



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 23/01/2024

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«HHV7 ELITe MGB[®] Kit» Ref. RTS037PLD

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

- *Extension of the use of the product in association with «ELITE BeGenius[®]» instrument (REF INT040) and whole blood and plasma matrices.*
- *Update of PERFORMANCE CHARACTERISTICS:*
 - o *LoD, LLoD and ULoD values confirmed on matrix*
 - o *Repeatability and Reproducibility calculated on matrix*
 - o *Internal Cut-off value changed from 36 to 35*

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



HHV7 ELITE MGB® Kit
réactifs de PCR en temps réel de l'ADN

REF RTS037PLD

PRINCIPE DU TEST

Le test est une PCR quantitative en temps réel qui détecte l'ADN du HHV7, isolé à partir d'échantillons et amplifié à l'aide du réactif du test **HHV7 Q PCR Mix** qui contient des amorces et des sondes dotées de la technologie ELITE MGB et TaqMan™ MGB®.

Les sondes ELITE MGB et TaqMan MGB sont activées lorsqu'elles s'hybrident aux produits de PCR associés. Les **ELITE InGenius** et **ELITE BeGenius** surveillent l'augmentation de la fluorescence et calculent le cycle seuil (Ct) ainsi que les températures de fusion (Tm). La quantité d'ADN du HHV7 est calculée en se basant sur une courbe d'étalonnage enregistrée.

Dans les sondes ELITE MGB, les fluorophores sont désactivés lorsque la sonde est à l'état simple brin et enroulée de manière aléatoire. Les fluorophores sont actifs dans le duplex sonde/amplicon étant donné que le désactivateur est spatialement séparé du fluorophore. Noter que le fluorophore n'est pas clivé pendant la PCR et peut être utilisé pour l'analyse de dissociation et le calcul de la température de fusion.

HHV7 ELITE MGB® Kit

réactifs de PCR en temps réel de l'ADN

REF RTS037PLD



TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|---------|
| APPLICATION | page 1 |
| PRINCIPE DU TEST | page 2 |
| DESCRIPTION DU PRODUIT | page 2 |
| MATÉRIEL FOURNI | page 2 |
| MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI | page 2 |
| AUTRES PRODUITS REQUIS | page 3 |
| AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS | page 4 |
| ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES POUR LES ELITE InGenius et ELITE BeGenius | page 5 |
| PROCÉDURE AVEC LE ELITE InGenius | page 8 |
| PROCÉDURE AVEC LE ELITE BeGenius | page 13 |
| CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC LES ELITE InGenius et ELITE BeGenius | page 18 |
| ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES POUR D'AUTRES SYSTÈMES | page 24 |
| PROCÉDURES POUR D'AUTRES SYSTÈMES | page 25 |
| CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC D'AUTRES SYSTÈMES | page 34 |
| BIBLIOGRAPHIE | page 36 |
| LIMITES DE LA PROCÉDURE | page 37 |
| PROBLÈMES ET SOLUTIONS | page 38 |
| LÉGENDE DES SYMBOLES | page 41 |
| NOTE POUR L'ACQUÉREUR : LICENCE LIMITÉE | page 43 |
| ANNEXE : GUIDE DE DÉMARRAGE RAPIDE | page A |

APPLICATION

Le produit **HHV7 ELITE MGB® Kit** est un test qualitatif et quantitatif d'amplification des acides nucléiques pour la **détection et la quantification de l'ADN de l'herpèsvirus humain de type 7 (HHV7)** dans des échantillons d'ADN extraits de sang total prélevé sur EDTA, plasma prélevé sur EDTA et liquide céphalorachidien (LCR).

Le test est validé en association avec les instruments **ELITE InGenius®** et **ELITE BeGenius®**, des systèmes intégrés et automatisés d'extraction, de PCR en temps réel et d'interprétation des résultats, en utilisant des échantillons humains de sang total et de plasma prélevés sur EDTA.

Le test est validé en association avec le **7300 Real-Time PCR System** et le **7500 Real-Time PCR System**, en utilisant des échantillons humains de sang total, de plasma prélevé sur EDTA et de liquide céphalorachidien.

Le produit est destiné à être utilisé dans le diagnostic et la surveillance des infections par le HHV7, en association avec les données cliniques du patient et d'autres résultats d'analyse de laboratoire.

DESCRIPTION DU PRODUIT

Le **HHV7 ELITE MGB Kit** fournit le réactif du test, le **HHV7 Q - PCR Mix**, un mélange de PCR optimisé et stabilisé qui contient les amorces et les sondes spécifiques pour :

- le HHV7, région du **gène de la protéine de capsid (U57)**, détecté dans le Canal **HHV7** ; la sonde est stabilisée par le groupe MGB, désactivée par le désactivateur Eclipse Dark Quencher® et marquée par le colorant FAM.
- le Contrôle interne (IC), spécifique pour la séquence d'ADN artificielle IC2, détecté dans le Canal **IC** ; la sonde est stabilisée par le groupe MGB, désactivée par le désactivateur Eclipse Dark Quencher® et marquée par le colorant AquaPhuor® 525 (AP525).

Le **HHV7 Q - PCR Mix** contient également un tampon, du chlorure de magnésium, des nucléotides triphosphates, le fluorophore AP593 (analogue 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 **HHV7 ELITE MGB Kit** contient suffisamment de réactifs pour effectuer **96 tests** sur les **ELITE InGenius** et **ELITE BeGenius**, en utilisant 20 µL par réaction.

Le produit **HHV7 ELITE MGB Kit** contient suffisamment de réactifs pour effectuer **100 tests** sur d'autres systèmes, en utilisant 20 µL par réaction.

Le **HHV7 ELITE MGB Kit** peut également être utilisé en association avec d'autres instruments équivalents.

MATÉRIEL FOURNI

| Composant | Description | Quantité | Classification des risques |
|------------------------------------|---|------------|----------------------------|
| HHV7 Q - PCR Mix réf. RTS037PLD | Mélange de réactifs pour la PCR en temps réel dans un tube doté d'un capuchon transparent | 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.
- Centrifugeuse de paillasse (~3 000 tr/min).
- Microcentrifugeuse de paillasse (~13 000 tr/min).
- Thermomixer.

HHV7 ELITE MGB® Kit
réactifs de PCR en temps réel de l'ADN

REF RTS037PLD

- Micropipettes et cônes stériles avec filtre pour les aérosols ou cônes stériles à déplacement positif 0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Tubes stériles à capuchon vissant de 2,0 mL (Sarstedt, Allemagne, réf. 72.694.005).
- 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.

AUTRES PRODUITS REQUIS

Les réactifs pour l'extraction de l'ADN des échantillons, le contrôle interne d'extraction et d'inhibition, les contrôles positif et négatif d'amplification, les étalons d'ADN et les consommables ne sont pas fournis avec ce produit.

Pour l'extraction automatisée des acides nucléiques, la PCR en temps réel et l'interprétation des résultats des échantillons, les produits suivants sont requis :

| Instruments et logiciel | Produits et réactifs |
|--|---|
| <p>ELITE InGenius(ELITechGroup S.p.A., EG SpA réf. INT030)</p> <p>ELITE InGenius Software version 1.3.0.17 (ou versions ultérieures)</p> <p>HHV7 ELITE_STD, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des calibrateurs</p> <p>HHV7 ELITE_PC, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse du Contrôle positif</p> <p>HHV7 ELITE_NC, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse du Contrôle négatif</p> <p>HHV7 ELITE_WB_200_100, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des échantillons de sang total</p> <p>HHV7 ELITE_PL_200_100, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des échantillons de plasma</p> | <p>ELITE InGenius SP200 (EG SpA, réf. INT032SP200)</p> <p>ELITE InGenius SP 200 Consumable Set (EG SpA, réf. INT032CS)</p> <p>ELITE InGenius PCR Cassette (EG SpA, réf. INT035PCR)</p> <p>ELITE InGenius Waste Box (EG SpA, réf. F2102-000)</p> <p>300 µL Filter Tips Axygen (Corning Life Sciences Inc., réf. TF-350-L-R-S), avec le ELITE InGenius uniquement</p> <p>1000 µL Filter Tips Tecan (Tecan, Suisse, réf. 30180118), avec le ELITE BeGenius uniquement</p> <p>CPE – Internal Control (EG SpA, réf. CTRCPE)</p> <p>HHV7 ELITE Standard (EG SpA, réf. STD037PLD)</p> <p>HHV7 – ELITE Positive Control (EG SpA, réf. CTR037PLD)</p> |
| <p>ELITE BeGenius (EG SpA réf. INT040)</p> <p>ELITE BeGenius Software version 2.1.0. (ou versions ultérieures)</p> <p>HHV7 ELITE_Be_STD, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des calibrateurs</p> <p>HHV7 ELITE_Be_PC, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse du Contrôle positif</p> <p>HHV7 ELITE_Be_NC, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse du Contrôle négatif</p> <p>HHV7 ELITE_Be_WB_200_100, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des échantillons de sang total</p> <p>HHV7 ELITE_Be_PL_200_100, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des échantillons de plasma</p> | |

HHV7 ELITE MGB® Kit
réactifs de PCR en temps réel de l'ADN

REF RTS037PLD

| Instruments et logiciel | Produits et réactifs |
|--|--|
| <p>7300 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, réf. 4351101)</p> <p>QIASymphony® SP/AS (QIAGEN GmbH, Réf. 9001297, 9001301)</p> <p>NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux SA, Réf. 200111)</p> | <p>MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (LifeTechnologies, réf. N8010560)</p> <p>CPE – Internal Control (EG SpA, réf. CTRCPE)</p> <p>HHV7 ELITE Standard (EG SpA, réf. STD037PLD)</p> <p>HHV7 – ELITE Positive Control (EG SpA, réf. CTR037PLD)</p> <p>QIASymphony® Midi kit (QIAGEN GmbH, Réf. 931236)</p> <p>NucliSENS® easyMAG® Reagents (bioMérieux SA, Réf. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135)</p> |
| <p>7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (ThermoFisher Scientific, réf. 4406985)</p> <p>QIASymphony SP/AS (QIAGEN GmbH, Réf. 9001297, 9001301)</p> <p>NucliSENS easyMAG (bioMérieux SA, Réf. 200111)</p> | <p>MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL (Life Technologies, réf. 4346906)</p> <p>CPE – Internal Control (EG SpA, réf. CTRCPE)</p> <p>HHV7 ELITE Standard (EG SpA, réf. STD037PLD)</p> <p>HHV7 – ELITE Positive Control (EG SpA, réf. CTR037PLD)</p> <p>QIASymphony Midi kit (QIAGEN GmbH, Réf. 931236)</p> <p>NucliSENS easyMAG Reagents (bioMérieux SA, Réf. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135)</p> |

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

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

Avertissements et précautions d'ordre général

Manipuler et éliminer tous les échantillons biologiques comme s'ils étaient infectieux. Éviter tout contact direct avec les échantillons biologiques. Éviter de provoquer des éclaboussures ou des pulvérisations. Les tubes, cônes et tout autre matériel qui a été en contact avec les échantillons biologiques doivent être traités pendant au moins 30 minutes avec de l'hypochlorite de sodium à 3 % (eau de Javel) ou autoclavés pendant une (1) heure à 121 °C avant d'être mis au rebut.

Manipuler et éliminer tous les réactifs et l'ensemble du matériel qui ont été utilisés pour réaliser le test comme s'ils étaient 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. Éviter tout contact des réactifs d'extraction avec l'hypochlorite de sodium (eau de Javel).

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 indiquées avant d'exécuter le test.

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

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

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

Ne pas utiliser de réactifs provenant de lots différents.

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

Avertissements et précautions pour la biologie moléculaire

Les procédures de biologie moléculaire exigent du personnel qualifié et dûment formé pour éviter tout risque de résultats erronés, en particulier ceux dus à la dégradation des acides nucléiques des échantillons ou à la contamination des échantillons par les produits de PCR.

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

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

HHV7 ELITE MGB® Kit
réactifs de PCR en temps réel de l'ADN

REF RTS037PLD

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.

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

Les échantillons doivent être adaptés et, si possible, dédiés à ce type d'analyse. Les échantillons doivent être manipulés sous une hotte à flux laminaire. Les pipettes utilisées pour manipuler les échantillons doivent être exclusivement utilisées à cette fin spécifique. Les pipettes doivent être de type à déplacement positif ou doivent être utilisées avec des cônes dotés d'un filtre pour les aérosols. Les cônes utilisés doivent être stériles, exempts de DNases et de RNases, et exempts d'ADN et d'ARN.

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

Les produits d'extraction doivent être manipulés de manière à réduire la dispersion dans l'environnement afin d'éviter tout risque de contamination. Les PCR Cassettes (Cassettes de PCR) doivent être manipulées avec précaution et ne doivent jamais être ouvertes afin d'éviter la diffusion des produits de PCR dans l'environnement, et toute contamination des échantillons et des réactifs.

Avvertissements et précautions spécifiques pour les composants

| Composant | Température de stockage | Utilisation après la première ouverture | Cycles de congélation/décongélation | Stabilité à bord de l'instrument (ELITE InGenius et ELITE BeGenius) |
|------------------|---|---|-------------------------------------|--|
| HHV7 Q - PCR Mix | -20 °C ou température plus basse (à l'abri de la lumière) | un mois | jusqu'à cinq | jusqu'à cinq sessions d'analyse distinctes* de trois heures chacune ou jusqu'à 7 heures consécutives (2 sessions d'analyse de 3 heures chacune et durée nécessaire au paramétrage d'une troisième session d'analyse) |

* avec congélation intermédiaire

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES pour les ELITE InGenius et ELITE BeGenius

Échantillons

Ce produit est destiné à être utilisé sur les **ELITE InGenius** et **ELITE BeGenius** avec les échantillons cliniques suivants, identifiés et manipulés selon les directives du laboratoires, et prélevés, transportés et conservés dans les conditions suivantes :

| Échantillon | Exigences de prélèvement | Conditions de transport/conservation | | | |
|-------------|--------------------------|--------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | | +16/+26 °C (température ambiante) | +2/+8 °C | -20 ± 10 °C | -70 ± 15 °C |
| Sang total | EDTA | ≤ 24 heures | ≤ 72 heures | ≤ 1 mois | > 1 mois |
| Plasma | EDTA | ≤ 24 heures | ≤ 72 heures | ≤ 1 mois | > 1 mois |

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

HHV7 ELITE MGB® Kit
réactifs de PCR en temps réel de l'ADN

REF RTS037PLD

Utiliser les protocoles de test (Assay Protocols) suivants pour procéder au test des échantillons sur les **ELITE InGenius** et **ELITE BeGenius**. Ces protocoles de DIV ont été spécifiquement validés avec les ELITE MGB Kits et le **ELITE InGenius** ou **ELITE BeGenius** avec les matrices indiquées.

| Protocoles de test pour le HHV7 ELITE MGB Kit | | | | |
|---|----------------|--------------------------|-----------|--|
| Échantillon | Instrument | Nom du protocole de test | Rapport | Caractéristiques |
| Sang total | ELITE InGenius | HHV7 ELITE_WB_200_100 | copies/mL | Volume d'extraction initial : 200 µL Volume d'éluion extrait : 100 µL Contrôle Interne : 10 µL Sonication : NON Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de PCR de l'échantillon : 10 µL |
| | ELITE BeGenius | HHV7 ELITE_Be_WB_200_100 | copies/mL | Volume d'extraction initial : 200 µL Volume d'éluion extrait : 100 µL Contrôle Interne : 10 µL Sonication : NON Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de PCR de l'échantillon : 10 µL |
| Plasma | ELITE InGenius | HHV7 ELITE_PL_200_100 | copies/mL | Volume d'extraction initial : 200 µL Volume d'éluion extrait : 100 µL Contrôle Interne : 10 µL Sonication : NON Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de PCR de l'échantillon : 10 µL |
| | ELITE BeGenius | HHV7 ELITE_Be_PL_200_100 | copies/mL | Volume d'extraction initial : 200 µL Volume d'éluion extrait : 100 µL Contrôle Interne : 10 µL Sonication : NON Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de PCR de l'échantillon : 10 µL |

Pour tous les protocoles, le transfert de l'échantillon dans le tube d'extraction (pour le ELITE InGenius) ou le tube Sarstedt de 2 mL (pour le ELITE BeGenius) est facultatif.

Remarque : 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 sur le paramétrage et l'exécution de la procédure d'extraction.

Remarque : le pipetage des échantillons dans le **tube d'extraction** ou le **tube Sarstedt de 2 mL** peut entraîner une contamination. Utiliser les pipettes appropriées et suivre toutes les recommandations indiquées à la section « Avvertissements et précautions ».

Les acides nucléiques purifiés peuvent être laissés à température ambiante pendant 16 heures et conservés à -20 °C ou à une température plus basse pendant un mois maximum.

Se reporter au paragraphe « Substances potentiellement interférentes » de la section « Caractéristiques de performance » pour obtenir de plus amples informations concernant les substances interférentes.

Ne pas utiliser de plasma prélevé sur héparine, qui est un inhibiteur connu de la transcription inverse et de la PCR.

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.

Calibrateurs et contrôles de la PCR

Une courbe d'étalonnage doit être générée et approuvée pour chaque lot de réactifs de PCR.

- Pour la courbe d'étalonnage, utiliser les quatre niveaux du produit **HHV7 ELITE Standard** (non inclus dans ce kit) avec les protocoles de test (Assay Protocols) **HHV7 ELITE_STD** ou **HHV7 ELITE_Be_STD**.

Les résultats des contrôles de la PCR doivent être générés et approuvés pour chaque lot de réactifs de PCR.

- Pour le Contrôle positif, utiliser le produit **HHV7 - ELITE Positive Control** (non inclus dans ce kit) avec les protocoles de test (Assay Protocols) **HHV7 ELITE_PC** ou **HHV7 ELITE_Be_PC**.
- Pour le Contrôle négatif, utiliser de l'eau de qualité biologie moléculaire (non incluse dans ce kit) avec les protocoles de test (Assay Protocols) **HHV7 ELITE_NC** ou **HHV7 ELITE_Be_NC**.

Remarque : les **ELITE InGenius** et **ELITE BeGenius** permettent 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 courbes d'étalonnage expirent au bout de **60 jours**, après quoi il est nécessaire d'effectuer à nouveau l'étalonnage

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.

Les calibrateurs et les contrôles de la PCR doivent être à nouveau analysés en cas de survenue de l'une des situations suivantes :

- 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 **ELITE InGenius** ou **ELITE BeGenius** subit une procédure de maintenance ou d'entretien majeure.

Contrôles de qualité

Il est recommandé de vérifier la procédure d'extraction et de PCR. Il est possible d'utiliser des échantillons archivés ou du matériel de référence certifié. Les contrôles externes doivent être utilisés conformément aux exigences des organismes d'accréditation locaux, régionaux et fédéraux, selon le cas.

PROCÉDURE AVEC LE ELITE InGenius

La procédure d'utilisation du **HHV7 ELITE MGB Kit** avec le **ELITE InGenius** comporte trois étapes :

| | | |
|---------|---|---|
| ÉTAPE 1 | Vérification de la préparation du système | |
| ÉTAPE 2 | Paramétrage de la session d'analyse | A) Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR]) |
| | | B) Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement]) |
| | | C) Analyse d'étalonnage (PCR Only [PCR uniquement]) |
| | | D) Analyse du Contrôle positif et du Contrôle négatif (PCR Only [PCR uniquement]) |
| ÉTAPE 3 | Examen et approbation des résultats | 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 |

ÉTAPE 1 – Vérification de la préparation du système

Avant de commencer la session d'analyse :

- mettre le **ELITE InGenius** en marche et se connecter en mode « **CLOSED** » (FERMÉ), dans le menu « Calibration » (Étalonnage) de la page Home (Accueil), vérifier que les calibrateurs (**HHV7 Q - PCR Standard**) sont approuvés et valides (Status [Statut]) pour le lot de PCR Mix à utiliser. Si aucun calibrateur valide n'est disponible pour le lot de **PCR Mix**, effectuer un étalonnage comme décrit dans les sections suivantes,
- dans le menu « Controls » (Contrôles) de la page Home (Accueil), vérifier que les contrôles de PCR (**HHV7 - Positive Control**, **HHV7 Negative Control**) sont approuvés et valides (Status [Statut]) pour le lot de PCR Mix à utiliser. Si aucun contrôle de PCR valide n'est disponible pour le lot de **PCR Mix**, analyser les contrôles de PCR comme décrit dans les sections suivantes,
- choisir le type d'analyse, en suivant les instructions de l'interface graphique (GUI) pour le paramétrage de la session d'analyse et l'utilisation des protocoles de test (Assay Protocols) fournis par EG SpA (se reporter à la section « Échantillons et contrôles »).

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

Des protocoles d'analyse qualitative sont disponibles sur demande.

ÉTAPE 2 – Paramétrage de la session d'analyse

Le **HHV7 ELITE MGB Kit** peut être utilisé sur le **ELITE InGenius** pour les opérations suivantes :

- A. Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR]),
- B. Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement]),
- C. Analyse d'étalonnage (PCR Only [PCR uniquement]),
- D. Analyse du Contrôle positif et du Contrôle 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.

N.B. : le **ELITE InGenius** peut être connecté au « Laboratory Information System » (système de gestion des informations de laboratoire - LIS) qui permet de télécharger les informations relatives à la session d'analyse. Se reporter au manuel de l'instrument pour plus de détails.

Avant de paramétrer une analyse :

Décongeler les tubes de **HHV7 Q PCR Mix** nécessaires à température ambiante pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer **24 tests** dans des conditions optimisées (2 tests ou plus par session d'analyse). Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré.

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

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

| | A. Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR]) | B. Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement]) |
|----|---|--|
| 1 | <p>Identifier les échantillons et, si nécessaire, les décongeler à température ambiante, mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré.</p> <p>Décongeler les tubes de CPE nécessaires à température ambiante pendant 30 minutes. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré. Chaque tube permet d'effectuer 12 extractions.</p> | <p>Décongeler les les «Elution tube» (tubes d'éluion) contenant les acides nucléiques extraits à température ambiante. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré.</p> |
| 2 | Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil). | Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil). |
| 3 | Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initial) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'éluion de l'extraction) est de 100 µL. | Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initial) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'éluion de l'extraction) est de 100 µL. |
| 4 | Pour chaque échantillon, attribuer une « Track » (Position) et renseigner le « SampleID » (ID échantillon - SID) en le saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon. | Pour chaque échantillon, attribuer une « Track » (Position) et renseigner le « SampleID » (ID échantillon - SID) en le saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon. |
| 5 | Sélectionner le Assay Protocol (Protocole de test) dans la colonne « Assay » (Analyse) (se reporter à la section « Échantillons et contrôles »). | Sélectionner le Assay Protocol (Protocole de test) dans la colonne « Assay » (Analyse) (se reporter à la section « Échantillons et contrôles »). |
| 6 | Vérifier que le « Protocol » (Protocole) affiché est : « Extract + PCR » (Extraction + PCR). | Sélectionner « PCR Only » (PCR seulement) dans la colonne « Protocol » (Protocole). |
| 7 | Sélectionner la position de chargement de l'échantillon en tant que « Extraction Tube » (Tube d'extraction) dans la colonne « Sample Position » (Position de l'échantillon). Vérifier que le « Dilution factor » (Facteur de dilution) est « 1 ». | Vérifier que la position de chargement de l'échantillon dans la colonne « Sample Position » (Position échantillon) est « Elution Tube (bottom row) » (Tube d'éluion [ligne du bas]). Vérifier que le « Dilution factor » (Facteur de dilution) est « 1 ». |
| 8 | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. |
| 9 | Charger le CPE et le PCR Mix sur le « Inventory Block » (Gestionnaire de stocks) en se reportant à la « Load List » (Liste) et saisir le numéro de lot et la date de péremption du CPE et du PCR Mix ainsi que le nombre de réactions pour chaque tube. | Charger le PCR Mix sur le « Inventory Block » (Gestionnaire de stocks) en se reportant à la « Load List » (Liste) et saisir le numéro de lot et la date de péremption du PCR Mix ainsi que le nombre de réactions pour chaque tube. |
| 10 | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. |
| 11 | Vérifier les cônes dans les « Tip Racks » (Compartiment à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer les « Tip Racks » si nécessaire. | Vérifier les cônes dans les « Tip Racks » (Compartiment à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer les « Tip Racks » si nécessaire. |
| 12 | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. |
| 13 | Charger la PCR Cassette (Cassette de PCR), les cartouches d'extraction ELITE InGenius SP 200, et tous les consommables requis et échantillons à extraire. | Charger la PCR Cassette (Cassette de PCR) et les tubes d'éluion avec les échantillons extraits. |
| 14 | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. |
| 15 | Fermer le tiroir de l'instrument. | Fermer le tiroir de l'instrument. |
| 16 | Appuyer sur « Start » (Début). | Appuyer sur « Start » (Début). |

| | C. Analyse d'étalonnage (PCR Only [PCR seulement]) | D. Analyse du Contrôle positif et du Contrôle négatif (PCR Only [PCR seulement]) |
|----|---|---|
| 1 | <p>Décongeler les tubes de Q-PCR Standard nécessaires (Cal1 : Q-PCR Standard 10², Cal2 : Q-PCR Standard 10³, Cal3 : Q-PCR Standard 10⁴, Cal4 : Q-PCR Standard 10⁵) à température ambiante pendant 30 minutes. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré.</p> | <p>Décongeler les tubes de Contrôle positif à température ambiante pendant 30 minutes. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré.</p> <p>Préparer le Contrôle négatif en transférant au minimum 50 µL d'eau de qualité biologie moléculaire dans un « Elution tube » (Tube d'éluion) fourni avec le ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.</p> |
| 2 | Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil). | Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil). |
| 3 | Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initial) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'éluion extrait) est de 100 µL. | Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initial) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'éluion extrait) est de 100 µL. |
| 4 | Pour le Q-PCR Standard, attribuer la « Track » (Position), sélectionner le Assay Protocol (Protocole de test) dans la colonne « Assay » (Test) et saisir le numéro de lot et la date de péremption du réactif. | Sélectionner le Assay Protocol (Protocole de test) dans la colonne « Assay » (Analyse) (se reporter à la section « Échantillons et contrôles »). Saisir le numéro de lot et la date de péremption du Contrôle positif et de l'eau de qualité biologie moléculaire. |
| 5 | Vérifier que « PCR Only » (PCR uniquement) est sélectionné dans la colonne « Protocol » (Protocole). | Vérifier que « PCR Only » (PCR uniquement) est sélectionné dans la colonne « Protocol » (Protocole). |
| 6 | Vérifier que la position de chargement de l'échantillon dans la colonne « Sample Position » (Position échantillons) est « Elution Tube (bottom row) » [Tube d'éluion (ligne inférieure)]. | Vérifier que la position de chargement de l'échantillon dans la colonne « Sample Position » (Position échantillon) est « Elution Tube (bottom row) » (Tube d'éluion [ligne du bas]). |
| 7 | Charger le 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 PCR Mix ainsi que le nombre de réactions pour chaque tube. | Charger le 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 PCR Mix ainsi que le nombre de réactions pour chaque tube. |
| 8 | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. |
| 9 | Vérifier les cônes dans les « Tip Racks » (Compartiment à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer les portoirs de cônes si nécessaire. | Vérifier les cônes dans les « Tip Racks » (Compartiment à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer les « Tip Racks » si nécessaire. |
| 10 | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. |
| 11 | Charger la PCR Cassette (Cassette de PCR) et les tubes de Q-PCR Standard. | Charger la PCR Cassette (Cassette de PCR), le Contrôle positif et le Contrôle négatif. |
| 12 | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. |
| 13 | Fermer le tiroir de l'instrument. | Fermer le tiroir de l'instrument. |
| 14 | Appuyer sur « Start » (Démarrer). | Appuyer sur « Start » (Début). |

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

Remarque : à la fin de l'analyse, l'échantillon extrait restant dans le **tube d'éluion** doit être retiré de l'instrument, bouché, identifié et conservé à -20 ± 10 °C pendant un mois maximum. Éviter de renverser l'échantillon extrait.

Remarque : à la fin de l'analyse, le **PCR Mix** peut être retiré de l'instrument, bouché et stocké à -20 °C ou à une température plus basse ou peut être conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant un maximum de 7 heures (2 sessions d'analyse de 3 heures chacune et durée nécessaire au paramétrage d'une troisième session d'analyse). Mélanger délicatement et centrifuger le contenu pendant 5 secondes avant de commencer la session d'analyse suivante.

Remarque : à la fin de l'analyse, les étalons **Q-PCR Standard** restants peuvent être retirés de l'instrument, bouchés et conservés à -20 °C ou à une température plus basse. Éviter de renverser les étalons Q - PCR Standard.

Remarque : les étalons **HHV7 Q-PCR Standard** peuvent être utilisés pendant 4 sessions d'analyse distinctes de 2 heures chacune.

Remarque : à la fin de l'analyse, le **Contrôle positif** restant peut être retiré de l'instrument, bouché et conservé à -20 °C ou à une température plus basse. Éviter de renverser le Contrôle positif. Le **Contrôle négatif** restant doit être jeté.

Remarque : le **HHV7 Positive Control** peut être utilisé pendant 4 sessions d'analyse distinctes de 3 heures chacune.

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 de renverser les produits de la réaction.

ÉTAPE 3 - Examen et approbation des résultats

Le **ELITE InGenius** surveille les signaux de fluorescence cibles et de 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. 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]). Se reporter au manuel de l'instrument pour plus de détails.

Remarque : le **ELITE InGenius** 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. Se reporter au manuel de l'instrument pour plus de détails.

Le **ELITE InGenius** génère les résultats à l'aide du **HHV7 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,
- C. Validation des résultats de l'échantillon,
- D. Rapport des résultats de l'échantillon.

A. Validation de la courbe d'étalonnage

Le **ELITE InGenius Software** interprète les résultats de la PCR pour la cible des réactions des calibrateurs avec les paramètres du protocole de test (Assay Protocol) **HHV7 ELITE STD**. Les valeurs Ct versus la concentration génèrent la courbe d'étalonnage.

Les courbes d'étalonnage, spécifiques au lot de réactifs de PCR, sont enregistrées dans la base de données (Calibration [Étalonnage]). Elles peuvent être visualisées et approuvées par des utilisateurs « Administrator » (Administrateur) ou « Analyst » (Analyste) en suivant les instructions de la GUI.

La courbe d'étalonnage expire **au bout de 60 jours**.

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. De plus, si des échantillons ont été inclus dans l'analyse, ceux-ci ne sont pas quantifiés et doivent également être répétés pour générer des résultats quantitatifs.

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

Le **ELITE InGenius Software** interprète les résultats de la PCR pour la cible des réactions du Contrôle positif et du Contrôle négatif avec les paramètres des protocoles de test (Assay Protocols) **HHV7 ELITE_PC** et **HHV7 ELITE_NC**. Les valeurs Ct résultantes sont converties en concentration et utilisées pour vérifier 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**.

Le **ELITE InGenius Software** traite les résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif et génère des Control Charts (Graphiques de contrôle). Quatre résultats de Contrôle positif et de Contrôle négatif approuvés sont utilisés pour configurer le graphique 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. Se reporter au manuel de l'instrument pour plus de détails.

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 de l'échantillon

Le **ELITE InGenius Software** interprète les résultats de la PCR pour la cible (canal **HHV7**) et le Contrôle interne (canal **IC**) avec les paramètres de protocole de test (Assay Protocol) **HHV7 ELITE_WB_200_100** et **HHV7 ELITE_PL_200_100**. Les valeurs Ct des cibles résultantes sont converties en concentration.

Les résultats sont présentés dans l'écran « Results Display » (Affichage des résultats).

Les résultats de l'échantillon peuvent être approuvés lorsque les trois conditions du tableau ci-dessous sont remplies.

| 1) Courbe d'étalonnage | Statut |
|------------------------|----------|
| HHV7 Q-PCR Standard | APPROUVÉ |
| 2) Contrôle positif | Statut |
| HHV7 Positive Control | APPROUVÉ |
| 3) Contrôle négatif | Statut |
| HHV7 Negative Control | APPROUVÉ |

Les résultats de l'échantillon sont automatiquement interprétés par le **ELITE InGenius Software** en utilisant les paramètres du protocole de test (Assay Protocol).

Les messages des résultats possibles d'un échantillon sont répertoriés dans le tableau ci-dessous.

Pour chaque échantillon, le système rapporte une combinaison des messages suivants spécifiant si les ADN de l'agent pathogène sont détectés ou non détectés.

| Résultat de l'analyse de l'échantillon | Interprétation |
|---|--|
| HHV7:DNA Detected, quantity equal to "XXX" copies/mL (HHV7 : ADN détecté, quantité égale à « XXX » copies/mL) | L'ADN du HHV7 a été détecté dans l'échantillon dans la plage de mesure du test ; sa concentration est celle affichée. |
| HHV7:DNA Detected, quantity below "LLOq" copies/mL (HHV7 : ADN détecté, quantité inférieure au nombre de copies/mL de la « LLOq ») | L'ADN du HHV7 a été détecté dans l'échantillon ; sa concentration est inférieure à la limite inférieure de quantification du test. |
| HHV7:DNA Detected, quantity beyond "ULOq" copies/mL (HHV7 : ADN détecté, quantité supérieure au nombre de copies/mL de la « ULOq ») | L'ADN du HHV7 a été détecté dans l'échantillon ; sa concentration est supérieure à la limite supérieure de quantification du test. |
| HHV7:DNA Not detected or below the "LoD" copies/mL (HHV7 : ADN non détecté ou inférieur au nombre de copies/mL de la « LoD ») | L'ADN du HHV7 n'a pas été détecté dans l'échantillon. L'échantillon est négatif pour l'ADN cible ou sa concentration est inférieure à la limite de détection du test. |
| Invalid-Retest Sample (Non valide - Tester à nouveau l'échantillon) | Résultat d'analyse non valide en raison d'un échec du Contrôle Interne (en raison, par exemple, d'une extraction incorrecte ou d'un transfert d'inhibiteurs). Le test doit être répété. |

Échantillons rapportés comme « Invalid-Retest Sample » (Non valide - Tester à nouveau l'échantillon) : dans ce cas, l'ADN du Contrôle Interne n'a pas été efficacement détecté, ce qui peut être dû à des problèmes lors des étapes de prélèvement de l'échantillon, d'extraction ou de PCR (par ex. échantillonnage incorrect, 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 seulement). 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) (se reporter à la section « Problèmes et solutions »).

Les échantillons rapportés comme « HHV7:DNA Not detected or below the "LoD" copies/mL » (HHV7 : ADN non détecté ou inférieur au nombre de copies/mL de la « LoD ») sont appropriés pour l'analyse mais il n'a pas été possible de détecter l'ADN du HHV7. Dans ce cas, l'échantillon peut être négatif pour l'ADN du HHV7 ou l'ADN du HHV7 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 HHV7 à une concentration inférieure à la limite de détection (et à la limite inférieure de quantification) du test, s'ils sont détectés, sont rapportés comme « HHV7:DNA Detected, quantity below "LLoQ" copies/mL » (HHV7 : ADN détecté, quantité inférieure au nombre de copies/mL de la « LLoQ ») (se reporter à la section « Caractéristiques de performance »).

Les échantillons positifs pour l'ADN du HHV7 dans la plage de mesure linéaire (se reporter à la section « Caractéristiques de performance ») sont détectés et rapportés comme « HHV7: DNA Detected, quantity equal to "XXX" copies/mL ». (HHV7 : ADN détecté, quantité égale à « XXX » copies/mL).

Les échantillons positifs pour l'ADN du HHV7 qui sont supérieurs à la limite supérieure de quantification sont rapportés comme « HHV7: DNA Detected, quantity beyond "ULoQ" copies/mL » (HHV7 : ADN détecté, quantité au nombre de copies/mL de la « ULoQ ») et ne sont pas appropriés pour une quantification. Si nécessaire, 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 de mesure linéaire du test.

Remarque : les résultats obtenus avec ce test doivent être interprétés en association avec l'ensemble des observations cliniques pertinentes et des résultats du laboratoire.

Les résultats de l'échantillon sont stockés dans la base de données et, s'ils sont valides, peuvent être approuvés (Result Display [Affichage des résultats]) par des utilisateurs « 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 de l'échantillon

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 des résultats par échantillon sélectionné (SID).

Le « Track Report » (Rapport des positions) présente les détails des résultats par position sélectionnée.

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

PROCÉDURE AVEC LE ELITE BeGenius

La procédure d'utilisation du HHV7 ELITE MGB Kit avec le ELITE BeGenius comporte trois étapes :

| | | |
|---------|---|---|
| ÉTAPE 1 | Vérification de la préparation du système | |
| ÉTAPE 2 | Paramétrage de la session d'analyse | A) Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR]) |
| | | B) Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement]) |
| | | C) Analyse d'étalonnage (PCR Only [PCR uniquement]) |
| | | D) Analyse du Contrôle positif et du Contrôle négatif (PCR Only [PCR uniquement]) |

| | | |
|---------|-------------------------------------|--|
| ÉTAPE 3 | Examen et approbation des résultats | 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 |

ÉTAPE 1 - Vérification de la préparation du système

Avant de commencer la session d'analyse :

- mettre le système **ELITE BeGenius** en marche et se connecter en mode « **CLOSED** » (FERMÉ) ;
- dans le menu « Calibrations » (Étalonnages) de la page Home (Accueil), vérifier que les calibrateurs (**HHV7 Q - PCR Standard**) sont approuvés et valides (Status [Statut]) pour le lot de **HHV7 PCR Mix** à utiliser. Si aucun calibrateur valide n'est disponible pour le lot de **HHV7 PCR Mix**, effectuer un étalonnage comme décrit dans les sections suivantes,
- dans le menu « Controls » (Contrôles) de la page Home (Accueil), vérifier que les contrôles de PCR (**HHV7 Positive Control**, **HHV7 Negative Control**) sont approuvés et valides (Status [Statut]) pour le lot de **HHV7 PCR Mix** à utiliser. Si aucun contrôle de PCR valide n'est disponible pour le lot de **HHV7 PCR Mix**, analyser les contrôles de PCR comme décrit dans les sections suivantes,

choisir le type d'analyse, en suivant les instructions de l'interface graphique (GUI) pour le paramétrage de la session d'analyse et l'utilisation des protocoles de test (Assay Protocols) fournis par EG SpA (se reporter à la section « Échantillons et contrôles »).

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

Des protocoles d'analyse qualitative sont disponibles sur demande.

ÉTAPE 2 – Paramétrage de la session d'analyse

Le **HHV7 ELITE MGB Kit** peut être utilisé sur le **ELITE BeGenius** pour les opérations suivantes :

- A. Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR]),
- B. Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement]),
- C. Analyse d'étalonnage (PCR Only [PCR uniquement]),
- D. Analyse 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 chargés automatiquement lorsque le protocole de test est sélectionné.

Remarque : le **ELITE BeGenius** peut être connecté au « Laboratory Information System » (système de gestion des informations de laboratoire - LIS) qui permet de télécharger les informations relatives à la session d'analyse. Se reporter au manuel de l'instrument pour plus de détails.

Avant de paramétrer une analyse :

Décongeler les tubes de **HHV7 PCR Mix** nécessaires à température ambiante pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer **24 tests** dans des conditions optimisées (2 tests ou plus par session d'analyse). Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré.

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

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

| | A. Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR]) | B. Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement]) |
|----|---|--|
| 1 | <p>Identifier les échantillons et, si nécessaire, les décongeler à température ambiante, mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré.</p> <p>Décongeler les tubes de CPE nécessaires à température ambiante pendant 30 minutes. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré. Chaque tube permet d'effectuer 12 extractions.</p> | <p>Si nécessaire, décongeler les « Elution tube » (tubes d'élué) contenant les acides nucléiques extraits à température ambiante. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré.</p> |
| 2 | Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil). | Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil). |
| 3 | Retirer les « Racks » (rack) de la « Cooler Unit » et les placer sur la table de préparation. | Retirer les « Racks » (rack) des « Lane 1, 2 and 3 » (lane 1, 2 et 3) (L1, L2, L3) de la « Cooler Unit » et les placer sur la table de préparation. |
| 4 | Sélectionner le « Run mode » (run mode) : « Extract + PCR » (Extraction + PCR). | Sélectionner le « Run mode » (run mode) : « PCR Only » (PCR seulement). |
| 5 | Charger les échantillons dans le « Sample Rack » (Compartiment des échantillons). Lorsque des tubes secondaires « 2 mL Tubes » sont chargés, utiliser les adaptateurs bleus pour le « Sample Rack » (Compartiment des échantillons). | Charger les échantillons dans le « Elution Rack » (rack d'élué). |
| 6 | Insérer le « Sample Rack » (Compartiment des échantillons) dans la « Cooler Unit », en commençant par la « Lane 5 » (Lane 5) (L5). Si nécessaire, insérer le « Sample ID » (ID échantillon) (SID) pour chaque « Position » utilisée. (Si des tubes secondaires sont chargés, les marquer « 2 mL Tube » (Tube de 2 mL). Si les tubes secondaires ne comportent pas de codes-barres, saisir manuellement le « Sample ID » [ID échantillon]). | Insérer le « Elution Rack » (Rack d'élué) dans la « Cooler Unit », en commençant par la « Lane 3 » (Lane 3) (L3). Si nécessaire, pour chaque « Position », saisir le « Sample ID » (ID échantillon), la « Sample Matrix » (Matrice d'échantillon), le « Extraction kit » (Kit d'extraction) et le « Extracted eluate vol. » (Volume d'élué extrait). |
| 7 | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. |
| 8 | Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initial) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élué de l'extraction) est de 100 µL. | Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initial) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élué de l'extraction) est de 100 µL. |
| 9 | Sélectionner le Assay Protocol (Protocole de test) dans la colonne « Assay » (Analyse) (se reporter à la section « Échantillons et contrôles »). | Sélectionner le Assay Protocol (Protocole de test) dans la colonne « Assay » (Analyse) (se reporter à la section « Échantillons et contrôles »). |
| 10 | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. |
| 11 | en cas de traitement de plus de 12 échantillons, répéter la procédure à partir du point 6. | en cas de traitement de plus de 12 échantillons, répéter la procédure à partir du point 6. |
| 12 | Charger les « Elution tubes » (Tubes d'élué) dans le « Elution Rack » (rack d'élué) (les tubes d'élué peuvent être étiquetés avec un code-barres pour améliorer la traçabilité). | non applicable |
| 13 | Insérer le « Elution Rack » (rack d'élué) dans la « Cooler Unit », en commençant par la « Lane 3 » (Lane 3) (L3). En cas de traitement de plus de 12 échantillons, répéter la procédure en utilisant la « Lane 2 » (Lane 2) (L2). | non applicable |
| 15 | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. | non applicable |
| 16 | Charger le CPE et le PCR Mix dans le « Reagent/Elution Rack » (rack de réactifs/d'élué). | Charger le PCR Mix dans le « Reagent/Elution Rack » (rack de réactifs/d'élué). |
| 17 | Insérer le « Reagent/Elution Rack » (rack de réactifs/d'élué) dans la « Lane 2 » (Lane 2) (L2) si disponible, ou dans la « Lane 1 » (Lane 1) (L1) de la « Cooler Unit ». Si nécessaire, pour chaque PCR Mix et/ou CPE, saisir le | Insérer le « Reagent/Elution Rack » (rack de réactifs/d'élué) dans la « Lane 2 » (Lane 2) (L2) si disponible, ou dans la « Lane 1 » (Lane 1) (L1) de la « Cooler Unit ». Si nécessaire, pour chaque PCR Mix, saisir le « S/N » |

| | A. Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR]) | B. Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement]) |
|----|--|--|
| | « S/N » (numéro de série), le « Lot No. » (numéro de lot), la « Exp. Date » (date de péremption) et le « T/R » (nombre de réactions). | (numéro de série), le « Lot No. » (numéro de lot), la « Exp. Date » (date de péremption) et le « T/R » (nombre de réactions). |
| 18 | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. |
| 19 | Vérifier les cônes dans les « Tip Racks » (Compartiment à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer les « Tip Racks » si nécessaire. | Vérifier les cônes dans les « Tip Racks » (Compartiment à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer les « Tip Racks » si nécessaire. |
| 20 | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. |
| 21 | Charger le « PCR Rack » (PCR rack) avec la « PCR Cassette » (Cassette de PCR) dans la « Inventory Area » (Zone de Stockage). | Charger le « PCR Rack » (PCR rack) avec la « PCR Cassette » (Cassette de PCR) dans la « Inventory Area » (Zone de Stockage). |
| 22 | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. |
| 23 | Charger le « Extraction Rack » (Portoir d'extraction) avec les cartouches d'extraction « ELITE InGenius SP 200 » et les consommables d'extraction requis. | non applicable |
| 24 | Fermer le tiroir de l'instrument. | Fermer le tiroir de l'instrument. |
| 25 | Appuyer sur « Start » (Début). | Appuyer sur « Start » (Début). |

| | C. Analyse d'étalonnage (PCR Only [PCR seulement]) | D. Analyse du Contrôle positif et du Contrôle négatif (PCR Only [PCR seulement]) |
|---|--|--|
| 1 | Décongeler les tubes de Q-PCR Standard nécessaires (Cal1 : Q-PCR Standard 10 ² , Cal2 : Q-PCR Standard 10 ³ , Cal3 : Q-PCR Standard 10 ⁴ , Cal4 : Q-PCR Standard 10 ⁵) pendant 30 minutes à température ambiante. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré. | Décongeler les tubes de Contrôle positif à température ambiante pendant 30 minutes. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré. Préparer le Contrôle négatif en transférant au minimum 50 µL d'eau de qualité biologie moléculaire dans un « Elution tube » (Tube d'élué) fourni avec le ELITE InGenius SP 200 Consumable Set. |
| 2 | Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil). | Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil). |
| 3 | Retirer les « Racks » (rack) des « Lane 1, 2 and 3 » (Lane 1, 2 et 3) (L1, L2, L3) de la « Cooler Unit » et les placer sur la table de préparation. | Retirer les « Racks » (rack) des « Lane 1, 2 and 3 » (Lane 1, 2 et 3) (L1, L2, L3) de la « Cooler Unit » et les placer sur la table de préparation. |
| 4 | Sélectionner le « Run mode: PCR Only » (Mode d'analyse : PCR seulement). | Sélectionner le « Run mode » (run mode) : « PCR Only » (PCR seulement). |
| 5 | Charger les tubes de Q-PCR Standard dans le « Elution Rack » (Rack d'élué). | Charger les tubes de Contrôle positif et de Contrôle négatif dans le « Elution Rack » (Rack d'élué). |
| 6 | Insérer le « Elution Rack » (Rack d'élué) dans la « Cooler Unit », en commençant par la « Lane 3 » (Lane 3) (L3). 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). | Insérer le « Elution Rack » (Rack d'élué) dans la « Cooler Unit », en commençant par la « Lane 3 » (Lane 3) (L3). 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). |
| 7 | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. |
| 8 | Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initial) est de 600 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élué de l'extraction) est de 50 µL. | Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initial) est de 600 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élué de l'extraction) est de 50 µL. |
| 9 | Sélectionner le Assay Protocol (Protocole de test) dans la colonne « Assay » (Analyse) (se reporter à la section « Échantillons et contrôles »). | Sélectionner le Assay Protocol (Protocole de test) dans la colonne « Assay » (Analyse) (se reporter à la section « Échantillons et contrôles »). |

| | C. Analyse d'étalonnage (PCR Only [PCR seulement]) | D. Analyse du Contrôle positif et du Contrôle négatif (PCR Only [PCR seulement]) |
|----|---|--|
| 10 | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. |
| 11 | Charger le PCR Mix dans le « Reagent/Elution Rack » (rack de réactifs/d'éluion). | Charger le PCR Mix dans le « Reagent/Elution Rack » (rack de réactifs/d'éluion). |
| 12 | Insérer le « Reagent/Elution Rack » (rack de réactifs/d'éluion) dans la « Lane 2 » (Lane 2) (L2) de la « Cooler Unit ». Si nécessaire, pour chaque PCR Mix, saisissez 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). | Insérer le « Reagent/Elution Rack » (rack de réactifs/d'éluion) dans la « Lane 2 » (Lane 2) (L2) de la « Cooler Unit ». Si nécessaire, pour chaque PCR Mix, saisissez 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). |
| 13 | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. |
| 14 | Vérifier les cônes dans les « Tip Racks » (Compartiment à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer les « Tip Racks » si nécessaire. | Vérifier les cônes dans les « Tip Racks » (Compartiment à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer les « Tip Racks » si nécessaire. |
| 15 | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. |
| 16 | Charger le « PCR Rack » (PCR rack) avec la « PCR Cassette » (Cassette de PCR) dans la « Inventory Area » (Zone de Stockage). | Charger le « PCR Rack » (PCR rack) avec la « PCR Cassette » (Cassette de PCR) dans la « Inventory Area » (Zone de Stockage). |
| 17 | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. | Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre. |
| 18 | Fermer le tiroir de l'instrument. | Fermer le tiroir de l'instrument. |
| 19 | Appuyer sur « Start » (Début). | Appuyer sur « Start » (Début). |

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

Remarque : à la fin de l'analyse, l'échantillon extrait restant dans le **tube d'éluion** doit être retiré de l'instrument, bouché, identifié et conservé à -20 ± 10 °C pendant un mois maximum. Éviter de renverser l'échantillon extrait.

Remarque : à la fin de l'analyse, le **PCR Mix** peut être retiré de l'instrument, bouché et stocké à -20 °C ou à une température plus basse ou peut être conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant un maximum de 7 heures (2 sessions d'analyse de 3 heures chacune et durée nécessaire au paramétrage d'une troisième session d'analyse). Mélanger délicatement et centrifuger le contenu pendant 5 secondes avant de commencer la session d'analyse suivante.

Remarque : à la fin de l'analyse, les étalons **Q - PCR Standard** restants peuvent être retirés de l'instrument, bouchés et conservés à -20 °C ou à une température plus basse. Éviter de renverser les étalons Q - PCR Standard.

Remarque : les étalons **HHV7 Q-PCR Standard** peuvent être utilisés pendant 4 sessions d'analyse distinctes de 2 heures chacune.

Remarque : à la fin de l'analyse, le **Contrôle positif** restant peut être retiré de l'instrument, bouché et conservé à -20 °C ou à une température plus basse. Éviter de renverser le **Contrôle positif**. Le **Contrôle négatif** restant doit être jeté.

Remarque : le **HHV7 Positive Control** peut être utilisé pendant 4 sessions d'analyse distinctes de 3 heures chacune.

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 de renverser les produits de la réaction.

ÉTAPE 3 - Examen et approbation des résultats

Le **ELITE BeGenius** surveille les signaux de fluorescence cibles et de 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. 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]). Se reporter au manuel de l'instrument pour plus de détails.

Remarque : le **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. Se reporter au manuel de l'instrument pour plus de détails.

Le **ELITE BeGenius** génère les résultats à l'aide du **HHV7 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,
- C. Validation des résultats de l'échantillon,
- D. Rapport des résultats de l'échantillon.

Remarque : se reporter au paragraphe correspondant relatif à la **procédure avec le ELITE InGenius** pour connaître les détails.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC LES ELITE InGenius et ELITE BeGenius

Sensibilité analytique : limite de blanc avec du sang total

En raison de la forte prévalence du HHV7 dans la population (environ 80 %) rapportée dans la littérature (Michael Kidd et al.), un certain pourcentage de résultats faiblement positifs, cliniquement non significatifs, est attendu lors de l'analyse d'échantillons de sang total. Afin d'obtenir la négativité du test avec ces échantillons, il a été nécessaire d'évaluer une valeur seuil Ct pour le HHV7 égale à 35 **sur les ELITE InGenius et ELITE BeGenius**.

Les résultats sur le **ELITE InGenius** sont présentés dans le tableau ci-dessous :

| Limite de blanc pour du sang total prélevé sur EDTA avec le ELITE InGenius | | | |
|---|----------|-----------------|-----------------|
| Échantillons | N | positifs | négatifs |
| Sang total prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du HHV7 | 35 | 0 | 35 |

Les résultats sur le **ELITE BeGenius** sont présentés dans le tableau ci-dessous :

| Limite de blanc pour du sang total prélevé sur EDTA avec le ELITE BeGenius | | | |
|---|----------|-----------------|-----------------|
| Échantillons | N | positifs | négatifs |
| Sang total prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du HHV7 | 20 | 0 | 20 |

Dans le test de la limite de blanc, le **HHV7 ELITE MGB Kit** a correctement détecté tous les échantillons testés comme prévu, selon la valeur seuil Ct définie pour la cible.

Sensibilité analytique : limite de détection (LoD)

La 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 évaluée sur le **ELITE InGenius** en utilisant de l'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/10 µL en présence d'ADN plasmidique contenant le contrôle interne à un titre de 20 000 copies/10 µL.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

| Échantillons | N | positifs | négatifs |
|---|----|----------|----------|
| 10 copies d'ADN plasmidique de HHV7 + 20 000 copies de contrôle interne | 18 | 18 | 0 |

La valeur théorique de la LoD a été vérifiée en testant, sur les ELITE InGenius et ELITE BeGenius, un pool de plasma prélevé sur EDTA et de sang total prélevé sur EDTA dopé avec un matériel de référence du HHV7 (ZeptoMetrix, réf. PINATHHV7-ST) à la concentration revendiquée.

Les résultats obtenus ont confirmé la concentration revendiquée pour la cible du HHV7 ELITE MGB Kit sur les ELITE InGenius et ELITE BeGenius.

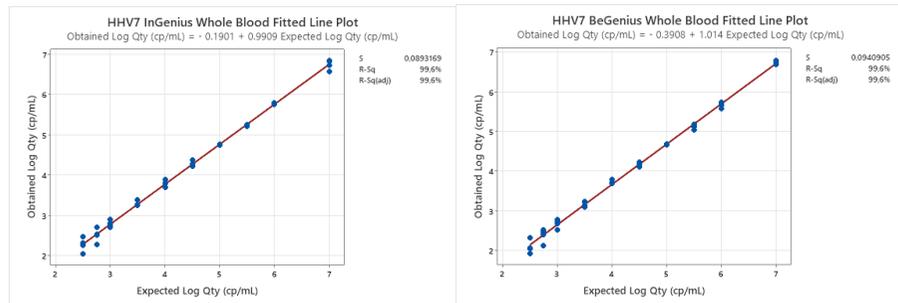
Plage de mesure linéaire

La plage de mesure linéaire du HHV7 ELITE MGB Kit a été déterminée avec des échantillons de sang total et de plasma sur les ELITE InGenius et ELITE BeGenius.

Pour le sang total :

La plage de mesure linéaire a été déterminée en utilisant un panel de dilutions d'un plasmide contenant la séquence cible du HHV7 dans des échantillons de sang total prélevé sur EDTA négatifs.

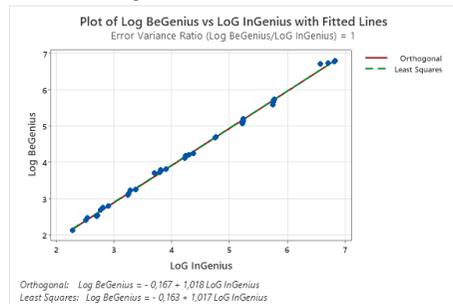
Les résultats sont présentés sur la figure suivante.



La plage de mesure linéaire en copies/mL pour le plasma prélevé sur EDTA est calculée en appliquant le facteur de conversion spécifique indiqué à la section suivante.

Les résultats obtenus avec les 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.

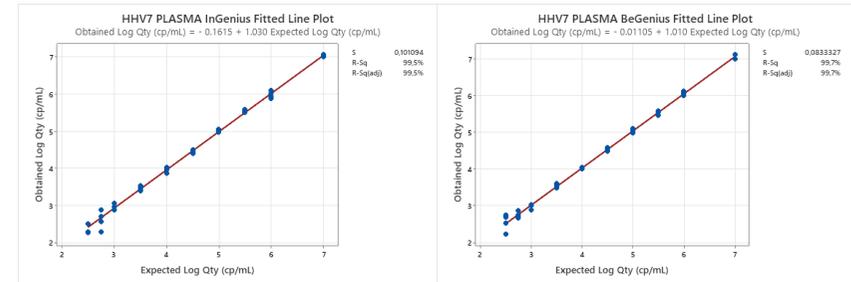


L'analyse de régression orthogonale génèrait une ordonnée à l'origine de -0,167 (IC à 95 % : -0,2256, -0,1075) et une pente de 1,018 (CI à 95 % : 1,0048, 1,0307). L'analyse de régression linéaire génèrait un R2 de 0,999.

Pour le plasma prélevé sur EDTA :

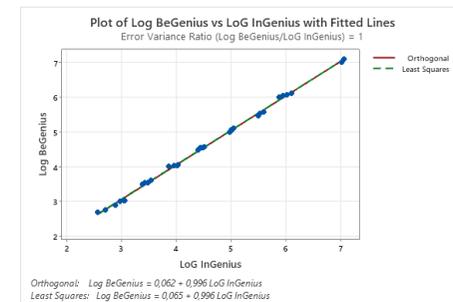
La plage de mesure linéaire a été déterminée en utilisant un panel de dilutions d'un plasmide contenant la séquence cible du HHV7 dans des échantillons de plasma prélevé sur EDTA négatifs.

Les résultats sont présentés sur la figure suivante.



Les résultats obtenus avec les 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.



L'analyse de régression orthogonale génèrait une ordonnée à l'origine de 0,062 (IC à 95 % : 0,0053 ; 0,1194) et une pente de 0,996 (IC à 95 % : 0,9845 ; 1,0082). L'analyse de régression linéaire génèrait un R2 de 0,999.

La plage de mesure linéaire pour les échantillons de sang total et de plasma prélevés sur EDTA couvre une plage de concentrations indiquée dans le tableau suivant :

| Plage de mesure linéaire pour le HHV7 ELITE MGB Kit avec les ELITE InGenius et ELITE BeGenius | | |
|---|-------------------|----------------------|
| Matrice | Limite inférieure | Limite supérieure |
| Sang total | 500 copies/mL | 10 000 000 copies/mL |
| Plasma | 500 copies/mL | 10 000 000 copies/mL |

Répétabilité

La répétabilité du test a été évaluée sur les ELITE BeGenius et ELITE InGenius par l'analyse d'un panel d'échantillons de sang total prélevé sur EDTA qui étaient négatifs ou avaient été dopés avec le HHV7 (ZeptoMetrix, réf. PINATHHV7-ST).

Un exemple des résultats de la répétabilité intra-session (sur un seul jour) sur le ELITE InGenius est présenté dans le tableau ci-dessous.

| Répétabilité intra-session avec le ELITE InGenius | | | | | |
|---|-----------|----------|------|------|-----------------|
| Description | HHV7 | | | | Concordance (%) |
| | Pos./Nég. | Ct moyen | EC | % CV | |
| Négatif | 0/8 | N.A. | N.A. | N.A. | 100 % |
| 3 x la LoD | 8/8 | 32,97 | 0,38 | 1,14 | 100 % |
| 10 x la LoD | 8/8 | 31,18 | 0,29 | 0,92 | 100 % |

Un exemple des résultats de la répétabilité intra-session (sur un seul jour) sur le ELITE BeGenius est présenté dans le tableau ci-dessous.

| Répétabilité intra-session avec le ELITE BeGenius | | | | | |
|---|-----------|----------|------|------|-----------------|
| Description | HHV7 | | | | Concordance (%) |
| | Pos./Nég. | Ct moyen | EC | % CV | |
| Négatif | 0/8 | N.A. | N.A. | N.A. | 100 % |
| 3 x la LoD | 8/8 | 34,52 | 0,30 | 0,88 | 100 % |
| 10 x la LoD | 8/8 | 32,36 | 0,22 | 0,69 | 100 % |

Les résultats de la répétabilité inter-sessions (sur deux jours) sur le ELITE InGenius sont présentés dans le tableau ci-dessous.

| Répétabilité inter-sessions avec le ELITE InGenius | | | | | |
|--|-----------|----------|------|------|-----------------|
| Description | HHV7 | | | | Concordance (%) |
| | Pos./Nég. | Ct moyen | EC | % CV | |
| Négatif | 0/16 | N.A. | N.A. | N.A. | 100 % |
| 3 x la LoD | 16/16 | 33,07 | 0,36 | 1,09 | 100 % |
| 10 x la LoD | 16/16 | 31,17 | 0,24 | 0,77 | 100 % |

Les résultats de la répétabilité inter-sessions (sur deux jours) sur le ELITE BeGenius sont présentés dans le tableau ci-dessous.

| Répétabilité inter-sessions avec le ELITE BeGenius | | | | | |
|--|-----------|----------|------|------|-----------------|
| Description | HHV7 | | | | Concordance (%) |
| | Pos./Nég. | Ct moyen | EC | % CV | |
| Négatif | 0/16 | N.A. | N.A. | N.A. | 100 % |
| 3 x la LoD | 16/16 | 34,41 | 0,49 | 1,42 | 100 % |
| 10 x la LoD | 16/16 | 32,34 | 0,30 | 0,92 | 100 % |

Dans le test de répétabilité, le HHV7 ELITE MGB Kit a détecté tous les échantillons comme attendu et a montré une variabilité maximale des valeurs Ct des cibles (en tant que % CV) de 1,42 %.

Reproductibilité

La reproductibilité du test a été évaluée sur les ELITE BeGenius et ELITE InGenius par une analyse d'échantillons de sang total prélevé sur EDTA qui étaient négatifs pour l'ADN du HHV7 ou avaient été dopés avec le HHV7 (ZeptoMetrix, réf. PINATHHV7-ST).

Les résultats de la reproductibilité inter-lots (deux lots) sur le ELITE InGenius sont présentés dans le tableau ci-dessous.

| Reproductibilité inter-lots avec le ELITE InGenius | | | | | |
|--|-----------|----------|------|------|-----------------|
| Description | HHV7 | | | | Concordance (%) |
| | Pos./rép. | Ct moyen | EC | % CV | |
| Négatif | 0/8 | - | - | - | 100 % |
| 3 x la LoD | 8/8 | 33,39 | 0,20 | 0,59 | 100 % |
| 10 x la LoD | 8/8 | 31,39 | 0,18 | 0,57 | 100 % |

Les résultats de la reproductibilité inter-lots (deux lots) sur le ELITE BeGenius sont présentés dans le tableau ci-dessous.

| Reproductibilité inter-lots avec le ELITE BeGenius | | | | | |
|--|-----------|----------|------|------|-----------------|
| Description | HHV7 | | | | Concordance (%) |
| | Pos./rép. | Ct moyen | EC | % CV | |
| Négatif | 0/8 | - | - | - | 100 % |
| 3 x la LoD | 8/8 | 34,58 | 0,14 | 0,42 | 100 % |
| 10 x la LoD | 8/8 | 32,66 | 0,24 | 0,75 | 100 % |

Les résultats de la reproductibilité inter-instruments (sur deux jours, avec deux lots et deux instruments) sur le ELITE InGenius sont présentés dans le tableau ci-dessous.

| Reproductibilité inter-instruments avec le ELITE InGenius | | | | | |
|---|-----------|----------|------|------|-----------------|
| Description | HHV7 | | | | Concordance (%) |
| | Pos./rép. | Ct moyen | EC | % CV | |
| Négatif | 0/8 | - | - | - | 100 % |
| 3 x la LoD | 8/8 | 34,50 | 0,31 | 0,90 | 100 % |
| 10 x la LoD | 8/8 | 32,61 | 0,23 | 0,69 | 100 % |

Les résultats de la reproductibilité inter-instruments (sur deux jours, avec deux lots et deux instruments) sur le ELITE BeGenius sont présentés dans le tableau ci-dessous.

| Reproductibilité inter-instruments avec le ELITE BeGenius | | | | | |
|---|-----------|----------|------|------|-----------------|
| Description | HHV7 | | | | Concordance (%) |
| | Pos./rép. | Ct moyen | EC | % CV | |
| Négatif | 0/8 | - | - | - | 100 % |
| 3 x la LoD | 8/8 | 33,25 | 0,26 | 0,79 | 100 % |
| 10 x la LoD | 8/8 | 31,26 | 0,21 | 0,66 | 100 % |

Dans le test de reproductibilité, le HHV7 ELITE MGB Kit a détecté tous les échantillons comme attendu et a montré une variabilité maximale des valeurs Ct des cibles (en tant que % CV) de 0,90 %.

Spécificité diagnostique : confirmation des échantillons négatifs

La spécificité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons négatifs, a été évaluée en association avec le ELITE InGenius en analysant des échantillons cliniques de sang total et de plasma prélevés sur EDTA.

Étant donné que les performances analytiques du ELITE BeGenius sont équivalentes à celles du 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 ELITE InGenius s'applique également au ELITE BeGenius.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

| Échantillons | N | positifs | négatifs | Spécificité diagnostique (%) |
|---|----|----------|----------|------------------------------|
| Échantillons de sang total prélevé sur EDTA | 38 | 0 | 38 | 100 % |
| Échantillons de plasma prélevé sur EDTA | 33 | 0 | 33 | 100 % |

Tous les échantillons de sang total et de plasma étaient valides pour l'analyse. La valeur seuil pour la cible HHV7 a été appliquée uniquement pour les échantillons de sang total.

La spécificité diagnostique du HHV7 ELITE MGB Kit en association avec des échantillons de sang total et de plasma prélevés sur EDTA était de 100 %.

La valeur seuil Ct de l'IC est définie à 35 pour les échantillons de sang total et de plasma prélevés sur EDTA sur les InGenius et BeGenius.

Sensibilité diagnostique : confirmation des échantillons positifs

La sensibilité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons cliniques positifs, a été évaluée en association avec le **ELITE InGenius** en analysant des échantillons cliniques de sang total et de plasma prélevés sur EDTA.

Étant donné que les performances analytiques du **ELITE BeGenius** sont équivalentes à celles du **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 **ELITE InGenius** s'applique également au **ELITE BeGenius**.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant des échantillons de sang total et de plasma prélevés sur EDTA qui étaient négatifs pour le HHV7 et avaient été dopés avec le « Human Herpes Virus Type 7 Stock –(NATHHV7-ST) » (ZeptoMetrix Corporation) à 1000 copies/mL.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

| Échantillons | N | positifs | négatifs | Sensibilité diagnostique (%) |
|--|----|----------|----------|------------------------------|
| Sang total prélevé sur EDTA dopé avec de l'ADN du HHV7 | 34 | 34 | 0 | 100 % |
| Plasma prélevé sur EDTA dopé avec de l'ADN du HHV7 | 33 | 33 | 0 | 100 % |

Tous les échantillons ont été correctement détectés comme positifs.

La sensibilité diagnostique du HHV7 ELITE MGB Kit en association avec des échantillons de sang total et de plasma prélevés sur EDTA 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 l'instrument sont présentés dans la Fiche technique du produit « HHV7 ELITE MGB Kit », FTP037PLD.

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES POUR D'AUTRES SYSTÈMES

Échantillons

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

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 et conservés à température ambiante (+16/+26 °C) pendant 24 heures au maximum, 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.

N.B. : pour procéder à l'extraction de l'ADN du sang total avec l'instrument **NucliSENS® easyMAG®**, utiliser le protocole d'extraction **Generic 2.0.1** et suivre ces instructions : transférer **100 µL** d'échantillon dans la barrette à 8 puits, charger la barrette sur l'instrument et effectuer l'extraction sans incubation de lyse. Sans retirer la barrette, après l'ajout du **NucliSENS® easyMAG® Lysis Buffer** par l'instrument, mélanger le contenu de la barrette à trois reprises à l'aide de la pipette multicanaux fournie en utilisant le programme numéro 3. Incuber pendant 10 minutes, puis ajouter **5 µL** de **CPE** pour le contrôle interne et 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 les acides nucléiques dans **50 µL** de tampon d'élution.

N.B. : pour procéder à l'extraction de l'ADN du sang total avec l'instrument **QIASymphony® SP/AS** et le kit **QIASymphony® DNA Mini Kit** avec la **version logicielle 3.5**, utiliser le protocole d'extraction **Virus Blood_200_V4_default IC** et suivre ces instructions : l'instrument est capable d'utiliser un tube primaire, le volume d'échantillon requis pour l'extraction est **200 µL** et un volume mort minimum de **100 µL** est toujours nécessaire. Pour chaque échantillon à analyser, ajouter **5 µL** de **CPE** au tampon ATE. Sur l'instrument, dans le compartiment « internal control » (contrôle interne), charger les tubes contenant la solution comme indiqué dans le manuel d'utilisation du kit ; indiquer la position où les éluats seront distribués et spécifier le volume d'élution de **60 µL**. Pour obtenir plus de détails sur la procédure d'extraction, suivre les indications du manuel d'utilisation du kit.

Liquide céphalorachidien

Les échantillons de liquide céphalorachidien 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.

N.B. : pour procéder à l'extraction de l'ADN des échantillons de 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 et effectuer l'extraction. Après l'incubation de 10 minutes, ajouter **5 µL** de **CPE** pour le contrôle interne avant d'ajouter la **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** et poursuivre l'extraction. Éluer les acides nucléiques dans **100 µL** de tampon d'élution.

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, utiliser de l'eau de qualité biologie moléculaire (non incluse dans ce kit) pour l'ajouter à la réaction à la place de l'ADN extrait de l'échantillon.

Pour le contrôle positif, utiliser le produit **HHV7 - ELITE Positive Control** ou le produit **HHV7 ELITE Standard**.

Contrôles de qualité

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

PROCÉDURES POUR D'AUTRES SYSTÈMES

Paramétrage de la session d'amplification en temps réel

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

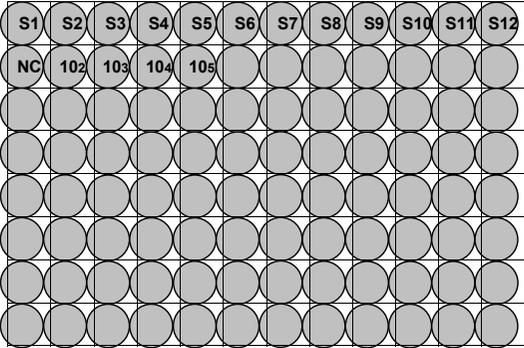
Avec un instrument **7300 Real-Time PCR System** :

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 HHV7 avec le « reporter » (rapporteur) = « FAM » et le « quencher » (désactivateur) = « none » (aucun) (non fluorescent) et le nommer « HHV7 » ;
- 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 utilisés 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.

N.B. : afin de déterminer le titre de l'ADN dans l'échantillon de départ, paramétrer un ensemble de réactions avec les étalons **Q - PCR Standards** (105 copies, 104 copies, 103 copies, 102 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 ; 102 : étalon à 102 copies ; 103 : étalon à 103 copies ; 104 : étalon à 104 copies ; 105 : étalon à 105 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** ;

N.B. : 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 (acquisition de 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 HHV7 avec le « reporter » (rapporteur) = « FAM » et le « quencher » (désactivateur) = « none » (aucun) (non fluorescent) et le nommer « HHV7 » ;
- paramétrer (à l'aide du Detector Manager [Gestionnaire de détecteur]) : le « detector » (détecteur) pour la sonde de 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 ses puits.

N.B. : afin de déterminer le titre de l'ADN dans l'échantillon de départ, paramétrer un ensemble de réactions avec les étalons **Q - PCR Standards** (10⁵ copies, 10⁴ copies, 10³ copies, 10² copies) pour obtenir la **courbe d'étalonnage**.

La configuration de l'analyse quantitative de 12 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** ;

N.B. : 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 (acquisition de fluorescence) | 30 s |
| | 72 °C | 20 s |
| Dissociation (facultatif) | 95 °C | 15 s |
| | 40 °C | 1 min. |
| | 80 °C | 15 s |
| | 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 **HHV7 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 **HHV7 - Positive Control** ou de **HHV7 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.
- se munir de la **feuille de scellage d'amplification** qui sera utilisée pendant la session d'analyse, en veillant à la manipuler avec des gants non poudrés et à ne pas l'endommager,

1. Pipeter avec précision **20 µL** de **HHV7 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.

N.B. : 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 **10 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 10 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** est requis (détection de l'ADN du HHV7), pipeter avec précision, en le déposant dans le mélange réactionnel, **10 µL** de **HHV7 - 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 volume de 10 µl à trois reprises dans le mélange réactionnel. Éviter d'introduire des bulles.

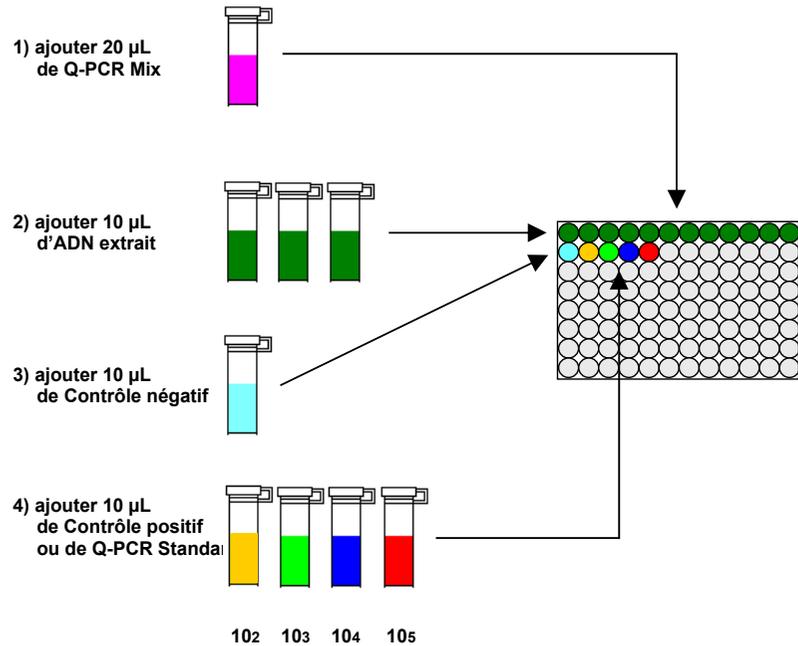
- Lorsqu'un résultat **quantitatif** est requis (quantification de l'ADN du HHV7), pipeter avec précision, en le déposant dans le mélange réactionnel, **10 µL** de **HHV7 Q - PCR Standard 10²** dans le puits correspondant de la **microplaque d'amplification**, comme précédemment établi dans la **Work Sheet** (Fiche de travail). Bien mélanger l'étalon en pipetant le volume de 10 µl à trois reprises dans le mélange réactionnel. Éviter d'introduire des bulles. Procéder de la même manière avec les étalons **HHV7 Q - PCR Standards 10³, 10⁴, 10⁵**.

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-HHV7-ELITECHGROUP »).

N. B. : 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.



N.B. : 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.

Analyse qualitative des résultats

Les valeurs enregistrées de la fluorescence émise par la sonde spécifique pour le HHV7 (détecteur FAM « HHV7 ») et par la sonde de 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 ;

N.B. : avec un échantillon positif présentant un titre élevé d'ADN du HHV7, la fluorescence FAM de la sonde spécifique pour le HHV7 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 « HHV7 » 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 « HHV7 » 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 HHV7 (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 « HHV7 » | 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 HHV7, 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.

* **N.B.** : lorsque ce produit est utilisé pour la quantification de l'ADN du HHV7, 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 10s (Ct ≤ 25)**.

Dans la réaction d'amplification du **Contrôle négatif**, la valeur **Ct** du HHV7 (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 « HHV7 » | 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 HHV7, 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 HHV7 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.

N.B. : 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).

Ce produit est capable de détecter une quantité minimale d'environ 10 copies d'ADN de la région d'un gène de protéine de capsid (U57) du HHV7 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 HHV7 |
|------------------------|---------------------------|-----------------------------|------------------|-------------|
| détecteur FAM « HHV7 » | 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 HHV7 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'ADN du contrôle interne, nombre insuffisant de cellules dans l'échantillon, 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, le test n'est pas valide et doit être répété 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 HHV7 et **Ct ≤ 35** pour le contrôle interne, cela signifie que l'ADN du HHV7 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 HHV7 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 test doivent être interprétés en tenant compte de l'ensemble des données cliniques et des autres résultats d'analyse de laboratoire du patient.

N.B. : lorsque l'ADN du HHV7 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 HHV7 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.

Les valeurs **Ct** du HHV7 dans les réactions d'amplification des quatre **Q - PCR standards** 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 « HHV7 » | 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 HHV7 dans la réaction d'amplification de chaque **échantillon** et la **courbe d'étalonnage** de la session d'amplification sont utilisées pour calculer la **quantité** de l'ADN cible présente dans les réactions d'amplification des échantillons.

Le produit est capable de quantifier environ 1 000 000 à 10 copies d'ADN de la région d'un gène de protéine de capsid (U57) du HHV7 dans la réaction d'amplification, correspondant aux équivalents génomiques par réaction (plage de mesure linéaire, se reporter au paragraphe « Caractéristiques de performance »), comme indiqué dans le tableau suivant :

| Résultat de l'échantillon détecteur FAM « HHV7 » | Équivalents génomiques du HHV7 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 HHV7 présents dans l'échantillon utilisé dans l'extraction (**Nc**) selon la formule suivante :

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

Dans laquelle :

Vc est la quantité de l'échantillon utilisé 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 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 système d'extraction **NucliSENS® easyMAG®** avec des échantillons de sang total prélevé sur EDTA et si le résultat doit être exprimé en **gEq/mL**, la formule est la suivante :

$$Nc \text{ (gEq/mL)} = 100 \times \text{Quantité}$$

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

$$Nc \text{ (gEq/mL)} = 20 \times \text{Quantité}$$

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

$$Nc \text{ (gEq/mL)} = 45 \times \text{Quantité}$$

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 (en gEq/mL) peuvent être calculées à partir de la plage de mesure linéaire de la réaction d'amplification selon la formule suivante :

$$\text{Limite inférieure (gEq/mL)} = \frac{V_e \times 10 \text{ gEq}}{V_c \times V_a \times E_p}$$

$$\text{Limite supérieure (gEq/mL)} = \frac{V_e \times 1\,000\,000 \text{ gEq}}{V_c \times V_a \times E_p}$$

En cas d'utilisation du système d'extraction NucliSENS® easyMAG® 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 système NucliSENS® easyMAG® |
|---|
| Limite inférieure (gEq/mL) = 100 x 10 gEq |
| Limite supérieure (gEq/mL) = 100 x 1 000 000 gEq |
| de 1000 à 100 000 000 gEq/mL |

En cas d'utilisation du système d'extraction NucliSENS® easyMAG® avec des échantillons de liquide céphalorachidien, la formule est la suivante :

| Limites de la plage de mesure linéaire (gEq/mL) avec le système NucliSENS® easyMAG® |
|---|
| Limite inférieure (gEq/mL) = 20 x 10 gEq |
| Limite supérieure (gEq/mL) = 20 x 1 000 000 gEq |
| de 200 à 20 000 000 gEq/mL |

En cas d'utilisation du système d'extraction QIASymphony® SP/AS 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 système QIASymphony® SP/AS |
|--|
| Limite inférieure (gEq/mL) = 45 x 10 gEq |
| Limite supérieure (gEq/mL) = 45 x 1 000 000 gEq |
| de 450 à 45 000 000 gEq/mL |

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC D'AUTRES SYSTÈMES

Sensibilité analytique : limite de détection

La sensibilité analytique de ce test permet de détecter la présence d'environ 10 molécules d'ADN cible dans 10 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 un titre de 10 copies/10 µL avec l'IC-ADN, dilué à un titre de 20 000 copies/10 µL, dans de l'ADN génomique humain à un titre de 500 ng/10 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 + 20 000 copies de IC-ADN + 500 ng d'ADN génomique humain | 50 | 50 | 0 |

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 10 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La sensibilité analytique de ce test a été déterminée en utilisant un panel de dilutions (étapes de dilution de 1 log₁₀) 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 10⁷ molécules par réaction à 10¹ 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 démontré que le test présentait une réponse linéaire pour toutes les dilutions (coefficient de corrélation R-carré supérieur à 0,99).

La limite supérieure de la plage de mesure linéaire a été définie à 10⁶ molécules par réaction, correspondant aux équivalents génomiques par réaction, à plus ou moins 1 logarithme de la concentration la plus élevée de l'étalon d'amplification Q - PCR Standard (10⁵ molécules/10 µl).

La limite inférieure de la plage de mesure linéaire a été définie à 10 molécules par réaction, correspondant aux équivalents génomiques par réaction, à plus ou moins 1 logarithme de la concentration la plus faible de l'étalon d'amplification Q - PCR Standard (10² molécules/10 µl).

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant.

| Plage de mesure linéaire (gEq/réaction) | |
|---|----------------------------|
| Limite supérieure | 1 000 000 ADN gEq/réaction |
| Limite inférieure | 10 ADN 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 26.

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'analyse, a permis d'obtenir un pourcentage de coefficient de variation moyen (% CV) d'environ 25,9 % des quantités mesurées, dans la plage de 10⁶ molécules à 10¹ molécules dans les 10 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 testés au cours de la même session d'analyse et la concentration théorique de l'échantillon, a permis d'obtenir un pourcentage d'imprécision moyen (% Imprécision) d'environ 9,0 % des quantités mesurées, dans la plage de 10⁶ molécules à 10 molécules dans les 10 µl d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

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

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

La sensibilité analytique 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 **U57** du HHV7 a montré leur conservation et une absence de mutations significatives.

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 positifs pour l'ADN du HHV7.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant, à titre de matériel de référence, 23 échantillons de sang total prélevé sur EDTA négatifs (testés avec un produit d'amplification nichée de DIV portant le marquage CE) qui avaient été dopés à un titre équivalent à trois fois la limite de détection pour l'ADN du HHV7 avec l'échantillon de référence certifié « HHV7 Culture Fluid », (Réf. 0810071CF, ZeptoMetrix, États-Unis). Chaque échantillon a été testé 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 sont résumés dans le tableau suivant.

| Échantillons | N | positifs | négatifs |
|--|----|----------|----------|
| Sang total prélevé sur EDTA dopé avec de l'ADN du HHV7 | 23 | 23 | 0 |

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

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant, à titre de matériel de référence, 25 échantillons de liquide céphalorachidien négatifs pour l'ADN du HHV7 (testés avec un produit d'amplification nichée de DIV portant le marquage CE) qui avaient été dopés à un titre équivalent à trois fois la limite de détection pour l'ADN du HHV7 avec l'échantillon de référence certifié « HHV7 Culture Fluid », (Réf. 0810071CF, ZeptoMetrix, États-Unis). Chaque échantillon a été testé en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir une extraction avec le système automatisé NucliSENS® easyMAG® et une 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 HHV7 | 25 | 25 | 0 |

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 HHV7, incluant les génomes complets du CMV, de l'EBV et du HHV6, les virus humains les plus similaires au HHV7, 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 d'autres marqueurs potentiellement interférents, a été vérifiée en testant quelques échantillons cliniques négatifs pour l'ADN du HHV7 mais positifs pour d'autres agents pathogènes.

La spécificité analytique a été vérifiée en utilisant, à titre de matériel de référence, 12 échantillons de sang total prélevé sur EDTA qui étaient négatifs pour l'ADN du HHV7 (testés avec un produit d'amplification nichée de DIV portant le marquage CE) mais positifs pour l'ADN d'autres agents pathogènes (CMV, EBV et HHV6). Chaque échantillon a été testé 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 sont résumés dans le tableau suivant.

| Échantillons | N | positifs | négatifs |
|---|---|----------|----------|
| Sang total prélevé sur EDTA positif pour le CMV | 4 | 0 | 4 |
| Sang total prélevé sur EDTA positif pour l'EBV | 6 | 0 | 6 |
| Sang total prélevé sur EDTA positif pour le HHV6 | 1 | 0 | 1 |
| Sang total prélevé sur EDTA positif pour le HHV6 et l'EBV | 1 | 0 | 1 |

Spécificité diagnostique : confirmation des échantillons négatifs

La spécificité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons négatifs, a été testée en analysant quelques échantillons cliniques négatifs pour l'ADN du HHV7.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant, à titre de matériel de référence, 23 échantillons de sang total prélevé sur EDTA qui étaient négatifs pour l'ADN du HHV7 (testés avec un produit d'amplification nichée de DIV portant le marquage CE). Chaque échantillon a été testé 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 sont résumés dans le tableau suivant.

| Échantillons | N | positifs | négatifs |
|--|----|----------|----------|
| Sang total prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du HHV7 | 23 | 0 | 23 |

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

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant, à titre de matériel de référence, 26 échantillons de liquide céphalorachidien qui étaient négatifs pour l'ADN du HHV7 (testés avec un produit d'amplification nichée de DIV portant le marquage CE). Chaque échantillon a été testé en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir une extraction avec le système automatisé NucliSENS® easyMAG® et une 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 HHV7 | 26 | 1 | 25 |

Un échantillon a généré un résultat positif discordant pour l'ADN du HHV7, ayant un titre inférieur à 1 copie/réaction. La discordance peut s'expliquer en considérant que des échantillons ayant des titres aussi faibles peuvent entraîner des résultats alternativement et aléatoirement positifs et négatifs.

Dans ce test, la spécificité diagnostique de l'analyse était de 96,1 %.

N.B. : 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 « HHV7 ELITE MGB® Kit », FTP RTS037PLD.

BIBLIOGRAPHIE

F. Drago et al. (1997) *Lancet* 349: 1367 - 1368 (annexe n° 1, 2 pages);
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30
Michael Kidd et al. (1996) *The Journal of Infectious Diseases* 174: 396-401
K. Linnet et al. (2004) *Clin. Chem.* 50: 732 - 740.

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Utiliser exclusivement ce produit avec les échantillons cliniques suivants : sang total, plasma prélevé sur EDTA et liquide céphalorachidien (LCR).

Il n'existe actuellement aucune donnée disponible concernant les performances du produit avec d'autres échantillons cliniques.

Le plasma prélevé sur EDTA doit être obtenu à partir de sang total conservé à température ambiante ou à +2/+8 °C pendant 24 heures maximum.

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 en ce qui concerne les performances du produit avec de l'ADN extrait des échantillons cliniques suivants : suspension de leucocytes et de granulocytes, liquide amniotique.

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 appropriés 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 le produit.

La méthode de PCR en temps réel utilisée dans ce produit présente une sensibilité analytique élevée qui la rend sensible à une contamination par les échantillons cliniques positifs, les contrôles positifs et les produits de PCR. Une contamination croisée peut générer des résultats faux positifs. Le format du produit est conçu pour limiter la contamination croisée. Toutefois, une contamination croisée ne peut être évitée qu'en respectant les bonnes pratiques de laboratoire et en suivant le présent mode d'emploi.

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

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

Ce produit exige de porter des équipements de protection individuelle et d'utiliser des instruments dédiés au paramétrage des sessions de travail afin d'éviter tout résultat faux positif.

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

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 indique que l'ADN cible 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 cible 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. Dans ce cas, l'échantillon doit être testé à nouveau, en commençant par l'extraction, ce qui peut entraîner des retards d'obtention des résultats finaux.

D'éventuels polymorphismes, insertions ou délétions dans la région de l'ADN ciblée par les amorces et les sondes du produit peuvent affecter la détection et la quantification de l'ADN cible.

Comme avec tout autre dispositif médical de diagnostic, les résultats obtenus avec ce produit doivent être interprétés en association avec l'ensemble des observations cliniques et des résultats de laboratoire pertinents.

PROBLÈMES ET SOLUTIONS

ELITE InGenius et ELITE BeGenius

| Réaction du Q-PCR Standard, courbe d'étalonnage ou réaction du Contrôle positif non valide | |
|---|--|
| Causes possibles | Solutions |
| Erreur de paramétrage de l'instrument. | Vérifier la position du PCR Mix, des étalons Q-PCR Standards et du Contrôle Positif Vérifier le volume du PCR Mix, des étalons Q-PCR Standards et du Contrôle Positif |
| Dégradation du PCR Mix. | Ne pas utiliser le PCR Mix pendant plus de 7 sessions d'analyse indépendantes (de 3 heures chacune dans le bloc réfrigéré de la « Inventory Area » [Zone inventaire]) ou dans l'unité de refroidissement). Ne pas utiliser le PCR Mix pendant plus de 3 sessions d'analyse consécutives (7 heures dans le bloc réfrigéré de la « Inventory Area » [Zone inventaire]) ou dans l'unité de refroidissement). Ne pas laisser le PCR Mix à température ambiante pendant plus de 30 minutes. Utiliser une nouvelle aliquote du PCR Mix. |
| Dégradation des étalons Q-PCR Standards ou du Contrôle positif | Ne pas utiliser le Q-PCR Standard pendant plus de 4 sessions d'analyse indépendantes (de 2 heures chacune dans la « Extraction Area » [Zone d'extraction] ou dans l'unité de refroidissement). Ne pas utiliser le Contrôle positif pendant plus de 4 sessions d'analyse indépendantes (de 3 heures chacune dans la « Extraction Area » [Zone d'extraction] ou dans l'unité de refroidissement). Utiliser de nouvelles aliquotes des étalons Q-PCR Standards ou du Contrôle positif. |
| Erreur de l'instrument. | Contactez le service technique d'ELITechGroup. |

| Réaction du Contrôle négatif non valide | |
|---|---|
| Causes possibles | Solutions |
| Erreur de paramétrage de l'instrument. | Vérifier la position du PCR Mix et du Contrôle négatif. Vérifier les volumes du PCR Mix et du Contrôle négatif. |
| Contamination du Contrôle négatif. | Ne pas utiliser le Contrôle négatif pour plus d'une (1) session d'analyse. Utiliser une nouvelle aliquote d'eau de qualité biologie moléculaire. |
| Contamination du PCR Mix. | Utiliser une nouvelle aliquote du PCR Mix. |
| Contamination de la zone d'extraction, des portoirs, du « Inventory Block » (Bloc inventaire) ou de l'unité de refroidissement. | Nettoyer les surfaces avec des détergents aqueux, laver les blouses de laboratoire, remplacer les tubes et les cônes utilisés. |
| Erreur de l'instrument. | Contactez le service technique d'ELITechGroup. |

| Réaction de l'échantillon non valide | |
|---|--|
| Causes possibles | Solutions |
| Erreur de paramétrage de l'instrument. | Vérifier la position du PCR Mix, du Contrôle Interne et de l'échantillon. Vérifier les volumes du PCR Mix, du Contrôle Interne et de l'échantillon. |
| Dégradation du PCR Mix. | Ne pas utiliser le PCR Mix pendant plus de 7 sessions d'analyse indépendantes (de 3 heures chacune dans le bloc réfrigéré de la « Inventory Area » [Zone inventaire]) ou dans l'unité de refroidissement). Ne pas utiliser le PCR Mix pendant plus de 3 sessions d'analyse consécutives (7 heures dans le bloc réfrigéré de la « Inventory Area » [Zone inventaire]) ou dans l'unité de refroidissement). Ne pas laisser le PCR Mix à température ambiante pendant plus de 30 minutes. Utiliser une nouvelle aliquote du PCR Mix. |
| Dégradation de la matrice du Contrôle interne. | Utiliser une nouvelle aliquote du Contrôle Interne |
| Inhibition due à des substances interférentes dans l'échantillon. | Répéter l'amplification avec une dilution à 1:2 de l'échantillon élué dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, lors d'une session d'analyse « PCR Only » (PCR uniquement). Répéter l'extraction avec une dilution à 1:2 de l'échantillon dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, lors d'une session d'analyse « Extract + PCR » (Extraction + PCR). |
| Erreur de l'instrument. | Contactez le service technique d'ELITechGroup. |

| Courbe de dissociation anormale | |
|---|---|
| Causes possibles | Solutions |
| Absence de pic défini. Pic défini mais Tm différente de celles des autres échantillons et de celle des étalons ou du Contrôle positif. | Vérifier que la valeur Ct de la cible est inférieure à 30. Une grande quantité de produit d'amplification à la fin de la réaction peut interférer avec l'analyse de la courbe de fusion. Répéter l'amplification de l'échantillon pour confirmer la présence d'une cible comportant une éventuelle mutation. La cible dans l'échantillon doit être séquencée pour confirmer la mutation. |

| Erreur de calcul de la valeur Ct | |
|--|---|
| Causes possibles | Solutions |
| Concentration trop élevée de la cible dans l'échantillon ou échantillon montrant une anomalie du signal de fluorescence. | Si une amplification significative est observée dans la courbe de PCR, sélectionner la position associée à l'échantillon et approuver manuellement le résultat comme positif. Si aucune amplification n'est observée dans la courbe de PCR, sélectionner la position associée à l'échantillon et approuver manuellement le résultat comme négatif ou le laisser non valide. Si une valeur Ct est requise : - répéter l'amplification de l'échantillon élué avec une dilution à 1:10 dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, lors d'une session d'analyse « PCR Only » (PCR uniquement). - répéter l'extraction de l'échantillon avec une dilution à 1:10 dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, lors d'une session d'analyse « Extract + PCR » (Extraction + PCR). |

| Taux anormalement élevé de résultats positifs dans la même session d'analyse (réactions avec des valeurs Ct tardives similaires) | |
|---|--|
| Causes possibles | Solutions |
| Contamination inter-échantillons pendant les étapes pré-analytiques. | Nettoyer la micropipette à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 3 % (eau de Javel) fraîchement préparée ou d'un agent de nettoyage de l'ADN/ARN après le pipetage de chaque échantillon. Ne pas utiliser de pipettes Pasteur. Les pipettes doivent être de type à déplacement positif ou être utilisées avec des cônes dotés d'un filtre pour les aérosols. Introduire les échantillons dans les dernières positions des instruments, comme indiqué par la GUI. Suivre la séquence de chargement indiquée par le logiciel. |
| Contamination environnementale du laboratoire. | Nettoyer toutes les surfaces en contact avec l'opérateur et les échantillons (y compris les pipettes) à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium (eau de Javel) à 3 % fraîchement préparée ou d'un agent de nettoyage de l'ADN/ARN. Effectuer un cycle de décontamination U.V. Utiliser un nouveau tube de PCR Mix et/ou de CPE. |

Plateforme ouverte :

| 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 réactions 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. |
| 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. |

| 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 ou des étalons dans les puits de la microplaque, et se conformer à la feuille de travail. |
| Erreur lors du paramétrage de l'instrument. | Vérifier les réglages de position des échantillons, des contrôles négatifs, des contrôles positifs ou 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 stérile. |
| Contamination du mélange réactionnel. | Utiliser une nouvelle aliquote du mélange réactionnel. |
| Contamination de la zone d'extraction/de préparation des réactions d'amplification. | Nettoyer les surfaces et les instruments avec des détergents aqueux, laver les blouses de laboratoire, remplacer les tubes à essai et les cônes utilisés. |

| Fluorescence de bruit de fond irrégulière ou élevée dans les réactions | |
|--|--|
| Causes possibles | Solutions |
| Distribution incorrecte de l'échantillon. | Veiller à bien mélanger les échantillons, les contrôles 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 desquels 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). |

| Courbe de dissociation anormale | |
|---|---|
| Causes possibles | Solutions |
| Absence de pic défini. Pic défini mais différent de celui des autres échantillons et des étalons ou du contrôle positif. | Vérifier que la valeur Ct du détecteur FAM est inférieure à 30. Une grande quantité de produit d'amplification à la fin de la réaction peut interférer avec l'analyse de la courbe de fusion. Répéter l'amplification de l'échantillon pour confirmer la présence d'un ADN cible comportant une éventuelle mutation. L'ADN cible de l'échantillon doit être séquencé pour confirmer la mutation. |

LÉGENDE DES SYMBOLES

-  Numéro de référence.
-  Limite supérieure de température.
-  Code de lot.
-  Date de péremption (dernier jour du mois).
-  Dispositif médical de diagnostic *in vitro*.
-  Conforme aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*.
-  Contenu suffisant pour « N » tests.
-  Attention, consulter le mode d'emploi.
-  Contenu.
-  Tenir à l'abri de la lumière du soleil.
-  Fabricant.

NOTE POUR L'ACQUÉREUR : LICENCE LIMITÉE

Ce produit contient des réactifs fabriqués par Thermo Fisher Scientific et commercialisés selon des accords de licence entre EG SpA et ses filiales et Thermo Fisher Scientific. 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, Thermo Fisher Scientific. E-mail : outlicensing@thermofisher.com.

Les réactifs de détection ELITE MGB® sont couverts par un ou plusieurs des brevets américains numéros 6972339, 7112684, 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7582739, 7601851, 7671218, 7718374, 7723038, 7759126, 7767834, 7851606, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8569516, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529 et par les brevets EP numéros 1430147, 1687609, 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161, ainsi que par des demandes de brevet actuellement en instance.

Les technologies ELITE InGenius® et ELITE BeGenius® sont couvertes par des brevets et des demandes en instance.

Cette licence limitée permet à la personne ou à l'entité à laquelle ce produit a été fourni d'utiliser le produit, ainsi que les données générées par son utilisation, uniquement à des fins de diagnostic humain. Ni ELITechGroup S.p.A. ni ses concédants n'accordent d'autres licences, explicites ou implicites, à d'autres fins.

MGB® Eclipse Dark Quencher®, AquaPhiur®, ELITE MGB®, le logo « ELITE MGB® », ELITE InGenius® et ELITE BeGenius® sont des marques déposées d'ELITechGroup au sein de l'Union européenne.

NucliSENS® easyMAG® sont des marques déposées de bioMérieux SA.

QIASymphony® est une marque déposée de QIAGEN.

Ficoll® est une marque déposée de GE Healthcare Bio-Sciences AB.

HHV7 ELITE MGB® kit used in association with Genius series® platforms



Ref: RTS037PLD

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

Intended use

The HHV7 ELITE MGB® Kit product is an *in vitro* diagnostic medical device intended to be used by healthcare professionals as quantitative nucleic acids Real-Time PCR assay for the detection and the quantification of the DNA of **Human Herpes Virus 7 (HHV7)**, extracted from clinical specimens.

The assay is validated in association with **ELITE InGenius®** and **ELITE BeGenius®** instruments, automated and integrated systems for extraction, Real-Time PCR and results interpretation, using human specimens of whole blood and plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HHV7 infections.

The results must be interpreted in combination with all relevant clinical observations and laboratory outcomes.

Amplified sequence

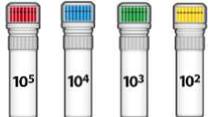
| | Gene | Fluorophore | Channel |
|------------------|-------------------------|-------------|---------|
| Target | capsid protein gene U57 | FAM | HHV7 |
| Internal Control | IC2 | AP525 (VIC) | IC |

Validated matrix

› **Whole blood** EDTA

› **Plasma** EDTA

Kit content and related products

| HHV7 ELITE MGB KIT RTS037PLD | HHV7 ELITE Standard STD037PLD | HHV7 - ELITE Positive Control CTR037PLD |
|---|--|--|
|  X 4 |  X 2 |  X 1 |
| Ready-to-use PCR Mix 4 tubes of 540 µL 96 reactions per kit 5 freeze-thaw cycles | Ready-to-use 4 levels: 10 ⁵ , 10 ⁴ , 10 ³ , 10 ² 2 set of 4 tubes of 160 µL 4 freeze-thaw cycles each set (4 separate sessions on board) | Ready-to-use PC 1 tube of 160 µL 4 reactions per kit 4 freeze-thaw cycles (4 separate sessions on board) |
| Maximum shelf-life: | 24 months | |
| Storage temperature | ≤ -20°C | |

Other products required not provided in the kit

- | | |
|---|---|
| › ELITE InGenius instrument: INT030 | › HHV7 ELITE Standard: STD037PLD |
| › ELITE BeGenius instrument: INT040 | › HHV7 - ELITE Positive Control: CTR037PLD |
| › ELITE InGenius SP200 Extraction Cartridge: INT032SP200 | › ELITE InGenius Waste Box: F2102-000 |
| › ELITE InGenius PCR Cassette: INT035PCR | › 300 µL Filter Tips Axygen: TF-350-L-R-S |
| › ELITE InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS | › 1000 µL Filter Tips Tecan: 30180118 |
| › CPE - Internal Control: CTCRPE | |

ELITE InGenius and ELITE BeGenius Protocol

- | | | | |
|-------------------------------|--------|-------------------------------|---------|
| › Sample volume | 200 µL | › Unit of quantitative result | cp/mL |
| › CPE Internal Control volume | 10 µL | › Frequency of controls | 15 days |
| › Total eluate volume | 100 µL | › Frequency of calibration | 60 days |
| › PCR eluate input volume | 10 µL | | |
| › HHV7 Q-PCR Mix volume | 20 µL | | |

ELITE InGenius and ELITE BeGenius Performances

| Matrix | Limit of Detection | Diagnostic Sensitivity | Diagnostic Specificity |
|-------------|--------------------|------------------------|------------------------|
| Whole Blood | 500 cp/mL | 100% 34/34* | 100% 38/38* |
| Plasma | 500 cp/mL | 100% 33/33* | 100% 33/33* |

*confirmed samples/ tested samples

Sample preparation

This product is intended for use on the **ELITE InGenius®** and **ELITE BeGenius®** with the following clinical specimens identified according to laboratory guidelines, and collected, transported, and stored under the following conditions.

| Sample type | Transport/Storage conditions | | | |
|-------------------------------|------------------------------------|------------|------------|------------|
| | +16 / +26 °C (room temperature) | +2 / +8 °C | -20 ±10 °C | -70 ±15 °C |
| Whole Blood collected in EDTA | ≤ 24 hours | ≤ 72 hours | ≤ 1 month | > 1 month |
| Plasma collected in EDTA | ≤ 24 hours | ≤ 72 hours | ≤ 1 month | > 1 month |

Do not use Plasma collected in heparin to prevent inhibition of amplification reaction and frequent invalid results.

ELITE InGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the Graphic User Interface of ELITE InGenius software to setup the run. All the steps: extraction, Real-Time PCR and result interpretation are automatically performed. Two operational mode are available: complete run (Extract + PCR) or PCR only.

Before analysis

- | | | |
|---|--|--|
| 1. Switch on ELITE InGenius. Log in with username and password. Select the mode "CLOSED". | 2. Verify calibrators: HHV7 Q-PCR Standard in the "Calibration menu" Verify controls: HHV7 Positive Control and HHV7 Negative Control in the "Control menu" <i>Note:</i> All must have been run, approved and not expired | 3. Thaw the HHV7 PCR Mix and the CTRCPE tubes Vortex gently Spin down 5 sec. |
|---|--|--|

Procedure 1 - Complete run: Extract + PCR (e.g., samples)

- | | | |
|---|--|--|
| 1. Select "Perform Run" on the touch screen | 2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elution: "100 µL" | 3. Scan the sample barcodes with hand-barcode reader or type the sample ID |
| 4. Select the "Assay protocol" of interest: HHV7 ELITE_PL_200_100 or HHV7 ELITE_WB_200_100 | 5. Select the method "Extract + PCR" and the sample position: Primary tube or Extraction Tube | 6. Load the PCR Mix and Internal Control in the Inventory Block |
| 7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tips, Extraction Tube racks and primary sample racks | 8. Close the door Start the run | 9. View, approve and store the results |

Note: If an Extract Only mode is needed, refer to the instrument user's manual for procedure.

Procedure 2 - PCR only (e.g., eluates, standards, controls)

- | | | |
|--|--|--|
| 1. Select "Perform Run" on the touch screen | 2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elution: "100 µL" | 3. Scan the sample barcodes with hand-barcode reader or type the sample ID |
| 4. Select the "Assay protocol" of interest: HHV7 ELITE_PC and HHV7 ELITE_NC or HHV7 ELITE_STD) | 5. Select the method "PCR only" and set the sample position "Elution tube" | 6. Load the PCR Mix in the inventory block |
| 7. Load: PCR cassette rack and the Elution tube rack with the extracted nucleic acid | 8. Close the door Start the run | 9. View, approve and store the results |

ELiTe BeGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the Graphic User Interface of ELiTe BeGenius software to setup the run. All the steps: extraction, Real-Time PCR and result interpretation are automatically performed. Two operational mode are available: complete run (Extract + PCR) or PCR Only.

Before analysis

| | | |
|--|--|--|
| <p>1. Switch on ELiTe BeGenius. Log in with username and password. Select the mode "CLOSED".</p> | <p>2. Verify calibrators: HHV7 Q-PCR Standard in the "Calibration" menu. Verify controls: HHV7 Positive Control and HHV7 Negative Control in the "Controls" menu. <i>Note:</i> All must have been run, approved and not expired.</p> | <p>3. Thaw the HHV7 PCR Mix and the CTRCPE tubes. Vortex gently. Spin down 5 sec.</p> |
|--|--|--|

Procedure 1 - Complete run: Extract + PCR (e.g., samples)

| | | |
|---|---|--|
| <p>1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode «Extract + PCR»</p> | <p>2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the Cooler Unit. The barcode scan is already active</p> | <p>3. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Elution: "100 µL"</p> |
| <p>4. Select the "Assay protocol" of interest (HHV7 ELiTe_Be_PL_200_100 or HHV7 ELiTe_Be_WB_200_100) Note: if a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4</p> | <p>5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the Cooler Unit</p> | <p>6. Load the PCR-Mix and the Internal Control in Reagent Rack/Elution Rack and insert it in the Cooler Unit</p> |
| <p>7 Load "PCR Basket" with "PCR Cassette" and the "Extraction Basket" with the "ELiTe InGenius SP 200" extraction cartridges and the required extraction consumables</p> | <p>8. Close the door. Start the run</p> | <p>9. View, approve and store the results</p> |

Procedure 2 - PCR only (e.g., eluates, standards, controls)

| | | |
|---|---|---|
| <p>1. Select "Perform Run" on the touch screen and the click on the run mode «PCR Only»</p> | <p>2. Load the extracted nucleic acid or controls or standards barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the Cooler Unit</p> | <p>3. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Eluate: "100 µL"</p> |
| <p>4Select the "Assay protocol" of interest (HHV7 ELiTe_Be_PC and HHV7 ELiTe_Be_NC or HHV7 ELiTe_Be_STD) 7. Close the door. Start the run</p> | <p>5. . Load the PCR-Mix in Reagent/ Elution Rack and insert it in the Cooler Unit 8. View, approve and store the results</p> | <p>6. Load "PCR Basket" with "PCR Cassette"</p> |