



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 08/06/2022

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«CMV ELITe MGB[®] Kit» Ref. RTK015PLD

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), Plasma and Whole Blood*
- *Update of PERFORMANCE CHARACTERISTICS:*
 - *Change in Limit of Detection (LoD)*
 - *Change in Linear measuring range*
 - *Addition of Repeatability*
 - *Addition of Reproducibility*
- *Introduction of IC cut-off value*

Composition and use 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



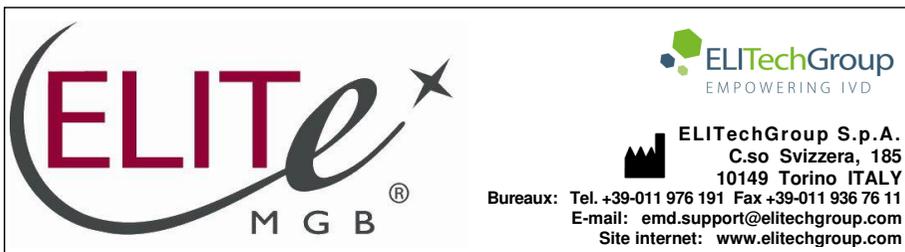
LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT



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



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



CMV ELITE MGB® Kit

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

REF RTK015PLD



TABLE DES MATIÈRES

APPLICATION	Page 2
PRINCIPE DU TEST	Page 2
DESCRIPTION DU PRODUIT	Page 3
MATÉRIEL FOURNI	Page 3
MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI	Page 3
AUTRES PRODUITS REQUIS	Page 3
AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS	Page 5
ELITE INGENIUS®	Page 6
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	Page 6
ELITE INGENIUS® PROCÉDURE	Page 9
ELITE BEGENIUS®	Page 17
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	Page 17
ELITE BEGENIUS® PROCÉDURE	Page 18
CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES ELITE INGENIUS® ET ELITE BEGENIUS®	Page 23
ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ABI 7300 Real-Time System	Page 38
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	Page 38
PROCÉDURE	Page 41
CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES	Page 49
Roche cobas z 480 analyzer	Page 63
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	Page 63
PROCÉDURE	Page 64
CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES	Page 70
BIBLIOGRAPHIE	Page 74
LIMITES DE LA PROCÉDURE	Page 75
PROBLÈMES ET SOLUTIONS	Page 76
LÉGENDE DES SYMBOLES	Page 78
NOTE POUR L'ACQUEREUR: LICENCE LIMITEE	Page 79

CMV ELITE MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

APPLICATION

Le produit «CMV ELITE MGB® Kit» est un test qualitatif et quantitatif d'amplification des acides nucléiques pour la **détection et la quantification de l'ADN du Cytomégalo virus humain (CMV)** dans des échantillons d'ADN extrait de sang total prélevé dans un tube EDTA, de plasma prélevé dans un tube EDTA, de liquide céphalorachidien, d'urines, écouvillons buccaux, liquide amniotique et lavage bronchoalvéolaire (BAL) / aspiration bronchique (BA).

Le produit est destiné à être utilisé, conjointement au tableau clinique du patient et aux résultats d'autres examens de laboratoire, dans le diagnostic et le suivi de l'infection au CMV.

PRINCIPE DU TEST

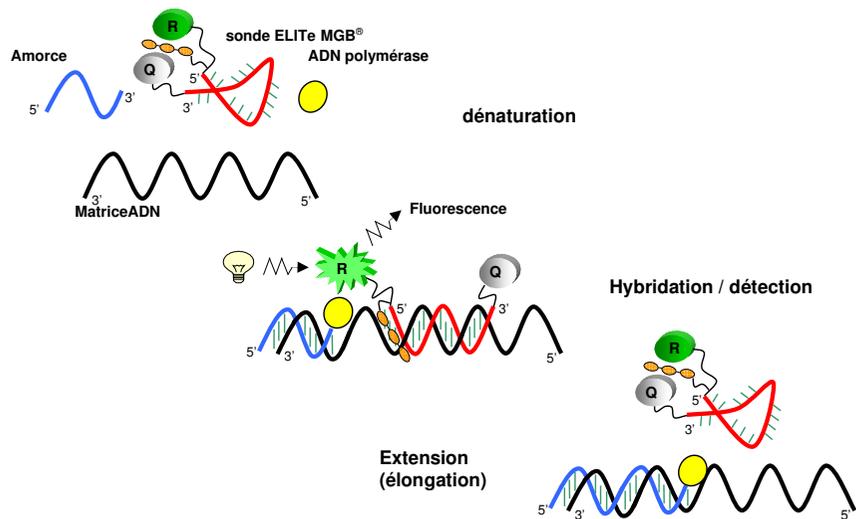
Le test est basé sur une réaction d'amplification en temps réel sur microplaque avec un thermostat programmable doté d'un système optique de détection de fluorescence.

Dans chaque puits deux réactions d'amplification sont réalisées à partir de l'ADN extrait des échantillons à étudier : une réaction spécifique à une région de l'**exon 4 du gène MIEA de CMV** (major immediate early antigen, HCMVUL123) et une spécifique à la région du gène humain codant pour la **β-globine** (contrôle interne d'inhibition). Toutes les sondes sont fabriquées avec la technologie ELITE MGB®. La sonde spécifique au CMV est marquée avec le fluorophore FAM et est activée lorsqu'elle s'hybride avec le produit spécifique de la réaction d'amplification du CMV. La sonde spécifique au Contrôle interne est marquée avec le fluorophore AP525 (un analogue à VIC) et elle est activée lorsqu'elle s'hybride avec le produit de la réaction d'amplification du 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 la quantité d'ADN de CMV contenue dans l'échantillon initial.

Au terme de l'amplification il est possible d'analyser la courbe de fusion afin de déterminer la température de fusion. La température de fusion permet de confirmer la présence de la bonne cible, ou d'identifier des mutations.

Le test a été validé sur les systèmes présentés sur ce manuel d'instruction.

La figure ci-dessous montre 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 et elle peut donc être utilisée pour l'analyse de la courbe de fusion.



CMV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

DESCRIPTION DU PRODUIT

Le kit «**CMV ELITe MGB® Kit**» contient le mélange "CMV Q - PCR Mix" pour l'amplification en temps réel. Ce mélange est complet, **prêt à l'emploi**, stabilisé dans une solution stabilisante et **pré-aliquotée en quatre tubes**. Chaque tube contient **540 µL** de solution, une quantité suffisante pour **24 tests** (en traitant au moins 2 échantillons par session d'analyse) en association avec le système «**ELITe InGenius®**» et «**ELITe BeGenius®**» ou **25 tests** en association à d'autres systèmes.

Les oligonucléotides d'amorçage et la sonde CMV (stabilisée par le groupe MGB®, marquée avec le fluorophore FAM et inactivée par le quencher non fluorescent) sont spécifiques à la **région de l'exon 4 du gène MIEA de CMV** (major immediate early antigen, HCMVUL123).

Les oligonucléotides d'amorçage et la sonde pour le contrôle interne (stabilisée par le groupe MGB®, marquée avec le fluorophore AP525, équivalent au VIC, et inactivée par un quencher non fluorescent) sont spécifiques de la **région promoteur et 5' UTR du gène humain codant la β-globine**.

Le mélange de réaction fournit le tampon, le chlorure de magnésium, les nucléotides triphosphates, le fluorophore AP593 (utilisé en remplacement du ROX ou du Cy5) comme référence passive pour la normalisation de la fluorescence, l'enzyme Uracil-N-glycosidase (UNG) pour l'inactivation des contaminations dérivant de produit d'amplification et l'enzyme ADN polymérase exo- à activation thermique.

Le produit permet d'effectuer **96 tests associé aux systèmes «ELITe InGenius®»** et «**ELITe BeGenius®**», en incluant les standards et les contrôles

Le produit permet d'effectuer **100 tests associé aux autres systèmes**, en incluant les standards et les contrôles.

MATÉRIEL FOURNI

Composant	Description	Quantité	Classification et Étiquetage
CMV Q - PCR Mix	mélange complet de réaction	4 x 540 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 (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Eau ultra pure pour la biologie.
- 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.
- Thermostat programmable couplé à un système optique de détection de la fluorescence, cobas z 480 analyzer calibré conformément aux recommandations du fabricant.

AUTRES PRODUITS REQUIS

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

Pour l'extraction manuelle d'ADN des échantillons à analyser, il est conseillé d'utiliser des produits génériques «**EXTRAblood**» (ELITechGroup S.p.A., code EXTB01), kit d'extraction d'ADN d'échantillons cellulaires et non-cellulaires.

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

Pour l'extraction automatique de l'ADN des échantillons à analyser, avec l'automate «**ELITe InGenius**» (ELITechGroup S.p.A., code INT030), il est conseillé d'utiliser les produits génériques suivants: cartouches d'extraction «**ELITe InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., code INT032SP200) or «**ELITe InGenius® SP 1000**» (ELITechGroup S.p.A., code INT033SP1000), et consommables pour extraction et amplification à partir d'échantillons biologiques «**ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A., code SCH mINT032CS), «**ELITe InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A., code F2102-000), «**ELITe InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A., code INT035PCR) et «**300 µL Filter Tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, USA, code TF-350-L-R-S).

Pour l'extraction automatique de l'ADN des échantillons à analyser, pour l'amplification en temps réel, et pour l'interprétation des résultats avec l'automate «**ELITe InGenius**» et des protocoles spécifiques (ELITechGroup S.p.A.):

- pour les Calibreurs «**CMV ELITe STD**» or «**CMV ELITe STD_1000_100**»,
- pour le Contrôle Positif d'amplification «**CMV ELITe PC**» or «**CMV ELITe_PC_1000_100**»,
- pour le Contrôle Négatif d'amplification «**CMV ELITe NC**» or «**CMV ELITe_NC_1000_100**»,
- pour les échantillons à analyser «**CMV ELITe_WB_200_100**», «**CMV ELITe_PL_200_100**», «**CMV ELITe_PL_1000_100**», «**CMV ELITe_CSF_200_100**», «**CMV ELITe_U_200_100**», «**CMV ELITe_BS_200_100**», «**CMV ELITe_AF_200_100**» et «**CMV ELITe_BAL_200_100**».

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

Pour l'extraction automatique de l'ADN, l'amplification et l'interprétation de l'analyse d'un échantillon, l'instrument «**ELITe BeGenius**» (ELITechGroup S.p.A., réf. INT040) et les protocoles d'analyse spécifiques suivants (ELITechGroup S.p.A.) sont requis :

- pour les calibreurs «**CMV ELITe_Be STD**»,
- pour le contrôle positif d'amplification «**CMV ELITe_Be PC**»,
- pour le contrôle négatif d'amplification «**CMV ELITe_Be NC**»,
- pour l'analyse des échantillons «**CMV ELITe_Be_WB_200_100**» et «**CMV ELITe_Be_PL_200_100**».

Pour l'extraction automatique de l'ADN des échantillons à analyser, il est conseillé d'utiliser le produit générique «**ELITe STAR 200 Extraction Kit**» (ELITechGroup S.p.A., code INT011EX), kit d'extraction des acides nucléiques à partir d'échantillons biologiques, avec l'instrument «**ELITe STAR**» (ELITechGroup S.p.A., code INT010).

Pour l'extraction automatique de l'ADN des échantillons à analyser, il est conseillé d'utiliser le produit générique «**ELITe GALAXY 300 Extraction Kit**» (ELITechGroup S.p.A., code INT021EX), kit d'extraction des acides nucléiques à partir d'échantillons biologiques, avec l'instrument «**ELITe GALAXY**» (ELITechGroup S.p.A., code INT020). L'automate «**ELITe GALAXY**» peut également effectuer la mise au point de la PCR.

Pour l'extraction automatique d'ADN des échantillons à analyser, il est conseillé d'utiliser des produits génériques **NucliSENS® easyMAG® Reagents** (bioMérieux SA, réf. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135), kits d'extraction des acides nucléiques d'échantillons biologiques, avec l'automate d'extraction «**NucliSENS® easyMAG®**» (bioMérieux SA, réf. 200111).

Pour l'extraction automatique de l'ADN des échantillons à analyser, il est également conseillé d'utiliser le produit «**QIASymphony® DNA Mini Kit**» (QIAGEN GmbH, code 931236), kit d'extraction des acides nucléiques d'échantillons biologiques, à l'aide de l'instrument «**QIASymphony® SP/AS**» (codes 9001297, 9001301) et des produits génériques correspondants.

Pour l'extraction automatique de l'ADN des échantillons à analyser, il est également conseillé d'utiliser le produit «**Magna Pure 24 Total NA Isolation Kit**» (Roche, code 07658036001), kit d'extraction des acides nucléiques d'échantillons biologiques, à l'aide de l'instrument «**Magna Pure 24 System**»

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

(Roche, code 07290519001).

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.

Avec un instrument cobas z 480 analyzer, il est conseillé d'utiliser le produit générique «**AD-plate 0.3ml**» (Roche, code 05232724001), contenant des microplaques de 0,3 mL et des films adhésifs, pour l'amplification en temps réel.

Si cela est nécessaire la détection du CMV ADN pour l'analyse qualitative, il est conseillé d'utiliser le produit «**CMV - ELITe Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A. code CTR015PLD), ou le produit «**CMV - ELITe Positive Control RF**» (ELITechGroup S.p.A., code CTR015PLD-R), contrôle positif de ADN plasmidique.

Si cela est nécessaire la détection et l'amplification du CMV ADN pour l'analyse qualitative, il est conseillé d'utiliser le produit «**CMV ELITe Standard**» (ELITechGroup S.p.A., code STD015PLD). Ce kit est composé de quatre dilutions d'ADN plasmidique de concentration connue et il est utilisé pour obtenir la courbe standard.

Comme contrôle positif d'extraction d'acides nucléiques d'échantillons non-cellulaires et contrôle d'inhibition, il est nécessaire d'utiliser des produits génériques «**CPE - Internal Control**» (ELITechGroup S.p.A., code CTCRPE), une solution stabilisée contenant de l'ADN à deux plasmides et de l'ARN génomique du bactériophage MS2.

Un facteur de conversion permet d'exprimer les résultats quantitatifs dans les Unités Internationales du CMV du «st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques» (NIBSC, UK, code 09/162).

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, l'amplification et la détection d'acides nucléiques doivent être exécutées par un personnel compétent et ayant reçu une formation appropriée afin

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

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.

Lorsque la session d'amplification est configurée manuellement, 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.

Lorsque la session d'amplification est configurée manuellement, 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 et 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 et 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.

Avertissements et précautions concernant les composants

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

Le **CMV Q - PCR Mix** ne doit pas être congelé et décongelé plus de **cinq fois**. Tout cycle de congélation / décongélation supplémentaire risque d'entraîner une perte des performances du produit.

Le **CMV Q - PCR Mix** peut être utilisé pour 5 sessions de travail indépendantes de 3 heures chacune ou peut être conservé à bord dans le bloc réfrigéré jusqu'à 3 sessions de travail consécutives de 3 heures chacune.

ELITe InGenius®

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES**Échantillons**

Ce produit doit être utilisé avec les échantillons cliniques suivants:

Sang total prélevé dans un tube EDTA

Les échantillons de sang total destinés à l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés dans un tube EDTA et suivant les indications du laboratoire. Ils doivent être transportés à +2°C / +8°C et conservés à +2°C / +8°C pendant un maximum de trois jours. 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. Lors de l'utilisation d'échantillons congelés, décongeler les échantillons immédiatement avant l'extraction pour éviter une éventuelle dégradation des acides nucléiques.

Lorsque l'on utilise le tube primaire, le volume de l'échantillon varie en fonction du type de tube chargé. Pour plus de détails sur la configuration et l'exécution de la procédure d'extraction, se reporter aux instructions d'utilisation du kit d'extraction.

Plasma prélevé dans un tube EDTA

Les échantillons de plasma destinés à l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés dans un tube EDTA et suivant les indications du laboratoire. Ils doivent être transportés à +2°C / +8°C et conservés à +2°C / +8°C pendant un maximum de trois jours. 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. Lors de l'utilisation d'échantillons

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

congelés, décongeler les échantillons immédiatement avant l'extraction pour éviter une éventuelle dégradation des acides nucléiques.

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN à partir de plasma avec **ELITe InGenius** et avec **ELITe InGenius Software version 1.3** (ou version suivante équivalent) suivre les protocoles d'extraction **CMV ELITe_PL_200_100**. Ce protocole utilise 200 µL d'échantillon, avec ajout de **CPE** avec 10 µL / extraction et élution des acides nucléiques dans 100 µL d'eau.

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN à partir de plasma avec **ELITe InGenius** et avec **ELITe InGenius Software version 1.3** (ou version suivante équivalent) suivre les protocoles d'extraction **CMV ELITe_PL_1000_100**. Ce protocole utilise 1000 µL d'échantillon, avec ajout de **CPE** avec 10 µL / extraction et élution des acides nucléiques dans 100 µL d'eau.

Le tube primaire ne peut pas être utilisé avec le protocole de test CMV ELITe_PL_1000_100.

Liquide céphalorachidien (CSF)

Les échantillons de liquide céphalorachidien (CSF) 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.

Avant l'analyse avec ce produit, transférer 0,2 mL d'échantillon dans le tube de sonication fourni avec le produit «ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set».

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.

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN à partir de liquide céphalorachidien (CSF) avec **ELITe InGenius** et **ELITe InGenius Software version 1.3** (ou version suivante), suivre le protocole d'extraction **CMV ELITe_CSF_200_100**. Ce protocole utilise 200 µL d'échantillon, en présence de **CPE** à 10 µL / extraction et élution des acides nucléiques dans 100 µL.

Urines

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.

Avant l'analyse avec ce produit, transférer 0,2 mL d'échantillon dans le tube de sonication fourni avec le produit «ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set».

Si possible, éviter de congeler les échantillons d'urine 1er jet. La congélation des échantillons d'urines 1er jet peut entraîner la précipitation des inhibiteurs et la perte du titre d'ADN.

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.

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN à partir de urines avec **ELITe InGenius** et **ELITe InGenius Software version 1.3** (ou version suivante), suivre le protocole d'extraction **CMV ELITe_U_200_100**. Ce protocole utilise 200 µL d'échantillon, en présence de **CPE** à 10 µL / extraction et élution des acides nucléiques dans 100 µL.

Écouvillons buccaux

Les prélèvements buccaux pour l'extraction des acides nucléiques doivent être recueillis en utilisant le système «eSwab Collection Kit» (COPAN Italia S.p.A., code 480CE) et identifiés conformément aux indications du laboratoire. Les écouvillons buccaux doivent être transportés et conservés à température ambiante (+18 / +25 °C) pendant cinq jours ou à +2 / +8 °C pendant sept jours et congelés et conservés à -20 °C jusqu'à six mois ou -70 °C pour des périodes plus longues.

Avant l'analyse avec ce produit, transférer 0,2 mL d'échantillon dans le tube de sonication fourni avec le produit «ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set».

Il est conseillé de diviser les échantillons à conserver congelés en plusieurs aliquotes afin de ne pas les soumettre à des cycles répétés de congélation / décongélation. Lors de l'utilisation d'échantillons congelés, décongeler les échantillons immédiatement avant l'extraction pour éviter la dégradation possible

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

des acides nucléiques.

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN à partir de écouvillons buccaux avec **ELITe InGenius** et **ELITe InGenius Software version 1.3** (ou version suivante), suivre le protocole d'extraction **CMV ELITe_BS_200_100**. Ce protocole utilise 200 µL d'échantillon, en présence de **CPE** à 10 µL / extraction et élution des acides nucléiques dans 100 µL.

Liquide amniotique

Les échantillons de liquide amniotique pour l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés selon les instructions du laboratoire, transportés à +2 / +8 °C et conservés à +2 / +8 °C pendant quatre heures maximum, sinon ils doivent être congelés et conservés à -20 °C pendant 30 jours ou à -70 °C pendant des périodes plus longues.

Avant l'analyse avec ce produit, transférer 0,2 mL d'échantillon dans le tube de sonication fourni avec le produit «ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set».

Il est conseillé de diviser les échantillons à conserver congelés en plusieurs aliquotes afin de ne pas les soumettre à des cycles répétés de congélation / décongélation. Lors de l'utilisation d'échantillons congelés, décongeler les échantillons immédiatement avant l'extraction pour éviter la dégradation possible des acides nucléiques.

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN à partir de liquide amniotique avec **ELITe InGenius** et **ELITe InGenius Software version 1.3** (ou version suivante), suivre le protocole d'extraction **CMV ELITe_AF_200_100**. Ce protocole utilise 200 µL d'échantillon, en présence de **CPE** à 10 µL / extraction et élution des acides nucléiques dans 100 µL.

Lavage bronchoalvéolaire (LBA) / Aspiration bronchique (AB)

Les échantillons LBA / AB, destinés à l'extraction d'ADN, doivent être collectés dans une solution physiologique stérile ou du PBS stérile selon les directives du laboratoire, transportés à +2 / +8 °C et conservés à +2 / +8 °C pour un maximum d'un la semaine. Sinon, ils doivent être congelés et conservés à -20 °C pendant un maximum de trente jours ou à -70 °C jusqu'à un an, selon les pratiques de laboratoire.

Avant l'analyse avec ce produit, 0,2 ml d'échantillon doit être transféré dans le tube de sonication fourni avec «ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set».

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

Si les échantillons LBA / AB sont particulièrement muqueux, ils peuvent être liquéfiés par des réactifs à base de dithiothréitol (par exemple Sputasol, Oxoid, Thermo Fisher Scientific) selon les directives du laboratoire.

Remarque: lorsque l'extraction d'ADN à partir de LAB / AB est effectuée avec **ELITe InGenius** et avec **ELITe InGenius Software version 1.3** (ou versions équivalentes ultérieures), utilisez le protocole de test **CMV ELITe_BAL_200_100**. Ce protocole traite 200 µL d'échantillon, ajoute le **CPE** à 10 µL / extraction et élue les acides nucléiques dans 100 µL.

Autres échantillons :

Il n'y a pas de données disponibles concernant la performance du produit avec l'ADN extrait des échantillons cliniques suivants : suspensions de leucocytes, suspensions de granulocytes.

Substances interférentes

L'ADN extrait de l'échantillon ne doit pas contenir d'héparine, d'hémoglobine, de dextran, de Ficoll®, d'éthanol ou de 2-propanol. Ceci afin d'éviter des phénomènes d'inhibition et des résultats erronés.

Des quantités élevées d'ADN génomique humain dans l'ADN extrait de l'échantillon peuvent inhiber la réaction d'amplification.

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

Contrôles d'amplification

Avant l'analyse de chaque échantillon, il est impératif d'élaborer et d'approuver la courbe de calibration et la validation des réactifs pour chaque lot d'amplification du réactif :

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

- comme Calibrateurs, utilisez les quatre niveaux de concentration de **CMV ELITe Standard**, en association avec le protocole «**CMV ELITe STD**» or «**CMV ELITe STD_1000_100**»,
- comme Contrôle Positif, utiliser le produit **CMV- ELITe Positive Control**, en association avec le protocole «**CMV ELITe PC**» or «**CMV ELITe PC_1000_100**»,
- comme Contrôle Négatif, utiliser de l'eau ultra pure pour la biologie (non incluse dans le produit), en association avec le protocole «**CMV ELITe NC**» or «**CMV ELITe NC_1000_100**».

Remarque: ELITe InGenius et l'**ELITe InGenius Software** permettent d'obtenir la courbe de calibration et la validation des résultats de contrôle de l'amplification pour chaque lot de réactif d'amplification enregistré dans la base de données.

Les courbes de calibration, approuvées et enregistrées dans la base de données, expireront après **60 jours**. À la date d'expiration, il est nécessaire de refaire la calibration.

La validation des résultats de contrôle de l'amplification, approuvés et enregistrés dans la base de données, expirera après **15 jours**. À la date d'expiration, il est nécessaire de refaire les contrôles positifs et négatifs.

Les calibreurs et les contrôles d'amplification doivent être à nouveau testés dans l'un des cas suivants:

- Utilisation d'un nouveau lot de réactif d'amplification
- Résultats des analyses de contrôle de qualité (voir paragraphe suivant) non conformes
- Intervention de maintenance principale effectuée sur l'automate **ELITe InGenius**.

Contrôles de la qualité

Les contrôles extérieurs doivent être utilisés dans le respect de la législation locale ou nationale et des organismes d'accréditation fédéraux. Le "CMV Molecular Q Panel", est un exemple de contrôle externe commercial code CMVMQP01, Qnostics Ltd, Royaume Uni) et «AcroMetrix® CMV_{ic} Panel» (Acrometrix, Life Technologies; Etats-Unis).

ELITe InGenius® PROCÉDURE

La procédure d'utilisation du produit «**CMV - ELITe MGB® Kit**» avec le système **ELITe InGenius** se déroule en trois étapes :

- Vérification de l'état du système
- Configuration de l'analyse
- Évaluation et approbation des résultats

Vérification du système

Avant de lancer l'analyse, en suivant les consignes imparties dans la documentation de l'automate, il est nécessaire de :

- allumer l'automate **ELITe InGenius** et sélectionner le mode **FERME'** ;
- vérifier (Calibration) que les calibreurs (Calibration - **CMV Q-PCR standard**) sont exécutés, approuvés et qu'ils ne sont pas expirés (statuts). Ce contrôle peut être effectué à partir du menu "Calibration" dans la page d'accueil ;
- vérifier (Controls) que les contrôles d'amplification (Controls - **CMV Positive Control**, **CMV Negative Control**) sont exécutés, approuvés et qu'ils ne sont pas expirés (statuts). Ce contrôle peut être effectué à partir du menu "Contrôle" dans la page d'accueil ;
- choisir le type d'analyse et la mettre en œuvre en suivant les instructions des protocoles des tests fournis par ELITechGroup. Ces protocoles IVD ont été validés de façon spécifique avec les kits **ELITe MGB** et l'automate **ELITe InGenius**, spécifiques à chaque matrice et l'automate **ELITe InGenius**.

Le protocole du test disponible pour le kit «**CMV ELITe MGB® Kit**» est illustré dans le tableau ci-dessous.

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

Protocole du test pour le kit CMV ELITe MGB kit

Nom	Matrice	Unité	Caractéristiques
CMV ELITe_WB_200_100	Sang total	gEq/mL or UI/mL	Volume d'extraction initial: 200 µL Volume de l'éluat: 100 µL Contrôle interne: 10 µL Sonication: NO Facteur de dilution: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume d'éluat utilisé pour la PCR: 20 µL
CMV ELITe_PL_200_100	Plasma	gEq/mL or UI/mL	Volume d'extraction initial: 200 µL Volume de l'éluat: 100 µL Contrôle interne: 10 µL Sonication: NO Facteur de dilution: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume d'éluat utilisé pour la PCR: 20 µL
CMV ELITe_PL_1000_100	Plasma	gEq/mL or UI/mL	Volume d'extraction initial: 1000 µL Volume de l'éluat: 100 µL Contrôle interne: 10 µL Sonication: NO Facteur de dilution: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume d'éluat utilisé pour la PCR: 20 µL
CMV ELITe_CSF_200_100	Liquide céphalorachidien	gEq/mL or UI/mL	Volume d'extraction initial: 200 µL Volume de l'éluat: 100 µL Contrôle interne: 10 µL Sonication: NO Facteur de dilution: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume d'éluat utilisé pour la PCR: 20 µL

Protocole du test pour le kit CMV ELITe MGB kit

CMV ELITe_U_200_100	Urines	gEq/mL or UI/mL	Volume d'extraction initial: 200 µL Volume de l'éluat: 100 µL Contrôle interne: 10 µL Sonication: NO Facteur de dilution: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume d'éluat utilisé pour la PCR: 20 µL
CMV ELITe_BS_200_100	Écouillons buccaux	gEq/mL or UI/mL	Volume d'extraction initial: 200 µL Volume de l'éluat: 100 µL Contrôle interne: 10 µL Sonication: NO Facteur de dilution: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume d'éluat utilisé pour la PCR: 20 µL
CMV ELITe_AF_200_100	Liquide amniotique	gEq/mL or UI/mL	Volume d'extraction initial: 200 µL Volume de l'éluat: 100 µL Contrôle interne: 10 µL Sonication: NO Facteur de dilution: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume d'éluat utilisé pour la PCR: 20 µL

CMV ELITE MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

Protocole du test pour le kit CMV ELITE MGB kit

CMV ELITE_BAL_200_100	BAL / BA	gEq/mL or IU/mL	Volume d'extraction initial: 200 µL Volume de l'éluat: 100 µL Contrôle interne: 10 µL Sonication: NO Facteur de dilution: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume d'éluat utilisé pour la PCR: 20 µL
------------------------------	----------	-----------------	---

Si le protocole du test à réaliser n'est pas présent dans le système, contacter le Service clients local d'ELITechGroup.

Les protocoles d'analyse qualitative sont disponibles sur demande.

Configuration de l'étape

Le produit **CMV ELITE MGB® Kit** associé à l'automate **ELITE InGenius** peut être utilisé pour effectuer:

- Cycle complet (Extraction + PCR)
- Cycle d'amplification (PCR uniquement)
- Cycle de Calibration (PCR uniquement)
- Cycle d'amplification pour le Contrôle Positif et le Contrôle Négatif (PCR uniquement)

Le profil thermique d'amplification est compris dans le protocole du test disponible sur l'automate et il est automatiquement rappelé lors de la sélection du protocole.

Remarque: le système ELITE InGenius peut être relié au «serveur d'informations de localisation» (LIS) grâce auquel vous pouvez envoyer les informations de réglage de session. Pour plus de détails, reportez-vous au mode d'emploi de l'instrument. Les principales étapes de configuration des quatre types de cycles sont décrites ci-dessous.

A Cycle complet

Pour configurer le cycle intégré, suivre les indications ci-après conformément au logiciel et son interface graphique (**Graphical User Interface, GUI**) :

- Décongeler une quantité de tubes de CMV Q - PCR Mix suffisante pour le cycle. Chaque tube permet la préparation de 24 réactions dans des conditions optimales de consommation de réactif. Mélanger délicatement le contenu et centrifuger pendant 5 secondes.
- Décongeler une quantité de tubes de CPE suffisante pour le cycle. Chaque tube permet la préparation de 12 extractions. Mélanger délicatement le contenu et centrifuger pendant 5 secondes.
- Sélectionner "Perform Run" dans la page d'accueil.
- Vérifier que le volume d'extraction initial est de 200 µL pour traiter 200 µL d'échantillon ou 1000 µL pour traiter 1000 µL d'échantillon et le volume de l'éluat extrait de 100 µL.
- Pour chaque trace à réaliser, renseigner le "SampleID" (SID) en saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.
- Sélectionner le protocole du test à utiliser dans la colonne "Assay" (par exemple CMV ELITE_WB_200_100).
- Vérifier que le Protocole affiché soit : "Extract + PCR".
- Sélectionner la position de chargement de l'échantillon dans la colonne "Sample Position":
 - En cas d'utilisation d'un tube primaire, sélectionner "Primary Tube"; le tube primaire ne peut être utilisé qu'à partir de 200 µL d'échantillon;
 - En cas d'utilisation d'un tube secondaire, sélectionner "ExtractionTube".
 - Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger le CPE et le CMV Q-PCR Mix dans le gestionnaire des réactifs sélectionné en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger / contrôler les racks d'embouts dans la zone sélectionnée en suivant les instructions de

CMV ELITE MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.

- Charger les échantillons à extraire dans la position indiquée au point 8, ainsi que les cartouches d'extraction et les cassettes de PCR outre tous les consommables, en suivant les instructions GUI. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Fermer le volet de l'automate.
- Appuyer sur "Start" pour lancer la course.

Au terme de la procédure, **ELITE InGenius** permet d'afficher, approuver, mémoriser les résultats et d'imprimer et d'enregistrer le compte-rendu.

Remarque: Au terme du cycle, le reliquat d'échantillon primaire peut être retiré de l'automate, bouché, identifié et conservé à -20°C. Manipuler l'échantillon avec précaution pour éviter tout risque de contamination.

Remarque: Au terme du cycle, les cassettes PCR avec les produits de réaction et les consommables doivent être retirées de l'automate et éliminées en veillant à ne pas contaminer l'environnement. Éviter toute dispersion des produits de réaction.

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

B Cycle d'amplification

Pour configurer le cycle d'amplification, suivre les indications ci-après conformément aux instructions

GUI:

- Décongeler une quantité de tubes de CMV Q - PCR Mix suffisante pour réaliser le cycle. Chaque tube permet la préparation de 24 réactions dans des conditions optimales de consommation de réactif. Mélanger délicatement le contenu et centrifuger pendant 5 secondes.
- Sélectionner "Perform Run" dans la page d'accueil.
- Vérifier que le volume d'extraction initial soit de 200 µL pour traiter 200 µL d'échantillon ou 1000 µL pour traiter 1000 µL d'échantillon et le volume de l'éluat extrait de 100 µL.
- Pour chaque trace à réaliser, renseigner le "SampleID" (SID) en saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.
- Sélectionner le protocole du test à utiliser dans la colonne "Assay" (par exemple CMV ELITE_WB_200_100).
- Sélectionner "PCR only" dans la colonne "Protocol".
- Contrôler que la position de chargement de l'échantillon élué dans la colonne "Sample Position" soit "Extra Tube" (position 1)". Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger le CMV Q-PCR Mix dans le gestionnaire de réactifs sélectionné en suivant les instructions GUI. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger / contrôler les racks des embouts dans la zone sélectionnée en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger les échantillons des acides nucléiques extraits et la cassette PCR, en suivant les instructions GUI. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Fermer la porte de l'automate.
- Appuyer sur "Start" pour lancer la course.

Au terme de la procédure, **ELITE InGenius** permet d'afficher, approuver, mémoriser les résultats et d'imprimer et d'enregistrer le compte-rendu.

Remarque: Au terme du cycle, le reliquat d'échantillon extrait peut être retiré de l'automate, bouché, identifié et conservé à -20°C. Manipuler l'échantillon avec précaution pour éviter tout risque de contamination.

Remarque: Au terme du cycle, les cassettes PCR avec les produits de réaction et les consommables doivent être retirées de l'automate et éliminées en veillant à ne pas contaminer l'environnement. Éviter toute

dispersion des produits de réaction.

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

C Cycle de calibration

Pour configurer le cycle d'étalonnage, suivre les indications ci-après conformément aux instructions

GUI:

- Décongeler une quantité de tubes de CMV Q - PCR Mix suffisante pour réaliser le cycle. Chaque tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions optimales de consommation de réactif. Mélanger délicatement le contenu et centrifuger pendant 5 secondes.
- Décongeler les tubes de CMV ELITE Standard (Cal1: CMV Q-PCR Standards 10², Cal2: CMV Q-PCR Standards 10³, Cal3: CMV Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: CMV Q-PCR Standards 10⁵). Chaque tube permet la préparation de 4 cycles. Mélanger délicatement le contenu et centrifuger pendant 5 secondes.
- Sélectionner "Perform Run" dans la page d'accueil.
- Vérifier que le volume d'extraction initial soit de 200 µL pour traiter 200 µL d'échantillon ou 1000 µL pour traiter 1000 µL d'échantillon et le volume de l'éluat extrait de 100 µL.
- A partir de la trace à réaliser, sélectionner le protocole de dosage à utiliser dans la colonne "Assay" (CMV ELITE_STD ou CMV ELITE_STD_1000_100) et indiquer le numéro de lot et la date d'échéance pour la Q - PCR standard. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger le CMV Q-PCR Mix dans le gestionnaire des réactifs sélectionné en suivant les instructions GUI. Si nécessaire, se reporter au Manuel d'Utilisation de l'automate pour configurer le gestionnaire des réactifs. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger / contrôler les Racks des embouts dans la zone sélectionnée en suivant les instructions GUI. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger les tubes de calibration et la cassette PCR en suivant les instructions de l'interface graphique. Si nécessaire, se reporter au Manuel de l'Opérateur de l'automate pour configurer le gestionnaire des réactifs. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Fermer la porte de l'automate.
- Appuyer sur "Start" pour lancer le cycle.

Au terme de la procédure, l'ELITE InGenius permet d'afficher, approuver, mémoriser les résultats et d'imprimer et d'enregistrer le compte-rendu.

Remarque: Au terme du cycle, le reliquat de standard peut être retiré de l'automate, bouché et conservé à -20°C.

Remarque: Au terme du cycle, les cassettes PCR avec les produits de réaction et les consommables doivent être retirées de l'automate et éliminées en veillant à ne pas contaminer l'environnement. Éviter toute dispersion des produits de réaction.

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

D. Cycle d'amplification pour le Contrôle Positif et le Contrôle Négatif

Pour configurer le cycle d'amplification du Contrôle Positif, suivre les indications ci-après :

- Décongeler une quantité de tubes de CMV Q - PCR Mix suffisante pour le cycle. Chaque tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions optimales de consommation de réactif. Mélanger délicatement le contenu et centrifuger pendant 5 secondes.
- Décongeler le produit CMV - ELITE Positive Control pour l'amplification du Contrôle Positif. Chaque tube permet la préparation de 4 cycles. Mélanger délicatement le contenu et centrifuger pendant 5 secondes.
- Transférer au moins 50 µL d'eau ultra pure nécessaire aux étapes dans un tube d'éluat fourni avec ELITE InGenius® SP Consumable Set.
- Sélectionner "Perform Run" dans la page d'accueil.
- Bien qu'aucune extraction ne soit effectuée, vérifier que le "Volume d'entrée d'extraction": 200 µL pour traiter 200 µL d'échantillon ou 1000 µL pour traiter 1000 µL d'échantillon et vérifiez que le «Volume extrait extrait» est réglé sur 100 µL.
- Sélectionner CMV ELITE_PC ou CMV ELITE_PC_1000_100 pour le contrôle positif et indiquer le numéro de lot et la date d'expiration pour le Positive Control (Contrôle positif),
- Sélectionner CMV ELITE_NC ou CMV ELITE_NC_1000_100 pour le contrôle négatif et indiquer le numéro de lot et la date d'expiration pour l'eau de qualité biologie moléculaire.
- Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger le CMV Q-PCR Mix dans le gestionnaire des réactifs sélectionné en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger / contrôler les racks d'embouts dans la zone sélectionnée en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger la cassette PCR, le Contrôle Positif et le Contrôle Négatif en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Fermer la porte de l'automate.
- Appuyer sur "Start" pour lancer le cycle.

Au terme de la procédure, l'ELITE InGenius permet d'afficher, approuver, mémoriser les résultats et d'imprimer et d'enregistrer le compte-rendu.

Remarque: Le Contrôle Positif doit être effectué comme contrôle d'amplification, pour configurer la carte de contrôle. Pour configurer le graphique, quatre (4) valeurs du Contrôle Positif et du Contrôle Négatif de 4 séances différentes, sont requises pour établir la carte de contrôle. Au terme du paramétrage, les valeurs du contrôle positif et du contrôle négatif sont enregistrées par l'automate et utilisées pour contrôler la phase d'amplification. Pour plus de détails, se reporter au Manuel d'Utilisation de l'automate.

Remarque: Au terme du cycle, le reliquat de Contrôle Positif peut être retiré de l'automate, bouché, identifié et conservé à -20°C. Manipuler l'échantillon avec précaution pour éviter tout risque de contamination

Remarque: Au terme du cycle, les cassettes PCR avec les produits de réaction et les consommables doivent être retirées de l'automate et éliminées en veillant à ne pas contaminer l'environnement. Éviter toute dispersion des produits de réaction.

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

Évaluation et approbation des résultats

Au terme du cycle, l'écran "Results Display" s'affiche automatiquement. Il affiche les résultats relatifs à l'échantillon / calibrateur / contrôle ainsi que les informations concernant le cycle. A partir de cet écran, il est possible d'approuver le résultat, d'imprimer ou d'enregistrer le compte-rendu ("Sample Report" ou "Track Report").

Remarque: Pour plus de détails, consulter le Manuel d'Instructions de l'automate **ELITe InGenius**.

ELITe InGenius génère les résultats avec le kit **CMV ELITe MGB® Kit**, en suivant cette procédure :

- A. Validation de la calibration,
- B. Validation des résultats d'amplification du Contrôle Positif et du Contrôle Négatif,
- C. Validation des résultats de l'échantillon,
- D. Élaboration du compte-rendu des résultats de l'échantillon

A. Validation de la courbe de calibration

Les signaux de fluorescence émis par la sonde spécifique pour CMV ("CMV") dans les réactions d'amplification du calibrateur sont automatiquement analysés et interprétés par le logiciel de l'automate compte tenu des paramètres du protocole de test "CMV ELITe_STD" et "CMV ELITe_STD_1000_100".

La courbe de calibration, spécifique au lot du réactif d'amplification, est mémorisée dans la base de données et peut être visualisée et approuvée par le personnel qualifié comme "Administrateur" ou "Analyste", suivant les instructions GUI.

La courbe de calibration, spécifique au lot du réactif d'amplification, expirera après 60 jours.

Avant d'analyser chaque échantillon, il est impératif d'élaborer et d'approuver la courbe de calibration pour le lot de réactif d'amplification utilisé. La disponibilité d'une courbe de calibration et les résultats du contrôle d'amplification "Approved" (Status) sont affichés dans la fenêtre "Calibration" du logiciel ELITe InGenius.

Remarque: Lorsque la courbe de calibration ne satisfait pas aux critères d'acceptation, l'automate affiche le message "not passed" dans le menu "Calibration", et la dite courbe ne peut être approuvée. Les réactions d'amplification du calibrateur doivent être répétées.

Remarque: Dans le cas où la courbe de calibration est générée avec les échantillons et le résultat est invalide, l'ensemble du cycle ne sera pas valide et l'amplification de tous les échantillons devra être répétées.

B. Validation des résultats d'amplification du Contrôle Positif et Contrôle Négatif

Les signaux de fluorescence émis par la sonde spécifique pour CMV (FAM, Channel 1 "CMV"), dans les réactions d'amplification du Contrôle Positif et du Contrôle Négatif sont automatiquement analysés et interprétés par le logiciel de l'automate compte tenu des paramètres du protocole de test "CMV ELITe_PC" et "CMV ELITe_NC".

Les résultats de l'amplification du Contrôle Positif et du Contrôle Négatif, spécifiques au lot du réactif d'amplification, sont mémorisés dans la base de données et peuvent être visualisés et approuvés (Controls) par le personnel qualifié comme "Administrateur" ou "Analyste", suivant les instructions GUI.

Les résultats de l'amplification du Contrôle Positif et du Contrôle Négatif, spécifiques au lot du réactif d'amplification, expireront après 15 jours.

Avant d'analyser un échantillon et après approbation de la courbe de calibration, il est impératif d'élaborer et d'approuver le résultat de l'amplification du Contrôle Positif pour le lot de réactif d'amplification utilisé. La disponibilité du résultat du Contrôle Positif ou du Contrôle Négatif d'amplification "Approved" (Status) s'affiche dans la fenêtre "Controls" du logiciel ELITe InGenius.

Remarque: Lorsque le Contrôle Positif ou le Contrôle Négatif ne satisfait pas aux critères d'acceptation, l'automate visualise le message "not passed" s'affiche dans le menu "Controls" et le contrôle ne peut être approuvé. L'amplification du Contrôle Positif ou du Contrôle Négatif doit être répétée.

Remarque: Lorsque le Contrôle Positif ou le Contrôle Négatif est effectué comme contrôle d'amplification avec les échantillons et que le résultat n'est pas valide, tout le cycle est invalidé et l'amplification de tous les échantillons doit être répétée.

C. Validation des résultats de l'échantillon

Les signaux de fluorescence émis par la sonde spécifique pour CMV ("CMV") et par la sonde spécifique pour le Contrôle Interne ("IC") dans chaque réaction d'amplification, sont automatiquement analysés et interprétés par le logiciel de l'automate compte tenu des paramètres du protocole de test.

Remarque: Avant d'analyser chaque échantillon, il est impératif d'élaborer et d'approuver la courbe de calibration et l'amplification des Contrôles pour le lot de réactif utilisé. Il est conseillé, mais facultatif, d'effectuer les Contrôles Positif et Négatif conjointement aux calibrateurs. La disponibilité d'une courbe de calibration et d'amplification et les résultats du Contrôle Positif et du Contrôle Négatif "Approved" (Status) s'affichent dans les fenêtres "Calibration" et "Controls" du logiciel ELITe InGenius et ils sont reportés dans la section "Assay Parameters".

Les résultats sont décrits dans les rapports élaborés par l'automate ("Result Display").

Le cycle de l'échantillon est valide lorsque les trois conditions reportées dans le tableau ci-dessous sont réunies.

1) Courbe de calibration	Statut
CMV Q-PCR Standard	APPROVED
2) Contrôles Positif	Statut
CMV Positive Control	APPROVED
3) Contrôles Négatif	Statut
CMV Negative Control	APPROVED

Pour chaque échantillon, le résultat du test est interprété automatiquement par le système comme déterminé par l'algorithme de **ELITe InGenius software** et les paramètres du protocole de dosage.

La mesure est exprimée en "copies / mL" ou "IU / mL" comme établi dans le protocole de test.

Les messages relatifs au résultat d'un échantillon sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Résultat du cycle de l'échantillon	Interprétation
CMV: DNA Detected, quantity equal to XXX gEq / mL or IU / mL	ADN du CMV détecté dans l'intervalle de mesure du test, quantité comme indiqué.
CMV: DNA Detected, quantity below LLoQ gEq / mL or IU / mL	ADN du CMV détecté inférieur au seuil inférieur de quantification du test
CMV: DNA Detected, quantity beyond ULoQ gEq / mL or IU / mL	ADN du CMV détecté supérieur au seuil supérieur de quantification du test
CMV: DNA Not Detected or below LoD gEq / mL or IU / mL	ADN du CMV non détecté ou inférieur à la limite de detection du test
Invalid - Retest Sample	Résultat du test non valide suite à une erreur du contrôle interne. Le Ct du contrôle interne a donné un résultat non déterminé ou supérieur à 35 (seuil de contrôle interne = 35). Le test doit être répété

Les échantillons non conformes pour l'analyse sont indiqués comme "Invalid - Retest Sample" par le logiciel du système **ELITe InGenius**. Dans ce cas, il n'a pas été possible de détecter efficacement l'ADN du contrôle interne parce qu'il y avait des problèmes dans l'étape d'amplification ou dans la phase d'extraction (dégradation de l'ADN, une perte d'ADN lors de l'extraction ou la présence d'inhibiteurs dans l'extrait) qui peuvent causer des résultats incorrects et des faux négatifs.

Lorsque le volume de l'échantillon extrait est suffisant, il peut faire l'objet d'un nouveau test à travers une amplification en mode cycle "PCR uniquement". En présence d'un deuxième résultat invalide, l'échantillon doit être re-testé à partir de l'extraction, en utilisant le mode cycle "Extraction + PCR".

Les échantillons utilisés dans lesquels il n'a pas été possible de détecter l'ADN du CMV sont enregistrés comme "DNA Not Detected or below LoD". Dans ce cas, on ne peut exclure que l'ADN des gènes codant pour des résistances est présent à une concentration inférieure à la limite de détection du produit (voir section "Caractéristiques des Performances").

Remarque: Les résultats obtenus avec ce dosage doivent être interprétés compte-tenu de toutes les données cliniques et des autres résultats des examens de laboratoire concernant le patient.

Les résultats du cycle de l'échantillon sont enregistrés dans la base de données et peuvent être visualisés et approuvés (Result Display) par le personnel qualifié comme "Administrateur" ou "Analyste", suivant les instructions GUI. A partir de la fenêtre "Result Display" il est possible d'imprimer et d'enregistrer l'échantillon exécuté comme "Sample Report" et "Track Report".

D. Élaboration du compte-rendu des résultats de l'échantillon

Les résultats de l'échantillon sont enregistrés dans la base de données et peuvent être visualisés comme "Sample Report" et "Track Report".

Le "Sample Report" montre les détails de l'analyse de l'échantillon sélectionné à travers le numéro de l'échantillon, par exemple du patient.

Le "Track Report" montre les détails de l'analyse de l'échantillon pour une position définie.

Le "Sample Report" et le "Track Report" peuvent être imprimés et signés par le personnel autorisé.

ELITe BeGenius®

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES

Échantillons

Ce produit doit être utilisé avec les échantillons cliniques suivants:

Sang total prélevé dans un tube EDTA

Les échantillons de sang total destinés à l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés dans un tube EDTA et suivant les indications du laboratoire. Ils doivent être transportés à +2°C / +8°C et conservés à +2°C / +8°C pendant un maximum de trois jours. 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. Lors de l'utilisation d'échantillons congelés, décongeler les échantillons immédiatement avant l'extraction pour éviter une éventuelle dégradation des acides nucléiques.

Remarque: lorsque l'extraction d'ADN à partir de sang total est effectuée avec le **ELITe BeGenius** et avec le logiciel **ELITe BeGenius** version 2.0.0 (ou versions équivalentes ultérieures), utiliser le protocole d'extraction **CMV ELITe Be_WB_200_100**. Ce protocole traite 200 µL d'échantillon, ajoute le contrôle interne **CPE** à 10 µL / extraction et élue les acides nucléiques dans 100 µL.

Lorsque l'on utilise le tube primaire, le volume de l'échantillon varie en fonction du type de tube chargé. Pour plus de détails sur la configuration et l'exécution de la procédure d'extraction, se reporter aux instructions d'utilisation du kit d'extraction.

Plasma prélevé dans un tube EDTA

Les échantillons de plasma destinés à l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés dans un tube EDTA et suivant les indications du laboratoire. Ils doivent être transportés à +2°C / +8°C et conservés à +2°C / +8°C pendant un maximum de trois jours. 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. Lors de l'utilisation d'échantillons congelés, décongeler les échantillons immédiatement avant l'extraction pour éviter une éventuelle dégradation des acides nucléiques.

Remarque: lorsque l'extraction d'ADN à partir de sang total est effectuée avec le **ELITe BeGenius** et avec le logiciel **ELITe BeGenius** version 2.0.0 (ou versions équivalentes ultérieures), utiliser le protocole d'extraction **CMV ELITe Be_WB_200_100**. Ce protocole traite 200 µL d'échantillon, ajoute le contrôle interne **CPE** à 10 µL / extraction et élue les acides nucléiques dans 100 µL.

Autres échantillons :

Il n'y a pas de données disponibles concernant la performance du produit avec l'ADN extrait des échantillons cliniques suivants : suspensions de leucocytes, suspensions de granulocytes.

Substances interférentes

L'ADN extrait de l'échantillon ne doit pas contenir d'héparine, d'hémoglobine, de dextran, de Ficoll®, d'éthanol ou de 2-propanol. Ceci afin d'éviter des phénomènes d'inhibition et des résultats erronés.

Des quantités élevées d'ADN génomique humain dans l'ADN extrait de l'échantillon peuvent inhiber la réaction d'amplification.

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

Contrôles d'amplification

Avant l'analyse de chaque échantillon, il est impératif d'élaborer et d'approuver la courbe de calibration et la validation des réactifs pour chaque lot d'amplification du réactif :

- comme Calibrateurs, utilisez les quatre niveaux de concentration de **CMV ELITe Standard**, en association avec le protocole «**CMV ELITe_Be_STD**»,
- comme Contrôle Positif, utiliser le produit **CMV- ELITe Positive Control**, en association avec le protocole «**CMV ELITe_Be_PC**»,
- comme Contrôle Négatif, utiliser de l'eau ultra pure pour la biologie (non incluse dans le produit), en association avec le protocole «**CMV ELITe_Be_NC**».

Remarque: **ELITe BeGenius** et l'**ELITe BeGenius Software** permettent d'obtenir la courbe de calibration et la validation des résultats de contrôle de l'amplification pour chaque lot de réactif d'amplification enregistré dans la base de données.

Les courbes de calibration, approuvées et enregistrées dans la base de données, expireront après **60 jours**. À la date d'expiration, il est nécessaire de refaire la calibration.

La validation des résultats de contrôle de l'amplification, approuvés et enregistrés dans la base de données, expirera après **15 jours**. À la date d'expiration, il est nécessaire de refaire les contrôles positifs et négatifs.

Les calibreurs et les contrôles d'amplification doivent être à nouveau testés dans l'un des cas suivants:

- Utilisation d'un nouveau lot de réactif d'amplification
- Résultats des analyses de contrôle de qualité (voir paragraphe suivant) non conformes
- Intervention de maintenance principale effectuée sur l'automate

Contrôles de la qualité

Les contrôles de qualité externes doivent être utilisés en accord avec les organisations d'accréditation locales, nationales ou fédérales, selon le cas. Des contrôles de qualité externes sont disponibles sur le marché.

ELITe BeGenius® PROCÉDURE

La procédure d'utilisation du « **CMV ELITe MGB® Kit** » avec l'instrument **ELITe BeGenius** comporte trois étapes :

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

Vérification de la préparation du système

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

- mettre l'instrument **ELITe BeGenius** en marche et sélectionner le mode « **CLOSED** » (FERMÉ) ;
- vérifier que les calibreurs (**CMV Q-PCR Standard**) ont été analysés, sont approuvés et ne présentent pas le statut (Status) Expiré. Ceci peut être vérifié dans le menu « Calibration » (Étalonnage) de la page Home (Accueil),
- vérifier que les contrôles d'amplification (**CMV - Positive Control**, **CMV Negative Control**) ont été analysés, sont approuvés et ne présentent pas le statut (Status) Expiré. Ceci peut être vérifié dans le menu « Control » (Contrôle) de la page Home (Accueil) ;
- choisir le type d'analyse et paramétrer l'analyse, en suivant les instructions de l'interface graphique utilisateur (GUI) concernant le paramétrage de la session et en utilisant les protocoles de test fournis par ELITechGroup. Ces protocoles de DIV ont été spécifiquement validés avec les kits ELITe MGB, les matrices et l'instrument ELITe BeGenius.

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

Les protocoles de test disponibles pour le produit « **CMV ELITe MGB® Kit** » sont décrits dans le tableau ci-dessous.

Protocoles de test pour le « CMV ELITe MGB® Kit » avec l'instrument ELITe BeGenius			
Nom	Matrice	Unités du rapport	Caractéristiques
CMV ELITe_Be_WB_200_100	Sang total	copies/mL ou IU / mL	Volume d'extraction initial : 200 µl Volume d'élué extrait : 100 µl Contrôle interne : 10 µl Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µl Volume initial de PCR de l'échantillon : 20 µl
CMV ELITe_Be_PL_200_100	Plasma	copies/mL ou IU / mL	Volume d'extraction initial : 200 µl Volume d'élué extrait : 100 µl Contrôle interne : 10 µl Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µl Volume initial de PCR de l'échantillon : 20 µl

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

Des protocoles d'analyse qualitative sont disponibles sur demande.

Paramétrage de la session

Le produit **CMV ELITe MGB® Kit**, en association avec le système **ELITe BeGenius**, peut être utilisé afin d'effectuer les opérations suivantes :

- Analyse d'échantillons (EXTR + PCR),
- Analyse d'amplification [« PCR Only »] (PCR uniquement),
- Analyse d'étalonnage [« PCR Only »] (PCR uniquement),
- Analyse des contrôles positif et négatif [« PCR Only »] (PCR uniquement).

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

Remarque : l'instrument **ELITe BeGenius** peut être connecté au « serveur d'informations de localisation » (LIS) par lequel il est possible d'envoyer les informations relatives à la session de travail. Se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument pour plus de détails.

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

A. Analyse d'échantillons

Pour paramétrer l'analyse intégrée, effectuer les étapes comme indiqué par l'interface graphique utilisateur (GUI) du logiciel :

- Décongeler des tubes de CMV Q - PCR Mix en nombre suffisant pour la session d'analyse. Chaque nouveau tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions de consommation de réactif optimales. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
 - Décongeler des tubes de CPE en nombre suffisant pour la session d'analyse. Chaque nouveau tube permet d'effectuer 12 extractions. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
 - Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
 - Retirer les portoirs de l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit) et les placer sur la table de préparation.
 - Sélectionner le « run mode » (mode d'analyse) : « Extract + PCR » (Extraction + PCR).
 - Charger les échantillons dans la zone de refroidissement en commençant par le portoir d'échantillons L5.
 - Insérer le portoir dans l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Remarque : si des tubes secondaires sont chargés, les marquer « Tube de 2 ml ». Si les tubes secondaires ne portent pas de codes-barres, saisir manuellement l'ID de l'échantillon.
- Vérifier l'Extraction Input Volume (Volume d'Extraction Initial) (200 µl) et le Extracted Elute Volume (Volume d'Élué Extrait) (100 µl).
 - Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (c'est-à-dire

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

CMV ELITe_Be_PL_200_100). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.

10. Si une deuxième extraction doit être exécutée, répéter les étapes 6 à 9 en utilisant le portoir d'échantillons L4.

11. Charger les tubes d'élué à codes-barres dans la zone de refroidissement en commençant par le portoir d'élué L3.

Remarque : les tubes d'élué peuvent être étiquetés pour faciliter la traçabilité.

12. Insérer le portoir d'élué L3 dans l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.

13. Répéter les étapes 11 et 12 en utilisant le portoir de réactif/élué L2.

14. Charger le CPE et le CMV Q-PCR Mix dans la zone de refroidissement.

15. Insérer le portoir de réactif L1 dans l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.

16. Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la Zone inventaire (Inventory Area) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.

17. Charger le portoir de PCR avec la « Cassette PCR » (PCR Cassette) dans la Zone inventaire (Inventory Area) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.

18. Charger le portoir d'extraction avec les cartouches d'extraction « ELITe InGenius SP 200 » et les consommables d'extraction requis en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.

19. Fermer le tiroir de l'instrument.

20. Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

Au terme du processus, le système **ELITe BeGenius** permet à l'utilisateur de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, puis d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

Remarque : au terme de l'analyse, l'échantillon extrait restant peut être retiré de l'instrument, bouché, identifié et conservé à -20 °C. Éviter le déversement de l'échantillon extrait.

Remarque : au terme de l'analyse, la « PCR Cassette » (Cassette de PCR) contenant les produits de réaction et les autres consommables doivent être retirés de l'instrument et éliminés en évitant toute contamination environnementale. Éviter tout déversement des produits de la réaction.

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

B. Analyse d'amplification

Pour paramétrer l'analyse d'amplification avec des échantillons élués, effectuer les étapes suivantes comme indiqué par la GUI :

- Décongeler des tubes de CMV Q - PCR Mix en nombre suffisant pour la session d'analyse. Chaque nouveau tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions de consommation de réactif optimales. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
- Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
- Retirer les portoirs 1, 2 et 3 de l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit) et les placer sur la table de préparation.
- Sélectionner le « run mode » (mode d'analyse) : « PCR only » (PCR uniquement).
- Charger les échantillons dans la zone de refroidissement en commençant par le portoir d'élué L3.
- Insérer le portoir dans l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Même si aucune extraction n'est réalisée, vérifier le Extraction Input Volume (Volume d'Extraction Initial) (200 µl) et le Extracted Elute Volume (Volume d'Élué Extrait) (100 µl).
- Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (par ex. CMV ELITe_Be_PL_200_100). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger le CMV Q-PCR Mix dans la zone de refroidissement.
- Insérer le portoir dans l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la Zone inventaire (Inventory Area) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger le portoir de PCR avec la « Cassette PCR » (PCR Cassette) dans la Zone inventaire (Inventory Area) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Fermer le tiroir de l'instrument.

14. Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

Au terme du processus, le système **ELITE BeGenius** permet à l'utilisateur de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, puis d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

Remarque : au terme de l'analyse, l'échantillon extrait restant peut être retiré de l'instrument, bouché, identifié et conservé à -20 °C. Éviter le déversement de l'échantillon extrait.

Remarque : au terme de l'analyse, la « PCR Cassette » (Cassette de PCR) contenant les produits de réaction doit être retirée de l'instrument et éliminée en évitant toute contamination environnementale. Éviter tout déversement des produits de la réaction.

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

C. Analyse d'étalonnage

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

1. Décongeler des tubes de CMV Q - PCR Mix en nombre suffisant pour la session d'analyse. Chaque nouveau tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions de consommation de réactif optimales. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.

2. Décongeler les tubes de CMV Q - PCR Standard (Cal1 : CMV Q-PCR Standards 102, Cal2 : CMV Q-PCR Standards 103, Cal3 : CMV Q-PCR Standards 104, Cal4 : CMV Q-PCR Standards 105). Chaque tube permet d'effectuer 4 sessions d'analyse. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.

3. Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
4. Retirer les portoirs 1, 2 et 3 de l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit) et les placer sur la table de préparation.

5. Sélectionner le « run mode » (mode d'analyse) : « PCR only » (PCR uniquement).
6. Charger les tubes de calibre dans le portoir d'éluion L3.
7. Insérer le portoir dans l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.

8. Même si aucune extraction n'est réalisée, vérifier le Extraction Input Volume (Volume d'Extraction Initial) (200 µl) et le Extracted Elute Volume (Volume d'Éluion Extrait) (100 µl).

9. Sélectionner le protocole de test « CMV ELITE_Be_STD » à utiliser dans la colonne « Assay » (Test). Cliquer sur le bouton « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.

10. Charger le CMV Q-PCR Mix dans le portoir de réactif/éluion L2.

11. Insérer le portoir de réactif/éluion L2 dans l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.

12. Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la Zone inventaire (Inventory Area) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.

13. Charger le portoir de PCR avec la « Cassette PCR » (PCR Cassette) dans la Zone inventaire (Inventory Area) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.

14. Fermer le tiroir de l'instrument.
15. Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

Au terme du processus, le système **ELITE BeGenius** permet à l'utilisateur de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, puis d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

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

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

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

D. Analyse du contrôle positif et du contrôle négatif

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

1. Décongeler des tubes de CMV Q - PCR Mix en nombre suffisant pour la session d'analyse. Chaque nouveau tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions de consommation de réactif optimales. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.

2. Décongeler le produit CMV - ELITE Positive Control, pour l'amplification du contrôle positif. Chaque tube permet d'effectuer 4 sessions d'analyse. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.

3. Transférer au minimum 50 µl d'eau de qualité biologie moléculaire (à titre de contrôle négatif) pour les sessions d'analyse dans un (1) « Tube d'éluion » (Elution tube) fourni dans le kit de consommables ELITE InGenius SP Consumable Set.

4. Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
5. Retirer les portoirs 1, 2 et 3 de l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit) et les placer sur la table de préparation.

6. Sélectionner le « run mode » (mode d'analyse) : « PCR only » (PCR uniquement).
7. Charger les tubes de contrôle positif et de contrôle négatif dans le portoir d'éluion L3.
8. Insérer le portoir dans l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.

9. Même si aucune extraction n'est réalisée, vérifier le Extraction Input Volume (Volume d'Extraction Initial) (200 µl) et le Extracted Elute Volume (Volume d'Éluion Extrait) (100 µl).

10. Sélectionner le protocole de test « CMV ELITE_Be_PC » et « CMV ELITE_Be_NC » à utiliser dans la colonne « Assay » (Test). Cliquer sur le bouton « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.

11. Charger le CMV Q-PCR Mix dans le portoir de réactif/éluion L2.
12. Insérer le portoir de réactif/éluion L2 dans l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.

13. Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la Zone inventaire (Inventory Area) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.

14. Charger le portoir de PCR avec la « Cassette PCR » (PCR Cassette) dans la Zone inventaire (Inventory Area) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.

15. Fermer le tiroir de l'instrument.
16. Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

Au terme du processus, le système **ELITE BeGenius** permet à l'utilisateur de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, puis d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

Remarque : au terme de l'analyse, le contrôle positif restant peut être retiré de l'instrument, bouché et conservé à -20 °C. Éviter tout déversement des contrôles positifs.

Remarque : au terme de l'analyse, les « PCR Cassettes » (Cassettes de PCR) contenant les produits de réaction doivent être retirées de l'instrument et mises au rebut en évitant toute contamination environnementale. Éviter tout déversement des produits de la réaction.

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

Examen et approbation des résultats

Au terme de l'analyse, l'écran « Results Display » (Affichage des résultats) s'affiche automatiquement. Dans cet écran, les résultats de l'échantillon/du calibre/du contrôlé et les informations concernant l'analyse sont affichés. À partir de cet écran, il est possible d'approuver le résultat, d'imprimer ou d'enregistrer les rapports [« Sample Report » (Rapport échantillons) ou « Track Report » (Rapport des positions)].

Remarque : l'instrument **ELITE BeGenius** peut être connecté au « serveur d'informations de localisation » (LIS) par lequel il est possible d'envoyer les résultats de la session de travail au centre de données du laboratoire. Se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument pour plus de détails.

L'instrument **ELITE BeGenius** génère les résultats à l'aide du produit CMV ELITE MGB Kit en exécutant la procédure suivante :

- Validation de la courbe d'étalonnage,
- Validation des résultats du contrôle positif et du contrôle négatif d'amplification,
- Validation des résultats de l'échantillon,
- Rapport des résultats de l'échantillon.

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

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

REF RTK015PLD

**CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES
ELITe InGenius and ELITe BeGenius**

Sensibilité analytique : seuil de détection

La sensibilité analytique de ce test, entendue comme seuil de détection, permet de détecter la présence d'environ 10 copies dans les 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La sensibilité analytique du test, entendue comme seuil de détection, a été testée à partir d'un ADN plasmidique contenant le produit d'amplification dont la concentration initiale a été mesurée au spectrophotomètre. L'ADN plasmidique a été dilué à un titre de 10 copies / 20 µL dans de l'ADN génomique humain à un titre de 500 ng / 20 µL. Cet échantillon a été utilisé dans 12 réplicats pour effectuer l'amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A. sur deux automates différents.

Les résultats finaux sont récapitulés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
10 copies d'ADN plasmidique + 500 ng d'ADN génomique humain	24	23	1

La sensibilité analytique de l'essai a été vérifiée en utilisant un panel de dilutions du CMV dans la concentration limite, associé à des échantillons de sang total et **ELITe InGenius**. Le panel a été préparé en diluant le "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC code 09/162, Royaume Uni) dans des échantillons de sang total négatif pour l'ADN du CMV. Le panel était composé d'au moins six points autour de la concentration limite. Chaque échantillon du panel a été utilisé dans au moins 12 réplicats pour effectuer toute la procédure d'analyse, de préparation du cycle, d'extraction, d'amplification en temps réel et d'interprétation des résultats avec **ELITe InGenius** et les produits ELITechGroup S.p.A. L'analyse statistique a été effectuée par régression Probit. Le seuil de détection a été défini comme concentration à laquelle la probabilité d'atteindre un résultat positif est de 95%.

Les résultats finaux sont récapitulés dans le tableau suivant :

Seuil de détection avec ELITe InGenius (UI / mL)				
Volume d'échantillon	Matrice	95% positivité	Intervalle de confiance de 95 %	
			valeur inférieure	valeur supérieure
200 µL	sang total	109 UI / mL	71 UI / mL	239 UI / mL
	plasma	88 UI / mL	50 UI / mL	291 UI / mL
	liquide céphalorachidien	58 UI / mL	48 UI / mL	82 UI / mL
	urine	151 UI / mL	119 UI / mL	214 UI / mL
	écouvillons buccaux	44 UI / mL	36 UI / mL	57 UI / mL
	liquide amniotique	57 UI / mL	46 UI / mL	78 UI / mL
1000 µL	BAL / BA	97 UI / mL	58 UI / mL	291 UI / mL
	plasma	17 UI / ml	14 UI / mL	22 UI / mL

La sensibilité analytique exprimée en gEq / mL a été calculée en appliquant pour chaque matrice le facteur de conversion spécifique indiqué à la page. 23.

La sensibilité analytique comme gEq/mL est reportée ci-dessous.

Seuil de détection avec ELITe InGenius (gEq/mL)				
Volume d'échantillon	Matrice	95% positivité	Intervalle de confiance de 95 %	
			valeur inférieure	valeur supérieure
200 µL	sang total	156 gEq/mL	99 gEq / mL	332 gEq / mL
	plasma	293 gEq/mL	166 gEq / mL	970 gEq / mL
	liquide céphalorachidien	193 gEq/mL	160 gEq / mL	273 gEq / mL

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

REF RTK015PLD

Seuil de détection avec ELITe InGenius (gEq/mL)				
200 µL	urine	216 gEq/mL	170 gEq / mL	306 gEq / mL
	écouvillons buccaux	220 gEq/mL	180 gEq / mL	285 gEq / mL
	liquide amniotique	285 gEq/mL	230 gEq / mL	390 gEq / mL
	BAL / BA	485 UI/ ml	290 gEq / mL	1455 gEq / mL
1000 µL	plasma	57 UI/ ml	47 gEq /mL	73 gEq /mL

La valeur de la LoD calculée pour les matrices de **sang total et de plasma** (volume d'échantillon de 200 µl) en association avec les instruments **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** a été vérifiée en testant 20 réplicats d'échantillons de sang total prélevé sur EDTA et 20 réplicats d'échantillons de plasma prélevé sur EDTA dopés avec un matériel de référence certifié du CMV (1^{er} étalon international de l'OMS, NIBSC) à la concentration revendiquée. La LoD était confirmée si au moins 18 des 20 réplicats génèrent un résultat positif conformément à la norme EP17-A du CLSI.

Les résultats sont présentés dans les tableaux suivants.

Limite de détection pour des échantillons de sang total et de plasma avec l'instrument ELITe InGenius					
Échantillon	Titre	Cible	N	Positif	Négatif
Sang total prélevé sur EDTA	109 UI/ml	CMV	20	20	0
Plasma prélevé sur EDTA	88 UI/ml	CMV	20	20	0

Limite de détection pour des échantillons de sang total et de plasma avec l'instrument ELITe BeGenius					
Échantillon	Titre	Cible	N	Positif	Négatif
Sang total prélevé sur EDTA	109 UI/ml	CMV	20	20	0
Plasma prélevé sur EDTA	88 UI/ml	CMV	20	19	1

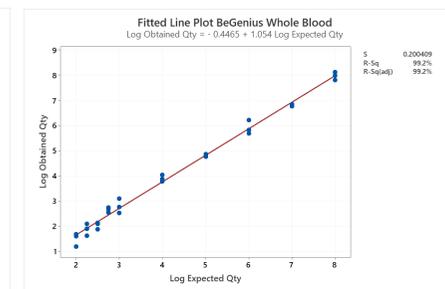
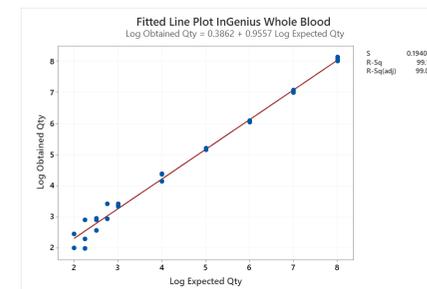
La valeur de la LoD pour la cible CMV a été confirmée à 109 UI/ml pour le sang total prélevé sur EDTA et à 88 UI/ml pour le plasma prélevé sur EDTA.

Intervalle linéaire de mesure

Sang total :

La plage de mesure linéaire du produit CMV ELITe MGB® Kit, utilisé en association avec du sang total et les instruments **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius**, a été testée en utilisant un panel préparé en diluant un matériel de référence du CMV (Notovir, Italie) dans une matrice négative pour l'ADN du CMV. Le panel consistait en huit points de dilution à partir de 10⁸ jusqu'à 10² UI/ml. Chaque échantillon du panel a été testé en 3 réplicats.

L'analyse des données obtenues, réalisée par régression linéaire, a démontré que le test effectué en association avec des échantillons de sang total présentait une réponse linéaire pour tous les niveaux de dilution avec un coefficient de corrélation R-carré (R²) de 0,991 pour l'instrument ELITe InGenius et de 0,992 pour l'instrument ELITe BeGenius.



La limite inférieure de quantification (LLOQ) a été définie à la concentration qui génère des résultats

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

quantitatifs précis (écart-type égal à 0,2702 log UI/ml pour l'instrument ELITe InGenius et à 0,1925 log UI/ml pour l'instrument ELITe BeGenius) et exacts (biais égal à 0,3453 log UI/ml pour l'instrument ELITe InGenius et à -0,1462 log UI/ml pour l'instrument ELITe BeGenius) : 178 UI/ml.

La limite supérieure de quantification (ULoQ) a été définie à la concentration la plus élevée testée qui génère des résultats quantitatifs précis (écart-type égal à 0,0597 log UI/ml pour l'instrument ELITe InGenius et à 0,1590 log UI/ml pour l'instrument ELITe BeGenius) et exacts (biais égal à -0,0683 log UI/ml pour l'instrument ELITe InGenius et à 0,0249 log UI/ml pour l'instrument ELITe BeGenius) : 100 000 000 UI/ml.

La plage de mesure linéaire, exprimée en copies/ml pour le sang total prélevé sur EDTA, est calculée en appliquant le facteur de conversion spécifique indiqué à la page 27.

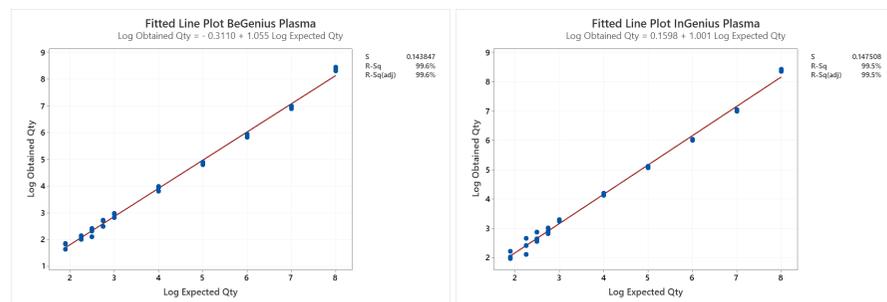
Les résultats finaux sont résumés dans le tableau suivant.

Plage de mesure linéaire pour les échantillons de sang total avec les instruments ELITe InGenius et ELITe BeGenius		
Unité de mesure	limite inférieure	limite supérieure
UI/ml	178	100 000 000
gEq/ml	254	142 857 143

Plasma (volume d'échantillon de 200 µl) :

La plage de mesure linéaire du produit CMV ELITe MGB® Kit, utilisé en association avec du plasma et les instruments **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius**, a été testée en utilisant un panel préparé en diluant un matériel de référence du CMV (Notovir, Italie) dans une matrice négative pour l'ADN du CMV. Le panel consistait en huit points de dilution à partir de 10⁸ jusqu'à 10² UI/ml. Chaque échantillon du panel a été testé en 3 réplicats.

L'analyse des données obtenues, réalisée par régression linéaire, a démontré que le test effectué en association avec des échantillons de plasma présentait une réponse linéaire pour tous les niveaux de dilution avec un coefficient de corrélation R-carré (R²) de 0,995 pour l'instrument ELITe InGenius et de 0,996 pour l'instrument ELITe BeGenius.



La limite inférieure de quantification (LLOQ) a été définie à la concentration de la LoD qui génère des résultats quantitatifs précis (écart-type égal à 0,2701 log UI/ml pour l'instrument ELITe InGenius et à 0,2114 log UI/ml pour l'instrument ELITe BeGenius) et exacts (biais égal à 0,3314 log UI/ml pour l'instrument ELITe InGenius et à -0,0619 log UI/ml pour l'instrument ELITe BeGenius) : 88 UI/ml.

La limite supérieure de quantification (ULoQ) a été définie à la concentration la plus élevée testée qui génère des résultats quantitatifs précis (écart-type égal à 0,0351 log UI/ml pour l'instrument ELITe InGenius et à 0,0675 log UI/ml pour l'instrument ELITe BeGenius) et exacts (biais égal à -0,3988 log UI/ml pour l'instrument ELITe InGenius et à -0,3865 log UI/ml pour l'instrument ELITe BeGenius) : 100 000 000 UI/ml.

La plage de mesure linéaire, exprimée en copies/ml pour le plasma EDTA, est calculée en appliquant le facteur de conversion spécifique indiqué à la page 30.

Les résultats finaux sont résumés dans le tableau suivant.

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

Plage de mesure linéaire pour les échantillons de plasma avec les instruments ELITe InGenius et ELITe BeGenius

Unité de mesure	limite inférieure	limite supérieure
UI/ml	88	100 000 000
gEq/ml	293	333 333 334

Autres matrices

La linéarité de ce test utilisé en association avec l'instrument **ELITe InGenius** a été vérifiée avec un panel de dilutions du CMV dans les différentes matrices suivantes : plasma (volume d'échantillon de 100 µl), liquide céphalorachidien, urine, prélèvement buccal à l'écouvillon, liquide amniotique, LBA/AB.

La linéarité en mode "**PCR Only**" de ce test a été déterminée en utilisant un panel de dilutions (1 Log10 entre deux dilutions) d'ADN plasmidique contenant le produit d'amplification dont la concentration initiale a été mesurée au spectrophotomètre. Les points du panel de 2 x 10⁶ molécules par réaction à 2 x 10¹ molécules par réaction ont été utilisés dans 5 réplicats pour effectuer l'amplification avec les produits ELITeGroup S.p.A. L'analyse des données obtenues, exécutée par régression linéaire, a démontré que le test présente une réponse linéaire pour tous les points du panel (coefficient de corrélation linéaire supérieur à 0,99).

La linéarité en mode "**Extract+PCR**" de ce test utilisé en association avec différentes matrices et **ELITe InGenius** a été vérifiée avec un panel de dilutions de CMV. Le panel a été préparé en diluant le "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC code 09/162, Royaume-Uni) dans une matrice négative pour l'ADN du CMV. Le panneau avait 5 étapes de dilution de 1 Log de 10⁶ à 10² UI / mL. Chaque point de panel a été testé en au moins 3 répétitions en effectuant la totalité de la procédure d'analyse, la préparation du coup, l'extraction, l'amplification en temps réel et l'interprétation des résultats avec **ELITe InGenius** et les produits ELITeGroup S.p.A. L'analyse des données obtenues, réalisée avec la régression linéaire, a montré que le test présente une réponse linéaire pour tous les points du panel.

Limites de la quantification

La limite inférieure de la gamme de mesure linéaire a été fixée à la concentration la plus faible qui donne 100% de positivité et des résultats quantitatifs exacts et précis à ± 0,5 Log UI / mL. La limite supérieure de la gamme de mesure linéaire a été fixée à la concentration la plus élevée testée qui donne des résultats quantitatifs exacts et précis à ± 0,5 Log IU / mL.

Les limites de la plage de mesure linéaire en gEq / mL ont été calculées en appliquant pour chaque matrice le facteur de conversion spécifique indiqué à la page. 25.

Les résultats finaux pour chaque matrice sont présentés dans les tableaux suivants.

Intervalle de mesure linéaire avec échantillons de plasma et ELITe InGenius

Volume d'échantillon	Unité de mesure	Seuil inférieur	Seuil supérieur
1000 µL	IU / mL	178	1,500,000
	gEq / mL	593	5,000,000

Intervalle de mesure linéaire avec échantillons de liquide céphalorachidien et ELITe InGenius

Volume d'échantillon	Unité de mesure	Seuil inférieur	Seuil supérieur
200 µL	UI / mL	101	15.000.000
	gEq / mL	335	50.000.000

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

REF RTK015PLD

Intervalle de mesure linéaire avec échantillons d'urine et ELITe InGenius

Volume d'échantillon	Unité de mesure	Seuil inférieur	Seuil supérieur
200 µL	UI / mL	316	35.000.000
	gEq / mL	451	50.000.000

Intervalle de mesure linéaire avec échantillons de écouvillons buccaux et ELITe InGenius

Volume d'échantillon	Unité de mesure	Seuil inférieur	Seuil supérieur
200 µL	UI / mL	100	10.000.000
	gEq / mL	500	50.000.000

Intervalle de mesure linéaire avec échantillons de liquide amniotique et ELITe InGenius

Volume d'échantillon	Unité de mesure	Seuil inférieur	Seuil supérieur
200 µL	UI / mL	100	10.000.000
	gEq / mL	500	50.000.000

Intervalle de mesure linéaire avec échantillons de BAL / BA et ELITe InGenius

Volume d'échantillon	Unité de mesure	Seuil inférieur	Seuil supérieur
200 µL	IU / mL	178	10.000.000
	gEq / mL	890	50.000.000

Répétabilité

La répétabilité des résultats obtenus avec le produit CMV ELITe MGB Kit en association avec les instruments **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** a été testée en analysant un panel d'échantillons de sang total prélevé sur EDTA. Le panel incluait un échantillon négatif et deux échantillons dopés avec un matériel de référence certifié du CMV [1er étalon international de l'OMS pour l'ADN du CMV (NIBSC code 09/162, Royaume-Uni)] à une concentration de 3 x la LoD (environ 327 UI/ml) et de 10 x la LoD (environ 1090 UI/ml).

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

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

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

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

Répétabilité intra-session, ELITe InGenius

Échantillon	CMV				Contrôle interne			
	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV
Négatif	0/8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	24,18	0,17	0,69
3 x la LoD	8/8	35,91	0,51	1,42				
10 x la LoD	8/8	33,98	0,29	0,86				

Répétabilité inter-sessions, ELITe InGenius

Échantillon	CMV				Contrôle interne			
	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV
Négatif	0/16	N.A.	N.A.	N.A.	48/48	24,20	0,22	0,90
3 x la LoD	16/16	36,09	0,78	2,15				
10 x la LoD	16/16	34,07	0,25	0,75				

Dans le test de répétabilité sur l'instrument **ELITe InGenius**, l'analyse détectait la cible CMV comme

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

REF RTK015PLD

attendu et montrait un faible % CV des valeurs Ct qui n'excédait pas 2,2 % pour le CMV et 0,9 % pour le contrôle interne.

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

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

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

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

Répétabilité intra-session, ELITe BeGenius

Échantillon	CMV				Contrôle interne			
	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV
Négatif	0/8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	27,21	0,38	1,39
3 x la LoD	8/8	37,21	0,49	1,33				
10 x la LoD	8/8	35,03	0,52	1,48				

Répétabilité inter-sessions, ELITe BeGenius

Échantillon	CMV				Contrôle interne			
	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV
Négatif	0/16	N.A.	N.A.	N.A.	48/48	27,18	0,37	1,38
3 x la LoD	16/16	37,51	0,61	1,63				
10 x la LoD	16/16	35,06	0,44	1,25				

Dans le test de répétabilité sur l'instrument **ELITe BeGenius**, l'analyse détectait la cible CMV comme attendu et montrait un faible % CV des valeurs Ct qui n'excédait pas 1,6 % pour le CMV et 1,4 % pour le contrôle interne.

Reproductibilité

La reproductibilité des résultats obtenus avec le produit CMV ELITe MGB Kit en association avec les instruments **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** a été testée en analysant un panel d'échantillons de sangre total. Le panel incluait un échantillon négatif et deux échantillons dopés avec un matériel de référence certifié du CMV [1er étalon international de l'OMS pour l'ADN du CMV (NIBSC code 09/162, Royaume-Uni)] à une concentration de 3 x la LoD (environ 327 UI/ml) et de 10 x la LoD (environ 1090 UI/ml).

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

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

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

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

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

Reproductibilité inter-instruments, ELITe InGenius

Échantillon	CMV				Contrôle interne			
	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV
Négatif	0/8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	25,31	0,71	2,82
3 x la LoD	8/8	35,96	0,81	2,26				
10 x la LoD	8/8	33,62	0,36	1,07				

Répétabilité inter-lots, ELITe InGenius

Échantillon	CMV				Contrôle interne			
	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV
Négatif	0/8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	25,20	0,65	2,59
3 x la LoD	8/8	35,97	0,65	1,82				
10 x la LoD	8/8	33,72	0,29	0,86				

Dans le test de reproductibilité sur l'instrument **ELITe InGenius**, l'analyse détectait la cible CMV comme attendu et montrait un faible % CV des valeurs Ct qui n'excédait pas 2,3 % pour le CMV et 2,8 % pour le contrôle interne.

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

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

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

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

Répétabilité inter-instruments, ELITe BeGenius

Échantillon	CMV				Contrôle interne			
	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV
Négatif	0/8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	28,29	0,48	1,69
3 x la LoD	8/8	36,06	0,46	1,27				
10 x la LoD	8/8	34,12	0,23	0,66				

Répétabilité inter-lots, ELITe BeGenius

Échantillon	CMV				Contrôle interne			
	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV
Négatif	0/8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	28,30	0,47	1,65
3 x la LoD	8/8	36,19	0,51	1,41				
10 x la LoD	8/8	34,22	0,12	0,36				

Dans le test de reproductibilité sur l'instrument **ELITe BeGenius**, l'analyse détectait la cible CMV comme attendu et montrait un faible % CV des valeurs Ct qui n'excédait pas 1,4 % pour le CMV et 1,7 % pour le contrôle interne.

Précision et Fidélité Inter-sessions

La précision du test, comme la variabilité des résultats obtenus lors de séances d'amplification réalisées sur plusieurs jours, a permis d'obtenir un coefficient de variation en pourcentage maximum (CV%) des valeurs de Ct inférieures à 1,95%, dans l'intervalle de 10⁵ génomes équivalents à 10² molécule génomes équivalents par réaction.

La fidélité du test, définie comme la différence entre la moyenne des résultats obtenus au cours d'un même cycle d'amplification avec différents réplicats d'un échantillon et la valeur théorique de la

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

concentration de l'échantillon, a permis de relever un manque de fidélité moyen des quantités mesurées d'environ 27%, dans l'intervalle de 10⁵ génomes équivalents à 10² génomes équivalents par mL.

La précision du dosage, comme la différence entre les résultats moyens obtenus dans les séances d'amplification effectuées sur plusieurs jours et la valeur théorique de la concentration de l'échantillon, a conduit à un pourcentage moyen de précision des quantités mesurées d'environ 18%, varie de 10⁵ génomes équivalents à 10² gènes équivalents par mL.

Reproductibilité avec panel de matériel de référence certifié

La sensibilité analytique du test a été évaluée en utilisant comme matériel de référence calibré deux panels de «CMV Molecular "Q" Panel» (Qnostics, Ltd). Chaque échantillon du panel a été utilisé dans 2 réplicats pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction d'amplification, de révélation et d'interprétation des résultats avec **ELITe InGenius** et les produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats, obtenu à partir de 200 µL d'échantillon, sont reportés dans le tableau ci-dessous.

Tests avec matériel de référence certifié et ELITe InGenius

Échantillon	Titre nominal UI / mL	Titre nominal Log10	Positifs / Réplicats	Moyenne des résultats Log UI / mL
CMVMQP01-High	10 ⁵	5,000	2/2	5,024
CMVMQP01-Medium	10 ⁴	4,000	2/2	3,996
CMVMQP01-Low	10 ³	3,000	2/2	3,060
CMVMQP01-Negative	Négatif	-	0/2	-

Tous les échantillons positifs ont été correctement détectés avec un titre qui s'inscrit dans l'intervalle de ± 0,5 Log défini pour la valeur.

Les résultats, obtenu à partir de 1000 µL d'échantillon, sont reportés dans le tableau ci-dessous.

Tests avec matériel de référence certifié et ELITe InGenius

Échantillon	Titre nominal UI / mL	Titre nominal Log UI / mL	Positifs / Réplicats	Moyenne des résultats Log UI / mL
CMVMQP01-High	10 ⁵	5,000	2/2	4,679
CMVMQP01-Medium	10 ⁴	4,000	2/2	3,717
CMVMQP01-Low	10 ³	3,000	2/2	2,733
CMVMQP01-Negative	negativo	-	0/2	-

Tous les échantillons positifs ont été correctement détectés avec un titre qui s'inscrit dans l'intervalle de ± 0,5 Log défini pour la valeur.

La sensibilité analytique du test a été évaluée en utilisant comme matériel de référence un panel de dilution CMV Panel « QCMD 2014 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel » (Qnostics Ltd, Royaume Uni.) Chaque échantillon du panel a été utilisé dans 2 réplicats pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction d'amplification, de révélation et d'interprétation des résultats avec **ELITe InGenius** et les produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats en UI / mL ont été calculés en appliquant le facteur de conversion pour **ELITe InGenius** et pour le plasma et ils sont reportés dans le tableau ci-dessous.

Tests avec matériel de référence certifié et ELITe InGenius

Échantillon	Consensus Log10 conc. virale	Déviat standard	Positifs / Réplicats	Moyenne des résultats Log10 UI / mL
CMVDNA14-01	2,468	0,343	2/2	2,256
CMVDNA14-02	3,034	0,281	2/2	2,915
CMVDNA1403	3,383	0,368	2/2	3,185
CMVDNA14-04	3,014	0,251	2/2	2,976
CMVDNA14-05	1,859	0,462	2/2	1,706
CMVDNA14-06	2,767	0,325	2/2	2,526
CMVDNA14-07	4,030	0,280	2/2	3,924

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

REF RTK015PLD

Tests avec matériel de référence certifié et ELITe InGenius				
CMVDNA14-08	Négatifs	NA	0/2	-
CMVDNA14-09	2,065	0,512	2/2	1,273
CMVDNA14-10	3,947	0,278	2/2	3,946

Tous les échantillons ont été correctement détectés. Dans l'analyse quantitative, 8/9 échantillons positifs ont été quantifiés dans l'intervalle défini par le Consensus ± 1 déviation standard et un échantillon (CMVDNA14-09) a été quantifié dans l'intervalle défini par le consensus à ± 2 déviations standards. Ceci peut être expliqué par le titre de l'échantillon au-dessous de la limite inférieure de quantification.

D'autres tests ont été effectués utilisant comme matériel de référence un panel de dilution «AcroMetrix® CMV_{ic} Panel» (Acrometrix, Life Technologies; États-Unis). Chaque échantillon du panel a été utilisé dans 2 réplicats pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction d'amplification, de révélation et d'interprétation des résultats avec **ELITe InGenius** et les produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats en UI / mL ont été calculés en appliquant le facteur de conversion pour **ELITe InGenius** et pour le plasma et ils sont reportés dans le tableau ci-dessous.

Tests avec matériel de référence certifié et ELITe InGenius				
Échantillon	Titre nominal UI / mL	Titre nominal Log10	Positifs / Réplicats	Moyenne des résultats Log UI / mL
CMV DNA 3E6	3.000.000	6,477	2/2	6,386
CMV DNA 3E5	300.000	5,477	2/2	5,444
CMV DNA 3E4	30.000	4,477	2/2	4,473
CMV DNA 3E3	3.000	3,477	2/2	3,441
CMV DNA 3E2	300	2,477	2/2	2,575

Tous les échantillons positifs ont été correctement détectés avec un titre qui s'inscrit dans l'intervalle de $\pm 0,5$ Log défini pour la valeur.

D'autres tests, à partir de 1000 μ l d'échantillon, ont été effectués en utilisant comme matériel de référence un panel de dilution CMV "QCMD 2017 Cytomegalovirus DNA EQA Panel" (Qnostics Ltd, Royaume-Uni). Chaque panel a été utilisé dans 2 réplicats pour effectuer l'analyse, l'extraction, l'amplification, la détection et l'interprétation complètes des résultats avec **ELITe InGenius** et ELITechGroup S.p.A.

Les résultats en UI / mL ont été calculés en appliquant le facteur de conversion pour **ELITe InGenius** et pour le plasma et ils sont reportés dans le tableau ci-dessous.

Tests avec matériel de référence certifié et ELITe InGenius			
Échantillon	Consensus Log UI / mL	Positifs / Réplicats	Moyenne des résultats Log UI / mL
CMVDNA17S-01	2,431	2/2	2,362
CMVDNA17S-02	3,762	2/2	3,665
CMVDNA17S-03	3,920	2/2	3,822
CMVDNA17S-04	2,847	2/2	2,671
CMVDNA17S-05	2,572	2/2	2,189
CMVDNA17S-06	2,849	2/2	2,658
CMVDNA17S-07	3,902	2/2	3,785
CMVDNA17S-08	3,746	2/2	3,667
CMVDNA17S-09	Negative	0/2	-
CMVDNA17S-10	3,900	2/2	3,707

Tous les échantillons positifs ont été correctement détectés avec un titre qui s'inscrit dans l'intervalle de $\pm 0,5$ Log défini pour la valeur.

Facteur de conversion en Unités Internationales

Le facteur de conversion à utiliser avec ce test pour transformer le résultat quantitatif de gEq / mL en Unités Internationales / mL a été déterminé en utilisant un panel de matériel de référence calibré approuvé par l'OMS ("1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification

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

REF RTK015PLD

Techniques", NIBSC, Royaume-Uni, code 09/162) dans les différentes matrices négatives pour l'ADN du CMV et en association avec **ELITe InGenius**. Le panneau a eu au moins 3 étapes de dilution de 1 Log. Chaque point du panel a été testé dans au moins 10 réplicats en effectuant la procédure d'analyse complète, la préparation du trait, l'extraction, l'amplification en temps réel et l'interprétation des résultats avec **ELITe InGenius** et ELITechGroup S.p.A.

Les résultats finaux pour chaque matrice sont présentés dans les tableaux suivants.

Conversion en Unités Internationales avec ELITe InGenius		
Volume d'échantillon	Matrice	Fc (UI / gEq)
200 μ L	sang total	0,7
	plasma	0,3
	liquide céphalorachidien	0,3
	urine	0,7
	écouvillons buccaux	0,2
	liquide amniotique	0,2
1000 μ L	BAL / BA plasma	0,3

Le facteur de conversion du CMV ELITe MGB® Kit utilisé en association avec du **sang total** prélevé sur EDTA et les instruments **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** a été vérifié avec un panel de dilutions du CMV. Le panel a été préparé en diluant le « 1er étalon international de l'OMS pour les techniques d'amplification des acides nucléiques du cytomégalovirus humain » (NIBSC code 09/162, Royaume-Uni) dans une matrice négative pour l'ADN du CMV. Le panel consistait en sept points de dilution à partir d'environ 10^6 UI/ml jusqu'à $10^{2,5}$ UI/ml. Chaque échantillon du panel a été testé en 3 réplicats.

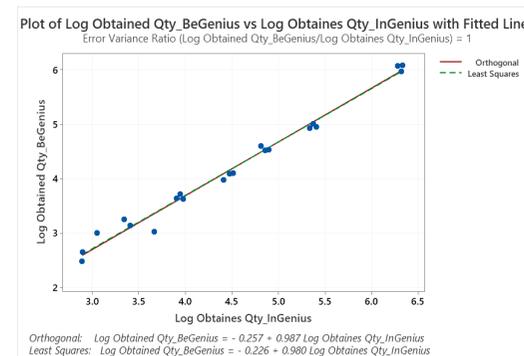
La précision de quantification cible, en tant qu'écart-type des log UI/ml, était inférieure à 0,5 log pour les deux instruments **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius**.

La précision de quantification cible, en tant que différence entre les concentrations théorique et mesurée en log UI/ml, était inférieure à 0,5 log pour les deux instruments **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius**.

Ces résultats confirmaient les facteurs de conversion calculés pour le sang total avec l'instrument **ELITe InGenius**.

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

Les résultats sont résumés sur la figure suivante.



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

REF RTK015PLD

L'analyse de régression orthogonale générait une ordonnée à l'origine de -0,257 (IC à 95 % : -0,503 ; -0,011) et une pente de 0,987 (IC à 95 % : 0,934 ; 1,040). L'analyse de régression linéaire générait un R2 de 0,986.

Le facteur de conversion du CMV ELITe MGB® Kit utilisé en association avec du plasma prélevé sur EDTA et les instruments **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** a été vérifié avec un panel de dilutions du CMV. Le panel a été préparé en diluant le « 1er étalon international de l'OMS pour les techniques d'amplification des acides nucléiques du cytomégalovirus humain » (NIBSC code 09/162, Royaume-Uni) dans une matrice négative pour l'ADN du CMV. Le panel consistait en huit points de dilution à partir d'environ 10⁶ UI/ml jusqu'à 10² UI/ml. Chaque échantillon du panel a été testé en 3 réplicats.

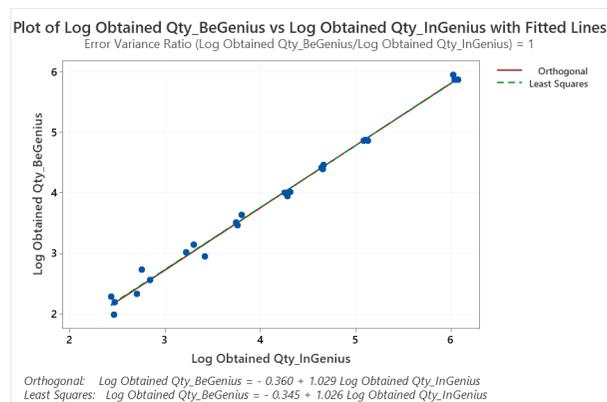
La précision de quantification cible, en tant qu'écart-type des log UI/ml, était inférieure à 0,5 log pour les deux instruments **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius**.

La précision de quantification cible, en tant que différence entre les concentrations théorique et mesurée en log UI/ml, était inférieure à 0,5 log pour les deux instruments **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius**.

Ces résultats confirmaient les facteurs de conversion calculés pour le sang total avec l'instrument **ELITe InGenius**.

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

Les résultats sont résumés sur la figure suivante.



Dans ce test, l'analyse de régression orthogonale générait une pente de 1,029 (IC à 95 % : 0,993-1,065) et une ordonnée à l'origine de -0,360 (IC à 95 % : -0,510 ; -0,209). L'analyse de régression linéaire générait un R2 de 0,993.

Robustesse: absence de contamination croisée

La robustesse du test, ainsi que l'absence de contamination croisée, a été vérifiée en analysant les résultats de cinq sessions dans lesquelles des échantillons négatifs pour l'ADN du CMV ont été alternés avec des échantillons positifs pour l'ADN du CMV. Aucun échantillon négatif pour l'ADN du CMV n'était positif.

L'absence de contamination croisée a été vérifiée à l'aide d'un échantillon de sang total négatif pour l'ADN du CMV avec le matériel de référence calibré approuvé par l'OMS (« 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques », NIBSC 09/162, Royaume-Uni) à une charge virale de 10 000 UI / mL et un échantillon de sang total négatif pour l'ADN du CMV. Cinq séries de 12 échantillons, alternant un échantillon positivisé avec un échantillon négatif, ont été utilisés pour effectuer l'analyse complète, l'extraction, l'amplification, la détection et l'interprétation des résultats avec **ELITe InGenius** et les produits de ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

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

REF RTK015PLD

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé sur l'EDTA positivisé pour l'ADN du CMV	30	30	0
Sang total prélevé sur l'EDTA négatif pour l'ADN du CMV	30	0	30

Robustesse: taux d'erreur global du système

La robustesse du test, en tant que taux d'erreur global du système conduisant à des résultats faussement négatifs, a été vérifiée en effectuant une analyse en panel d'échantillons positivement testés pour l'ADN du CMV à faible titre et égal à 1,7% .

Le taux d'erreur global a été vérifié à l'aide d'un panel d'échantillons de sang total négatif pour l'ADN du CMV positivisé avec le matériau de référence calibré et certifié CMVDNA12-01, un échantillon du panel "QCMD 2012 Human Cytomegalovirus EQA Panel" (Qnostics Ltd, Royaume-Uni), à une charge virale de 750 UI / mL. Chaque échantillon a été utilisé pour effectuer l'analyse complète, l'extraction, l'amplification, la détection et l'interprétation des résultats avec **ELITe InGenius** et les produits de ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé sur l'EDTA positivisé pour l'ADN du CMV	60	59	1

Sensibilité diagnostique: confirmation d'échantillons positifs

Sang total et plasma (volume d'échantillon de 200 µl) :

La sensibilité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons cliniques positifs, a été évaluée en analysant quelques échantillons cliniques qui étaient positifs pour l'ADN du CMV en association avec l'instrument **ELITe InGenius**. Dans la mesure où l'instrument **ELITe BeGenius** a montré des performances analytiques équivalentes à celles de l'instrument **ELITe InGenius**, on peut supposer que les résultats de sensibilité diagnostique obtenus avec l'instrument **ELITe InGenius** sont également applicables à l'instrument **ELITe BeGenius**.

La sensibilité diagnostique du test, confirmée par des échantillons cliniques positifs, a été évaluée en utilisant des échantillons cliniques positifs pour l'ADN du CMV.

Les tests, à partir de 200 µL d'échantillon ont été réalisés sur:

- 60 échantillons de sang prélevés dans EDTA positif pour l'ADN CMV (testé avec un produit CE-IVD d'amplification en temps réel).
- 54 échantillons de plasma prélevés sur EDTA de patients positifs pour l'ADN CMV (testé avec un produit CE-IVD d'amplification en temps réel).

Chaque échantillon a été utilisé pour effectuer la totalité de la procédure d'analyse, l'extraction, l'amplification, la détection et l'interprétation des résultats avec l'**ELITe InGenius** et produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Volume d'échantillon	Échantillons	N	positifs	négatifs
200 µL	Sang total prélevé sur EDTA positifs pour l'ADN de CMV	60	60	0
	Plasma prélevé sur EDTA positifs pour l'ADN de CMV	54	54	0

Tous les échantillons, analysés à partir de 200 µL d'échantillon, étaient valables pour l'analyse et confirmés positifs. La sensibilité diagnostique du test dans ces tests était égale à 100%.

Autres matrices

La sensibilité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons cliniques positifs, a été évaluée en analysant certains échantillons cliniques positifs pour l'ADN du CMV en association avec **ELITe InGenius** et les matrices suivantes : plasma (volume de l'échantillon 1000 µL), liquide céphalorachidien, urine, écouvillon buccal, liquide amniotique, BAL / BA.

Le test, à partir de 200 µL d'échantillon, a été réalisé sur :

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF

RTK015PLD

- 20 échantillons de liquide céphalorachidien de négatif pour l'ADN CMV, qui ont été positivisée pour l'ADN CMV en ajoutant "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC, Royaume-Uni, code 09/162).
- 31 échantillons d'urine de patients positifs pour l'ADN CMV (testé avec un produit CE-IVD d'amplification en temps réel).
- 50 échantillons de frottis buccal négatifs pour l'ADN CMV, qui ont été positivisée pour l'ADN CMV en ajoutant "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC, Royaume-Uni, code 09/162).
- 11 des échantillons de liquide amniotique de patients positifs pour l'ADN CMV (testé avec un produit CE-IVD d'amplification en temps réel) et de 20 échantillons de liquide amniotique négatifs pour l'ADN CMV, qui sont nous avons été positivisée pour l'ADN CMV en ajoutant "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC, Royaume-Uni, le code 09/162).
- 49 échantillons BAL / BA de patients positifs pour l'ADN du CMV (testés avec un produit d'amplification en temps réel CE IVD).

Le test, à partir de 1000 µL d'échantillon, a été réalisé sur 60 échantillons de plasma prélevés en EDTA chez des patients qui étaient positifs pour l'ADN du CMV (testé avec un produit IVD CE à amplification en temps réel).

Chaque échantillon a été testé en effectuant toute la procédure d'analyse, l'extraction, l'amplification, la détection et l'interprétation des résultats avec **ELITe InGenius** et avec les produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Volume d'échantillon	Échantillons	N	positifs	négatifs
200 µL	Liquide céphalorachidien positivisé pour l'ADN du CMV	20	20	0
	Urine positive pour l'ADN du CMV	31	31	0
	Écouvillons buccaux positivisés pour l'ADN du CMV	50	50	0
	Liquide amniotique positif ou positivisé pour l'ADN du CMV	31	31	0
	BAL / BA positif pour l'ADN du CMV	49	49	0
1000 µL	Plasma prélevé sur EDTA positifs pour l'ADN de CMV	60	58	2

Tous les échantillons de toutes les matrices, analysés à partir de 200 µL de volume, ont été confirmés positifs. La sensibilité diagnostique de l'essai, dans ces tests, était égale à 100% pour chaque matrice.

Tous les échantillons de plasma, analysés à partir de 1000 µL de volume, étaient valides pour l'analyse, 58 des 60 échantillons de plasma ont été confirmés positifs, deux échantillons étaient discrètement négatifs.

La sensibilité diagnostique de l'essai, dans ce test, était égale à 96,6 % pour le plasma.

Spécificité diagnostique: confirmation d'échantillons négatifs**Sang total et plasma (volume d'échantillon de 200 µl) :**

La spécificité diagnostique de l'analyse, en tant que confirmation des échantillons négatifs, a été évaluée en analysant quelques échantillons cliniques qui étaient négatifs pour l'ADN du CMV en association avec l'instrument **ELITe InGenius**. Dans la mesure où l'instrument **ELITe BeGenius** a montré des performances analytiques équivalentes à celles de l'instrument **ELITe InGenius**, on peut supposer que les résultats de spécificité diagnostique obtenus avec l'instrument **ELITe InGenius** sont également applicables à l'instrument **ELITe BeGenius**.

Les tests, à partir de 200 µL d'échantillon ont été réalisés sur:

- 59 échantillons de sang total prélevés dans l'EDTA, négatifs pour l'ADN du CMV (testés avec un

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF

RTK015PLD

produit CE IVD d'amplification en temps réel).

- 58 échantillons de plasma prélevés dans de l'EDTA, négatifs pour l'ADN du CMV (testés avec un produit CE IVD d'amplification en temps réel).

Chaque échantillon a été testé en effectuant toute la procédure d'analyse, extraction, amplification, détection et interprétation des résultats avec **ELITe InGenius** et avec les produits ELITechGroup S.p.A..

Volume d'échantillon	Échantillons	N	positifs	négatifs
200 µL	Sang total prélevé sur l'EDTA négatif pour l'ADN du CMV	59	4	55
	Plasma prélevé sur l'EDTA négatif pour l'ADN du CMV	58	1	57

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Tous les échantillons étaient valides pour l'analyse. La valeur de contrôle interne était inférieure au seuil de contrôle interne fixé à 35 pour les deux matrices.

Cinquante-cinq (55) des 59 échantillons de sang total ont été confirmés négatifs pour l'ADN du CMV, alors que quatre échantillons présentaient des résultats faiblement positifs et discordants. Ce résultat peut s'expliquer par la limite de détection de la méthode de référence qui est supérieure à la limite de détection du produit concerné.

La spécificité diagnostique du test en association avec la matrice du sang total dans ce test était égale à 93.2%.

Cinquante-sept (57) échantillons sur 58 ont été confirmés négatifs, alors qu'un échantillon était un discordant positif faiblement positif.

La spécificité diagnostique du test en association avec la matrice plasmatique dans ce test était égale à 98.3%.

Autres matrices

La spécificité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons négatifs, a été évaluée en analysant certains échantillons cliniques négatifs pour l'ADN du CMV en association avec **ELITe InGenius** et les matrices suivantes : plasma (volume de l'échantillon 1000 µL), liquide céphalorachidien, urine, écouvillon buccal, liquide amniotique, BAL / BA.

Le test, à partir de 200 µL d'échantillon, a été réalisé sur :

- 7 échantillons de CSF, négatifs pour l'ADN du CMV (testés avec un produit CE IVD d'amplification en temps réel) et 3 échantillons de CSF, présumés négatifs pour l'ADN du CMV.
- 8 échantillons d'urine, négatifs pour l'ADN du CMV (testé avec un produit d'amplification CE IVD en temps réel) et 46 échantillons d'urine, présumés
- 52 écouvillons buccaux, présumés négatifs pour l'ADN du CMV.
- 10 échantillons de liquide amniotique, négatif pour l'ADN du CMV (testé avec un produit CE IVD d'amplification en temps réel) et 22 échantillons de liquide amniotique, présumés négatifs pour l'ADN du CMV.
- 49 échantillons BAL / BA négatifs pour l'ADN du CMV (testés avec un produit d'amplification en temps réel CE IVD).

Les tests, à partir de 1000 µl d'échantillon, ont été réalisés sur 62 échantillons de plasma prélevés en EDTA, négatifs pour l'ADN du CMV (testé avec un produit CE IVD d'amplification en temps réel).

Chaque échantillon a été utilisé pour effectuer l'analyse complète, l'extraction, l'amplification, la détection et l'interprétation des résultats avec **ELITe InGenius** et ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont reportés dans le tableau ci-dessous.

Volume d'échantillon	Échantillons	N	positifs	négatifs
200 µL	Liquide Céphalorachidien négatif ou présumé négatif pour l'ADN du CMV	20	0	20
	Urine négative ou présumée négative pour l'ADN du CMV	54	0	54
	Échantillons buccaux présomptifs négatifs pour l'ADN du CMV	52	2	50
	Liquide amniotique négatif ou présomptif négatif pour l'ADN du CMV	32	0	32
	BAL / BA négatif pour l'ADN du CMV	49	0	49
1000 µL	Plasma prélevé sur l'EDTA négatif pour l'ADN du CMV	57	3	54

Tous les échantillons, analysés à partir de 200 µL d'échantillon, étaient valables pour l'analyse. La valeur du contrôle interne était inférieure au seuil de contrôle interne qui est fixé à 35 pour toutes les matrices.

Cinquante (50) des 52 échantillons de prélèvements buccaux ont été confirmés négatifs pour l'ADN du CMV, tandis que deux échantillons étaient discordants positifs avec des titres faibles.

La spécificité diagnostique du test en association avec la matrice tampon buccale dans ce test était égale à 96%.

Tous les échantillons de liquide amniotique, d'urine, de liquide céphalorachidien et de BAL / BA ont été confirmés négatifs.

La spécificité diagnostique du test en association avec la matrice liquide amniotique, l'urine et le liquide céphalorachidien était égale à 100%

Tous les échantillons, analysés à partir de 1000 µL d'échantillon, étaient valables pour l'analyse.

Cinquante-quatre (54) échantillons sur 57 échantillons ont été confirmés négatifs pour l'ADN du CMV, trois (3) échantillons ont été positifs, les résultats divergents.

La spécificité diagnostique du test dans ce test est égale à 94,7%.

La spécificité diagnostique du test était égale à 97,4%.

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

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES

Échantillons

Ce produit doit être utilisé avec l'ADN extrait à partir des échantillons cliniques suivants:

Sang total prélevé dans un tube EDTA

Les échantillons de sang total destinés à l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés dans un tube EDTA et suivant les indications du laboratoire. Ils doivent être transportés à +2°C / +8°C et conservés à +2°C / +8°C pendant un maximum de trois jours. 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. En cas d'utilisation d'échantillons congelés, il est nécessaire de les décongeler juste avant l'extraction afin d'éviter une éventuelle dégradation des acides nucléiques.

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN à partir de sang total (échantillon cellulaire) avec le kit «EXTRAblood», suivre les indications fournies dans la Notice d'instructions et d'utilisation: partir d'un échantillon de 200 µL (2 millions de cellules maximum), éluer l'ADN dans 100 µL de tampon d'éluant.

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN d'échantillons de sang total (échantillon cellulaire), avec le kit **ELITe STAR** et **version logicielle 3.4.13** (ou suivantes), suivre le protocole d'extraction "UUNI_E100_S200_EL1" qui utilise 200 µL d'échantillon et élue extrait dans 100 µL. Dans le tube primaire, les échantillons peuvent être chargés directement sur l'automate «ELITe STAR». Il est toujours nécessaire de disposer d'un volume minimum de 700 µL de chaque échantillon. Ajouter 200 µL de contrôle interne CPE dans le tube de la solution Protéinase-Carrier comme indiqué dans la Notice d'instructions et d'utilisation du kit d'extraction. Pour tout détail sur la procédure d'extraction, suivre les indications fournies dans la Notice d'utilisation du kit.

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN d'échantillons de sang total (échantillon cellulaire), avec le kit **ELITe GALAXY** et **version logicielle 1.3.1** (ou suivantes), suivre le protocole d'extraction **xNA Extraction (Universal)** qui utilise 300 µL d'échantillon et élue extrait dans 100 µL. Dans le tube primaire, les échantillons peuvent être chargés directement sur l'automate «ELITe GALAXY». Il est toujours nécessaire de disposer d'un volume minimum de 400-650 µL de chaque échantillon. Préparer 10 µL de CPE pour chaque échantillon. CPE doit être ajoutée la solution **IC + Carrier solution** comme indiqué dans la Notice d'instructions et d'utilisation du kit d'extraction. Pour tout détail sur la procédure d'extraction, suivre les indications fournies dans la Notice d'utilisation du kit.

Remarque: lors de l'extraction d'ADN à partir de sang total avec l'instrument «NucliSENS® easyMAG®», suivre le protocole d'extraction **Generic 2.0.1** et les indications ci-dessous : distribuer 100 µL d'échantillon dans la bande de 8 puits, charger la bande sur l'instrument et lancer l'extraction sans incubation pour la lyse; après ajout d'**EasyMAG® Lysis Buffer** par l'instrument, mélanger trois fois le contenu de la bande, directement sur l'instrument, en utilisant la pipette multicanaux fournie. Utiliser le programme 3, laisser incuber pendant 10 minutes puis, à l'aide de la pipette multicanaux, ajouter l'**EasyMAG® Magnetic Silica** au contenu de la bande, et le programme 3; poursuivre avec l'extraction, récupérer l'ADN avec 50 µL de tampon d'éluant.

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN d'échantillons de sang total à l'aide de l'instrument «**QIASymphony® SP/AS**» et du kit «**QIASymphony® DNA Mini Kit**», **logiciel version 3.5**, suivre le protocole d'extraction **Virus Blood_200_V4_default IC** et les consignes suivantes: l'instrument est en mesure d'utiliser directement le tube primaire, le volume d'échantillon prélevé pour l'extraction est de 200 µL, il est toujours nécessaire de disposer d'un volume mort de 100 µL minimum. Sur l'instrument, à la position "contrôle interne" prévue pour les tubes, charger les tubes contenant le tampon ATE, en suivant les indications fournies dans la Notice d'utilisation du kit ; indiquer la position sur laquelle seront dispensés les éluas et préciser le volume d'éluant à 60 µL (l'éluant se produit dans 90µL effectifs dont 60 µL sont récupérés.) Pour tout détail sur la procédure d'extraction, suivre les indications fournies dans la Notice d'utilisation du kit.

Plasma prélevé dans un tube EDTA

Les échantillons de plasma destinés à l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés dans un tube EDTA et suivant les indications du laboratoire. Ils doivent être transportés à +2°C / +8°C et conservés à +2°C / +8°C pendant un maximum de trois jours. 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.

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

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN d'échantillons de plasma, avec le kit **ELITe STAR** et **version logicielle 3.4.13** (ou suivantes), suivre le protocole d'extraction "**UUNI_E100_S200_ELI**" qui utilise 200 µL d'échantillon et élue extrait dans 100 µL. Dans le tube primaire, les échantillons peuvent être chargés directement sur l'automate « **ELITe STAR** ». Il est toujours nécessaire de disposer d'un volume minimum de 700 µL de chaque échantillon. Ajouter **200 µL** de contrôle interne **CPE** dans le tube de la solution Protéinase-Carrier comme indiqué dans la Notice d'instructions et d'utilisation du kit d'extraction. Pour tout détail sur la procédure d'extraction, suivre les indications fournies dans la Notice d'utilisation du kit.

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN d'échantillons de plasma, avec le kit **ELITe GALAXY** et **version logicielle 1.3.1** (ou suivantes), suivre le protocole d'extraction **xNA Extraction (Universal)** qui utilise 300 µL d'échantillon et élue extrait dans 100 µL. Dans le tube primaire, les échantillons peuvent être chargés directement sur l'automate **ELITe GALAXY**. Il est toujours nécessaire de disposer d'un volume minimum de 400-650 µL de chaque échantillon. Préparer **10 µL** de **CPE** pour chaque échantillon. CPE doit être ajoutée à la solution **IC + Carrier solution** comme indiqué dans la Notice d'instructions et d'utilisation du kit d'extraction. Pour tout détail sur la procédure d'extraction, suivre les indications fournies dans la Notice d'utilisation du kit.

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN d'échantillons de plasma à l'aide de l'instrument «**QIASymphony® SP/AS**» et du kit «**QIASymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit**», et **logiciel version 3.5**, suivre le protocole d'extraction "**Virus Cell free 500_V3_DSP_default IC**" et les consignes suivantes: l'instrument est en mesure d'utiliser directement le tube primaire, le volume d'échantillon prélevé pour l'extraction est de **500 µL**, il est toujours nécessaire de disposer d'un volume mort de 100 µL minimum. Préparer la solution contenant le tampon AVE et l'ARN entraîneur (carrier) en suivant les instructions de la Notice d'utilisation du kit d'extraction. Ajouter à la solution **6 µL** de **CPE** pour chaque échantillon demandé. Sur l'instrument, à la position "contrôle interne" prévue pour les tubes, charger les tubes contenant la solution, en suivant la Notice d'utilisation du kit; indiquer la position sur laquelle seront dispensés les éluas et préciser le volume d'éluion à **85 µL**. Pour tout détail sur la procédure d'extraction, suivre attentivement les indications fournies dans la Notice d'utilisation du kit.

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.

Remarque: lors de l'extraction d'ADN à partir de liquide céphalorachidien avec l'instrument «**NucliSENS® easyMAG®**», suivre le protocole d'extraction **Generic 2.0.1** et les indications ci-dessous: distribuer **500 µL** d'échantillon dans la bande de 8 puits, charger la bande sur l'instrument et lancer l'extraction; Après 10 minutes d'incubation ajouter **5 µL** de **CPE** pour le contrôle interne avant ajouter l'**EasyMAG® Magnetic Silica** au contenu de la bande avec la pipette multicanaux et le programme 3; poursuivre avec l'extraction, récupérer l'ADN avec **100 µL** de tampon d'éluion.

Urine

Les échantillons d'urines destinés à l'extraction des acides nucléiques doivent être récoltés dans des contenants 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. Autrement, ils doivent être conservés à +2 / +8 °C pendant un maximum de trois jours. Si possible, éviter de congeler les échantillons d'urine 1er jet. La congélation des échantillons d'urines 1er jet peut entraîner la précipitation des inhibiteurs et la perte du titre d'ADN.

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 et de les conservés à -20 °C pendant un maximum de trente jours ou à -70 °C pour une période de temps plus longue.

Remarque: lors de l'extraction d'ADN à partir de urine avec l'instrument «**NucliSENS® easyMAG®**», suivre le protocole d'extraction **Generic 2.0.1** et les indications ci-dessous: distribuer **500 µL** d'échantillon dans la bande de 8 puits, charger la bande sur l'instrument et lancer l'extraction; Après 10 minutes d'incubation ajouter **5 µL** de **CPE** pour le contrôle interne avant ajouter l'**EasyMAG® Magnetic Silica** au contenu de la bande avec la pipette multicanaux et le programme 3; poursuivre avec l'extraction, récupérer l'ADN avec **100 µL** de tampon d'éluion.

Autres échantillons :

Il n'y a pas de données disponibles concernant la performance du produit avec l'ADN extrait des échantillons cliniques suivants : écouvillon buccal, liquide amniotique, lavage broncho-alvéolaire (LBA) et aspiration bronchique (BA), suspensions de leucocytes, suspensions de granulocytes.

Substances interférentes

L'ADN extrait de l'échantillon ne doit pas contenir d'héparine, d'hémoglobine, de dextran, de Ficoll®, d'éthanol ou de 2-propanol. Ceci afin d'éviter des phénomènes d'inhibition et des résultats erronés trop fréquents.

Des quantités élevées d'ADN génomique humain dans l'ADN extrait de l'échantillon peuvent inhiber la réaction d'amplification.

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

Contrôles d'amplification

Chaque session d'amplification doit impérativement être validée en préparant une réaction de contrôle négatif et une réaction de contrôle positif.

Comme contrôle négatif utiliser de l'eau ultra pure pour la biologie (non fournie avec le kit).

Comme contrôle positif, utiliser les produits «**CMV - ELITe Positive Control**» ou «**CMV Q-PCR Standard**».

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.

Les contrôles externes doivent être utilisés en conformité l'État, les organismes d'accréditation fédéraux locaux. Exemple de contrôle externes disponibles sur le marché est l'"CMV Molecular Q Panel" (code CMVMQP01, Qnostics Ltd, Royaume Uni).

Cycle de température		
Phase	Températures	Temps
Décontamination	50 °C	2 min.
Dénaturation initiale	94 °C	2 min.
Amplification et détection (45 cycles)	94 °C	10 sec.
	60 °C (acquisition de la fluorescence)	30 sec.
	72 °C	20 sec.
Dissociation (option)	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 les tubes contenant les échantillons à analyser. Agiter délicatement les tubes, les centrifuger pendant 5 secondes pour reporter le contenu dans le fond et les conserver dans la glace;
- prendre et décongeler les tubes de **CMV Q - PCR Mix**. Chaque tube permet de préparer **25 réactions**. Agiter délicatement les tubes, les centrifuger pendant 5 secondes en reportant le contenu dans le fond et les conserver dans la glace;
- prendre et décongeler le tube de **CMV - Positive Control** or les tubes de **CMV Q - PCR Standard**. Agiter délicatement les tubes, les centrifuger pendant 5 secondes pour reporter le contenu dans le fond et les conserver dans la glace;
- prendre l'**Amplification microplate**. La manipuler avec des gants sans poudre et veiller à ne pas endommager les puits.

1. Déposer délicatement et sans faire de bulles, **20 µL** du mélange de réaction «**CMV Q - PCR Mix**», dans le fond de l'**Amplification microplate** en suivant l'organisation définie précédemment dans la **Grille de travail**.

Remarque: Le reste de mélange de réaction résiduel doit être conservé à l'abri de la lumière, à -20°C et au maximum pendant un mois. Le mélange de réaction ne doit pas être congelé et décongelé plus que **5 FOIS**.

2. Conformément à la **Grille de travail** transférer délicatement **20 µL d'ADN** du premier échantillon dans le puits correspondant de l'**Amplification microplate**. Mélanger soigneusement l'échantillon et pipeter trois fois le volume de 20 µL dans le mélange de réaction. Ne pas faire de bulles. Procéder de la même façon avec tous les **ADN extraits**.

3. Pour le contrôle négatif d'amplification déposer délicatement dans le mélange de réaction **20 µL d'Eau ultra pure pour la biologie** (non incluse dans le produit), dans le puits correspondant de l'**Amplification microplate** conformément à l'organisation définie précédemment dans la **Grille de travail**. Mélanger soigneusement le contrôle négatif et pipeter trois fois l'**eau ultra pure pour la biologie** dans le mélange de réaction. Ne pas faire de bulles.

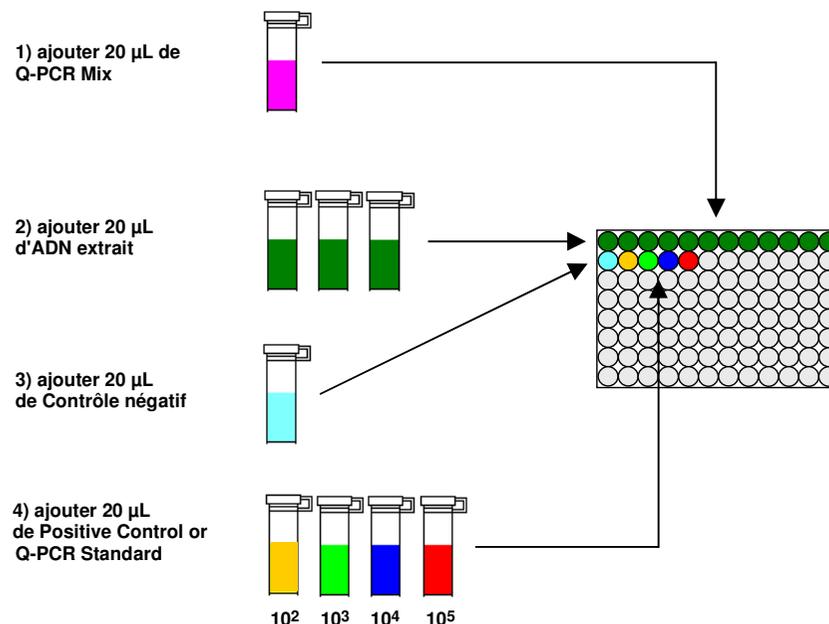
4. Lorsqu'un résultat **quantitatif** de l'analyse est requis, déposer délicatement dans le mélange de réaction **20 µL de CMV Q - PCR Standard 10²** dans le puits correspondant de l'**Amplification microplate** conformément à l'organisation définie précédemment dans la **Grille de travail**. Mélanger soigneusement le puits standard en pipétant trois fois le **CMV Q - PCR Standard 10²** dans le mélange de réaction. Ne pas faire de bulles. Procéder de la même manière avec les **CMV Q - PCR Standard 10³, 10⁴, 10⁵**.

5. Sceller soigneusement l'**Amplification microplate** à l'aide de l'**Amplification Sealing Sheet**.

6. Transférer l'**Amplification microplate** 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-CMV-ELITECHGROUP").

Remarque: Au terme du cycle d'amplification, l'**Amplification microplate** 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 microplate** afin d'éviter toute fuite des produits de réaction.

La figure ci-dessous illustre la préparation d'une réaction d'amplification.



Remarque: si la préparation de l'amplification est effectuée à l'aide de l'instrument «**QIASymphony® SP/AS**», introduire la microplaque contenant les extraits, les réactifs ainsi que la microplaque d'amplification dans les logements prévus en utilisant les adaptateurs fournis et suivre les instructions de la Notice d'utilisation du préparateur automatique et les étapes requises par le logiciel.

Remarque: si la préparation de l'amplification est effectuée à l'aide de l'instrument «**ELITe GALAXY**», charge la microplaque d'élution, le mélange réactionnel complet et la microplaque d'amplification suivre le manuel d'instructions pour l'utilisation de l'instrument et à la demande à partir de l'interface graphique GUI. Analyse qualitative des résultats

Les valeurs de la fluorescence émise par la sonde spécifique du CMV (détecteur FAM "CMV") 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 CMV élevé, la fluorescence FAM de la sonde spécifique pour CMV peut commencer à augmenter avant le 15ème cycle. Dans ce cas, l'intervalle de calcul du **Niveau de fluorescence de fond** doit être adapté. Il faut paramétrer l'intervalle de calcul 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 "CMV";
- programmer manuellement à **0,05 le Seuil (Threshold)** pour le détecteur VIC "CI".

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF

RTK015PLD

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

- programmer manuellement à **0,2** le **Seuil (Threshold)** pour le détecteur FAM "CMV";
- 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.

Dans la réaction d'amplification avec le **Positive Control***, la valeur du **Ct** pour CMV (Results > Report) est utilisée pour valider l'amplification et la détection, comme décrit dans le tableau suivant:

Réaction Q - PCR Standard 10 ⁵ CMV (FAM "CMV")	Résultat du test	Amplification / Révélation
Ct ≤ 25	POSITIF	CORRECTE

Si le résultat de la réaction d'amplification du **Positive Control** est **Ct > 25** ou **Ct non déterminé (Undetermined)** pour le CMV, la présence de l'ADN cible n'a pas été détectée correctement. Il y avait des problèmes dans la phase d'amplification ou de détection (distribution incorrecte du mélange réactionnel ou du contrôle positif, dégradation du mélange réactionnel ou du contrôle positif, réglage incorrect de la position du contrôle positif, réglage incorrect du cycle thermique) pouvant causer résultats incorrects. La session n'est pas valide et doit être répétée par la phase d'amplification.

*Remarque: lorsque ce produit est utilisé pour la quantification de l'ADN du CMV, la série de réactions avec les **Q - PCR Standard** a été définie à la place de la réaction avec le **Positive Control**. Dans ce cas, pour valider l'amplification et la détection, il convient de faire référence à la réaction d'amplification du **Q - PCR Standard 10⁵ (Ct ≤ 25)**.

Pour la réaction d'amplification du **Contrôle négatif**, la valeur du **Ct** de CMV (Results > Report) sert à valider l'amplification et la détection comme indiqué dans le tableau ci-dessous:

Réaction Contrôle négatif détecteur FAM "CMV"	Résultat du test	Amplification / Détection
Ct Non interprétable	NÉGATIF	CORRECTE

Si le résultat de la réaction d'amplification du **Contrôle négatif** est différent de **Ct Non interprétable (Undetermined)**, cela indique que de l'ADN cible a été détecté et que des problèmes sont apparus pendant la phase d'amplification (contamination) pouvant engendrer des résultats erronés et des faux positifs. La session de travail n'est pas valide et doit être recommencée à partir de la phase d'amplification.

Pour les **échantillons**, la valeur du **Ct** de CMV est utilisée pour détecter la présence de l'ADN cible et la valeur du **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 peut détecter une quantité minimale d'environ 11 génomes Équivalents par réaction, 279 génomes Équivalents par mL de sang total extrait avec le kit d'extraction «**EXTRAblood**» (voir caractéristiques des performances).

Les **Ct** des réactions d'amplification de chaque **échantillon** (Results > Report) doivent être interprétés comme suit:

Réaction de l'échantillon		Conformité de l'échantillon	Résultat du test	ADN de CMV
détecteur FAM "CMV"	détecteur VIC "CI"			
Ct Non interprétable	Ct > 35 ou Ct Non interprétable	non conforme	non valable	-
	Ct ≤ 35	conforme	valable, négatif	NON DETECTE

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF

RTK015PLD

Réaction de l'échantillon		Conformité de l'échantillon	Résultat du test	ADN de CMV
détecteur FAM "CMV"	détecteur VIC "CI"			
Ct Interprétable	Ct > 35 ou Ct Non interprétable	conforme	valable, positif	DETECTE
	Ct ≤ 35	conforme	valable, positif	DETECTE

Si le résultat d'un échantillon est **Ct Non interprétable** pour CMV et **Ct > 35** ou **Ct Non interprétable** pour le Contrôle interne, cela indique que l'ADN du Contrôle interne n'a pas été détecté correctement et que des problèmes sont apparus pendant la phase d'amplification (amplification inefficace ou nulle) ou lors de l'extraction (altération de l'ADN, quantité de cellules insuffisante dans l'échantillon, perte de l'ADN pendant l'extraction ou présence d'inhibiteurs). Ces problèmes peuvent engendrer des résultats erronés et des faux négatifs. L'échantillon n'est pas conforme, le test n'est pas valable et doit être recommencé à partir de l'extraction de l'échantillon.

Si le résultat d'un échantillon est **Ct Non interprétable** pour CMV et **Ct ≤ 35** pour le Contrôle interne, cela indique que l'ADN de CMV n'a pas été détecté dans l'échantillon. Il ne faut pas exclure la possibilité que l'ADN de CMV soit présent à un titre inférieur au seuil de détection du produit (voir Caractéristiques des performances). Dans ce cas, le résultat serait un faux négatif.

Les résultats obtenus avec ce test doivent être interprétés en tenant compte de toutes les données cliniques et des résultats des autres examens de laboratoire du patient.

Remarque: Lorsque, dans la réaction d'amplification d'un échantillon, la présence de l'ADN de CMV a été détectée, le Contrôle interne peut avoir un Ct > 35 ou Ct Non interprétable. En effet, la réaction d'amplification à faible efficacité du Contrôle interne peut être annulée par la compétition avec la réaction d'amplification à haute efficacité de CMV. Dans ce cas, l'échantillon est conforme et le résultat positif du test est valable.

Analyse quantitative des résultats

Après avoir analysé les résultats qualitatifs, il est possible de quantifier les échantillons positifs.

Les valeurs de **Ct** pour CMV dans les réactions d'amplification des quatre **Q - PCR standard** sont utilisées pour calculer la **Courbe standard** (Results > Standard Curve) de la session d'amplification et pour valider l'amplification et la détection comme décrit dans le tableau suivant:

Courbe standard détecteur FAM "CMV"	Intervalle d'acceptabilité	Amplification / Détection
Coefficient de corrélation (R2)	0,990 ≤ R2 ≤ 1,000	CORRECTE

Si le **r Coefficient de corrélation (R2)** ne s'inscrit pas dans les limites de l'intervalle d'acceptation, cela indique que l'ADN cible n'a pas été révélé correctement. Des problèmes sont survenus pendant la phase d'amplification ou de révélation (distribution erronée du mélange de réaction ou du contrôle positif, dégradation du mélange de réaction ou du contrôle positif, paramétrage erroné de la position du contrôle positif ou 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.

Les valeurs des **Ct** du CMV dans les réactions d'amplification de chaque **échantillon** et la **Courbe standard (Standard Curve)** (Results > Standard Curve) de la session sont utilisées pour calculer la **Quantité (Quantity)** d'ADN cible présente dans chaque échantillon.

Ce produit peut doser de 1.000.000 à environ 13 génomes Équivalents par réaction, de 25.000.000 à 316 génomes Équivalents par mL de sang total extrait avec le kit d'extraction «**EXTRAblood**» (voir caractéristiques des performances) comme illustré par le tableau ci-dessous:

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

Résultat de l'échantillon détecteur FAM "CMV"	génomés Équivalents de CMV par réaction
Quantité >1 x 10 ⁶	SUPÉRIEURS À 1.000.000
1,3 x 10 ¹ ≤ Quantité ≤ 1 x 10 ⁶	= Quantité
Quantité < 1,3 x 10 ¹	INFÉRIEURS À 13

Les résultats (**Quantité**) de chaque **échantillon** (Results > Report) sont utilisés pour calculer le nombre de génomés Équivalents (**gEq**) de CMV présents dans l'échantillon initial (**Nc**) selon la formule:

$$Nc = \frac{V_e \times \text{Quantité}}{V_c \times V_a \times E_p}$$

Où:

Vc est la quantité d'échantillon utilisée dans l'extraction exprimé selon l'unité de mesure requête;

Ep est l'efficacité de la procédure, extraction et amplification, **exprimée en décimales**;

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

Va est le volume de produit d'extraction utilisé dans la réaction d'amplification **exprimé en µL**;

Quantité est le résultat de la réaction d'amplification **exprimé en gEq par réaction**.

Pour obtenir le résultat en **gEq / mL** lorsqu'on utilise du sang total prélevé dans un tube EDTA avec le kit d'extraction «**EXTRABlood**» il faut utiliser la formule suivante:

Formule simplifiée pour sang total et «EXTRABlood»

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 25 \times \text{Quantité}$$

Pour obtenir le résultat en **gEq / mL** lorsqu'on utilise du sang total et plasma prélevé dans un tube EDTA avec le kit d'extraction **ELITe STAR** il faut utiliser la formule suivante:

Formule simplifiée pour sang total, plasma et ELITe STAR

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 28 \times \text{Quantité}$$

Pour obtenir le résultat en **gEq / mL** lorsqu'on utilise du sang total et plasma prélevé dans un tube EDTA avec le kit d'extraction **ELITe GALAXY** il faut utiliser la formule suivante:

Formule simplifiée pour sang total, plasma et ELITe GALAXY

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 35 \times \text{Quantité}$$

Pour obtenir le résultat en **gEq / mL** lorsqu'on utilise du sang total prélevé dans un tube EDTA avec l'automate d'extraction «**NucliSENS® easyMAG®**», il faut utiliser la formule suivante:

Formule simplifiée pour sang total et «NucliSENS® easyMAG®»

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

Pour obtenir le résultat en **gEq / mL** lorsqu'on utilise du liquide céphalorachidien ou des échantillons d'urines avec l'automate d'extraction «**NucliSENS® easyMAG®**», il faut utiliser la formule suivante:

Formule simplifiée pour liquide céphalorachidien et urines et «NucliSENS® easyMAG®»

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 10 \times \text{Quantité}$$

Pour obtenir le résultat en **gEq / mL** lorsqu'on utilise des échantillons de sang total prélevé dans un tube EDTA et le kit d'extraction «**QIASymphony® SP/AS**», pour obtenir le **résultat en gEq / mL**, il faut utiliser la formule suivante:

Formule simplifiée pour sang total et «QIASymphony® SP/AS»

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 24 \times \text{Quantité}$$

Pour obtenir le résultat en **gEq / mL** lorsqu'on utilise des échantillons de plasma prélevé dans un

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

tube EDTA et le kit d'extraction «**QIASymphony® SP/AS**», pour obtenir le **résultat en gEq / mL**, il faut utiliser la formule suivante:

Formule simplifiée pour sang total et «QIASymphony® SP/AS»

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 12 \times \text{Quantité}$$

Conversion des résultats en Unités Internationales

Pour obtenir le résultat en **UI / mL** lorsqu'on utilise du sang total prélevé dans un tube EDTA avec le kit d'extraction «**EXTRABlood**», il faut utiliser la formule suivante:

Formule simplifiée pour sang total et «EXTRABlood»

$$Fc = 0,76 \text{ UI / gEq}$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = 19,0 \times \text{Quantité}$$

Pour obtenir le résultat en **UI / mL** lorsqu'on utilise du sang total prélevé dans un tube EDTA avec le kit d'extraction **ELITe STAR**, il faut utiliser la formule suivante:

Formule simplifiée pour sang total et ELITe STAR

$$Fc = 0,79 \text{ UI / gEq}$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = 22,1 \times \text{Quantité}$$

Pour obtenir le résultat en **UI / mL** lorsqu'on utilise du plasma prélevé dans un tube EDTA avec le kit d'extraction **ELITe STAR**, il faut utiliser la formule suivante:

Formule simplifiée pour sang total et ELITe STAR

$$Fc = 1,10 \text{ UI / gEq}$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = 30,8 \times \text{Quantité}$$

Pour obtenir le résultat en **UI / mL** lorsqu'on utilise du sang total prélevé dans un tube EDTA avec le kit d'extraction **ELITe GALAXY**, il faut utiliser la formule suivante:

Formule simplifiée pour sang total et ELITe GALAXY

$$Fc = 0,51 \text{ UI / gEq}$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = 17,9 \times \text{Quantité}$$

Pour obtenir le résultat en **UI / mL** lorsqu'on utilise du plasma prélevé dans un tube EDTA avec le kit d'extraction **ELITe GALAXY**, il faut utiliser la formule suivante:

Formule simplifiée pour sang total et ELITe GALAXY

$$Fc = 0,27 \text{ UI / gEq}$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = 9,5 \times \text{Quantité}$$

Pour **exprimer le résultat en UI / mL** lorsqu'on utilise du sang total prélevé dans un tube EDTA avec l'automate d'extraction «**NucliSENS® easyMAG®**», il faut utiliser la formule suivante:

Formule simplifiée pour sang total et «NucliSENS® easyMAG®»

$$Fc = 0,61 \text{ UI / gEq}$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$$

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

$$Nc \text{ (UI / mL)} = 30,5 \times \text{Quantité}$$

Pour exprimer le résultat en UI / mL lorsqu'on utilise du sang total prélevé dans un tube EDTA avec l'automate d'extraction «QIASymphony® SP/AS», il faut utiliser la formule suivante:

Formule simplifiée pour sang total et «QIASymphony® SP/AS»

$$F_c = 0,46 \text{ UI / gEq}$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times F_c$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = 11,0 \times \text{Quantité}$$

Pour exprimer le résultat en UI / mL lorsqu'on utilise du sang total prélevé dans un tube EDTA avec l'automate d'extraction «QIASymphony® SP/AS», il faut utiliser la formule suivante:

Formule simplifiée pour sang total et «QIASymphony® SP/AS»

$$F_c = 0,87 \text{ UI / gEq}$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times F_c$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = 10,4 \times \text{Quantité}$$

Fc est le facteur de conversion obtenu en utilisant le matériel de référence calibré et approuvé par l'OMS "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus DNA for Nucleic Acid Amplification Techniques", NIBSC, Royaume Uni, code 09/162 (voir caractéristiques des performances).

CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES**Sensibilité analytique: seuil de détection**

La sensibilité analytique de ce test, comme limite de détection, permet de détecter la présence d'environ 11 génomes Équivalents dans les 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La sensibilité analytique du test, ou le seuil de détection, a été testée à partir d'ADN plasmidique. Le plasmide contient le produit d'amplification et sa concentration initiale a été mesurée au spectrophotomètre. Le plasmide a été dilué à une concentration de 10 copies / 20 µL dans de l'ADN génomique humain à une concentration de 500 ng / 20 µL. Cet échantillon a été amplifié 50 fois, avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous:

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

La sensibilité analytique du test a été déterminée à partir d'un panel de dilutions de CMV dans la limite de concentration utilisée en combinaison avec des échantillons de sang total et «EXTRAblood». Le panel a été préparé à partir d'échantillons de sang total négatif pour l'ADN du CMV ensemencés avec du matériel de référence calibré et certifié «OptiQuant CMV DNA» (souche AD169, AcroMetrix Europe B.V., Pays Bas). La concentration virale varie de 1 gEq / mL à 3.160 gEq / mL. Chaque échantillon du panel a été testé dans 24 réplifications en effectuant toute la procédure d'analyse (extraction et amplification) avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. L'analyse statistique a été effectuée par régression Probit. La limite de détection a été définie comme étant la concentration à laquelle la probabilité d'atteindre un résultat positif est de 95%.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Limite de détection avec échantillons de sang total et «EXTRAblood» (gEq / mL)			
Intervalle de confiance de 95 %			
		valeur inférieure	valeur supérieure
95% positivité	279 gEq / mL	198 gEq / mL	466 gEq / mL

Limite de détection avec échantillons de sang total et «EXTRAblood» (gEq / réaction)			
Intervalle de confiance de 95 %			
		valeur inférieure	valeur supérieure
95% positivité	11,2 gEq / réaction	7,9 gEq / réaction	18,6 gEq / réaction

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

Les conversions de «gEq / mL» en «gEq / réaction» ont été calculées comme indiqué page 39.

La sensibilité analytique du test a été vérifiée en utilisant un panel de dilutions de CMV dans la concentration limite, associé à des échantillons de sang total et **ELITe STAR**. Le panel a été préparé en diluant le "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC code 09/162, Royaume Uni) dans des échantillons de sang total prélevé dans un tube EDTA négatif pour l'ADN de CMV. La concentration virale varie de 3,160 UI / mL à 1000 UI / mL. Chaque échantillon du panel a été utilisé dans 12 réplifications pour effectuer toute la procédure d'analyse, de préparation de la course, d'extraction, d'amplification en temps réel et d'interprétation des résultats avec **ELITe STAR** et les produits ELITechGroup S.p.A. L'analyse statistique a été effectuée par régression Probit. Le seuil de détection a été défini comme concentration à laquelle la probabilité d'atteindre un résultat positif est de 95%. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Limite de détection avec échantillons de sang total et ELITe STAR (UI / mL)			
Intervalle de confiance de 95 %			
		valeur inférieure	valeur supérieure
95% positivité	263 UI / mL	128 UI / mL	1.208 UI / mL

La sensibilité analytique est rapporté comment gEq/mL dans le tableau suivant:

Limite de détection avec échantillons de sang total et ELITe STAR (gEq / mL)			
Intervalle de confiance de 95 %			
		valeur inférieure	valeur supérieure
95% positivité	332 gEq / mL	162 gEq / mL	1.529 gEq / mL

La sensibilité analytique en gEq/mL des échantillons de sang et de l'**ELITe STAR** est calculée en appliquant un facteur de conversion spécifique donné à la page 39.

La sensibilité analytique du test a été vérifiée en utilisant un panel de dilutions de CMV dans la concentration limite, associé à des échantillons de plasma et **ELITe STAR**. Le panel a été préparé en diluant le "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC code 09/162, Royaume Uni) dans des échantillons de sang total prélevé dans un tube EDTA négatif pour l'ADN de CMV. Les concentrations virales variaient de 3,160 UI / mL à 1000 UI / mL. Chaque échantillon du panel a été utilisé dans 8 réplifications pour effectuer toute la procédure d'analyse, de préparation de la course, d'extraction, d'amplification en temps réel et d'interprétation des résultats avec **ELITe STAR** et les produits ELITechGroup S.p.A. L'analyse statistique a été effectuée par régression Probit. Le seuil de détection a été défini comme concentration à laquelle la probabilité d'atteindre un résultat positif est de 95%.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Limite de détection avec échantillons de plasma et ELITe STAR (UI / mL)			
Intervalle de confiance de 95 %			
		valeur inférieure	valeur supérieure
95% positivité	222 UI / mL	126 UI / mL	1.638 UI / mL

La sensibilité analytique est rapporté comment gEq/mL dans le tableau suivant:

Limite de détection avec échantillons de plasma et ELITe STAR (gEq / mL)			
Intervalle de confiance de 95 %			
		valeur inférieure	valeur supérieure
95% positivité	201 gEq / mL	114 gEq / mL	1.489 gEq / mL

La sensibilité analytique comment gEq/mL des échantillons de plasma et le **ELITe STAR** est calculée en appliquant un facteur de conversion spécifique donné à la page 39.

La sensibilité analytique du test a été vérifiée en utilisant un panel de dilutions de CMV dans la concentration limite, associé à des échantillons de sang total et **ELITe GALAXY**. Le panel a été préparé en diluant le "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC code 09/162, Royaume Uni) dans des échantillons de sang total prélevé dans un tube EDTA négatif pour l'ADN de CMV. La concentration virale varie de 10 UI / mL à 560 UI / mL. Chaque échantillon du panel a été utilisé dans 12 réplifications pour effectuer toute la procédure d'analyse, de préparation de la course, d'extraction, d'amplification en temps réel et d'interprétation des résultats avec

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF

RTK015PLD

ELITe GALAXY et les produits ELITechGroup S.p.A. L'analyse statistique a été effectuée par régression Probit. Le seuil de détection a été défini comme concentration à laquelle la probabilité d'atteindre un résultat positif est de 95%.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Limite de détection avec échantillons de plasma et ELITe GALAXY (UI / mL)			
		Intervalle de confiance de 95 %	
		valeur inférieure	valeur supérieure
95% positivité	127 UI / mL	75 UI / mL	435 UI / mL

La sensibilité analytique est rapporté engEq/mL dans le tableau suivant:

Limite de détection avec échantillons de plasma et ELITe GALAXY (gEq / mL)			
		Intervalle de confiance de 95 %	
		valeur inférieure	valeur supérieure
95% positivité	249 gEq / mL	147 gEq / mL	853 gEq / mL

La sensibilité analytique en gEq/mL des échantillons de plasma et l' **ELITe GALAXY** est calculée en appliquant un facteur de conversion spécifique donné à la page 39.

La sensibilité analytique du test a été vérifiée en utilisant un panel de dilutions de CMV dans la concentration limite, associé à des échantillons de sang total et **ELITe GALAXY**. Le panel a été préparé en diluant le "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC code 09/162, Royaume Uni) dans des échantillons de sang total prélevé dans un tube EDTA négatif pour l'ADN de CMV. La concentration virale varie de 10 UI / mL à 560 UI / mL. Chaque échantillon du panel a été utilisé dans 12 répliques pour effectuer toute la procédure d'analyse, de préparation de la course, d'extraction, d'amplification en temps réel et d'interprétation des résultats avec **ELITe GALAXY** et les produits ELITechGroup S.p.A. L'analyse statistique a été effectuée par régression Probit. Le seuil de détection a été défini comme concentration à laquelle la probabilité d'atteindre un résultat positif est de 95%.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Limite de détection avec échantillons de plasma et ELITe GALAXY (UI / mL)			
		Intervalle de confiance de 95 %	
		valeur inférieure	valeur supérieure
95% positivité	140 UI / mL	86 UI / mL	381 UI / mL

La sensibilité analytique est rapporté en gEq/mL dans le tableau suivant:

Limite de détection avec échantillons de plasma et ELITe GALAXY (gEq / mL)			
		Intervalle de confiance de 95 %	
		valeur inférieure	valeur supérieure
95% positivité	519 gEq / mL	319 gEq / mL	1.411 gEq / mL

La sensibilité analytique en gEq/mL des échantillons de plasma et l' **ELITe GALAXY** est calculée en appliquant un facteur de conversion spécifique donné à la page 39.

Sensibilité analytique: intervalle linéaire de mesure

La sensibilité analytique de ce test, ou l'intervalle linéaire de mesure, permet de quantifier environ 1.000.000 à 10 génomes Équivalents dans les 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La sensibilité analytique du test a été déterminée à partir d'un panel de dilutions (1 Log₁₀ entre deux dilutions) d'ADN plasmidique. Le plasmide contient le produit d'amplification et sa concentration initiale a été mesurée au spectrophotomètre. Les solutions contenant 2.5 x 10⁷ molécules par réaction à 2.5 x 10¹ molécules par réaction ont été amplifiées 9 fois avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. L'analyse des résultats, réalisée par régression linéaire, a démontré que le test présente une linéarité pour tous les points du panel (coefficient de corrélation linéaire supérieur à 0,99).

La limite inférieure de l'intervalle linéaire de mesure de ce test utilisé en association avec des échantillons de sang total et «**EXTRAblood**» a été fixée à environ 13 gEq / réaction car, lors des essais

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF

RTK015PLD

effectués pour déterminer la limite de détection, la dilution à 316 gEq / mL est la dernière présentant 100% de positivité. La limite inférieure de l'intervalle linéaire de mesure correspond à une valeur d'un logarithme en dessous de la plus faible concentration du standard d'amplification «Q - PCR Standard» (10² gEq / 20 µL).

La limite supérieure de l'intervalle linéaire de mesure de ce test utilisé en association avec des échantillons de sang total et «**EXTRAblood**» a été fixé à 10⁶ gEq par réaction, correspondant à une valeur d'un logarithme en dessous de la plus haute concentration du standard d'amplification «Q - PCR Standard» (10⁵ gEq / 20 µL).

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Intervalle de mesure linéaire avec échantillons de sang total et «EXTRAblood»		
	Seuil inférieur	Seuil supérieur
UI / mL	240	19.000.000
gEq / mL	316	25.000.000
gEq / réaction	12,6	1.000.000

Les conversions de «gEq / mL» en «gEq / réaction» et inversement ont été calculées comme indiqué à page 39. La conversion de «gEq / mL» en «UI / mL» et vice versa a été calculée comme indiqué à la page 40.

Le seuil inférieur de la gamme de mesure linéaire de ce test utilisé en association avec des échantillons de sang total et **ELITe GALAXY** a été fixée à environ 10 gEq / réaction, car 350 gEq/ml est la concentration la plus faible qui donne 100% de positivité dans l'étude de la limite de détection. Le seuil inférieur de la gamme de mesure linéaire se trouve à moins de 1 logarithme de la concentration la plus faible du standard d'amplification Q - PCR Standard (10² gEq / 20 µL).

Le seuil supérieur de la gamme de mesure linéaire de ce test utilisé en association avec des échantillons de sang total et **ELITe GALAXY** a été fixée à 10⁶ gEq / réaction, à moins de 1 logarithme de la concentration la plus élevée du standard d'amplification Q - PCR Standard (10⁵ gEq / 20 µL).

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Intervalle de mesure linéaire avec échantillons de sang total et ELITe GALAXY		
	Seuil inférieur	Seuil supérieur
UI / mL	178	17.800.000
gEq / mL	350	35.000.000
gEq / réaction	10	1.000.000

Les conversions de «gEq / mL» en «gEq / réaction» et inversement ont été calculées comme indiqué à page 39. La conversion de «gEq / mL» en «UI / mL» et vice versa a été calculée comme indiqué à la page 40.

Sensibilité analytique: Précision et Fidélité

La précision du test, ou la variabilité des résultats au cours d'une même session d'amplification avec différents réplicas d'un échantillon, a permis d'obtenir un pourcentage de Coefficient de variation moyen (CV %) des Ct inférieur à 2% compris entre 10⁶ molécules et 10¹ molécules dans les 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La précision du test, ou la variabilité des résultats au cours d'une même étape d'amplification avec différents réplicas d'un échantillon, a permis d'obtenir un pourcentage de Coefficient de variation moyen (CV %) d'environ 21% pour l'intervalle compris entre 10⁶ molécules et 10¹ molécules dans les 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La fidélité du test, ou la différence entre la moyenne des résultats obtenus au cours d'une même étape d'amplification avec différents réplicas d'un échantillon et la valeur théorique de la concentration de l'échantillon, a permis d'obtenir un manque de fidélité moyen d'environ 20% pour l'intervalle compris entre 10⁶ molécules et 10¹ molécules dans les 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La précision et la fidélité ont été calculées à partir des données obtenues lors des essais pour l'étude de l'intervalle linéaire de mesure.

Sensibilité analytique: reproductibilité grâce à un panel de matériel de référence

La sensibilité analytique du test, ou la reproductibilité des résultats comparés à ceux obtenus avec

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

d'autres méthodes dans différents laboratoires, a été vérifiée avec un panel de matériel de référence.

Les essais ont été menés en utilisant, comme matériel de référence certifié et calibré, un panel de dilutions de CMV dans la limite de concentration (souche AD169, QCMD 2009 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Royaume Uni). Chaque échantillon du panel a été testé dans 2 répétitions en effectuant toute la procédure d'analyse, extraction manuelle avec «**EXTRAblood**» et amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Essais avec produit de référence calibré et «EXTRAblood»				
Échantillon	Consensus Log ₁₀ conc. virale	Déviati on standard	Positifs / Réplications	Moyenne des résultats Log ₁₀ gEq / mL
CMV09-01	4,368	0,465	2 / 2	4,064
CMV09-02	2,995	0,400	2 / 2	2,984
CMV09-03	2,297	0,583	2 / 2	2,038
CMV09-04	5,407	0,442	2 / 2	5,026
CMV09-05	2,996	0,444	2 / 2	2,902
CMV09-06	3,493	0,421	2 / 2	3,231
CMV09-07	4,379	0,412	2 / 2	4,129
CMV09-08	Négatif	NA	0 / 2	Non détecté
CMV09-09	6,374	0,457	2 / 2	5,943
CMV09-10	2,352	0,542	2 / 2	1,996
CMV09-11	2,407	0,513	2 / 2	2,105
CMV09-12	3,645	0,449	2 / 2	3,539

Tous les échantillons ont été correctement détectés. Les résultats quantitatifs obtenus s'inscrivent dans l'intervalle défini par le Consensus des tests commerciaux ± 1 Déviation standard.

D'autres tests ont été faits en utilisant comme matériel de référence un panel de dilution CMV Panel (QCMD 2012 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Royaume Uni.) Chaque échantillon du panel a été utilisé dans 2 répétitions pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction, d'amplification, de révélation et d'interprétation des résultats avec **ELITe STAR** et les produits ELITechGroup S.p.A. Les résultats en UI / mL ont été calculés en appliquant le facteur de conversion pour **ELITe STAR** et plasma et ils sont reportés dans le tableau ci-dessous.

Essais avec produit de référence calibré et ELITe STAR				
Échantillon	Consensus Log ₁₀ conc. virale	Déviati on standard	Positifs / Réplications	Moyenne des résultats Log ₁₀ gEq / mL
CMV12-01	4,409	0,349	2/2	4,589
CMV12-02	3,925	0,335	2/2	4,111
CMV12-03	2,297	0,507	1/2	2,423
CMV12-04	2,021	0,617	1/2	2,320
CMV12-05	3,158	0,613	2/2	3,529
CMV12-06	3,448	0,361	2/2	3,594
CMV12-07	3,490	0,377	2/2	3,321
CMV12-08	Négatif	NA	0/2	Non détecté
CMV12-09	3,767	0,374	2/2	4,580
CMV12-10	2,826	0,456	1/2	4,111

Tous les échantillons ont été correctement détectés. Les résultats quantitatifs obtenus s'inscrivent dans l'intervalle défini par le Consensus des tests commerciaux ± 1 Déviation standard.

Autre test ont été faits utilisant comme matériel de référence un panel de dilution CMV Panel (QCMD 2012 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Royaume Uni.). Chaque échantillon du panel a été utilisé dans 2 répétitions pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction d'amplification, de révélation et d'interprétation des résultats avec **ELITe GALAXY** et les produits ELITechGroup S.p.A.

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

Les résultats en UI / mL ont été calculés en appliquant le facteur de conversion pour **ELITe GALAXY** et plasma et ils sont reportés dans le tableau ci-dessous.

Essais avec produit de référence calibré et ELITe GALAXY				
Échantillon	Consensus Log ₁₀ conc. virale	Déviati on standard	Positifs / Réplications	Moyenne des résultats Log ₁₀ gEq / mL
CMV12-01	4,409	0,349	2/2	4,010
CMV12-02	3,925	0,335	2/2	3,484
CMV12-03	2,297	0,507	1/1	1,811
CMV12-04	2,021	0,617	2/2	1,647
CMV12-05	3,158	0,613	2/2	2,511
CMV12-06	3,448	0,361	2/2	3,106
CMV12-07	3,490	0,377	2/2	3,319
CMV12-08	négatif	NA	0/2	Non rilevato
CMV12-09	3,767	0,374	2/2	3,486
CMV12-10	2,826	0,456	2/2	2,593

Une répétition de CMV12-03 a été exclue de l'analyse suite à une panne du système pendant la phase initiale d'extraction. Dans l'analyse qualitative, tous les échantillons ont été correctement détectés. Dans l'analyse quantitative, 8/9 échantillons positifs ont été correctement quantifiés dans l'intervalle de 0,5 log par rapport au titre prévu. Les échantillons CMV12-01 et CMV 12-07 sont associés. La différence entre CMV12-01 (4,035 Log₁₀) et CMV12-07 (3,296 Log₁₀) a été égale à 0,691 et s'inscrit dans l'intervalle prévu. Le résultat CMV 12-07 est considéré comme valide.

Sensibilité analytique : Facteur de conversion en Unités Internationales

Le facteur de conversion à utiliser avec cet essai pour transformer le résultat quantitatif à partir de gEq / mL a Unités Internationales / mL avec **échantillons de sang total** prélevé dans un tube EDTA a été défini comme suit:

0,76 Unités Internationales / gEq avec le kit d'extraction manuelle «**EXTRAblood**»;

0,83 Unités Internationales / gEq avec l'automate d'extraction **ELITe STAR**;

0,51 Unités Internationales / gEq avec l'automate d'extraction **ELITe GALAXY**;

0,61 Unités Internationales / gEq avec l'automate d'extraction «NuclISENS® easyMAG®»;

0,46 Unità Internazionali / gEq avec l'automate d'extraction «QIASymphony® SP/AS».

Le facteur de conversion à utiliser avec cet essai pour transformer le résultat quantitatif à partir de gEq / mL a Unités Internationales / mL avec **échantillons de plasma** prélevé dans un tube EDTA a été défini comme suit:

1,10 Unités Internationales / gEq avec l'automate d'extraction **ELITe STAR**;

0,28 Unités Internationales / gEq avec l'automate d'extraction **ELITe GALAXY**;

0,87 Unités Internationales / gEq avec l'automate d'extraction «QIASymphony® SP/AS».

Les données pour chaque facteur de conversion sont indiqués ci-dessous:

Sang total prélevé dans un tube EDTA

Le facteur de conversion a été déterminé en utilisant quatre dilutions (0,5 log₁₀ entre deux dilutions) de matériel de référence calibré et approuvé par l'OMS ("1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus DNA for Nucleic Acid Amplification Techniques", NIBSC, Royaume Uni, code 09/162) ensemencées dans du sang total prélevé dans un tube EDTA.

Les quatre points du panel ont été testés 8 fois en effectuant toute la procédure d'analyse, extraction avec «**EXTRAblood**» et amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A.

L'analyse des données obtenues a permis de calculer un facteur de conversion (Fc) moyen égal à 0,76 Unités Internationales (UI) par gEq de CMV détecté.

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

REF RTK015PLD

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous:

Conversion en Unités Internationales avec sang total et «EXTRAblood» (Fc = 0,76 UI / gEq)				
Concentr. attendue UI / mL	Concentr. attendue Log ₁₀ UI / mL	Quantité moyenne gEq / mL	Quantité moyenne UI / mL	Quantité moyenne Log ₁₀ UI / mL
316.255	5,500	362.383	275.411	5,440
100.000	5,000	155.738	118.361	5,073
31.625	4,500	39.503	30.022	4,477
10.000	4,000	13.623	10.353	4,015

Les quatre points du panel ont été testés 15 fois en effectuant toute la procédure d'analyse, extraction et configuration PCR avec système d'extraction automatique **ELITE STAR** et amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A.

L'analyse des données obtenues a permis de calculer un facteur de conversion (Fc) moyen égal à 0,79 Unités Internationales (UI) par gEq de CMV détecté. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous:

Conversion en Unités Internationales avec sang total et ELITe STAR (Fc = 0,79 UI / gEq)				
Concentr. attendue UI / mL	Concentr. attendue Log ₁₀ UI / mL	Quantité moyenne gEq / mL	Quantité moyenne UI / mL	Quantité moyenne Log ₁₀ UI / mL
316.255	5,500	566.090	464.398	5,620
100.000	5,000	135.119	106.744	4,997
31.625	4,500	42.655	33.698	4,488
10.000	4,000	14.486	11.444	4,014
3.162	3,500	3.717	2.936	3,401

Les quatre points du panel ont été testés 15 fois en effectuant toute la procédure d'analyse, extraction et configuration PCR avec système d'extraction automatique **ELITE GALAXY** et amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A.

L'analyse des données obtenues a permis de calculer un facteur de conversion (Fc) moyen égal à 0,51 Unités Internationales (UI) par gEq de CMV détecté. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous:

Conversion en Unités Internationales avec sang total et ELITe GALAXY (Fc = 0,51 UI / gEq)				
Concentr. attendue UI / mL	Concentr. attendue Log ₁₀ UI / mL	Quantité moyenne gEq / mL	Quantité moyenne UI / mL	Quantité moyenne Log ₁₀ UI / mL
316.255	5,500	473.265	240.507	5,370
100.000	5,000	217.626	110.595	5,036
31.625	4,500	55.656	28.284	4,438
10.000	4,000	24.229	12.313	4,076
3.162	3,500	7.809	3.968	3,575

Les quatre points du panel ont été testés dans 8 répétitions en effectuant toute la procédure d'analyse: extraction, avec automate d'extraction «NucliSENS® easyMAG®» et amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A.

L'analyse des données obtenues a permis de calculer un facteur de conversion (Fc) moyen égal à 0,61 Unités Internationales (UI) par gEq de CMV détecté.

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

REF RTK015PLD

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous:

Conversion en Unités Internationales avec sang total et «NucliSENS® easyMAG®» (Fc = 0,61 UI / gEq)				
Concentr. attendue UI / mL	Concentr. attendue Log ₁₀ UI / mL	Quantité moyenne gEq / mL	Quantité moyenne UI / mL	Quantité moyenne Log ₁₀ UI / mL
316.255	5,500	564.835	344.549	5,537
100.000	5,000	178.704	109.009	5,037
31.625	4,500	51.454	31.387	4,497
10.000	4,000	14.141	8.626	3,936

Les quatre points du panel ont été testés dans 8 répétitions en effectuant toute la procédure d'analyse: extraction, avec automate d'extraction «QIASymphony® SP/AS» et amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A.

L'analyse des données obtenues a permis de calculer un facteur de conversion (Fc) moyen égal à 0,46 Unités Internationales (UI) par gEq de CMV détecté. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Conversion en Unités Internationales avec «QIASymphony® SP/AS» (Fc = 0,46 UI / gEq)				
Concentr. attendue UI / mL	Concentr. attendue Log ₁₀ UI / mL	Quantité moyenne gEq / mL	Quantité moyenne UI / mL	Quantité moyenne Log ₁₀ UI / mL
316.255	5,500	599.940	275.972	5,435
100.000	5,000	222.073	102.153	5,004
31.625	4,500	70.712	32.527	4,497
10.000	4,000	24.326	11.190	4,038

Plasma prélevé dans un tube EDTA

Le facteur de conversion a été déterminé en utilisant quatre dilutions (0,5 log₁₀ entre deux dilutions) de matériel de référence calibré et approuvé par l'OMS ("1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus DNA for Nucleic Acid Amplification Techniques", NIBSC, Royaume Uni, code 09/162) ensemencées dans du sang total prélevé dans un tube EDTA.

Les quatre points du panel ont été testés 15 fois en effectuant toute la procédure d'analyse, extraction et configuration PCR avec système d'extraction automatique **ELITE STAR** et amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A.

L'analyse des données obtenues a permis de calculer un facteur de conversion (Fc) moyen égal à 1,10 Unités Internationales (UI) par gEq de CMV détecté. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous:

Conversion en Unités Internationales avec plasma et ELITe STAR (Fc = 1,10 UI / gEq)				
Concentr. attendue UI / mL	Concentr. attendue Log ₁₀ UI / mL	Quantité moyenne gEq / mL	Quantité moyenne UI / mL	Quantité moyenne Log ₁₀ UI / mL
316.255	5,500	282.851	311.136	5,481
100.000	5,000	107.043	117.747	5,048
31.625	4,500	30.868	33.955	4,512
10.000	4,000	8.632	9.495	3,972
3.162	3,500	2.814	3.096	3,468

Les quatre points du panel ont été testés 15 fois en effectuant toute la procédure d'analyse, extraction et configuration PCR avec système d'extraction automatique **ELITE GALAXY** et amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A.

L'analyse des données obtenues a permis de calculer un facteur de conversion (Fc) moyen égal à 0,27 Unités Internationales (UI) par gEq de CMV détecté. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous:

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

Conversion en Unités Internationales avec plasma et ELITe GALAXY (Fc = 0,27 UI / gEq)				
Concentr. attendue UI / mL	Concentr. attendue Log ₁₀ UI / mL	Quantité moyenne gEq / mL	Quantité moyenne UI / mL	Quantité moyenne Log ₁₀ UI / mL
316.228	5,500	1.095.881	301.020	5,413
100.000	5,000	460.141	126.3937	5,033
31.623	4,500	117.258	32.209	4,448
10.000	4,000	43.980	12.081	4,053
3.162	3,500	13.713	3.767	3,546

Les quatre points du panel ont été testés dans 8 répétitions en effectuant toute la procédure d'analyse: extraction, avec automate d'extraction «QIASymphony® SP/AS» et amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A.

L'analyse des données obtenues a permis de calculer un facteur de conversion (Fc) moyen égal à 0,87 Unités Internationales (UI) par gEq de CMV détecté. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Conversion en Unités Internationales avec «QIASymphony® SP/AS» (Fc = 0,87 UI / gEq)				
Concentr. attendue UI / mL	Concentr. attendue Log ₁₀ UI / mL	Quantité moyenne gEq / mL	Quantité moyenne UI / mL	Quantité moyenne Log ₁₀ UI / mL
316.255	5,500	330.340	287.396	5,458
100.000	5,000	101.683	88.464	4,947
31.625	4,500	40.963	35.638	4,551
10.000	4,000	13.148	11.438	4,058

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

La sensibilité diagnostique du test, ou l'efficacité de détection et de quantification sur différents génotypes / sous-types, a été évaluée en comparant des séquences à des banques de données nucléotidiques.

L'examen des régions choisies pour l'hybridation des oligonucléotides d'amorçage et de la sonde sur l'alignement des séquences disponibles dans la banque de données de l'exon 4 du gène MIEA de CMV, notamment celles des souches AD169 et Merlin, a démontré leur conservation et l'absence de mutation significative.

La sensibilité diagnostique du test, ou l'efficacité de détection et de quantification sur différents génotypes / sous-types, a été évaluée grâce à des plasmides contenant la région amplifiée du CMV de la souche Merlin.

L'efficacité de détection et de quantification a été évaluée en utilisant comme matériel de référence des plasmides contenant la région amplifiée du CMV de la souche Merlin (GENEART A.G., Allemagne.). Les plasmides ont été dilués aux concentrations suivantes: 100.000, 10.000, 1.000, 100 et 10 copies par réaction. Chaque échantillon a été amplifié avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Efficacité de détection et de quantification avec CMV souche Merlin			
Échantillon	Concentration théorique copies / réaction	Positifs / Réplications	Moyenne des résultats copies / réaction
plasmide pMerlin 10 ⁵	100.000	3 / 3	93.699
plasmide pMerlin 10 ⁴	10.000	3 / 3	8.815
plasmide pMerlin 10 ³	1.000	3 / 3	898
plasmide pMerlin 10 ²	100	3 / 3	100
plasmide pMerlin 10 ¹	10	9 / 9	11

Le plasmide pMerlin a été détecté et quantifié correctement également à la concentration de 10 copies par réaction.

Sensibilité diagnostique: confirmation d'échantillons positifs

La sensibilité diagnostique du test, ou la confirmation d'échantillons cliniques positifs, a été évaluée en utilisant plusieurs échantillons de sang total positif pour l'ADN du CMV.

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 54 échantillons de sang total prélevé dans un tube EDTA, positifs pour l'ADN du CMV (testés avec un kit d'amplification en temps réel marqué CE IVD). Chaque échantillon a été testé en effectuant toute la session d'analyse extraction manuelle avec «EXTRAblood» et d'amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé dans un tube EDTA positif pour l'ADN du CMV	54	53	0

Un échantillon s'est avéré "non valide" dans deux sessions d'analyses différentes. Le résultat "non valide" a probablement été causé par un inhibiteur non identifié et présent dans l'échantillon. Cet échantillon a été exclu du calcul de la sensibilité diagnostique. Pour ce test, la sensibilité diagnostique est égal à 100%.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 60 échantillons de sang total prélevé dans un tube EDTA, positifs pour l'ADN du CMV (testés avec un kit d'amplification en temps réel marqué CE IVD). Chaque échantillon a été testé en effectuant toute la session d'analyse: extraction avec système d'extraction automatique ELITE STAR et d'amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé dans un tube EDTA rendu positif pour l'ADN du CMV	60	57	0

Trois échantillons ont donné un résultat "non valide" dans deux étapes d'analyse indépendantes.

Pour ce test, la sensibilité diagnostique est égal à 100%.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 68 échantillons de plasma prélevé dans un tube EDTA, positifs pour l'ADN du CMV (testés avec un kit d'amplification en temps réel marqué CE IVD). Chaque échantillon a été testé en effectuant toute la session d'analyse: extraction avec système d'extraction automatique ELITE STAR et d'amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Plasma prélevé dans un tube EDTA rendu positif pour l'ADN du CMV	68	66	2

Deux échantillons ont présenté un résultat négatif avec les produits ELITechGroup S.p.A. Cette divergence peut s'expliquer par le fait que le titre CMV de l'échantillon est proche ou inférieur au seuil de révélation de la méthode utilisée (280 gEq/mL).

Pour ce test, la sensibilité diagnostique est égal à 97,1%.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 60 échantillons de sang total prélevé dans un tube EDTA, positifs pour l'ADN du CMV (testés avec un kit d'amplification en temps réel marqué CE IVD). Chaque échantillon a été testé en effectuant toute la session d'analyse: extraction avec système d'extraction automatique ELITE GALAXY et d'amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé dans un tube EDTA rendu positif pour l'ADN du CMV	60	59	1

Un échantillon a rapporté un résultat négatif avec les produits ELITechGroup S.p.A. Cet écart peut être expliqué par la dégradation de l'échantillon.

Pour ce test, la sensibilité diagnostique est égal à 98,3%.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 51 échantillons de plasma prélevé dans un tube EDTA, positifs pour l'ADN du CMV (testés avec un kit d'amplification en temps réel marqué CE IVD). Chaque échantillon a été testé en effectuant toute la session d'analyse: extraction avec système d'extraction automatique ELITE GALAXY et d'amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Plasma prélevé dans un tube EDTA rendu positif pour l'ADN du CMV	51	47	4

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF

RTK015PLD

Quatre échantillons ont reporté un résultat négatif avec les produits EGSpA. Cette divergence peut s'expliquer par le fait que les titres CMV des échantillons en question (respectivement <350 gEq/mL, <350 gEq/mL, 961 gEq/mL et 534 gEq/mL) étaient proches ou inférieurs au seuil supérieur de révélation de la méthode utilisée.

Pour ce test, la sensibilité diagnostique est égal à 92,16%.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 50 échantillons négatifs de sang total prélevé dans un tube EDTA. Ces échantillons de donneurs normaux négatifs ont été rendus positifs pour l'ADN du CMV, grâce à du matériel de référence certifié et calibré (QCMD 2009 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Royaume Uni), à la concentration de 1.500 copies / mL. Chaque échantillon a été utilisé pour exécuter la totalité de la session d'analyse: l'extraction a été effectuée avec l'automate d'extraction «NucliSENS® easyMAG®» et l'amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé dans un tube EDTA rendu positif pour l'ADN du CMV	50	50	0

Pour ce test, la sensibilité diagnostique est égal à 100%.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 60 échantillons négatifs de sang total prélevé dans un tube EDTA. Ces échantillons négatifs ont été rendus positifs pour l'ADN du CMV, grâce à du matériel de référence certifié et calibré (QCMD 2009 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Royaume Uni), à la concentration de 700 copies / mL. Chaque échantillon a été utilisé pour exécuter la totalité de la session d'analys: l'extraction a été effectuée avec l'automate d'extraction «QIASymphony® SP/AS», et l'amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé dans un tube EDTA positif pour l'ADN du CMV	60	60	0

Pour ce test, la sensibilité diagnostique égal à 100%.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 60 échantillons négatifs de plasma prélevé dans un tube EDTA. Ces échantillons négatifs ont été rendus positifs pour l'ADN du CMV, grâce à du matériel de référence certifié et calibré (QCMD 2009 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Royaume Uni), à la concentration de 360 copies / mL. Chaque échantillon a été utilisé pour exécuter la totalité de la session d'analys: l'extraction a été effectuée avec l'automate d'extraction «QIASymphony® SP/AS», et l'amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Plasma prélevé dans un tube EDTA positif pour l'ADN du CMV	60	60	0

Pour ce test, la sensibilité diagnostique est égal à 100%.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 60 échantillons négatifs de liquide céphalorachidien. Ces échantillons négatifs ont été rendus positifs pour l'ADN du CMV, grâce à du matériel de référence certifié et calibré (QCMD 2009 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Royaume Uni), à la concentration de 300 copies / mL. Chaque échantillon a été utilisé pour exécuter la totalité de la session d'analys: l'extraction a été effectuée avec l'automate d'extraction «NucliSENS® easyMAG®» et l'amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Liquide céphalorachidien rendu positif pour l'ADN du CMV	60	60	0

Pour ce test, la sensibilité diagnostique est égal à 100%.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 52 échantillons d'urine positifs pour l'ADN du CMV (testé avec un kit d'amplification en temps réel marqué CE IVD). Chaque échantillon a été testé en effectuant la totalité de la session d'analyse: l'extraction a été effectuée avec l'automate d'extraction «NucliSENS® easyMAG®» et l'amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF

RTK015PLD

Échantillons	N	positifs	négatifs
Urine positive pour l'ADN du CMV	52	52	0

Pour ce test, la sensibilité diagnostique est égal à 100%.

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

La spécificité analytique du test, ou l'absence de réactivité croisée avec d'autres marqueurs potentiellement interférents, a été évaluée en comparant des séquences avec des banques de données nucléidiques.

L'alignement des séquences des amorces et de la sonde fluorescente avec des séquences, disponibles dans la banque de données, d'organismes différents du CMV, notamment celles du génome complet de l'HHV6 (le virus herpétique humain le plus semblable au CMV) a démontré leur spécificité et l'absence d'homologies significatives.

La spécificité analytique du test ou l'absence de réactivité croisée avec d'autres marqueurs potentiellement interférents, a été vérifiée en utilisant des échantillons négatifs pour l'ADN du CMV mais positifs pour l'ADN de l'HHV6, de l'EBV et du VZV.

La spécificité analytique a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 16 échantillons de sang total prélevé dans un tube EDTA. Ces échantillons sont négatifs pour l'ADN du CMV mais positifs pour l'ADN de l'HHV6, de l'EBV et du VZV (ces échantillons ont été testés avec des kits d'amplification en temps réel marqués CE IVD). Chaque échantillon a été testé en effectuant toute la session d'analyse(extraction et amplification) avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé dans un tube EDTA positif pour l'ADN d'HHV6	8	0	8
Sang total prélevé dans un tube EDTA positif pour l'ADN d'EBV	7	0	7
Sang total prélevé dans un tube EDTA positif pour l'ADN de VZV	1	0	1

Spécificité diagnostique: confirmation d'échantillons négatifs

La spécificité diagnostique du test, ou la confirmation d'échantillons cliniques négatifs, a été évaluée en utilisant plusieurs échantillons cliniques négatifs pour l'ADN du CMV.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant, comme matériel de référence, 56 échantillons de sang total prélevé dans un tube EDTA, négatifs pour l'ADN du CMV (testés avec un kit d'amplification en temps réel marqué CE IVD). Chaque échantillon a été utilisé en effectuant toute la session d'analyse extraction manuelle avec «EXTRAblood», et amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé dans un tube EDTA négatif pour l'ADN de CMV	56	0	56

Pour ce test, la spécificité diagnostique a été égal à 100%.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant, comme matériel de référence, 70 échantillons de sang total prélevé dans un tube EDTA, négatifs pour l'ADN du CMV (testés avec un kit d'amplification en temps réel marqué CE IVD). Chaque échantillon a été utilisé en effectuant toute la session d'analyse: extraction avec système d'extraction automatique ELITE STAR et d'amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé dans un tube EDTA négatif pour l'ADN de CMV	70	0	63

Sept échantillons ont donné un résultat "non valide" dans deux étapes d'analyse indépendantes.

Pour ce test, la spécificité diagnostique a été égal à 100%.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant, comme matériel de référence, 61 échantillons de plasma prélevé dans un tube EDTA, négatifs pour l'ADN du CMV (testés avec un kit d'amplification en temps réel marqué CE IVD). Chaque échantillon a été utilisé en effectuant toute la session d'analyse: extraction avec système d'extraction automatique ELITE STAR et d'amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

Échantillons	N	positifs	négatifs
Plasma prélevé dans un tube EDTA négatif pour l'ADN de CMV	61	0	61

Pour ce test, la spécificité diagnostique a été égal à 100%.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant, comme matériel de référence, 66 échantillons de sang total prélevé dans un tube EDTA, négatifs pour l'ADN du CMV (testés avec un kit d'amplification en temps réel marqué CE IVD). Chaque échantillon a été utilisé en effectuant toute la session d'analyse: extraction avec système d'extraction automatique **ELITE GALAXY** et d'amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé dans un tube EDTA négatif pour l'ADN de CMV	66	0	65

Un échantillon s'est avéré "non valide" à cause d'un inhibiteur non identifié dans l'échantillon. Cet exemple n'a pas été inclus dans le calcul de la sensibilité diagnostique.

Pour ce test, la spécificité diagnostique a été égal à 100%.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant, comme matériel de référence, 64 échantillons de plasma prélevé dans un tube EDTA, négatifs pour l'ADN du CMV (testés avec un kit d'amplification en temps réel marqué CE IVD). Chaque échantillon a été utilisé en effectuant toute la session d'analyse: extraction avec système d'extraction automatique **ELITE GALAXY** et d'amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Plasma prélevé dans un tube EDTA négatif pour l'ADN de CMV	64	0	64

Pour ce test, la spécificité diagnostique a été égal à 100%.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant, comme matériels de référence, 50 échantillons de sang total prélevé dans un tube EDTA. Ces échantillons sont supposés être négatifs pour l'ADN du CMV. Chaque échantillon a été utilisé en effectuant la totalité de la session d'analyse: l'extraction a été effectuée avec l'automate d'extraction «NucliSENS® easyMAG®» et l'amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé dans un tube EDTA négatif pour l'ADN de CMV	50	0	50

Pour ce test, la spécificité diagnostique est égal à 100%.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant, comme matériels de référence, 60 échantillons de sang total prélevé dans un tube EDTA. Ces échantillons sont supposés être négatifs pour l'ADN du CMV. Chaque échantillon a été utilisé en effectuant la totalité de la session d'analyse: l'extraction a été effectuée avec l'automate d'extraction «QIASymphony® SP/AS» et l'amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé dans un tube EDTA négatif pour l'ADN de CMV	60	1	59

Un échantillon de sang total, négatif pour l'ADN du CMV, a donné un résultat positif pour le CMV avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. Le résultat divergent peut s'expliquer par le titre très bas d'ADN du CMV dans la réaction (environ 2 gEq / réaction). Cet écart peut s'expliquer par une infection latente par le CMV, un virus largement répandu dans la population. Pour ce test, la spécificité diagnostique est supérieure à 98,3%.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant, comme matériau de référence 60 échantillons de plasma prélevés dans EDTA chez des donneurs normaux et présumés négatifs pour l'ADN du CMV. Chaque échantillon a été utilisé en effectuant toute la procédure d'analyse: l'extraction a été effectuée avec l'automate d'extraction «QIASymphony® SP/AS» et l'amplification avec es produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Plasma prélevé dans un tube EDTA négatif pour l'ADN de CMV	60	1	59

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

Un échantillon de sang total, négatif pour l'ADN du CMV, a donné un résultat positif pour le CMV avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. Le résultat divergent peut s'expliquer par le titre très bas d'ADN du CMV dans la réaction (environ 2 gEq / réaction). Cet écart peut s'expliquer par une infection latente par le CMV, un virus largement répandu dans la population. Pour ce test, la spécificité diagnostique est supérieure à 98,3%.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant, comme matériel de référence, 60 échantillons de liquide céphalorachidien négatifs pour l'ADN du CMV (testés avec un kit d'amplification en temps réel marqué CE IVD). Chaque échantillon a été utilisé en effectuant toute la procédure d'analyse: l'extraction a été effectuée avec l'automate d'extraction «NucliSENS® easyMAG®» et l'amplification avec es produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Liquide céphalorachidien négatif pour l'ADN de CMV	60	0	60

Pour ce test, la spécificité diagnostique est égal à 100%.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 56 échantillons d'urines négatifs pour l'ADN du CMV (testés avec un kit d'amplification en temps réel marqué CE IVD). Chaque échantillon a été testé en effectuant la totalité de la session d'analyse: l'extraction a été effectuée avec l'automate d'extraction «NucliSENS® easyMAG®» et l'amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Urine négative pour l'ADN du CMV	56	1	55

Un échantillon d'urine, négatif pour l'ADN du CMV, a donné un résultat positif pour le CMV avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. Le résultat divergent peut s'expliquer par le titre très bas d'ADN du CMV dans la réaction (environ 4 gEq / réaction). Cette concentration est probablement inférieure au seuil de détection du kit. Pour ce test, la spécificité diagnostique est supérieure à 98,2%.

Robustesse: absence de contamination croisée

La robustesse du test, ou l'absence de contamination croisée, a été évaluée en analysant les résultats de cinq sessions de travail. Lors de ces sessions, des échantillons négatifs pour l'ADN du CMV ont été alternés avec des échantillons ensemencés avec de l'ADN du CMV. Aucun échantillon négatif ne s'est révélé positif.

L'absence de contamination croisée a été évaluée grâce à deux échantillons. Le premier est un échantillon de sang total négatif pour l'ADN du CMV ensemencés avec le matériel de référence calibré et certifié OptiQuant CMV DNA (souche AD169, AcroMetrix Europe B.V., Pays-Bas), à la concentration de 8.300 gEq / mL. Le deuxième est un échantillon de sang total négatif pour l'ADN du CMV. Cinq séries de 12 échantillons, alternant un échantillon positif à un échantillon négatif, ont été testées. L'ensemble des sessions d'analyse (extraction et amplification) ont été exécutées avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé dans un tube EDTA rendu positif pour l'ADN du CMV	30	30	0
Sang total prélevé dans un tube EDTA négatif pour l'ADN de CMV	30	0	30

Robustesse: pourcentage global d'erreur du système

La robustesse du test, ou le pourcentage global d'erreur du système engendrant des faux négatifs, a été évaluée en analysant un panel d'échantillons rendus faiblement positifs pour l'ADN du CMV. Pour ce test elle est inférieure à 1,7%.

Le pourcentage global d'erreur a été évalué grâce à des échantillons de sang total négatif pour l'ADN du CMV. Ces échantillons ont été rendus positifs avec du matériel de référence calibré et certifié OptiQuant CMV DNA (souche AD169, AcroMetrix Europe B.V. Pays-Bas), à la concentration de 900 gEq / mL. Chaque échantillon a été testé en effectuant toute la session d'analyse (extraction et d'amplification) avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé dans un tube EDTA rendu positif pour l'ADN du CMV	60	60	0

Roche cobas z 480 analyzer

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES

Échantillons

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

Sang total prélevé sur EDTA

Les échantillons de sang total destinés à l'extraction de l'ADN doivent être prélevés sur EDTA, identifiés selon les indications du laboratoire, transportés à +2 / +8°C et conservés à +2 / +8°C pendant trois jours maximum. Les échantillons doivent être congelés et stockés à -20°C pendant trente jours maximum ou à -70°C pour une période de temps 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. Décongeler immédiatement les échantillons congelés avant l'extraction, afin d'éviter l'éventuelle dégradation des acides nucléiques.

Remarque: en cas d'extraction de l'ADN à partir de sang total au moyen de l'instrument «**MagNA Pure 24 System**», **version logicielle 1.0** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction «**Pathogen200**» et suivre ces indications: introduire **350 µL** d'échantillon dans le MagNA Pure Tube 2,0 mL, charger le tube sur l'instrument et lancer l'extraction. Ce protocole traite 200 µL d'échantillon, ajoute **CPE 20 µL** / extraction et élue les acides nucléiques dans 100 µL. Le **CPE** doit être dilué au 1/2 dans de l'eau ultra pure pour la biologie moléculaire. Pour tout détail sur la procédure d'extraction, suivre attentivement les indications fournies dans la Notice d'utilisation du kit.

Plasma prélevé dans un tube EDTA

Les échantillons de plasma destinés à l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés dans un tube EDTA et suivant les indications du laboratoire. Ils doivent être transportés à +2 / +8°C et conservés à +2 / +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.

Décongeler immédiatement les échantillons congelés avant l'extraction, afin d'éviter l'éventuelle dégradation des acides nucléiques.

Remarque: en cas d'extraction de l'ADN à partir d'échantillons de plasma au moyen de l'instrument «**MagNA Pure 24 System**», **version logicielle 1.0** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction «**Pathogen200**» et suivre ces indications: introduire **350 µL** d'échantillon dans le MagNA Pure Tube 2,0 mL, charger le tube sur l'instrument et lancer l'extraction. Ce protocole traite 200 µL d'échantillon, ajoute **CPE 20 µL** / extraction et élue les acides nucléiques dans 100 µL. Le **CPE** doit être dilué au 1/2 dans de l'eau ultra pure pour la biologie moléculaire. Pour tout détail sur la procédure d'extraction, suivre attentivement les indications fournies dans la Notice d'utilisation du kit.

Urines

Les échantillons d'urines destinés à l'extraction des acides nucléiques doivent être récoltés dans des contenants 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 ou bien à +2 / +8°C pendant trois jours maximum. Éviter, si possible, de congeler les échantillons d'urine de premier jet. La congélation peut provoquer la précipitation d'inhibiteurs et la perte du titre de l'ADN.

En cas de congélation, il est recommandé de diviser les échantillons en plusieurs aliquots afin de ne pas les soumettre à des cycles répétés de congélation / décongélation et de les conserver à -20°C pendant trente jours au maximum ou à -70°C pendant plus longtemps.

Remarque: en cas d'extraction de l'ADN à partir d'échantillons d'urines au moyen de l'instrument «**MagNA Pure 24 System**», **version logicielle 1.0** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction «**Pathogen20** » et suivre ces indications: introduire **350 µL** d'échantillon dans le MagNA Pure Tube 2,0 mL, charger le tube sur l'instrument et lancer l'extraction. Ce protocole traite 200 µL d'échantillon, ajoute **CPE 20 µL** / extraction et élue les acides nucléiques dans 100 µL. Le **CPE** doit être dilué au 1/2 dans de l'eau ultra pure pour la biologie moléculaire. Pour tout détail sur la procédure d'extraction, suivre

attentivement les indications fournies dans la Notice d'utilisation du kit.

Autres échantillons :

Il n'y a pas de données disponibles concernant la performance du produit avec l'ADN extrait des échantillons cliniques suivants : écouvillon buccal, liquide amniotique, lavage broncho-alvéolaire (LBA) et aspiration bronchique (BA), suspensions de leucocytes, suspensions de granulocytes.

Substances interférentes

L'ADN extrait de l'échantillon source ne doit pas contenir d'héparine, d'hémoglobine, de dextran, de Ficol®[®], d'éthanol ou de 2-propanol pour éviter l'inhibition et l'apparition fréquente de résultats invalides.

Des quantités élevées d'ADN génomique humain dans l'ADN extrait de l'échantillon peuvent inhiber la réaction d'amplification.

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

Contrôles d'amplification

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

Comme contrôle négatif, utiliser de l'eau ultra pure pour la biologie moléculaire (non fournie dans le kit) à ajouter à la réaction au lieu de l'ADN extrait de l'échantillon.

Pour le contrôle positif, utiliser le produit «**CMV - ELITe Positive Control**» ou le produit «**CMV ELITe Standard**».

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.

PROCÉDURE

Mise en place de la session d'amplification en temps réel

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

En cas d'utilisation d'un instrument **cobas z 480 analyzer (Roche)**:

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

- allumer l'ordinateur de contrôle, allumer le thermocycleur pour le temps réel, lancer le logiciel dédié et, depuis la fenêtre principale, ouvrir une session "Nouvelle expérience";
- paramétrer un volume de réaction («Sample volume») de 40 µL;
- attribuer un code d'identification à chaque échantillon («Sample editor»);
- définir le cycle de températures de la réaction selon le tableau suivant:

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

Remarque: l'acquisition de la fluorescence se fait en mode simple, régler la vitesse de montée en température (°C/s) à 4,4°C/s.

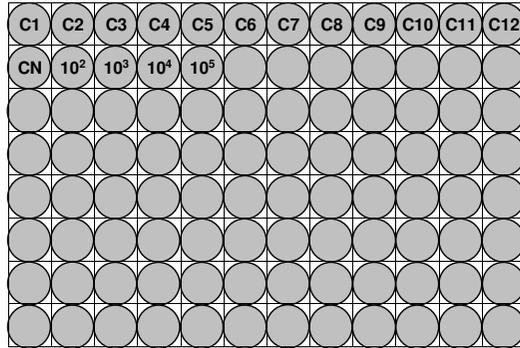
- sélectionner les canaux de détection du signal: le "détecteur" pour le capteur CMV avec le "canal

FAM 465-510" et le "détecteur" pour le capteur interne CI avec le "canal VIC 540-580";

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** (10^5 gEq, 10^4 gEq, 10^3 gEq, 10^2 gEq) pour obtenir la **Courbe standard**.

Exemple d'organisation d'une l'analyse quantitative de 12 échantillons :



Légende: C1 - C12: Échantillons à analyser ; CN : Contrôle négatif d'amplification ; 10^2 : Standard 10^2 gEq ; 10^3 : Standard 10^3 gEq ; 10^4 : Standard 10^4 gEq ; 10^5 : Standard 10^5 gEq.

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 les tubes contenant les échantillons à analyser. Agiter délicatement les tubes, les centrifuger pendant 5 secondes pour en reporter le contenu au fond et les conserver dans la glace.
- Prendre et décongeler les tubes de **CMV Q - PCR Mix**. Chaque tube permet de préparer **25 réactions**. Agiter délicatement les tubes, les centrifuger pendant 5 secondes pour en reporter le contenu au fond et les conserver dans la glace.
- Prélever et décongeler le tube de **CMV - Positive Control** or les tubes de **CMV Q - PCR Standard**. Agiter délicatement les tubes, les centrifuger pendant 5 secondes pour en reporter le contenu au fond et les conserver dans la glace.
- Prendre l'**AD-plate** qui sera utilisée par la suite en ayant soin de la manipuler avec des gants sans poudre et de ne pas endommager les puits.

1. Déposer délicatement et sans faire de bulles, **20 µL** du mélange de réaction **CMV Q - PCR Mix** dans le fond de l'**AD-plate** en suivant l'organisation définie précédemment dans la **Grille de travail**.

Remarque: Le reste de mélange de réaction doit être conservé à l'abri de la lumière, à -20°C et au maximum pendant un mois. Le mélange de réaction ne doit pas être congelé et décongelé plus de **5 FOIS**.

2. Conformément à la **Grille de travail** transférer délicatement dans le mélange de réaction **20 µL d'ADN extrait** du premier échantillon dans le puits correspondant de l'**AD-plate**. Mélanger soigneusement l'échantillon et pipeter trois fois l'**ADN extrait** dans le mélange de réaction. Ne pas faire de bulles. Procéder de la même façon avec tous les **ADN extraits**.
3. Déposer délicatement dans le mélange de réaction **20 µL d'eau ultra pure pour la biologie moléculaire** (non incluse dans le produit), dans le puits de l'**AD-plate** 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 l'**eau ultra pure pour la biologie moléculaire** dans le mélange de réaction. Ne pas faire de bulles.

4. En fonction du type de résultat demandé (qualitatif ou quantitatif), suivez l'une des deux options suivantes:

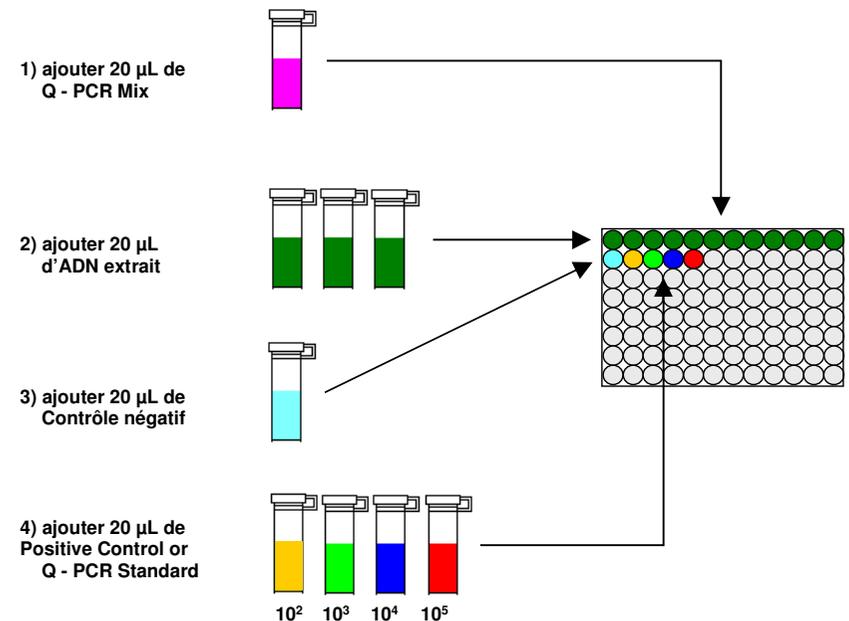
- Lorsqu'un résultat **qualitatif** de l'analyse est requis (détection de l'ADN du CMV): transférer, en les déposant avec précaution dans le mélange réactionnel, **20 µL de CMV - Positive Control** dans le puits correspondant de la **AD-plate**, préalablement établi dans la **Grille de travail**. Mélanger le contrôle positif en pipétant le **CMV - Positive Control** trois fois dans le mélange réactionnel. Veillez à ne pas créer de bulles.

- Lorsqu'un résultat **quantitatif** de l'analyse est requis (quantification de l'ADN du CMV): transférer, en les déposant avec précaution dans le mélange réactionnel, **20 µL de CMV Q - PCR Standard 10^2** dans le puits correspondant de la **AD-plate**, préalablement établi dans la **Grille de travail**. Mélanger le puits standard en pipétant trois fois le **CMV Q - PCR Standard 10^2** dans le mélange réactionnel. Veillez à ne pas créer de bulles. Procéder de la même manière avec les **CMV Q - PCR Standard 10^3 , 10^4 , 10^5** .

5. Sceller soigneusement l'**AD-plate** avec il **Film Scelleur (Sealing Film)**.
6. Transférer l'**AD-plate** 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 la configuration avec un nom identifiable et univoque (p.ex. « année-mois-jour-CMV-EGSpA »).

Remarque : Au terme du cycle de températures, l'**AD-plate** contenant les produits de réaction doit être retirée de l'instrument et jetée afin de ne pas contaminer l'environnement. **Ne jamais soulever le Sealing Film de l'Amplification microplate** afin d'éviter toute fuite des produits de réaction.

La figure ci-dessous illustre la préparation d'une réaction d'amplification.



Analyse qualitative des résultats

Les valeurs enregistrées de la fluorescence émise par la sonde spécifique au CMV (détecteur «CMV») et par la sonde spécifique du Contrôle interne (détecteur «CI») dans les réactions d'amplification doivent être analysées à l'aide du logiciel de l'instrument.

Sélectionner le menu "Analysis" et sélectionnez le type "Absolute Quant / Fit Points" (2 points)

Sélectionner le groupe d'échantillons sur lequel appliquer l'analyse

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 (Background)** du cycle 2 au cycle 6 ;

Pour les échantillons de **Plasma et Urine** :

- programmer manuellement à **0,55 le Seuil (Threshold)** pour le détecteur FAM «CMV» ;
- programmer manuellement à **1,2 le Seuil (Threshold)** pour le détecteur VIC «CI».

Pour les échantillons de **Plasma et Urine** :

- programmer manuellement à **0,80 le Seuil (Threshold)** pour le détecteur FAM «CMV» ;
- programmer manuellement à **1,5 le Seuil (Threshold)** pour le détecteur VIC «CI».

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

Dans la réaction d'amplification avec le **Positive Control***, la valeur de **Ct** pour CMV (résultat-Rapport) est utilisée pour valider l'amplification et la détection, comme décrit dans le tableau suivant:

Réaction Positive Control détecteur «CMV»	Résultat du test	Amplification / Détection
Ct ≤ 25	POSITIF	CORRECTE

Standard Curve "CMV" détecteur	Plage d'acceptabilité	Amplification / Détection
Correlation Coefficient (R2)	0.99 ≤ R2 ≤ 1.0	CORRECT

Si le résultat de la réaction d'amplification du **Q - PCR Standard 10⁵** est **Ct > 25** ou **Ct non déterminé (Undetermined)** l'ADN cible n'a pas été détecté correctement. Il y avait des problèmes dans la phase d'amplification ou de détection (distribution incorrecte du mélange réactionnel ou des standards, dégradation du mélange réactionnel ou du contrôle positif, réglage incorrect de la position du contrôle positif, réglage incorrect du cycle thermique) pouvant entraîner des résultats pas corrects. La session n'est pas valide et doit être répétée par la phase d'amplification.

Pour la réaction d'amplification du **Contrôle négatif**, la valeur du **Ct** de CMV (Results > Report) sert à valider l'amplification et la détection comme indiqué dans le tableau ci-dessous :

Réaction Contrôle négatif détecteur « CMV »	Résultat du test	Amplification / Détection
Ct Non interprétable	NÉGATIF	CORRECTE

Si le résultat de la réaction d'amplification du **Contrôle négatif** est différent de **Ct Non interprétable (Undetermined)**, cela indique que de l'ADN cible a été détecté. Des problèmes sont apparus pendant la phase d'amplification (contamination) pouvant engendrer des résultats erronés et des faux positifs. La session de travail n'est pas valide et doit être recommencée à partir de la phase d'amplification.

Dans les réactions d'amplification de chaque **échantillon**, la valeur du **Ct** de CMV est utilisée pour détecter la présence de l'ADN cible alors que la valeur du **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).

Les **Ct** des réactions d'amplification de chaque **échantillon** (Results > Report) doivent être interprétés comme suit :

Réaction de l'échantillon		Conformité de l'échantillon	Résultat du test	ADN de CMV
détecteur «CMV»	détecteur «CI»			
Ct Non interprétable	Ct > 35 ou Ct Non interprétable	non conforme	non valable	-
	Ct ≤ 35	conforme	valide, négatif	NON DÉTECTÉ
Ct Interprétable	Ct > 35 ou Ct Non interprétable	conforme	valide, positif	DÉTECTÉ
	Ct ≤ 35	conforme	valide, positif	DÉTECTÉ

Si le résultat de la réaction d'amplification d'un échantillon est **Ct Non interprétable** pour CMV et **Ct > 35** ou **Ct Non interprétable** pour le Contrôle Interne, cela signifie qu'il n'a pas été possible de détecter de façon efficace l'ADN du Contrôle Interne. Dans ce cas, des problèmes sont apparus dans la phase d'amplification (inefficacité ou absence d'amplification) ou dans la phase d'extraction (dégradation de l'ADN de l'échantillon, échantillon avec un nombre insuffisant de cellules, perte de l'ADN pendant l'extraction ou présence d'inhibiteurs dans l'ADN extrait) qui peuvent provoquer des résultats erronés et de faux négatifs. L'échantillon n'est pas conforme, le test n'est pas valable et doit être recommencé à partir de l'extraction de l'échantillon.

Si le résultat de la réaction d'amplification d'un échantillon est **Ct Non interprétable** pour CMV et **Ct ≤ 35** pour le Contrôle Interne, l'ADN de CMV n'a pas été correctement détecté dans l'ADN extrait de l'échantillon, mais il ne faut pas pour autant exclure la possibilité que l'ADN de CMV soit présent à un titre inférieur au seuil de détection du produit (voir Caractéristiques des performances). Dans ce cas, le résultat serait un faux négatif.

Les résultats obtenus avec ce test doivent être interprétés en tenant compte de toutes les données cliniques et des résultats des autres examens de laboratoire du patient.

Remarque: Lorsque, dans la réaction d'amplification d'un échantillon, la présence de l'ADN de CMV a été détectée, l'amplification du Contrôle Interne peut avoir un Ct > 35 ou Ct Non interprétable. En effet, la réaction d'amplification à faible efficacité du Contrôle interne peut être annulée par la compétition avec la réaction d'amplification à haute efficacité de CMV. Dans ce cas, l'échantillon est convenit et le résultat positif du test est valable.

Analyse quantitative des résultats

Après avoir effectué la procédure d'analyse quantitative, il est possible de quantifier les résultats relatifs aux échantillons positifs.

Si le résultat de la réaction d'amplification du **Q - PCR Standard 10⁵** est **Ct > 25** ou **Ct Non interprétable (Undetermined)**, ou les valeurs de Ct dans les réactions d'amplification des quatre Q-PCR standard ne sont pas placées régulièrement sur la ligne d'étalonnage, l'ADN cible n'a pas été correctement mesurée. Des problèmes sont apparus pendant la phase d'amplification ou de détection (distribution erronée du mélange de réaction ou des standards, dégradation du mélange de réaction ou des standards, paramétrage erroné de la position des standards ou du cycle de température) qui peuvent générer des résultats erronés. La session de travail n'est pas valide et doit être recommencée à partir de la phase d'amplification.

Les valeurs du **Ct** de CMV dans les réactions d'amplification de chaque **échantillon** et la **Courbe standard (Standard Curve, Results > Standard Curve)** de la session d'amplification sont utilisées pour calculer la **Quantité (Quantity)** d'ADN cible présente dans les réactions d'amplification relatives aux échantillons.

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

Ce produit est en mesure de quantifier de 1 000 000 à environ 10 génomes Équivalents par réaction, de 25 000 000 à 250 génomes Équivalents par mL de sang total avec adoption du système d'extraction **MagNA Pure 24** (voir Caractéristiques des performances), comme indiqué dans le tableau suivant :

Résultat de l'échantillon détecteur FAM «CMV»	génomes Équivalents de CMV par réaction
Quantité > 1 x 10 ⁶	SUPÉRIEURS À 1 000 000
1,0 x 10 ¹ ≤ Quantité ≤ 1 x 10 ⁶	= Quantité
Quantité < 1,0 x 10 ¹	INFÉRIEURS À 10

Les résultats (Quantité) de chaque échantillon (Results > Report) sont utilisés pour calculer le nombre de génomes Équivalents (gEq) de CMV présents dans l'échantillon initial (Nc) selon la formule :

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

Où :

Vc est la quantité d'échantillon utilisée dans l'extraction exprimée selon l'unité de mesure requise;

Ep est l'efficacité de la procédure, de l'extraction et de l'amplification, exprimée en décimaux;

Ve est le volume total obtenu de l'extraction exprimé en µL;

Va est le volume du produit d'extraction utilisé dans la réaction d'amplification exprimé en µL;

Quantité est le résultat de la réaction d'amplification exprimé en gEq par réaction.

Lors de l'utilisation d'échantillons de sang total et de plasma prélevés sur EDTA et **MagNA Pure 24** et que l'on souhaite obtenir le résultat exprimé en gEq / mL, la formule devient :

Formule simplifiée pour sang total, plasma, urines et MagNA Pure 24

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 25 \times \text{Quantité}$$

Conversion des résultats en Unités Internationales

Lorsque l'on utilise des échantillons de sang total prélevé sur EDTA et **MagNA Pure 24** et que l'on souhaite obtenir le résultat en UI / mL, la formule devient :

Formule simplifiée pour sang total et MagNA Pure 24

$$Fc = 0.5 \text{ IU / gEq}$$

$$Nc \text{ (IU / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$$

$$Nc \text{ (IU / mL)} = 12.5 \times \text{Quantité}$$

Lorsque des échantillons de plasma prélevé dans un tube EDTA et **MagNA Pure 24** sont utilisés et que le résultat est requis en UI / mL, la formule devient :

Formule simplifiée pour plasma et MagNA Pure 24

$$Fc = 0.4 \text{ IU / gEq}$$

$$Nc \text{ (IU / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$$

$$Nc \text{ (IU / mL)} = 10 \times \text{Quantité}$$

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK015PLD

Lorsque des échantillons d'urine et **MagNA Pure 24** sont utilisés et que le résultat est requis en UI / mL, la formule devient :

Formule simplifiée pour urines and MagNA Pure 24

$$Fc = 1.1 \text{ IU / gEq}$$

$$Nc \text{ (IU / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$$

$$Nc \text{ (IU / mL)} = 27.5 \times \text{Quantité}$$

Où **Fc** est le facteur de conversion calculé à l'aide du matériau étalonné de référence approuvé par l'OMS "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification (NAT) Techniques", code NIBSC 09/162, Royaume-Uni (voir le paragraphe Caractéristiques de performance).

CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES**Sensibilité analytique: seuil de détection**

La sensibilité analytique de ce test, comme seuil de détection, permet de détecter la présence d'environ 10 copies dans les 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La sensibilité analytique du test, comme seuil de détection, a été testée à partir d'un ADN plasmidique contenant le produit d'amplification, dont la concentration initiale a été mesurée au spectrophotomètre. L'ADN plasmidique a été dilué à un titre de 10 copies / 20 µL en présence de 150.000 copies de pBÉTAGLOBINE/20 µL. Cet échantillon a été amplifié 27 fois, avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
10 copies d'ADN plasmidique + 150.000 copies de pBÉTAGLOBINE	27	26	1

La sensibilité analytique de ce test utilisé en association avec sang total, plasma et urines et **MagNA Pure 24** a été vérifiée avec un panel de dilutions de CMV dans la concentration limite. Le panel a été préparé en diluant le "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (code NIBSC 09/162, Royaume-Uni) dans une matrice négative d'ADN de CMV. Le panel était composé de six points autour de la concentration limite. Chaque échantillon du panel a été amplifié 12 fois en effectuant l'extraction à l'aide du système automatique **MagNA Pure 24** et des produits ELITechGroup S.p.A.. L'analyse statistique a été réalisée par la régression Probit. La limite de détection a été calculée pour les concentrations auxquelles la probabilité d'un résultat positif est de 95%.

Les résultats de chaque matrice sont présentés dans le tableau suivant:

Limite de détection avec MagNA Pure 24 (UI / mL)

Matrice	95% de positivité	intervalle de confiance à 95 %.	
		seuil inférieur	seuil supérieur
whole bood	135 UI / mL	84 UI / mL	354 UI / mL
plasma	88 UI / mL	54 UI / mL	279 UI / mL
urine	296 UI / mL	174 UI / mL	851 UI / mL

La sensibilité analytique en gEq / mL pour chaque matrice est calculée en appliquant le facteur de conversion spécifique indiqué à la page 67.

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

Limite de détection avec MagNA Pure 24 (gEq / mL)

Matrice	95% de positivité	intervalle de confiance à 95 %.	
		seuil inférieur	seuil inférieur
whole bood	270 gEq / mL	168 gEq / mL	708 gEq / mL
plasma	220 gEq / mL	108 gEq / mL	698 gEq / mL
urine	269 gEq / mL	158 gEq / mL	774 gEq / mL

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF

RTK015PLD

Sensibilité analytique : intervalle de mesure linéaire

La sensibilité analytique de ce test, comme intervalle de mesure linéaire, permet de quantifier d'environ 25.000.000 à environ 25 génomes Équivalents dans les 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La sensibilité analytique du test a été évaluée à l'aide d'un panel de dilutions (1 Log₁₀ entre une dilution et la suivante) d'ADN plasmidique contenant le produit d'amplification, dont la concentration initiale a été mesurée au moyen du spectrophotomètre. Les solutions contenant 10⁷ molécules par réaction à 10¹ molécules par réaction ont été amplifiées 9 fois avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. L'analyse des résultats, réalisée par régression linéaire, a démontré que le test présente une linéarité pour tous les points du panel (coefficient de corrélation linéaire supérieur à 0,99).

Le seuil inférieur de l'intervalle linéaire de mesure a été fixé à environ 10 gEq / réaction, selon un logarithme équivalant au standard d'amplification Q - PCR Standard à concentration plus faible (10² gEq / 20 µL).

Le seuil supérieur de l'intervalle linéaire de mesure a été fixé à environ 10⁶ gEq / réaction, selon un logarithme équivalant au standard d'amplification Q - PCR Standard à concentration plus élevée (10⁹ gEq / 20 µL).

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Intervalle de mesure linéaire avec MagNA Pure 24		
	Seuil inférieur	Seuil supérieur
gEq / mL	250	25.000.000
gEq / réaction	10	1.000.000

Les transformations de gEq / mL à gEq / réaction et vice versa ont été calculées comme indiqué à la page 63.

La linéarité de ce test utilisé en association avec différentes matrices et **MagNA Pure 24** a été vérifiée avec un panel de dilutions de CMV. Le panel a été préparé en diluant le "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (code NIBSC 09/162, Royaume-Uni) dans une matrice négative d'ADN de CMV. Le panel était composé de cinq dilutions (niveaux de dilution de 1 log₁₀) à partir de 10⁶ UI / mL à 10² UI / mL. Chaque échantillon du panel a été amplifié 12 fois en effectuant l'extraction à l'aide du système automatique **MagNA Pure 24** et des produits ELITechGroup S.p.A.. L'analyse des données obtenues, effectuée par régression linéaire, a montré que le test présente une réponse linéaire pour toutes les dilutions supérieures à la Limite de détection.

Limite de quantification

Le seuil inférieur de la gamme de mesure linéaire a été fixée à la concentration la plus faible qui donne 100 % de positivité et des résultats quantitatifs suffisamment fidèles et précis. Le seuil supérieur de la gamme de mesure linéaire a été fixée à la concentration testée la plus élevée qui donne des résultats quantitatifs suffisamment fidèles et précis.

La gamme de mesure linéaire en gEq / mL pour chaque matrice est calculée en appliquant le facteur de conversion spécifique indiqué à la page 63.

Les résultats de chaque matrice sont présentés dans les tableaux suivants:

Gamme de mesure linéaire pour les échantillons de sang total et MagNA Pure 24		
Unité de mesure	Seuil inférieur	Seuil supérieur
UI / mL	178	1.000.000
gEq / mL	356	2.000.000

Gamme de mesure linéaire pour les échantillons de plasma et MagNA Pure 24		
Unité de mesure	Seuil inférieur	Seuil supérieur
UI / mL	100	1.000.000
gEq / mL	250	2.500.000

CMV ELITe MGB® Kit

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

REF

RTK015PLD

Gamme de mesure linéaire pour les échantillons d'urines total et MagNA Pure 24		
Unité de mesure	Seuil inférieur	Seuil supérieur
UI / mL	1000	1.000.000
gEq / mL	909	909.091

Sensibilité analytique: Précision et Fidélité

La précision du test, ou la variabilité des résultats au cours d'une même session d'amplification avec différents réplicas d'un échantillon, a permis d'obtenir un pourcentage de Coefficient moyen (CV %) des valeurs de Ct inférieur à 1,36% pour l'intervalle compris entre 10⁶ molécules et 10¹ molécules dans les 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La précision du test, ou la variabilité des résultats au cours d'une même session d'amplification avec différents réplicas d'un échantillon, a permis d'obtenir un pourcentage de Coefficient moyen (CV %) des quantités mesurées d'environ 12,5 % pour l'intervalle compris entre 10⁶ molécules et 10¹ molécules dans les 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

L'étude de la fidélité du test, entendue comme différence entre la moyenne des résultats obtenus au cours d'une même session d'amplification avec différentes répliques d'un échantillon et la valeur théorique de la concentration de l'échantillon, a permis d'obtenir un manque de fidélité des alentours 6,7% pour l'intervalle compris entre 10⁶ molécules et 10¹ molécules dans les 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La précision et la fidélité ont été calculées à partir des données obtenues lors des essais pour l'étude de l'intervalle de mesure linéaire.

Reproductibilité avec un matériau de référence certifié

La sensibilité analytique du test a été évaluée en utilisant comme matériau de référence le panel calibré "AcroMetrix® CMVtc Panel" (Acrometrix, Life Technologies, US). Chaque échantillon du panel a été amplifié 2 fois en effectuant l'extraction à l'aide du système automatique **MagNA Pure 24** et des produits ELITechGroup S.p.A..

Les résultats en UI/mL ont été calculés en appliquant le facteur de conversion pour **MAGNA Pure 24** et le plasma sont reportés dans le tableau suivant:

Tests avec des matériaux de référence étalonnés et MAGNA Pure 24				
Echantillon	Titre nominal UI / mL	Titre nominal Log IU / mL	Positif / Réplicats	Résultats moyens Log UI / mL
CMV DNA 3E6	3,000,000	6.477	2/2	6.299
CMV DNA 3E5	300,000	5.477	2/2	5.280
CMV DNA 3E4	30,000	4.477	2/2	4.298
CMV DNA 3E3	3,000	3.477	2/2	3.364
CMV DNA 3E2	300	2.477	2/2	2.262

Tous les échantillons ont été détectés comme positifs, avec un titre dans la valeur attendue ± 0,5 Log.

Facteur de conversion en unités internationales

Le facteur de conversion à utiliser avec ce test pour transformer le résultat quantitatif de gEq / mL en unités internationales / mL a été déterminé à l'aide d'un panel de matériel de référence étalonné approuvé par l'OMS ("1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (code NIBSC 09/162, Royaume-Uni) dans les différentes matrices négatives pour l'ADN CMV et en association avec **MagNA Pure 24**. Le panel a 6 niveaux de dilution de 1 Log. Chaque échantillon du panel a été amplifié 16 fois en effectuant l'extraction à l'aide du système automatique **MagNA Pure 24** et des produits ELITechGroup S.p.A..

L'analyse des données obtenues a permis de calculer un facteur de conversion moyen (Fc) égal à **0,5** Unités Internationales (UI) par gEq de CMV détecté avec des échantillons de **sang total**.

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

REF RTK015PLD

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant:

Conversion en unités internationales avec sang total et «MagNA Pure» (Fc = 0.5 UI/ gEq)				
Concentration attendue UI / mL	Concentration attendue Log ₁₀ IU / mL	Quantité moyenne gEq / mL	Quantité moyenne UI / mL	Quantité moyenne Log ₁₀ UI / mL
111,055	5.046	197,188	98,594	4.991
34,903	4.543	73,891	36,945	4.556
10,970	4.040	23,428	11,714	4.050
3,448	3.538	8,863	4,431	3.605
1,084	3.035	2,963	1,481	3.136
341	2.532	995	497	2.638

L'analyse des données obtenues a permis de calculer un facteur de conversion moyen (Fc) égal à 0,4 Unité Internationale (UI) par gEq de CMV détecté avec des échantillons de **plasma**.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant:

Conversion en Unités Internationales avec plasma et «MagNA Pure» (Fc = 0.4 UI/ gEq)				
Concentration attendue UI / mL	Concentration attendue Log ₁₀ IU / mL	Quantité moyenne gEq / mL	Quantité moyenne UI / mL	Quantité moyenne Log ₁₀ UI / mL
111,055	5.046	235,469	94,188	4.969
34,903	4.543	89,375	35,750	4.548
10,970	4.040	25,950	10,380	4.008
3,448	3.538	9,683	3,873	3.576
1,084	3.035	3,189	1,276	3.086
341	2.532	910	364	2.526

L'analyse des données obtenues a permis de calculer un facteur de conversion moyen (Fc) égal à 1,1 Unités Internationales (UI) par gEq de CMV détecté avec les échantillons d'**urines**.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Conversion en Unités Internationales avec urines et «MagNA Pure» (Fc = 1.1 IU/ gEq)				
Expected conc. IU / mL	Expected conc. Log ₁₀ IU / mL	Mean Quantity gEq / mL	Mean Quantity IU / mL	Mean Quantity Log ₁₀ IU / mL
316,228	5.500	217,719	242,110	5.379
100,000	5.000	91,719	100,891	4.995
31,623	4.500	33,484	36,833	4.557
10,000	4.000	10,550	11,605	4.053
3,162	3.500	3,434	3,777	3.565
1,000	3.000	1,050	1,155	3.054

Sensibilité diagnostique: confirmation d'échantillons positifs

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 52 échantillons de sang total prélevés dans EDTA positif pour l'ADN de CMV (testé avec un produit CE IVD d'amplification en temps réel), 63 échantillons de plasma collectés dans EDTA positifs pour l'ADN de CMV (testé avec un produit d'amplification en temps réel CE IVD), 6 échantillons d'urine positifs pour l'ADN de CMV (testé avec un produit CE IVD d'amplification en temps réel) et sur 45 échantillons d'urine d'ADN de CMV négatifs ont été positivisés pour l'ADN de CMV en ajoutant "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC, Royaume-Uni, code 09/162).

Chaque échantillon a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse : extraction avec le système automatique **MagNA Pure 24** et amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A.

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

REF RTK015PLD

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé sur EDTA positif pour l'ADN de CMV	51	51	0
Plasma prélevé sur EDTA positif pour l'ADN de CMV	63	62	1
Urine positive pour l'ADN de CMV	6	6	0
Urine rendue positive pour l'ADN de CMV	45	44	1

Tous les échantillons étaient valides.

Tous les échantillons de sang total ont été confirmés positifs pour l'ADN de CMV.

La sensibilité diagnostique du test en association avec la matrice de sang total dans ce test était égale à 100%.

Soixante-deux (62) échantillons sur 63 échantillons de plasma se sont révélés positifs pour l'ADN de CMV, tandis qu'un échantillon était un écart négatif.

La spécificité diagnostique du test en association avec la matrice plasmatique dans ce test était égale à 98%.

Tous les échantillons d'urine ont été confirmés positifs pour l'ADN de CMV. Un échantillon positivisé a rapporté un résultat négatif avec ELITechGroup S.p.A. Cet écart peut être expliqué par une erreur dans la préparation de l'opérateur.

La sensibilité diagnostique du test dans ce test était égale à 98%.

La sensibilité diagnostique totale du test était égale à 98,8%.

Spécificité diagnostique: confirmation d'échantillons négatifs

La spécificité du diagnostic a été évaluée en utilisant comme matériau de référence 53 échantillons de sang total prélevés dans l'EDTA présumé négatifs pour l'ADN de CMV, 50 échantillons de plasma prélevés dans l'EDTA présumés négatifs pour l'ADN de CMV, et 49 échantillons présumés négatifs pour ADN de CMV.

Chaque échantillon a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse : extraction et configuration PCR avec le système automatique **MagNA Pure 24** et amplification avec les 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 de CMV	53	1	52
Plasma prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN de CMV	50	2	48
Urine négative pour l'ADN de CMV	49	0	49

Tous les échantillons de sang total étaient valables en première analyse et cinquante deux (52) sur 53 échantillons de sang total ont été confirmés négatifs pour l'ADN de CMV, alors qu'un échantillon était un écart positif. La spécificité diagnostique du test en association avec la matrice sang total dans ce test était égale à 98%.

Quarante-neuf (49) sur 50 échantillons de plasma étaient valables en première analyse, un échantillon non valide a donné un résultat négatif après ré-amplification. Quarante-huit (48) sur 50 échantillons de plasma ont été confirmés négatifs pour l'ADN de CMV, alors que deux échantillons ont présenté des résultats discordants positifs. La spécificité diagnostique du test en association avec la matrice plasma dans ce test était égale à 96%.

Tous les échantillons d'urines étaient valables en première analyse et confirmés négatifs pour l'ADN de CMV. La spécificité diagnostique du test en association avec la matrice urinaire dans ce test était égale à 100%.

La spécificité diagnostique totale du test était égale à 98%.

Remarque: les données et les résultats complets des essais effectués pour l'évaluation des caractéristiques des performances du produit, avec les matrices et les instruments, sont enregistrés dans la Section 7 du Fascicule Technique de Produit «CMV ELITe MGB® Kit», FTP RTK015PLD.

BIBLIOGRAPHIE

T. E. Fenner et al. (1991) *J Clin Microbiology* 29: 2621 - 2622
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Utiliser uniquement de l'ADN extrait à partir des échantillons cliniques suivants: sang total prélevé dans un tube EDTA, liquide céphalo-rachidien, urines, écouvillons buccaux, liquide amniotique et BAL.

Ne pas utiliser de l'ADN extrait d'échantillons contenant de l'héparine: l'héparine inhibe la réaction d'amplification des acides nucléiques et engendre des résultats erronés.

Ne pas utiliser de l'ADN contaminé par de l'hémoglobine, du dextran, du Ficoll®, de l'éthanol ou du 2-propanol: ces substances inhibent la réaction d'amplification des acides nucléiques et peuvent engendrer des résultats erronés.

Ne pas utiliser de l'ADN contenant des quantités élevées d'ADN génomique humain car l'ADN génomique peut inhiber la réaction d'amplification des acides nucléiques.

Aucune donnée n'est disponible pour les performances de ce produit avec de l'ADN extrait des échantillons cliniques suivants: suspensions de leucocytes, suspensions de granulocytes, plasma prélevé dans un tube EDTA, liquide amniotique.

Utilisez ce produit uniquement avec les instruments validés et les échantillons cliniques associés indiqués dans la section "Échantillons et contrôles".

Aucune donnée n'est disponible concernant les éventuels phénomènes d'inhibition par des médicaments antiviraux, 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 CMV, 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 a 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 des 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 positifs, il est nécessaire de porter de 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.

Les différentes technologies présentant des différences intrinsèques, avant de passer à un nouveau produit il est conseillé de procéder à des études de corrélation pour estimer ces différences.

Un résultat négatif obtenu avec ce produit indique que de l'ADN de CMV n'a pas été détecté. Il ne faut pas exclure que de l'ADN de CMV soit présent à un titre inférieur au seuil de détection du produit (voir Caractéristiques des performances); dans ce cas, le résultat serait un faux négatif.

Un résultat non valable obtenu avec ce produit indique qu'il n'a pas été possible de relever efficacement l'ADN du Contrôle Interne; dans ce cas, l'analyse de l'échantillon devra être répétée à partir de l'extraction avec d'éventuels retards dans l'obtention du résultat.

Les polymorphismes éventuels de la région du génome viral dans lequel hybrident les oligonucléotides d'amorçage et la sonde du produit pourraient compromettre la détection et la quantification de l'ADN de CMV.

Comme tous les autres tests de diagnostics, 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 tests 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 prénatal et d'urgence, ce risque peut contribuer à la prise de décisions erronées pouvant avoir de conséquences graves pour le patient.

PROBLÈMES ET SOLUTIONS

L'ADN cible n'est pas détecté dans la réaction des Q - PCR Standard ou le Coefficient de corrélation de la Courbe standard n'est pas valide

Causes éventuelles	Solutions
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 du contrôle positif ou des standards distribué.
Configuration de session incorrecte sur ELITe InGenius et ELITe BeGenius	Vérifiez la position du mélange réactionnel, du contrôle positif ou des étalons. Vérifiez les volumes de mélange réactionnel, de contrôle positif ou d'étalons.
Dégradation de la sonde.	Utiliser un nouveau tube de mélange de réaction.
Dégradation du contrôle positif ou 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.
Erreur d'instrument.	Contactez le service technique ELITechGroup.

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.
Configuration de session incorrecte sur ELITe InGenius et ELITe BeGenius	Vérifiez la position du mélange réactionnel ou du contrôle négatif. Vérifiez les volumes de mélange réactionnel ou de contrôle négatif.
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 ultra pure pour la biologie.	Utiliser un nouveau tube d'eau.
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.
Erreur d'instrument.	Contactez le service technique ELITechGroup.

ADN cible et contrôle interne non détectés dans les réactions de l'échantillon	
Causes éventuelles	Solutions
Distribution incorrecte dans les puits de microplaques.	Évitez de renverser le contenu du tube à essai d'échantillon. Changez toujours les conseils entre un échantillon et un autre. Soyez prudent lorsque vous distribuez des échantillons dans les puits de microplaques et respectez la feuille de travail.
Configuration de session incorrecte sur ELITe InGenius et ELITe BeGenius	Vérifiez la position du mélange réactionnel ou des échantillons. Vérifiez les volumes de mélange réactionnel ou d'échantillons.
Dégradation du contrôle interne.	Utilisez de nouvelles aliquotes de contrôle interne.
Inhibition due à des échantillons de substances interférentes.	Répétez l'amplification avec une dilution 1: 2 dans de l'eau de qualité de biologie moléculaire de l'échantillon élué dans une session "PCR uniquement". Répétez l'extraction et l'amplification de l'échantillon.
Stockage incorrect des réactifs.	Vérifiez que le mélange réactionnel n'a pas été exposé à la température ambiante pendant plus de 30 minutes.
Problèmes lors de l'extraction	Vérifiez la qualité et la concentration de l'ADN extrait.
Erreur d'instrument.	Contactez le service technique ELITechGroup.

Une Présence de fluorescence de base irrégulière ou élevée dans les réactions	
Causes éventuelles	Solutions
Erreur de distribution de l'échantillon.	Mélanger soigneusement, en pipétant 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".

Présence d'une courbe de dissociation anormale	
Causes éventuelles	Solutions
Absence de pic défini. Pic défini mais différent de celui des autres échantillons et des standards	Contrôler que le Ct du détecteur FAM soit inférieur à 30. Des quantités élevées de produit d'amplification présentes à la fin de la réaction peuvent interférer avec l'analyse de la courbe de dissociation Répétez l'amplification de l'échantillon pour confirmer la présence d'un ADN cible avec une mutation possible. Pour confirmer la présence d'une mutation, l'ADN cible présent dans l'échantillon devrait être séquencé.

Erreur 30103 sur ELITe InGenius	
Causes éventuelles	Solutions
Concentration de cible trop élevée dans l'échantillon.	Si une amplification significative est observée dans la parcelle PCR: - répéter l'amplification avec une dilution 1:10 dans de l'eau de qualité de biologie moléculaire de l'échantillon élué dans une session "PCR uniquement" ou - répéter l'extraction avec une dilution 1:10 dans de l'eau de qualité biologie moléculaire de l'échantillon dans une session "Extraire + PCR".

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*. Certifiée par DEKRA Certification B.V., Pays Bas.
-  Contenu suffisant pour "x" tests.
-  Attention, consulter le mode d'emploi.
-  Contenus.
-  Conserver à l'abri de la lumière solaire.
-  Fabriqué par.

NOTE POUR L'ACQUEREUR: LICENCE LIMITEE

Ce produit contient des réactifs fabriqués par Life Technologies Corporation et est vendu dans le cadre d'accords de licence entre ELITechGroup S.p.A. et ses sociétés affiliées et Life Technologies Corporation. Le prix d'achat de ce produit comprend des droits limités et non transférables d'utiliser uniquement cette quantité du produit uniquement pour les activités de l'acheteur qui sont directement liées aux diagnostics humains. Pour plus d'informations sur l'achat d'une licence pour ce produit à des fins autres que celles indiquées ci-dessus, contactez le service des licences, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Téléphone: +1(760)603-7200. Télécopie: +1(760)602-6500. Courriel: outlicensing@thermofisher.com.

Les réactifs de détection ELITE MGB® sont couverts par un ou plusieurs des États-Unis. Brevets nos. 6127121, 6485906, 6660845, 6699975, 6727356, 6790945, 6949367, 6972328, 7045610, 7319022, 7368549, 7381818, 7662942, 7671218, 7715989, 7723038, 7759126, 7767834, 7897736, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8969003, 8980855, 9 056 887, 9 085 800, 9 169 256 et numéros de brevet EP, 0819133, 1068358, 1144429, 1232157, 1261616 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939, ainsi que des demandes actuellement en instance.

Cette licence limitée autorise la personne ou l'entité juridique à laquelle ce produit a été fourni à utiliser le produit et les données générées par l'utilisation du produit, uniquement à des fins de diagnostic humain. Ni ELITechGroup S.p.A. ni ses concédants de licence n'accordent aucune autre licence, expresse ou implicite à d'autres fins.

ELITE MGB® et le logo ELITE MGB® sont des marques commerciales enregistrées pour l'Union européenne.

ELITE InGenius® et ELITE BeGenius® sont des marques déposées d'ELITechGroup.

«NucliSENS® easyMAG®» sont des marques déposées de bioMérieux.

«QIASymphony®» est une marque déposée de QIAGEN.

Ficoll® est une marques enregistrées de GE Healthcare Bio-Sciences AB.

MagNA Pure est une marques de Roche.

CMV ELITE MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTK015PLD



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

A. Intended use

The «**CMV ELITE MGB® Kit**» product is a **qualitative** and **quantitative** nucleic acids amplification assay for the detection and quantification of the DNA of Human Cytomegalovirus (CMV) in DNA samples extracted from whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA, cerebrospinal fluid (CSF), urine, buccal swab, amniotic fluid and bronchoalveolar lavage (BAL) / bronchial aspirate (BA).

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of CMV infections, alongside patient clinical data and other laboratory test outcomes.

The assay is CE-IVD validated in combination with **Whole Blood EDTA and Plasma EDTA** and the instruments **ELITE InGenius** and **ELITE BeGenius**.

The assay is CE-IVD validated in combination with **Cerebrospinal Fluid, Urine, Buccal swab, Amniotic fluid, BAL, BA** and the instrument **ELITE InGenius**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
Internal Control	CMV MIEA gene (exon 4 region)	FAM
	Human beta Globin gene	AP525

C. Validated matrix

Whole Blood EDTA, Plasma EDTA, Cerebrospinal Fluid, Urine, Buccal swab, Amniotic fluid, BAL, BA

D. Kit component

CMV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 96
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

ELITE InGenius instrument: INT030	›	CMV - ELITE Positive Control: CTR015PLD
ELITE BeGenius instrument: INT040	›	CMV ELITE Standard: STD015PLD
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 (for INT030)
ELITE InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS	›	1000 µL Filter Tips Tecan : 30180118 (for INT040)
CPE – Internal Control: CTCRPE		

F. ELITE InGenius protocol

- › Sample volume 200 µL
- › CPE Internal Control volume 10 µL
- › Total eluate volume 100 µL
- › PCR eluate input volume 20 µL
- › CMV Q-PCR Mix volume 20 µL
- › Unit of quantitative result International Unit: IU/mL genome equivalent: gEq/mL (equivalent to copies/mL)
- › Frequency of controls 15 days
- › Frequency of calibration 60 days

G. ELITE InGenius/ELITE BeGenius Performances

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	109 IU/mL – 156 gEq/mL	100% 60/60*	93% 55/59*
Plasma	88 IU/mL – 293gEq/mL	100% 54/54*	98% 57/58*

*confirmed samples/ tested samples

Matrix	Linearity (gEq/mL)	Linearity (IU/mL)	CF gEq/mL to IU/mL
Whole Blood	254 – 1.4x10 ⁸	178 – 1 x10 ⁸	0.7
Plasma	293 – 3.3x10 ⁸	88 – 1 x10 ⁸	0.3

H. ELITe InGenius Performances

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Cerebrospinal fluid	58 IU/mL – 193 gEq/mL	100% 20/20*	100% 20/20*
Urine	151 IU/mL – 216 gEq/mL	100% 31/31*	100% 54/54*
Buccal swab	44 IU/mL – 220 gEq/mL	100% 50/50*	96% 50/52*
Amniotic fluid	57 IU/mL – 285 gEq/mL	100% 31/31*	100% 32/32*
BAL / BA	97 IU/mL – 485 gEq/mL	100% 49/49*	100% 49/49*

Matrix	Linearity (gEq/mL)	Linearity (IU/mL)	CF gEq/mL to IU/mL
Cerebrospinal fluid	335 – 5x10 ⁷	101 – 1,5 x10 ⁷	0.3
Urine	451 – 5x10 ⁷	316 – 3,5 x10 ⁷	0.7
Buccal swab	500 – 5x10 ⁷	100 – 1,0 x10 ⁷	0.2
Amniotic fluid	500 – 5x10 ⁷	100 – 1,0 x10 ⁷	0.2
BAL / BA	890 – 5x10 ⁷	178 – 1,0 x10 ⁷	0.2

H. Reference Material

Panel name	Provider	Qualitative results	Quantitative results
Molecular Q Panel: CMVMQP01	Qnostics	Concordance 100% (4/4)*	Titre as expected value ± 0.5 log
Acrometrix: CMVDNA3E	Thermo-Fisher	Concordance 100% (5/5)*	Titre as expected value ± 0.5 log
QCMD 2014: CMVDNA14	Qnostics	Concordance 100% (10/10)*	Titre as expected value ± 1 log**

*confirmed samples/ tested samples

**within the range of quantification

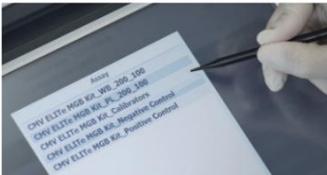
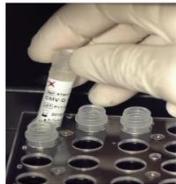
I. ELITe InGenius Procedures

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

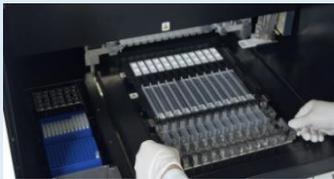
Before analysis

1. Switch on ELITe InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"	2. Verify calibrators: CMV Q-PCR standard in the "Calibration menu" Verify controls: CMV pos. and neg. controls in the "Control menu" <i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired	3. Thaw the CMV Q- PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec
--	--	--

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen 	2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elute: "100 µL" 	3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID 
4. Select the "Assay protocol" of interest 	5. Select the sample position: Primary tube or sonication tube 	6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in the inventory block 

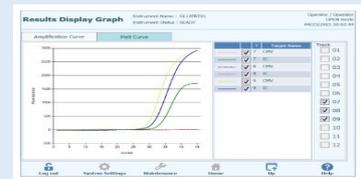
7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, sonication tube and primary sample racks



8. Close the door
Start the run



9. View, approve and store the results



Procedure 2 - PCR only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above

5. Select the protocol "PCR only" and set the sample position "Extra tube"

6. Load the extracted nucleic acid tubes in the rack n°4

7. Load the PCR cassette rack
Load the Q-PCR Mix in the inventory block

8. Close the door
Start the run

9. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above

5. Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position :
Primary tube or Secondary tube

6. Load the CPE Internal Control in the inventory block

7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, sonication tube and primary sample racks

8. Close the door
Start the run

9. Archive the eluate sample

ELITE BeGenius Procedures

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

Before analysis

1. Switch on ELITE BeGenius Identification with username and password
Select the mode "Closed"

2. Verify calibrators: CMV Q-PCR standard in the "Calibration menu"
Verify controls: CMV pos. and neg. controls in the "Control menu"
NB: Both have been run, approved and not expired

3. Thaw the CMV Q- PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes
Vortex gently
Spin down 5 sec

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

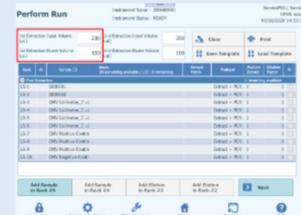
1. Select "Perform Run" on the touch screen



2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the cooling area. The barcode scan is already active



3. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Eluate: "100 µL"



4. Select the "Assay protocol" of interest



Note: if a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4

5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area



6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in Reagent Rack and insert it in the cooling area



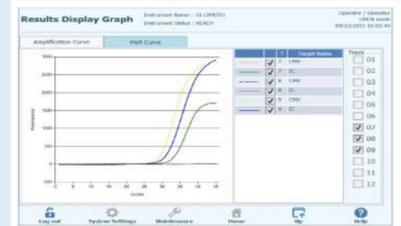
7. Load: Filter Tips, Extraction rack, and PCR rack



8. Close the door Start the run



9. View, approve and store the results



Procedure 2 - PCR only

1. Select "Perform Run" on the touch screen and the click on the run mode «PCR Only»

4. Load the Q-PCR-Mix in Reagent Rack and insert it in the cooling area
Load filter tips and the PCR rack

2. Load the extracted nucleic acid barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area

5. Close the door.
Start the run

3. Select the "Assay protocol" of interest

6. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above

7. Load: Filter Tips and the Extraction Rack

5. Select the protocol "Extraction Only" in the Assay Protocol selection screen.

8. Close the door
Start the run

6. Load the CPE Internal Control in the Elution Rack and insert it in the cooling area

9. Archive the eluate sample

CMV ELITE MGB® kit used with ELITE InGenius®

ELITE InGenius® SP 1000

Ref: RTK015PLD



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

A. Intended use

The CMV ELITE MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection** and **quantification** of the DNA of **Human Cytomegalovirus (CMV)**. The assay is CE-IVD validated in combination with the instrument **ELITE InGenius®**.

B. Amplified sequence

	Gene	Fluorophore
Target	CMV MIEA gene (exon 4 region)	FAM
Internal Control	Human beta Globin gene	AP525

C. Validated matrix

Plasma EDTA

D. Kit component

CMV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



X 4

- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 96
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

ELITE InGenius instrument: INT030

ELITE InGenius SP1000 Extraction Cartridge:
INT033SP1000

ELITE InGenius PCR Cassette: INT035PCR

ELITE InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS

CPE – Internal Control: CTCRPE

- › **CMV ELITE Positive Control:** CTR015PLD
- › **CMV ELITE Standard:** STD015PLD
- › **ELITE InGenius Waste Box:** F2102-000
- › **Filter Tips 300:** TF-350-L-R-S

F. ELITE InGenius protocol

› Sample volume	1000 µL	› Unit of quantitative result	International Unit: IU/mL genome equivalent:
› CPE Internal Control volume	10 µL		gEq/mL (equivalent to
› Total eluate volume	100 µL		copies/mL) 15 days
› PCR eluate input volume	20 µL	› Frequency of controls	
› CMV Q-PCR Mix volume	20 µL	› Frequency of calibration	60 days

G. Performance

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Plasma	17 IU/mL – 57 gEq/mL	97% 58/60*	95% 54/57*
			<small>*confirmed samples/ tested samples</small>
Matrix	Linearity (gEq/mL)	Linearity (IU/mL)	CF gEq/mL to IU/mL
Plasma	593 – 5x10⁶	178 – 1,5 x10⁷	0.3

H. Reference material tested

Panel name	Provider	Qualitative results	Quantitative results
Molecular Q Panel: CMVMQP01	Qnostics	Concordance 100% (4/4)*	Titre as expected value ± 0.5 log
QCMD 2017: CMVDNA17-S	Qnostics	Concordance 100% (10/10)*	Titre as expected value ± 0.5 log**
		<small>*confirmed samples/ tested samples</small>	<small>**within the range of quantification</small>

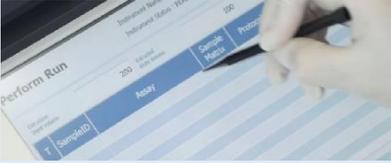
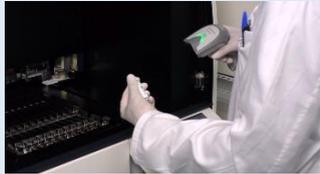
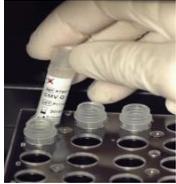
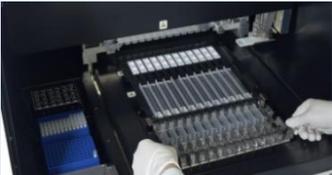
I. Procedures

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

Before analysis

<p>1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"</p>	<p>2. Verify calibrators: CMV Q-PCR standard in the "Calibration menu" Verify controls: CMV pos. and neg. controls in the "Control menu" <i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired</p>	<p>3. Thaw the CMV Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec</p>
--	---	--

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

<p>1. Select "Perform Run" on the touch screen</p> 	<p>2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elute: "100 µL"</p> 	<p>3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID</p> 
<p>4. Select the "Assay protocol" of interest</p> 	<p>5. Select the sample position: Primary tube or sonication tube</p> 	<p>6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in the inventory block</p> 
<p>7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, sonication tube and primary sample racks</p> 	<p>8. Close the door Start the run</p> 	<p>9. View, approve and store the results</p> 

Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

<p>1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above</p>	<p>5. Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position: Primary tube or Secondary tube</p>	<p>6. Load the CPE Internal Control in the inventory block</p>
<p>7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, sonication tube and primary sample racks</p>	<p>8. Close the door Start the run</p>	<p>9. Archive the eluate sample</p>

CMV ELITE MGB[®] Kit used with ABI PCR instrument

Ref: RTK015PLD



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

A. Intended use

The CMV ELITE MGB Kit is a Real-Time PCR assay for the detection and quantification of the DNA of **Human Cytomegalovirus (CMV)**. The assay is CE-IVD validated in combination with **ABI PCR thermal cyclers** (Thermo-Fisher) and the following extraction systems: **ELITE STAR** (ELITechGroup), **ELITE GALAXY** (ELITechGroup), **easyMAG** (BioMérieux) or **QIASymphony** (Qiagen).

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
	CMV MIEA gene (Exon 4 region)	FAM
Internal Control	human beta Globin gene	VIC

C. Validated matrix

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

D. Kit Components

CMV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 100
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> › 7500 Fast Dx and 7300 PCR Instrument › ELITE STAR: INT010 › ELITE STAR 200 extraction kit: INT011EX › ELITE GALAXY: INT020 › ELITE GALAXY 300 extraction kit: INT021EX › CPE - Internal Control: CTCRPE | <ul style="list-style-type: none"> › CMV – ELITE Positive Control: CTR015PLD › CMV ELITE Standard: STD015PLD › easyMAG - Generic protocol 2.0.1 › QIASymphony - DNA Mini kit or DSP Virus/Pathogen Midi kit › Molecular biology grade water |
|--|---|

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
ELITE STAR - ABI	Whole blood	263 IU/mL - 332 gEq/mL	100% (57/60)*	100% (63/70)*
	Plasma	222 IU/mL - 201 gEq/mL	97.1% (66/68)*	100% (61/61)*
ELITE GALAXY - ABI	Whole blood	127 IU/mL - 249 gEq/mL	98.3% (59/60)*	100% (65/66)*
	Plasma	140 IU/mL - 519 gEq/mL	92.2% (47/51)*	100% (64/64)*
easyMAG - ABI	Whole blood	-	100% (50/50)*	100% (50/50)*
	Cerebrospinal fluid	-	100% (60/60)*	100% (60/60)*
	Urine	-	100% (52/52)*	98.2% (55/56)*
QIASymphony - ABI	Whole blood	-	100% (60/60)*	98.3% (59/60)*
	Plasma	-	100% (60/60)*	98.3% (59/60)*

*confirmed samples/tested samples

System	Linearity (IU/mL)	Conversion factor gEq/reaction to gEq/mL	Conversion factor gEq/mL to IU/mL
ELITE STAR - ABI	221 → 22 x 10 ⁶ (WB), 308 → 30.8 x 10 ⁶ (PL)	28 (WB,PL)	0.79 (WB), 1.10 (PL)
ELITE GALAXY - ABI	178 → 17.8 x 10 ⁶ (WB), 105 → 10 x 10 ⁶ (PL)	35 (WB,PL)	0.51 (WB), 0.27 (PL)
easyMAG - ABI	305 → 30.5 x 10 ⁶ (WB)	50 (WB), 10 (CSF, Urine)	0.61 (WB)
QIASymphony - ABI	110 → 11 x 10 ⁶ (WB), 104 → 10 x 10 ⁶ (PL)	24 (WB), 12 (PL)	0.46 (WB), 0.87 (PL)

G. Procedure

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

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
ELITe Star	WB, Plasma	200 µL	700 µL	100 µL	200 µL for 12 samples
ELITe Galaxy	WB, Plasma	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL
EasyMAG	WB	100 µL	-	50 µL	-
	CSF, Urine	500 µL	-	100 µL	5 µL
QIASymphony	WB	200 µL	300 µL	60 µL	-
	Plasma	500 µL	600 µL	85 µL	6 µL

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

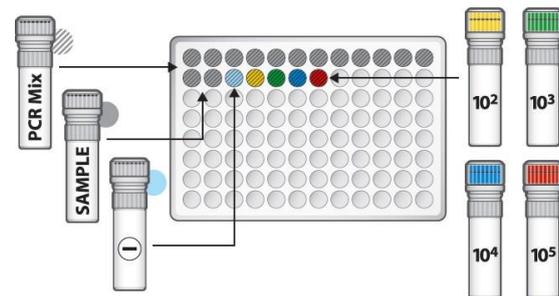
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "CMV" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition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

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

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

Amplification - PCR Set-up

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



Amplification - Threshold for qualitative analysis

Instrument	CMV FAM	Internal Control VIC
7500 Fast Dx Real Time PCR	0.2	0.1
7300 Real Time PCR	0.1	0.05

Interpretation - Qualitative results

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

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The CMV Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction.

The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ gEq/reaction or approximately from 100 to 10⁷ gEq/mL.

CMV ELITE MGB® Kit used with Cobas Z 480 PCR instrument

Ref: RTK015PLD



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

A. Intended use

The CMV ELITE MGB Kit is a Real-Time PCR assay for the detection and quantification of the DNA of **Human Cytomegalovirus (CMV)**. The assay is CE-IVD validated in combination with **Cobas Z 480 analyzer** (Roche) and the following extraction systems: **MagNA Pure 24 System**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
	CMV MIEA gene (Exon 4 region)	FAM
Internal Control	human beta Globin gene	VIC

C. Validated matrix

› Whole blood EDTA › Plasma EDTA › Urine

D. Kit Components

CMV Q-PCR Mix

4 tubes of 540 µL



X 4

Ready to use complete reaction mixture
Number of tests per kit: 100
Freeze and thaw cycles per tube: 5
Maximum shelf-life: 24 months
Storage temperature: -20°C

E. Material required not provided in the kit

- › Cobas Z 480 analyzer PCR Instrument
- › MagNA Pure 24 System
- › CMV – ELITE Positive Control:CTR015PLD
- › CMV – ELITE Positive Control RF:CTR015PLD-R
- › CMV ELITE Standard:STD015PLD
- › CPE - Internal Control: CTCRPE
- › Molecular biology grade water

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
MagNA Pure 24	Whole blood	135 IU/mL 270 gEq/mL	100% (51/51)*	98% (52/53)*
	Plasma	88 IU/mL - 220 gEq/mL	98% (62/63)*	96% (48/50)*
	Urine	296 IU/mL - 269 gEq/mL	98% (50/51)*	100% (49/49)*

*confirmed samples/tested samples

System	Matrix	Linearity (IU/mL)	Conversion factor gEq/reaction to gEq/mL	Conversion factor gEq/mL to IU/mL
MagNA Pure 24	Whole blood	178 IU/mL -> 10⁶ IU/mL		0.5
	Plasma	100 IU/mL -> 10⁶ IU/mL	25 (WB, PL, Urine)	0.4
	Urine	10³ IU/mL -> 10⁶ IU/mL		1.1

G. Procedure

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

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
MagNA Pure 24	WB PL, Urine	200 µL	350 µL	100 µL	20 µL Diluted 1:2

Amplification - Settings of Cobas-Z 480 PCR instruments

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

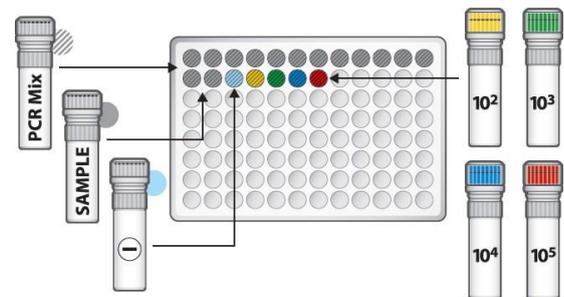
Stage	Temperature	Timing
Decontamination	50°C	2 min
Denaturation	94°C	2 min
Amplification and detection	94°C	10 sec
	60°C	30 sec
45 cycles	72°C	20 sec

acquisition must be set during hybridation step at 60°C

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

Amplification - PCR Set-up

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



Amplification - Threshold for qualitative analysis

Instrument	Matrix	CMV FAM	Internal Control VIC
Cobas – Z 480	WB	0.80	1.5
	Plasma	0.55	1.2
	Urine	0.55	1.2

Interpretation - Qualitative results

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

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The CMV Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction.

The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ gEq/reaction or approximately from 250 to 2.5 10⁷ gEq/mL.