



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

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

NOTICE of CHANGE dated 08/08/2022

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«HBV ELITe MGB Kit» Ref. RTK602ING

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).*

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

PLEASE NOTE



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



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



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



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



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



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



HBV ELITe MGB® Kit
réactifs pour l'amplification en temps réel de
l'ADN

REF RTK602ING

PRINCIPES DU TEST

Le test est une PCR quantitative en temps réel multiplexe qui a été validée sur les systèmes **ELITE InGenius** et **ELITE BeGenius**, des systèmes intégrés et automatisés d'extraction, d'amplification et de détection des acides nucléiques, et d'interprétation des résultats.

L'ADN du VHB est isolé à partir d'échantillons de sérum ou de plasma (prélevé sur EDTA ou ACD) puis est amplifié dans une PCR en temps réel avec le **HBV PCR Mix**. Les réactifs du test contiennent des amorces et des sondes ciblant le gène de la polymérase du VHB (domaine TP). La sonde pour le VHB utilisant la technologie ELITE MGB est marquée par le fluorophore FAM. De plus, des amorces et des sondes spécifiques à une cible du Contrôle Interne hétérologue sont incluses dans les réactifs du test. La sonde du Contrôle Interne, qui utilise également la technologie ELITE MGB, est marquée par le colorant AquaPhluor® 525 (AP525). Le Contrôle Interne exogène, IC2, est ajouté au tampon de lyse et permet de surveiller l'extraction et l'efficacité de la PCR.

Les sondes spécifiques au VHB et au Contrôle Interne sont activées lorsqu'elles s'hybrident aux produits de PCR associés. Le système ELITE InGenius surveille l'augmentation de la fluorescence et calcule la valeur Ct et la quantité en se basant sur une courbe d'étalonnage enregistrée.

La technologie ELITE MGB est représentée sur l'illustration ci-dessous. Les fluorophores sont désactivés lorsque la sonde est à l'état simple brin et enroulée de manière aléatoire. Les fluorophores sont actifs dans le duplex sonde-amplicon étant donné que le Quencher (désactivateur) est généralement séparé du fluorophore. Noter que le fluorophore n'est pas clivé pendant la PCR.

HBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTK602ING

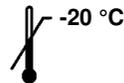


TABLE DES MATIÈRES

APPLICATION	page 1
PRINCIPES DU TEST	page 2
DESCRIPTION DU PRODUIT	page 3
MATÉRIEL FOURNI	page 4
MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI	page 4
AUTRES PRODUITS REQUIS	page 4
AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS	page 5
ELITE INGENIUS	page 7
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	page 7
PROCÉDURE	page 8
ELITE BEGENIUS	page 15
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	page 15
PROCÉDURE	page 17
CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE DES SYSTÈMES ELITE INGENIUS et ELITE BEGENIUS	page 22
BIBLIOGRAPHIE	page 37
LIMITES DE LA PROCÉDURE	page 37
PROBLÈMES ET SOLUTIONS	page 38
LÉGENDE DES SYMBOLES	page 40
NOTE POUR L'ACQUÉREUR : LICENCE LIMITÉE	page 41
ANNEXE - GUIDE DE DÉMARRAGE RAPIDE	page A

APPLICATION

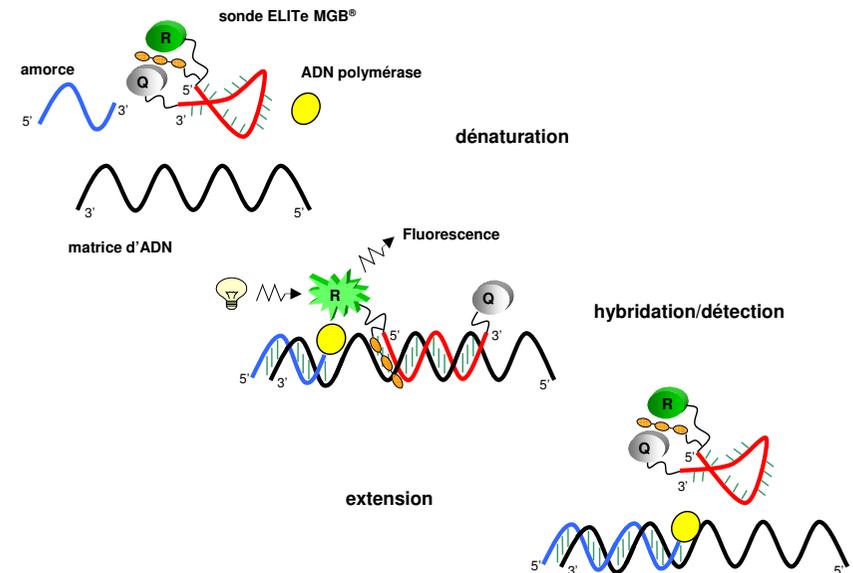
Le produit **HBV ELITE MGB® Kit** est un test d'amplification des acides nucléiques pour la **détection et la quantification** de l'ADN du virus de l'hépatite B (**VHB**) extrait d'échantillons cliniques.

Le test est capable de détecter le VHB appartenant aux génotypes A, B, C, D, E, F, G, H, I et RF.

Le test a été validé en association avec les systèmes **ELITE InGenius®** et **ELITE BeGenius®** en utilisant du plasma (prélevé sur EDTA ou ACD) et du sérum humains.

Le produit est destiné à être utilisé en tant qu'aide à la prise en charge des individus infectés par le VHB recevant une thérapie antivirale. Les résultats doivent être interprétés en association avec l'ensemble des observations cliniques pertinentes et des résultats du laboratoire.

Ce produit n'est pas destiné à être utilisé comme un test de dépistage de la présence du VHB dans le sang ou les produits sanguins, ou comme un test diagnostique pour confirmer la présence d'une infection par le VHB.



HBV ELITe MGB® Kit
réactifs pour l'amplification en temps réel de
l'ADN

REF RTK602ING

DESCRIPTION DU PRODUIT

Le produit **HBV ELITe MGB Kit** contient les composants suivants :

- **HBV ELITe MGB Mix**

Le composant **HBV ELITe MGB Mix** contient le sous-composant **HBV PCR Mix**, un mélange de PCR optimisé et stabilisé aliquoté dans **huit tubes prêts à l'emploi**. Chaque tube contient **280 µL**, un volume suffisant pour effectuer **12 tests** sur les systèmes **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** (traitement d'au moins 2 échantillons par session d'analyse).

Les amorces et la sonde pour le VHB sont spécifiques au gène de la polymérase (domaine TP) du **VHB**. La sonde pour le VHB est stabilisée par le groupe **MGB®**, désactivée par le quencher **Eclipse Dark Quencher®**, et marquée par le fluorophore **FAM** pour une détection dans le Canal 1 des systèmes **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius**.

Les amorces et la sonde pour le Contrôle Interne exogène sont spécifiques à la séquence artificielle **IC2**. La sonde **IC2** est stabilisée par le groupe **MGB**, désactivée par le quencher **Eclipse Dark Quencher**, et marquée par le fluorophore **AP525** pour une détection dans le Canal 2 des systèmes **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius**.

Le mélange **HBV PCR Mix** contient également un tampon, du chlorure de magnésium, des nucléotides triphosphates, l'enzyme ADN polymérase avec activation thermique (Hot start).

Le composant **HBV ELITe MGB Mix** contient suffisamment de réactifs pour effectuer **96 tests sur les systèmes ELITe InGenius et ELITe BeGenius**, en utilisant 20 µL par réaction.

- **HBV ELITe Standard**

Le composant **HBV ELITe Standard** contient les sous-composants **HBV Q-PCR Standards**, quatre solutions stabilisées d'ADN plasmidique contenant la région du gène de la polymérase du VHB à un **titre connu**, aliquotées dans des **tubes prêts à l'emploi**. Chaque tube contient **160 µL** de solution, un volume suffisant pour effectuer **2 sessions d'analyse**. Les **HBV Q-PCR Standards** doivent être utilisés avec le mélange **HBV PCR Mix** sur les systèmes **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** afin de construire la courbe d'étalonnage du système (lot du produit et instrument) pour la quantification du VHB.

La concentration de l'ADN plasmidique a été déterminée par spectroscopie UV (copies/mL), qui a été corrélée au « 4^e étalon international de l'OMS pour les TAN de l'ADN du VHB » (NIBSC, Royaume-Uni, code 10/266) par un facteur de conversion permettant de quantifier le VHB en unité internationale/mL (UI/mL).

Le composant **HBV ELITe Standard** contient suffisamment de matériel pour effectuer **2 sessions d'analyse sur les systèmes ELITe InGenius et ELITe BeGenius**, en utilisant 20 µL par réaction.

- **HBV - ELITe Positive Control**

Le composant **HBV - ELITe Positive Control** contient le sous-composant **HBV Positive Control**, une solution stabilisée d'ADN plasmidique contenant la région du gène de la polymérase du VHB aliquotée dans **deux tubes prêts à l'emploi**. Chaque tube contient **160 µL** de solution, un volume suffisant pour effectuer **4 sessions d'analyse**. Le composant **HBV Positive Control** doit être utilisé avec le mélange **HBV PCR Mix** sur les systèmes **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** afin de construire des graphiques de contrôle pour la vérification du système (lot du produit et instrument).

Le composant **HBV - ELITe Positive Control** contient suffisamment de matériel pour effectuer **8 sessions d'analyse sur les systèmes ELITe InGenius et ELITe BeGenius**, en utilisant 20 µL par réaction.

- **HBV Internal Control**

Le composant **HBV Internal Control** contient le sous-composant **HBV CPE** (contrôle interne exogène), une solution stabilisée d'ADN plasmidique contenant la séquence **IC2** artificielle aliquotée dans **huit tubes prêts à l'emploi**. Chaque tube contient **160 µL** de solution, un volume suffisant pour **12 échantillons** (traitement d'au moins 2 échantillons par session d'analyse). Le **HBV CPE** est ajouté aux réactifs d'extraction, purifié avec les acides nucléiques de l'échantillon, puis combiné au mélange **HBV PCR Mix** pour la PCR en temps réel afin de valider les résultats des échantillons négatifs pour le VHB.

Le composant **HBV Internal Control** contient suffisamment de matériel pour effectuer **96 tests sur les systèmes ELITe InGenius et ELITe BeGenius**, en utilisant 10 µL par extraction.

HBV ELITe MGB® Kit
réactifs pour l'amplification en temps réel de
l'ADN

REF RTK602ING

MATÉRIEL FOURNI

Composant	Sous-composant	Description	Quantité	Classification des risques
HBV ELITe MGB Mix Réf. RTS602ING	HBV PCR Mix Réf. RTS602ING	Mélange de réactifs pour la PCR en temps réel avec un bouchon BLANC	8 x 280 µL	-
HBV ELITe Standard Réf. STD602ING	HBV Q-PCR Standard 10 ⁵ Réf. STD602ING-5	Solution de plasmide dans un tube doté d'un bouchon ROUGE	1 x 160 µL	-
	HBV Q-PCR Standard 10 ⁴ Réf. STD602ING-4	Solution de plasmide dans un tube doté d'un bouchon BLEU	1 x 160 µL	
	HBV Q-PCR Standard 10 ³ Réf. STD602ING-3	Solution de plasmide dans un tube doté d'un bouchon VERT	1 x 160 µL	
	HBV Q-PCR Standard 10 ² Réf. STD602ING-2	solution de plasmide dans un tube doté d'un bouchon JAUNE	1 x 160 µL	
HBV - ELITe Positive Control Réf. CTR602ING	HBV Positive Control Réf. CTR602ING	solution de plasmide dans un tube doté d'un bouchon NOIR	2 x 160 µL	-
HBV Internal Control Réf. CPE602ING	HBV CPE Réf. CPE602ING	Solution d'ADN plasmidiques et d'ARN génomique du phage MS2 avec un bouchon NEUTRE	8 x 160 µL	-

MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI

- Hotte à flux laminaire.
- Gants non poudrés en nitrile jetables ou matériel similaire.
- Agitateur de type vortex.
- Microcentrifugeuse de paillasse (12 000 - 14 000 tr/min).
- Micropipettes et cônes stériles avec filtre pour les aérosols ou cônes stériles à déplacement positif (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Eau de qualité biologie moléculaire.

AUTRES PRODUITS REQUIS

Les réactifs pour l'extraction de l'ADN de l'échantillon et les consommables ne sont **pas** fournis avec ce kit.

Pour l'extraction des acides nucléiques et l'analyse des échantillons avec l'instrument « **ELITe InGenius** » (ELITechGroup S.p.A., réf. INT030), les produits suivants sont requis :

- Cartouches d'extraction « **ELITe InGenius® SP 200** » (ELITechGroup S.p.A., réf. INT032SP200)
- Consommables « **ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set** » (ELITechGroup S.p.A., réf. INT032CS)
- Conteneurs « **ELITe InGenius® Waste Box** » (ELITechGroup S.p.A., réf. F2102-000)
- Cassette « **ELITe InGenius® PCR Cassette** » (ELITechGroup S.p.A., réf. INT035PCR)
- Cônes « **300 µL Filter Tips Axygen** » (Axygen BioScience Inc., CA, États-Unis, réf. TF-350-L-R-S)
- Protocoles de test (ELITechGroup S.p.A.)
 - Étalons de calibration **HBV ELITe STD**,
 - Contrôle positif de PCR **HBV ELITe PC**,
 - Contrôle négatif de PCR **HBV ELITe NC**,
 - Un des protocoles suivants pour l'analyse des échantillons : **HBV ELITe PL_200_50**, **HBV ELITe Se_200_50**.

Pour l'extraction des acides nucléiques et l'analyse des échantillons avec l'instrument « **ELITE BeGenius** » (ELITechGroup S.p.A., réf. INT040), les produits suivants sont requis :

- Cartouches d'extraction **ELITE InGenius® SP 200** (ELITechGroup S.p.A., réf. INT032SP200)
- Consommables **ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set** (ELITechGroup S.p.A., réf. INT032CS)
- Conteneurs **ELITE InGenius® Waste Box** (ELITechGroup S.p.A., réf. F2102-000)
- Cassette **ELITE InGenius® PCR Cassette** (ELITechGroup S.p.A., réf. INT035PCR)
- **1000 µL Filter Tips Tecan** (Tecan, Suisse, réf. 30180118)
- Protocoles de test (ELITechGroup S.p.A.)
 - Étalons de calibration **HBV ELITe_Be_STD**,
 - Contrôle positif de PCR **HBV ELITe_Be_PC**,
 - Contrôle négatif de PCR **HBV ELITe_Be_NC**,
 - Un des protocoles suivants pour l'analyse des échantillons : **HBV ELITe_Be_PL_200_50**, **HBV ELITe_Be_Se_200_50**.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

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

Avertissements et précautions d'ordre général

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

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

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

Ne jamais pipeter les solutions avec la bouche.

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

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

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

Lire attentivement toutes les instructions indiquées avant d'exécuter le test.

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

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

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

Ne pas utiliser de réactifs provenant de lots différents.

Sauf indication contraire, ne pas utiliser de réactifs commercialisés par d'autres fabricants.

Avertissements et précautions pour la biologie moléculaire

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

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

Les échantillons doivent être adaptés et, si possible, dédiés à ce type d'analyse. Les échantillons

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

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

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

Les PCR Cassettes doivent être manipulées avec précaution et ne doivent jamais être ouvertes afin d'éviter la diffusion des produits de PCR dans l'environnement, et toute contamination des échantillons et des réactifs.

Avertissements et précautions spécifiques aux composants du produit

- **HBV ELITe MGB Mix**

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

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

Le mélange **HBV PCR Mix** peut être congelé et décongelé jusqu'à **sept fois** : des cycles de congélation/décongélation supplémentaires risqueraient d'entraîner une perte des performances du produit.

Le mélange **HBV PCR Mix** peut être conservé dans le bloc de refroidissement de la « Inventory Area » (Zone inventaire) de l'instrument jusqu'à **sept sessions d'analyse séparées de trois heures chacune** (mode « Extract + PCR » [Extraction + PCR]) ou pendant **trois sessions d'analyse consécutives de trois heures chacune** (mode « Extract + PCR » [Extraction + PCR]).

- **HBV ELITe Standard**

Le **HBV Q-PCR Standard** doit être conservé à une température inférieure à -20 °C.

Le **HBV Q-PCR Standard** doit être utilisé dans le mois qui suit sa première ouverture.

Le **HBV Q-PCR Standard** peut être congelé et décongelé jusqu'à **deux fois** : des cycles de congélation/décongélation supplémentaires risqueraient d'entraîner une perte du titre.

Le **HBV Q-PCR Standard** peut être conservé dans la zone d'extraction de l'instrument pendant un maximum de **deux sessions d'analyse distinctes de deux heures chacune** [mode « PCR Only » (PCR uniquement)].

- **HBV - ELITe Positive Control**

Le **HBV Positive Control** doit être conservé à une température inférieure à -20 °C.

Le **HBV Positive Control** doit être utilisé dans le mois qui suit sa première ouverture.

Le **HBV Positive Control** peut être congelé et décongelé jusqu'à **quatre fois** : des cycles de congélation/décongélation supplémentaires risqueraient d'entraîner une perte des performances du produit.

Le **HBV Positive Control** peut être conservé dans la zone d'extraction pendant un maximum de **quatre sessions d'analyse distinctes de trois heures chacune** (mode « Extract + PCR » [Extraction + PCR]).

- **HBV Internal Control**

Le **HBV CPE** doit être conservé à une température inférieure à -20 °C.

Le **HBV CPE** doit être utilisé dans le mois qui suit sa première ouverture.

Le **HBV CPE** peut être congelé et décongelé jusqu'à **douze fois** : des cycles de congélation/décongélation supplémentaires risqueraient d'entraîner une perte des performances du produit.

Le **HBV CPE** peut être conservé dans le bloc de refroidissement de la « Inventory Area » [Zone inventaire] de l'instrument pendant un maximum de **six sessions d'analyse distinctes de trois heures chacune** (mode « Extract + PCR » [Extraction + PCR]).

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES

Échantillons

Ce produit doit être utilisé avec les échantillons cliniques suivants :

Plasma prélevé sur EDTA ou ACD

Les échantillons de plasma pour l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés sur EDTA ou ACD et identifiés conformément aux directives du laboratoire, et doivent être transportés et conservés à température ambiante (environ +25 °C) pendant trois jours au maximum ou entre +2 et +8 °C pendant cinq jours au maximum. Autrement, ils doivent être congelés et conservés à environ -20 °C pendant un mois au maximum ou à environ -70 °C pendant six mois.

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

Remarque : l'extraction des acides nucléiques des échantillons de plasma EDTA ou plasma ACD est effectuée à l'aide du système **ELITe InGenius** et du logiciel **ELITe InGenius** version 1.3 (ou versions ultérieures) en utilisant le protocole de test **HBV ELITe_PL_200_50**, qui comprend le traitement de 200 µL d'échantillon, l'ajout de 10 µL de **HBV CPE** (Contrôle interne) à chaque extraction et l'éluion des acides nucléiques dans 50 µL.

Les acides nucléiques purifiés peuvent être conservés à environ -20 °C pendant un mois.

Sérum

Les échantillons de sérum pour l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés et identifiés conformément aux directives du laboratoire, et doivent être transportés et conservés à température ambiante (environ +25 °C) pendant trois jours au maximum ou entre +2 et +8 °C pendant cinq jours au maximum. Autrement, ils doivent être congelés et conservés à environ -20 °C pendant un mois au maximum ou à environ -70 °C pendant six mois.

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

Remarque : l'extraction des acides nucléiques des échantillons de sérum est effectuée à l'aide du système **ELITe InGenius** et du logiciel **ELITe InGenius** version 1.3 (ou versions ultérieures) en utilisant le protocole de test **HBV ELITe_Se_200_50**, qui comprend le traitement de 200 µL d'échantillon, l'ajout de 10 µL de **HBV CPE** (Contrôle interne) à chaque extraction et l'éluion des acides nucléiques dans 50 µL.

Les acides nucléiques purifiés peuvent être conservés à environ -20 °C pendant un mois.

Autres échantillons

Il n'existe actuellement aucune donnée disponible en ce qui concerne la performance du produit avec d'autres échantillons cliniques, par exemple le sang total.

Substances interférentes

Les données disponibles concernant l'inhibition provoquée par les médicaments et d'autres substances sont indiquées au paragraphe « Substances potentiellement interférentes » de la section « Caractéristiques de performance ».

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

Courbe d'étalonnage et contrôles d'amplification

Avant d'analyser un échantillon, il est nécessaire de générer la courbe d'étalonnage et d'exécuter les contrôles d'amplification pour chaque lot de réactifs de PCR :

- pour la courbe d'étalonnage, utiliser les quatre niveaux du **HBV ELITe Standard** inclus dans ce kit et le protocole de test **HBV ELITe_STD**,
- pour le Contrôle Positif, utiliser le composant **HBV - ELITe Positive Control** inclus dans ce kit et le protocole de test **HBV ELITe_PC**,
- pour le Contrôle Négatif, utiliser de l'eau de qualité biologique moléculaire (non incluse dans ce kit) et le protocole de test **HBV ELITe_NC**.

Remarque : le système **ELITe InGenius** exige une courbe d'étalonnage et des contrôles d'amplification approuvés et valides pour chaque lot de réactifs de PCR.

Les courbes d'étalonnage stockées dans la base de données expirent au bout de **60 jours**, après quoi il est nécessaire de réanalyser le **HBV Standard** avec le lot de réactifs de PCR approprié.

Les résultats du contrôle d'amplification stockés dans la base de données expirent au bout de **15 jours**, après quoi il est nécessaire de réanalyser les Contrôles Positif et Négatif avec le lot de réactifs de PCR approprié.

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

- un nouveau lot de réactifs est utilisé,
- les résultats de l'analyse du contrôle de qualité (se reporter au paragraphe suivant) sont en dehors des spécifications,
- tout entretien ou service majeur est effectué sur l'instrument **ELITe InGenius**.

Contrôles de qualité

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

PROCÉDURE

L'utilisation du **HBV ELITe MGB Kit** avec le système **ELITe InGenius** comprend trois étapes :

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

Vérification de la préparation du système

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

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

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

Protocole de test pour le HBV ELITe MGB Kit			
Nom	Matrice	Unités du rapport	Caractéristiques
HBV ELITe_PL_200_50	Échantillons de plasma	Positif/UI/mL/ copies/mL/ Négatif	Volume d'extraction initial : 200 µL Volume d'éluion extrait : 50 µL Contrôle Interne : 10 µL Sonication : NON Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de l'échantillon PCR : 20 µL

Protocole de test pour le HBV ELITe MGB Kit			
Nom	Matrice	Unités du rapport	Caractéristiques
HBV ELITe_Se_200_50	Échantillons de sérum	Positif/ UI/mL/ copies/mL/ Négatif	Volume d'extraction initial : 200 µL Volume d'éluat extrait : 50 µL Contrôle Interne : 10 µL Sonication : NON Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de l'échantillon PCR : 20 µL

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

Paramétrage de la session d'analyse

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

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

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

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

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

A. Analyse intégrée

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

- Décongeler les échantillons à température ambiante (+18/25 °C) et les manipuler conformément aux directives du laboratoire et à la section « Échantillons et contrôles ».
- Décongeler les tubes de **HBV PCR Mix** nécessaires à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer 12 réactions dans des conditions optimisées (2 tests ou plus par session d'analyse). Mélanger délicatement puis centrifuger le contenu pendant 5 secondes.

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

- Décongeler les tubes de **HBV CPE** nécessaires à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer 12 extractions. Mélanger délicatement puis centrifuger le contenu pendant 5 secondes.
- Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
- Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initial) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'éluat extrait) est de 50 µL.
- Pour chaque échantillon, attribuer une « Track » (Position) et renseigner le « SampleID » (ID échantillon - SID) en le saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.
- Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (par ex. HBV ELITe_PL_200_50).
- Vérifier que le « Protocol » (Protocole) affiché est : « Extract + PCR » (Extraction + PCR).
- Sélectionner la position de chargement de l'échantillon en tant que « Extraction Tube » (Tube

d'extraction) dans la colonne « Sample Position » (Position de l'échantillon). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.

- Charger le **HBV CPE** et le **HBV PCR Mix** sur le « Inventory Block » (Bloc inventaire) désigné en se reportant à la liste de chargement et saisir le numéro de lot et la date de péremption du réactif. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
- Vérifier les cônes dans les portoirs de cônes de la « Inventory Area » (Zone inventaire) et remplacer le(s) portoir(s) de cônes si nécessaire. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
- Charger les **PCR Cassettes** (Cassettes de PCR), les cartouches d'extraction **ELITe InGenius SP 200**, et tous les consommables requis et échantillons à extraire en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
- Fermer le tiroir de l'instrument.
- Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

Lorsque la session d'analyse est terminée, le système ELITe InGenius permet aux utilisateurs de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats et d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

Remarque : À la fin de l'analyse, l'échantillon extrait restant dans le « Elution tube » (Tube d'éluat) doit être retiré de l'instrument, bouché, étiqueté et stocké à -20 °C pendant un mois. Éviter de renverser l'échantillon extrait.

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

Remarque : le PCR Mix peut être utilisé pendant 7 sessions d'analyse distinctes de 3 heures chacune ou peut être conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant un maximum de 3 sessions d'analyse consécutives de 3 heures chacune. Mélanger délicatement puis centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes avant de commencer la session d'analyse suivante.

B. Analyse d'amplification

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

- Décongeler les tubes de **HBV PCR Mix** nécessaires à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer 12 réactions dans des conditions optimisées (2 tests ou plus par session d'analyse). Mélanger délicatement puis centrifuger le contenu pendant 5 secondes.

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

- Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
- Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initial) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'éluat extrait) est de 50 µL, même si aucune extraction n'est réalisée.
- Pour chaque échantillon, attribuer la « Track » (Position) et renseigner l'ID de l'échantillon (SID) en le saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.
- Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (par ex. HBV ELITe_PL_200_50).
- Sélectionner « PCR Only » (PCR uniquement) dans la colonne « Protocol » (Protocole).
- Vérifier que la position de chargement de l'échantillon dans la colonne « Sample Position » (Position échantillons) est « Elution Tube (bottom row) » (Tube d'éluat [ligne inférieure]). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
- Charger le **HBV PCR Mix** sur le « Inventory Block » (Bloc inventaire) désigné en se référant à la liste de chargement et saisir le numéro de lot et la date de péremption du réactif. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
- Vérifier les cônes dans les portoirs de cônes de la « Inventory Area » (Zone inventaire) et remplacer le(s) portoir(s) de cônes si nécessaire. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.

10. Charger les **PCR Cassettes** (Cassettes de PCR) et les échantillons d'acide nucléique extraits en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.

11. Fermer le tiroir de l'instrument.

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

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

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

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

Remarque : le PCR Mix peut être utilisé pendant 7 sessions d'analyse distinctes de 3 heures chacune ou peut être conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant un maximum de 3 sessions d'analyse consécutives de 3 heures chacune. Mélanger délicatement puis 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 pour les Q-PCR Standards, suivre les étapes ci-dessous tout en se reportant à la GUI :

1. Décongeler les tubes de **HBV PCR Mix** nécessaires à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer 12 réactions dans des conditions optimisées (2 tests ou plus par session d'analyse). Mélanger délicatement puis centrifuger le contenu pendant 5 secondes.

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

2. Décongeler les tubes de **HBV Q-PCR Standard** (Cal1 : HBV Q-PCR Standard 10², Cal2 : HBV Q-PCR Standard 10³, Cal3 : HBV Q-PCR Standard 10⁴, Cal4 : HBV Q-PCR Standard 10⁵) à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer 2 réactions. Mélanger délicatement puis centrifuger le contenu pendant 5 secondes.

3. Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).

4. Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initial) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'éluion extrait) est de 50 µL, même si aucune extraction n'est réalisée.

5. Pour le **HBV Q-PCR Standard**, attribuer la position, sélectionner le protocole de test « HBV ELITE STD » dans la colonne « Assay » (Test) et saisir le numéro de lot et la date de péremption du réactif. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.

6. Charger le **HBV PCR Mix** sur le « Inventory Block » (Bloc inventaire) désigné en se référant à la liste de chargement et saisir le numéro de lot et la date de péremption du réactif. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.

7. Vérifier les cônes dans les portoirs de cônes de la « Inventory Area » (Zone inventaire) et remplacer le(s) portoir(s) de cônes si nécessaire. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.

8. Charger les **PCR Cassettes** (Cassettes de PCR) et les tubes de **HBV Q-PCR Standard** en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.

9. Fermer le tiroir de l'instrument.

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

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

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

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

Remarque : les Q-PCR Standards peuvent être utilisés pendant 2 sessions d'analyse distinctes de 2 heures chacune.

Remarque : le PCR Mix peut être utilisé pour 7 sessions d'analyse distinctes de 3 heures chacune ou peut être conservé à bord dans le bloc réfrigéré jusqu'à 3 sessions d'analyse distinctes de 3 heures chacune. Mélanger délicatement puis centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes avant de commencer la session d'analyse suivante.

D. Analyse d'amplification du Contrôle Positif et du Contrôle Négatif

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

1. Décongeler les tubes de **HBV PCR Mix** nécessaires à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer 12 réactions dans des conditions optimisées (2 tests ou plus par session d'analyse). Mélanger délicatement puis centrifuger le contenu pendant 5 secondes.

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

2. Décongeler les tubes de **HBV Positive Control** à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer 4 réactions. Mélanger délicatement puis centrifuger le contenu pendant 5 secondes.

3. Préparer le HBV Negative Control en transférant au minimum 50 µL d'eau de qualité biologie moléculaire dans un « Elution tube » (Tube d'éluion) fourni avec le **ELITE InGenius SP 200 Consumable Set**.

4. Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).

5. Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initial) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'éluion extrait) est de 50 µL, même si aucune extraction n'est réalisée.

6. Pour le Contrôle Positif, attribuer la position, sélectionner le protocole de test « HBV ELITE_PC » dans la colonne « Assay » (Test) et saisir le numéro de lot et la date de péremption du réactif.

7. Pour le Contrôle Négatif, attribuer la position, sélectionner le protocole de test « HBV ELITE_NC » dans la colonne « Assay » (Test) et saisir le numéro de lot et la date de péremption de l'eau de qualité biologique moléculaire. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.

8. Charger le **HBV PCR Mix** sur le « Inventory Block » (Bloc inventaire) désigné en se référant à la liste de chargement et saisir le numéro de lot et la date de péremption du réactif. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.

9. Vérifier les cônes dans les portoirs de cônes de la « Inventory Area » (Zone inventaire) et remplacer le(s) portoir(s) de cônes si nécessaire. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.

10. Charger les **PCR Cassettes** (Cassettes de PCR), le tube **HBV Positive Control** et le tube Negative Control en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.

11. Fermer le tiroir de l'instrument.

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

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

Remarque : à la fin de l'analyse, le Contrôle Positif restant peut être retiré de l'instrument, bouché et stocké à -20 °C. Le Contrôle Négatif restant doit être jeté.

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

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

Remarque : le PCR Mix peut être utilisé pendant 7 sessions d'analyse distinctes de 3 heures chacune ou peut être conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant un maximum de 3 sessions d'analyse consécutives de 3 heures chacune. Mélanger délicatement puis centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes avant de commencer la session d'analyse suivante.

Examen et approbation des résultats

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

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

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

Le système **ELITE InGenius** génère les résultats à l'aide du **HBV ELITE MGB Kit** en exécutant la procédure suivante :

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

A. Validation de la courbe d'étalonnage

Le **logiciel ELITE InGenius** interprète les résultats de la PCR pour la sonde de VHB (Canal « HBV ») des réactions des calibrateurs avec les paramètres du protocole de test **HBV ELITE STD**. Les valeurs Ct versus la concentration génèrent la courbe d'étalonnage.

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

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

Remarque : si la courbe d'étalonnage ne répond pas aux critères d'acceptation, le message « Failed » (Échec) s'affiche dans l'écran « Calibration » (Étalonnage). Dans ce cas, les résultats ne peuvent pas être approuvés et les réactions d'amplification du calibrateur doivent être répétées. De plus, si des échantillons ont été inclus dans l'analyse, ceux-ci ne sont pas quantifiés et doivent également être répétés pour générer des résultats quantitatifs.

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

Le **logiciel ELITE InGenius** interprète les résultats de la PCR pour la sonde de VHB (Canal « HBV ») des réactions du Contrôle Positif et Contrôle Négatif avec les paramètres du protocole de test **HBV ELITE PC** et **HBV ELITE NC**. Les valeurs Ct résultantes sont converties en concentration et utilisées pour valider le système (lots de réactifs et instrument).

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

Les résultats du Contrôle Positif et du Contrôle Négatif expirent **au bout de 15 jours**.

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

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

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

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

C. Validation des résultats de l'échantillon

Le **logiciel ELITE InGenius** interprète les résultats de la PCR pour la sonde HBV (canal « HBV ») et la sonde de contrôle interne (canal « IC ») avec les paramètres de protocole de test **HBV ELITE_PL_200_50** et **HBV ELITE_Se_200_50**. Les valeurs Ct pour VHB résultantes sont converties en concentration.

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

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

1) Courbe d'étalonnage	Statut
HBV Q-PCR Standards	APPROUVÉ
2) Contrôle Positif	Statut
HBV Positive Control	APPROUVÉ
3) Contrôle Négatif	Statut
HBV Negative Control	APPROUVÉ

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

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

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

Les échantillons rapportés comme « DNA Detected, quantity beyond ULoQ » (ADN détecté, quantité supérieure à la ULoQ) ne sont pas appropriés pour une quantification. La concentration de l'ADN du VHB détecté dans l'échantillon est supérieure au niveau auquel il peut être précisément quantifié. L'échantillon

peut être dilué avant l'extraction ou la PCR pour être testé à nouveau afin de générer des résultats compris dans la plage linéaire du test.

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

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

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

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

Remarque : les résultats obtenus avec ce test doivent être interprétés en association avec toutes les autres données cliniques et autres tests de laboratoire du patient.

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

D. Rapport des résultats de l'échantillon

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

Le « Sample Report » (Rapport échantillons) présente les détails des résultats par échantillon sélectionné (SID).

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

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

ELITe BeGenius

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES

Échantillons

Ce produit doit être utilisé avec les échantillons cliniques suivants :

Plasma prélevé sur EDTA ou ACD

Les échantillons de plasma pour l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés sur EDTA ou ACD et identifiés conformément aux directives du laboratoire, et doivent être transportés et conservés à température ambiante (environ +25 °C) pendant trois jours au maximum ou entre +2 et +8 °C pendant cinq jours au maximum. Sinon, ils doivent être congelés et conservés à environ -20 °C pendant un mois au maximum ou à environ -70 °C pendant six mois.

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

Remarque : l'extraction d'ADN à partir de plasma prélevé sur EDTA ou ACD est effectuée à l'aide du système **ELITe BeGenius** et du **logiciel ELITe BeGenius** version 2.1.0 (ou versions ultérieures équivalentes) en utilisant le protocole de test **HBV ELITe_Be_PL_200_50**. Ce protocole comprend le traitement de 200 µL d'échantillon, l'ajout du **HBV CPE** (contrôle interne) à 10 µL par extraction et l'éluat des acides nucléiques dans 50 µL.

Les acides nucléiques purifiés peuvent être conservés à environ -20 °C pendant un mois.

Sérum

Les échantillons de sérum pour l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés et identifiés conformément aux directives du laboratoire, et doivent être transportés et conservés à température ambiante (environ +25 °C) pendant trois jours au maximum ou entre +2 et +8 °C pendant cinq jours au maximum. Sinon, ils doivent être congelés et conservés à environ -20 °C pendant un mois au maximum ou à environ -70 °C pendant six mois.

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

Remarque : l'extraction d'ADN à partir de sérum est effectuée à l'aide du système **ELITe BeGenius** et du **logiciel ELITe BeGenius** version 2.1.0 (ou versions ultérieures équivalentes) en utilisant le protocole de test **HBV ELITe_Be_Se_200_50**. Ce protocole comprend le traitement de 200 µL d'échantillon, l'ajout du **HBV CPE** (contrôle interne) à 10 µL par extraction et l'éluat des acides nucléiques dans 50 µL.

Les acides nucléiques purifiés peuvent être conservés à environ -20 °C pendant un mois.

Autres échantillons

Aucune donnée n'est disponible concernant les performances du produit avec d'autres échantillons cliniques tels que le sang total.

Substances interférentes

Les données disponibles concernant l'inhibition provoquée par les médicaments et d'autres substances sont fournies au paragraphe « Substances potentiellement interférentes » de la section « Caractéristiques de performance ».

Ne pas utiliser de plasma prélevé sur héparine afin de prévenir l'inhibition de la réaction d'amplification et de fréquents résultats non valides.

Contrôles d'amplification

Avant d'analyser un échantillon, il est indispensable de générer et d'approuver la courbe d'étalonnage et les contrôles d'amplification pour chaque lot de réactifs d'amplification :

- à titre de jeu de calibrateurs, utiliser les quatre niveaux de concentration du produit **HBV ELITe Standard** inclus dans ce kit, en association avec le protocole de test **HBV ELITe_Be_STD**,
- à titre de contrôle positif d'amplification, utiliser le produit **HBV - ELITe Positive Control** inclus dans ce kit, en association avec le protocole de test **HBV ELITe_Be_PC**,
- à titre de contrôle négatif d'amplification, utiliser de l'eau de qualité biologique moléculaire (non incluse dans ce kit) en association avec le protocole de test **HBV ELITe_Be_NC**.

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

Les courbes d'étalonnage, approuvées et stockées dans la base de données, expirent au bout de **60 jours**. À la date d'expiration, il est nécessaire de réanalyser les étalons Q-PCR Standards en association avec le lot de réactifs d'amplification.

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

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

- un nouveau lot de réactifs est utilisé,
- les résultats de l'analyse du contrôle de qualité (se reporter au paragraphe suivant) sont en dehors des spécifications,
- l'instrument **ELITe BeGenius** subit une procédure de maintenance majeure.

Contrôles de qualité

Il est recommandé de planifier la validation de la procédure d'extraction et d'amplification. À cette fin, il est possible d'utiliser les échantillons testés ou un matériel de référence certifié. Les contrôles externes doivent être utilisés conformément aux exigences des organismes d'accréditation locaux, régionaux et nationaux en vigueur.

PROCÉDURE

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

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

Vérification de la préparation du système

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

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

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

Protocole de test pour le HBV ELITe MGB Kit			
Nom	Matrice	Unités du rapport	Caractéristiques
HBV ELITe_Be_PL_200_50	Échantillons de plasma	Positif/Ui/mL/ copies/mL/ Négatif	Volume d'extraction initial : 200 µL Volume d'élué extrait : 50 µL Contrôle Interne : 10 µL Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de l'échantillon PCR : 20 µL
HBV ELITe_Be_Se_200_50	Échantillons de sérum	Positif/ Ui/mL/ copies/mL/ Négatif	Volume d'extraction initial : 200 µL Volume d'élué extrait : 50 µL Contrôle Interne : 10 µL Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de l'échantillon PCR : 20 µL

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

Paramétrage de la session d'analyse

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

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

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

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

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

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

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

1. Décongeler les échantillons à température ambiante (environ +25 °C) et les manipuler conformément aux directives du laboratoire et à la section « Échantillons et contrôles ».
2. Décongeler les tubes de **HBV PCR Mix** nécessaires à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer 12 réactions dans des conditions optimisées (2 tests ou plus par session d'analyse). Mélanger délicatement puis centrifuger le contenu pendant 5 secondes.

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

3. Décongeler les tubes de **HBV CPE** nécessaires à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer 12 extractions. Mélanger délicatement puis centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
4. Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
5. Retirer les portoirs de la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement) et les placer sur la table de préparation.
6. Sélectionner le « run mode » (mode d'analyse) : « Extract + PCR » (Extraction + PCR).
7. Charger les échantillons dans les portoirs 5 et 4 (toujours commencer par le portoir 5), en utilisant les adaptateurs pour garantir une mise en place correcte si nécessaire.
8. Insérer le portoir dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.

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.

9. Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initial) est de 200 µL et que le « Extraction Elution Volume » (Volume d'élué extrait) est de 100 µL.
10. Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (c'est-à-dire **HBV ELITe_Be_PL_200_50**). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
11. Si le portoir 4 est utilisé, répéter les étapes 7 à 9.
12. Charger les tubes d'élué dans les portoirs 3 et 2 (toujours commencer par le portoir 3).

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

13. Insérer le portoir dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
14. Si le portoir 2 est utilisé, répéter l'étape 12.
15. Charger le **CPE** et le **HBV-PCR Mix** dans le portoir 1.
16. Insérer le portoir 1 dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement). Cliquer sur « Next » (Suivant)

pour poursuivre.

- Vérifier les cônes dans les portoirs de cônes de la « Inventory Area » (Zone inventaire) et remplacer le(s) portoir(s) de cônes si nécessaire. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
- Charger le panier avec la **PCR Cassette** (Cassette de PCR) dans la « Inventory Area » (Zone inventaire) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
- Charger le panier 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.
- Fermer le tiroir de l'instrument.
- Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

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

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

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

Remarque : le PCR Mix peut être utilisé pendant 7 sessions de travail indépendantes de 3 heures chacune ou peut être conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant un maximum de 3 sessions de travail consécutives de 3 heures chacune. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes avant de commencer la session d'analyse suivante.

B. Analyse d'amplification

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

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

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

- Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
- Retirer les portoirs 1, 2 et 3 de la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement) et les placer sur la table de préparation.
- Sélectionner le mode d'analyse : « PCR Only » (PCR uniquement).
- Charger les échantillons dans les portoirs 3 et 2 (toujours commencer par le portoir 3).
- Insérer le portoir dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
- Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initial) est de 200 µL et que le « Extraction Elution Volume » (Volume d'éluion extrait) est de 100 µL, même si aucune extraction n'est réalisée.
- Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (par ex. HBV ELITe_Be_PL_200_50). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
- Si le portoir 2 est utilisé, répéter les étapes 7 à 9.
- Charger le **HBV PCR Mix** dans le portoir 1.
- Insérer le portoir dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
- Vérifier les cônes dans les portoirs de cônes de la « Inventory Area » (Zone inventaire) et remplacer le(s) portoir(s) de cônes si nécessaire. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.

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

- Fermer le tiroir de l'instrument.

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

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

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

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

Remarque : le PCR Mix peut être utilisé pendant 7 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 (« PCR Only » [PCR uniquement])

Pour paramétrer une analyse d'étalonnage avec les Q-PCR Standards, suivre les étapes ci-dessous tout en se reportant à la GUI :

- Décongeler les tubes de **HBV PCR Mix** nécessaires à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes pour la session d'analyse. Chaque tube permet d'effectuer 12 réactions dans des conditions optimisées (au moins 2 tests par session d'analyse). Mélanger délicatement puis centrifuger le contenu pendant 5 secondes.

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

- Décongeler les tubes de **HBV Q-PCR Standard** (Cal1 : HBV Q-PCR Standards 10², Cal2 : HBV Q-PCR Standards 10³, Cal3 : HBV Q-PCR Standards 10⁴, Cal4 : HBV Q-PCR Standards 10⁵) à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer 2 réactions. Mélanger délicatement puis centrifuger le contenu pendant 5 secondes.
- Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
- Retirer les portoirs 1, 2 et 3 de la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement) et les placer sur la table de préparation.
- Sélectionner le « run mode » (mode d'analyse) : « PCR Only » (PCR uniquement).
- Charger les étalons de calibration dans les portoirs 3.
- Insérer le portoir dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
- Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (HBV ELITe_Be_STD). Cliquer sur le bouton « Next » (Suivant) pour poursuivre.
- Charger le **HBV PCR Mix** dans le portoir 2.
- Insérer le portoir 2 dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
- Vérifier les cônes dans les portoirs de cônes de la « Inventory Area » (Zone inventaire) et remplacer le(s) portoir(s) de cônes si nécessaire. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
- Charger le panier avec la **PCR Cassette** (Cassette de PCR) dans la « Inventory Area » (Zone inventaire) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
- Fermer le tiroir de l'instrument.

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

Lorsque la session d'analyse est terminée, le système **ELITe BeGenius** permet aux utilisateurs de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats et 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 : à la fin de l'analyse, les PCR Cassettes (Cassettes de PCR) et les consommables doivent être éliminés conformément à toutes les réglementations gouvernementales et environnementales. Éviter de renverser les produits de réaction.

Remarque : le PCR Mix peut être utilisé pendant 7 sessions de travail indépendantes de 3 heures chacune ou peut être conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant un maximum de 3 sessions de travail consécutives de 3 heures chacune. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes avant de commencer la session d'analyse suivante.

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

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

- Décongeler les tubes de **HBV PCR Mix** nécessaires à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer 12 réactions dans des conditions optimisées (2 tests ou plus par session d'analyse). Mélanger délicatement puis centrifuger le contenu pendant 5 secondes.

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

- Décongeler les tubes de **HBV Positive Control** à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer 4 réactions. Mélanger délicatement puis centrifuger le contenu pendant 5 secondes.
- Transférer ≥ 50 µL d'eau de qualité biologie moléculaire (à titre de contrôle négatif) dans un « Elution tube » (Tube d'éluion) fourni dans le kit de consommables **ELITe InGenius SP Consumable Set**.
- Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
- Retirer les portoirs 1, 2 et 3 de la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement) et les placer sur la table de préparation.
- Sélectionner le mode d'analyse : « PCR Only » (PCR uniquement).
- Charger les tubes du Contrôle positif et du Contrôle négatif dans les portoirs 3.
- Insérer le portoir dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
- Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (HBV ELITe_Be_PC et HBV ELITe_Be_NC). Cliquer sur le bouton « Next » (Suivant) pour poursuivre.
- Charger le **HBV PCR Mix** dans le portoir 2.
- Insérer le portoir 2 dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Vérifier les cônes dans les portoirs de cônes de la « Inventory Area » (Zone inventaire) et remplacer le(s) portoir(s) de cônes si nécessaire. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
- Charger le panier avec la **PCR Cassette** (Cassette de PCR) dans la « Inventory Area » (Zone inventaire) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
- Fermer le tiroir de l'instrument.
- Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

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

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

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

Remarque : le PCR Mix peut être utilisé pendant 7 sessions de travail indépendantes de 3 heures chacune ou peut être conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant un maximum de 3 sessions de travail consécutives de 3 heures chacune. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes avant de commencer la session d'analyse suivante.

Examen et approbation des résultats

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

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

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

L'instrument **ELITe BeGenius** génère les résultats à l'aide du produit **HBV 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 BeGenius**, se reporter aux chapitres correspondants relatifs à ce système.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE Systèmes ELITe InGenius et ELITe BeGenius

Limite de détection (LoD)

La limite de détection (LoD) du HBV ELITe MGB® Kit a été déterminée avec des échantillons de plasma sur le système ELITe InGenius.

La LoD a été déterminée en testant un panel d'échantillons de plasma ACD négatifs pour le VHB qui ont été dopés avec un matériel de référence certifié du VHB (4^e étalon international de l'OMS, NIBSC) dont les titres était connus. Six niveaux de dilutions ont été préparés, de 18 UI/mL à 1 UI/mL. Chaque niveau de dilution a été traité en 24 réplicats sur le système ELITe InGenius en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR). Une analyse de régression des probits a été réalisée sur les résultats, et la LoD a été estimée comme la concentration correspondant à une probabilité de résultat positif de 95 %.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Limite de détection (UI/mL) pour des échantillons de plasma ACD avec le système ELITe InGenius			
Cible	LoD	Intervalle de confiance à 95 %	
		Limite inférieure	Limite supérieure
VHB	9	6	18

La LoD, exprimée en copies/mL pour le plasma ACD, a été calculée en appliquant le facteur de conversion spécifique indiqué à la page 23. La sensibilité analytique, en copies/mL, est indiquée ci-dessous.

Limite de détection (copies/mL) pour des échantillons de plasma ACD avec le système ELITe InGenius			
Cible	LoD	Intervalle de confiance à 95 %	
		Limite inférieure	Limite supérieure
VHB	38	27	73

La valeur de la LoD calculée a été vérifiée en testant 30 réplicats d'échantillons de plasma ACD, 30 réplicats d'échantillons de plasma EDTA et 30 réplicats d'échantillons de sérum qui ont été dopés avec un matériel de référence certifié du VHB (4^e étalon international de l'OMS, NIBSC) à la concentration revendiquée. La LoD était confirmée si au moins 27 des 30 réplicats généraient un résultat positif.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Limite de détection pour des échantillons de plasma et de sérum avec le système ELITe InGenius					
Échantillon	Titre	Cible	N	Positif	Négatif
Plasma ACD	9 UI/mL	VHB	30	30	0
Plasma EDTA	9 UI/mL	VHB	30	28	2
Sérum	9 UI/mL	VHB	30	29	1

La valeur de la LoD pour la cible VHB a été confirmée à 9 UI/mL pour le plasma ACD, le plasma EDTA et le sérum.

La LoD calculée en association avec le système **ELITe BeGenius** a été vérifiée en testant 30 réplicats d'échantillons de plasma ACD, 30 réplicats d'échantillons de plasma EDTA et 30 réplicats d'échantillons de sérum qui avaient été dopés avec un matériel de référence certifié du VHB (4^e étalon international de l'OMS, NIBSC) à la concentration revendiquée. La LoD était confirmée si au moins 27 des 30 réplicats généraient un résultat positif.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Limite de détection pour des échantillons de plasma et de sérum avec le système ELITe BeGenius					
Échantillon	Titre	Cible	N	Positif	Négatif
Plasma ACD	9 UI/mL	VHB	30	28	2
Plasma EDTA	9 UI/mL	VHB	30	28	2
Sérum	9 UI/mL	VHB	30	30	0

La valeur de la LoD pour la cible VHB a été confirmée à 9 UI/mL pour le plasma ACD, le plasma EDTA et le sérum.

Équivalence des matrices : plasma EDTA versus plasma ACD et sérum

L'équivalence des matrices du HBV ELITe MGB Kit a été vérifiée en utilisant des échantillons de plasma ACD, de plasma EDTA et de sérum sur le système ELITe InGenius.

Un test a été réalisé sur 30 échantillons de plasma EDTA et 30 échantillons de plasma ACD provenant des mêmes 30 donneurs individuels (échantillons appariés), testés négatifs pour le VHB par un dosage immunologique portant le marquage CE DIV. Les échantillons ont été testés sur le système ELITe InGenius en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR). Le pourcentage de concordance négative (PCN) a été évalué. Le coefficient de variation (% CV) des valeurs Ct du Contrôle Interne a été calculé afin d'évaluer l'équivalence des deux matrices.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Échantillon	N	Positif	Négatif	PCN	% CV Ct du Contrôle Interne	% CV Ct globale du Contrôle Interne
Plasma EDTA	30	0	30	100 %	0,86	0,98
Plasma ACD	30	0	30		1,01	

Un test a été réalisé sur 30 échantillons appariés de plasma EDTA et de sérum, testés négatifs pour le VHB par un dosage immunologique portant le marquage CE DIV. Les échantillons ont été testés sur le système ELITe InGenius en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR). Le pourcentage de concordance négative a été évalué. Le coefficient de variation (% CV) des valeurs Ct du Contrôle Interne a été calculé afin d'évaluer l'équivalence des deux matrices.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Échantillon	N	Positif	Négatif	PCN	% CV Ct du Contrôle Interne	% CV Ct globale du Contrôle Interne
Plasma EDTA	30	0	30	97 %	0,90	0,86
Sérum	30	1	29		0,82	

L'échantillon de sérum positif montrait un très faible titre (inférieur à 9 UI/mL), ce qui est cohérent avec un résultat négatif par le dosage immunologique portant le marquage CE DIV utilisé pour certifier la négativité de l'échantillon.

Un test a été réalisé sur 30 échantillons appariés de plasma EDTA et de plasma ACD, testés négatifs pour le VHB par un dosage immunologique portant le marquage CE DIV et dopés avec un matériel de référence certifié (4^e étalon international pour le VHB de l'OMS, NIBSC) à une concentration de 3 x la LoD (environ 27 UI/mL). Les échantillons ont été testés sur le système ELITe InGenius en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR). Le pourcentage de concordance positive (PCP) a été évalué. Le coefficient de variation (% CV) des valeurs Ct de la cible VHB a été calculé afin d'évaluer l'équivalence des deux matrices.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Échantillon	N	Positif	Négatif	PCP	% CV Ct du VHB	% CV Ct globale du VHB	ΔQté (Log UI/mL)
Plasma EDTA	30	30	0	100 %	1,75	1,81	0,0458
Plasma ACD	30	30	0		1,88		

Un test a été réalisé sur 30 échantillons appariés de plasma EDTA et de sérum, testés négatifs pour le VHB par un dosage immunologique portant le marquage CE DIV et dopés avec un matériel de référence certifié (4^e étalon international pour le VHB de l'OMS, NIBSC) à une concentration de 3 x la LoD (environ 27 UI/mL). Les échantillons ont été testés sur le système ELITe InGenius en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR). Le pourcentage de concordance positive a été évalué. Le coefficient de variation (% CV) des valeurs Ct de la cible VHB a été calculé afin d'évaluer l'équivalence des deux matrices.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Échantillon	N	Positif	Négatif	PCP	% CV Ct du VHB	% CV Ct globale du VHB	ΔQté (Log UI/mL)
Plasma EDTA	30	30	0	100 %	1,59	1,49	0,0910
Sérum	30	30	0		1,29		

Dans ces tests, les 30 échantillons appariés de plasma EDTA et de plasma ACD, et les 30 échantillons appariés de plasma EDTA et de sérum montraient des performances équivalentes lorsqu'ils étaient analysés à l'aide du HBV ELITe MGB Kit en association avec le système ELITe InGenius.

Un test d'équivalence des matrices supplémentaire a été effectué dans l'étude de la plage de mesure linéaire indiquée à la page 23.

Plage de mesure linéaire

La plage de mesure linéaire du HBV ELITe MGB Kit a été déterminée avec des échantillons de plasma sur le système ELITe InGenius.

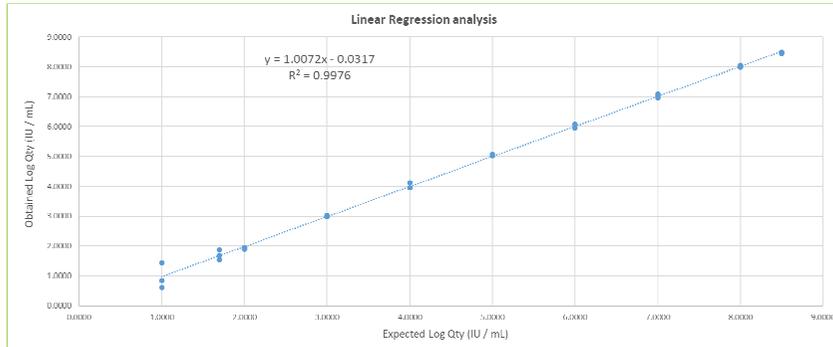
La plage de mesure linéaire a été déterminée en utilisant un panel de dilutions d'un matériel de référence du VHB (ZeptoMetrix) dans des échantillons de plasma EDTA négatifs. Le panel consistait en dix points de dilution à partir d'environ 3,2 x 10⁸ UI/mL jusqu'à 10 UI/mL. Chaque échantillon du panel a été testé en triple sur le système ELITe InGenius en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

HBV ELITe MGB® Kit
réactifs pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTK602ING

Les données ont été analysés par une régression linéaire et une analyse polynomiale, et les résultats ont démontré que le test présentait une réponse linéaire pour toutes les dilutions avec un coefficient de corrélation R-carré (R²) de 0,998.

Les résultats sont présentés sur la figure suivante.



La limite inférieure de quantification (LLOQ) a été déterminée à 9 UI/mL, la même valeur que la LoD, où les résultats mesurés étaient à $\pm 0,5$ Log UI/mL de la concentration cible. La précision et l'exactitude à la LLOQ ont été calculées avec un écart type = 0,2813 Log UI/mL et un biais = 0,2767 Log UI/mL.

La limite supérieure de quantification (ULOQ) a été déterminée à 317 750 000 UI/mL, où les résultats mesurés se situaient à $\pm 0,5$ Log UI/mL de la concentration cible. La précision et l'exactitude à la ULOQ ont été calculées avec un écart type = 0,0275 Log UI/mL et un biais = 0,0175 Log UI/mL.

La plage de mesure linéaire en copies/mL pour le plasma EDTA est calculée en appliquant le facteur de conversion spécifique indiqué à la page 31.

Les résultats finaux sont résumés dans le tableau suivant.

Plage de mesure linéaire pour les échantillons de plasma EDTA avec le système ELITe InGenius	
Limite inférieure	Limite supérieure
9 UI/mL	317 750 000 UI/mL
38 copies/mL	1 323 958 333 copies/mL

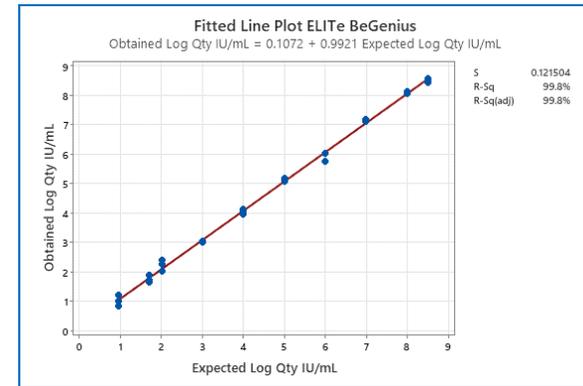
La plage de mesure linéaire du HBV ELITe MGB® Kit a été vérifiée en association avec des échantillons de plasma et le système **ELITe BeGenius** en utilisant un panel de dilutions d'un matériel de référence du VHB (ZeptoMetrix) dans des échantillons de plasma EDTA négatifs. Le panel consistait en dix points de dilution à partir d'environ $3,2 \times 10^8$ UI/mL jusqu'à 9 UI/mL. Chaque échantillon du panel a été testé en 3 réplicats sur le système ELITe BeGenius en mode « Extraction + PCR » (Extract + PCR).

L'analyse des données obtenues, effectuée par une analyse de régression linéaire, a démontré que le test présentait une réponse linéaire pour toutes les dilutions avec un coefficient de corrélation R-carré (R²) de 0,998.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

HBV ELITe MGB® Kit
réactifs pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTK602ING



La limite inférieure de quantification (LLOQ) a été confirmée à 9 UI/mL, la même valeur que la LoD, où les résultats mesurés étaient à $\pm 0,5$ Log UI/mL de la concentration cible. La précision et l'exactitude à la LLOQ ont été calculées avec un écart type = 0,1939 Log UI/mL et un biais = 0,0709 Log UI/mL.

La limite supérieure de quantification (ULOQ) a été confirmée à 317 750 000 UI/mL, où les résultats mesurés se situaient à $\pm 0,5$ Log UI/mL de la concentration cible. La précision et l'exactitude à la ULOQ ont été calculées avec un écart type = 0,0579 Log UI/mL et un biais = 0,0131 Log UI/mL.

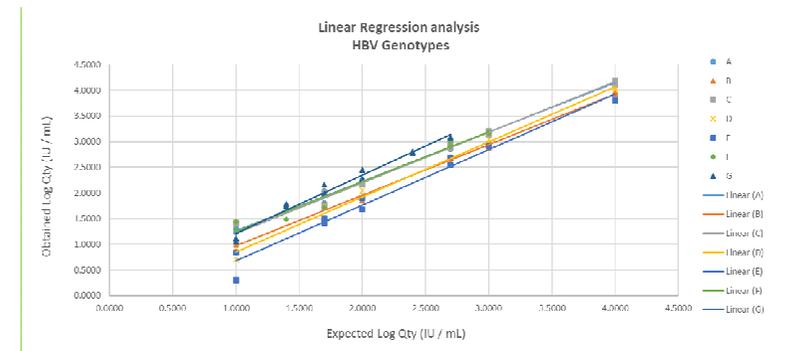
La plage de mesure linéaire en copies/mL pour le plasma EDTA est calculée en appliquant le facteur de conversion spécifique indiqué à la page 31.

Les résultats finaux sont résumés dans le tableau suivant.

Plage de mesure linéaire pour les échantillons de plasma EDTA avec le système ELITe BeGenius	
Limite inférieure	Limite supérieure
9 UI/mL	317 750 000 UI/mL
38 copies/mL	1 323 958 333 copies/mL

La plage de mesure linéaire a été vérifiée par une analyse des échantillons de plasma EDTA négatifs dopés avec un matériel de référence du VHB (1^{er} panel de référence international de l'OMS pour les génotypes du VHB, PEI) pour les principaux génotypes du VHB (A, B, C, D, E, F, G). Chaque génotype du VHB a été testé dans un panel de 6 niveaux de dilution. Chaque niveau de dilution a été testé en double sur le système ELITe InGenius en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

Les résultats sont présentés sur la figure suivante.



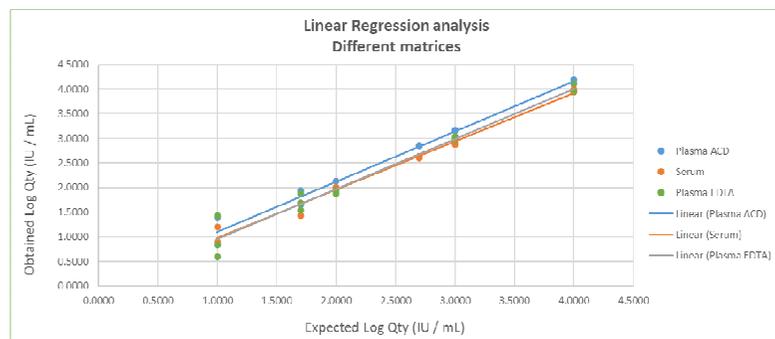
La linéarité du test a été confirmée pour les principaux génotypes du VHB (A, B, C, D, E, F, G) générant des résultats quantitatifs à $\pm 0,5$ Log UI/mL et un R² compris entre 0,979 et 0,996.

HBV ELITe MGB® Kit
réactifs pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTK602ING

La plage de mesure linéaire a été vérifiée par une analyse des échantillons de plasma ACD négatifs et de sérum négatifs dopés avec un matériel de référence du VHB (4^e étalon international de l'OMS, NIBSC). Chaque matrice a été testée dans un panel de 6 niveaux de dilution. Chaque niveau de dilution a été testé en double sur le système ELITe InGenius en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR). Les résultats correspondants des tests avec le plasma EDTA ont été rapportés comme référence.

Les résultats sont présentés sur la figure suivante.



La linéarité du test a été confirmée pour le plasma ACD et le sérum en générant des résultats quantitatifs à $\pm 0,5$ Log UI/mL et un R2 respectivement de 0,982 et 0,988.

Inclusivité : efficacité de détection et de quantification de différents génotypes

L'efficacité de détection de différents génotypes du VHB a été évaluée par une analyse *in silico* des séquences disponibles dans les bases de données de nucléotides.

L'analyse des régions spécifiques pour l'hybridation des amorces et de la sonde dans le gène de la polymérase (domaine TP) a montré leur conservation et une absence de mutations significatives dans les génotypes A, B, C, D, E, F, G, H, I et RF du VHB pour toutes les séquences disponibles dans les bases de données de nucléotides. On s'attend donc à une détection et une quantification efficace des différents génotypes du VHB.

L'inclusivité du test, évaluée par l'efficacité de détection et de quantification des différents génotypes, a été vérifiée en testant le 1^{er} panel de référence international de l'OMS pour les génotypes du VHB (PEI) incluant les principaux génotypes du VHB (A, B, C, D, E, F, G).

Chaque échantillon du panel a été préparé à une concentration de 3 x la LoD (environ 27 UI/mL) dans des échantillons de plasma ACD négatifs et a été testé sur le système ELITe InGenius en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

1 ^{er} panel de référence international de l'OMS pour les génotypes du VHB (PEI)				
ID de l'échantillon	Génotype	Pos./Rép.	Ct moyenne du VHB	UI/mL moyennes du VHB
HBV 1/A	A	3/3	37,71	25
HBV 2/A		3/3	37,76	25
HBV 3/A		3/3	38,20	17
HBV 4/B	B	3/3	38,15	17
HBV 5/B		3/3	38,56	17
HBV 6/B		3/3	38,23	18
HBV 7/B	C	3/3	37,75	24
HBV 8/C		3/3	38,01	20
HBV 9/C		3/3	38,12	18
HBV 10/D	D	3/3	37,84	22
HBV 11/D		3/3	37,97	20
HBV 12/D		3/3	38,29	16
HBV 13/E	E	3/3	38,02	19
HBV 14/F	F	3/3	37,81	22
HBV 15/G	G	3/3	37,08	37

HBV ELITe MGB® Kit
réactifs pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTK602ING

L'inclusivité du test a également été vérifiée en testant le « AccuSet™ HBV DNA Genotype Performance Panel » (SeraCare) y compris les génotypes A, B, C, D, E, F, G, H du VHB.

Chaque échantillon du panel a été préparé à une concentration de 3 x la LoD (environ 27 UI/mL) dans des échantillons de plasma ACD négatifs et a été testé sur le système ELITe InGenius en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

« AccuSet™ HBV DNA Genotype Performance Panel » (SeraCare)				
ID de l'échantillon	Génotype	Pos./Rép.	Ct moyenne du VHB	UI/mL moyennes du VHB
A	A	3/3	38,01	19
B	B	3/3	37,99	20
C	C	3/3	38,14	18
D	D	3/3	38,16	18
E	E	3/3	38,15	17
F	F	3/3	37,92	21
H	H	3/3	37,80	22

Tous les échantillons ont été correctement détectés et quantifiés à $\pm 0,5$ Log UI/mL (9-85 UI/mL) à l'aide du HBV ELITe MGB Kit sur le système ELITe InGenius.

Marqueurs potentiellement interférents : réactivité croisée

La réactivité croisée potentielle du test avec d'autres organismes non souhaités a été évaluée par une analyse *in silico* des séquences disponibles dans les bases de données de nucléotides.

Les séquences des amorces et des sondes ont été évaluées pour leur homologie avec les séquences d'autres organismes disponibles dans les bases de données de nucléotides. Les résultats n'ont montré aucune homologie significative et, par conséquent, aucune réactivité croisée n'est attendue.

L'absence de réactivité croisée avec d'autres organismes qui peuvent être présents dans des échantillons cliniques de plasma et de sérum a également été vérifiée en testant un panel de matériels de référence certifiés.

Des échantillons d'ADN ou d'ARN génomique de différents marqueurs potentiellement interférents (ATCC, NIBSC, ZeptoMetrix) ont été analysés à une concentration élevée (au moins 10⁵ copies/réaction) en triple en association sur le système ELITe InGenius en mode « PCR Only » (PCR uniquement). L'ADN ou l'ARN génomique de chaque organisme a également été ajouté à 80 000 copies de Contrôle Interne par réaction afin d'imiter l'échantillon clinique extrait.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Échantillon	VHB Pos./Rép.	Résultat
Adénovirus 2	0/3	Aucune réactivité croisée
CMV	0/3	Aucune réactivité croisée
EBV	0/3	Aucune réactivité croisée
HHV6	0/3	Aucune réactivité croisée
VZV	0/3	Aucune réactivité croisée
HSV1	0/3	Aucune réactivité croisée
HSV2	0/3	Aucune réactivité croisée
HTLV-1	0/3	Aucune réactivité croisée
HTLV-2	0/3	Aucune réactivité croisée
Parvovirus B19	0/3	Aucune réactivité croisée

Échantillon	VHB Pos./Rép.	Résultat
Échovirus 4	0/3	Aucune réactivité croisée
Virus de la dengue de type 3	0/3	Aucune réactivité croisée
VNO	0/3	Aucune réactivité croisée
Virus de la grippe A (H1N1)	0/3	Aucune réactivité croisée
Virus de la grippe B (Florida)	0/3	Aucune réactivité croisée
RSV A2	0/3	Aucune réactivité croisée
VHA	0/3	Aucune réactivité croisée
VHC	0/3	Aucune réactivité croisée
VHE	0/3	Aucune réactivité croisée
HIV-1	0/3	Aucune réactivité croisée
HIV-2	0/3	Aucune réactivité croisée
<i>Candida albicans</i>	0/3	Aucune réactivité croisée
<i>Staphylococcus aureus</i>	0/3	Aucune réactivité croisée

Tous les marqueurs potentiellement interférents testés n'ont montré aucune réactivité croisée pour la cible VHB à l'aide du HBV ELITe MGB Kit.

Marqueurs potentiellement interférents : interférence

L'absence d'interférence causée par la présence d'autres organismes dans des échantillons cliniques de plasma a été vérifiée en testant un panel de matériels de référence certifiés.

Des échantillons d'ADN ou d'ARN génomique de marqueurs potentiellement interférents (ATCC, NIBSC, ZeptoMetrix) à une concentration élevée (au moins 10⁵ copies/réaction) ont été dopés avec de l'ADN génomique du VHB (NIBSC) à une faible concentration (environ 10 copies/réaction). Les échantillons ont été analysés en triple sur le système ELITe InGenius en mode « PCR Only » (PCR uniquement). Chaque échantillon a également été ajouté à 80 000 copies de Contrôle Interne par réaction afin d'imiter l'échantillon clinique extrait.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Échantillon	VHB Pos./Rép.	Résultat
Adénovirus 2	3/3	Aucune interférence
CMV	3/3	Aucune interférence
EBV	3/3	Aucune interférence
HHV6	3/3	Aucune interférence
VZV	3/3	Aucune interférence
HSV1	3/3	Aucune interférence
HSV2	3/3	Aucune interférence
HTLV-1	3/3	Aucune interférence
HTLV-2	3/3	Aucune interférence
Parvovirus B19	3/3	Aucune interférence
Échovirus 4	3/3	Aucune interférence
Virus de la dengue de type 3	3/3	Aucune interférence
VNO	3/3	Aucune interférence
Virus de la grippe A (H1N1)	3/3	Aucune interférence
Virus de la grippe B (Florida)	3/3	Aucune interférence

Échantillon	VHB Pos./Rép.	Résultat
RSV A2	3/3	Aucune interférence
VHA	3/3	Aucune interférence
VHC	3/3	Aucune interférence
VHE	3/3	Aucune interférence
HIV-1	3/3	Aucune interférence
HIV-2	3/3	Aucune interférence
<i>Staphylococcus aureus</i>	3/3	Aucune interférence
<i>Candida albicans</i>	3/3	Aucune interférence

Tous les organismes potentiellement interférents testés n'ont montré aucune inhibition de l'amplification de la cible VHB à l'aide du HBV ELITe MGB Kit.

Substances potentiellement interférentes

L'effet de substances potentiellement interférentes a été évalué en analysant le « AcroMetrix® Inhibition Panel » (Thermo Fisher Scientific Inc.), qui contient des substances endogènes entraînant une hémolyse, un ictere et une lipémie, ainsi que des substances exogènes, notamment les anticoagulants EDTA et héparine.

Les échantillons du panel d'inhibition ont été dopés avec un matériel de référence certifié du VHB (4^e étalon international pour le VHB de l'OMS, NIBSC) à une concentration de 3 x la LoD (environ 27 UI/mL).

De plus, 6 autres substances potentiellement interférentes, des médicaments, ont été testées à la concentration pertinente : Ganciclovir, Azithromycine, Glécaprévir, Entécavir, Ténofovir, Lamivudine. Les substances ont été chacune ajoutées à des échantillons de plasma ACD négatifs dopés avec un matériel de référence certifié du VHB (4^e étalon international pour le VHB de l'OMS, NIBSC) à une concentration de 3 x la LoD (environ 27 UI/mL).

Les échantillons ont été traités en triple sur le système ELITe InGenius en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR). Les valeurs Ct (échantillons de référence et de test) de la cible VHB et du Contrôle Interne ont été utilisées pour calculer le Coefficient de Variation (% CV) afin d'évaluer l'éventuelle interférence.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Échantillon	Pos./Rép.	%CV Ct du VHB	%CV Ct du Contrôle Interne
EDTA	3/3	1,78	0,87
Héparine	1/3	N.A.	7,11
Sang hémolytique, concentration élevée	3/3	1,11	0,90
Plasma lipémique	3/3	1,30	0,72
Plasma icterique	3/3	1,13	1,41
Ganciclovir	3/3	0,96	0,76
Azithromycine	3/3	0,88	0,85
Glécaprévir	3/3	1,04	0,57
Entécavir	3/3	1,07	0,88
Ténofovir	3/3	0,88	0,76
Lamivudine	3/3	1,13	0,78

Le test a montré que l'EDTA, l'Hémoglobine, les Triglycérides, la Bilirubine, le Ganciclovir, l'Azithromycine, le Glécaprévir, l'Entécavir, le Ténofovir et la Lamivudine n'interféraient pas avec l'amplification du VHB ou du Contrôle Interne. Le % CV des valeurs Ct pour le VHB et l'IC était inférieur à 2 %.

Il a été confirmé que l'héparine était capable d'inhiber l'amplification du VHB ; cependant, en raison de la valeur seuil Ct du Contrôle Interne (Ct de l'IC < 31), les résultats des échantillons étaient « non valides » et pas « faux négatifs ».

Absence de contamination croisée

L'absence de contamination croisée a été testée en analysant les résultats de cinq sessions d'analyse dans lesquelles des échantillons de plasma négatifs pour l'ADN du VHB étaient testés en alternance avec des échantillons de plasma dopés avec un matériel de référence certifié du VHB

HBV ELITe MGB® Kit
réactifs pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTK602ING

(ZeptoMetrix) à une concentration de 1×10^6 UI/mL.

Cinq ensembles d'échantillons, avec une alternance de six échantillons positifs et six échantillons négatifs, ont été testés sur le système ELITe InGenius en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	Négatif	Positif
Plasma ACD dopé à 1×10^6 UI/mL de VHB	30	0	30
Plasma ACD négatif pour le VHB	30	30	0

Aucun des échantillons négatifs pour le VHB testés n'a généré de résultats faux positifs. Dans ce test, aucune contamination croisée n'a été détectée (intra-session et inter-sessions).

Taux de défaillance de l'ensemble du système

Le taux de défaillance de l'ensemble du système a été vérifié, en association avec le système **ELITe InGenius**, en analysant un panel d'échantillons dopés pour l'ADN du VHB à un faible titre et en déterminant la fréquence des résultats « faux négatifs ».

100 échantillons individuels de plasma EDTA, 30 échantillons individuels de plasma ACD et 30 échantillons individuels de sérum (tous testés négatifs pour l'ADN du VHB), ont été dopés avec un matériel de référence certifié (4^e étalon international pour le VHB de l'OMS, NIBSC) à une concentration de $3 \times$ la LoD (environ 27 UI/mL). Les échantillons ont été testés sur le système ELITe InGenius en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	Négatif	Positif	UI/mL moyennes du VHB
Plasma EDTA dopé	100	0	100	26
Plasma ACD dopé	30	0	30	27
Sérum dopé	30	0	30	23

Aucun des échantillons positifs pour le VHB testés n'a généré de résultats faux négatifs. Dans ce test, le taux de défaillance de l'ensemble du système était de 0 %.

Le taux de défaillance de l'ensemble du système a été vérifié, en association avec le système **ELITe BeGenius**, en analysant un panel d'échantillons dopés pour l'ADN du VHB à un faible titre et en déterminant la fréquence des résultats « faux négatifs ».

100 échantillons individuels de plasma EDTA, testés négatifs pour l'ADN du VHB, ont été dopés avec un matériel de référence certifié (4^e étalon international pour le VHB de l'OMS, NIBSC) à une concentration de $3 \times$ la LoD (environ 27 UI/mL). Les échantillons ont été testés sur le système ELITe BeGenius en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	Négatif	Positif	UI/mL moyennes du VHB
Plasma EDTA dopé	100	0	100	15

Aucun des échantillons positifs pour le VHB testés n'a généré de résultats faux négatifs. Dans ce test, le taux de défaillance de l'ensemble du système était de 0 %.

Répétabilité

La répétabilité des résultats obtenus à l'aide du HBV ELITe MGB Kit sur le système **ELITe InGenius** a été évaluée en analysant un panel d'échantillons de plasma. Le panel comprenait un échantillon négatif et deux échantillons dopés avec un matériel de référence certifié du VHB (4^e étalon international pour le VHB de l'OMS, NIBSC) à des concentrations de $3 \times$ la LoD (environ 27 UI/mL) et de $10 \times$ la LoD (environ 90 UI/mL).

La répétabilité a été déterminée en analysant les membres du panel en quatre réplicats, à raison de deux analyses par jour, en utilisant un seul lot de produit par jour, sur deux jours différents. Les tests ont été effectués avec un total de trois lots de produit, tous utilisant le même instrument, et par le même opérateur. Les échantillons ont été traités à des positions aléatoires sur le système ELITe InGenius en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

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

HBV ELITe MGB® Kit
réactifs pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTK602ING

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

Répétabilité intra-session								
Échantillon	VHB				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	28,89	0,23	0,79
3 x la LoD	8/8	38,07	0,38	1,00				
10 x la LoD	8/8	36,26	0,25	0,69				

Répétabilité inter-sessions								
Échantillon	VHB				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	28,79	0,28	0,97
3 x la LoD	16/16	38,01	0,41	1,08				
10 x la LoD	16/16	36,18	0,28	0,77				

Dans le test de répétabilité, l'analyse a détecté la cible VHB comme attendu et a montré des valeurs Ct avec un % CV inférieur à 1,1 % pour le VHB et 1 % pour le Contrôle Interne

La répétabilité des résultats obtenus à l'aide du produit HBV ELITe MGB Kit sur le système **ELITe BeGenius** a été évaluée en analysant un panel d'échantillons de plasma. Le panel incluait un échantillon négatif et deux échantillons dopés avec un matériel de référence certifié du VHB (4^e étalon international pour le VHB de l'OMS, NIBSC) à une concentration de $3 \times$ la LoD (environ 27 UI/mL) et de $10 \times$ la LoD (environ 90 UI/mL).

La répétabilité a été obtenue en analysant les échantillons du panel en huit réplicats, à raison d'une analyse par jour, en utilisant le même lot de produit, sur deux jours différents. Trois lots de produit ont été utilisés avec le même instrument et le même opérateur. Les échantillons ont été traités à des positions aléatoires sur le système ELITe BeGenius en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

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

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

Répétabilité intra-session								
Échantillon	VHB				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	30,06	0,37	1,24
3 x la LoD	8/8	38,64	0,46	1,19				
10 x la LoD	8/8	36,83	0,34	0,93				

Répétabilité inter-sessions								
Échantillon	VHB				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	30,04	0,54	1,80
3 x la LoD	16/16	38,93	0,86	2,22				
10 x la LoD	16/16	36,87	0,35	0,94				

Dans le test de répétabilité, l'analyse détectait la cible VHB comme attendu et montrait un faible % CV des valeurs Ct qui n'excédait pas 2,2 % pour le VHB et 1,8 % pour le contrôle interne.

Reproductibilité

La reproductibilité des résultats obtenus à l'aide du HBV ELITe MGB Kit sur le système **ELITe InGenius** a été évaluée en analysant un panel d'échantillons de plasma. Le panel comprenait un échantillon négatif et deux échantillons dopés avec un matériel de référence certifié du VHB (4^e étalon international pour le VHB de l'OMS, NIBSC) à des concentrations de $3 \times$ la LoD (environ 27 UI/mL) et de $10 \times$ la LoD (environ 90 UI/mL).

HBV ELITe MGB® Kit
réactifs pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTK602ING

La reproductibilité a été déterminée en analysant les membres du panel en quatre réplicats, à raison d'une analyse par jour, sur deux jours par site. Trois lots de produits différents ont été utilisés sur trois sites différents avec trois instruments différents et par trois opérateurs différents. Les échantillons ont été traités à des positions aléatoires sur le système ELITe InGenius en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

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

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

Reproductibilité inter-sites								
Échantillon	VHB				Contrôle Interne			
	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV
Négatif	0/24	N.A.	N.A.	N.A.	72/72	28,73	0,45	1,58
3 x la LoD	24/24	37,60	0,68	1,80				
10 x la LoD	24/24	35,63	0,35	0,98				

Reproductibilité inter-lots								
Échantillon	VHB				Contrôle Interne			
	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV
Négatif	0/48	N.A.	N.A.	N.A.	144/144	28,67	0,41	1,44
3 x la LoD	48/48	38,19	0,44	1,16				
10 x la LoD	48/48	36,25	0,38	1,06				

Dans le test de reproductibilité, l'analyse détectait la cible VHB comme attendu et montrait des valeurs Ct avec un % CV inférieur à 1,8 % pour le VHB et 1,6 % pour le Contrôle Interne

La reproductibilité des résultats obtenus à l'aide du produit HBV ELITe MGB Kit sur le système **ELITe BeGenius** a été évaluée en analysant un panel d'échantillons de plasma. Le panel incluait un échantillon négatif et deux échantillons dopés avec un matériel de référence certifié du VHB (4^e étalon international pour le VHB de l'OMS, NIBSC) à une concentration de 3 x la LoD (environ 27 UI/mL) et de 10 x la LoD (environ 90 UI/mL).

La reproductibilité a été obtenue en analysant les échantillons du panel en quatre réplicats, à raison d'une analyse par jour, sur deux jours pour chaque instrument. Trois lots de produits différents ont été utilisés avec trois instruments différents et par trois opérateurs différents. Les échantillons ont été traités à des positions aléatoires sur le système ELITe BeGenius en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

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

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

Reproductibilité inter-instruments								
Échantillon	VHB				Contrôle Interne			
	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV
Négatif	0/24	N.A.	N.A.	N.A.	72/72	30,67	0,86	2,80
3 x la LoD	24/24	38,54	1,08	2,79				
10 x la LoD	24/24	36,53	0,76	2,09				

Reproductibilité inter-lots								
Échantillon	VHB				Contrôle Interne			
	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV
Négatif	0/48	N.A.	N.A.	N.A.	144/144	29,89	0,51	1,71
3 x la LoD	48/48	38,19	0,85	2,24				
10 x la LoD	48/48	36,38	0,57	1,57				

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

Facteur de conversion en unités internationales

Le facteur de conversion, permettant de rapporter les résultats quantitatifs en unités internationales/mL à partir d'un nombre de copies/mL, a été calculé en utilisant un panel de quatre dilutions

HBV ELITe MGB® Kit
réactifs pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTK602ING

(0,5 log entre les dilutions) du matériel de référence étalon certifié « 4^e étalon international pour le VHB de l'OMS » (NIBSC) dans du plasma EDTA qui était négatif pour l'ADN du VHB.

Chaque point du panel a été testé en 27 réplicats en utilisant trois lots de produit différents, sur trois instruments différents et sur trois jours différents. Les échantillons ont été traités à des positions aléatoires sur le système ELITe InGenius en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

Le facteur de conversion a été déterminé en calculant la différence de concentration logarithmique entre le titre de référence en UI/mL et les résultats obtenus en copies/mL, en ayant pour résultat 0,24 UI/copie.

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

Facteur de conversion en unités internationales, Fc = 0,24 UI/copie						
Échantillon			Résultat			Différence log. (réf. - test)
UI/mL	Log UI/mL	N	Nombre moyen de copies/mL	Moyenne UI/mL	Moyenne Log UI/mL	
31 600	4,5000	27	133 240	31 748	4,4877	+0,0123
10 000	4,0000	27	41 965	9 999	3,9917	+0,0083
3 160	3,5000	27	14 275	3 401	3,5187	-0,0187
1 000	3,0000	27	4 337	1 033	3,0020	-0,0020

Étant donné que l'équivalence entre le plasma EDTA, le plasma ACD et le sérum a été démontrée (pages 15 et 16), le facteur de conversion peut être appliquée aux trois matrices.

Le facteur de conversion du HBV ELITe MGB® Kit en association avec des échantillons de plasma EDTA a été vérifié en association avec les systèmes **ELITe BeGenius** et **ELITe InGenius** en utilisant un panel de cinq dilutions (0,5 Log entre les dilutions) du matériel de référence étalon et certifié « 4^e étalon international pour le VHB de l'OMS » (NIBSC) dans du plasma EDTA qui était négatif pour l'ADN du VHB. Le panel consistait en cinq points de dilution à partir d'environ 4,5 Log UI/mL jusqu'à 2,5 Log UI/mL. Chaque échantillon du panel a été testé en 4 réplicats.

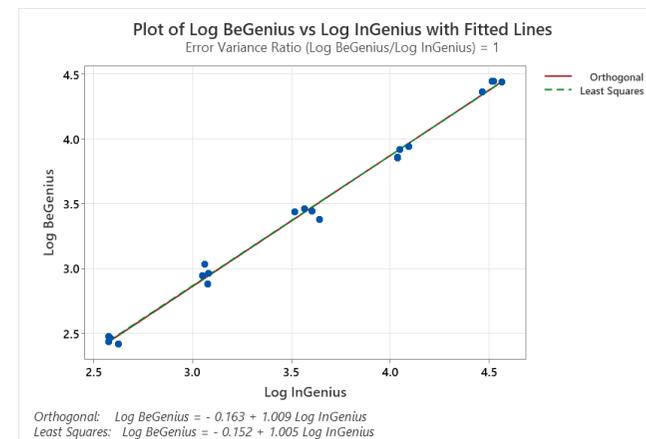
La précision de quantification cible, en tant qu'écart-type des Log UI/mL, était inférieure à 0,5 Log.

L'exactitude de quantification cible, en tant que différence entre les concentrations théorique et mesurée en Log UI/mL, était inférieure à 0,5 Log.

Ces résultats confirmaient le facteur de conversion calculé pour le plasma 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.



L'analyse de régression orthogonale générant une ordonnée à l'origine de -0,163 (IC à 95 % : -

HBV ELITe MGB® Kit
réactifs pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTK602ING

0,294 ; -0,032) et une pente de 1,009 (CI à 95 % : 0,973 ; 1,045). L'analyse de régression linéaire générant un R2 de 0,994.

Reproductibilité avec un matériel de référence

La reproductibilité des résultats du test par rapport à d'autres méthodes dans différents laboratoires a été vérifiée en testant le panel d'étude de référence « QCMD 2020 Hepatitis B Virus DNA EQA Programme » (QCMD).

Chaque membre du panel a été testé sur le système ELITe InGenius en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant, où les valeurs consensus sont dérivées de systèmes commerciaux d'amplification en temps réel.

Code de l'échantillon	Contenu de l'échantillon	Consensus Log UI/mL	EC Log UI/mL	Résultats du test Log UI/mL	Différence (cons. - test)
HBVDNA101S-01	VHB de type A	2,823	0,130	2,695	+0,128
HBVDNA101S-02	VHB de type D	2,673	0,148	2,625	+0,048
HBVDNA101S-03	VHB de type D	3,642	0,155	3,579	+0,063
HBVDNA101S-04	Négatif pour le VHB	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
HBVDNA101S-05	VHB de type A	1,869	0,229	1,688	+0,181
HBVDNA101S-06	VHB de type A	3,803	0,156	3,781	+0,022
HBVDNA101S-07	VHB de type A	2,848	0,176	2,696	+0,152
HBVDNA101S-08	VHB de type D	1,724	0,227	1,422	+0,302

Dans ce test, l'analyse a correctement détecté tous les membres du panel. Sept échantillons ont été détectés à ± 1 écart-type (EC) des valeurs consensus. L'échantillon HBVDNA101S-08 (53 UI/mL) a été sous-estimé, et le résultat est à la fois à ± 2 EC et ± 0,5 Log UI/mL de la valeur consensus.

Sensibilité diagnostique : corrélation des méthodes

La sensibilité diagnostique du test, évaluée par une analyse de corrélation de différentes méthodes, a été évaluée en analysant des échantillons cliniques positifs pour l'ADN du VHB de patients recevant une thérapie antivirale en association avec le système **ELITe InGenius**. Étant donné que les performances analytiques du système **ELITe BeGenius** sont équivalentes à celles du système **ELITe InGenius**, les performances diagnostiques du test effectué sur les deux instruments sont également considérées comme équivalentes. En conséquence, la sensibilité diagnostique du test obtenue en association avec le système **ELITe InGenius** s'applique également au système **ELITe BeGenius**.

Les taux d'ADN du VHB des échantillons étaient dans la plage de mesure du HBV ELITe MBG Kit et de méthodes de diagnostic moléculaire de référence portant le marquage CE DIV (« cobas® HBV for use on the 4800 Systems » et « cobas® HBV for use on the 6800 Systems », Cobas HBV, Roche Diagnostics).

L'étude de corrélation a été effectuée dans trois sites différents sur les 131 échantillons de plasma EDTA suivants :

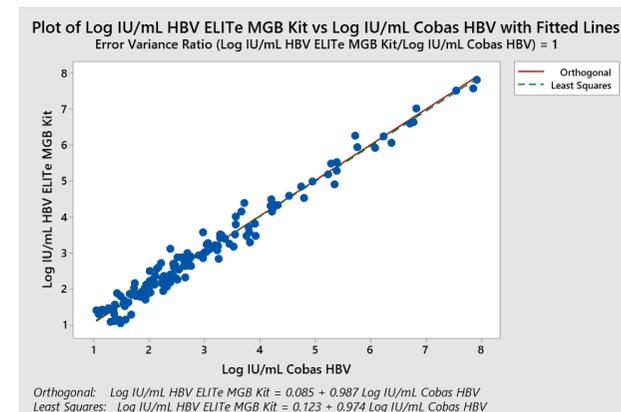
- site 1 : 92 échantillons cliniques de plasma EDTA positifs pour l'ADN du VHB,
- site 2 : 17 échantillons cliniques de plasma EDTA positifs pour l'ADN du VHB,
- site 3 : 22 échantillons cliniques de plasma EDTA positifs pour l'ADN du VHB.

Chaque échantillon a été soumis à la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction, l'amplification, la détection et l'interprétation des résultats, à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. et par les méthodes de référence. Les résultats obtenus avec le HBV ELITe MBG Kit et les méthodes de référence 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.

HBV ELITe MGB® Kit
réactifs pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTK602ING



Dans ce test, l'analyse de régression orthogonale générant une pente de 0,987, IC à 95 % [0,959, 1,015] et une ordonnée à l'origine de 0,085, IC à 95 % [-0,009, 0,179]. L'analyse de régression linéaire générant une valeur R2 de 0,974.

Spécificité diagnostique : confirmation des échantillons négatifs

La spécificité diagnostique du test, évaluée par le Pourcentage de Concordance Négative de différentes méthodes, a été évaluée en association avec le système **ELITe InGenius** en analysant des échantillons cliniques négatifs pour l'ADN du VHB testés par des méthodes de diagnostic moléculaire marquées CE DIV comme référence de diagnostic moléculaire (Roche Diagnostics).

Étant donné que les performances analytiques du système **ELITe BeGenius** sont équivalentes à celles du système **ELITe InGenius**, les performances diagnostiques du test effectué sur les deux instruments sont également considérées comme équivalentes. En conséquence, la spécificité diagnostique du test obtenue en association avec le système **ELITe InGenius** s'applique également au système **ELITe BeGenius**.

L'étude de la spécificité diagnostique a été effectuée dans trois sites différents sur les 127 échantillons de plasma EDTA suivants :

- site 1 : 93 échantillons cliniques de plasma EDTA négatifs pour l'ADN du VHB,
- site 2 : 13 échantillons cliniques de plasma EDTA négatifs pour l'ADN du VHB,
- site 3 : 21 échantillons cliniques de plasma EDTA négatifs pour l'ADN du VHB.

Chaque échantillon a été soumis à la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction, l'amplification, la détection et l'interprétation des résultats, à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. Les résultats obtenus par le HBV ELITe MBG Kit ont été utilisés pour calculer le Pourcentage de Concordance Négative (PCN) avec les méthodes de référence.

Les résultats, après analyse discordante, sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	Positif	Négatif	Non valide	Spécificité diagnostique
Plasma EDTA négatif pour l'ADN du VHB	127	3	124	0	97,6 %

Dans ce test, 124 échantillons ont été confirmés comme négatifs. Trois échantillons ont généré un résultat positif discordant avec des concentrations de titrage inférieures à la LoD du kit HBV ELITe MBG et des méthodes de référence. Ces échantillons possèdent de très faibles concentrations de titrage qui peuvent générer des résultats positifs de manière aléatoire. La spécificité diagnostique du kit HBV ELITe MBG était de 97,6 %.

Remarque : les données complètes et les résultats des tests effectués pour évaluer les caractéristiques de performance du produit avec les matrices et l'instrument sont présentés à la section 7 de la Fiche technique du produit « HBV ELITe MGB Kit », FTP 602ING.

BIBLIOGRAPHIE

S. Velkov et al. (2018) *Genes*. 9: 495.
D. N. Clark et al. (2017) *J. of Virology*. 91: e01785-16.
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Utiliser ce produit uniquement avec les échantillons cliniques suivants : Plasma prélevé sur EDTA ou ACD, sérum.

Le plasma prélevé sur EDTA ou sur ACD et le sérum peuvent être obtenus à partir de sang total conservé à +2/+25 °C pendant 24 heures au maximum.

Ne pas utiliser de plasma prélevé sur héparine avec ce produit : l'héparine inhibe la réaction d'amplification des acides nucléiques et génère des résultats non valides.

Actuellement, aucune donnée n'est disponible concernant les performances du produit avec d'autres échantillons cliniques tels que le sang total.

Ce produit n'est pas destiné à être utilisé comme un test de dépistage de la présence du VHB dans le sang ou les produits sanguins, ou comme un test diagnostique pour confirmer la présence d'une infection par le VHB.

Les résultats obtenus avec ce produit dépendent d'une identification, d'une collecte, d'un transport, de la conservation et d'un traitement appropriés des échantillons. Afin d'éviter tout résultat incorrect, il est par conséquent nécessaire de prendre des précautions particulières pendant ces étapes et de suivre scrupuleusement le mode d'emploi fourni avec le produit.

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

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

Ce produit exige l'utilisation d'équipements de protection individuelle et de zones adaptées au traitement d'échantillons biologiques potentiellement infectieux et de préparations chimiques classées comme dangereuses pour prévenir les accidents aux conséquences potentiellement graves pour l'utilisateur et les autres personnes.

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

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

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

Un résultat négatif obtenu avec ce produit indique que l'ADN cible n'a pas été détecté dans l'ADN extrait de l'échantillon ; toutefois, il n'est pas possible d'exclure le fait que de l'ADN cible soit présent à une concentration de titrage inférieur à la limite de détection du produit (se reporter à la section « Caractéristiques de performance »). Dans ce cas, le résultat pourrait être un faux négatif.

Les résultats obtenus avec ce produit peuvent parfois être non valides en raison d'un échec du Contrôle Interne. Dans ce cas, l'échantillon doit être testé à nouveau, en commençant par l'extraction, ce qui peut entraîner des retards d'obtention des résultats finaux.

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

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

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

PROBLÈMES ET SOLUTIONS

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

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

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

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

Erreur TH, Erreur SDM, Erreur Ct	
Causes possibles	Solutions
Forme anormale de la courbe de l'échantillon.	En cas d'observation d'une amplification significative sur la courbe de PCR : - répéter l'amplification de l'échantillon élué avec une dilution à 1:10 dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, lors d'une session d'analyse « PCR Only » (PCR uniquement), ou - répéter l'extraction de l'échantillon primaire avec une dilution à 1:10 dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, lors d'une session d'analyse « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

LÉGENDE DES SYMBOLES

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

NOTE POUR L'ACQUÉREUR : LICENCE LIMITÉE

Ce produit contient des réactifs fabriqués par Thermo Fisher Scientific et commercialisés selon des accords de licence entre ELITechGroup S.p.A. et ses filiales et Thermo Fisher Scientific. Le prix d'achat de ce produit inclut des droits, limités et non transférables, qui permettent d'utiliser uniquement cette quantité du produit dans le seul objectif de satisfaire aux activités de l'acheteur qui sont directement liées à la réalisation de tests diagnostiques chez l'homme. Pour obtenir des informations sur l'achat d'une licence relative à ce produit à des fins autres que celles mentionnées ci-dessus, contacter le Licensing Department, Thermo Fisher Scientific. Email : outlicensing@thermofisher.com.

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

La technologie ELITe InGenius® et ELITe BeGenius® est couverte par des brevets et des demandes en instance.

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



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

Intended use

The HBV ELITe MGB® Kit is a nucleic acid amplification assay for the detection and the quantification of Hepatitis B Virus (HBV) DNA extracted from clinical specimens.

The assay is able to detect the DNA of HBV belonging to genotypes A, B, C, D, E, F, G, H, I and RF.

The assay is validated in association with "ELITe InGenius®" and "ELITe BeGenius®" systems starting from human plasma collected in EDTA or in ACD and serum samples.

The product is intended for use as an aid in managing of HBV-infected individuals undergoing antiviral therapy. The results must be interpreted in combination with all relevant clinical observations and laboratory results.

This product is not intended for use as a screening test for the presence of HBV in blood or blood products or as a diagnostic test to confirm the presence of HBV infection.

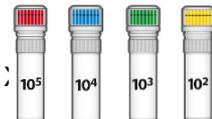
Amplified sequence

Sequence	Gene	Fluorophore	Channel
Target	HBV polymerase gene (TP domain)	FAM	HBV
Internal Control	IC2	AP525	IC

Validated matrix

- › Plasma EDTA or Plasma ACD
- › Serum

Kit content

HBV ELITe MGB Mix	HBV ELITe Standard	HBV Internal Control	HBV - ELITe Positive Control
 X 8		 X 8	 X 2
Ready-to-use PCR Mix 8 tubes of 280 µL 96 reactions per kit 7 freeze-thaw cycles	Ready-to-use 4 levels: 10 ⁵ , 10 ⁴ , 10 ³ , 10 ² 1 set of 4 tubes of 160 µL 2 freeze-thaw cycles	Ready-to-use IC 8 tubes of 160 µL 96 reactions per kit 12 freeze-thaw cycles	Ready-to-use PC 2 tubes of 160 µL 8 reactions per kit 4 freeze-thaw cycles

Maximum shelf-life: **24 months**

Storage Temperature: **-20 °C**

Material required not provided in the kit

- › ELITe InGenius instrument: INT030
- › ELITe InGenius SP 200 Extraction Cartridge: INT032SP200
- › ELITe InGenius PCR Cassette: INT035PCR
- › ELITe InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS
- › ELITe InGenius Waste Box: F2102-000
- › Filter Tips 300: TF-350-L-R-S
- › 1000 µL Filter Tips Tecan : 30180118

ELITe InGenius and ELITe BeGenius protocol

› Sample volume	200 µL	› Unit of quantitative result	International Unit: IU/mL
› HBV CPE volume	10 µL	› Conversion factor to IU	0.24 IU/copy
› Total elution volume	50 µL	› Frequency of controls	15 days
› PCR elution input volume	20 µL	› Frequency of calibration	60 days
› HBV PCR Mix volume	20 µL		

ELITe InGenius and ELITe BeGenius Performance

Matrix	Limit of Detection	Method Correlation	Diagnostic Specificity
Plasma / Serum	9 IU / mL 38 copies / mL	R² = 0.974 131 quantified samples	97.6% 124 confirmed samples / 127 tested samples

reference methods:

"cobas® HBV for use on the 4800 Systems" and

"cobas® HBV for use on the 6800 Systems", Roche Diagnostics.

Sample preparation

Plasma samples collected in EDTA or ACD and Serum samples must be identified according to laboratory guidelines, transported and stored at room temperature (~+25 °C) for a maximum of three days or at +2 / +8 °C for a maximum of five days. Otherwise, they must be frozen and stored at ~-20 °C for a maximum of one month or at ~-70 °C for six months. Do not use Plasma collected in heparin in order to prevent inhibition of amplification reaction and frequent invalid results.

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 modes are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

1. Switch on ELITE InGenius. Log in with username and password. Select the mode "Closed".	2. Verify calibrators: HBV Q-PCR Standard in the "Calibration" menu. Verify controls: HBV Positive Control and HBV Negative Control in the "Controls" menu. <i>Note:</i> Both must have been run, approved and not expired.	3. Thaw the HBV PCR Mix and the HBV CPE 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", elution: "50 µL"	3. Scan the sample barcodes with handheld barcode reader or type the sample ID
4. Select the "Assay protocol" of interest: HBV ELITE_PL_200_50, HBV ELITE_Se_200_50	5. Select the method "Extract + PCR" and the sample position: Extraction Tube	6. Load the PCR Mix and the Internal Control in the inventory block
7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip Cassette, Extraction Tube racks	8. Close the door Start the run	9. View, approve and store the results

Procedure 2 - PCR only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above	5. Select the method "PCR only" and set the sample position "Elution Tube"	6. Load the PCR Mix in the inventory block
7. Load: PCR cassette rack and the Elution tube rack with the extracted nucleic acid	8. Close the door Start the run	9. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above	5. Select the method "Extraction Only" and set the sample position: Extraction Tube	6. Load the Internal Control in the inventory block
7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, Extraction Tube 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 the steps: extraction, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

1. Switch on ELiTe BeGenius. Log in with username and password. Select the mode "Closed".
2. Verify calibrators: **HBV Q-PCR Standard** in the "Calibration" menu. Verify controls: **HBV Positive Control** and **HBV Negative Control** in the "Controls" menu. *Note: Both must have been run, approved and not expired.*
3. Thaw the **HBV PCR Mix** and the **HBV CPE tubes**. Vortex gently. Spin down 5 sec.

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode «Extraction and PCR»



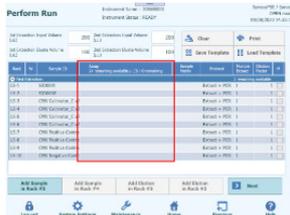
2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the cooling area. The barcode scan is already active



3. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Eluate: "50 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 Control in Reagent Rack and insert it in the cooling area



6. Load the PCR-Mix and the CPE Internal Control in Reagent Rack and insert it in the cooling area



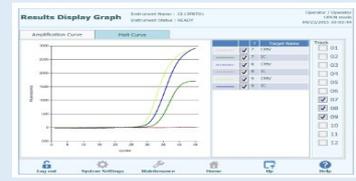
7. Load: Filter Tips, Extraction rack, and PCR rack



8. Close the door. Start the run



9. View, approve and store the results



Procedure 2 - PCR only

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