR), sang total prélevé sur EDTA et plasma prélevé sur EDTA.

Liquide céphalorachidien (LCR)

Les échantillons de LCR pour l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés conformément aux directives de laboratoire en évitant toute contamination par le sang du patient. Ils doivent être transportés entre +2° et +8 °C et conservés entre +2° et +8 °C pendant quatre heures au maximum. Sinon, ils doivent être congelés et conservés à -20 °C pendant trente jours au maximum ou à -70 °C pour des périodes plus longues.

Il est recommandé de diviser les échantillons en aliquotes avant la congélation afin d'éviter des cycles

répétés de congélation et de décongélation. En cas d'utilisation d'échantillons congelés, les décongeler juste avant l'extraction afin d'éviter une éventuelle dégradation des acides nucléiques.

Remarque : pour procéder à l'extraction de l'ADN du liquide céphalorachidien avec le système **ELITe STAR** et la **version logicielle 3.4.13** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **UUNI_E100S200_ELI**, qui traite 200 µL d'échantillon et effectue l'élution de l'extrait dans 100 µL (l'élution est en fait effectuée dans 115 µL, parmi lesquels 100 µL sont récupérés). Les échantillons dans les tubes primaires peuvent être chargés directement sur le système **ELITe STAR**. Un volume minimum de 700 µL est toujours requis pour chaque échantillon. Ajouter **200 µL** de **CPE** dans un tube de protéinase-véhicule comme indiqué dans le manuel du kit d'extraction. Pour la procédure d'extraction, se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction.

Remarque : pour procéder à l'extraction de l'ADN du liquide céphalorachidien avec le système **ELITe GALAXY** et la **version logicielle 1.3.1** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **xNA Extraction (Universal)**, qui traite 300 µL d'échantillon et effectue l'élution de l'extrait dans 200 µL (l'élution est en fait effectuée dans 210 µL, parmi lesquels 200 µL sont récupérés). Les échantillons dans les tubes primaires peuvent être chargés directement sur le système **ELITe GALAXY**. Un volume minimum de 400-650 µL, selon la classe de tube utilisée, est toujours requis pour chaque échantillon. Ajouter **10 µL/échantillon** de **CPE**. Le CPE doit être ajouté à la **solution IC + véhicule** comme indiqué dans le manuel du kit d'extraction. Pour la procédure d'extraction, se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction.

Remarque : pour procéder à l'extraction de l'ADN du liquide céphalorachidien avec l'instrument **NucliSENS® easyMAG®**, utiliser le protocole d'extraction **Generic 2.0.1** et suivre ces instructions : transférer **500 µL** d'échantillon dans la barrette à 8 puits, charger la barrette sur l'instrument et effectuer l'extraction. Après 10 minutes d'incubation, ajouter **5 µL** de **CPE** à titre de contrôle interne avant d'ajouter la **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** au contenu de la barrette à l'aide de la pipette multicanaux en utilisant le programme numéro 3, puis procéder à l'extraction. Éluer l'ADN dans **100 µL** de tampon d'élution.

Sang total prélevé sur EDTA

Les échantillons de sang total pour l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés sur de l'EDTA conformément aux directives de laboratoire. Ils doivent être transportés entre +2 et +8 °C et conservés entre +2 et +8 °C pendant trois jours au maximum. Sinon, ils doivent être congelés et conservés à -20 °C pendant trente jours au maximum ou à -70 °C pour des périodes plus longues.

Il est recommandé de diviser les échantillons en aliquotes avant la congélation afin d'éviter des cycles répétés de congélation et de décongélation. En cas d'utilisation d'échantillons congelés, les décongeler juste avant l'extraction afin d'éviter une éventuelle dégradation des acides nucléiques.

Remarque : pour procéder à l'extraction de l'ADN du sang total (échantillon cellulaire) à l'aide du kit **EXTRAblood**, suivre le mode d'emploi : commencer avec **200 µL** d'échantillon (2 millions de cellules au maximum), puis récupérer l'ADN avec **100 µL** de tampon d'élution.

Remarque : pour procéder à l'extraction de l'ADN du sang total avec le système **ELITe STAR** et la **version logicielle 3.4.13** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **UUNI_E100S200_ELI**, qui traite 200 µL d'échantillon et effectue l'élution de l'extrait dans 100 µL. Les échantillons dans les tubes primaires peuvent être chargés directement sur le système **ELITe STAR**. Un volume minimum de 700 µL est toujours requis pour chaque échantillon. Ajouter **200 µL** de **CPE** dans un tube de protéinase-véhicule comme indiqué dans le manuel du kit d'extraction. Pour la procédure d'extraction, se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction.

Remarque : pour procéder à l'extraction de l'ADN du sang total avec le système **ELITe GALAXY** et la **version logicielle 1.3.1** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **xNA Extraction (Universal)**, qui traite 300 µL d'échantillon et effectue l'élution de l'extrait dans 200 µL. Les échantillons dans les tubes primaires peuvent être chargés directement sur le système **ELITe GALAXY**. Un volume minimum de 400-650 µL, selon la classe de tube utilisée, est toujours requis pour chaque échantillon. Ajouter **10 µL/échantillon** de **CPE**. Le CPE doit être ajouté à la **solution IC + véhicule** comme indiqué dans le manuel du kit d'extraction. Pour la procédure d'extraction, se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction.

Plasma prélevé sur EDTA

Les échantillons de plasma pour l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés sur de l'EDTA conformément aux directives de laboratoire. Ils doivent être transportés entre +2 et +8 °C et conservés entre +2 et +8 °C pendant quatre heures au maximum. Sinon, ils doivent être congelés et conservés à -20 °C pendant trente jours au maximum ou à -70 °C pour des périodes plus longues.

Il est recommandé de diviser les échantillons en aliquotes avant la congélation afin d'éviter des cycles répétés de congélation et de décongélation.

En cas d'utilisation d'échantillons congelés, les décongeler juste avant l'extraction afin d'éviter une éventuelle dégradation des acides nucléiques.

Remarque : pour procéder à l'extraction de l'ADN du plasma avec le système **ELITe STAR** et la **version logicielle 3.4.13** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **UUNI_E100S200_ELI**, qui traite 200 µL d'échantillon et effectue l'élution de l'extrait dans 100 µL. Les échantillons dans les tubes primaires peuvent être chargés directement sur le système **ELITe STAR**. Un volume minimum de 700 µL est toujours requis pour chaque échantillon. Ajouter **200 µL** de **CPE** dans un tube de protéinase-véhicule comme indiqué dans le manuel du kit d'extraction. Pour la procédure d'extraction, se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction.

Remarque : pour procéder à l'extraction de l'ADN du plasma avec le système **ELITe GALAXY** et la **version logicielle 1.3.1** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **xNA Extraction (Universal)**, qui traite 300 µL d'échantillon et effectue l'élution de l'extrait dans 200 µL. Les échantillons dans les tubes primaires peuvent être chargés directement sur le système **ELITe GALAXY**. Un volume minimum de 400-650 µL, selon la classe de tube utilisée, est toujours requis pour chaque échantillon. Ajouter **10 µL/échantillon** de **CPE**. Le CPE doit être ajouté à la **solution IC + véhicule** comme indiqué dans le manuel du kit d'extraction. Pour la procédure d'extraction, se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction.

Remarque : pour procéder à l'extraction de l'ADN du plasma à l'aide de l'instrument **NucliSENS® easyMAG®**, utiliser le protocole d'extraction **Generic 2.0.1** et suivre ces instructions : transférer **500 µL** d'échantillon dans la barrette à 8 puits, ajouter **5 µL** de **CPE** pour le contrôle interne avant d'ajouter la **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica**. Éluer l'ADN dans **100 µL** de tampon d'élution.

Remarque : pour procéder à l'extraction de l'ADN du plasma avec l'instrument **QIAsymphony® SP/AS** et le kit **QIAsymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit** avec la **version logicielle 3.5**, utiliser le protocole d'extraction **« Virus Cell free 500_V3_DSP_default IC »** et suivre ces instructions : l'instrument est capable d'utiliser un tube primaire, le volume d'échantillon requis pour l'extraction est **500 µL** et un volume mort minimum de 100 µL est toujours nécessaire. Préparer la solution contenant le tampon AVE et le véhicule d'ARN conformément au manuel d'instructions du kit d'extraction. Ajouter **6 µL/échantillon** de **CPE** à la solution pour chaque échantillon à analyser. Sur l'instrument, dans le compartiment « internal control » (contrôle interne), charger les tubes contenant la solution comme indiqué dans le mode d'emploi du kit ; indiquer la position où les éluats seront distribués et préciser le volume d'élution de **85 µL**. Pour obtenir plus de détails sur la procédure d'extraction, suivre les indications du mode d'emploi du kit.

Autres échantillons :

Il n'existe actuellement aucune donnée disponible concernant les performances du produit avec l'ADN extrait des échantillons cliniques suivants : échantillons de lésions mucocutanées prélevés à l'écouvillon, liquide amniotique.

Substances interférentes

L'ADN extrait de l'échantillon ne doit pas contenir d'héparine, d'hémoglobine, de dextrane, de Ficoll®, d'éthanol ou de 2-propanol afin de prévenir le problème d'inhibition et la possibilité de génération fréquente de résultats non valides.

La présence d'une grande quantité d'ADN génomique humain dans l'ADN extrait de l'échantillon peut inhiber la réaction d'amplification.

Il n'existe actuellement aucune donnée disponible en ce qui concerne l'inhibition provoquée par des médicaments antiviraux, antibiotiques, de chimiothérapie ou immunosuppresseurs.

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.

Pour le contrôle négatif, utiliser de l'eau de qualité biologie moléculaire (non fournie avec ce produit) pour l'ajouter à la réaction à la place de l'ADN extrait de l'échantillon.

Pour le contrôle positif, utiliser le produit **VZV - ELITe Positive Control** ou le produit **VZV ELITe Standard**.

Contrôles de qualité

Il est recommandé de valider l'ensemble de la procédure d'analyse de chaque session d'extraction et d'amplification en testant les contrôles du processus, c'est-à-dire un échantillon testé négatif et un échantillon testé positif ou du 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)

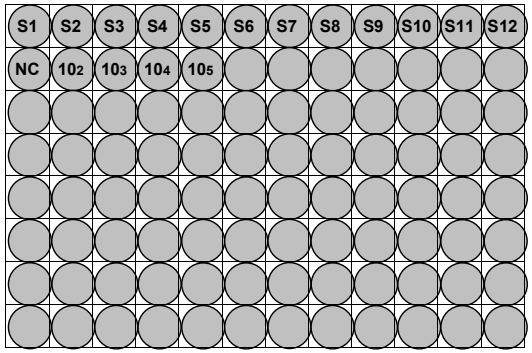
Avec un instrument **7300 Real-Time PCR System** :

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

- mettre le thermocycleur en temps réel en marche, puis l'ordinateur, lancer le logiciel dédié et ouvrir une session de « absolute quantification » (quantification absolue) ;
- paramétrer (à l'aide du « Detector Manager » [Gestionnaire de détecteur]) : le « detector » (détecteur) pour la sonde VZV avec le « reporter » (rapporteur) = « FAM » et le « quencher » (désactivateur) = « none » (aucun) (non fluorescent) et le nommer « VZV » ;
- paramétrer (à l'aide du Detector Manager [Gestionnaire de détecteur]) : le « detector » (détecteur) pour la sonde du contrôle interne, le « reporter » (rapporteur) = « VIC » (AP525 est analogue à VIC), et le « quencher » (désactivateur) = « none » (aucun) (non fluorescent) et le nommer« IC » ;
- pour chaque puits utilisé dans la microplaque, paramétrer (à l'aide du Well Inspector [Inspecteur de puits]) : le « detector » (détecteur) (type de fluorescence à mesurer), la « passive reference » (référence passive) = « ROX » (AP593 est utilisé à la place de ROX, pour la normalisation de la fluorescence mesurée) et le type de réaction (échantillon, contrôle d'amplification négatif, contrôle d'amplification positif ou étalon en quantité connue). Ajouter ces informations à la **Work Sheet** (Fiche de travail) jointe à la fin du présent manuel ou imprimer la configuration de la microplaque. La **Work Sheet** (Fiche de travail) doit être scrupuleusement suivie pendant le transfert du mélange réactionnel complet et des échantillons dans les puits.

Remarque : afin de déterminer le titre de l'ADN dans l'échantillon de départ, paramétrer un ensemble de réactions avec les étalons **Q - PCR Standards** (10^5 copies, 10^4 copies, 10^3 copies, 10^2 copies) pour obtenir la **courbe d'étalonnage**.

L'exemple ci-dessous montre comment organiser l'analyse quantitative de 12 échantillons.



Légende : S1 - **S12** : échantillons à analyser ; **NC** : contrôle négatif d'amplification :
10^2 : étalon à 10^2 copies ; **10^3** : étalon à 10^3 copies ; **10^4** : étalon à 10^4 copies ; **10^5** : étalon à 10^5 copies.

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

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

Remarque : l'acquisition de la fluorescence (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection [Instrument > Protocole du thermocycleur > Paramètres > Collecte de données) doit être paramétrée pendant l'étape d'hybridation à 60 °C.

- modifier le temps comme indiqué dans le tableau **« Cycle thermique »** ;
- paramétrer le nombre de cycles sur **45** ;
- paramétrer le volume pour l'émulation logicielle du transfert thermique à la réaction (« Sample volume » [Volume d'échantillon]) sur **30 µL** ;

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS035PLD

- facultatif : ajouter l'étape de dissociation (Add Dissociation Stage [Ajouter étape de dissociation]) et paramétrer la température entre **40 °C** et **80 °C**.

Cycle thermique		
Étape	**Températures**	**Temps**
Décontamination	50 °C	2 min.
Dénaturation initiale	94 °C	2 min.
Amplification et détection (45 cycles)	94 °C	10 s
	60 °C (acquisition de la fluorescence)	30 s
	72 °C	20 s
Dissociation (facultatif)	95 °C	15 s
	40 °C	30 s
	80 °C	15 s

Avec un instrument **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** :

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

- mettre le thermocycleur en temps réel en marche, puis l'ordinateur, lancer le logiciel dédié, ouvrir une session de « absolute quantification » (quantification absolue) et choisir le « Run mode: Fast 7500 » (Mode d'exécution : Fast 7500) ;
- paramétrer (à l'aide du « Detector Manager » [Gestionnaire de détecteur]) : le « detector » (détecteur) pour la sonde VZV avec le « reporter » (rapporteur) = « FAM » et le « quencher » (désactivateur) = « none » (aucun) (non fluorescent) et le nommer « VZV » ;
- paramétrer (à l'aide du Detector Manager [Gestionnaire de détecteur]) : le « detector » (détecteur) pour la sonde du contrôle interne, le « reporter » (rapporteur) = « VIC » (AP525 est similaire à VIC), et le « quencher » (désactivateur) = « none » (aucun) (non fluorescent) et le nommer« IC » ;
- pour chaque puits utilisé dans la microplaque, paramétrer (à l'aide du Well Inspector [Inspecteur de puits]) : le « detector » (détecteur) (type de fluorescence à mesurer), la « passive reference » (référence passive) = « CY5 » (AP593 est utilisé à la place de CY5, pour la normalisation de la fluorescence mesurée) et le type de réaction (échantillon, contrôle d'amplification négatif, contrôle d'amplification positif ou étalon en quantité connue).

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

Remarque : afin de déterminer le titre de l'ADN dans l'échantillon de départ, paramétrer un ensemble de réactions avec les étalons **Q - PCR Standards** (10^5 copies, 10^4 copies, 10^3 copies, 10^2 copies) pour obtenir la **courbe d'étalonnage**.

Le paramétrage de l'analyse quantitative de quelques échantillons est présentée, à titre d'exemple, dans le paragraphe précédent décrivant la procédure pour l'instrument **7300 Real Time PCR System**.

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

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

Remarque : l'acquisition de la fluorescence (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection [Instrument > Protocole du thermocycleur > Paramètres > Collecte de données) doit être paramétrée pendant l'étape d'hybridation à 60 °C.

- modifier le temps comme indiqué dans le tableau **« Cycle thermique »** ;
- paramétrer le nombre de cycles sur **45** ;
- paramétrer le volume pour l'émulation logicielle du transfert thermique à la réaction (« Sample volume » [Volume d'échantillon]) sur **30 µL** ;
- facultatif : ajouter l'étape de dissociation (Add Dissociation Stage [Ajouter étape de dissociation]) et

paramétrer la température entre **40 °C** et **80 °C**.

Cycle thermique		
Étape	**Températures**	**Temps**
Décontamination	50 °C	2 min.
Dénaturation initiale	94 °C	2 min.
Amplification et détection (45 cycles)	94 °C	10 s
	60 °C (collecte des données)	30 s
	72 °C	20 s
Dissociation (facultatif)	95 °C	15 s
	40 °C	1 min.
	80 °C	15 s
Dissociation (facultatif)	60 °C	15 s

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 les tubes de **VZV Q - PCR Mix** requis pour la session d'analyse, en se rappelant que le contenu de chaque tube est suffisant pour préparer **25 réactions**. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ;
- sortir et décongeler les tubes de **VZV - Positive Control** ou de **VZV Q - PCR Standard**. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ;
- 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.

1. Pipeter avec précision **20 µL** de mélange réactionnel **VZV Q - PCR Mix** au fond des puits de la **microplaque d'amplification**, comme précédemment établi dans la **Work Sheet** (Fiche de travail). Éviter d'introduire des bulles.

Remarque : si le mélange réactionnel n'est pas utilisé en intégralité, conserver le volume restant dans l'obscurité à -20 °C pendant un mois au maximum. Congeler et décongeler le mélange réactionnel **5 fois** au maximum.

2. En le déposant dans le mélange réactionnel, pipeter avec précision **20 µL** de **l'ADN extrait** du premier échantillon dans le puits correspondant de la **microplaque d'amplification**, comme précédemment établi dans la **Work Sheet** (Fiche de travail). 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 **20 µL** d'**eau de qualité biologie moléculaire** (non incluse avec ce produit) dans le puits de la **microplaque d'amplification** destiné au contrôle négatif d'amplification, comme précédemment établi dans la **Work Sheet** (Fiche de travail). 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. Selon le résultat requis (qualitatif ou quantitatif), suivre l'une des ces deux options :

   - Lorsqu'un résultat **qualitatif** de l'analyse est requis (détection de l'ADN du VZV), pipeter avec précision, en le déposant dans le mélange réactionnel, **20 µL** de **VZV - Positive Control** dans le puits correspondant de la **microplaque d'amplification**, comme précédemment établi dans la **Work Sheet** (Fiche de travail). Bien mélanger le contrôle positif en pipetant le **VZV - Positive Control** à trois reprises dans le mélange réactionnel. Éviter d'introduire des bulles.

   - Lorsqu'un résultat **quantitatif** de l'analyse est requis (quantification de l'ADN du VZV), pipeter avec précision, en le déposant dans le mélange réactionnel, **20 µL** de **VZV Q - PCR Standard 10_2** dans le puits correspondant de la **microplaque d'amplification**, comme précédemment établi dans la **Work Sheet** (Fiche de travail). Bien mélanger l'étalon en pipetant le **VZV Q - PCR Standard 10_2** à trois reprises

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS035PLD

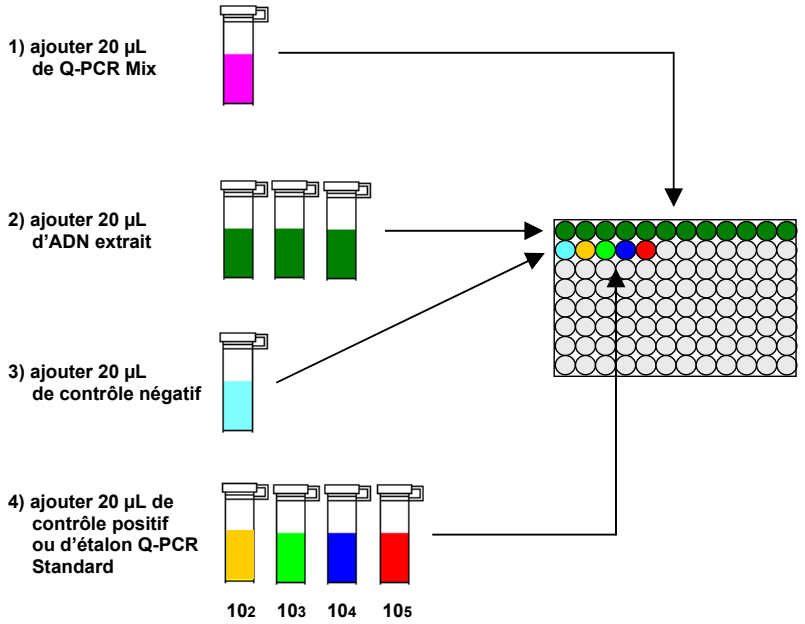
dans le mélange réactionnel. Éviter d'introduire des bulles. Procéder de la même manière avec les étalons **VZV Q - PCR Standards 10_3, 10_4, 10_5**.

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 (p. ex., « année-mois-jour-VZV-EGSpA »).

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 la préparation de la réaction d'amplification.



REMARQUE : si la préparation de l'amplification est effectuée avec l'instrument **QIAsymphony® SP/AS**, insérer la microplaque contenant les extraits, les réactifs et la microplaque d'amplification dans les compartiments prévus à cet effet, en utilisant les adaptateurs spéciaux, puis suivre les indications du manuel d'utilisation pour paramétrer le module et les étapes requises par le logiciel.

Remarque : si la préparation de l'amplification est effectuée avec l'instrument **ELITe GALAXY**, charger la microplaque d'élution, le mélange réactionnel complet et la microplaque d'amplification comme indiqué dans le manuel d'utilisation de l'instrument et suivre les étapes requises par la GUI.

Analyse qualitative des résultats

Les valeurs enregistrées de la fluorescence émise par la sonde spécifique au VZV (détecteur FAM « VZV ») et par la sonde du contrôle interne spécifique (détecteur VIC « IC ») dans les réactions d'amplification doivent être analysées par le logiciel de l'instrument.

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

- paramétrer manuellement (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle [Résultats > Tracé d'amplification > delta Rn vs Cycle]) la plage de calcul pour la **Baseline** (Référence) (**niveau de bruit de fond de la fluorescence**) du cycle 6 au cycle 15 ;

Remarque : avec un échantillon positif présentant un titre élevé d'ADN du VZV, la fluorescence FAM de la sonde spécifique au VZV peut commencer à augmenter avant le cycle 15. Dans ce cas, la plage de calcul pour la **Baseline** (Référence) doit être adaptée à partir du cycle 6 jusqu'au cycle pendant lequel la fluorescence FAM de l'échantillon commence à augmenter, tel que détecté par le logiciel de l'instrument (Results > Component [Résultats > Composant]).

Avec un **7300 Real-Time PCR System** :

- paramétrer manuellement le **Threshold** (Seuil) pour le détecteur FAM « VZV » sur **0,1**.
- paramétrer manuellement le **Threshold** (Seuil) pour le détecteur VIC « IC » sur **0,05**.

Avec un **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** :

- paramétrer manuellement le **Threshold** (Seuil) pour le détecteur FAM « VZV » sur **0,2**.
- paramétrer manuellement le **Threshold** (Seuil) pour le détecteur VIC « IC » sur **0,1**.

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).

Dans la réaction d'amplification du **contrôle positif***, la valeur **Ct** du VZV (Results > Report [Résultats > Rapport]) est utilisée pour valider l'amplification et la détection, comme décrit dans le tableau suivant :

Réaction du contrôle positif détecteur FAM « VZV »	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct ≤ 25	**POSITIF**	**CORRECTE**

Si le résultat de la réaction d'amplification du **contrôle positif** est **Ct > 25** ou **Ct indéterminé** pour le VZV, 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 du contrôle positif, dégradation du mélange réactionnel ou du contrôle positif, 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.

***Remarque :** lorsque ce produit est utilisé pour la quantification de l'ADN du VZV, les réactions des étalons **Q - PCR Standard** sont paramétrées à la place de la réaction du **contrôle positif**. Dans ce cas, valider l'amplification et la détection en se reportant à la réaction d'amplification de l'étalon **Q - PCR Standard 10^5** (**Ct ≤ 25**).

Dans la réaction d'amplification du **contrôle négatif**, la valeur **Ct** du VZV (Results > Report [Résultats > Rapport]) est utilisée pour valider l'amplification et la détection, comme décrit dans le tableau suivant :

Réaction du contrôle négatif détecteur FAM « VZV »	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct indéterminé	**NÉGATIF**	**CORRECTE**

Si le résultat de la réaction d'amplification du **contrôle négatif** est différent de **Ct indéterminé** pour le VZV, l'ADN cible a été détecté. Cela signifie que des problèmes sont survenus pendant l'étape d'amplification (contamination), ce qui peut générer des résultats incorrects et des faux positifs. La session d'analyse n'est pas valide et doit être répétée en commençant par l'étape d'amplification.

Dans la réaction d'amplification de chaque **échantillon**, la valeur **Ct** du VZV est utilisée pour détecter l'ADN cible alors que la valeur **Ct** du contrôle interne est utilisée pour valider l'extraction, l'amplification et la détection.

Remarque : à l'aide du logiciel de l'instrument (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle [Résultats > Tracé d'amplification > delta Rn vs Cycle]), vérifier que le **Ct** a été déterminé par une augmentation rapide et régulière des valeurs de la fluorescence, et non par des pics ou une augmentation du bruit de fond (bruit de fond irrégulier ou important).

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS035PLD

Le produit est capable de détecter une quantité minimale d'environ 10 copies d'ADN du gène de la protéine majeure de liaison à l'ADN (ORF29) du VZV dans la réaction d'amplification, ce qui correspond aux équivalents génomiques par réaction (limite de détection du produit, se reporter à la section « Caractéristiques de performance »).

Les résultats, en tant que valeur **Ct** des réactions d'amplification de chaque **échantillon** (Results > Report [Résultats > Rapport]), sont utilisés comme indiqué dans le tableau suivant :

Réaction d'échantillon		Adéquation de l'échantillon	Résultat du test	ADN du VZV
détecteur FAM « VZV »	**détecteur VIC « IC »**			
Ct indéterminé	**Ct > 35 ou Ct indéterminé**	**non adéquat**	**non valide**	**-**
	Ct ≤ 35	**adéquat**	**valide, négatif**	**NON DÉTECTÉ**
Ct déterminé	**Ct > 35 ou Ct indéterminé**	**adéquat**	**valide, positif**	**DÉTECTÉ**
	Ct ≤ 35	**adéquat**	**valide, positif**	**DÉTECTÉ**

Si le résultat de la réaction d'amplification d'un échantillon est **Ct indéterminé** pour le VZV et **Ct > 35** ou **Ct indéterminé** pour le contrôle interne, cela signifie qu'il n'a pas été possible de détecter efficacement l'ADN du contrôle interne. Dans ce cas, des problèmes sont survenus pendant l'étape d'amplification (amplification inefficace ou nulle) ou pendant l'étape d'extraction (dégradation de l'échantillon d'ADN, échantillon comportant un nombre de cellules insuffisant, perte d'ADN pendant l'extraction ou présence d'inhibiteurs), ce qui peut générer des résultats incorrects et des faux négatifs. L'échantillon n'est pas adéquat, l'analyse n'est pas valide et doit être répétée en commençant par l'extraction d'un nouvel échantillon.

Si le résultat de la réaction d'amplification d'un échantillon est **Ct indéterminé** pour le VZV et **Ct ≤ 35** pour le contrôle interne, cela signifie que l'ADN du VZV n'a pas été détecté dans l'ADN extrait de l'échantillon ; toutefois, il n'est pas possible d'exclure le fait que de l'ADN du VZV soit présent à un titre inférieur à la limite de détection du produit (se reporter à la section concernant les « Caractéristiques de performance »). Dans ce cas, le résultat pourrait être un faux négatif.

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.

Remarque : lorsque l'ADN du VZV est détecté dans la réaction d'amplification d'un échantillon, le résultat du contrôle interne peut être Ct > 35 ou Ct indéterminé. En fait, la réaction d'amplification de faible efficacité du contrôle interne peut être déplacée par compétition avec la réaction d'amplification de l'ADN du VZV hautement efficace. Dans ce cas, l'échantillon reste néanmoins adéquat et le résultat positif du test est valide.

Analyse quantitative des résultats

Après avoir réalisé la procédure d'analyse qualitative des résultats, il est possible d'effectuer l'analyse quantitative des résultats pour les échantillons positifs.

Dans les réactions d'amplification des quatre **Q - PCR standards**, les valeurs **Ct** du VZV sont utilisées pour calculer la **courbe d'étalonnage** (Results > Standard Curve [Résultats > Courbe d'étalonnage]) de la session d'amplification, afin de valider l'amplification et la détection comme indiqué dans le tableau suivant :

Courbe d'étalonnage détecteur FAM « VZV »	Plage d'acceptabilité	Amplification/Détection
Coefficient de corrélation (R2)	**0,990 ≤ R2 ≤ 1,000**	**CORRECTE**

Si la valeur du **coefficient de corrélation (R2)** ne se situe pas dans les limites, cela signifie que des problèmes sont survenus pendant l'étape d'amplification ou de détection (distribution incorrecte du mélange réactionnel ou des étalons, dégradation du mélange réactionnel ou des étalons, paramétrage incorrect de la position des étalons, 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.

Les valeurs **Ct** du VZV dans la réaction d'amplification de chaque **échantillon** et la **courbe d'étalonnage** (Results > Standard Curve [Résultats > Courbe d'étalonnage]) de la session d'amplification sont utilisées pour calculer la **quantité** d'ADN cible présent dans les réactions d'amplification des échantillons.

Le produit est capable de quantifier environ 1 000 000 à 10 copies d'ADN du gène de la protéine majeure de liaison à l'ADN (ORF29) du VZV dans la réaction d'amplification, ce qui correspond aux équivalents génomiques par réaction (plage de mesure linéaire du produit, se reporter à la section « Caractéristiques de performance »), comme indiqué dans le tableau suivant :

Résultat de l'échantillon détecteur FAM « VZV »	Équivalents génomiques du VZV par réaction
Quantité > 1 x 10_6	PLUS DE 1 000 000
1 x 10_1 ≤ Quantité ≤ 1 x 10_6	= Quantité
Quantité < 1 x 10_1	MOINS DE 10

Les résultats (**Quantité**) de chaque **échantillon** (Results > Report [Résultats > Rapport]) sont utilisés pour calculer les équivalents génomiques **(gEq)** du VZV présents dans l'échantillon utilisé dans l'extraction (**Nc**) selon la formule suivante :

$$\text{Nc (gEq)} = \frac{\text{Ve x Quantité}}{\text{Vc x Va x Ep}}$$

Dans laquelle :
Vc est la quantité de l'échantillon utilisé dans l'extraction exprimée selon l'unité de mesure requise ;
Ep est l'efficacité de la procédure, à savoir l'extraction et l'amplification, **exprimée en valeurs décimales** ;
Ve est le volume total du produit d'extraction **exprimé en µL** ;
Va est le volume du produit d'extraction utilisé dans la réaction d'amplification **exprimé en µL** ;
Quantité est le résultat de la réaction d'amplification de l'échantillon **exprimé en gEq par réaction**.

En cas d'utilisation du kit d'extraction **EXTRAblood** avec des échantillons de sang total prélevé sur EDTA et si le résultat doit être **exprimé en gEq/mL**, la formule est la suivante :

Formule simplifiée pour le sang total avec le kit EXTRAblood
Nc (gEq/mL) = 25 x Quantité

En cas d'utilisation du système d'extraction **ELITe STAR** avec des échantillons de sang total et de plasma prélevé sur EDTA, ou des échantillons de liquide céphalorachidien, et si le résultat doit être **exprimé en gEq/mL**, la formule est la suivante :

Formule simplifiée pour le sang total, le plasma, le liquide céphalorachidien avec le système ELITe STAR
Nc (gEq/mL) = 28 x Quantité

En cas d'utilisation du système d'extraction **ELITe GALAXY** avec des échantillons de sang total et de plasma prélevé sur EDTA, ou des échantillons de liquide céphalorachidien, et si le résultat doit être **exprimé en gEq/mL**, la formule est la suivante :

Formule simplifiée pour le sang total, le plasma, le liquide céphalorachidien avec le système ELITe GALAXY
Nc (gEq/mL) = 35 x Quantité

En cas d'utilisation du système d'extraction **NucliSENS® easyMAG®** avec des échantillons de liquide céphalorachidien ou de plasma prélevé sur EDTA et si le résultat doit être **exprimé en gEq/mL**, la formule est la suivante :

Formule simplifiée pour le liquide céphalorachidien ou le plasma avec le système NucliSENS® easyMAG®
Nc (gEq/mL) = 10 x Quantité

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS035PLD

En cas d'utilisation du système d'extraction **QIAsymphony® SP/AS** avec des échantillons de plasma prélevé sur EDTA et si le résultat doit être **exprimé en gEq/mL**, la formule est la suivante :

Formule simplifiée pour le plasma avec le système QIAsymphony® SP/AS
Nc (gEq/mL) = 12 x Quantité

Calcul des limites de la plage de mesure linéaire

Lorsqu'une méthode d'extraction particulière est utilisée, les limites de la plage de mesure linéaire de l'échantillon, exprimées en gEq/mL, peuvent être calculées à partir de la plage de mesure linéaire de la réaction d'amplification selon la formule suivante :

$$\text{Limite inférieure (gEq/mL)} = \frac{\text{Ve x 10 gEq}}{\text{Vc x Va x Ep}}$$

$$\text{Limite supérieure (gEq/mL)} = \frac{\text{Ve x 1 000 000 gEq}}{\text{Vc x Va x Ep}}$$

En cas d'utilisation du kit d'extraction **EXTRAblood** avec des échantillons de sang total prélevé sur EDTA, la formule est la suivante :

Limites de la plage de mesure linéaire (gEq/mL) avec le kit EXTRAblood
Limite inférieure (gEq/mL) = 25 x 10 gEq Limite supérieure (gEq/mL) = 25 x 1 000 000 gEq
de 250 à 25 000 000 gEq/mL

En cas d'utilisation du système d'extraction **ELITe STAR** avec des échantillons de sang total et de plasma prélevé sur EDTA, ou des échantillons de liquide céphalorachidien, la formule est la suivante :

Limites de la plage de mesure (gEq/mL) avec le système ELITe STAR
Limite inférieure (gEq/mL) = 28 x 10 gEq Limite supérieure (gEq/mL) = 28 x 1 000 000 gEq
de 280 à 28 000 000 gEq/mL

En cas d'utilisation du système d'extraction **ELITe GALAXY** avec des échantillons de sang total et de plasma prélevé sur EDTA, ou des échantillons de liquide céphalorachidien, la formule est la suivante :

Limites de la plage de mesure (gEq/mL) avec le système ELITe GALAXY
Limite inférieure (gEq/mL) = 35 x 10 gEq Limite supérieure (gEq/mL) = 35 x 1 000 000 gEq
de 350 à 35 000 000 gEq/mL

En cas d'utilisation du système d'extraction **NucliSENS® easyMAG®** avec des échantillons de plasma prélevé sur EDTA ou des échantillons de liquide céphalorachidien, la formule est la suivante :

Limites de la plage de mesure (gEq/mL) avec le système NucliSENS® easyMAG®
Limite inférieure (gEq/mL) = 10 x 10 gEq Limite supérieure (gEq/mL) = 10 x 1 000 000 gEq
de 100 à 10 000 000 gEq/mL

En cas d'utilisation du système d'extraction **QIAsymphony® SP/AS** avec des échantillons de plasma prélevé sur EDTA, la formule est la suivante :

Limites de la plage de mesure (gEq/mL) avec le système QIAsymphony® SP/AS
Limite inférieure (gEq/mL) = 12 x 10 gEq **Limite supérieure (gEq/mL) = 12 x 1 000 000 gEq**
de 120 à 12 000 000 gEq/mL

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Sensibilité analytique : limite de détection

La sensibilité analytique de ce test permet de détecter la présence d'environ 10 molécules d'ADN cible dans les 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La sensibilité analytique du test, en tant que limite de détection, a été testée en utilisant un ADN plasmidique contenant le produit d'amplification dont la concentration initiale a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. L'ADN plasmidique a été dilué à un titre de 10 copies/20 µL dans de l'ADN génomique humain à un titre de 500 ng/20 µL. Cet échantillon a été testé en 50 réplicats en effectuant l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant.

Échantillons	**N**	**positifs**	**négatifs**
10 copies d'ADN plasmidique + 500 ng d'ADN génomique humain	50	50	0

La sensibilité analytique de ce test utilisé en association avec des échantillons de sang total et le système **ELITe GALAXY** a été vérifiée avec un panel de dilutions du VZV comprises dans la plage de la concentration limite. Le panel a été préparé en diluant l'échantillon VZV07-12 du panel « QCMD 2007 Varicella Zoster Virus DNA EQA Panel » (Qnostics Ltd, Royaume-Uni) dans du sang total prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du VZV. Les concentrations virales étaient comprises entre 10 gEq/mL et 562 gEq/mL. Chaque échantillon du panel a été testé en 12 réplicats en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction et le paramétrage de PCR avec le système **ELITe GALAXY**, et l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. L'analyse statistique a été effectuée en utilisant une régression des probits. La limite de détection a été calculée pour les concentrations auxquelles la probabilité de résultat positif était de 95 %.

La sensibilité analytique, en gEq/mL, est indiquée ci-dessous.

Limite de détection pour des échantillons de sang total avec le système ELITe GALAXY (gEq/mL)			
		Intervalle de confiance à 95 %	
		limite inférieure	limite supérieure
Positivité de 95 %	**100 gEq/mL**	**64** gEq/mL	**241** gEq/mL

La sensibilité analytique de ce test utilisé en association avec des échantillons de plasma et le système **ELITe GALAXY** a été vérifiée avec un panel de dilutions du VZV comprises dans la plage de la concentration limite. Le panel a été préparé en diluant l'échantillon VZV07-12 du panel « QCMD 2007 Varicella Zoster Virus DNA EQA Panel » (Qnostics Ltd., Royaume-Uni) dans du plasma prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du VZV. Les concentrations virales étaient comprises entre 10 gEq/mL et 562 gEq/mL. Chaque échantillon du panel a été testé en 12 réplicats en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction et le paramétrage de PCR avec le système **ELITe GALAXY**, et l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. L'analyse statistique a été effectuée en utilisant une régression des probits. La limite de détection a été calculée pour les concentrations auxquelles la probabilité de résultat positif était de 95 %.

La sensibilité analytique, en gEq/mL, est indiquée ci-dessous.

Limite de détection pour des échantillons de plasma avec le système ELITe GALAXY (gEq/mL)			
		Intervalle de confiance à 95 %	
		limite inférieure	limite supérieure
Positivité de 95 %	**69 gEq/mL**	**46** gEq/mL	**164** gEq/mL

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS035PLD

Sensibilité analytique : plage de mesure linéaire

La sensibilité analytique de ce test permet de quantifier entre 1 000 000 et 10 molécules d'ADN cible dans 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La sensibilité analytique du test, en tant que plage de mesure linéaire, a été déterminée en utilisant un panel de dilutions (1 $\log_{10}$ d'une dilution à l'autre) d'un ADN plasmidique contenant le produit d'amplification, dont la concentration initiale a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. Des dilutions de 10^7 molécules par réaction à 10^1 molécules par réaction ont été testées en 9 réplicats en réalisant l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

L'analyse des données obtenues, utilisant une régression linéaire, a montré que le test présentait une réponse linéaire pour toutes les dilutions (coefficient de corrélation linéaire supérieur à 0,99).

La limite supérieure de la plage de mesure linéaire a été définie à 10^6 molécules par réaction, en correspondant aux équivalents génomiques par réaction, à plus ou moins un logarithme de la concentration la plus élevée de l'étalon d'amplification Q - PCR Standard (10^5 molécules/20 µL).

La limite inférieure de la plage de mesure linéaire a été définie à 10 molécules par réaction, en correspondant aux équivalents génomiques par réaction, à plus ou moins un logarithme de la concentration la plus faible de l'étalon d'amplification Q - PCR Standard (10^2 molécules/20 µL).

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant :

Plage de mesure linéaire (gEq/réaction)	
Limite supérieure	1 000 000 gEq/réaction
Limite inférieure	10 gEq/réaction

Les limites de la plage de mesure linéaire, exprimées en gEq/mL et en référence au kit d'extraction utilisé, sont calculées à la page 25.

Sensibilité analytique : Précision et exactitude

La précision du test, en tant que variabilité des résultats obtenus avec plusieurs réplicats d'un échantillon testé dans la même session d'amplification, permet d'obtenir un pourcentage de coefficient de variation moyen (% CV) d'environ 21,0 % des quantités mesurées, dans la plage de 10^6 molécules à 10^1 molécules dans les 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

L'exactitude du test, en tant que différence entre la moyenne des résultats obtenus avec plusieurs réplicats d'un échantillon dans la même session d'amplification et la concentration théorique de l'échantillon, permet d'obtenir un pourcentage d'imprécision moyen (% Imprécision) d'environ 9,7 % des quantités mesurées, dans la plage de 10^6 molécules à 10^1 molécules dans les 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La précision et l'exactitude ont été déterminées en utilisant les données obtenues dans l'étude de la plage de mesure linéaire.

Sensibilité analytique : reproductibilité avec un panel de matériel de référence certifié

La sensibilité analytique du test, en tant que reproductibilité des résultats par comparaison aux résultats obtenus avec d'autres tests dans différents laboratoires, a été vérifiée en testant un panel d'un matériel de référence certifié.

Les tests ont été effectués en utilisant, à titre de matériel de référence certifié et étalonné, un panel de dilutions du VZV, souches 98/4 et Ellen, comprises dans la plage de la concentration limite (« QCMD 2010 Varicella-Zoster virus DNA EQA Panel » Qnostics Ltd, Royaume-Uni). Chaque échantillon du panel a été remis en suspension dans du sang total prélevé sur EDTA et a été utilisé en double en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction avec le kit **EXTRAblood** et l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tests avec un matériel de référence certifié et le kit EXTRAblood				
Échantillon	Consensus des tests commerciaux Log_{10} conc. virus	Écart-type	Positifs/Réplicats	Résultats moyens Log_{10} gEq/mL
VZV10-01	2,047	0,593	2/2	1,748
VZV10-02	négatif	N.A.	0/2	Non détecté
VZV10-03	1,844	1,140	2/2	1,569
VZV10-04	1,489	0,378	1/2	1,439
VZV10-05	HSV1	N.A.	0/2	Non détecté
VZV10-06	2,428	0,471	2/2	2,274
VZV10-07	2,149	0,648	2/2	2,070
VZV10-08	3,410	0,454	2/2	3,618
VZV10-09	0,964	0,729	1/2	1,687
VZV10-10	3,174	0,454	2/2	3,136

Tous les échantillons ont été correctement détectés. Sur les 2 réplicats, les échantillons VZV10-04 (31 copies/mL) et VZV10-09 (9 copies/mL) n'ont généré qu'un seul résultat positif, mais ils présentent des concentrations inférieures à la limite de détection du produit. Tous les résultats quantitatifs obtenus sont compris dans la plage définie par le consensus ± 1 écart-type.

Des tests supplémentaires ont été effectués en utilisant, à titre de matériel de référence étalonné, un panel de dilutions du VZV, souches 98/4 et Ellen, comprises dans la plage de la concentration limite (« QCMD 2012 Varicella-Zoster virus DNA EQA Panel » Qnostics Ltd, Royaume-Uni). Chaque échantillon du panel a été utilisé en double en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction avec le système **ELITe STAR**, et l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tests avec du matériel de référence certifié et le système ELITe STAR				
Échantillon	Consensus des tests commerciaux Log_{10} conc. virus	Écart-type	Positifs/Réplicats	Résultats moyens Log_{10} gEq/mL
VZV12-01	négatif	N.A.	0/2	Non détecté
VZV12-02	3,150	0,439	2/2	3,535
VZV12-03	4,052	0,588	2/2	4,564
VZV12-04	2,280	0,584	2/2	2,267
VZV12-05	2,547	0,450	2/2	2,854
VZV12-06	3,099	0,406	2/2	3,349
VZV12-07	2,794	0,633	2/2	3,129
VZV12-08	1,926	0,418	2/2	1,697
VZV12-09	2,287	0,561	2/2	2,531
VZV12-10	négatif	N.A.	0/2	Non détecté

Tous les échantillons négatifs ont été correctement détectés comme négatifs et tous les échantillons positifs ont été détectés comme positifs, conformément aux résultats quantitatifs définis par le consensus des tests commerciaux.

Des tests supplémentaires ont été effectués en utilisant, à titre de matériel de référence étalonné, un panel de dilutions du VZV comprises dans la limite de concentration (« QCMD 2012 Varicella-Zoster virus DNA EQA Panel », Qnostics Ltd, Royaume-Uni). Chaque échantillon a été testé en double en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction et le paramétrage de la PCR à l'aide du système **ELITe GALAXY** et l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS035PLD

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tests avec un matériel de référence étalonné et le système ELITe GALAXY				
Échantillon	Consensus des tests commerciaux Log_{10} conc. virus	Écart-type	Positifs/Réplicats	Résultats moyens Log_{10} gEq/mL
VZV12-01	négatif	N.A.	0/2	Non détecté
VZV12-02	3,150	0,439	2/2	3,061
VZV12-03	4,052	0,588	2/2	4,275
VZV12-04	2,280	0,584	2/2	2,435
VZV12-05	2,547	0,450	2/2	2,686
VZV12-06	3,099	0,406	2/2	3,359
VZV12-07	2,794	0,633	2/2	3,027
VZV12-08	1,926	0,418	1/2	1,860
VZV12-09	2,287	0,561	2/2	1,957
VZV12-10	négatif	N.A.	0/2	Non détecté

Tous les échantillons négatifs ont été correctement détectés comme négatifs et tous les échantillons positifs ont été détectés comme positifs, conformément aux résultats quantitatifs définis par le consensus des tests commerciaux. Sur les 2 réplicats, l'échantillon VZV12-08 n'a généré qu'un seul résultat positif. Ce résultat peut s'expliquer par le titre de l'échantillon qui était très proche de la limite de détection. Tous les résultats quantitatifs obtenus sont compris dans la plage définie par le consensus ± 1 écart-type.

Sensibilité diagnostique : efficacité de détection et de quantification de différents génotypes/sous-types

La sensibilité diagnostique du test, en ce qui concerne l'efficacité de détection et de quantification de différents génotypes/sous-types, a été évaluée par une comparaison de séquences avec des bases de données de nucléotides.

L'analyse des régions choisies pour l'hybridation des amorces et des sondes fluorescentes dans l'alignement des séquences disponibles dans la base de données pour le gène de la protéine majeure de liaison à l'ADN (ORF29) du VZV a montré leur conservation et une absence de mutations significatives.

La sensibilité diagnostique du test, en ce qui concerne l'efficacité de détection et de quantification de différents génotypes/sous-types, a été vérifiée en testant un panel de matériel de référence certifié.

La sensibilité diagnostique a été vérifiée en utilisant, à titre de matériel de référence certifié et étalonné, un panel incluant des échantillons positifs pour l'ADN du VZV des souches 98/4 et Ellen (« QCMD 2010 Varicella-Zoster virus DNA EQA Panel » Qnostics Ltd, Royaume-Uni). Chaque échantillon du panel a été testé en 2 réplicats en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir une extraction et une amplification, à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats obtenus sont présentés au paragraphe « Sensibilité analytique : reproductibilité avec un panel de matériel de référence certifié ».

Sensibilité diagnostique : confirmation des échantillons positifs

La sensibilité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons cliniques positifs, a été testée en analysant quelques échantillons cliniques de sang total prélevé sur EDTA qui étaient positifs pour l'ADN du VZV.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant, à titre de matériel de référence, 24 échantillons de sang total prélevé sur EDTA provenant de donneurs qui étaient présumés négatifs pour l'ADN du VZV (« Biological Sample Library Europe S.A.S. », Lyon, France), dopés à un titre connu avec de l'ADN du VZV en ajoutant l'échantillon VZV03-10 du panel « QCMD 2010 Human Varicella-Zoster virus DNA EQA Panel » (Qnostics Ltd, Royaume-Uni). Chaque échantillon a été utilisé en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction avec le kit **EXTRAblood** et l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé sur EDTA dopé avec de l'ADN du VZV	24	24	0

Tous les échantillons dopés ont été correctement détectés comme positifs pour l'ADN du VZV.
Dans ce test, la sensibilité diagnostique de l'analyse était de 100 %.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant 22 échantillons de liquide céphalorachidien qui étaient négatifs pour l'ADN du VZV et avaient été dopés avec de l'ADN du VZV en ajoutant l'échantillon VZV12-03, issu du panel « QCMD 2012 Varicella-Zoster virus EQA Panel » (Qnostics Ltd, Royaume-Uni), 30 échantillons de sang total prélevé sur EDTA qui étaient négatifs pour l'ADN du VZV et 30 échantillons de plasma prélevé sur EDTA qui étaient négatifs pour l'ADN du VZV, et avaient été dopés avec de l'ADN du VZV en ajoutant l'échantillon VZV07-06, issu du panel « QCMD 2007 Human Varicella-Zoster Virus EQA Panel » (Qnostics Ltd, Royaume-Uni). Chaque échantillon a été utilisé en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction à l'aide du système **ELITe STAR** et l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Liquide céphalorachidien dopé avec de l'ADN du VZV	22	22	0
Sang total prélevé sur EDTA dopé avec de l'ADN du VZV	30	30	0
Plasma prélevé sur EDTA dopé avec de l'ADN du VZV	30	30	0

Tous les échantillons dopés ont été correctement détectés comme positifs pour l'ADN du VZV.
Dans ce test, la sensibilité diagnostique de l'analyse était de 100 %.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant 20 échantillons de liquide céphalorachidien négatifs pour l'ADN du VZV, qui avaient été dopés avec de l'ADN du VZV en ajoutant l'échantillon VZV12-03, issu du panel « QCMD 2012 Varicella-Zoster virus EQA Panel » (Qnostics Ltd, Royaume-Uni), 30 échantillons de plasma prélevé sur EDTA négatifs pour l'ADN du VZV, qui avaient été dopés avec de l'ADN du VZV en ajoutant l'échantillon VZV07-06 du panel « QCMD 2007 Human Varicella-Zoster Virus EQA Panel » (Qnostics Ltd, Royaume-Uni) et 30 échantillons de sang total prélevé sur EDTA négatifs pour l'ADN du VZV, qui avaient été dopés avec de l'ADN du VZV en ajoutant l'échantillon VZV07-06 du panel « QCMD 2007 Human Varicella-Zoster Virus EQA Panel » (Qnostics Ltd, Royaume-Uni). Chaque échantillon a été utilisé en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction et le paramétrage de la PCR à l'aide du système **ELITe GALAXY** et l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Liquide céphalorachidien dopé avec de l'ADN du VZV	20	20	0
Plasma prélevé sur EDTA dopé avec de l'ADN du VZV	30	29	0
Sang total prélevé sur EDTA dopé avec de l'ADN du VZV	30	29	0

Un échantillon de plasma et un échantillon de sang total ont généré un résultat non valide en raison d'une erreur pendant l'étape d'extraction et n'ont pas été utilisés pour calculer la sensibilité.
Dans ce test, la sensibilité diagnostique de l'analyse était de 100 %.

Spécificité analytique : absence de réactivité croisée avec des marqueurs potentiellement interférents

La spécificité analytique du test, en ce qui concerne l'absence de réactivité croisée avec des marqueurs potentiellement interférents, a été évaluée par une comparaison de séquences avec des bases de données de nucléotides.

L'analyse de l'alignement des séquences des amorces et de la sonde fluorescente avec les séquences disponibles dans des bases de données d'organismes autres que le VZV, y compris les génomes complets du HSV1 et du VZV, les herpèsvirus humains les plus similaires au VZV, a montré leur spécificité et l'absence d'homologie significative.

La spécificité analytique du test, en ce qui concerne l'absence de réactivité croisée avec des marqueurs potentiellement interférents, a été vérifiée en testant un panel de matériel de référence certifié.

La spécificité analytique a été vérifiée en utilisant, à titre de matériel de référence certifié et étalonné, un panel de dilutions du HSV1 et du VZV comprises dans la plage de la concentration limite (« QCMD 2009 Herpes Simplex virus DNA EQA Panel » Qnostics Ltd, Royaume-Uni). Chaque échantillon du panel a été testé en 2 réplicats en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir une extraction avec le kit **EXTRAblood** et une amplification, à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS035PLD

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tests avec un matériel de référence certifié et le kit EXTRAblood				
Échantillon	Contenu	Consensus des tests commerciaux Log_{10} conc. virus	Positifs/Réplicats	Résultats moyens Log_{10} gEq/mL
HSV09-01	HSV1	2,215	0/2	Non détecté
HSV09-02	HSV2	2,236	0/2	Non détecté
HSV09-03	HSV2	3,293	0/2	Non détecté
HSV09-04	HSV2	2,314	0/2	Non détecté
HSV09-05	VZV	-	2/2	4,939
HSV09-06	HSV1	2,402	0/2	Non détecté
HSV09-07	HSV1	4,189	0/2	Non détecté
HSV09-08	HSV2	2,389	0/2	Non détecté
HSV09-09	négatif	-	0/2	Non détecté
HSV09-10	HSV1	3,205	0/2	Non détecté

Aucune réactivité croisée n'a été détectée avec les échantillons positifs pour l'ADN d'autres agents pathogènes.

Spécificité diagnostique : confirmation des échantillons négatifs

La spécificité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons cliniques négatifs, a été testée en analysant quelques échantillons cliniques de sang total prélevé sur EDTA provenant de donneurs présumés négatifs pour l'ADN du VZV.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant, à titre de matériel de référence, 24 échantillons de sang total prélevé sur EDTA provenant de donneurs qui étaient présumés négatifs pour l'ADN du VZV (« Biological Sample Library Europe S.A.S. », Lyon, France). Chaque échantillon a été utilisé en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction avec le kit **EXTRAblood** et l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé sur EDTA présumé négatif pour l'ADN du VZV	24	1	23

Un échantillon de sang total d'un donneur a généré un résultat positif pour l'ADN du VZV avec un très faible titre (environ 17 qEq/mL) à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. Le même échantillon a généré un résultat négatif et valide dans une seconde session d'amplification. Cette discordance peut s'expliquer par une réactivation du VZV, un virus largement répandu dans la population, suite à une période de latence. Dans ce test, la spécificité diagnostique de l'analyse était de 95,8 %.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant 24 échantillons de liquide céphalorachidien qui étaient négatifs pour l'ADN du VZV, 30 échantillons de sang total prélevé sur EDTA qui étaient négatifs pour l'ADN du VZV (testés avec un produit d'amplification en temps réel de DIV portant le marquage CE) et 30 échantillons de plasma prélevé sur EDTA qui étaient négatifs pour l'ADN du VZV (testés avec un produit d'amplification en temps réel de DIV portant le marquage CE). Chaque échantillon a été utilisé en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction à l'aide du système **ELITe STAR** et l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Liquide céphalorachidien négatif pour l'ADN du VZV	24	0	24
Sang total prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du VZV	30	0	29
Plasma prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du VZV	30	0	30

Un échantillon de sang total a généré un résultat non valide, probablement en raison de la présence d'un inhibiteur, et n'a pas été utilisé pour calculer la spécificité.
Dans ce test, la spécificité diagnostique de l'analyse était de 100 %.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant 22 échantillons de liquide céphalorachidien qui étaient négatifs pour l'ADN du VZV, 34 échantillons de plasma prélevé sur EDTA qui étaient négatifs pour l'ADN du VZV et 35 échantillons de sang total prélevé sur EDTA qui étaient négatifs pour l'ADN du VZV (testés avec un produit d'amplification en temps réel de DIV portant le marquage CE). Chaque échantillon a été utilisé en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction et le paramétrage de la PCR à l'aide du système **ELITe GALAXY** et l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Liquide céphalorachidien négatif pour l'ADN du VZV	22	0	22
Plasma prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du VZV	34	0	34
Sang total prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du VZV	35	0	35

Tous les échantillons négatifs ont été correctement détectés comme négatifs pour l'ADN du VZV.
Dans ce test, la spécificité diagnostique de l'analyse était de 100 %.

Roche cobas z 480 analyzer

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES

Échantillons

Ce produit doit être utilisé avec de **l'ADN extrait** des échantillons cliniques suivants :

Sang total prélevé sur EDTA

Les échantillons de sang total pour l'extraction de l'ADN doivent être prélevés sur de l'EDTA et être identifiés conformément aux directives de laboratoire. Ils doivent être transportés entre +2 et +8 °C et conservés entre +2 et +8 °C pendant trois jours au maximum. Sinon, ils doivent être congelés et conservés à -20 °C pendant trente jours au maximum ou à -70 °C pour des périodes plus longues. Il est recommandé de diviser les échantillons en aliquotes avant la congélation afin d'éviter des cycles répétés de congélation et de décongélation. En cas d'utilisation d'échantillons congelés, les décongeler juste avant l'extraction afin d'éviter une éventuelle dégradation des acides nucléiques.

Remarque : pour procéder à l'extraction de l'ADN des échantillons de sang total à l'aide de l'instrument **« MagNA Pure 24 System »** et de la **version logicielle 1.0** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **« Pathogen200 »** et suivre ces instructions : distribuer **350 µL** d'échantillon dans le tube MagNA Pure Tube 2.0 mL, charger le tube dans l'instrument et commencer l'extraction. Ce protocole comprend le traitement de 200 µL d'échantillon, l'ajout du **CPE** à 20 µL/extraction et l'élution des acides nucléiques dans 100 µL. Le **CPE** doit être dilué à 1:2 dans de l'eau ultra-pure de qualité biologie moléculaire. Pour plus de détails sur la procédure d'extraction, suivre scrupuleusement les instructions contenues dans le mode d'emploi du kit.

Plasma prélevé sur EDTA

Les échantillons de plasma pour l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés sur de l'EDTA conformément aux directives de laboratoire. Ils doivent être transportés entre +2 et +8 °C et conservés entre +2 et +8 °C pendant trois jours au maximum. Sinon, ils doivent être congelés et conservés à -20 °C pendant trente jours au maximum ou à -70 °C pour des périodes plus longues.

Il est recommandé de diviser les échantillons en aliquotes avant la congélation afin d'éviter des cycles répétés de congélation et de décongélation.

En cas d'utilisation d'échantillons congelés, les décongeler juste avant l'extraction afin d'éviter une éventuelle dégradation des acides nucléiques.

Remarque : pour procéder à l'extraction de l'ADN des échantillons de plasma à l'aide de l'instrument **« MagNA Pure 24 System »** et de la **version logicielle 1.0** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **« Pathogen200 »** et suivre ces instructions : distribuer **350 µL** d'échantillon dans le tube MagNA Pure Tube 2.0 mL, charger le tube dans l'instrument et commencer l'extraction. Ce protocole comprend le traitement de 200 µL d'échantillon, l'ajout du **CPE** à 20 µL/extraction et l'élution des acides nucléiques dans 100 µL. Le **CPE** doit être dilué à 1:2 dans de l'eau ultra-pure de qualité biologie moléculaire. Pour plus de détails sur la procédure d'extraction, suivre scrupuleusement les instructions contenues dans le mode d'emploi du kit.

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS035PLD

Autres échantillons :
Il n'existe actuellement aucune donnée disponible en ce qui concerne les performances du produit avec l'ADN extrait des échantillons cliniques suivants : liquide céphalorachidien (LCR), échantillons de lésions mucocutanées prélevés à l'écouvillon, liquide amniotique.

Substances interférentes

L'ADN extrait de l'échantillon ne doit pas contenir d'héparine, d'hémoglobine, de dextrane, de Ficoll®, d'éthanol ou de 2-propanol afin de prévenir les problèmes d'inhibition et la possibilité de génération fréquente de résultats non valides.

La présence d'une grande quantité d'ADN génomique humain dans l'ADN extrait de l'échantillon peut inhiber la réaction d'amplification.

Il n'existe actuellement aucune donnée disponible en ce qui concerne l'inhibition provoquée par des médicaments antiviraux, antibiotiques, de chimiothérapie ou immunosuppresseurs.

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.

Pour le contrôle négatif, à la place de l'ADN extrait de l'échantillon, ajouter à la réaction de l'eau ultra-pure de qualité biologie moléculaire (non incluse dans le kit).

Pour le contrôle positif, utiliser le produit **VZV - ELITe Positive Control** ou autrement le produit **VZV - ELITe Positive Control RF** ou le produit **VZV ELITe Standard**.

Contrôles de qualité

Il est recommandé de valider l'ensemble de la procédure d'analyse de chaque session d'extraction et d'amplification en testant les contrôles du processus, c'est-à-dire un échantillon testé négatif et un échantillon testé positif ou du 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)

Lorsque l'instrument **cobas z 480 analyzer (Roche)** est utilisé :

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

- mettre l'ordinateur de contrôle et le thermocycleur en temps réel en marche. Ouvrir le logiciel dédié et, dans la fenêtre principale, ouvrir une session « New Experiment » (Nouvelle expérience) ;
- paramétrer le volume de la réaction (« Reaction volume » [Volume de réaction]) à 40 µL ;
- attribuer un identifiant à chaque échantillon (« Sample editor » [Éditeur d'échantillons]) ;
- définir le cycle thermique de la réaction conformément au tableau suivant :

Cycle thermique		
Étape	**Températures**	**Durée**
Décontamination	50 °C	2 min
Dénaturation initiale	94 °C	2 min
Amplification et détection (45 cycles)	94 °C	10 s
	60 °C (acquisition de la fluorescence)	30 s
	72 °C	20 s
Dissociation (facultatif)	95 °C	15 s
	40 °C	30 s
	80 °C	15 s

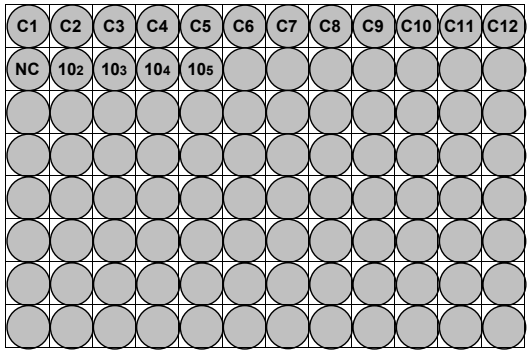
Remarque : l'acquisition de la fluorescence se produit individuellement ; paramétrer le « Ramp Rate » (Rampe) (°C/s) à 4,4 °C/s.

- sélectionner les canaux de détection du signal : « detector » (détecteur) pour la sonde VZV avec le « channel FAM 465-510 » (canal FAM 465-510) et « detector » (détecteur) pour la sonde du contrôle interne (IC) avec le « channel VIC 540-580 » (canal VIC 540-580) ;

Compléter le **Work Plan** (Plan de travail) joint à la fin du présent manuel d'utilisation, en renseignant ces informations ou en imprimant la disposition de la microplaque. Ce **Work Plan** (Plan de travail) doit être scrupuleusement suivi pendant le transfert du mélange réactionnel et des échantillons dans les puits.

Remarque : afin de déterminer la concentration de l'ADN dans l'échantillon source, il est nécessaire d'exécuter un ensemble de réactions avec l'étalon **Q - PCR Standard** (10^5 gEq, 10^4 gEq, 10^3 gEq, 10^2 gEq) afin d'obtenir la **courbe d'étalonnage**.

L'exemple ci-dessous montre comment organiser l'analyse quantitative de 12 échantillons.



Légende : C1 - **C12** : échantillons à analyser ; **NC** : contrôle d'amplification négatif ;
10^2 : étalon à 10^2 gEq ; **10^3** : étalon à 10^3 gEq ; **10^4** : étalon à 10^4 gEq ; **10^5** : étalon à 10^5 gEq.

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 :
- récupérer et décongeler les tubes à essai contenant les échantillons à analyser. Agiter délicatement les tubes, les placer dans la centrifugeuse pendant 5 secondes pour amener le contenu au fond, puis les conserver sur de la glace ;
- récupérer et décongeler les tubes à essai contenant le mélange **VZV Q - PCR Mix** requis pour la session, en se rappelant que le contenu de chaque tube est suffisant pour effectuer **25 réactions**. Agiter délicatement les tubes, les placer dans la centrifugeuse pendant 5 secondes pour amener le contenu au fond, puis les conserver sur de la glace ;
- récupérer et décongeler le tube à essai contenant le **VZV – Positive Control** ou autrement le **VZV - ELITe Positive Control RF** ou les tubes à essai contenant le **VZV Q - PCR Standard**. Agiter délicatement les tubes, les placer dans la centrifugeuse pendant 5 secondes pour amener le contenu au fond, puis les conserver sur de la glace ;
- récupérer la **plaque AD** devant être utilisée pour la session d'analyse, en veillant à porter des gants anti-poussière pour la manipuler et à ne pas endommager les puits.

1. Sans introduire de bulles et en veillant à déposer le mélange avec précision au fond des puits, transférer **20 µL** de mélange réactionnel **VZV Q - PCR Mix** dans les puits de la **plaque AD**, comme précédemment établi dans le **Work Plan** (Plan de travail).

Remarque : si le mélange réactionnel n'est pas utilisé en intégralité, conserver le mélange restant à -20 °C pendant un mois au maximum. Congeler et décongeler le mélange réactionnel **5 FOIS** au maximum.

2. En le déposant avec précision dans le mélange réactionnel, transférer **20 µL** de **l'ADN extrait** du premier échantillon dans le puits correspondant de la **plaque AD**, comme précédemment établi dans le **Work Plan** (Plan de travail). Bien mélanger l'échantillon en pipetant **l'ADN extrait** à trois reprises dans le mélange réactionnel. Veiller à ne pas introduire de bulles. Procéder de la même manière avec tous les autres **ADN extraits**.

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF **RTS035PLD**

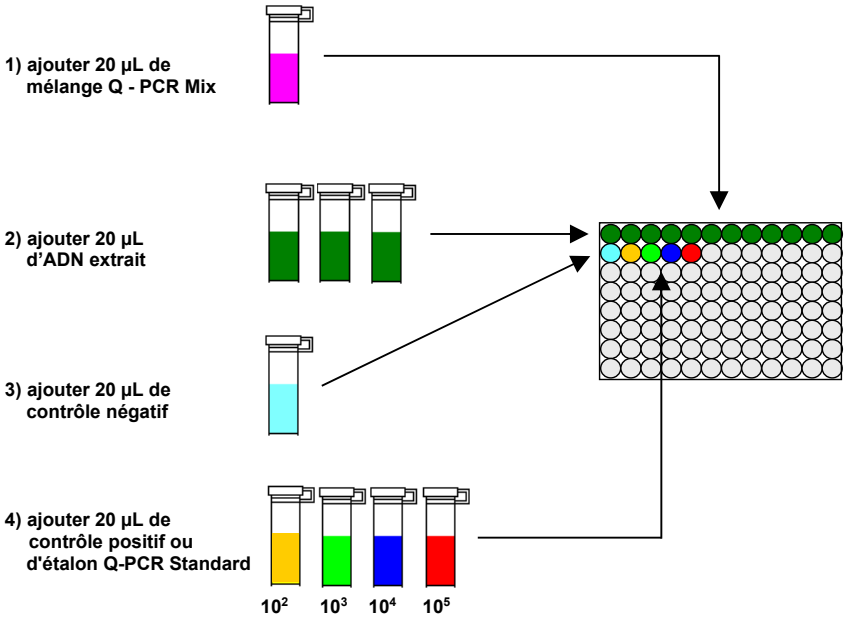
3. En le déposant avec précision dans le mélange réactionnel, transférer **20 µL** d'**eau ultra-pure de qualité biologie moléculaire** (non fournie avec le produit) dans le puits de la **plaque AD** contenant le contrôle d'amplification négatif, comme précédemment établi dans le **Work Plan** (Plan de travail). Bien mélanger le puits de contrôle négatif en pipetant **l'eau ultra-pure de qualité biologie moléculaire** à trois reprises dans le mélange réactionnel. Veiller à ne pas introduire de bulles.
4. Selon le résultat requis (qualitatif ou quantitatif), suivre l'une des ces deux options :

   - Lorsqu'un résultat **qualitatif** est requis (détection de l'ADN du VZV), pipeter avec précision, en le déposant dans le mélange réactionnel, **20 µL** de **VZV - ELITe Positive Control** ou autrement **VZV - ELITe Positive Control RF** dans le puits correspondant de la **plaque AD**, comme précédemment établi dans le **Work Plan** (Plan de travail). Bien mélanger le contrôle positif en pipetant le **VZV - ELITe Positive Control** à trois reprises dans le mélange réactionnel. Éviter d'introduire des bulles.

   - Lorsqu'un résultat **quantitatif** est requis (quantification de l'ADN du VZV), pipeter avec précision, en le déposant dans le mélange réactionnel, **20 µL** de **VZV Q - PCR Standard 10_2** dans le puits correspondant de la **plaque AD**, comme précédemment établi dans le **Work Plan** (Plan de travail). Bien mélanger l'étalon en pipetant le **VZV Q - PCR Standard** à trois reprises dans le mélange réactionnel. Éviter d'introduire des bulles. Procéder de la même manière avec les autres étalons **Q - PCR Standards** (**10_3, 10_4, 10_5**).
5. Sceller soigneusement la **plaque AD** à l'aide du **film de scellage**.
6. Transférer la **plaque AD** dans le thermocycleur en temps réel installé 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 sous un identifiant unique et reconnaissable (par exemple, « année-mois-jour-VZV-EGSpA »).

Remarque : à la fin du cycle thermique, la **plaque AD** et les produits de la réaction doivent être retirés de l'instrument et mis au rebut via une procédure qui n'engendre aucune pollution environnementale. **Ne jamais retirer** le **film de scellage de la microplaque d'amplification** pour éviter toute fuite des produits de la réaction.

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



Analyse qualitative des résultats

Les valeurs de la fluorescence émise enregistrées par le détecteur VZV (détecteur « VZV ») et le détecteur du contrôle interne (IC) (détecteur « IC ») pendant les réactions d'amplification doivent être analysées par le logiciel de l'instrument.

Sélectionner le menu « Analysis » (Analyse) et choisir « Absolute Quant/Fit Points » (Quantification absolue/Points d'ajustement) (2 points).

Sélectionner le groupe d'échantillons à analyser.

Conformément à la documentation de l'instrument, avant de commencer l'analyse, il est nécessaire de :

- saisir manuellement la plage de calcul (bouton Background [Bruit de fond]) du **Background Fluorescence Level** (Niveau de fluorescence de bruit de fond) du cycle 2 au cycle 6.

Pour les échantillons de **plasma :**

- paramétrer manuellement le **Threshold** (Seuil) et la **Noiseband** (Bande de bruit) pour le détecteur FAM « VZV » à **0,55**.
- paramétrer manuellement le **Threshold** (Seuil) et la **Noiseband** (Bande de bruit) pour le détecteur VIC « IC » à **1,2**.

Pour les échantillons de **sang total :**

- paramétrer manuellement le **Threshold** (Seuil) et la **Noiseband** (Bande de bruit) pour le détecteur FAM « VZV » à **0,80**.
- paramétrer manuellement le **Threshold** (Seuil) et la **Noiseband** (Bande de bruit) pour le détecteur VIC « IC » à **1,5**.

Les valeurs de la fluorescence émise par les détecteurs spécifiques dans la réaction d'amplification et les valeurs de fluorescence du **Threshold** (Seuil) et de la **Noiseband** (Bande de bruit) sont utilisées pour déterminer le **Threshold Cycle** (**Ct)** (Cycle seuil [Ct]), c'est-à-dire le cycle pendant lequel le **Threshold** (Seuil) de fluorescence est atteint.

Dans la réaction d'amplification du **contrôle positif***, la valeur **Ct** du VZV (Results > Report [Résultats > Rapport]) est utilisée pour valider l'amplification et la détection, comme décrit dans le tableau suivant :

Réaction du contrôle positif détecteur « VZV »	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct ≤ 25	**POSITIF**	**CORRECTE**

Si le résultat de la réaction d'amplification du **contrôle positif** est **Ct > 25** 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 du contrôle positif, dégradation du mélange réactionnel ou du contrôle positif, 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.

*** Remarque :** lorsque ce produit est utilisé pour la quantification de l'ADN du VZV, les réactions des étalons **Q - PCR Standard** sont paramétrées à la place de la réaction du **contrôle positif**. Dans ce cas, valider l'amplification et la détection en se reportant à la réaction d'amplification de l'étalon **Q - PCR Standard 10^5** (**Ct ≤ 25**).

Pendant la réaction d'amplification du **contrôle négatif**, la valeur **Ct** pour le VZV (fenêtre Analysis [Analyse]) est utilisée pour valider l'amplification et la détection, comme indiqué dans le tableau suivant :

Réaction du contrôle négatif détecteur « VZV »	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct indéterminé	**NÉGATIF**	**CORRECTE**

Si le résultat de la réaction d'amplification du **contrôle négatif** est autre que **Ct indéterminé** pour le VZV, la présence de la cible d'ADN a été détectée. Des problèmes sont survenus pendant l'étape d'amplification (contamination), ce qui peut générer des résultats incorrects et des faux positifs. La session d'analyse n'est pas valide et doit être répétée en commençant par l'étape d'amplification.

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS035PLD

Pendant les réactions d'amplification de chaque **échantillon**, la valeur **Ct** pour le VZV est utilisée pour détecter la présence de la cible d'ADN, alors que la valeur **Ct** pour le contrôle interne est utilisée pour valider l'extraction, l'amplification et la détection.

Remarque : à l'aide du logiciel de l'instrument (fenêtre Analysis [Analyse]), vérifier que le **Ct** est déterminé par une augmentation rapide et régulière des valeurs de la fluorescence, et non par des pics ou par une augmentation du signal de bruit de fond (bruit de fond irrégulier ou important).

Les résultats de type **Ct** de chacune des réactions d'amplification d'un **échantillon** (fenêtre Analysis [Analyse]) sont utilisés comme indiqué dans le tableau suivant :

Réaction d'échantillon		Adéquation de l'échantillon	Résultat du test	ADN du VZV
Détecteur « VZV »	**Détecteur « IC »**			
Ct indéterminé	**Ct > 35 ou Ct indéterminé**	**non adéquat**	**non valide**	**-**
	Ct ≤ 35	**adéquat**	**valide, négatif**	**NON DÉTECTÉ**
Ct déterminé	**Ct > 35 ou Ct indéterminé**	**adéquat**	**valide, positif**	**DÉTECTÉ**
	Ct ≤ 35	**adéquat**	**valide, positif**	**DÉTECTÉ**

Si le résultat d'une réaction d'amplification d'un échantillon est **Ct indéterminé** pour le VZV et **Ct > 35** ou Ct **indéterminé** pour le contrôle interne, il n'a pas été possible de détecter efficacement l'ADN du contrôle interne. Dans ce cas, des problèmes sont survenus pendant l'étape d'amplification (amplification inefficace ou nulle) ou pendant l'étape d'extraction (ADN de l'échantillon dégradé, échantillon comportant un nombre de cellules insuffisant, perte d'ADN pendant l'extraction ou présence d'inhibiteurs dans l'ADN extrait), ce qui peut générer des résultats incorrects et des faux négatifs. L'échantillon n'est pas adéquat, l'analyse n'est pas valide et doit être répétée en commençant par l'extraction d'un nouvel échantillon.

Si le résultat de la réaction d'amplification d'un échantillon est **Ct indéterminé** pour le VZV et **Ct ≤ 35** pour le contrôle interne, l'ADN du VZV n'a pas été détecté dans l'ADN extrait de l'échantillon ; toutefois, il n'est pas possible d'exclure le fait que de l'ADN du VZV soit présent à une concentration inférieure à la limite de détection du produit (se reporter à la section « Caractéristiques de performance »). Dans ce cas, le résultat constituerait un faux négatif.

Les résultats obtenus avec cette analyse doivent être interprétés en tenant compte de l'ensemble des données cliniques et des résultats des autres analyses de laboratoire du patient.

Remarque : lorsque l'ADN du VZV est détecté pendant la réaction d'amplification d'un échantillon, l'amplification du contrôle interne peut générer un résultat Ct > 35 ou Ct indéterminé. En fait, la réaction d'amplification du contrôle interne de faible efficacité peut être éliminée par compétition avec la réaction du VZV hautement efficace. Dans ce cas, l'échantillon est adéquat et le résultat d'analyse positif est valide.

Analyse quantitative des résultats

Après avoir effectué la procédure d'analyse qualitative, il est possible d'effectuer l'analyse quantitative des résultats de l'échantillon positif.

Si le résultat de la réaction d'amplification de l'étalon **Q - PCR Standard 10^5** est **Ct > 25** ou **Ct indéterminé** ou si les valeurs Ct des quatre étalons Q - PCR Standard ne sont pas régulièrement ajustées sur la courbe d'étalonnage, la cible d'ADN n'a pas été détectée correctement. Des problèmes sont survenus pendant l'étape d'amplification ou de détection (distribution incorrecte du mélange réactionnel ou des étalons, dégradation du mélange réactionnel ou des étalons, paramétrage incorrect des positions des étalons, 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.

Les valeurs **Ct** pour le VZV dans les réactions d'amplification de chaque **échantillon** et la **courbe d'étalonnage** (bouton **Standard Curve** [Courbe d'étalonnage]) de la session d'amplification sont utilisées pour calculer la **quantité** de la cible d'ADN présente dans les réactions d'amplification des échantillons.

Ce produit est capable de quantifier 1 000 000 à environ 10 équivalents génomiques par réaction, 25 000 000 à 250 équivalents génomiques par mL de sang total en utilisant le système d'extraction **MagNA Pure 24** (se reporter à la section « Caractéristiques de performance »), comme indiqué dans le tableau suivant :

Résultat de l'échantillon détecteur FAM « VZV »	Équivalents génomiques du VZV par réaction
Quantité > 1 x 10^6	**PLUS DE 1 000 000**
1,0 x 10^1 ≤ Quantité ≤ 1 x 10^6	**= Quantité**
Quantité < 1,0 x 10^1	**MOINS DE 10**

Les résultats (**Quantité**) de chaque **échantillon** (fenêtre Analysis [Analyse]) sont utilisés pour calculer les copies du VZV présentes dans l'échantillon source (**Nc**) selon la formule suivante :

$$Nc = \frac{Ve \times Quantité}{Vc \times Va \times Ep}$$

Dans laquelle :
Vc est la quantité d'échantillon utilisée dans l'extraction selon l'unité de mesure requise ;
Ep est l'efficacité de la procédure, à savoir l'extraction et l'amplification, **exprimée en valeurs décimales**,
Ve est le volume total obtenu à partir de l'extraction **exprimé en µL** ;
Va est le volume du produit d'extraction utilisé dans la réaction d'amplification **exprimé en µL** ;
Quantité est le résultat de la réaction d'amplification de l'échantillon **exprimé en copies par réaction**.

En cas d'utilisation d'échantillons de sang total et de plasma prélevé sur EDTA ainsi que d'urine avec le système d'extraction **MagNA Pure 24**, et si le résultat doit être **exprimé en copies/mL**, la formule est la suivante :

Formule simplifiée pour le sang total et le plasma avec le système MagNA Pure 24
Nc (copies/mL) = 25 x Quantité

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Sensibilité analytique : limite de détection

La sensibilité analytique de ce test, en tant que limite de détection, permet de détecter environ 10 copies dans 20 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 dont la concentration initiale a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. L'ADN plasmidique a été dilué à une concentration de 10 copies/20 µL dans 150 000 copies de pBETAGLOBIN/20 µL. Cet échantillon a été utilisé en 18 réplicats afin de réaliser une amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. Les résultats finaux sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
10 copies d'ADN plasmidique + 150 000 copies de pBETAGLOBIN	18	18	0

Sensibilité analytique : plage de mesure linéaire

La sensibilité analytique de ce test, en tant que plage de mesure linéaire, permet de quantifier environ 1 000 000 à 10 copies dans 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La sensibilité analytique de ce test a été évaluée en utilisant un panel de dilutions (1 $\log_{10}$ d'une dilution à l'autre) d'un ADN plasmidique contenant le produit d'amplification, dont la concentration initiale a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. Les points du panel de 10^7 molécules par réaction à 10^1 molécules par réaction ont été utilisés en 9 réplicats afin de réaliser une amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. Une analyse des données obtenues, utilisant une régression linéaire, a montré que le test présentait une réponse linéaire pour tous les points du panel (coefficient de corrélation linéaire supérieur à 0,99).

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS035PLD

La limite inférieure de la plage de mesure linéaire a été définie à environ 10 copies/réaction à plus ou moins un logarithme de la concentration la plus faible de l'étalon d'amplification Q - PCR Standard (10^2 copies/20 µL).

La limite supérieure de la plage de mesure linéaire a été définie à 10^6copies/réaction à plus ou moins un logarithme de la concentration la plus élevée de l'étalon d'amplification Q - PCR Standard (10^5 copies/20 µL).

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Plage de mesure linéaire en utilisant le système MagNA Pure 24		
	Limite inférieure	Limite supérieure
copies/mL	**25**	**25 000 000**
copies/réaction	**10**	**1 000 000**

Les conversions de « copies/mL » en « copies/réaction », et vice-versa, ont été calculées comme indiqué à la page 39.

Sensibilité analytique : Précision et exactitude

La précision de ce test, en termes de variabilité des résultats obtenus au cours de la même session d'amplification en utilisant différents réplicats d'un échantillon, a permis d'obtenir un pourcentage de coefficient de variation moyen (% VC) des valeurs Ct inférieur à 1 % dans la plage de 10^6 molécules à 10^1 molécules dans 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La précision de ce test, en termes de variabilité des résultats obtenus dans la même session d'amplification en utilisant différents réplicats d'un échantillon, a permis d'obtenir un pourcentage de coefficient de variation moyen (% CV) des quantités mesurées d'environ 7 % dans la plage de 10^6 molécules à 10^1 molécules dans 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

L'exactitude de ce test, en termes de différence entre la moyenne des résultats obtenus au cours de la même session d'amplification en utilisant différents réplicats d'un échantillon et la valeur de la concentration théorique d'un échantillon, a permis d'obtenir un pourcentage d'inexactitude moyen de la quantité mesurée d'environ 12 % dans la plage de 10^6 molécules à 10^1 molécules dans 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La précision et l'exactitude ont été déterminées en utilisant les données obtenues lors des expériences qui ont évalué la plage de mesure linéaire.

Sensibilité analytique : reproductibilité avec un matériel de référence certifié

La sensibilité analytique du test, en tant que reproductibilité de la valeur d'un matériel de référence étalonné, a été évaluée en utilisant, à titre de matériel de référence, le panel étalonné « QCMD 2017 Varicella-Zoster virus DNA EQA Panel » (Qnostics Ltd, Royaume-Uni). Chaque échantillon du panel a été testé en 2 réplicats en effectuant l'extraction à l'aide du système d'extraction automatisé **MagNA Pure 24** et l'amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tests avec des matériels de référence étalonnés et le système « MagNA Pure 24 »		
Échantillon	**Cible**	**Positifs/Réplicats**
VZVDNA17S-01	VZV Oka	2/2
VZVDNA17S-02	Négatif	0/2
VZVDNA17S-03	VZV Oka	2/2
VZVDNA17S-04	VZV Oka	2/2
VZVDNA17S-05	VZV Oka	2/2
VZVDNA17S-06	VZV Ellen	2/2
VZVDNA17S-07	VZV Ellen	2/2
VZVDNA17S-08	VZV Ellen	2/2
VZVDNA17S-09	VZV Ellen	2/2
VZVDNA17S-10	VZV Ellen	2/2

Tous les échantillons négatifs ont été correctement détectés comme négatifs et tous les échantillons positifs ont été correctement détectés comme positifs, conformément aux résultats quantitatifs définis par le consensus EQA.

La sensibilité analytique du test, en tant que reproductibilité de la valeur d'un matériel de référence étalonné, a été évaluée en utilisant, à titre de matériel de référence, le panel étalonné VZV Molecular "Q" Panel (Qnostics, Ltd, Royaume-Uni). Chaque échantillon du panel a été testé en 2 réplicats en effectuant l'extraction à l'aide du système d'extraction automatisé **MagNA Pure 24** et l'amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tests avec des matériels de référence étalonnés et le système « MagNA Pure 24 »	
Échantillon	**Positifs/Réplicats**
VZVMQP01-High (concentration élevée)	2/2
VZVMQP01-Medium (concentration moyenne)	2/2
VZVMQP01-Low (faible concentration)	2/2
VZVMQP01-Negative (négatif)	0/2

Tous les échantillons positifs ont été correctement détectés.

Sensibilité diagnostique : confirmation des échantillons positifs

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant, à titre de matériel de référence, 30 échantillons de sang total prélevé sur EDTA négatifs pour l'ADN du VZV, qui avaient été dopés avec l'ADN du VZV en ajoutant l'échantillon VZVMQP01-High (concentration élevée) (Qnostics Ltd, Royaume-Uni) et 30 échantillons de plasma prélevé sur EDTA négatifs pour l'ADN du VZV, qui avaient été dopés avec l'ADN du VZV en ajoutant l'échantillon VZVMQP01-High (concentration élevée) (Qnostics Ltd, Royaume-Uni).

Chaque échantillon a été utilisé en effectuant la procédure d'analyse complète : une extraction en utilisant le système d'extraction automatisé **MagNA Pure 24** et une amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	**N**	**positifs**	**négatifs**
Sang total prélevé sur EDTA dopé avec de l'ADN du VZV	30	30	0
Plasma prélevé sur EDTA dopé avec de l'ADN du VZV	30	30	0

Tous les échantillons étaient valides lors du premier test ; ils ont été confirmés comme étant positifs pour l'ADN du VZV.

La sensibilité diagnostique du test en association avec des échantillons de sang total et de plasma était de 100 %.

Spécificité diagnostique : confirmation des échantillons négatifs

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant, à titre de matériel de référence, 36 échantillons de sang total prélevé sur EDTA présumés négatifs pour l'ADN du VZV et 34 échantillons de plasma prélevé sur EDTA présumés négatifs pour l'ADN du VZV.

Chaque échantillon a été utilisé en effectuant la procédure d'analyse complète : une extraction en utilisant le système d'extraction automatisé **MagNA Pure 24** et une amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	**N**	**positifs**	**négatifs**
Sang total prélevé sur EDTA présumé négatif pour l'ADN du VZV	36	0	36
Plasma prélevé sur EDTA présumé négatif pour l'ADN du VZV	34	1	34

Tous les échantillons de sang total étaient valides lors du premier test ; ils ont été confirmés comme étant négatifs pour l'ADN du VZV.

La spécificité diagnostique du test en association avec des échantillons de sang total et de plasma était de 100 %.

Remarque : les données complètes et les résultats des tests effectués pour évaluer les caractéristiques de performance du produit avec les matrices et les instruments sont présentés dans la Fiche technique du produit « VZV ELITe MGB® Kit », FTP RTS035PLD.

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS035PLD

BIBLIOGRAPHIE

A. J. Wakefield et al. (1992) *J Med Virology* 38: 183 - 190
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Utiliser exclusivement ce produit avec de l'ADN extrait des échantillons cliniques suivants : liquide céphalorachidien (LCR), sang total prélevé sur EDTA et plasma prélevé sur EDTA.

Ne pas utiliser d'ADN extrait d'échantillons héparinés avec ce produit : l'héparine inhibe la réaction d'amplification des acides nucléiques et génère des résultats non valides.

Ne pas utiliser d'ADN extrait contaminé par de l'hémoglobine, du dextrane, du Ficoll®, de l'éthanol ou du 2-propanol avec ce produit : ces substances inhibent la réaction d'amplification des acides nucléiques et peuvent générer des résultats non valides.

Ne pas utiliser ce produit avec de l'ADN extrait contenant une grande quantité d'ADN génomique humain, qui risque d'inhiber la réaction d'amplification des acides nucléiques.

Il n'existe actuellement aucune donnée disponible concernant les performances du produit avec l'ADN extrait des échantillons cliniques suivants : échantillons de lésions mucocutanées prélevés à l'écouvillon, liquide amniotique.

Utiliser ce produit uniquement avec les instruments validés et les échantillons clinique associés indiqués à la section « Échantillons et Contrôles ».

Il n'existe actuellement aucune donnée disponible en ce qui concerne l'inhibition provoquée par des médicaments antiviraux, antibiotiques, de chimiothérapie ou immunosuppresseurs.

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 cliniques positifs pour le VZV, 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 scrupuleusement 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 appropriés 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 l'utilisation de vêtements et d'instruments spéciaux 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 du VZV n'a pas été détecté dans l'ADN extrait de l'échantillon ; toutefois, il n'est pas possible d'exclure le fait que de l'ADN du VZV soit présent à un titre inférieur à la limite de détection du produit (se reporter à la section « Caractéristiques de performance »). Dans ce cas, le résultat pourrait être un faux négatif.

Les résultats obtenus avec ce produit peuvent parfois être non valides en raison d'une défaillance du contrôle interne et nécessitent d'effectuer un nouveau test, à partir de l'extraction, ce qui peut entraîner un

retard d'obtention des résultats finaux.

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

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 davantage réduit. Dans certains cas, comme en cas de diagnostic prénatal ou d'urgence, 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 ou de l'étalon Q - PCR Standard ou coefficient de corrélation non valide dans la courbe d'étalonnage	
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 ou de l'étalon distribué.
Paramétrage incorrect de la session d'analyse sur le système ELITe InGenius et ELITe BeGenius.	Vérifier la position du mélange réactionnel, du contrôle positif ou des étalons. Vérifier le volume du mélange réactionnel, du contrôle positif ou des étalons.
Dégradation de la sonde.	Utiliser une nouvelle aliquote du mélange réactionnel.
Dégradation du contrôle positif ou d'un étalon.	Utiliser une nouvelle aliquote du contrôle positif ou de l'étalon.
Erreur de paramétrage de l'instrument.	Vérifier le paramétrage des positions pour les réactions du contrôle positif ou de l'étalon sur l'instrument. Vérifier le paramétrage du cycle thermique sur l'instrument.
Erreur de l'instrument.	Contacter le service technique d'ELITechGroup.

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 de cônes entre les échantillons. Faire attention lors de la distribution des échantillons, des contrôles négatifs, des contrôles positifs et des étalons dans les puits de la microplaque, et se conformer à la feuille de travail.
Paramétrage incorrect de la session d'analyse sur le système ELITe InGenius et ELITe BeGenius.	Vérifier la position du mélange réactionnel, du contrôle positif ou des étalons. Vérifier le volume du mélange réactionnel, du contrôle positif ou des étalons.
Erreur lors du réglage de l'instrument.	Vérifier les réglages de position des échantillons, des contrôles négatifs, des contrôles positifs et des étalons sur l'instrument.
Microplaque mal scellée.	Faire attention lors du scellage de la microplaque.
Contamination de l'eau de qualité biologie moléculaire.	Utiliser une nouvelle aliquote d'eau.

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.
Erreur de l'instrument.	Contacter le service technique d'ELITechGroup.

ADN cible et du contrôle interne non détectés dans les réactions de l'échantillon	
Causes possibles	**Solutions**
Distribution incorrecte dans les puits de la microplaque.	Éviter de renverser le contenu des tubes à essai d'échantillon. Toujours changer de cônes entre les échantillons. Faire attention lors de la distribution des échantillons dans les puits de la microplaque et respecter la fiche de travail.
Paramétrage incorrect de la session d'analyse sur le système ELITe InGenius et ELITe BeGenius.	Vérifier la position du mélange réactionnel ou des échantillons. Vérifier le volume du mélange réactionnel ou des échantillons.
Dégradation du contrôle interne.	Utiliser de nouvelles aliquotes du Internal Control.
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 d'analyse « PCR Only » (PCR uniquement). Répéter l'extraction et l'amplification de l'échantillon.
Stockage incorrect du réactif.	Vérifier que le mélange réactionnel n'a pas été exposé à la température ambiante pendant plus de 30 minutes.
Problèmes lors de l'extraction.	Vérifier la qualité et la concentration de l'ADN extrait.
Erreur de l'instrument.	Contacter le service technique d'ELITechGroup.

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, les contrôle négatifs et les contrôles positifs ou les étalons 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 lesquels la fluorescence de bruit de fond s'est déjà stabilisée (vérifier les données « Results » [Résultats], « Component » [Composant]) et dans lesquels la fluorescence du signal n'a pas encore commencé à augmenter, par ex., du cycle 6 au cycle 15. Utiliser le calcul automatique de la référence en activant l'option « Auto Baseline » (Référence auto).

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 : - 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 d'analyse « PCR Only » (PCR uniquement) ou - répéter l'extraction avec une dilution à 1:10 de l'échantillon, dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, lors d'une session d'analyse « 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*.

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

Σ Contenu suffisant pour « N » tests.

Attention, consulter le mode d'emploi.

CONT Contenu.

Tenir à l'abri de la lumière du soleil.

Fabricant.

VZV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS035PLD

NOTE POUR L'ACQUÉREUR : LICENCE LIMITÉE

Ce produit contient des réactifs fabriqués par Life Technologies Corporation et commercialisés selon des accords de licence entre ELITechGroup S.p.A. et ses filiales et Life Technologies Corporation. Le prix d'achat de ce produit inclut des droits, limités et non transférables, qui permettent d'utiliser uniquement cette quantité du produit dans le seul objectif de satisfaire aux activités de l'acheteur qui sont directement liées à la réalisation de tests diagnostiques chez l'homme. Pour obtenir des informations sur l'achat d'une licence relative à ce produit à des fins autres que celles mentionnées ci-dessus, contacter le Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Téléphone : +1(760)603-7200. Fax : +1(760)602-6500. E-mail : outlicensing@thermofisher.com.

Les réactifs de détection ELITe MGB® sont couverts par un ou plusieurs des brevets américains numéros 6,127,121, 6,485,906, 6,660,845, 6,699,975, 6,727,356, 6,790,945, 6,949,367, 6,972,328, 7,045,610, 7,319,022, 7,368,549, 7,381,818, 7,662,942, 7,671,218, 7,715,989, 7,723,038, 7,759,126, 7,767,834, 7,897,736, 8,008,522, 8,067,177, 8,163,910, 8,389,745, 8,969,003, 8,980,855, 9,056,887, 9,085,800, 9,169,256 et par les brevets EP numéros 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939, ainsi que par des demandes de brevet actuellement en instance.

Cette licence limitée permet à la personne ou à l'entité légale à laquelle ce produit a été fourni de l'utiliser, ainsi que les données générées par son utilisation, uniquement à des fins de diagnostic chez l'homme. Ni ELITechGroup S.p.A. ni ses concédants de licence ne concèdent d'autres licences, expresses ou implicites, à toute autre fin.

« ELITe MGB® » et le logo « ELITe MGB® » sont des marques déposées au sein de l'Union européenne.

ELITe InGenius® et ELITe BeGenius® sont des marques déposées de ELITechGroup.

NucliSENS® easyMAG® sont des marques déposées de bioMérieux.

QIAsymphony® est une marque déposée de QIAGEN GmbH.

Ficoll® est une marque déposée de GE Healthcare.

VZV ELITe MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTS035PLD

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 «**VZV ELITe MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of human herpetic Varicella - Zoster virus (VZV)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.
The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of VZV infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay is CE-IVD validated in combination with the instruments **ELITe InGenius®** and **ELITe BeGenius®**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
VZV	Major DNA binding protein (ORF 29)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

› **Whole Blood** EDTA, **Plasma** EDTA**, CSF**

D. Kit content

VZV Q-PCR Mix
X 4
Ready-to-use PCR Master Mix 4 tubes of 540 µL 96 reactions per kit 5 freeze-thaw cycles per tube

› Maximum shelf-life: 24 months
› Storage temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

› **ELITe InGenius®** instrument**:** INT030
› **ELITe BeGenius®** instrument**:** INT040
› **ELITe InGenius SP200** extraction cartridge**:** INT032SP200
› **ELITe InGenius PCR Cassette** amplification cartridge**:** INT035PCR
› **ELITe InGenius SP200 Consumable Set** consumable for extraction**:** INT032CS
› **VZV - ELITe Standard:** STD035PLD
› **VZV - ELITe Positive Control:** CTR035PLD
› **CPE – Internal Control:** CTRCPE
› **ELITe InGenius Waste Box:** F2102-000
› **300 µL Filter Tips Axygen:** TF-350-L-R-S
› **1000 µL Filter Tips Tecan :** 30180118

F. Protocol

› Sample volume	200 µL
› CPE Internal Control volume	10 µL
› Total eluate volume	100 µL
› PCR eluate input volume	20 µL
› Q-PCR Mix volume	20 µL
› Unit of quantitative result	Copies/mL
› Frequency of controls	15 days
› Frequency of calibration	60 days

G. Performance ELITe InGenius® and ELITe BeGenius®

Matrix	Limit of Detection	Linearity Range	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	**100 cp / mL**	**100 – 25,000,000**	**96%** 27/28*	**100%** 34/34*
Plasma	**69 cp /mL**	**69 – 25,000,000**	**100%** 30/30*	**100%** 30/30*
CSF	**69 cp / reaction**	**69 – 25,000,000**	**100%** 20/20*	**100%** 22/22*

**confirmed samples/ tested samples*

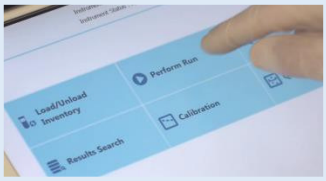
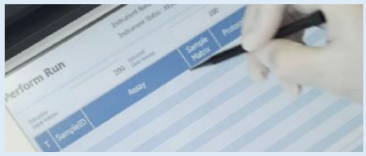
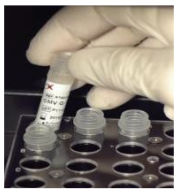
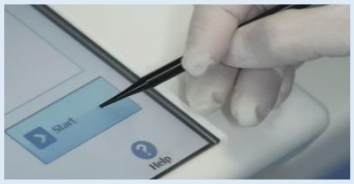
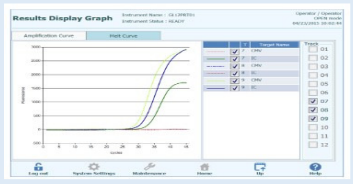
H. Procedures ELITe InGenius®

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 calibrators: VZV Q-PCR Standard in the "Calibration menu" Verify controls: VZV positve and negative controls in the "Control menu" *N.B:* Both have been run, approved and not expired	**3.** Thaw the Q- PCR-Mix and the Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen 	**2.** Verify the extraction volume: 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: Primary tube or extraction tube 	**6.** Load the Q-PCR Mix and the Internal Control in the inventory block 
7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, extraction tube and primary sample 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 Elution tubes rack
7. Load the PCR cassette rack Load the Q-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 : Primary tube or Secondary tube	**6.** Load the Internal Control in the inventory block
7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, extraction tube and primary sample racks	**8.** Close the door Start the run	**9.** Archive the eluate sample

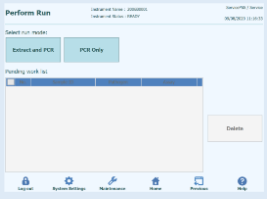
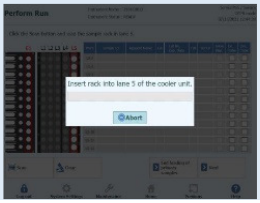
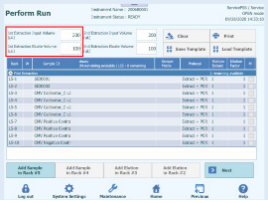
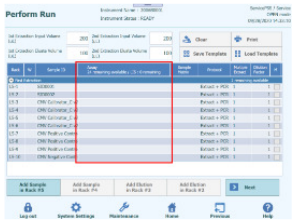
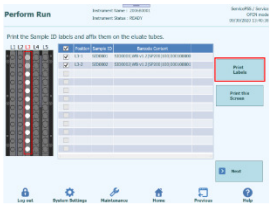
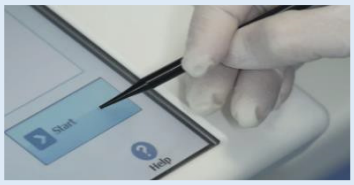
L. Procedures ELITe BeGenius®

The user is guided step-by-step by the ELITe BeGenius 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 BeGenius Identification with username and password Select the mode “Closed”	**2.** Verify calibrators: VZV Q-PCR standard in the “Calibration menu” Verify controls: VZV pos. and neg. controls in the “Control menu” *NB:* Both have been run, approved and not expired	**3.** Thaw the VZV Q- PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select “Perform Run” on the touch screen and then click on the run mode «Extraction and PCR» 	**2.** Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the cooling area. The barcode scan is already active 	**3.** Verify the extraction volumes: Input: “200 µL”, Eluate: “100 µL” 
4. Select the “Assay protocol” of interest  **Note**: if a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4	**5.** Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area 	**6.** Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in Reagent Rack and insert it in the cooling area
7. Load: Filter Tips, Extraction rack, and PCR rack 	**8.** Close the door. Start the run 	**9.** View, approve and store the results

Procedure 2 - PCR only

1. Select “Perform Run” on the touch screen and the click on the run mode «PCR Only»	**2.** Load the extracted nucleic acid barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area	**3.** Select the “Assay protocol” of interest
4. Load the Q-PCR-Mix in Reagent Rack and insert it in the cooling area Load filter tips and the PCR rack	**5.** Close the door. Start the run	**6.** 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” in the Assay Protocol selection screen.	**6.** Load the CPE Internal Control in the Elution Rack and insert it in the cooling area
7. Load : Filter Tips and the Extraction Rack	**8.** Close the door Start the run	**9.** Archive the eluate sample

VZV ELITe MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Ref: RTS035PLD

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 «**VZV ELITe MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of human herpetic Varicella - Zoster virus (VZV)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.
The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of VZV infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay is CE-IVD validated in combination with **ABI PCR thermal cyclers** (Thermo-Fisher) and the following extraction systems: **ELITe STAR** (ELITechGroup), **ELITe GALAXY** (ELITechGroup), **easyMAG** (BioMérieux) or **QIAsymphony** (Qiagen).

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
VZV	Major DNA binding protein (ORF 29)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

› **Whole blood** EDTA › **Plasma** EDTA › **Cerebrospinal fluid**

D. Kit content

VZV Q-PCR Mix

X 4

Ready-to-use PCR Master Mix
4 tubes of 540 µL
100 reactions per kit
5 freeze-thaw cycles per tube

› Maximum shelf-life: 24 months
› Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

› **7500 Fast Dx and 7300 PCR Instrument**
› **ELITe STAR:** INT010
› **ELITe STAR 200 extraction kit:** INT011EX
› **ELITe GALAXY:** INT020
› **ELITe GALAXY 300 extraction kit:** INT021EX
›

› **VZV ELITe Standard:** STD035PLD
› **VZV - ELITe Positive Control:** CTR035PLD
› **CPE - Internal Control:** CTRCPE
› **easyMAG** - Generic protocol 2.0.1
› **QIAsymphony** - DNA Mini kit or DSP Virus/Pathogen Midi kit
› **Molecular biology grade water**

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
ELITe STAR - ABI	Whole blood	**10 gEq/reaction**	**100%** (30/30)*	**100%** (29/29)*
	Plasma	**10 gEq/reaction**	**100%** (30/30)*	**100%** (30/30)
	CSF	**10 gEq/reaction**	**100%** (22/22)*	**100%** (24/24)*
ELITe GALAXY - ABI	Whole blood	**100 gEq/mL**	**100%** (29/29)*	**100%** (35/35)*
	Plasma	**69 gEq/mL**	**100%** (29/29)*	**100%** (34/34)*
	CSF	**10 gEq/reaction**	**100%** (20/20)*	**100%** (22/22)*

**confirmed samples/tested samples*

G. 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.

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
ELITe STAR	WB, Plasma, CSF	200 µL	700 µL	100 µL	200 µL
ELITe GALAXY	WB, Plasma	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL
EasyMAG	CSF, Plasma	500 µL	-	100 µL	5 µL
QIAsymphony	Plasma	500 µL	700 µL	85 µL	10 µL

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

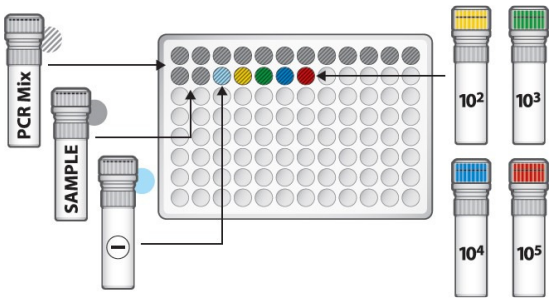
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "VZV" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridation step at 60°C

Stage	Temperature	Timing
Decontamination	50°C	2 min
Denaturation	94°C	2 min
Amplification and detection *45 cycles*	94°C 60°C 72°C	10 sec 30 sec 20 sec

The melt curve analysis is optional, refer to the complete IFU

Amplification - PCR Set -up

1. Thaw VZV Q-PCR Mix and Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet **20 µL** of Q-PCR-Mix in all microplate wells in use
4. Add, **20 µL** of extracted DNA in sample wells, **20 µL** of molecular grade water in Negative Control well, and **20 µL** of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells
   Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification – Baseline and Threshold for qualitative analysis

Instrument	Baseline	VZV FAM	Internal Control VIC
7500 Fast Dx Real Time PCR	6 - 15	0.2	0.1
7300 Real Time PCR	6 - 15	0.1	0.05

Interpretation - Qualitative results

VZV Ct value	Internal Control Ct value	Interpretation
Determined	-	Positive
Undetermined	Ct ≤ 35	Negative
	Ct >35 or Undetermined	Invalid*

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The VZV Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction.
The sample quantification ranges from approximately 10 to 10^6 cp/reaction or approximately from 100 to 10^7 cp/mL.

VZV ELITe MGB® Kit used with Cobas-Z 480 PCR instruments

Ref.: RTS035PLD

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 «**VZV ELITe MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for **the detection and quantification of the DNA of human herpetic Varicella - Zoster virus (VZV)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of VZV infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay is CE-IVD validated in combination with **Cobas – Z 480 analyzer (Roche)** and the following extraction systems: **MagNA Pure 24 System**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
VZV	**Major DNA binding protein (ORF 29)**	**FAM**
Internal Control	**human beta globin gene**	**AP525**

C. Validated matrix

› **Whole blood** EDTA › **Plasma** EDTA

D. Kit content

VZV Q-PCR Mix
X 4
Ready-to-use PCR Master Mix 4 tubes of 540 µL 100 reactions per kit 5 freeze-thaw cycles per tube

› Maximum shelf-life: 24 months
› Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

› **Cobas – Z 480 analyzer PCR Instrument**
› **MagNA Pure 24 System,** software 1.0
› **VZV - ELITe Positive Control:** CTR035PLD
› **VZV ELITe Standard:** STD035PLD
› **CPE Internal Control:** CTRCPE

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
MagNA Pure 24	Whole blood	**10 cp/reaction**	**100%** (30/30)*	**100%** (36/36)*
	Plasma	**10 cp/reaction**	**100%** (30/30)*	**100%** (34/34)*

**confirmed samples/tested samples*

G. 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.

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
MagNA Pure 24	WB, Plasma	200 µL	350 µL	100 µL	20 µL

Amplification - Settings of Cobas-Z 480 PCR instruments PCR instruments

1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "VZV" detector with "FAM channel 465 -510"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC channel 540 - 580"

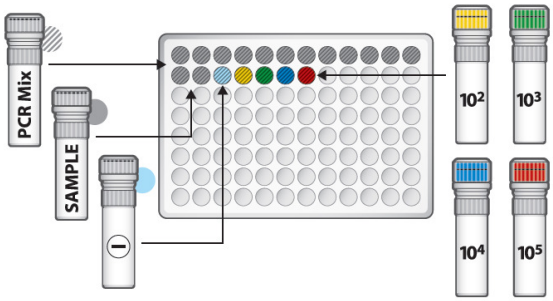
Stage	Temperature	Timing
Decontamination	50°C	2 min
Denaturation	94°C	2 min
Amplification and detection *45 cycles*	94°C 60°C 72°C	10 sec 30 sec 20 sec

The melt curve analysis is optional, refer to the complete IFU

Amplification - PCR Set-up

1. Thaw VZV Q-PCR Mix and Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet **20 µL** of Q-PCR Mix in all microplate wells in use
4. Add, **20 µL** of extracted DNA in sample wells, **20 µL** of molecular grade water in Negative Control well, and **20 µL** of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells

   Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification – Background and Threshold for qualitative analysis*

Instrument	Matrix	Background	VZV FAM	Internal Control VIC
Cobas-Z 480 PCR instruments	Plasma	2 - 6	0.55	1.2
Cobas-Z 480 PCR instruments	WB	2 - 6	0.8	1.5

**manually set the Threshold and Noiseband*

Interpretation - Qualitative results

VZV Ct value	Internal Control Ct value	Interpretation
Determined	-	Positive
Undetermined	Ct ≤ 35	Negative
	Ct >35 or Undetermined	Invalid*

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The VZV Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction. The sample quantification ranges from approximately 10 to 10^6 copies/reaction or approximately from 100 to 10^7 copies/mL.