



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

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

NOTICE of CHANGE dated 13/10/2020

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«WNV ELITE MGB Kit» Ref. RTS100PLD

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

- *Minor changes in the Intended Use description. The Intended Use of the product remains unchanged.*

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

PLEASE NOTE



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



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



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



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



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



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



WNV ELITe MGB® Kit
réactif pour la transcription inverse et
l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS100PLD

PRINCIPE DU TEST

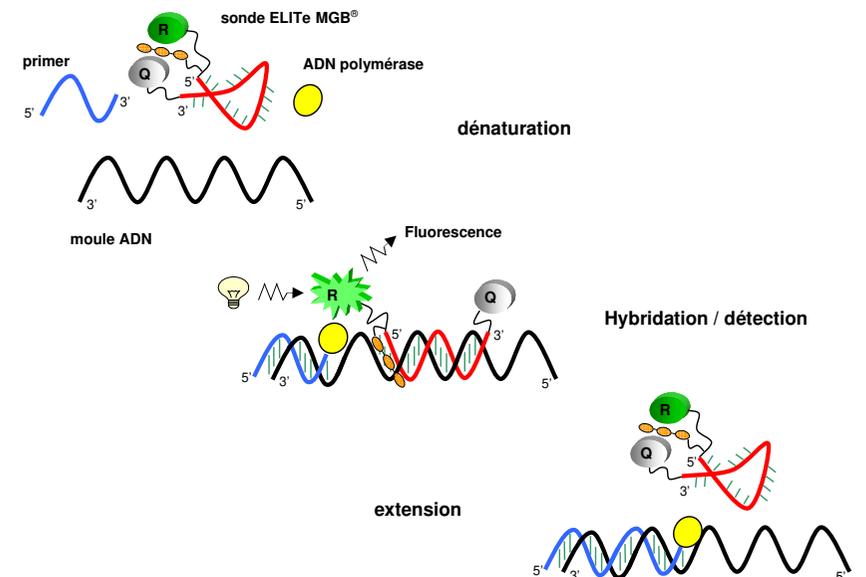
Le test est basé sur une réaction de transcription inverse et d'amplification en temps réel (méthodique one-step) sur microplaque avec un thermostat programmable doté d'un système optique de détection de la fluorescence (thermocycleur pour amplification en temps réel).

Dans chaque puits, on effectue une réaction de transcription inverse et d'amplification spécifique de la région du gène **NS5 de WNV** codant pour une protéine non structurale, et d'une région de l'ARN génomique du **phage MS2** (contrôle interne d'inhibition) en utilisant directement l'ARN extrait à partir des échantillons à tester. La sonde avec la technologie ELITe MGB® spécifique pour WNV, marquée avec le fluorophore FAM, est activée lorsqu'elle s'hybride avec le produit spécifique de la réaction d'amplification de WNV. La sonde avec la technologie ELITE MGB® spécifique pour le contrôle interne, marquée avec le fluorophore AP525 (équivalent à VIC), est activée lorsqu'elle s'hybride avec le produit spécifique de la réaction d'amplification pour le contrôle interne. L'émission de la fluorescence augmente au fur et à mesure qu'augmentent les produits spécifiques de la réaction d'amplification et elle est mesurée et enregistrée par l'instrument. Le traitement des données permet de détecter la présence et de mesurer la quantité d'ARN de WNV contenue dans l'échantillon initial.

A la fin de la session, on peut effectuer l'analyse de la courbe de fusion (melting curve) et d'identifier la température de fusion (melting temperature) pour confirmer la présence du cible ou d'identifier la présence de mutations

Le test a été validé à l'aide d'instruments 7300 Real Time PCR System et 7500 Fast Dx Real Time PCR Instrument.

La figure ci-dessous synthétise le mécanisme d'activation et d'émission de la fluorescence de la sonde fabriquée avec la technologie ELITe MGB®. La sonde n'est pas hydrolysée pendant le cycle d'amplification, elle peut donc être utilisée pour l'analyse de la courbe de dissociation.



WNV ELITe MGB® Kit
réactif pour la transcription inverse de l'ARN et
l'amplification en temps réel de l'ADNc

REF RTS100PLD



TABLE DES MATIÈRES

APPLICATION	Page 1
PRINCIPE DU TEST	Page 2
DESCRIPTION DU PRODUIT	Page 3
MATÉRIEL FOURNI	Page 3
MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI	Page 4
AUTRES PRODUITS REQUIS	Page 4
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	Page 5
AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS	Page 6
PROCÉDURE	Page 7
LIMITES DE LA PROCÉDURE	Page 15
CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES	Page 17
BIBLIOGRAPHIE	Page 24
PROBLÈMES ET SOLUTIONS	Page 25
LÉGENDE DES SYMBOLES	Page 26
NOTE POUR L'ACQUEREUR: LICENCE LIMITEE	Page 27

APPLICATION

Le produit «WNV ELITe MGB® Kit» est un test qualitatif et quantitatif de transcription inverse et d'amplification des acides nucléiques pour la recherche et le dosage de l'ADNc du flavivirus humain West Nile Virus (WNV, Lineage 1a, y compris les souches méditerranéennes, et Lineage 2) à partir des échantillons d'ARN extrait de sang total prélevé sur EDTA, liquide céphalorachidien (LCR) et urine recueillie sans conservateurs.

Ce produit est utilisé, conjointement aux données cliniques et à d'autres examens de laboratoire, dans le diagnostic et le monitoring des cas de infection par WNV. Aucune donnée de validation n'est disponible pour l'utilisation du produit en association avec des matrices biologiques ou pour des utilisations prévues différentes de celles indiquées dans le présent mode d'emploi.

DESCRIPTION DU PRODUIT

Le produit «WNV ELite MGB® Kit» fournit les composants suivants:

• **WNV PreMix**

Un mélange d'oligonucléotides d'amorçage pour la transcription inverse et l'amplification en temps réel dans une solution stabilisante, **pré-répartie dans deux tubes** (bouchon NEUTRE). Chaque tube contient **270 µL** de solution, suffisants pour **50 réactions**.

Les oligonucléotides d'amorçage et la sonde pour WNV (stabilisés par le groupe MGB®, marquée avec le fluorophore FAM et inactivée par un agent d'extinction non fluorescente) sont spécifiques à une région du gène **NS5 de WNV**.

Les oligonucléotides d'amorçage et la sonde pour le contrôle interne (stabilisé par le groupe MGB®, marquée avec le fluorophore AP525, équivalent à VIC et inactivée par un agent d'extinction non fluorescente) sont spécifiques à une région d'ARN génomique du **phage MS2**.

Le mélange fournit également le fluorophore AP593, utilisé à la place du CY5 ou ROX comme une référence passive pour la normalisation de la fluorescence.

• **PCR MasterMix**

Un mélange optimisé de réactifs pour la transcription inverse et l'amplification en temps réel dans une solution stabilisante, **pré-répartie dans deux tubes** (bouchon NEUTRE). Chaque tube contient **820 µL** de solution, suffisants pour **50 réactions**.

Le mélange de réaction fournit le tampon, le chlorure de magnésium, les nucléotides triphosphates et l'enzyme Taq ADN polymérase à activation thermique (hot start).

• **RT EnzymeMix**

Un mélange optimisé pour la transcription inverse dans une solution stabilisante, **pré-répartie dans deux tubes** (bouchon NOIR). Chaque tube contient **20 µL** de solution, suffisants pour 50 réactions.

Le mélange de réaction fournit les enzymes pour la transcription inverse.

Le produit permet d'effectuer **100 déterminations**, standards et contrôles inclus.

MATÉRIEL FOURNI

Composant	Description	Quantité	Classification des dangers
WNV PreMix	mélange d'oligonucléotides d'amorce et de la sonde Bouchon NEUTRE	2 x 270 µL	-
PCR MasterMix	mélange optimisé de réactifs pour la transcription inverse et l'amplification en temps réel Bouchon NEUTRE	2 x 820 µL	-
RT EnzymeMix	enzyme transcriptase inverse Bouchon NOIR	2 x 20 µL	-

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Hotte à flux laminaire.
- Gants sans poudre, jetables en nitrile ou équivalent.
- Vortex.
- Microcentrifugeuse de paillasse (12.000 - 14.000 Tr/min).
- Micro pipettes et embouts stériles avec filtre pour aérosol ou à distribution positive (2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Eau ultra pure pour la biologie.
- Microtubes pour la biologie moléculaire en polypropylène de 1,5 mL.
- Thermostat programmable couplé à un système optique de détection de la fluorescence, 7300 Real Time PCR System ou 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, calibré conformément aux recommandations du fabricant.

AUTRES PRODUITS REQUIS

Les réactifs pour l'extraction d'ARN des échantillons à analyser, le contrôle interne de l'extraction et de l'inhibition les microplaques pour l'amplification, le contrôle positif d'amplification et les ADN standard à quantité connue **ne sont pas** compris dans ce produit.

Pour l'extraction d'ARN des échantillons à analyser utiliser un produit générique «**ELite STAR 200 Extraction Kit**» (code INT011EX, ELITechGroup S.p.A.), kit d'extraction pour l'extraction des acides nucléiques à partir d'échantillons biologiques avec l'instrument «**ELite STAR**» (code INT010, ELITechGroup S.p.A.).

Comme contrôle de l'extraction et de l'inhibition il est conseillé d'utiliser le produit générique «**CPE - Internal Control**» (ELITechGroup S.p.A., code CTCRPE), ADN plasmidique et ARN phage amplifié par les réactions de contrôle interne.

Avec un instrument 7300 Real-Time PCR System, il est conseillé d'utiliser le produit générique «**Q - PCR Microplates**» (ELITechGroup S.p.A., code RTSACC01), contenant des microplaques de 0,2 mL et des films adhésifs, pour l'amplification en temps réel.

Avec un instrument 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, il est conseillé d'utiliser le produit générique «**Q - PCR Microplates Fast**» (ELITechGroup S.p.A., code RTSACC02), contenant des microplaques de 0,1 mL et des films adhésifs, pour l'amplification en temps réel.

Dans le cas il est requis un résultat qualitatif de l'analyse, il est nécessaire à l'utilisation du produit «**WNV - ELite Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., code CTR100PLD).

Dans le cas il est requis un résultat quantitatif de l'analyse, il est nécessaire à l'utilisation du produit «**WNV ELite Standard**» (ELITechGroup S.p.A., code STD100PLD), quatre dilutions d'ADN plasmidique à une quantité connue afin d'obtenir la courbe standard.

WNV ELite MGB® Kit

réactif pour la transcription inverse et l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS100PLD

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES**Échantillons**

Ce produit doit être utilisé l'**ARN extrait** des échantillons biologiques suivants: sang total prélevé sur EDTA, liquide céphalorachidien (LCR) et urine recueillie sans conservateurs.

Ce produit peut être utilisé en ajoutant jusqu'à 300 ng d'**ARN extrait** à la réaction de la transcription inverse et l'amplification en temps réel.

Sang total prélevé sur EDTA

Le sang total prélevé sur EDTA destiné à l'extraction des acides nucléiques, doit être prélevé sur EDTA selon les indications du laboratoire, transporté à +2° / +8°C et conservé à +2° / +8°C pendant quatre heures maximum, autrement ils doivent être congelés et conservés à -20 ° C pendant un maximum de deux jours ou à -70 °C pendant des durées plus longues.

Il est conseillé de subdiviser en plusieurs aliquots les échantillons à conserver congelés de façon à ne pas les soumettre à plusieurs cycles de congélation / décongélation.

Liquide céphalorachidien

Les échantillons de liquide céphalorachidien destinés à l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés suivant les indications du laboratoire en évitant la contamination avec le sang du patient. Ils doivent être transportés à +2°C / +8°C et conservés à +2°C / +8°C pendant un maximum de 4 heures, autrement ils doivent être congelés et conservés à -20°C pendant un maximum de trente jours ou à -70°C pendant une période plus longue.

Il est conseillé de subdiviser en plusieurs aliquots les échantillons à conserver congelés de façon à ne pas les soumettre à plusieurs cycles de congélation / décongélation.

Urines prélevées sans conservateurs

Les échantillons d'urines destinés à l'extraction des acides nucléiques doivent être récoltés dans des conteneurs sans conservateurs, suivant les indications du laboratoire. Ils doivent être transportés et conservés à température ambiante (+18 / +25 °C) pendant un maximum de quatre heures. Ils peuvent être congelés et conservés à -20 °C pendant un maximum de trente jours ou à -70 °C pour une période de temps plus longue.

La congélation des échantillons d'urines entraîne souvent la formation de précipités qui peuvent compromettre les phases ultérieures de la méthode : pour l'extraction, utiliser uniquement le surnageant.

Remarque: lors de l'extraction de l'ARN d'échantillons de sang total, liquide céphalorachidien et urine à l'aide du kit «**ELITE STAR 200 Extraction Kit**» et de l'instrument «**ELITE STAR**» «**ELITE STAR**», **logiciel version 3.4.13** (ou plus), suivre le protocole **UUNI_E100S200_ELI** qui traite 200 µL d'échantillon et éluer l'ARN extrait dans 100 µL. Les échantillons dans le tube primaire peuvent être chargés directement sur l'appareil «**ELITE STAR**». Il est toujours nécessaire de disposer d'un volume mort de 700 µL minimum. Ajouter à la solution **200 µL** de contrôle interne **CPE** dans le tube de solution Proteinase-Carrier comme spécifié dans le manuel d'instructions pour l'utilisation du kit d'extraction. Pour tout détail sur la procédure d'extraction, suivre attentivement les indications fournies dans la Notice d'utilisation du kit.

Substances interférentes

L'ARN extrait de l'échantillon de départ ne doit contenir ni héparine, ni hémoglobine ni éthanol ou propane-2-ol, afin d'éviter des phénomènes d'inhibition et de résultats non valables.

Des quantités d'ARN extrait supérieure à 300 ng par réaction peut inhiber la réaction de transcription inverse et d'amplification en temps réel.

Des quantités d'ADN génomique humain élevé présent dans l'ARN extrait de l'échantillon peut inhiber la réaction de transcription inverse et d'amplification en temps réel.

Aucune donnée n'est disponible concernant les éventuels phénomènes d'inhibition par des médicaments antibiotiques, antiviraux, chimiothérapeutiques ou immunosuppresseurs.

Contrôles d'amplification

Chaque amplification doit impérativement être validée par un contrôle négatif et par un contrôle positif.

Pour le contrôle négatif, utiliser de l'eau ultra pure pour la biologie (non incluse dans le produit) à ajouter à la réaction à la place de l'ARN extrait de l'échantillon.

Pour le contrôle positif, utiliser le produit «**WNV ELite Standard**» ou le produit «**WNV - ELITE Positive Control**».

WNV ELite MGB® Kit

réactif pour la transcription inverse et l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS100PLD

Contrôles de la qualité

Il est conseillé de valider chaque étape de la procédure d'analyse, de l'extraction à l'amplification, en utilisant un échantillon négatif et un échantillon positif déjà testés ou du matériel de référence calibré.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS**Ce produit est destiné à l'usage *in vitro* uniquement.****Avertissements et précautions**

Manipuler et éliminer tous les échantillons biologiques comme s'ils pouvaient transmettre des agents infectieux. Éviter le contact direct avec les échantillons biologiques. Éviter les éclaboussures ou les aérosols. Le matériel qui entre en contact avec les échantillons biologiques doit être décontaminé à l'hypochlorite de sodium à 3% pendant au moins 30 minutes ou autoclavé à 121°C pendant une heure avant d'être éliminé.

Manipuler et éliminer tous les réactifs et tous les matériaux utilisés pour le test comme s'ils étaient potentiellement infectieux. Éviter le contact direct avec les réactifs. Éviter les éclaboussures ou les aérosols. Les déchets doivent être traités et éliminés conformément aux normes de sécurité. Le matériel jetable combustible doit être incinéré. Les déchets liquides contenant des acides ou des bases doivent être neutralisés avant leur élimination.

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

Ne jamais pipeter les solutions à la bouche.

Ne pas manger, boire, fumer ou se maquiller dans l'environnement de travail.

Se laver parfaitement les mains après avoir manipulé les échantillons et les réactifs.

Éliminer les réactifs en surplus et les déchets en respectant les réglementations en vigueur.

Lire attentivement toutes les instructions fournies dans le produit avant de procéder au test.

Respecter scrupuleusement les consignes fournies dans le produit pendant l'exécution du test.

Respecter la date de péremption du produit.

N'utiliser que les réactifs présents dans le produit et ceux conseillés par le producteur.

Ne pas utiliser des réactifs provenant de lots différents.

Ne pas utiliser de réactifs d'autres fabricants.

Avertissements et précautions à adopter en biologie moléculaire

Les procédures de biologie moléculaire, comme l'extraction, la transcription inverse, l'amplification et la détection d'acides nucléiques doivent être exécutées par un personnel compétent et ayant reçu une formation appropriée afin d'éviter tout risque de résultats erronés dus en particulier à la dénaturation des acides nucléiques ou à la contamination des échantillons par des produits d'amplification.

Il est nécessaire de disposer de locaux distincts pour l'extraction / préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification / détection des produits d'amplification. Ne jamais introduire un produit d'amplification dans la zone d'extraction / préparation des réactions d'amplification.

Il est nécessaire de disposer de blouses, gants et instruments dédiés pour l'extraction / préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification / détection des produits d'amplification. Ne jamais transférer les blouses, gants et instruments de la zone dédiée à l'amplification / détection des produits d'amplification vers la zone dédiée à l'extraction / préparation des réactions d'amplification.

Les échantillons ne doivent être utilisés que pour ce type d'analyse. Les échantillons doivent être manipulés sous une hotte à flux laminaire. Les tubes contenant des échantillons différents ne doivent jamais être ouverts simultanément. Les pipettes utilisées pour manipuler les échantillons ne doivent servir qu'à cet usage exclusif. Les pipettes doivent être du type à distribution positive ou utiliser des embouts à filtre pour aérosol. Les embouts utilisés doivent être stériles, dépourvus de DNase, de RNase, d'ADN et d'ARN.

Les réactifs doivent être manipulés sous une hotte à flux laminaire. Les réactifs nécessaires à l'amplification doivent être préparés de façon à être utilisés au cours d'une seule étape. Les pipettes utilisées pour manipuler les réactifs ne doivent servir qu'à cet usage exclusif. Les pipettes doivent être de type à distribution positive ou utiliser des embouts à filtre pour aérosol. Les embouts utilisés doivent être stériles, dépourvus de DNase, RNase, d'ADN et d'ARN.

Les produits d'amplification doivent être manipulés de façon à en limiter le plus possible la dispersion dans l'environnement afin d'éviter tout risque de contamination. Les pipettes utilisées pour manipuler les produits d'amplification ne doivent servir qu'à cet usage.

WNV ELite MGB® Kit
réactif pour la transcription inverse et
l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS100PLD

Avertissements et précautions concernant les composants

WNV PreMix

Le **WNV PreMix** doit être conservé dans l'obscurité à -20°C.

Le **WNV PreMix** peut être congelé et décongelé pour un maximum de **cinq fois**: tout cycle de congélation / décongélation supplémentaire risque d'entraîner une perte des performances du produit.

• **PCR MasterMix**

Le **PCR MasterMix** doit être conservé à -20°C.

Le **PCR MasterMix** peut être congelé et décongelé pour un maximum de **cinq fois**: tout cycle de congélation / décongélation supplémentaire risque d'entraîner une perte des performances du produit.

• **RT EnzymeMix**

Le **RT EnzymeMix** doit être conservé à -20 ° C.

Le **RT EnzymeMix** ne doit pas être exposé à des températures supérieures à -20 ° C pendant plus de 10 minutes.

PROCÉDURE

Mise en place de l'amplification en temps réel

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

En cas d'utilisation de l'instrument **7300 Real-Time PCR System**:

Avant de commencer, en se reportant à la documentation de l'instrument, il faut:

- allumer le thermocycleur pour amplification en temps réel, allumer l'ordinateur, lancer le logiciel dédié et ouvrir une étape de quantification absolue;
- paramétrer (Detecteur Manager) le "détecteur" pour la sonde de WNV avec le "reporter" = "FAM" et le "quencher" = "none" (non fluorescent) et l'appeler "WNV";
- paramétrer (Detecteur Manager) le "détecteur" pour la sonde du MS2 avec le "reporter" = "VIC" et le "quencher" = "none" (non fluorescent) et l'appeler "CI";
- pour chaque puits utilisé, paramétrer (Well Inspector) les "détecteurs" (type de fluorescence à mesurer), la "référence passive" = "ROX" (AP593 est utilisé en remplacement du ROX, normalisation de la fluorescence mesurée) et le type de réaction (échantillon, contrôle négatif d'amplification, ou standard en indiquant le titre). Reporte ces informations dans la **Grille de travail** annexée à cette notice d'instructions et d'utilisation ou imprimer l'organisation de la microplaque. La **Grille de travail** doit être suivie scrupuleusement pendant le transfert du mélange de réaction et des échantillons dans les puits.

Remarque: pour déterminer le titre de l'ADNc dans l'échantillon initial, il est nécessaire de préparer une série de réactions avec les **Q - PCR standard** (10⁵ copies, 10⁴ copies, 10³ copies, 10² copies) pour obtenir la **Courbe Standard**.

A l'aide de la documentation de l'instrument, configurer sur le logiciel dédié (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile) les paramètres du **cycle de température**:

- Ajouter à la phase d'amplification l'étape (Add Step) **d'extension à 72°C**;

Remarque: l'acquisition de la fluorescence (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection) doit être paramétrée lors de l'étape **d'hybridation à 60°C**.

- modifier les temps selon les valeurs fournies dans le tableau "**Cycle de température**";
- paramétrer **45 cycles**;
- paramétrer la valeur du volume pour la simulation logicielle du transfert thermique à la réaction ("Sample volume") à **30 µL**;
- Facultatif: ajouter l'étape de dissociation (Ajouter Dissociation Stage) et définir des températures de **40°C à 80°C**.

WNV ELite MGB® Kit
réactif pour la transcription inverse et
l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS100PLD

Cycle de température		
Phase	Températures	Temps
Retrotranscription	50° C	20 min.
Dénaturation initiale	94° C	5 min.
Amplification et détection (45 cycles)	94° C	10 sec.
	60° C (acquisition de la fluorescence)	30 sec.
	72° C	20 sec.
Dissociation (facultatif)	95 °C	15 sec.
	40 °C	30 sec.
	80 °C	15 sec.

En cas d'utilisation de l'instrument **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**:

Avant de commencer, en se reportant à la documentation de l'instrument, il faut:

- allumer le thermocycleur pour amplification en temps réel, allumer l'ordinateur, lancer le logiciel dédié, ouvrir une étape de quantification absolue et paramétrer "Run mode: Fast 7500";
- paramétrer (Detecteur Manager) le "détecteur" pour la sonde de WNV avec le "reporter" = "FAM" et le "quencher" = "none" (non fluorescent) et l'appeler "WNV";
- paramétrer (Detecteur Manager) le "détecteur" pour la sonde du MS2 avec le "reporter" = "FAM" et le "quencher" = "none" (non fluorescent) et l'appeler "CI";
- pour chaque puits utilisé, paramétrer (Well Inspector) les "détecteurs" (type de fluorescence à mesurer), la "référence passive" = "Cy5" (AP593 est utilisé en remplacement du Cy5, normalisation de la fluorescence mesurée) et le type de réaction (échantillon, contrôle négatif d'amplification, ou standard en indiquant le titre). Reporte ces informations dans la **Grille de travail** annexée à cette notice d'instructions et d'utilisation ou imprimer l'organisation de la microplaque. La **Grille de travail** doit être suivie scrupuleusement pendant le transfert du mélange de réaction et des échantillons dans les puits.

Remarque: pour déterminer le titre de l'ADN dans l'échantillon initial, il est nécessaire de préparer une série de réactions avec les **Q - PCR standard** (10⁵ copies, 10⁴ copies, 10³ copies, 10² copies) pour obtenir la **Courbe standard**.

A l'aide de la documentation de l'instrument, configurer sur le logiciel dédié (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile) les paramètres du **cycle de température**:

- Ajouter à la phase d'amplification l'étape (Add Step) **d'extension à 72°C**;

Remarque: l'acquisition de la fluorescence (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection) doit être paramétrée lors de l'étape **d'hybridation à 60°C**.

- modifier les temps selon les valeurs fournies dans le tableau "**Cycle de température**";
- paramétrer **45 cycles**;
- paramétrer la valeur du volume pour la simulation logicielle du transfert thermique à la réaction ("Sample volume") à **30 µL**;
- - Facultatif: ajouter l'étape de dissociation (Ajouter Dissociation Stage) et définir des températures de **40°C à 80°C**.

Cycle de température		
Phase	Températures	Temps
Retrotranscription	50° C	20 min.
Dénaturation initiale	94° C	5 min.
Amplification et détection (45 cycles)	94° C	10 sec.
	60° C (acquisition de la fluorescence)	30 sec.
	72° C	20 sec.
Dissociation (facultatif)	95 °C	15 sec.
	40 °C	1 min.
	80 °C	15 sec.
	60 °C	15 sec.

Préparation de l'amplification

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

Avant de commencer, il faut:

- prendre et décongeler à la température ambiante (+18 / 25 °C) les tubes contenant les échantillons d'ARN à analyser. Agiter les tubes avec le vortex, les centrifuger pendant 5 secondes pour reporter le contenu dans le fond et les conserver dans la glace;
- prendre et décongeler pendant 30 minutes à la température ambiante (+18 / 25 °C) les tubes de **WNV PreMix** (bouchon NEUTRE) nécessaire pour la session en rappelant que le contenu de chaque tube est suffisante pour préparer **50 réactions**. Agiter les tubes avec le vortex, les centrifuger pendant 5 secondes pour reporter le contenu dans le fond et les conserver dans la glace;
- prendre et décongeler pendant 30 minutes à la température ambiante (+18 / 25 °C) les tubes de **PCR MasterMix** (bouchon NEUTRE) nécessaire pour la session en rappelant que le contenu de chaque tube est suffisante pour préparer **50 réactions**. Agiter les tubes avec le vortex, les centrifuger pendant 5 secondes pour reporter le contenu dans le fond et les conserver dans la glace;
- prendre au moment de l'utilisation les tubes de **RT EnzymeMix** (bouchon NOIR) nécessaire pour la session en rappelant que le contenu de chaque tube est suffisante pour préparer **50 réactions**. Centrifuger les tubes pendant 5 secondes pour reporter le contenu dans le fond et les conserver dans la glace.

Remarque: Le **RT EnzymeMix** ne doit pas être exposé à des températures supérieures à -20°C pendant plus de 10 minutes.

- prendre et décongeler pendant 30 minutes à la température ambiante (+18 / 25 °C) les tubes de **WNV Q-PCR Standard** ou les tubes de **WNV – Positive Control**. Agiter les tubes avec le vortex, les centrifuger pendant 5 secondes pour reporter le contenu dans le fond.
- prélever la **microplaque d'amplification** utilisée au cours de la session en prêtant attention à la manipuler avec des gants sans poudre et veiller à ne pas endommager les puits.
- retirer l'**Amplification Sealing Sheet** qui sera utilisé lors de la session, en prenant soin de le manipuler avec des gants sans poudre et de ne pas l'endommager;
- préparer un microtube pour la biologie moléculaire en polypropylène de 1,5 ml (non fourni dans le kit): un pour le mélange de réaction complet **WNV Q – PCR Mix** et le marquer en manier reconnaissable avec un marqueur permanent;
- calculer les volumes de trois composants dans le kit nécessaire pour préparer le mélange réactionnel complet **WNV Q – PCR Mix** en fonction du nombre d'échantillons à analyser, comme décrit dans le tableau présenté ci-dessous.

Remarque: Pour le calcul des volumes des trois composants, il est nécessaire de définir le nombre N des réactions de travail en additionnant le nombre d'échantillons cliniques à analyser, un contrôle négatif de l'amplification, quatre Q - PCR standard et une réaction en plus comme marge de sécurité.

Nombre de réactions	WNV PreMix	PCR MasterMix	RT EnzymeMix
1	5 µL	15 µL	0,3 µL
N	N x 5 µL	N x 15 µL	N x 0,3 µL

- préparer le mélange de réaction complet **WNV Q – PCR Mix** en transférant dans le tube dédié les volumes des calculés trois composants.
- mélanger avec le vortex à faible vitesse pendant 10 secondes à trois reprises, centrifuger le tube pendant 5 secondes pour reporter le contenu dans le fond et les conserver dans la glace.

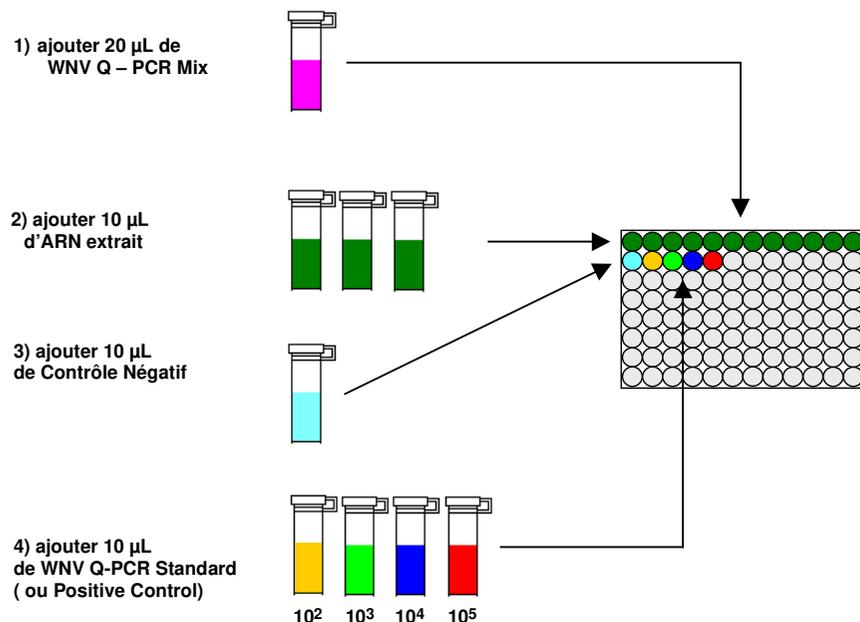
Remarque: le mélange de réaction complet préparée doit être utilisé dans 30 minutes. La mélange de réaction complet préparée **ne peut pas** être stocké.

Préparer les réactions comme décrit ci-dessous:

- Déposer délicatement et sans faire de bulles **20 µL** du mélange complet de réaction **WNV Q – PCR Mix** dans les puits de l'**Amplification microplaque** comme précédemment établi sur la **Grille de travail**.
- Conformément à la **Grille de travail**, transférer délicatement **10 µL** d'**ARN** du premier échantillon dans le puit correspondant de l'**Amplification microplaque** comme précédemment établi sur la **Grille de travail**. Mélanger soigneusement l'échantillon et pipeter trois fois le volume de 20 µL dans le mélange de réaction. Ne pas faire de bulles aussi bien sur le fond du puits et à la surface. Procéder de la même façon avec tous les **ARN extraits**.
- Déposer délicatement dans le mélange de réaction **10 µL** d'**Eau ultra pure pour la biologie** (non incluse dans le produit), dans le puit de l'**Amplification microplaque** du contrôle négatif d'amplification conformément à l'organisation définie précédemment dans la **Grille de travail**. Mélanger soigneusement le contrôle négatif et pipeter trois fois le **eau ultra pure pour la biologie** dans le mélange de réaction. Ne pas faire de bulles aussi bien sur le fond du puits et à la surface.
- Selon le type de résultat souhaité (qualitatif ou quantitatif), suivre l'une des deux options:
 - Lorsqu'un résultat de l'analyse qualitative est nécessaire (détection d'ARN du WNV): déposer délicatement dans le mélange de réaction **10 µL** de **WNV - Positive Control** dans le puit correspondant de l'**Amplification microplaque** conformément à l'organisation définie précédemment dans la **Grille de travail**. Mélanger soigneusement le standard et pipeter trois fois le **WNV – Positive Control** dans le mélange de réaction. Ne pas faire de bulles aussi bien sur le fond du puits et à la surface.
 - Lorsqu'un résultat de l'analyse quantitatif est nécessaire (quantification d'ARN du WNV): déposer délicatement dans le mélange de réaction **10 µL** de **WNV Q-PCR Standard 10²** dans le puit correspondant de l'**Amplification microplaque** conformément à l'organisation définie précédemment dans la **Grille de travail**. Mélanger soigneusement le standard et pipeter trois fois le **WNV Q-PCR Standard 10²** dans le mélange de réaction. Ne pas faire de bulles aussi bien sur le fond du puits et à la surface. Procéder de la même façon avec tous les **WNV Q-PCR Standard 10³, 10⁴, 10⁵**.
- Sceller soigneusement l'**Amplification microplaque** à l'aide de l'**Amplification Sealing Sheet**.
- Transférer l'**Amplification microplaque** dans le thermocycleur à temps réel, placé dans la zone d'amplification / détection des produits d'amplification, et lancer le cycle de température d'amplification en sauvegardant, avec un nom identifiable et ne pouvant prêter à confusion, les données de l'étape (p.ex. "année-mois-jour- WNV-EGSpA ").

Remarque: Au terme du cycle d'amplification, l'**Amplification microplaque** contenant les produits de réaction doit être retirée de l'instrument et jetée afin de ne pas contaminer l'environnement. **Ne jamais soulever l'Amplification Sealing Sheet de l'Amplification microplaque** afin d'éviter toute fuite des produits de réaction.

La figure ci-dessous illustre la préparation des réactions d'amplification pour l'analyse quantitative des 12 échantillons.



Analyse des résultats

Les valeurs de la fluorescence émise par la sonde spécifique à le WNV (détecteur FAM "WNV") et par la sonde spécifique du Contrôle Interne (détecteur VIC "CI") doivent être analysées à l'aide du logiciel de l'instrument.

Avant de procéder à l'analyse, en se reportant à la documentation de l'instrument, il faut:

- paramétrer manuellement (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle) l'intervalle de calcul du **Niveau de fluorescence de base (Baseline)** du cycle 6 au cycle 15;

Remarque: Pour un échantillon positif à titre de WNV élevé, la fluorescence FAM de la sonde spécifique à le WNV peut commencer à augmenter avant le 15ème cycle. Dans ce cas, l'intervalle de calcul du **Niveau de fluorescence de fond** doit être adapté du cycle 6 au cycle où la fluorescence FAM commence à augmenter (Results > Component).

En cas d'utilisation de l'instrument **7300 Real-Time PCR System**:

- programmer manuellement à **0,1** le **Seuil (Threshold)** pour le détecteur FAM "WNV";
- programmer manuellement à **0,05** le **Seuil (Threshold)** pour le détecteur VIC "CI".

En cas d'utilisation d'un instrument **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**:

- programmer manuellement à **0,1** le **Seuil (Threshold)** pour le détecteur FAM "WNV";
- programmer manuellement à **0,1** le **Seuil (Threshold)** pour le détecteur VIC "CI".

Les valeurs de fluorescence émises par les sondes spécifiques et la valeur **Seuil** de fluorescence sont utilisées pour déterminer le **Cycle Seuil (Ct, Threshold Cycle)**, le cycle où la valeur **Seuil** de fluorescence a été atteinte.

Contrôle Positif ou Courbe standard

Dans les réactions d'amplification du **Contrôle Positif** ou du **Q - PCR Standard 10⁵**, le valeur de **Ct** pour **WNV** (Results > Report) est utilisé pour valider l'amplification et la détection comme décrit dans les tableaux ci-dessous:

Réaction Contrôle Positif (ou Q - PCR Standard 10 ⁵) détecteur FAM "WNV"	Résultat du test	Amplification / Détection
Ct ≤ 25	POSITIF	CORRECTE

Si le résultat de la réaction d'amplification du **Contrôle Positif** ou de le **Q - PCR Standard 10⁵** est **Ct > 25** ou **Ct non-interprétable (Undetermined)** pour WNV, n'a pas été correctement détecté la présence d'ADN cible. Cela révèle la survenue de problèmes pendant la phase d'amplification ou de détection (distribution erronée ou dégradation du mélange de réaction ou du contrôle positif, paramétrage erroné de la position du cycle de température) qui peuvent générer des résultats erronés. L'étape n'est pas valable et doit être recommencée à partir de la phase d'amplification.

Contrôle Négatif

Dans la réaction d'amplification avec le **Contrôle négatif**, le valeur de **Ct** pour **WNV** (Results > Report) est utilisé pour valider l'étape d'amplification et de détection comme décrit dans le tableau ci-dessous:

Réaction Contrôle négatif détecteur FAM "WNV"	Résultat du test	Amplification / Détection
Ct Non interprétable	NON DÉTECTÉ	CORRECTE

Si le résultat de la réaction d'amplification du **Contrôle négatif** est différent de **Ct Non interprétable** pour WNV, cela indique que la présence d'ADN cible a été détectée dans la réaction d'amplification. Dans ce cas, des problèmes sont survenus en phase d'amplification (contamination) qui peuvent engendrer des résultats erronés. L'étape n'est pas valable et doit être recommencée à partir de la phase d'amplification.

Echantillons

Dans les réactions d'amplification de chaque **échantillon**, la valeur de **Ct** pour WNV est utilisée pour détecter et calculer la **Présence** d'ARN cible, tandis que les valeurs **Ct** du Contrôle Interne est utilisée pour valider l'extraction, l'amplification et la détection.

Remarque: Vérifier à l'aide du logiciel de l'instrument (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle) que le **Ct** est bien déterminé à partir d'une augmentation rapide et régulière des valeurs de fluorescence et pas à partir de phénomènes de pic ou d'augmentation progressive du signal de fond (fond irrégulier ou élevé).

Ce produit est capable de détecter une quantité minimale de 450 à 200 copies de WNV d'ARN par millilitre, ce qui équivaut aux génomes équivalents par millilitre (Limite de détection du produit, voir "Caractéristiques de performance").

WNV ELite MGB® Kit
réactif pour la transcription inverse et
l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS100PLD

Les valeurs de **Ct** dans les réactions d'amplification de chaque échantillon (Results > Report) ont été utilisés comme décrit dans le tableau suivant:

Réaction d'échantillon		Aptitude d'échantillon	Résultat du test	ARN de WNV
detector FAM "WNV"	detector VIC "CI"			
Ct Non interprétable	Ct > 35 ou Ct Non interprétable	inadéquat	Invalide	-
	Ct ≤ 35	adéquat	valide, négatif	NON DÉTECTÉ
Ct Interprétable	Ct > 35 ou Ct Non interprétable	adéquat	valide, négatif	DÉTECTÉ
	Ct ≤ 35	adéquat	valide, négatif	DÉTECTÉ

Si le résultat des réactions d'amplification d'un échantillon est **Ct Non interprétable** pour WNV et **Ct > 35 ou Ct Non interprétable** pour le Contrôle Interne, il n'a pas été possible de détecter efficacement l'ARN du Contrôle Interne. Dans ce cas, des problèmes dans l'étape d'extraction peuvent être vérifiées (perte d'ARN, présence d'inhibiteurs, de l'ARN extrait dégradé, voir Problèmes et Solutions) qui peuvent causer des résultats incorrects et des faux négatifs. L'échantillon ne convient pas, le test est invalide et le test doit être répété à partir de l'extraction d'un nouvel échantillon du patient.

Si le résultat des réactions d'amplification d'un échantillon est **Ct Non interprétable** pour WNV et **Ct ≤ 35** pour le Contrôle Interne, l'ARN du WNV n'a pas été révélé dans l'ARN extrait de l'échantillon, mais il est pas inconcevable que l'ARN du WNV est présent à un titre inférieur de la limite de détection du produit (Voir "Caractéristiques de performance"). Dans ce cas le résultat serait un faux négatif.

Les résultats obtenus avec cet essai doivent être interprétés en tenant compte de toutes les données cliniques et d'autres tests de laboratoire destinés à déterminer le patient.

Remarque: Lorsque dans la réaction d'amplification sur un échantillon il a été détecté la présence d'ARN du WNV, l'amplification du contrôle interne peut entraîner Ct > 35 ou Ct Non déterminé. En fait, la réaction d'amplification à faible efficacité du contrôle interne peut être remplacée par la compétition avec la réaction d'amplification à haute efficacité de l'ARN du WNV. Dans ce cas, l'échantillon est encore approprié et le résultat positif du test est valide.

Courbe Standard

Dans les réactions d'amplification avec le **Q - PCR Standard**, les valeurs de **Ct** sont utilisées pour calculer la **Courbe Standard** (Résultats > Standard Curve) de la session d'amplification telle que décrite dans le tableau suivant:

Courbe Standard detector FAM "WNV"	Intervalle d'acceptabilité	Amplification / Détection
Coefficient de Corrélation (R2)	0,990 ≤ R2 ≤ 1,000	CORRECTE

Si la valeur du **Coefficient de Corrélation (R2)** ne tombe pas dans les limites, cela indique que la présence d'ADN cible a été détectée dans la réaction d'amplification. Dans ce cas, des problèmes sont survenus en phase d'amplification ou de détection (préparation incorrecte du mélange de réaction, distribution incorrecte du mélange de réaction ou du standard, la dégradation de la sonde ou du standard, un réglage incorrect de la position du standard, réglage incorrect du cycle thermique, voir "Problèmes et solutions") qui peuvent engendrer des résultats erronés et faux négatif. L'étape n'est pas valable et doit être recommencée à partir de la phase d'amplification.

WNV ELite MGB® Kit
réactif pour la transcription inverse et
l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS100PLD

Échantillons

Les valeurs de **Ct** pour WNV dans les réactions d'amplification de chaque échantillon et la **Courbe Standard** (Résultats > Standard Curve) de la session d'amplification sont utilisés pour calculer la **Quantité** d'ARN cible (**Quantity**) présente dans les échantillons par rapport aux réactions d'amplification.

Ce produit a été testé avec des échantillons de concentration de 1.000.000 à 316 copies d'ARN par millilitre, correspondant aux génomes équivalents par millilitre (gamme de mesure linéaire du produit, voir "Caractéristiques de performance").

Les résultats (**Quantité**) pour chaque échantillon ont été utilisés pour calculer les génomes équivalents (**gEq**) du WNV présent dans l'échantillon original (**Nc**) selon la formule suivante:

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

Où :

Vc est la quantité de l'échantillon utilisé dans l'extraction **exprimée en mL**;

Ep est l'efficacité de la procédure (extraction, transcription inverse et amplification), **exprimé en décimal**;

Ve est le volume totale résultant de l'extraction **exprimé en µL**;

Va est le volume du produit d'extraction utilisé dans la réaction de transcription inverse et d'amplification **exprimée en µL**;

Quantité est le résultat de la réaction d'amplification de l'échantillon **exprimée en gEq par réaction**.

Lorsqu'on utilise le système d'extraction «**ELITE STAR**» avec des échantillons de sang total et on veut obtenir le résultat **exprimé en gEq / mL**, la formule devient:

Formule simplifiée pour «ELITE STAR» et sang total

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 66,7 \times \text{Quantité}$$

Lorsqu'on utilise le système d'extraction «**ELITE STAR**» avec des échantillons de liquide céphalorachidien ou d'urine et on veut obtenir le résultat **exprimé en gEq / mL**, la formule devient:

Formule simplifiée pour «ELITE STAR» et liquide céphalorachidien ou urine

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 50 \times \text{Quantité}$$

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Utiliser uniquement de l'ARN extrait à partir des échantillons cliniques suivants: sang total prélevé sur EDTA, liquide céphalorachidien (LCR) et urine.

Avec ce produit, ne pas utiliser l'ARN extrait des échantillons héparinés: l'héparine inhibe les réactions de transcription inverse et d'amplification des acides nucléiques et génère des résultats erronés.

Ne pas utiliser avec ce produit, l'ARN contaminé à l'hémoglobine, l'éthanol ou le propane-2-ol: ces substances peuvent inhiber les réactions de transcription inverse et d'amplification des acides nucléiques et générer des résultats erronés.

Quantités d'ARN extrait supérieur à 300 ng par réaction peut inhiber la réaction d'amplification des acides nucléiques.

Ne pas utiliser ce produit avec l'ARN extrait contiennent des quantités élevées d'ADN génomique humain qui peut inhiber la réaction de transcription inverse et l'amplification d'acides nucléiques et de provoquer des résultats erronés.

Aucune donnée n'est disponible concernant la performance du produit avec de l'ARN extrait à partir des échantillons cliniques suivants: le plasma recueilli sur EDTA.

Aucune donnée n'est disponible concernant les éventuels phénomènes d'inhibition par des médicaments antiviral, antibiotiques, chimiothérapeutiques ou immunosuppresseurs.

Les résultats obtenus avec ce produit dépendent de la bonne exécution de l'identification, de la collecte, du transport, de la conservation et de la préparation des échantillons. Afin d'éviter tout résultat erroné, il est essentiel d'apporter tout le soin possible et de suivre attentivement les instructions fournies avec les produits d'extraction des acides nucléiques.

Compte tenu de sa forte sensibilité analytique, l'amplification en temps réel des acides nucléiques utilisée dans ce test est sujette à la contamination par des échantillons cliniques positifs pour WNV, par des contrôles positifs et par des produits de la même réaction d'amplification. Les contaminations engendrent des résultats faux positifs. Le protocole du produit à été élaboré afin de limiter les contaminations; cependant, ces phénomènes ne peuvent être évités qu'avec une bonne pratique des techniques de laboratoire et le respect scrupuleux des consignes fournies dans cette notice.

Pour éviter tout accident pouvant avoir des conséquences graves pour l'utilisateur ou des tierces personnes, ce test doit être réalisé par un personnel compétent et formé à la manipulation d'échantillons biologiques (pouvant transmettre des agents infectieux) et de produits chimiques dangereux.

Pour éviter tout accident pouvant avoir des conséquences graves pour l'utilisateur ou des tierces personnes, le port de vêtements de travail et l'accès à des locaux adaptés à la manipulation d'échantillons biologiques (pouvant transmettre des agents infectieux) et de produits chimiques dangereux sont requis.

Afin d'éviter d'obtenir des résultats erronés, ce produit doit être manipulé par un personnel compétent et formé aux procédures de biologie moléculaire (extraction, amplification et détection d'acides nucléiques).

Afin d'éviter d'obtenir les faux positifs, il est nécessaire de disposer de locaux distincts pour l'extraction / préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification / détection des produits d'amplification.

Afin d'éviter d'obtenir les faux négatifs, il est nécessaire de porter des vêtements de travail et d'utiliser des instruments dédiés à l'extraction / préparation des réactions d'amplification ou à l'amplification / détection des produits d'amplification.

En raison des différences inhérentes aux différentes technologies, il est recommandé d'effectuer des études de corrélation pour estimer ces différences avant de passer à un nouveau produit.

Un résultat négatif de ce produit indique que le ARN de WNV n'a été détecté dans le produit de la transcription inverse à partir d'ARN extrait de l'échantillon, mais il est inconcevable que l'ARN WNV est présent à un titre inférieur à la limite de détection du produit (voir la section Caractéristiques de Performance); dans ce cas le résultat serait un faux négatif.

Un résultat non valide obtenu avec ce produit indique qu'il n'a pas été possible de détecter efficacement l'ARN du Contrôle Interne; dans ce cas, l'analyse de l'échantillon doit être répété à partir de

l'extraction avec des retards possibles pour obtenir le résultat.

Tous les polymorphismes dans les régions du génome du patient, dans lequel les oligonucléotides d'amorce et la sonde du produit hybrident, ils pourraient compromettre la détection et la quantification de l'ARN de WNV.

Comme tous les autres tests de diagnostic, les résultats obtenus avec ce produit doivent être interprétés en tenant compte de toutes les données cliniques et des autres examens de laboratoire du patient.

Comme tous les autres test de diagnostic, ce produit présente un risque résiduel de résultats non valables, de faux positifs et de faux négatifs. Ce risque ne peut être ni supprimé ni diminué. Dans certaines situations, par exemple le diagnostic d'urgence, ce risque peut contribuer à la prise de décisions erronées pouvant avoir de conséquences graves pour le patient.

CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES

Limite de révélation

Le limite de révélation de cet essai a été déterminé à l'aide d'un panneau de dilutions de WNV en sang total prélevé sur EDTA. Le panneau a été préparée avec sang total négatif pour l'ARN de WNV rendu positif avec du matériel de référence calibré et certifié QCMD 2012 West Nile Virus (RNA) EQA Programme (Qnostics Ltd, Royaume-Uni) de WNV WNV lineage 1a (moignon NY99). Le panneau présentait les concentrations de 562 copies / mL à 10 copies / mL. Chaque échantillon du panneau a été utilisé dans 24 réplicats pour réaliser l'ensemble de la procédure d'analyse, l'extraction, la transcription inverse et l'amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A. L'analyse statistique a été réalisée avec la régression Probit. Le limite de révélation a été défini comme la dilution à laquelle la probabilité d'obtenir un résultat positif est de 95%.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant:

Limite de révélation WNV lineage 1a in Sang Total avec «ELITe STAR»			
		Intervalle de confiance de 95%	
		Limite inférieure	Limite supérieure
LoD (95% positivité)	447 copies / mL	310 copies / mL	798 copies / mL

Le limite de révélation de cet essai a été déterminé à l'aide de deux panneaux de dilutions de WNV en Urine recueillie sans conservateurs. Les panneaux sont été préparées avec urine négatif pour l'ARN de WNV rendu positif avec du matériel de référence calibré et certifié QCMD 2012 West Nile Virus (RNA) EQA Programme (Qnostics Ltd, Royaume-Uni) de WNV WNV lineage 1a (moignon NY99) et lineage 2 (moignon Heja). Les panneaux présentait les concentrations de 316 copies / mL à 10 copies / mL. Chaque échantillon des panneaux a été utilisé dans 24 réplicats pour réaliser l'ensemble de la procédure d'analyse, l'extraction, la transcription inverse et l'amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A. L'analyse statistique a été réalisée avec la régression Probit. Le limite de révélation a été défini comme la dilution à laquelle la probabilité d'obtenir un résultat positif est de 95%.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant:

Limite de révélation WNV lineage 1a in Urine avec «ELITe STAR»			
		Intervalle de confiance de 95%	
		Limite inférieure	Limite supérieure
LoD (95% positivité)	318 copies / mL	228 copies / mL	554 copies / mL

Limite de révélation WNV lineage 2 in Urine avec «ELITe STAR»			
		Intervalle de confiance de 95%	
		Limite inférieure	Limite supérieure
LoD (95% positivité)	282 copies / mL	188 copies / mL	545 copies / mL

Le limite de révélation de cet essai a été déterminé à l'aide de d'un panneau de dilutions de WNV en LCR. Le panneau sont été préparées avec LCR négatif pour l'ARN de WNV rendu positif avec du matériel de référence calibré et certifié QCMD 2012 West Nile Virus (RNA) EQA Programme (Qnostics Ltd, Royaume-Uni) de WNV WNV lineage 1a (moignon NY99). Le panneau présentait les concentrations de 316 copies / mL à 10 copies / mL. Chaque échantillon des panneaux a été utilisé dans 24 réplicats pour réaliser l'ensemble de la procédure d'analyse, l'extraction, la transcription inverse et l'amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A. L'analyse statistique a été réalisée avec la régression Probit. Le limite de révélation a été défini comme la dilution à laquelle la probabilité d'obtenir un résultat positif est de 95%.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant:

Limite de révélation WNV lineage 1a in LCR avec «ELITe STAR»			
		Intervalle de confiance de 95%	
		Limite inférieure	Limite supérieure
LoD (95% positivité)	201 copies / mL	145 copies / mL	345 copies / mL

Intervalle linéaire de mesure

L'intervalle linéaire de mesure de cet essai a été déterminé à l'aide trois panneaux de dilutions de WNV in sang total, urine et LCR. Les panneaux ont été préparés avec matrices négatif pour l'ARN de WNV rendus positif avec du matériel de référence calibré et certifié QCMD 2010 West Nile Virus (RNA) EQA Programme (Qnostics Ltd, Royaume-Uni) de WNV lineage 1a (moignon NY99) e lineage 2 (moignon Heja). Les panneaux présentait les concentrations de 1.000.000 copies / mL à 316 copies / mL. Chaque échantillon du panneau a été utilisé dans 9 réplicats pour réaliser la transcription inverse et l'amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A. L'analyse statistique, effectuée par régression linéaire, a montré que l'essai a une réponse linéaire pour tous les points du panneau (carré du coefficient de corrélation linéaire supérieur à 0,99).

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Intervalle linéaire de mesure WNV lineage 1a in sang total avec «ELITe STAR»	
Limite inférieure	Limite supérieure (testé)
447 copies / mL	1.000.000 copies / mL

Intervalle linéaire de mesure WNV lineage 1a in urine avec «ELITe STAR»	
Limite inférieure	Limite supérieure (testé)
318 copies / mL	1.000.000 copies / mL

Intervalle linéaire de mesure WNV lineage 2 in urine avec «ELITe STAR»	
Limite inférieure	Limite supérieure (testé)
316 copies / mL	1.000.000 copies / mL

Intervalle linéaire de mesure WNV lineage 1a in LCR avec «ELITe STAR»	
Limite inférieure	Limite supérieure (testé)
316 copies / mL	1.000.000 copies / mL

Remarque: Dans le cas du sang total prélevé sur EDTA et urine rendus positif par le WNV lineage 1a sur la limite inférieure de l'intervalle linéaire de mesure, il a été imposé à la valeur de la limite de détection.

Sensibilité analytique: Précision et Fidélité

La précision du test entendu comme variabilité des résultats obtenus au cours d'une même étape d'amplification sur 9 réplicats d'un échantillon a été évaluée comme Coefficient de Variation en pourcentage (CV%) des valeurs de Ct et comme Déviation standard (DS) des résultats exprimés en Log copies /mL pour les concentrations de WNV dans l'intervalle linéaire de mesure de 1.000.000 copies / mL à 316 copies / mL..

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Précision: CV% du Ct				
Échantillons	WNV lineage 1a in Sang Total	WNV lineage 1a in Urine	WNV lineage 2 in Urine	WNV lineage 1a in LCR
6,0 Log copies / mL	0,43	1,16	0,81	0,98
5,0 Log copies / mL	0,30	1,25	0,73	0,50
4,0 Log copies / mL	0,68	1,09	1,02	0,71
3,0 Log copies / mL	0,76	2,18	1,23	0,56
2,5 Log copies / mL	0,97	2,82	2,71	1,01

WNV ELite MGB® Kit
réactif pour la transcription inverse et
l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS100PLD

Précision: DS du Log copies / mL				
Échantillons	WNV lineage 1a in Sang Total	WNV lineage 1a in Urine	WNV lineage 2 in Urine	WNV lineage 1a in LCR
6,0 Log copies / mL	0,15	0,09	0,06	0,07
5,0 Log copies / mL	0,10	0,11	0,06	0,04
4,0 Log copies / mL	0,23	0,11	0,10	0,07
3,0 Log copies / mL	0,26	0,24	0,13	0,06
2,5 Log copies / mL	0,33	0,32	0,31	0,11

La fidélité du test, entendue comme concordance entre la valeur moyenne mesurée, obtenue au cours d'une même étape d'amplification sur 9 réplifications d'un échantillon, et sa valeur théorique, a été évaluée comme l'écart, par rapport à la valeur théorique, de la valeur moyenne mesurée, exprimée en Log copies / mL pour les concentrations de WNV dans l'intervalle linéaire de mesure de 1.000.000 copies / mL à 316 copies / mL. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Fidélité: écart de la quantification (Log copies / mL) par rapport à la valeur théorique				
Échantillons	WNV lineage 1a in Sang Total	WNV lineage 1a in Urine	WNV lineage 2 in Urine	WNV lineage 1a in LCR
6,0 Log copies / mL	0,30	0,43	0,08	0,50
5,0 Log copies / mL	0,47	0,41	0,04	0,42
4,0 Log copies / mL	0,28	0,36	0,02	0,37
3,0 Log copies / mL	0,48	0,32	0,06	0,49
2,5 Log copies / mL	0,29	0,08	0,03	0,58

La précision et la fidélité ont été déterminées en utilisant les données obtenues dans les essais pour l'étude de l'intervalle de mesure linéaire

Reproductibilité avec un panel pour proficiency tests

La reproductibilité des résultats du test comparée aux résultats obtenus par d'autres méthodes dans d'autres laboratoires été vérifiée en testant le panel pour proficiency test QCMD 2013 West Nile Virus (RNA) EQA Programm (Qnostics Ltd, Royaume-Uni). Chaque échantillon du panel a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction, de transcription inverse et d'amplification, avec les produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Panneau pour Proficiency Test avec «ELite STAR»				
Échantillons	Contenu	Status de l'échantillon	Positifs / Réplifications	Moyenne des résultats Log ₁₀ copies / mL
WNV13-01	WNV NY99, lineage 1a	fréquemment détecté	2 / 2	8,28
WNV13-02	WNV NY99, lineage 1a	fréquemment détecté	2 / 2	7,17
WNV13-03	WNV NY99, lineage 1a	fréquemment détecté	2 / 2	5,92
WNV13-04	WNV NY99, lineage 1a	fréquemment détecté	2 / 2	5,99
WNV13-05	WNV NY99, lineage 1a	détecté	2 / 2	4,97
WNV13-06	WNV NY99, lineage 1a	détecté	2 / 2	3,95
WNV13-07	WNV Heja, lineage 2	fréquemment détecté	2 / 2	8,12
WNV13-08	WNV Heja, lineage 2	fréquemment détecté	2 / 2	7,10
WNV13-09	WNV Ug37, lineage 2	fréquemment détecté	2 / 2	7,60
WNV13-10	flavivirus not-WNV	Négatif	0 / 2	-
WNV13-11	flavivirus not-WNV	Négatif	0 / 2	-
WNV13-12	VTM Négatif	Négatif e	0 / 2	-

Tous les échantillons ont été correctement détectés. L'échantillon WNV13-10, contenant Japanese Encephalitis virus, Dengue 1 virus, Dengue 2 virus, Dengue 4 virus et l'échantillon WNV13-11, contenant Yellow Fever virus 17D, Dengue 3 virus, Dengue 4 virus, Tick Borne Encephalitis virus, ont été résultats négatifs.

WNV ELite MGB® Kit
réactif pour la transcription inverse et
l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS100PLD

Efficacité de détection et quantification sur différents génotypes.

L'efficacité de la détection et de la quantification sur différents génotypes a été évaluée par comparaison des séquences avec des bases de données nucléotidiques.

L'examen des régions choisies pour l'hybridation des oligonucléotides d'amorçage et de la sonde fluorescente sur l'alignement des séquences disponibles dans la base de données du gene NS5 de WNV, Lineage 1a et Lineage 2, a démontré leur conservation et l'absence de mutations significatives.

L'efficacité de la détection et de la quantification sur différents génotypes a été évaluée en utilisant un plasmide contenant la région amplifiée de WNV lineage 1a du moignon méditerranéen Ita09.

Un plasmide contenant la région amplifiée de WNV lineage 1a du moignon méditerranéen Ita09 ENA accession number GU011992) a été quantifiées par une lecture de spectrophotomètre et dilués à les concentrations de 100.000, 10.000, 1.000, 100 copies par réaction. Chaque échantillon a été testé en triple exemplaire avec les produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Efficacité de détection et de quantification avec WNV lineage 1a moignon Ita09		
Concentration théorique Log copies / réaction	Positifs / Réplifications	Moyenne des résultats Log copies / réaction
5,00	3 / 3	5,11
4,00	3 / 3	3,98
3,00	3 / 3	2,94
2,00	3 / 3	2,06

L'efficacité de la détection et de la quantification sur différents génotypes a été évaluée en utilisant le matériau de référence certifié positif pour WNV lineage 1a et lineage 2 de l' Institut Superior de la Santé (ISS, Italie). Chaque échantillon du panel a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction, de transcription inverse et d'amplification, avec les produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Efficacité de détection et de quantification avec matériau certifié ISS			
Échantillons	Quantité théorique Log copies / mL	Positivité	Quantité, mesuré Log copies / mL
WNV ARN ISS0213 (lineage 1a)	3,176	SI	3,371
WNV ARN ISS0411 (lineage 2)	3,000 – 3,698	SI	3,764

Marqueurs potentiellement interférents

L'absence de réactivité croisée avec d'autres marqueurs potentiellement interférents a été évaluée en comparant des séquences avec des bases de données nucléotidiques.

L'examen de l'alignement des séquences des oligonucléotides d'amorçage et de la sonde fluorescente avec les séquences disponibles dans la base de données d'organismes différents de WNV, Y compris d'autres flavivirus du complexe encéphalite japonaise antigénique, y compris le virus Usutu atteste de leur spécificité et de l'absence d'identité nucléidique.

L'absence de réactivité croisée avec d'autres marqueurs potentiellement interférents a été vérifiée en utilisant le panneau pour proficiency test QCMD 2013 West Nile Virus (RNA) EQA Programme.

Les résultats obtenus avec le panneau sont répertoriés dans la "Reproductibilité avec panneau de proficiency test". En particulier, l'échantillon WNV13-10, contenant Japanese Encephalitis virus, Dengue 1 virus, Dengue 2 virus, Dengue 4 virus, et l'échantillon WNV13-11, contenant Yellow Fever virus 17D, Dengue 3 virus, Dengue 4 virus, Tick Borne Encephalitis virus, étaient négatifs.

L'absence de réactivité croisée avec d'autres marqueurs potentiellement interférents a été vérifiée en utilisant comme matériel de référence à partir du proficiency test (Qnostics Ltd, Royaume-Uni) pour CMV (QCMD 2012 Human Cytomegalovirus (DNA) EQA Programme), pour EBV (QCMD 2008 Epstein-Barr virus (DNA) EQA Programme), pour HSV1 et HSV2 (QCMD 2008 Herpes Simplex Virus (DNA) EQA Programme) et pour VZV (QCMD 2012 Varicella Zoster Virus (DNA) EQA Programme).

Chaque échantillon du panel a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction de

WNV ELiTe MGB® Kit
réactif pour la transcription inverse et
l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS100PLD

transcription inverse et d'amplification, avec les produits ElitechGroup S.p.A. Tous les échantillons ont été confirmés négatifs.

Substances interférentes.

L'effet éventuel sur le test de substances interférentes a été évalué via l'analyse du panel "AcroMetrix® Inhibition Panel" (Life Technologies Inc) avec des échantillons contenant d'éventuelles substances interférentes endogènes dérivant d'hémolyse, d'ictère et de lipémie et d'exogènes, les anticoagulants EDTA et héparine.

Les échantillons du panel ont été rendus positifs en utilisant du matériel de référence QCMD 2012 West Nile Virus (RNA) EQA Programme (Qnostics Ltd, Royaume-Uni) à une concentration de 3xLoD. Chaque échantillon du panel a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction de transcription inverse et d'amplification, avec les produits ElitechGroup S.p.A.

Tous les échantillons ont été positifs, mais l'échantillon avec de l'héparine est inhibée (Ct du WNV et du contrôle interne sensiblement retardé).

Absence de contamination croisée

L'absence de contamination croisée a été vérifiée en analysant les résultats de trois étapes au cours desquelles des échantillons positifs pour l'ARN de WNV ont été alternés à des échantillons négatifs pour l'ARN de WNV. Aucun échantillon négatif pour l'ARN du WNV a été positive.

Un échantillon de sang total négatif pour l'ARN de WNV a été utilisé comme échantillon positif après ajout du matériel de référence certifié QCMD 2012 West Nile Virus (RNA) EQA Programme (Qnostics Ltd, Royaume-uni) à un titre de 10.000 copies / mL, comme échantillon positif.

Trois séries de 6 échantillons positifs alternés à 6 échantillons négatifs ont été utilisées pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction avec l'instrument ELiTe STAR, de transcription inverse et d'amplification, avec les produits ElitechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang Total positif pour l'ARN de WNV	18	18	0
Sang Total négatif pour l'ARN de WNV	18	0	18

Pourcentage global d'erreur du système

Le pourcentage global d'erreur du système qui aboutit à des résultats faux négatifs a été vérifié via l'analyse d'un panel d'échantillons rendus positifs pour l'ARN de WNV à faible titre. Aucun échantillon positivée pour l'ARN du WNV a été négative.

Un échantillon de sang total négatif pour l'ARN de WNV, a été rendu positif en utilisant le matériel de référence QCMD 2012 West Nile Virus (RNA) EQA Programme (Qnostics Ltd, Royaume-Uni) à un titre de 1.500 copies / mL. L'échantillon a été utilisé dans 60 réplifications pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction, de transcription inverse et d'amplification, avec les produits ElitechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang Total rendu positif pour l'ARN de WNV	60	60	0

Reproductibilité inter-lot

La reproductibilité inter-lot du test a été vérifiée en analysant la concordance et la variabilité des résultats obtenus avec le matériel de référence et trois lots de produits différents. Le test a présenté un CV% des valeurs de Ct inférieur à 4%.

Un échantillon de sang total prélevé sur EDTA négatif pour l'ARN de WNV et le matériel de référence QCMD 2012 West Nile Virus (RNA) EQA Programme (Qnostics Ltd, Royaume-Uni) ont été utilisés pour préparer le panel suivant de 12 échantillons:

WNV ELiTe MGB® Kit
réactif pour la transcription inverse et
l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS100PLD

- 3 échantillons rendus positifs à 1350 copies / mL (3x LoD);
- 3 échantillons rendus positifs à 450 copies / mL (1x LoD);
- 3 échantillons rendus positifs à 225 copies / mL (0,5x LoD);
- 3 échantillons négatifs pour WNV.

Le panel a été utilisé par 3 opérateurs différents en combinaison pour le système d'extraction «ELITE STAR». Les échantillons ont été extraits à une transcription inverse et amplifié, en utilisant 3 lots de produits ELiTechGroup S.p.A, en jours différents et sur automates d'amplification différents. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	Positifs / réplifications	Moyenne Ct WNV	DS	CV%	Moyenne Ct CI	DS	CV%
3x LoD	9 / 9	35,25	0,81	2,29	31,28	0,87	2,78
1x LoD	9 / 9	36,22	1,43	3,95	31,13	0,55	1,78
0,5x LoD	9 / 7	37,79	1,15	3,04	30,91	0,27	0,88
Négatifs	0 / 9	-	-	-	30,88	0,39	1,27

Sensibilité diagnostique: échantillons positifs

La sensibilité diagnostique du test, entendue comme confirmation d'échantillons cliniques positifs, a été évaluée à travers l'analyse des certaines échantillons cliniques de sang total, LCR et d'urine rendus positifs pour l'ARN du WNV, vue la difficulté de trouver un nombre important d'échantillons cliniques positifs.

Le test avec sang total prélevé sur EDTA a été effectuée sur 30 échantillons provenant de différents sujets. Les échantillons ont été rendus positifs dans une première série avec l'ARN du WNV lineage 1a et dans une deuxième série avec celle de la lineage 2 du QCMD 2010 West Nile Virus (RNA) EQA Programme (Qnostics Ltd, Royame-Uni) à un titre de 500 copies / mL. Pour tester le WNV lineage 2 ont ensuite été ajoutés 10 autres échantillons de sang total prélevé sur EDTA rendus positifs à un titre de 500 copies / mL. Chaque échantillon du panel a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction de transcription inverse et d'amplification, avec les produits ElitechGroup S.p.A.

Les résultats finaux sont récapitulés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang Total rendu positif pour l'ARN de WNV Lineage 1a	30	30	0
Sang Total rendu positif pour l'ARN de WNV Lineage 2	39	34	5
Total	69	64	5

Cinq échantillons étaient négatifs avec les produits ELiTechGroup S.p.A. probablement à cause de la concentration proche de la valeur limite de détection (447 copies / ml).

Un échantillon est résulté non valide en raison d'un inhibiteur non identifié et ne sont pas inclus dans le calcul de la sensibilité diagnostique.

La sensibilité diagnostique de l'essai dans ce test avec du sang total était égal à 92,7%.

Le test avec urine prélevée sans conservateurs a été effectuée sur 30 échantillons provenant de différents sujets. Les échantillons ont été rendus positifs dans une première série avec l'ARN du WNV lineage 1a et dans une deuxième série avec celle de la lineage 2 du QCMD 2010 West Nile Virus (RNA) EQA Programme (Qnostics Ltd, Royame-Uni) à un titre de 500 copies / mL. Pour tester le WNV lineage 2 ont ensuite été ajoutés 10 autres échantillons de sang total prélevé sur EDTA rendus positifs à un titre de 500 copies / mL. Chaque échantillon du panel a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction de transcription inverse et d'amplification, avec les produits ElitechGroup S.p.A.

Les résultats finaux sont récapitulés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Urine rendu positif pour l'ARN de WNV Lineage 1a	30	29	1
Urine rendu positif pour l'ARN de WNV Lineage 2	30	30	0
Total	60	59	1

Un échantillon était négatif avec des produits ELiTechGroup S.p.A. probablement à cause de la

WNV ELiTe MGB® Kit
réactif pour la transcription inverse et
l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS100PLD

concentration à proximité de LoD (318 copies / mL).

La sensibilité diagnostique de l'essai dans ce test d'urine était égale à 98,3%.

Le test avec LCR a été effectuée sur 20 échantillons provenant de différents sujets. Les échantillons ont été rendus positifs dans une première série avec l'ARN du WNV lineage 1a et dans une deuxième série avec celle de la lineage 2 du QCMD 2010 West Nile Virus (RNA) EQA Programme (Qnostics Ltd, Royaume-Uni) à un titre de 500 copies / mL. Pour tester le WNV lineage 2 ont ensuite été ajoutés 10 autres échantillons de sang total prélevé sur EDTA rendus positifs à un titre de 500 copies / mL. Chaque échantillon du panel a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction de transcription inverse et d'amplification, avec les produits ElitechGroup S.p.A.

Les résultats finaux sont récapitulés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
LCR rendu positif pour l'ARN de WNV Lineage 1a	20	20	0
LCR rendu positif pour l'ARN de WNV Lineage 2	20	20	0
Total	40	40	0

La sensibilité diagnostique de l'essai dans ce test de LCR était égale à 100%.

Spécificité diagnostique: confirmation d'échantillons négatifs

La spécificité diagnostique du test, entendue comme confirmation d'échantillons cliniques négatifs, a été évaluée en utilisant un panel d'échantillons cliniques de sang total, LCR et urine négatifs pour l'ARN de WNV. La spécificité diagnostique totale a été de 100%.

Le test avec sang total prélevé sur EDTA a été effectué sur 30 échantillons provenant de sujets différents. Les échantillons ont été testés négatifs pour l'ARN de WNV avec un produit "home-made" d'amplification en temps réel. Chaque échantillon du panel a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction, de transcription inverse et d'amplification, avec les produits ElitechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang Total négatif pour l'ARN de WNV	24	0	24

Six échantillons ont été "invalide" en raison d'un inhibiteur identifié et ne sont pas incluses dans le calcul de la spécificité du diagnostic.

La spécificité du test de diagnostic dans cet essai avec du sang total a été trouvée être de 100%.

Le test avec urine prélevé sans conservateurs a été effectué sur 30 échantillons provenant de sujets différents. Les échantillons ont été testés négatifs pour l'ARN de WNV avec un produit "home-made" d'amplification en temps réel. Chaque échantillon du panel a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction, de transcription inverse et d'amplification, avec les produits ElitechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Urine négatif pour l'ARN de WNV	27	0	27

Trois échantillons se sont révélés "invalide" en raison d'un inhibiteur non identifié et ne sont pas inclus dans le calcul de la spécificité du diagnostic.

La spécificité du test de diagnostic dans cet essai avec du urine a été trouvée être de 100%.

Le test avec LCR a été effectué sur 20 échantillons provenant de sujets différents. Les échantillons ont été testés négatifs pour l'ARN de WNV avec un produit "home-made" d'amplification en temps réel. Chaque échantillon du panel a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction, de transcription inverse et d'amplification, avec les produits ElitechGroup S.p.A.

WNV ELiTe MGB® Kit
réactif pour la transcription inverse et
l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS100PLD

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
LCR négatif pour l'ARN de WNV	20	0	20

La spécificité du test de diagnostic dans cet essai avec du LCR a été trouvée être de 100%.

Remarque: Les données et les résultats complets des tests effectués pour l'évaluation des caractéristiques des performances du produit ont été enregistrés dans la Section 7 du Fascicule Technique de Produit "WNV ELiTe MGB Kit", FTP RTS100PLD.

BIBLIOGRAPHIE

- F. J. May et al. (2011) *J. Virol.* March vol. 85: 2964-2974
 E. M. Botha (2008) *Emerging Infectious Disease* vol. 14: 222-230
 T. Bakonyi (2006) *Emerging Infectious Disease* vol. 12: 618-623
 J. H. Scherret (2001) *Emerging Infectious Disease* vol. 7: 697-705
 E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

PROBLÈMES ET SOLUTIONS

L'ADN cible n'est pas détecté dans les réactions des Q - PCR Standard ou le Coefficient de corrélation de la Courbe standard n'est pas valide	
Causes éventuelles	Solutions
Erreur dans la préparation du mélange de réaction	Contrôler les volumes des réactifs délivrés au cours de la préparation du mélange réactionnel complet.
Erreur de distribution dans la microplaque.	Distribuer soigneusement les réactifs dans la microplaque en suivant la grille de travail. Vérifier le volume du mélange de réaction distribué. Vérifier le volume des standards distribué.
Dégradation de la sonde.	Utiliser un nouveau tube de mélange de réaction.
Dégradation de la PCR MasterMix	Utiliser un nouveau tube de PCR MasterMix
Dégradation du standard.	Utiliser un nouveau tube de standard.
Erreur de paramétrage de l'instrument.	Vérifier le paramétrage de la position des standards. Vérifier le paramétrage du cycle de température.

L'ADN cible est détecté dans la réaction du Contrôle négatif	
Causes éventuelles	Solutions
Erreur de distribution dans la microplaque.	Éviter de répandre le contenu des tubes d'échantillons. Changer toujours d'embout entre deux échantillons Distribuer soigneusement les échantillons, le contrôle négatif et les standards dans la microplaque en suivant la grille de travail.
Erreur de paramétrage de l'instrument.	Vérifier le paramétrage de la position des échantillons, du contrôle négatif et des standards.
Microplaque mal scellée.	Sceller méticuleusement la microplaque.
Contamination de l'eau bi-distillée stérile.	Utiliser un nouveau tube d'eau stérile.
Contamination du mélange de réaction.	Utiliser un nouveau tube de mélange de réaction.
Contamination de la zone d'extraction / préparation des réactions d'amplification.	Nettoyer les surfaces et les instruments à l'aide d'un détergent aqueux. Laver les blouses et remplacer les tubes et les embouts utilisés.

ARN cible non détectée dans les échantillons des réactions	
Causes éventuelles	Solutions
Erreur dans la préparation du mélange de réaction complet.	Contrôler les volumes des réactifs délivrés au cours de la préparation du mélange de réaction complet. Assurez-vous que vous avez ajouté le RT EnzymeMix pour compléter le mélange de réaction.
Dégradation de la RT EnzymeMix.	Utiliser un nouveau tube de RT EnzymeMix.
Problèmes de stockage des réactifs.	Vérifier que le RT EnzymeMix ne demeure pas exposé à des températures supérieures à -20 ° C pendant plus de 10 minutes. Vérifiez que le mélange de réaction complet n'a pas été exposé à des températures ambiantes pendant plus de 30 minutes.
Problèmes lors de la phase d'extraction	Vérifiez la concentration et la qualité d'ARN extrait.

Une Présence de fluorescence de base irrégulière ou élevée dans les réactions	
Causes éventuelles	Solutions
Erreur de distribution de l'échantillon.	Mélanger soigneusement, en pipetant trois fois, les échantillons, le contrôle négatif et les standards dans le mélange de réaction. Éviter les bulles.
Erreur de paramétrage de la fluorescence de base	Paramétrer l'intervalle de calcul de la "Baseline" entre les cycles où la fluorescence de base est déjà stabilisée (contrôler les enregistrements "Results", "Component") et où la fluorescence du signal n'a pas encore commencé à croître, par exemple du cycle 6 au cycle 15. Paramétrer le calcul automatique de la fluorescence de base en sélectionnant l'option "Auto Baseline".

LÉGENDE DES SYMBOLES

-  Référence du catalogue.
-  Seuil supérieur de température.
-  Numéro de lot.
-  Date de péremption (dernier jour du mois).
-  Diagnostic *In vitro*.
-  Conforme aux exigences essentielles de la Directive européenne 98/79/CE concernant le diagnostic *in vitro*.
-  Contenu suffisant pour "x" tests.
-  Attention, consulter le mode d'emploi.
-  Contenus.
-  Conserver à l'abri de la lumière solaire.
-  Fabriqué par.

WNV ELITe MGB® Kit**réactif pour la transcription inverse et
l'amplification en temps réel de l'ADN****REF** RTS100PLD**NOTE POUR L'ACQUEREUR: LICENCE LIMITEE**

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

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

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

"ELITe MGB®" et le logo "ELITe MGB®" sont enregistrés en tant que marques dans l'Union Européenne.

