



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 22/12/2022

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«EBV ELITe MGB Kit» Ref. RTS020PLD

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

- *Description of IC cut off value already adopted in the Assay protocol of the product (section “Diagnostic specificity: confirmation of negative samples”)*

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



EBV ELITE MGB® Kit

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

REF RTS020PLD



TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|---------|
| APPLICATION | Page 2 |
| PRINCIPE DU TEST | Page 2 |
| DESCRIPTION DU PRODUIT | Page 3 |
| MATÉRIEL FOURNI | Page 3 |
| MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI | Page 3 |
| AUTRES PRODUITS REQUIS | Page 3 |
| AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS | Page 5 |
| ELITE INGENIUS® ET ELITE BEGENIUS® | Page 7 |
| ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES | Page 7 |
| PROCÉDURE ELITE INGENIUS® | Page 8 |
| PROCÉDURE ELITE BEGENIUS® | Page 16 |
| CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES ELITE INGENIUS® ET ELITE BEGENIUS® | Page 21 |
| ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ABI 7300 Real-Time System | Page 35 |
| ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES | Page 35 |
| PROCÉDURE | Page 37 |
| CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES | Page 47 |
| Roche cobas z 480 analyzer | Page 58 |
| ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES | Page 58 |
| PROCÉDURE | Page 59 |
| CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES | Page 64 |
| BIBLIOGRAPHIE | Page 69 |
| LIMITES DE LA PROCÉDURE | Page 70 |
| PROBLÈMES ET SOLUTIONS | Page 71 |
| LÉGENDE DES SYMBOLES | Page 73 |
| NOTE POUR L'ACQUEREUR: LICENCE LIMITEE | Page 74 |

EBV ELITE MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

APPLICATION

Le produit «EBV ELITE MGB® Kit» est un test qualitatif et quantitatif d'amplification des acides nucléiques pour la **détection et le dosage de l'ADN de l'herpèsvirus humain d'Epstein-Barr (EBV)** à partir d'ADN extraits de sang total prélevé dans un tube EDTA, plasma prélevé dans un tube EDTA et dans liquide céphalo-rachidien (LCR).

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

PRINCIPE DU TEST

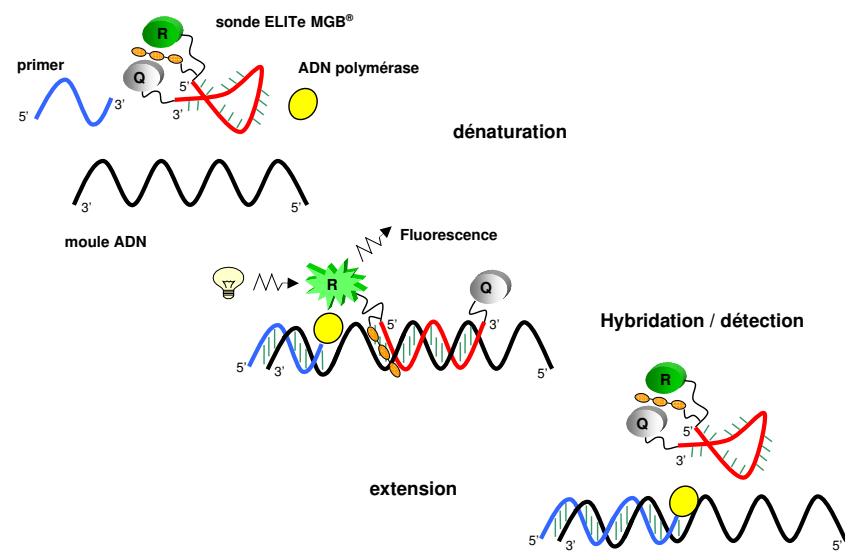
Le test est basé sur une réaction d'amplification en temps réel sur microplaque avec un thermostat programmable doté d'un système optique de détection de la fluorescence.

Dans chaque puits deux réactions d'amplification sont réalisées à partir de l'ADN extrait des échantillons à étudier: une réaction spécifique à la région du gène codant la protéine **EBNA-1** d'EBV et une spécifique à la région du gène humain codant pour la **β-globine** (contrôle interne d'inhibition). Toutes les sondes sont fabriquées avec la technologie ELITE MGB®. La sonde spécifique à l'EBV est marquée avec le fluorophore FAM est elle est activée lorsqu'elle s'hybride avec le produit spécifique de la réaction d'amplification d'EBV. La sonde spécifique au Contrôle interne est marquée avec le fluorophore AP525 (un analogue à VIC) et elle est activée lorsqu'elle s'hybride avec le produit de la réaction d'amplification du contrôle interne. L'émission de la fluorescence augmente au fur et à mesure qu'augmentent les produits spécifiques de la réaction d'amplification et elle est mesurée et enregistrée par l'instrument. Le traitement des données permet de détecter la présence et de mesurer la quantité d'ADN d'EBV contenue dans l'échantillon initial.

Au terme de la session il est possible d'analyser la courbe de dissociation (melting curve) afin de déterminer la température de dissociation (melting temperature). La température de dissociation permet de confirmer la présence de la bonne cible, ou d'identifier des mutations.

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

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



EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

DESCRIPTION DU PRODUIT

L'«**EBV ELITe MGB® Kit**» contient le mélange "EBV Q - PCR Mix" pour l'amplification en temps réel. Ce mélange est complet, **prêt à l'emploi**, stabilisé dans une solution stabilisante et **pré-aliquotée en quatre tubes**. Chaque tube contient **540 µL** de solution, une quantité suffisante pour **24 tests** en association aux systèmes «**ELITe InGenius®**» et «**ELITe BeGenius®**» ou **25 tests** en association à d'autres systèmes.

Les amorces et la sonde pour l'EBV (stabilisée par le groupe MGB®, marquée avec le fluorophore FAM et inactivée par le quencher non fluorescent) sont spécifiques de la région du gène codant la protéine **EBNA-1** d'EBV.

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

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

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

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

MATÉRIEL FOURNI

| Composant | Description | Quantité | Classification des dangers |
|-----------------|-----------------------------|------------|----------------------------|
| EBV Q - PCR Mix | mélange complet de réaction | 4 x 540 µL | - |

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Hotte à flux laminaire.
- Gants sans poudre, jetables en nitrile ou équivalent.
- Vortex.
- Microcentrifugeuse de paillasse (12.000 - 14.000 Tr/min).
- Micro pipettes et embouts stériles avec filtre pour aérosol ou à distribution positive (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Eau ultra pure pour la biologie.
- Thermostat programmable couplé à un système optique de détection de la fluorescence, 7300 Real Time PCR System ou 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, calibré conformément aux recommandations du fabricant.
- Thermostat programmable couplé à un système optique de détection de la fluorescence cobas z 480 analyzer calibré conformément aux recommandations du fabricant.

AUTRES PRODUITS REQUIS

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

Pour l'extraction manuelle d'ADN des échantillons à analyser, il est conseillé d'utiliser des produits génériques «**EXTRAblood**», kit d'extraction d'ADN d'échantillons cellulaires et non-cellulaires (ELITechGroup S.p.A., code EXTB01) ou «**EXTRAgen**», kit d'extraction d'acides nucléiques d'échantillons non-cellulaires, (ELITechGroup S.p.A.; code EXTG01).

EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

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

Pour l'extraction automatique de l'ADN, l'amplification real time et l'interprétation des résultats des échantillons des échantillons à analyser, sont nécessaires l'automate «**ELITe InGenius**» (ELITechGroup S.p.A., code INT030), et des Assay protocoles spécifiques suivant (ELITechGroup S.p.A.):

pour le calibrateur «**EBV ELITe STD**» ou «**EBV ELITe STD_1000_100**»,

pour le contrôle positif de l'amplification «**EBV ELITe PC**» ou «**EBV ELITe PC_1000_100**»,

pour le contrôle négatif de l'amplification «**EBV ELITe NC**» ou «**EBV ELITe NC_1000_100**»,

pour le échantillons à analyser «**EBV ELITe WB_200_100**», «**EBV ELITe PL_200_100**» ou «**EBV ELITe PL_1000_1000**»..

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

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

- pour les calibrateurs «**EBV ELITe Be STD**»,

- pour le contrôle positif d'amplification «**EBV ELITe Be PC**»,

- pour le contrôle négatif d'amplification «**EBV ELITe Be NC**»,

- pour l'analyse des échantillons «**EBV ELITe Be WB_200_100**» et «**EBV ELITe Be PL_200_100**».

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

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

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

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

Pour l'extraction automatique de l'ADN des échantillons à analyser, il est conseillé d'utiliser le produit «**Magna Pure 24 Total NA Isolation Kit**» (Roche, réf. 07658036001), kit d'extraction des acides nucléiques d'échantillons biologiques, à l'aide de l'instrument «**Magna Pure 24 System**» (Roche, réf. 07290519001).

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

EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

Avec un instrument 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, il est conseillé d'utiliser le produit générique «**Q - PCR Microplates Fast**» (ELITechGroup S.p.A., code RTSACCO2) contenant des microplaques de 0,1 mL et des films adhésifs, pour l'amplification en temps réel.

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

S'il est nécessaire de procéder à la révélation d'ADN d'EBV (analyse qualitative), il est conseillé d'utiliser le produit «**EBV - ELITe Positive Control**» ou le produit «**EBV - ELITe Positive Control RF**» (ELITechGroup S.p.A., code CTR020PLD-R), contrôle positif d'ADN plasmidique (ELITechGroup S.p.A., code CTR020PLD).

S'il est nécessaire de procéder à la révélation et à la quantification d'ADN d'EBV (analyse quantitative), il est conseillé d'utiliser le produit «**EBV ELITe Standard**» (ELITechGroup S.p.A., code STD020PLD), quatre dilutions d'ADN plasmidique de titre connu pour obtenir la courbe standard.

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

Un facteur de conversion permet d'exprimer les résultats quantitatifs en Unités Internationales d'EBV du "1st WHO International Standard for Human Epstein Barr Virus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC, Royaume Uni, code 09/260).

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Ce produit est destiné à l'usage *in vitro* uniquement.

Avertissements et précautions

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

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

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

Ne jamais pipeter les solutions à la bouche.

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

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

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

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

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

Respecter la date de péremption du produit.

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

Ne pas utiliser des réactifs provenant de lots différents.

Ne pas utiliser de réactifs d'autres fabricants.

Avertissements et précautions à adopter en biologie moléculaire

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

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

EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

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

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

Les produits d'extraction ne doivent être manipulés de manière à réduire au maximum la dispersion dans l'environnement afin d'éviter toute possibilité de contamination. Les pipettes utilisées pour manipuler les échantillons doivent être exclusivement destinées à cet usage spécifique. Les pipettes doivent être du type à distribution positive ou utiliser des embouts à filtre pour aérosol. Les embouts utilisés doivent être stériles, dépourvus de DNase et RNase, d'ADN et d'ARN.

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

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

Avertissements et précautions concernant les composants

La **EBV Q - PCR Mix** doit être conservée à l'abri de la lumière et à une température de -20° C.

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

ELITe InGenius® et ELITe BeGenius

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES

Échantillons

Ce produit doit être utilisé avec des échantillons cliniques suivants:

Sang total prélevé dans un tube EDTA

Les échantillons de sang total destinés à l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés dans un tube EDTA et suivant les indications du laboratoire. Ils doivent être transportés à +2°C / +8°C et conservés à +2°C / +8°C pendant un maximum de trois jours. Autrement, ils doivent être congelés et conservés à -20°C pendant un maximum de trente jours ou à -70°C pendant une période plus longue.

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

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN à partir de sang total avec **ELITe InGenius®** et l'**ELITe InGenius® Software version 1.3** (ou version suivante), suivre le protocole d'extraction **EBV ELITe_WB_200_100**. Ce protocole utilise 200 µL d'échantillon, en présence de **CPE** à 10 µL / extraction et élution des acides nucléiques dans 100 µL.

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

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

Plasma prélevé sur EDTA

Les échantillons de plasma destinés à l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés sur EDTA suivant les indications du laboratoire. Ils doivent être transportés à +2°C / +8°C et conservés à +2°C / +8°C pendant un maximum de trois jours. Autrement, ils doivent être congelés et conservés à -20°C pendant un maximum de trente jours. En cas de stockage pendant une période plus longue, ils doivent être congelés à -70°C.

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

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN à partir de sang total avec **ELITe InGenius** et l'**ELITe InGenius Software version 1.3** (ou version suivante), suivre le protocole d'extraction **EBV ELITe_PL_200_100**. Ce protocole utilise 200 µL d'échantillon, en présence de **CPE** à 10 µL / extraction et élution des acides nucléiques dans 100 µL.

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

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

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN à partir de sang total avec **ELITe InGenius** et l'**ELITe InGenius Software version 1.3** (ou version suivante), suivre le protocole d'extraction **EBV ELITe_PL_1000_100**. Ce protocole utilise 1000 µL d'échantillon, en présence de **CPE** à 10 µL / extraction et élution des acides nucléiques dans 100 µL.

Le tuyau primaire ne peut pas être utilisé en association avec le protocole de test EBV ELITe_PL_1000_100

Substances interférentes

Les données disponibles concernant l'inhibition causée par des médicaments et autres substances sont rapportées dans le paragraphe "Substances interférentes potentielles" du chapitre "Caractéristiques de performance".

Ne pas utiliser de sang total ou de plasma collecté dans de l'héparine afin d'éviter l'inhibition de la réaction d'amplification et de fréquents résultats invalides.

Contrôles et calibrateurs d'amplification

Avant chaque analyse d'échantillon, il est absolument obligatoire pour générer et approuver la courbe de calibration et les contrôles d'amplification pour chaque lot de réactif d'amplification :

comme calibrateurs, utilisez les quatre niveaux de concentration de **EBV ELITe Standard**, en association avec le protocole «**EBV ELITe_STD**» ou «**EBV ELITe_STD_1000_100**» pour **ELITe InGenius**, et «**EBV ELITe_Be_STD**» pour **ELITe BeGenius**,

comme contrôle positif, utiliser le produit «**EBV - ELITe Positive Control**», en association avec le protocole «**EBV ELITe_PC**» ou «**EBV ELITe_PC_1000_100**» pour **ELITe InGenius**, et «**EBV ELITe_Be_PC**» pour **ELITe BeGenius**,

comme contrôle négatif, utiliser de l'eau ultra pure pour la biologie (non incluse dans le produit), en association avec le protocole «**EBV ELITe_NC**» ou «**EBV ELITe_NC_1000_100**» pour **ELITe InGenius**, et «**EBV ELITe_Be_NC**» pour **ELITe BeGenius**.

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

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

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

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

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

Contrôles de la qualité

Les contrôles extérieurs doivent être utilisés dans le respect de la législation locale ou nationale et des organismes d'accréditation fédéraux. Des exemples de contrôles externes disponibles dans le commerce sont le "EBV Molecular Q Panel" (code EBVMQP01 de Qnostics Ltd, Royaume-Uni) et le "AcroMetrix® EBVtc Panel" (Acrometrix, Life Technologies; États-Unis).

PROCÉDURE ELITe InGenius®

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

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

Vérification du système

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

- allumer l'automate **ELITe InGenius** et sélectionner le mode **FERME**;
- vérifier (calibration) que les calibrateurs (Calibration-**EBV Q-PCR Standard**) sont exécutés, approuvés et qu'ils ne sont pas expirés (statuts). Ce contrôle peut être effectué à partir du menu "Calibration" dans la page d'accueil;
- vérifier (Controls) que les contrôles d'amplification (Controls - **EBV Positive Control**, **EBV Negative Control**) sont exécutés, approuvés et qu'ils ne sont pas expirés (statuts). Ce contrôle peut être effectué à partir du menu "Contrôle" dans la page d'accueil;

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

REF RTS020PLD

- choisir le type d'analyse et la mettre en œuvre en suivant les instructions des protocoles des tests fournis par ELITechGroup. Ces protocoles IVD ont été validés de façon spécifique avec les kits ELITe MGB et l'automate ELITe InGenius, spécifiques à chaque matrice.

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

| Protocole du test pour le kit «EBV ELITe MGB® Kit» | | | |
|--|------------|--------------------|---|
| Nom | Matrice | Unité | Caractéristiques |
| EBV ELITe_WB_200_100 | Sang total | copies/mL ou UI/mL | Volume d'extraction initial: 200 µL Volume de l'éluat: 100 µL Contrôle interne: 10 µL Sonication: NO Facteur de dilution:1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume d'éluat utilisé pour la PCR: 20 µL |
| EBV ELITe_PL_200_100 | Sang total | copies/mL ou UI/mL | Volume d'extraction initial: 200 µL Volume de l'éluat: 100 µL Contrôle interne: 10 µL Sonication: NO Facteur de dilution:1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume d'éluat utilisé pour la PCR: 20 µL |
| EBV ELITe_PL_1000_100 | Plasma | copies/mL ou UI/mL | Volume d'extraction initial: 1000 µL Volume de l'éluat: 100 µL Contrôle interne: 10 µL Sonication: NO Facteur de dilution:1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume d'éluat utilisé pour la PCR: 20 µL |

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

Les protocoles d'analyses qualitatives sont disponibles sur demande.

Configuration de l'étape

Le kit **EBV ELITe MGB Kit** associé à l'automate **ELITe InGenius** peut être utilisé pour effectuer :

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

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

Remarque: le système ELITe InGenius peut être connecté au «Laboratory Information Server» (LIS) via lequel il est possible d'envoyer les informations de configuration de session. Pour des informations détaillées, reportez-vous au manuel d'instructions de l'instrument.

Les principales étapes de configuration des cinq types de cycles sont décrites ci-dessous.

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

REF RTS020PLD

A Cycle complet

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

- Décongeler une quantité de tubes d'EBV Q - PCR Mix suffisante pour le cycle. Chaque tube permet la préparation de 24 réactions lors de l'exécution de 2 cycles de 12 échantillons chacun. Mélanger délicatement le contenu et centrifuger pendant 5 secondes.
- Décongeler une quantité de tubes de CPE suffisante pour le cycle. Chaque tube permet la préparation de 12 extractions. Mélanger délicatement le contenu et centrifuger pendant 5 secondes.
- Sélectionner "Perform Run" dans la page d'accueil.
- Vérifier que le volume d'extraction initial est de 200 µL et le volume de l'éluat de 100 µL.
- Pour chaque trace à réaliser, renseigner le "SampleID" (SID) en saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.
- Sélectionner le protocole du test à utiliser dans la colonne "Assay" (par exemple EBV ELITe_WB_200_100).
- Vérifier que le Protocole affiché soit: "Extract + PCR".
- Sélectionner la position de chargement de l'échantillon dans la colonne "Sample Position" : en cas d'utilisation d'un tube primaire, sélectionner "Primary Tube"; en cas d'utilisation d'un tube secondaire, sélectionner "Sonication Tube". Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger le CPE et l' EBV Q-PCR Mix dans le gestionnaire des réactifs sélectionné en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger / contrôler les racks d'embouts dans la zone sélectionnée en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger les échantillons à extraire dans la position indiquée au point 8, ainsi que les cartouches d'extraction et les cassettes de PCR outre tous les consommables, en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Fermer le volet de l'automate.
- Appuyer sur "Start" pour lancer la course.

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

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

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

Remarque: Le mélange PCR peut être stocké dans le bloc réfrigéré jusqu'à **16 heures** au total (maximum 5 sessions ou 1 session de nuit suivie d'une seule configuration).

B Cycle d'amplification

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

1. Décongeler une quantité de tubes d' EBV Q - PCR Mix suffisante pour réaliser le cycle. Chaque tube permet la préparation de 24 réactions lors de l'exécution de 2 cycles de 12 échantillons chacun. Mélanger délicatement le contenu et centrifuger pendant 5 secondes.
2. Sélectionner "Perform Run" dans la page d'accueil.
3. Vérifier que le volume d'extraction initial soit de 200 µL et le volume de l'éluat de 100 µL.
4. Pour chaque trace à réaliser, renseigner le "SampleID" (SID) en saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.
5. Sélectionner le protocole du test à utiliser dans la colonne "Assay" (par exemple EBV ELITe_WB_200_100).
6. Sélectionner "PCR only" dans la colonne "Protocol".
7. Contrôler que la position de chargement de l'échantillon élué dans la colonne "Sample Position" soit "Elution Tube" (bottom row)". Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
8. Charger l' EBV Q-PCR Mix dans le gestionnaire de réactifs sélectionné en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
9. Charger et contrôler les racks d'embouts dans la zone sélectionnée en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
10. Charger les échantillons des acides nucléiques extraits et la cassette PCR, en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
11. Fermer la porte de l'automate.
12. Appuyer sur "Start" pour lancer le cycle.

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

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

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

Remarque: Le mélange PCR peut être stocké dans le bloc réfrigéré jusqu'à **16 heures** au total (maximum 5 sessions ou 1 session de nuit suivie d'une seule configuration).

C Cycle de calibration

Pour configurer le cycle de calibration, suivre les indications de l'interface graphique ci-après :

1. Décongeler une quantité de tubes d' EBV Q - PCR Mix suffisante pour réaliser le cycle. Chaque tube permet de préparer 24 réactions en effectuant deux cycles de 12 échantillons chacun. Mélanger délicatement le contenu et centrifuger pendant 5 secondes.
2. Décongeler les tubes de EBV ELITe Standard (Cal1: EBV Q-PCR Standards 10², Cal2: EBV Q-PCR Standards 10³, Cal3: EBV Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: EBV Q-PCR Standards 10⁵). Chaque tube permet la préparation de 8 cycles. Mélanger délicatement le contenu et centrifuger pendant 5 secondes.
3. Sélectionner "Perform Run" dans la page d'accueil.
4. Vérifier que le volume d'extraction initial soit de 200 µL et le volume de l'éluat de 100 µL.
5. A partir de la trace à réaliser, sélectionner le protocole de dosage à utiliser dans la colonne "Assay" (EBV ELITe_STD) et indiquer le numéro du lot et la date d'expiration pour la Q - PCR standard. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
6. Charger l' EBV Q-PCR Mix dans le gestionnaire de réactifs sélectionné en suivant les instructions de l'interface graphique. Si nécessaire, se reporter au Manuel d'Utilisation de l'automate pour configurer le gestionnaire des réactifs. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
7. Charger / contrôler les racks d'embouts dans la zone sélectionnée en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
8. Charger les tubes de calibration et la cassette PCR en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
9. Fermer la porte de l'automate.
10. Appuyer sur "Start" pour lancer le cycle.

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

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

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

Remarque: Le mélange PCR peut être stocké dans le bloc réfrigéré jusqu'à **16 heures** au total (maximum 5 sessions ou 1 session de nuit suivie d'une seule configuration).

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

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

- Décongeler une quantité de tubes d' EBV Q - PCR Mix suffisante pour le cycle. Chaque tube permet de préparer 24 réactions en effectuant deux cycles de 12 échantillons chacun. Mélanger délicatement le contenu et centrifuger pendant 5 secondes.
- Décongeler le produit EBV ELITe Positive Control pour l'amplification du Contrôle Positif. Décongeler un tube à température ambiante. Chaque tube permet la préparation de 4 cycles. Mélanger délicatement le contenu et centrifuger pendant 5 secondes.
- Transférer l'eau ultra pure nécessaire aux cycles dans un tube d'éluion fourni avec ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
- Sélectionner "Perform Run" dans la page d'accueil.
- À partir de l'interface graphique, sélectionner le protocole de dosage à utiliser dans la colonne "Assay".
- Sélectionner EBV ELITe_PC o EBV ELITe_PC_1000_100 pour le contrôle positif et indiquer le numéro de lot et la date d'expiration pour - Positive Control (Contrôle positif),
- Sélectionner EBV ELITe_NC o EBV ELITe_NC_1000_100 et indiquer le numéro de lot et la date d'expiration pour le Contrôle négatif.
- Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger l' EBV Q-PCR Mix dans le gestionnaire des réactifs sélectionné en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger / contrôler les racks d'embouts dans la zone sélectionnée en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger la cassette PCR, le Contrôle Positif et le Contrôle Négatif en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Fermer la porte de l'automate.
- Appuyer sur "Start" pour lancer le cycle.

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

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

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

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

Remarque: Le mélange PCR peut être stocké dans le bloc réfrigéré jusqu'à **16 heures** au total (maximum 5 sessions ou 1 session de nuit suivie d'une seule configuration).

Évaluation et approbation des résultats

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

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

ELITe InGenius génère les résultats avec le EBV ELITe MGB Kit, en suivant cette procédure:

- Validation de la calibration
- Validation des résultats d'amplification du Contrôle Positif et Contrôle Négatif
- Validation résultats de l'échantillon
- Élaboration du compte-rendu des résultats de l'échantillon

A. Validation de la courbe de calibration

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

La courbe de calibration, spécifique au lot du réactif d'amplification, est mémorisée dans la base de données et peut être visualisée et approuvée par le personnel qualifié comme "Administrateur" ou "Analyste", suivant les instructions de l'interface graphique. La courbe de calibration, spécifique au lot du réactif d'amplification, expirera après 60 jours.

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

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

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

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

Les signaux de fluorescence émis par la sonde spécifique pour EBV ("EBV"), dans les réactions d'amplification du Contrôle Positif et Contrôle Négatif sont automatiquement analysés et interprétés par le logiciel de l'automate compte tenu des paramètres du protocole du test "EBV ELITe_PC" o "EBV ELITe_PC_1000_100" e "EBV ELITe_NC" o "EBV ELITe_PC_1000_100".

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

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

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

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

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

C. Validation des résultats de l'échantillon

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

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

Les résultats sont décrits dans les rapports générés par l'automate ("Sample Report" et "Track Report".)

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

| | |
|---------------------------------|---------------|
| 1) Courbe de calibration | Statut |
| EBV Q-PCR Standard | APPROVED |
| 2) Contrôle Positif | Statut |
| EBV Positive Control | APPROVED |
| 3) Contrôle Négatif | Statut |
| EBV Negative Control | APPROVED |

Pour chaque échantillon, le calcul de la charge virale est effectué en automatique par le système. Comme défini dans le protocole du test, la mesure est exprimée en "copies / mL" ou "IU / mL".

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

| Résultat du cycle de l'échantillon | Interprétation |
|---|---|
| EBV: DNA Detected, quantity equal to XXX copies / mL or IU / mL | ADN d'EBV détecté s'inscrit dans l'intervalle de mesure du test, quantité comme indiqué. |
| EBV: DNA Detected, quantity below LLoQ copies / mL or IU / mL | ADN d'EBV détecté inférieur au seuil inférieur de quantification du test |
| EBV: DNA Detected, quantity beyond ULoQ copies / mL or IU / mL | ADN d'EBV détecté supérieur au seuil supérieur de quantification du test |
| EBV: DNA Not Detected or below LoD copies / mL or IU / mL | ADN d'EBV non détecté ou inférieur au seuil de détection du test |
| Invalid - Retest Sample | Résultat du test non valide suite à une erreur du contrôle interne |

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

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

Les échantillons utilisés dans lesquels il n'a pas été possible de détecter l'ADN du EBV sont interprétés comme: "EBV: DNA Not Detected or below LoD". Dans ce cas, il ne saurait être exclu que l'ADN de EBV a un titre inférieur à la limite de détection du test (voir «Caractéristiques de performance»).

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

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

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

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

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

Le "Track Report" montre les détails d'une analyse pour une position définie.

PROCÉDURE ELITe BeGenius®

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

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

Vérification du système

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

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

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

| Protocole du test pour le kit «EBV ELITe MGB® Kit» et ELITe BeGenius | | | |
|--|------------|--------------------|--|
| Nom | Matrice | Unité | Caractéristiques |
| EBV ELITe_Be_WB_200_100 | Sang total | copies/mL ou UI/mL | Volume d'extraction initial: 200 µL Volume de l'éluat: 100 µL Contrôle interne: 10 µL Facteur de dilution:1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume d'éluat utilisé pour la PCR: 20 µL |
| EBV ELITe_Be_PL_200_100 | Plasma | copies/mL ou UI/mL | Volume d'extraction initial: 200 µL Volume de l'éluat: 100 µL Contrôle interne: 10 µL Facteur de dilution:1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume d'éluat utilisé pour la PCR: 20 µL |

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

Les protocoles d'analyses qualitatives sont disponibles sur demande.

Paramétrage de la session

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

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

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

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

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

A. Analyse d'échantillons

Pour paramétrer l'analyse intégrée, effectuer les étapes suivantes comme indiqué par la **GUI** :

- Décongeler des tubes de mélange EBV Q - PCR Mix en nombre suffisant pour la session. Chaque nouveau tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions de consommation de réactif optimales. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
- Décongeler des tubes de CPE en nombre suffisant pour la session. Chaque nouveau tube permet d'effectuer 12 extractions. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
- Sélectionner « Exécuter l'analyse » (Perform Run) dans l'écran « Accueil » (Home).
- Retirer les portoirs de l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit) et les placer sur la table de préparation.
- Sélectionner le « mode d'analyse » (run mode) : « Extraction + PCR » (Extract + PCR).
- Charger les échantillons dans la zone de refroidissement en commençant par le portoir d'échantillons L5.

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

Remarque : Si des tubes secondaires sont chargés, les marquer « Tube de 2 ml ». Si les tubes secondaires ne portent pas de codes-barres, saisir manuellement l'ID de l'échantillon.

- Vérifier le volume d'extraction initial (Extraction Input Volume ; 200 µl) et le volume d'éluat extrait (Extracted Elute Volume ; 100 µl).
- Sélectionner le protocole d'analyse à utiliser dans la colonne « Analyse » (Assay) (c'est-à-dire EBV ELITe_Be_WB_200_100). Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Si une deuxième extraction est exécutée, répéter les étapes 6 à 9 en utilisant les portoirs d'échantillons L4.
- Charger les tubes d'éluat à codes-barres dans la zone de refroidissement en commençant par le portoir d'éluat L3.

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

- Insérer le portoir d'éluat L3 dans l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit). Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Répéter les étapes 11 et 12 en utilisant le portoir de réactif/éluat L2.
- Charger le CPE et le mélange EBV Q-PCR Mix dans la zone de refroidissement.
- Insérer le portoir de réactif L1 dans l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit). Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la Zone inventaire (Inventory Area) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger le portoir de PCR avec la « Casette PCR » (PCR Cassette) dans la Zone inventaire (Inventory Area) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger le portoir d'extraction avec les cartouches d'extraction « ELITe InGenius SP 200 » et les consommables d'extraction requis en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Fermer le tiroir de l'instrument.
- Appuyer sur « Démarrer » (Start) pour lancer l'analyse.

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

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

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

Remarque : le PCR Mix peut être utilisé pendant 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 avec des échantillons élués, effectuer les étapes suivantes comme indiqué par la **GUI** :

- Décongeler des tubes de mélange EBV Q - PCR Mix en nombre suffisant pour la session. Chaque nouveau tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions de consommation de réactif optimales. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
- Sélectionner « Exécuter l'analyse » (Perform Run) dans l'écran « Accueil » (Home).

3. Retirer les portoirs 1, 2 et 3 de l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit) et les placer sur la table de préparation.
4. Sélectionner le « mode d'analyse » (run mode) : « PCR uniquement » (PCR only).
5. Charger les échantillons dans la zone de refroidissement en commençant par le portoir d'élution L3.
6. Insérer le portoir dans l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit). Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
7. Même si aucune extraction n'est réalisée, vérifier le volume d'extraction initial (Extraction Input Volume ; 200 µl) et le volume d'élution extrait (Extracted Elute Volume ; 100 µl).
8. Sélectionner le protocole d'analyse à utiliser dans la colonne « Analyse » (Assay) (par ex. HHV6 ELITe_Be_WB_200_100). Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
9. Charger le mélange EBV Q-PCR Mix dans la zone de refroidissement.
10. Insérer le portoir dans l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit). Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
11. Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la Zone inventaire (Inventory Area) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
12. Charger le portoir de PCR avec la « Casette PCR » (PCR Cassette) dans la Zone inventaire (Inventory Area) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
13. Fermer le tiroir de l'instrument.
14. Appuyer sur « Démarrer » (Start) pour lancer l'analyse.

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

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

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

Remarque : le PCR Mix peut être utilisé pendant 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

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

1. Décongeler des tubes de mélange EBV Q - PCR Mix en nombre suffisant pour la session. Chaque nouveau tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions de consommation de réactif optimales. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
2. Décongeler les tubes de EBV Q - PCR Standard (Cal1 : EBV Q-PCR Standards 10², Cal2 : EBV Q-PCR Standards 10³, Cal3 : EBV Q-PCR Standards 10⁴, Cal4 : EBV Q-PCR Standards 10⁵). Chaque tube permet d'effectuer 4 sessions. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
3. Sélectionner « Exécuter l'analyse » (Perform Run) dans l'écran « Accueil » (Home).
4. Retirer les portoirs 1, 2 et 3 de l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit) et les placer sur la table de préparation.
5. Sélectionner le « mode d'analyse » (run mode) : « PCR uniquement » (PCR only).
6. Charger les tubes de calibrateur dans le portoir d'élution L3.

7. Sélectionnez le protocole de test à utiliser dans la colonne "Assay" (EBV ELITe_Be_STD). Cliquez sur le bouton "Next" pour continuer la configuration.
8. Charger le mélange EBV Q-PCR Mix dans le portoir de réactif/d'élution L2.
9. Insérer le portoir de réactif/élution L2 dans l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit). Cliquez sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
10. Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la Zone inventaire (Inventory Area) en suivant les instructions de la GUI. Cliquez sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
11. Charger le portoir de PCR avec la « Casette PCR » (PCR Cassette) dans la Zone inventaire (Inventory Area) en suivant les instructions de la GUI. Cliquez sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
12. Fermer le tiroir de l'instrument.
13. Appuyer sur « Démarrer » (Start) pour lancer l'analyse.

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

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

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

Remarque : le PCR Mix peut être utilisé pendant 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 du contrôle positif et du contrôle négatif

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

1. Décongeler des tubes de mélange EBV Q - PCR Mix en nombre suffisant pour la session. Chaque nouveau tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions de consommation de réactif optimales. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
2. Décongeler le produit EBV - ELITe Positive Control, pour l'amplification du contrôle positif. Chaque tube permet d'effectuer 4 sessions. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
3. Transférer au minimum 50 µl d'eau de qualité biologie moléculaire (à titre de contrôle négatif) pour les sessions d'analyse dans un (1) « Tube d'élution » (Elution tube) fourni dans le kit de consommables ELITe InGenius SP Consumable Set.
4. Sélectionner « Exécuter l'analyse » (Perform Run) dans l'écran « Accueil » (Home).
5. Retirer les portoirs 1, 2 et 3 de l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit) et les placer sur la table de préparation.
6. Sélectionner le « mode d'analyse » (run mode) : « PCR uniquement » (PCR only).
7. Charger les tubes de contrôle positif et de contrôle négatif dans le portoir d'élution L3.
8. Sélectionnez le protocole de test à utiliser dans la colonne "Assay" (EBV ELITe_Be_PC et EBV ELITe_Be_NC). Cliquez sur le bouton "Next" pour continuer la configuration.
9. Chargez le mélange Q-PCR EBV dans le portoir de réactif/élution L2.
10. Insérez le rack de réactif/élution L2 dans le "Cooler Unit". Cliquez sur "Suivant" pour continuer la configuration.
11. Chargez et vérifiez les racks d'embouts dans la zone d'inventaire en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquez sur "Next" pour continuer la configuration.

EBV ELITE MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

12. Chargez le PCR Rack avec "Cassette PCR" dans la zone d'inventaire en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquez sur "Next" pour continuer la configuration.
13. Fermer le tiroir de l'instrument.
14. Appuyer sur « Démarrer » (Start) pour lancer l'analyse.

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

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

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

Remarque : le PCR Mix peut être utilisé pendant 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

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

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

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

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

**CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES
ELITE INGENIUS® ET ELITE BEGENIUS®**
Sensibilité analytique: Limite de détection

La sensibilité analytique du test, en tant que Limite de Détection LoD, a été vérifiée en utilisant un panel de dilutions d'EBV dans la concentration limite, associé à des échantillons de sang total et du plasma collectés en EDTA et **ELITE InGenius**. Le panel a été préparé en diluant le "1st WHO International Standard for Epstein-Barr Virus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC code 09/260, Royaume Uni) dans des échantillons de sang total prélevé dans un tube EDTA négatif pour l'ADN d'EBV. Le panel était composé d'au moins six points autour de la concentration limite. Chaque échantillon du panel a été utilisé dans 12 réplifications pour effectuer toute la procédure d'analyse, de préparation de la course, d'extraction, d'amplification en temps réel et d'interprétation des résultats avec le système **ELITE InGenius** et l'amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A. L'analyse statistique a été effectuée par régression Probit. Le seuil de détection a été défini comme concentration à laquelle la probabilité d'atteindre un résultat positif est de 95%.

EBV ELITE MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

| Limite de détection avec ELITE InGenius (UI / mL) | | | | |
|---|------------|-------------------|---------------------------------|-------------------|
| Volume d'échantillon | Matrice | 95% de positivité | Intervalle de confiance de 95 % | |
| | | | valeur inférieure | valeur supérieure |
| 200 µL | sang total | 104 UI / mL | 75 UI / mL | 175 UI / mL |
| | plasma | 124 UI / mL | 77 UI / mL | 290 UI / mL |
| 1000 µL | plasma | 18 UI / mL | 13 UI / mL | 28 UI / mL |

La sensibilité analytique exprimée en copies / ml est calculée en appliquant le facteur de conversion spécifique indiqué à la page 31.

La sensibilité analytique de chaque matrice en copies / ml est indiquée ci-dessous

| Limite de détection avec ELITE InGenius (copies / mL) | | | | |
|---|------------|-------------------|---------------------------------|-------------------|
| Volume d'échantillon | Matrice | 95% de positivité | Intervalle de confiance de 95 % | |
| | | | valeur inférieure | valeur supérieure |
| 200 µL | sang total | 36 copies / mL | 26 copies / mL | 60 copies / mL |
| | plasma | 65 copies / mL | 41 copies / mL | 153 copies / mL |
| 1000 µL | plasma | 11 copies / mL | 8 copies / mL | 18 copies / mL |

La valeur de la LoD a été vérifiée en association avec **ELITE InGenius** et **ELITE BeGenius** en testant 20 répliques de sang total collecté sur EDTA et 20 répliques de plasma collecté sur EDTA, dopées par le matériau de référence certifié EBV (1st WHO International Standard, NIBSC) la concentration revendiquée. La LoD était confirmée si au moins 18 des 20 réplicats généraient un résultat positif conformément à la directive CLSI EP17-A.

Les résultats sont présentés dans les tableaux suivants.

| Limite de détection pour des échantillons de sang total et de plasma avec le système ELITE InGenius | | | | | |
|---|-----------|-------|----|---------|---------|
| Échantillon | LoD | Cible | N | Positif | Négatif |
| Sang total prélevé sur EDTA | 104 UI/ml | EBV | 20 | 20 | 0 |
| Plasma prélevé sur EDTA | 124 UI/ml | EBV | 20 | 20 | 0 |

| Limite de détection pour des échantillons de sang total et de plasma avec le système ELITE InGenius | | | | | |
|---|-----------|-------|----|---------|---------|
| Échantillon | LoD | Cible | N | Positif | Négatif |
| Sang total prélevé sur EDTA | 104 UI/ml | EBV | 20 | 19 | 1 |
| Plasma prélevé sur EDTA | 124 UI/ml | EBV | 20 | 20 | 0 |

La valeur de la LoD pour la cible EBV a été confirmée à 104 UI/ml pour le sang total prélevé sur EDTA, et à 124 UI/ml pour le plasma prélevé sur EDTA.

Plage de mesure linéaire et limites de quantification

La plage de mesure linéaire du kit **ELITE MGB® EBV** utilisé en association avec du sang total et du plasma collectés en EDTA (volume de l'échantillon 200 µL) et **ELITE InGenius** et **ELITE BeGenius** a été vérifiée avec un panel de dilutions EBV. Le panel a été préparé en diluant la "1st WHO International Standard for Epstein-Barr Virus (EBV) for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC code 09/260, United Kingdom dans une matrice négative d'ADN EBV. Le panel était composé de cinq points de dilution (étapes de dilution de 1 log10) de 10⁶ UI / mL à 10² UI / mL. Chaque échantillon du panel a été testé en 3 répétitions. L'analyse des données obtenues, effectuée par régression linéaire, a montré que le test présente une réponse linéaire pour tous les niveaux de dilution.

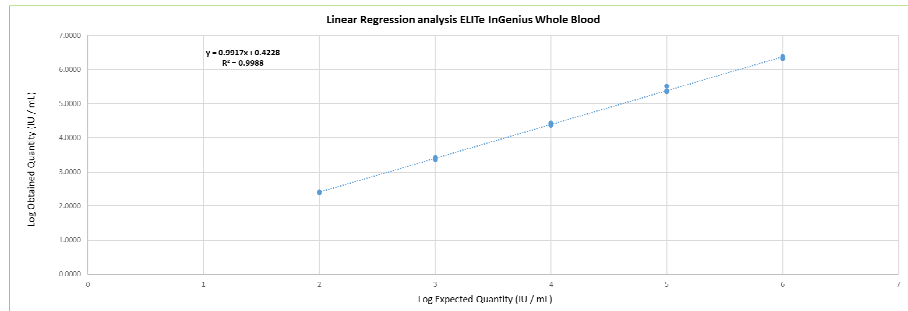
EBV ELITE MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS020PLD

Pour Sang Total:

L'analyse des données obtenues, utilisant une analyse de régression linéaire, a démontré que le test effectué en association avec du Sang Total provenant d'échantillons EDTA, présentait une réponse linéaire pour toutes les dilutions avec un coefficient de corrélation R-carré (R2) de 0,999 pour l'instrument **ELITE InGenius** et de 0,980 pour l'instrument **ELITE BeGenius**.

Les résultats sont présentés dans les tableaux suivants.



La limite inférieure de quantification (LLOQ) a été définie à 104 UI / mL la concentration de la LoD qui génère des résultats quantitatifs précis (écart-type égal à 0,2968 log UI/ml pour l'instrument **ELITE InGenius** et à 0,2486 log UI/ml pour l'instrument **ELITE BeGenius**) et exacts (biais égal à 0,4035 log UI/ml pour l'instrument **ELITE InGenius** et à 0,1329 log UI/ml pour l'instrument **ELITE BeGenius**) :

La limite supérieure de quantification (ULOQ) a été définie à 1,000,001 UI / mL la concentration la plus élevée testée qui génère des résultats quantitatifs précis (écart-type égal à 0,0299 log UI/ml pour l'instrument **ELITE InGenius** et à -0,0079 log UI/ml pour l'instrument **ELITE BeGenius**) et exacts (biais égal à -0,3459 log UI/ml pour l'instrument **ELITE InGenius** et à -0,2311 log UI/ml pour l'instrument **ELITE BeGenius**) :

La plage de mesure linéaire exprimée en copies/ml, pour le sang total prélevé sur EDTA, est calculée en appliquant le facteur de conversion spécifique indiqué à la page 31.

Les résultats finaux sont résumés dans le tableau suivant.

| Plage de mesure linéaire pour les échantillons de sang total et ELITE InGenius et ELITE BeGenius | | | |
|--|-----------------|-------------------|-------------------|
| Volume d'échantillon | Unité de mesure | limite inférieure | limite supérieure |
| 200 µL | IU / mL | 104 | 1,000,001 |
| | copies / mL | 36 | 344,828 |

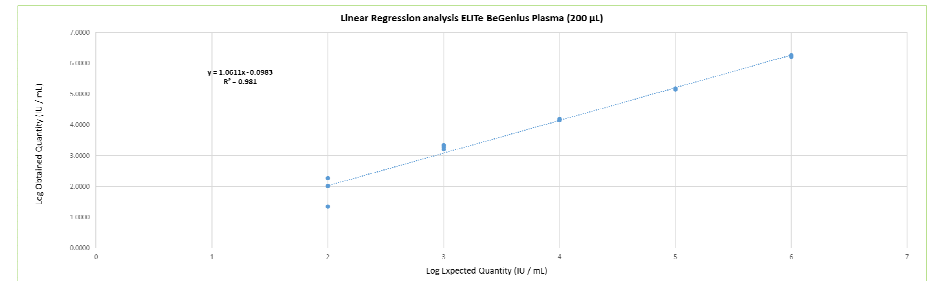
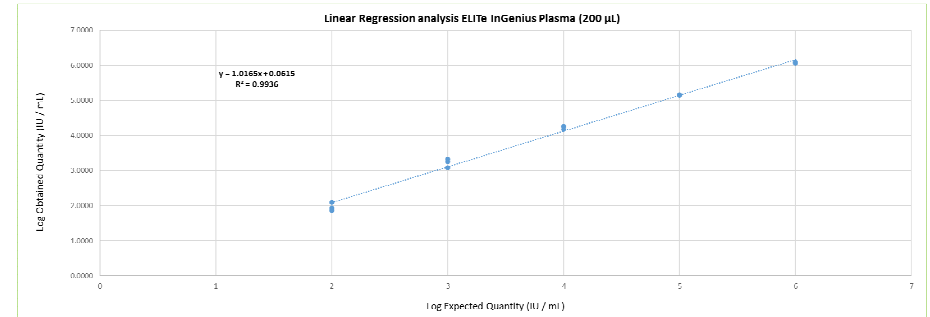
EBV ELITE MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS020PLD

Pour le plasma (volume des échantillons 200 µL):

L'analyse des données obtenues, utilisant une analyse de régression linéaire, a démontré que le test effectué en association avec du plasma provenant d'échantillons EDTA, présentait une réponse linéaire pour toutes les dilutions avec un coefficient de corrélation R-carré (R2) de 0,994 pour l'instrument **ELITE InGenius** et de 0,981 pour l'instrument **ELITE BeGenius**.

Les résultats sont présentés dans les tableaux suivants.



La limite inférieure de quantification (LLOQ) a été définie à la concentration de la LoD qui génère des résultats quantitatifs précis (écart-type égal à 0,2728 log UI/ml pour l'instrument **ELITE InGenius** et à 0,3457 log UI/ml pour l'instrument **ELITE BeGenius**) et exacts (biais égal à -0,556 log UI/ml pour l'instrument **ELITE InGenius** et à 0,1089 log UI/ml pour l'instrument **ELITE BeGenius**) avec une marge de ±0,5 log UI/ml : 124 UI/ml.

La limite supérieure de quantification (ULOQ) a été définie à la concentration la plus élevée qui génère des résultats quantitatifs précis (écart-type égal à 0,0154 log UI/ml pour l'instrument **ELITE InGenius** et à 0,0252 log UI/ml pour l'instrument **ELITE BeGenius**) et exacts (biais égal à 0,0310 log UI/ml pour l'instrument **ELITE InGenius** et à 0,3674 log UI/ml pour l'instrument **ELITE BeGenius**) avec une marge de ±0,5 log UI/ml : 1,000,000 UI/ml.

La plage de mesure linéaire exprimée en copies/ml, pour le plasma prélevé sur 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 et ELITE InGenius et ELITE BeGenius (200 µL) | | |
|---|-------------------|-------------------|
| Unité de mesure | limite inférieure | limite supérieure |
| IU / mL | 124 | 1,000,000 |
| copies / mL | 65 | 526,316 |

Pour le plasma (volume des échantillons 1000 µL):

EBV ELITe MGB® Kit

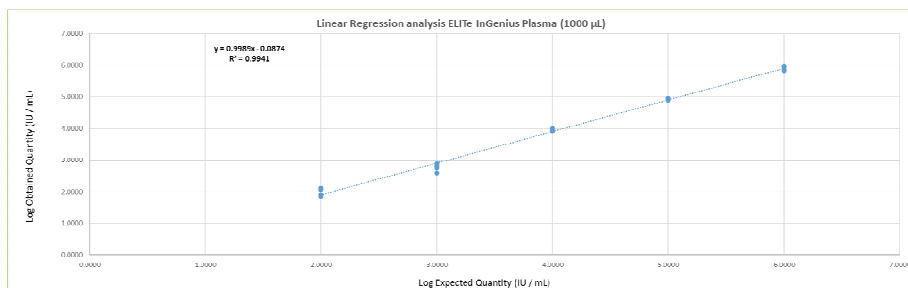
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS020PLD

La plage de mesure linéaire du kit ELITe MGB® EBV utilisé en association avec du Plasma collectés en EDTA (volume de l'échantillon 1000 µL) et **ELITe InGenius** a été vérifiée avec un panel de dilutions EBV. Le panel a été préparé en diluant la 1st WHO International Standard for Epstein-Barr Virus (EBV) for Nucleic Acid Amplification Techniques® (NIBSC code 09/260, United Kingdom dans une matrice négative d'ADN EBV. Le panel était composé de cinq points de dilution (étapes de dilution de 1 log10) de 10⁶ UI / mL à 10² UI / mL. Chaque échantillon du panel a été testé en 3 répétitions. L'analyse des données obtenues, effectuée par régression linéaire, a montré que le test présente une réponse linéaire pour tous les niveaux de dilution.

L'analyse des données obtenues, utilisant une analyse de régression linéaire, a démontré que le test effectué en association avec du plasma provenant d'échantillons EDTA (volume des échantillons 1000 µL), présentait une réponse linéaire pour toutes les dilutions avec un coefficient de corrélation R-carré (R²) de 0,994 pour l'instrument **ELITe InGenius**.

Les résultats sont présentés dans les tableaux suivants.



La limite inférieure de quantification (LLOQ) a été définie à la concentration de la LoD qui génère des résultats quantitatifs précis (écart-type égal à 0,126 log UI/ml pour l'instrument **ELITe InGenius**) et exacts (biais égal à -0,015 log UI/ml pour l'instrument **ELITe InGenius**) avec une marge de ±0,5 log UI/ml : 99 UI/ml.

La limite supérieure de quantification (ULOQ) a été définie à la concentration la plus élevée qui génère des résultats quantitatifs précis (écart-type égal à 0,064 log UI/ml pour l'instrument **ELITe InGenius**) et exacts (biais égal à 0,102 log UI/ml pour l'instrument **ELITe InGenius**) avec une marge de ±0,5 log UI/ml : 1,000,000 UI/ml.

La plage de mesure linéaire exprimée en copies/ml, pour le plasma prélevé sur 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 sang total et ELITe InGenius et ELITe BeGenius (1000 µL) | | | |
|--|-----------------|-------------------|-------------------|
| Volume d'échantillon | Unité de mesure | limite inférieure | limite supérieure |
| 1000 µL | IU / mL | 99 | 1,000,000 |
| | copies / mL | 62 | 625,000 |

La limite inférieure de la plage de mesure linéaire exprimée a été fixée à la concentration la plus faible qui donne 100 % de positivité et des résultats quantitatifs suffisamment exacts et précis.

La limite supérieure de la plage de mesure linéaire exprimée a été fixée à la concentration la plus élevée qui donne des résultats quantitatifs suffisamment exacts et précis.

La plage de mesure linéaire exprimée en copies/ml, pour chaque matrice est calculée en appliquant le facteur de conversion spécifique indiqué à la page 31.

Répétabilité

La répétabilité des résultats obtenus avec le produit EBV ELITe MGB Kit en association avec les systèmes **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** a été testée en analysant un panel d'échantillons de sang total prélevé sur EDTA. Le panel incluait un échantillon négatif et deux échantillons dopés avec un matériel de référence certifié du EBV (1st WHO EBV International Standard, NIBSC) à une concentration de 3 x la LoD (environ 312 UI/ml) et de 10 x la LoD (environ 1040 UI/ml).

EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

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

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

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

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

| Répétabilité intra-session, ELITe InGenius, lot U0521-016 | | | | | | | | |
|---|-----------|------------|------|------|------------------|------------|------|------|
| Échantillon | EBV | | | | Contrôle interne | | | |
| | Pos./Rép. | Ct moyenne | EC | % CV | Pos./Rép. | Ct moyenne | EC | % CV |
| Négatif | 0/8 | - | - | - | 24/24 | 23,97 | 0,38 | 1,60 |
| 3 x la LoD | 8/8 | 35,68 | 0,57 | 1,60 | | | | |
| 10 x la LoD | 8/8 | 34,22 | 0,24 | 0,70 | | | | |

| Répétabilité inter-sessions, ELITe InGenius, lot U0521-016 | | | | | | | | |
|--|-----------|------------|------|------|------------------|------------|------|------|
| Échantillon | EBV | | | | Contrôle interne | | | |
| | Pos./Rép. | Ct moyenne | EC | % CV | Pos./Rép. | Ct moyenne | EC | % CV |
| Négatif | 0/14 | - | - | - | 46/46 | 24,21 | 0,46 | 1,91 |
| 3 x la LoD | 16/16 | 35,72 | 0,53 | 1,48 | | | | |
| 10 x la LoD | 16/16 | 34,39 | 0,37 | 1,07 | | | | |

Dans le test de répétabilité sur l'instrument **ELITe InGenius**, l'analyse détectait la cible EBV comme attendu et montrait un faible % CV des valeurs Ct qui n'excédait pas 1,6 % pour le EBV et 1,9 % pour le contrôle interne.

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

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

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

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

| Répétabilité intra-session, ELITe BeGenius, lot U0521-016 | | | | | | | | |
|---|-----------|------------|------|------|------------------|------------|------|------|
| Échantillon | EBV | | | | Contrôle interne | | | |
| | Pos./Rép. | Ct moyenne | EC | % CV | Pos./Rép. | Ct moyenne | EC | % CV |
| Négatif | 0/8 | - | - | - | 24/24 | 27,13 | 0,76 | 2,80 |
| 3 x la LoD | 8/8 | 37,32 | 0,49 | 1,30 | | | | |
| 10 x la LoD | 8/8 | 35,97 | 0,43 | 1,19 | | | | |

| Répétabilité inter-sessions, ELITe BeGenius, lot U0521-016 | | | | | | | | |
|--|-----------|------------|------|------|------------------|------------|------|------|
| Échantillon | EBV | | | | Contrôle interne | | | |
| | Pos./Rép. | Ct moyenne | EC | % CV | Pos./Rép. | Ct moyenne | EC | % CV |
| Négatif | 0/14 | - | - | - | 46/46 | 27,32 | 0,69 | 2,53 |
| 3 x la LoD | 16/16 | 37,29 | 0,67 | 1,79 | | | | |
| 10 x la LoD | 16/16 | 35,82 | 0,67 | 1,86 | | | | |

EBV ELITE MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

Dans le test de répétabilité sur l'instrument **ELITE BeGenius**, l'analyse détectait la cible EBV comme attendu et montrait un faible % CV des valeurs Ct qui n'excédait pas 1,9 % pour le EBV et 2,8 % pour le contrôle interne.

Reproductibilité

La reproductibilité des résultats obtenus avec le produit EBV ELITE MGB Kit en association avec les systèmes **ELITE InGenius** et **ELITE BeGenius** a été testée en analysant un panel d'échantillons de sang total. Le panel incluait un échantillon négatif et deux échantillons dopés avec un matériel de référence certifié du EBV (1st WHO EBV International Standard, NIBSC) à une concentration de 3 x la LoD (environ 312 UI/ml) et de 10 x la LoD (environ 1040 UI/ml).

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

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

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

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

Reproductibilité inter-instruments, ELITE InGenius

| Échantillon | EBV | | | | Contrôle interne | | | |
|-------------|-----------|------------|------|------|------------------|------------|------|------|
| | Pos./Rép. | Ct moyenne | EC | % CV | Pos./Rép. | Ct moyenne | EC | % CV |
| Négatif | 0/8 | - | - | - | 24/24 | 25,25 | 0,70 | 2,77 |
| 3 x la LoD | 8/8 | 35,78 | 0,44 | 1,24 | | | | |
| 10 x la LoD | 8/8 | 30,38 | 0,36 | 1,17 | | | | |

Reproductibilité inter-lots, ELITE InGenius

| Échantillon | EBV | | | | Contrôle interne | | | |
|-------------|-----------|------------|------|------|------------------|------------|------|------|
| | Pos./Rép. | Ct moyenne | EC | % CV | Pos./Rép. | Ct moyenne | EC | % CV |
| Négatif | 0/8 | - | - | - | 24/24 | 25,25 | 0,70 | 2,77 |
| 3 x la LoD | 8/8 | 35,91 | 0,38 | 1,06 | | | | |
| 10 x la LoD | 8/8 | 34,48 | 0,15 | 1,43 | | | | |

Dans le test de reproductibilité sur l'instrument **ELITE InGenius**, l'analyse détectait la cible HHV6 comme attendu et montrait un faible % CV des valeurs Ct qui n'excédait pas 1,8 % pour le HHV6 et 1,6 % pour le contrôle interne.

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

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

EBV ELITE MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

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

Inter – Instrument Reproductibilité ELITE BeGenius

| Échantillon | EBV | | | | Internal Control | | | |
|-------------|-------------|------------|------|------|------------------|------------|------|------|
| | Pos. / Rep. | Ct moyenne | SD | % CV | Pos. / Rep. | Ct moyenne | EC | % CV |
| Negative | 0 / 7 | N.A. | N.A. | N.A. | 23 / 23 | 28.39 | 0.61 | 2.14 |
| 3 x LoD | 8 / 8 | 36.79 | 0.86 | 2.32 | | | | |
| 10 x LoD | 8 / 8 | 35.15 | 0.65 | 1.84 | | | | |

Inter – Batch Reproductibilité ELITE BeGenius

| Échantillon | EBV | | | | Internal Control | | | |
|-------------|-------------|------------|------|------|------------------|------------|------|------|
| | Pos. / Rep. | Ct moyenne | SD | % CV | Pos. / Rep. | Ct moyenne | EC | % CV |
| Negative | 0 / 7 | N.A. | N.A. | N.A. | 23 / 23 | 28.23 | 0.57 | 2.02 |
| 3 x LoD | 8 / 8 | 37.45 | 0.65 | 1.72 | | | | |
| 10 x LoD | 8 / 8 | 35.57 | 0.42 | 1.18 | | | | |

Dans le test de reproductibilité, le test a détecté la cible EBV comme prévu et a montré un faible %CV des valeurs Ct qui n'a pas dépassé 2,32 % pour l'EBV et 2,14 % pour le contrôle interne.

Reproductibilité avec un matériau de référence certifié

La sensibilité analytique du test a été évaluée en utilisant comme matériau de référence le panel calibré "EBV Molecular "Q" Panel" (Qnostics, Ltd, UK). Chaque échantillon du panel a été testé en 2 répétitions en effectuant toute la procédure d'analyse, d'extraction, d'amplification, de détection et d'interprétation du résultat avec Système **ELITE InGenius** et les produits ELITechGroup S.p.A..

Les résultats, obtenus à partir de 200 µL d'échantillon, sont reportés dans le tableau suivant.

Tests avec des matériaux de référence calibrés et ELITE InGenius

| Échantillon | Nominal titre IU / mL | Nominal titre Log ₁₀ IU / mL | Positive / Replicates | Mean results Log ₁₀ IU / mL |
|-------------------|-----------------------|---|-----------------------|--|
| EBVMQP01-High | 36,577 | 4.560 | 2/2 | 4.835 |
| EBVMQP01-Medium | 3,657 | 3.560 | 2/2 | 3.843 |
| EBVMQP01-Low | 365 | 2.560 | 2/2 | 2.899 |
| EBVMQP01-Negative | Negative | - | 0/2 | - |

Tous les échantillons positifs ont été détectés comme positifs avec un titre qui se situait dans la valeur attendue ± 0,5 Log.

Les résultats, obtenus à partir de 1000 µL d'échantillon, sont reportés dans le tableau suivant.

Tests avec des matériaux de référence calibrés et ELITE InGenius

| Échantillon | Nominal titre IU / mL | Nominal titre Log IU / mL | Positive / Replicates | Mean results Log IU / mL |
|-------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|--------------------------|
| EBVMQP01-High | 36,577 | 4.560 | 2/2 | 4.765 |
| EBVMQP01-Medium | 3,657 | 3.560 | 2/2 | 3.795 |
| EBVMQP01-Low | 365 | 2.560 | 2/2 | 2.592 |
| EBVMQP01-Negative | negativo | - | 0/2 | - |

Tous les échantillons positifs ont été détectés comme positifs avec un titre dans la valeur attendue ± 0,5 Log.

D'autres tests ont été effectués en utilisant comme matériau de référence le panel calibré "AcroMetrix EBV Plasma Panel" (Life Technologies). Chaque échantillon du panel a été testé en 2 répétitions en effectuant toute la procédure d'analyse, d'extraction, d'amplification, de détection et d'interprétation des résultats avec le système **ELITE InGenius** et les produits ELITechGroup S.p.A..

Les résultats, obtenus à partir de 200 µL d'échantillon, sont reportés dans le tableau suivant.

EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

Tests avec des matériaux de référence calibrés et ELITe InGenius

| Échantillon | Nominal titre IU / mL | Nominal titre Log ₁₀ IU / mL | Positive / Replicates | Mean results Log ₁₀ IU / mL |
|--------------------|-----------------------|---|-----------------------|--|
| Acrometrix EBV 1E6 | 10 ⁶ | 6.000 | 2/2 | 5.791 |
| Acrometrix EBV 1E5 | 10 ⁵ | 5.000 | 2/2 | 5.044 |
| Acrometrix EBV 1E4 | 10 ⁴ | 4.000 | 2/2 | 3.776 |
| Acrometrix EBV 1E3 | 10 ³ | 3.000 | 2/2 | 2.541 |
| Acrometrix EBV 1E2 | 10 ² | 2.000 | 2/2 | 2.034 |

Tous les échantillons positifs ont été détectés comme positifs avec un titre qui se situait dans la valeur attendue $\pm 0,5$ Log.

D'autres tests ont été réalisés en utilisant comme matériau de référence le QCMD 2014 Epstein-Barr Virus DNA EQA Panel (Qnostics Ltd, Scotland, UK), un panel de dilutions EBV. Chaque échantillon du panel a été testé en 2 répliques en effectuant toute la procédure d'analyse, d'extraction, d'amplification, de détection et d'interprétation des résultats, en utilisant les produits **ELITe InGenius** et ELITechGroup S.p.A..

Les résultats, obtenus à partir de 200 μ L d'échantillon, sont reportés dans le tableau suivant.

Tests avec des matériaux de référence calibrés et ELITe InGenius

| Échantillon | Consensus virus conc. Log ₁₀ IU / mL | Standard Deviation | Positive / Replicates | Mean results Log ₁₀ IU / mL |
|-------------|---|--------------------|-----------------------|--|
| EBVDNA14-01 | 3.504 | 0.212 | 2/2 | 3.439 |
| EBVDNA14-02 | 3.169 | 0.295 | 2/2 | 2.876 |
| EBVDNA14-03 | 2.500 | 0.310 | 2/2 | 2.275 |
| EBVDNA14-04 | 3.956 | 0.208 | 2/2 | 4.190 |
| EBVDNA14-05 | negative | - | 0/2 | - |
| EBVDNA14-06 | 3.957 | 0.259 | 2/2 | 3.999 |
| EBVDNA14-07 | 2.962 | 0.220 | 2/2 | 2.953 |
| EBVDNA14-08 | 3.465 | 0.221 | 2/2 | 3.419 |

Tous les échantillons ont été correctement détectés. Six (6) des sept échantillons positifs ont été quantifiés dans la fourchette définie par le Consensus à ± 1 écart-type (ET) et un échantillon (EBVDNA14-04) a été quantifié à ± 2 ET. Cependant, cet échantillon est légèrement sur quantifié (+0,234 Log UI / mL alors que l'écart-type est égal à 0,208 Log UI / mL).

D'autres tests, à partir de 1000 μ L d'échantillon, ont été effectués en utilisant comme matériau de référence calibré le panel " QCMD 2015 Epstein-Barr virus DNA EQA Panel" (Qnostics Ltd, UK). Chaque échantillon du panel a été testé en 2 répétitions en effectuant toute la procédure d'analyse, d'extraction, d'amplification, de détection et d'interprétation des résultats avec les produits **ELITe InGenius** et ELITechGroup S.p.A.

Les résultats, obtenus à partir de 1000 μ L d'échantillon, sont reportés dans le tableau suivant.

Tests avec des matériaux de référence calibrés et ELITe InGenius

| Échantillon | Consensus virus conc. Log ₁₀ IU / mL | Standard Deviation | Positive / Replicates | Mean results Log ₁₀ IU / mL |
|---------------|---|--------------------|-----------------------|--|
| EBVDNA15C1-01 | 3.418 | 0.343 | 2/2 | 3.220 |
| EBVDNA15C1-02 | 3.415 | 0.345 | 0/2 | 3.098 |
| EBVDNA15C1-03 | Negative | - | 2/2 | - |
| EBVDNA15C1-04 | 3.955 | 0.305 | 2/2 | 3.697 |
| EBVDNA15C1-05 | 2.493 | 0.516 | 2/2 | 2.136 |
| EBVDNA15C2-01 | 3.956 | 0.350 | 2/2 | 3.662 |
| EBVDNA15C2-02 | 3.942 | 0.347 | 2/2 | 3.697 |
| EBVDNA15C2-03 | 2.886 | 0.374 | 2/2 | 2.622 |
| EBVDNA15C2-04 | 3.952 | 0.377 | 2/2 | 3.732 |
| EBVDNA15C2-05 | 2.912 | 0.340 | 2/2 | 2.723 |

EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

Tous les échantillons ont été correctement détectés. Tous les échantillons positifs ont été quantifiés dans la fourchette définie par le Consensus ± 1 écart-type (SD).

D'autres tests ont été réalisés en utilisant comme matériau de référence le panel QCMD 2014 EQA pour le virus d'Epstein-Barr sur sang total (Qnostics Ltd, Scotland, UK), un panel de dilutions EBV. Chaque échantillon du panel a été testé en 4 répliques en effectuant toute la procédure d'analyse, d'extraction, d'amplification, de détection et d'interprétation des résultats, en utilisant les produits **ELITe InGenius** et ELITechGroup S.p.A..

Les résultats en UI/mL ont été calculés en appliquant le facteur de conversion pour le système **ELITe InGenius** et les échantillons de sang total et sont rapportés dans le tableau suivant.

Tests avec des matériaux de référence calibrés et ELITe InGenius

| Échantillon | Consensus virus conc. Log ₁₀ IU / mL | Standard Deviation | Positive / Replicates | Mean results Log ₁₀ IU / mL |
|-------------|---|--------------------|-----------------------|--|
| EBVWB14-01 | 3.361 | 0.439 | 4/4 | 3.242 |
| EBVWB14-02 | 2.960 | 0.641 | 4/4 | 2.037 |
| EBVWB14-03 | 3.841 | 0.367 | 4/4 | 3.860 |
| EBVWB14-04 | 3.845 | 0.362 | 4/4 | 3.786 |
| EBVWB14-05 | 3.441 | 0.343 | 4/4 | 3.161 |
| EBVWB14-06 | 4.255 | 0.451 | 4/4 | 4.466 |
| EBVWB14-07 | negative | - | 0/4 | - |
| EBVWB14-08 | 4.889 | 0.290 | 4/4 | 4.955 |

Tous les échantillons ont été correctement détectés. Six (6) des sept échantillons positifs ont été quantifiés dans la fourchette définie par le Consensus, à ± 1 écart-type (ET), et un échantillon (EBVWB14-02) a été quantifié à ± 2 ET. Cependant, cet échantillon avait un titre faible et a montré un écart-type élevé dans l'étude de compétence.

Reproductibilité avec panel de matériel de référence certifié.

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

Les résultats, obtenus à partir de 200 μ L d'échantillon, sont présentés dans le tableau suivant.

Tests avec matériel de référence certifié et ELITe InGenius

| Échantillon | Titre nominal UI / mL | Titre nominal Log ₁₀ UI / mL | Positifs / Réplicats | Moyenne des résultats Log ₁₀ UI / mL |
|-------------------|-----------------------|---|----------------------|---|
| EBVMQP01-High | 36.577 | 4,560 | 2/2 | 4,835 |
| EBVMQP01-Medium | 3.657 | 3,560 | 2/2 | 3,843 |
| EBVMQP01-Low | 365 | 2,560 | 2/2 | 2,899 |
| EBVMQP01-Negative | Négatif | - | 0/2 | - |

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

Les résultats, obtenus à partir de 1000 μ L d'échantillon, sont présentés dans le tableau suivant.

Tests avec matériel de référence certifié et ELITe InGenius

| Échantillon | Titre nominal UI / mL | Titre nominal Log ₁₀ UI / mL | Positifs / Réplicats | Moyenne des résultats Log ₁₀ UI / mL |
|-------------------|-----------------------|---|----------------------|---|
| EBVMQP01-High | 36.577 | 4,560 | 2/2 | 4,765 |
| EBVMQP01-Medium | 3.657 | 3,560 | 2/2 | 3,795 |
| EBVMQP01-Low | 365 | 2,560 | 2/2 | 2,592 |
| EBVMQP01-Negative | negativo | - | 0/2 | - |

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

EBV ELITE MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

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

Les résultats, obtenus à partir de 200 µL d'échantillon, sont présentés dans le tableau suivant.

| Tests avec matériel de référence certifié et ELITE InGenius | | | | |
|---|-----------------------|---|----------------------|---|
| Échantillon | Titre nominal UI / mL | Titre nominal Log ₁₀ UI / mL | Positifs / Réplicats | Moyenne des résultats Log ₁₀ UI / mL |
| EBV DNA 1E6 | 10 ⁶ | 6,000 | 2/2 | 5,791 |
| EBV DNA 1E5 | 10 ⁵ | 5,000 | 2/2 | 5,044 |
| EBV DNA 1E4 | 10 ⁴ | 4,000 | 2/2 | 3,776 |
| EBV DNA 1E3 | 10 ³ | 3,000 | 2/2 | 2,541 |
| EBV DNA 1E2 | 10 ² | 2,000 | 2/2 | 2,034 |

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

D'autres tests ont été effectués utilisant comme matériel de référence calibré deux panels de QCMD 2014 Epstein-Barr Virus Whole Blood EQA Panel (Qnostics Ltd, UK), chaque échantillon du panel a été utilisé dans 2 réplicats pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction d'amplification, de révélation et d'interprétation des résultats avec **ELITE InGenius** et les produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats, obtenus à partir de 200 µL d'échantillon, sont présentés dans le tableau suivant.

| Tests avec matériels de référence calibrés et ELITE InGenius | | | | |
|--|---|---------------------|----------------------|---|
| Échantillon | Consensus Log ₁₀ virus conc. | Déviations standard | Positif/Réplications | Moyenne des résultats Log ₁₀ IU / mL |
| EBVDNA14-01 | 3,504 | 0,212 | 2/2 | 3,439 |
| EBVDNA14-02 | 3,169 | 0,295 | 2/2 | 2,876 |
| EBVDNA14-03 | 2,500 | 0,310 | 2/2 | 2,275 |
| EBVDNA14-04 | 3,956 | 0,208 | 2/2 | 4,190 |
| EBVDNA14-05 | Négatif | NA | 2/2 | NA |
| EBVDNA14-06 | 3,957 | 0,259 | 2/2 | 3,999 |
| EBVDNA14-07 | 2,962 | 0,220 | 0/2 | 2,953 |
| EBVDNA14-08 | 3,465 | 0,221 | 2/2 | 3,419 |

Tous les échantillons ont été correctement détectés. Dans l'analyse quantitative, 6/7 échantillons positifs ont été correctement quantifiés dans la plage définie par le Consensus ± 1 Standard Deviation (SD). Un échantillon (EBVDNA14-04) a été quantifié à ± 2 ET. Cet échantillon a été légèrement surestimé (+0,234 Log IU / mL alors que le DS est égal à 0,208 Log IU / mL) d'un ordre considéré comme largement acceptable car inférieur à la valeur de $\pm 0,5$ Log IU / mL.

D'autres tests, à partir de 1000 µL d'échantillon, ont été effectués en utilisant un panel de dilution EBV «Panel QCMD 2015 Epstein-Barr virus EQA DNA» (Qnostics Ltd, Royaume-Uni) comme matériau de référence calibré. Chaque échantillon de panel a été utilisé en 2 répétitions pour effectuer la procédure complète d'analyse, d'extraction, d'amplification, de détection et d'interprétation des résultats avec les produits **ELITE InGenius** et ELITechGroup S.p.A.

Facteur de conversion en Unités Internationales

Le facteur de conversion à utiliser avec ce test pour transformer le résultat quantitatif des copies / ml en unités internationales / ml a été déterminé en utilisant un panel de matériel de référence étalon approuvé par l'OMS ("1st WHO International Standard for Epstein-Barr Virus (EBV) for Nucleic Acid Amplification Techniques", NIBSC, Royaume-Uni, code 09/162) dans les différentes matrices négatives (sang total et plasma collectés en EDTA) pour l'ADN d'EBV et en association avec **ELITE InGenius**. Le panel avait au moins 3 étapes de dilution de 1 Log. Chaque point du panel a été testé en au moins 10 répétitions en effectuant l'ensemble de la procédure d'analyse, préparation des analyses, extraction, amplification en temps réel et interprétation des résultats avec les produits **ELITE InGenius** et ELITechGroup S.p.A.

EBV ELITE MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

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

| Facteur de conversion en Unités Internationales SangTotal, Fc = 2.9 IU / copy | | | | | | |
|---|-------------|----|--------------|--------------|------------------|------------------------------|
| Échantillon | | | Résultats | | | Log différence (ref. - test) |
| IU / mL | Log IU / mL | N | Mean c. / mL | Mean IU / mL | Mean Log IU / mL | |
| 100000 | 5.000 | 10 | 47041 | 135479 | 5.108 | - 0.108 |
| 10000 | 4.000 | 10 | 4509 | 12987 | 4.063 | - 0.063 |
| 1000 | 3.000 | 10 | 223 | 641 | 2.746 | + 0.254 |

| Facteur de conversion en Unités Internationales Plasma (sample volume 200 µL), Fc = 1.9 IU / copy | | | | | | |
|---|-------------|----|--------------|--------------|------------------|------------------------------|
| Échantillon | | | Résultats | | | Log différence (ref. - test) |
| IU / mL | Log IU / mL | N | Mean c. / mL | Mean IU / mL | Mean Log IU / mL | |
| 100000 | 5.000 | 10 | 72352 | 137469 | 5.128 | - 0.128 |
| 10000 | 4.000 | 10 | 5092 | 9674 | 3.967 | + 0.033 |
| 1000 | 3.000 | 10 | 435 | 826 | 2.904 | + 0.096 |

| Conversion factor to International Units Plasma (sample volume 1000 µL), Fc = 1.6 IU / copy | | | | | | |
|---|-------------|----|--------------|--------------|------------------|------------------------------|
| Échantillon | | | Résultats | | | Log différence (ref. - test) |
| IU / mL | Log IU / mL | N | Mean c. / mL | Mean IU / mL | Mean Log IU / mL | |
| 316228 | 5.5 | 16 | 182001 | 291201 | 5.459 | + 0.041 |
| 100000 | 5 | 16 | 57197 | 91515 | 4.953 | + 0.047 |
| 31623 | 4.5 | 16 | 20626 | 33002 | 4.510 | - 0.010 |
| 10000 | 4 | 16 | 6911 | 11058 | 4.028 | - 0.028 |
| 3162 | 3.5 | 16 | 2086 | 3338 | 3.514 | - 0.014 |
| 1000 | 3 | 16 | 604 | 966 | 2.965 | + 0.035 |

Les résultats pour chaque matrice sont présentés dans le tableau suivant.

| Conversion en unités internationales avec ELITE InGenius | | |
|--|------------|-----------------|
| Volume d'échantillon | Matrice | Fc (UI / copie) |
| 200 µL | sang total | 2,9 |
| | plasma | 1,9 |
| 1000 µL | plasma | 1,6 |

Le facteur de conversion, pour convertir un résultat quantitatif de copies / mL en Unités Internationales / mL, a été vérifié pour **ELITE InGenius** et **ELITE BeGenius** en analysant les résultats obtenus pendant le test de linéarité.

La précision de quantification cible, en tant que déviation standard de Log IU/mL, était inférieure à 0,5 Log pour le sang total et le plasma et répond aux critères d'acceptation pour **ELITE InGenius** et **ELITE BeGenius**.

La précision de quantification cible, comme la différence entre les concentrations théoriques et mesurées en Log UI / mL, était inférieure à 0,5 Log pour le sang total et le plasma et répond aux critères d'acceptation pour **ELITE InGenius** et **ELITE BeGenius**.

Ces résultats ont confirmé les facteurs de conversion calculés pour chaque matrice avec **ELITE InGenius**.

Sensibilité diagnostique : confirmation des échantillons positifs

La sensibilité diagnostique du test, en tant que confirmation d'échantillons cliniques positifs, a été évaluée à l'aide de certains échantillons cliniques de sang total et de plasma collectés dans de l'EDTA et positifs pour l'ADN d'EBV en association avec **ELITE InGenius**. Comme **ELITE BeGenius** a montré des performances analytiques équivalentes à **ELITE InGenius**, on peut supposer que les résultats de la sensibilité du diagnostic obtenus en association avec **ELITE InGenius** sont également applicables à **ELITE BeGenius**.

EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

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

- 30 échantillons de sang total prélevés en EDTA positifs pour l'ADN EBV (testés avec un produit d'amplification en temps réel CE IVD).
- 12 échantillons de plasma EDTA prélevés sur des patients positifs pour l'ADN EBV (testés avec un produit d'amplification en temps réel CE IVD) et 35 échantillons de plasma EDTA prélevés sur EDTA négatif pour l'ADN EBV, qui étaient positifs pour l'ADN EBV d'EBV ajoutant "1er standard international de l'OMS pour le virus d'Epstein-Barr pour les techniques d'amplification d'acide nucléique" (code NIBSC 09/260, Royaume-Uni).

Les tests, à partir de 1000 µl d'échantillon, ont été effectués sur 30 échantillons de plasma prélevés dans l'EDTA de patients à ADN EBV positifs, qui avaient été positifs pour l'ADN EBV en ajoutant "le 1er standard international de l'OMS pour le virus Epstein-Barr pour Nucleic Acid Amplification Techniques" (code NIBSC 09/260, Royaume-Uni).

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

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

| Volume d'échantillon | Échantillons | N | positif | négatif |
|----------------------|---|----|---------|---------|
| 200 µL | sang total prélevé sur EDTA et positif pour l'ADN d'EBV | 30 | 30 | 0 |
| | Plasma prélevé sur EDTA et positif pour l'ADN d'EBV | 12 | 12 | 0 |
| | Plasma prélevé sur EDTA et positivée pour l'ADN d'EBV | 35 | 35 | 0 |
| 1000 µL | Plasma prélevé sur EDTA et positivée pour l'ADN d'EBV | 30 | 29 | 1 |

Tous les échantillons de sang total ont été confirmés comme étant valablement positifs pour l'ADN de l'EBV. La sensibilité diagnostique de l'essai dans ce test était égale à 100 %.

Tous les échantillons de plasma (200 µL) ont été confirmés comme étant valablement positifs pour l'ADN de l'EBV. La sensibilité diagnostique de l'essai dans ce test était égale à 100 %.

Vingt-neuf (29) des 30 échantillons de plasma (1000 µL) ont été confirmés comme étant valablement positifs pour l'ADN EBV, un échantillon était discrètement négatif. La sensibilité diagnostique de l'essai dans ces tests était égale à 96,7 %.

Tous les échantillons, analysés à partir de 1 000 µl d'échantillon, étaient valides pour l'analyse, 29 échantillons de plasma sur 30 ont été confirmés positifs, un échantillon était négatif. La sensibilité diagnostique du test, dans ces tests, était égale à 96,7%.

La sensibilité diagnostique totale du test dans ces tests était égale à 99%.

Spécificité diagnostique: confirmation des échantillons négatifs

La spécificité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons négatifs, a été évaluée en utilisant des échantillons cliniques de sang total et de plasma collectés dans EDTA et négatifs pour l'ADN d'EBV en association avec **ELITe InGenius**. Comme **ELITe BeGenius** a montré des performances analytiques équivalentes à **ELITe InGenius**, on peut supposer que les résultats de la sensibilité du diagnostic obtenus en association avec **ELITe InGenius** sont également applicables à **ELITe BeGenius**.

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

- 32 échantillons de sang total prélevés sur EDTA, négatifs pour l'ADN EBV (testés avec un produit d'amplification en temps réel CE IVD).
- 61 échantillons de plasma prélevés dans l'EDTA, négatifs pour l'ADN EBV (testés avec un produit d'amplification en temps réel CE IVD).

Les tests, à partir de 1000 µL d'échantillon, ont été effectués sur 62 échantillons de plasma prélevés dans l'EDTA, présumés négatifs pour l'ADN EBV.

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

EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

| Volume d'échantillon | Échantillons | N | positif | négatif |
|----------------------|---|----|---------|---------|
| 200 µL | sang total prélevé sur EDTA et négatif pour l'ADN d'EBV | 32 | 3 | 29 |
| | Plasma prélevé sur EDTA et négatif pour l'ADN d'EBV | 61 | 1 | 60 |
| 1000 µL | Plasma prélevé sur EDTA et allégué négatif pour l'ADN d'EBV | 62 | 2 | 60 |

Vingt-neuf (29) des 32 échantillons de sang total ont été confirmés négatifs pour l'ADN d'EBV, tandis que trois échantillons étaient positifs à faible titre. Ces échantillons ont un titre inférieur à la limite de détection de la méthode et peuvent donc être aléatoires négatifs et positifs. Ce résultat peut être expliqué en considérant que l'EBV est un virus répandu dans la population sous forme latente.

La spécificité diagnostique du test dans ce test de sang total était égale à 90,6%.

Soixante (60) échantillons de plasma sur 61 ont été confirmés négatifs, tandis qu'un échantillon était positif différentiel avec un titre faible. Cet échantillon a un titre proche de la limite de détection de la méthode et peut donc être aléatoire ou positif. Ce résultat peut être expliqué en considérant que l'EBV est un virus répandu dans la population sous forme latente.

La spécificité diagnostique du test dans ce test plasmatique était égale à 98,4%.

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

Soixante (60) des 62 échantillons de plasma ont été confirmés négatifs pour l'ADN de l'EBV, deux (2) échantillons étaient positifs divergents à faible titre. Cet échantillon avait un titre proche de la limite de détection de la méthode pour l'EBV - ADN ; cet échantillon peut être testé au hasard soit négatif soit positif. Ce résultat discordant peut s'expliquer en considérant que l'EBV est un virus largement répandu dans la population sous une forme latente.

La spécificité diagnostique du test dans ce test est égale à 96,8%.

La spécificité diagnostique totale du test dans ces tests était égale à 96%.

La valeur seuil du contrôle interne Ct (IC Ct) est fixée à 35.

Remarque : les données et les résultats complets des tests effectués pour évaluer les caractéristiques de performance du produit avec des matrices et des instruments sont consignés dans la section 7 du dossier technique du produit "EBV ELITe MGB® Kit", FTP RTS020PLD.

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

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES

Échantillons

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

Sang total prélevé dans un tube EDTA

Les échantillons de sang total destinés à l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés dans un tube EDTA et suivant les indications du laboratoire. Ils doivent être transportés à +2°C / +8°C et conservés à +2°C / +8°C pendant un maximum de trois jours. Autrement, ils doivent être congelés et conservés à -20°C pendant un maximum de trente jours ou à -70°C pendant une période plus longue.

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

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

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

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

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

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

Plasma prélevé sur EDTA

Les échantillons de plasma destinés à l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés sur EDTA suivant les indications du laboratoire. Ils doivent être transportés à +2°C / +8°C et conservés à +2°C / +8°C pendant un maximum de trois jours. Autrement, ils doivent être congelés et conservés à -20°C pendant un maximum de trente jours. En cas de stockage pendant une période plus longue, ils doivent être congelés à -70°C. Il est conseillé de subdiviser les échantillons à conserver congelés en plusieurs aliquots de façon à ne pas les soumettre à des cycles répétés de congélation / décongélation.

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

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

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN d'échantillons de plasma à l'aide de l'instrument «QIASymphony® SP/AS» et du kit «QIASymphony® DSP Virus / Pathogen Midi Kit», logiciel version 3.5, suivre le protocole d'extraction «Virus Cell free 500_V3_DSP_default IC» et les consignes suivantes : l'instrument est en mesure d'utiliser directement le tube primaire, le volume d'échantillon prélevé pour l'extraction est de 500 µL, il est toujours nécessaire de disposer d'un volume mort de 100 µL minimum. Préparer la solution contenant le tampon AVE et l'ARN entraîneur (carrier) en suivant les instructions de la Notice d'utilisation du kit d'extraction. Ajouter à la solution 12 µL de CPE-DNA, ou 6 µL de CPE pour chaque échantillon demandé. Sur l'instrument, à la position "contrôle interne" prévue pour les tubes, charger les tubes contenant la solution, en suivant la Notice d'utilisation du kit ; indiquer la position sur laquelle seront dispensés les élués et préciser le volume d'élution à 85 µL. Pour tout détail sur la procédure d'extraction, suivre attentivement les indications fournies dans la Notice d'utilisation du kit.

Liquide céphalorachidien

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

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

Substances interférentes

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

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

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

Contrôles d'amplification

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

Pour le contrôle négatif, remplacer l'ADN extrait par de l'eau ultra pure pour la biologie (non incluse dans le produit).

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

- modifier les temps selon les valeurs fournies dans le tableau suivant "Cycle de température";
- paramétrer **45** cycles;
- paramétrer un volume de réaction de **30 µL** pour la simulation logicielle du transfert thermique à la réaction ("Sample volume");
- option: ajouter la phase de dissociation (Add Dissociation Stage) et paramétrer les températures de **40°C à 80°C**.

| Cycle de température | | |
|---|---|---------|
| Phase | Températures | Temps |
| Décontamination | 50° C | 2 min. |
| Dénaturation initiale | 94° C | 2 min. |
| Amplification et détection (45 cycles) | 94° C | 10 sec. |
| | 60° C (acquisition de la fluorescence) | 30 sec. |
| | 72° C | 20 sec. |
| Dissociation (option) | 95° C | 15 sec. |
| | 40° C | 1 min. |
| | 80° C | 15 sec. |
| | 60° C | 15 sec. |

Préparation de l'amplification

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

Avant de commencer, il faut:

- prendre et décongeler les tubes contenant les échantillons à analyser. Agiter délicatement les tubes, les centrifuger pendant 5 secondes pour reporter le contenu dans le fond et les conserver dans la glace;
- prendre et décongeler les tubes d' **EBV Q - PCR Mix**. Chaque tube permet de préparer **25 réactions**. Agiter délicatement les tubes, les centrifuger pendant 5 secondes en reporter le contenu dans le fond et les conserver dans la glace;
- prendre et décongeler les tubes d' **EBV - Positive Control** ou les tubes d' **EBV Q - PCR Standard**. Agiter délicatement les tubes, les centrifuger pendant 5 secondes pour reporter le contenu dans le fond et les conserver dans la glace;
- prendre l'**Amplification microplate**. La manipuler avec des gants sans poudre et veiller à ne pas endommager les puits.

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

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

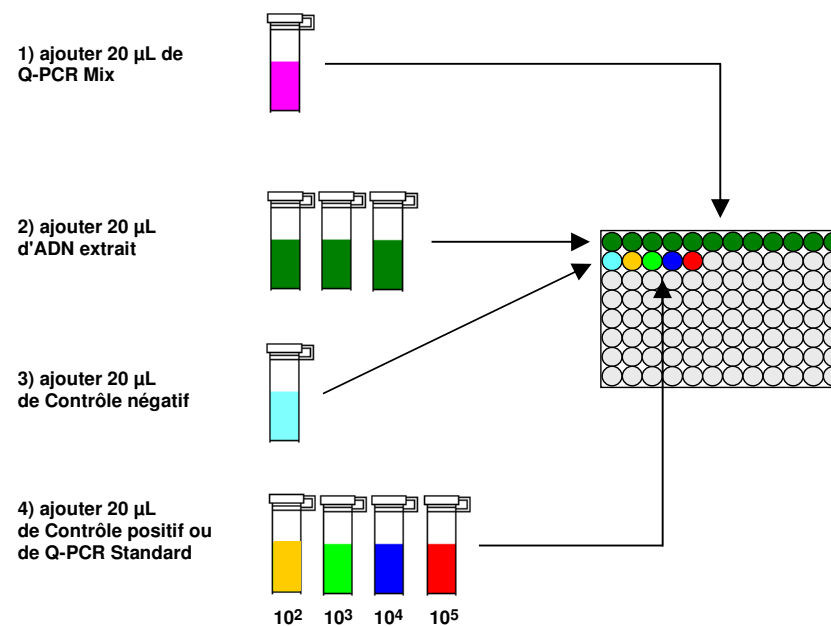
2. Conformément à la **Grille de travail** transférer délicatement **20 µL** d'**ADN** du premier échantillon dans le puits correspondant de l'**Amplification microplate**. Mélanger soigneusement l'échantillon et pipeter trois fois le volume de **20 µL** dans le mélange de réaction. Ne pas faire de bulles. Procéder de la même façon avec tous les **ADN extraits**.
3. Pour le contrôle négatif d'amplification déposer délicatement dans le mélange de réaction **20 µL** d'**Eau ultra pure pour la biologie** (non incluse dans le produit), dans le puits correspondant de l'**Amplification microplate** conformément à l'organisation définie précédemment dans la **Grille de travail**. Mélanger soigneusement le contrôle négatif et pipeter trois fois l'**eau ultra pure pour la biologie** dans le mélange de réaction. Ne pas faire de bulles.
4. En fonction du type de résultat requis (qualitatif ou quantitatif), suivre une des deux étapes suivantes:

- Pour un résultat **qualitatif** (détection de l'ADN d'EBV), déposer délicatement dans le mélange de réaction, **20 µL** d'**EBV - Positive Control** dans le puits correspondant de l'**Amplification microplate**, conformément à l'organisation définie précédemment dans la **Grille de travail**. Mélanger soigneusement le contrôle positif et pipeter trois fois l' **EBV - Positive Control** dans le mélange de réaction. Ne pas faire de bulles.

- Pour un résultat **quantitatif** (détection et dosage de l'ADN d'EBV), déposer délicatement dans le mélange de réaction, **20 µL** d'**EBV - Positive Control** dans le puits correspondant de l'**Amplification microplate**, conformément à l'organisation définie précédemment dans la **Grille de travail**. Mélanger soigneusement le standard et pipeter trois fois l' **EBV Q - PCR Standard 10²** dans le mélange de réaction. Ne pas faire de bulles. Faire de même avec les **EBV Q - PCR Standard 10³, 10⁴, 10⁵**.
5. Sceller soigneusement l'**Amplification microplate** à l'aide de l'**Amplification Sealing Sheet**.
 6. Transférer l'**Amplification microplate** dans le thermocycleur à temps réel, placé dans la zone d'amplification / détection des produits d'amplification et lancer le cycle de température d'amplification en sauvegardant, avec un nom identifiable et ne pouvant prêter à confusion, les données de l'étape (p.ex. "année-mois-jour-EBV-ELITECHGROUP").

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

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



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

Remarque: si la préparation de l'amplification est effectuée à l'aide de l'instrument «**ELITE GALAXY**», charger la microplaque contenant les extraits, le mélange complet de réaction et la microplaque d'amplification comme indiqué dans la Notice d'utilisation de l'instrument et suivre les étapes de l'interface graphique GUI.

EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

Analyse qualitative des résultats

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

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

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

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

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

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

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

- programmer manuellement à **0,2** le **Seuil (Threshold)** pour le détecteur FAM "EBV";
- programmer manuellement à **0,1** le **Seuil (Threshold)** pour le détecteur VIC "CI".

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

Pour la réaction d'amplification avec le **Positive Control***, la valeur du **Ct** d'EBV (Results > Report) sert à valider l'amplification et la détection, comme indiqué dans le tableau ci-dessous:

| Réaction Positive Control détecteur FAM "EBV" | Résultat du test | Amplification / Détection |
|--|------------------|---------------------------|
| Ct ≤ 25 | POSITIF | CORRECTE |

Si le résultat de la réaction d'amplification du **Positive Control** est **Ct > 25** ou si le **Ct** d'EBV est **non interprétable (Undetermined)**, cela indique que l'ADN cible n'a pas été détecté correctement. Des problèmes sont apparus pendant la phase d'amplification ou de détection (distribution erronée du mélange de réaction ou du contrôle positif, dégradation du mélange de réaction ou du contrôle positif, paramétrage erroné de la position du contrôle positif ou du cycle de température) qui peuvent engendrer des résultats erronés. La session de travail n'est pas valide et doit être recommencée à partir de la phase d'amplification.

***Remarque:** Pour le dosage de l'ADN d'EBV, le **Positive Control** a été remplacée par les **Q - PCR Standard**. Dans ce cas, pour valider l'amplification et la détection il est nécessaire de se référer aux résultats du **Q - PCR Standard 10⁵ (Ct ≤ 25)**.

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

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

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

Pour les **échantillons**, la valeur du **Ct** d'EBV est utilisée pour détecter la présence de l'ADN cible et la valeur du **Ct** du contrôle interne est utilisée pour valider l'extraction, l'amplification et la détection.

EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

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

Ce produit peut détecter une quantité minimale de 10 copies d'ADN du gène EBNA-1 d'EBV par réaction d'amplification: ce qui correspond aux génomes Équivalents par réaction (seuil de détection du produit, voir Caractéristiques des performances).

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

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

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

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

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

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

Analyse quantitative des résultats

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

Pour les réactions d'amplification des quatre **Q - PCR standard**, les valeurs des **Ct** d'EBV sont utilisées pour calculer la **Courbe standard** (Results > Standard Curve) de la session d'amplification et pour valider l'amplification et la détection, comme indiqué dans le tableau ci-dessous:

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

EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

Si la valeur du **Coefficient de corrélation (R2)** ne s'inscrit pas dans les limites, cela indique la présence de problèmes pendant la phase d'amplification ou de détection (distribution erronée du mélange de réaction ou des standards, dégradation du mélange de réaction ou des standards, paramétrage erroné de la position des standards, paramétrage erroné du cycle de température) qui peuvent engendrer des résultats erronés. La session de travail n'est pas valide et doit être recommencée à partir de la phase d'amplification.

Les valeurs du **Ct** d'EBV de l'échantillon et la **Courbe standard** de la session sont utilisées pour calculer la **Quantité (Quantity)** d'ADN cible présente dans l'échantillon.

Ce produit peut doser de 1.000.000 à 10 copies d'ADN du gène EBNA-1 d'EBV par réaction d'amplification: ce qui correspond aux génomes Équivalents par réaction (intervalle linéaire de mesure, voir Caractéristiques des performances, page 17), comme décrit dans le tableau ci-dessous:

| Résultat de l'échantillon détecteur FAM "EBV" | génomes Équivalents d'EBV par réaction |
|--|--|
| Quantité >1 x 10 ⁶ | SUPÉRIEURS À 1.000.000 |
| 1 x 10 ¹ ≤ Quantité ≤ 1 x 10 ⁶ | = Quantité |
| Quantité < 1 x 10 ¹ | INFÉRIEURS À 10 |

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

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

Où:

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

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

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

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

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

Lorsque l'on utilise des échantillons de sang total prélevé dans un tube EDTA et le kit d'extraction «EXTRAblood» et on veut obtenir le résultat **exprimé en gEq / mL**, la formule devient:

Formule simplifiée pour sang total et «EXTRAblood»

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

Lorsque l'on utilise d'échantillons de sang total, de plasma prélevé dans un tube EDTA et le kit d'extraction «ELITe STAR» et on veut obtenir le résultat **exprimé en gEq / mL**, la formule devient:

Formule simplifiée pour sang total, plasma et «ELITe STAR»

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

Lorsque l'on utilise d'échantillons de sang total, de plasma prélevé dans un tube EDTA et le kit d'extraction «ELITe GALAXY» et on veut obtenir le résultat **exprimé en gEq / mL**, la formule devient:

Formule simplifiée pour sang total, plasma et «ELITe GALAXY »

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

EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

Lorsque l'on utilise des échantillons de sang total prélevé dans un tube EDTA et le système d'extraction «NucliSENS® easyMAG®» en vue d'obtenir le résultat **exprimé en gEq / mL**, la formule est la suivante:

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

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

Lorsque l'on utilise des échantillons de sang total prélevé dans un tube EDTA et le système d'extraction «QIASymphony® SP/AS», pour obtenir le résultat **exprimé en gEq / mL**, la formule devient:

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

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 23 \times \text{Quantité}$$

Lorsque l'on utilise des échantillons de plasma prélevé dans un tube EDTA et le système d'extraction «QIASymphony® SP/AS», pour obtenir le résultat **exprimé en gEq / mL**, la formule devient:

Formule simplifiée pour plasma et «QIASymphony® SP/AS»

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

Calcul des seuils de l'intervalle linéaire de mesure

Lorsque l'on utilise une méthode d'extraction particulière, les seuils de l'intervalle linéaire de mesure (comme gEq / mL d'échantillon) peuvent être calculés à partir de l'intervalle de mesure linéaire de la réaction d'amplification selon la formule:

$$\text{Seuil inférieur (gEq / mL)} = \frac{Ve \times 10 \text{ gEq}}{Vc \times Va \times Ep}$$

$$\text{Seuil supérieur (gEq / mL)} = \frac{Ve \times 1.000.000 \text{ gEq}}{Vc \times Va \times Ep}$$

Lorsque l'on utilise le kit d'extraction «EXTRAblood» avec échantillons cellulaires, la formule devient:

Seuils de l'intervalle linéaire de mesure (gEq / mL) avec «EXTRAblood»

$$\text{Seuil inférieur (gEq / mL)} = 25 \times 10 \text{ gEq}$$

$$\text{Seuil supérieur (gEq / mL)} = 25 \times 1.000.000 \text{ gEq}$$

$$\text{de } 250 \text{ à } 25.000.000 \text{ gEq / mL}$$

Lorsque l'on utilise le système d'extraction «ELITe STAR System» avec échantillons cellulaires et non- cellulaires, la formule devient:

Limites de l'intervalle de mesure linéaire (gEq / mL) avec «ELITe STAR»

$$\text{Limite inférieure (gEq / mL)} = 28 \times 10 \text{ gEq}$$

$$\text{Limite supérieure (gEq / mL)} = 28 \times 1.000.000 \text{ gEq}$$

$$\text{de } 280 \text{ à } 28.000.000 \text{ gEq / mL}$$

EBV ELITE MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

Lorsque l'on utilise le système d'extraction « **ELITE GALAXY System** » avec échantillons cellulaires et non- cellulaires, la formule devient:

Limites de l'intervalle de mesure linéaire (gEq / mL) avec «ELITE GALAXY»

Limite inférieure (gEq / mL) = 35 x 10 gEq
 Limite supérieure (gEq / mL) = 35 x 1.000.000 gEq
 de 350 à 35.000.000 gEq / mL

Lorsque l'on utilise le système d'extraction «**NucliSENS® easyMAG®**» avec échantillons cellulaires, la formule devient:

Limites de l'intervalle de mesure linéaire (gEq / mL) avec «NucliSENS® easyMAG®»

Seuil inférieur (gEq / mL) = 50 x 10 gEq
 Seuil supérieur (gEq / mL) = 50 x 1.000.000 gEq
 de 500 à 50.000.000 gEq / mL

Lorsque l'on utilise le système d'extraction «**QIASymphony® SP/AS**» avec échantillons cellulaires, la formule devient :

Limites de l'intervalle de mesure linéaire (gEq / mL) avec «QIASymphony® SP/AS»

Seuil inférieur (gEq / mL) = 23 x 10 gEq
 Seuil supérieur (gEq / mL) = 23 x 1.000.000 gEq
 de 230 à 23.000.000 gEq / mL

Lorsque l'on utilise le système d'extraction «**QIASymphony® SP/AS**» avec échantillons non-cellulaires, la formule devient :

Limites de l'intervalle de mesure linéaire (gEq / mL) avec «QIASymphony® SP/AS»

Seuil inférieur (gEq / mL) = 12 x 10 gEq
 Seuil supérieur (gEq / mL) = 12 x 1.000.000 gEq
 de 120 à 12.000.000 gEq / mL

Conversion des résultats en Unités Internationales

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

Formule simplifiée pour sang total et «EXTRAblood»

Fc = 2,0 UI / gEq
 $Nc (UI / mL) = Nc (gEq / mL) \times Fc$
 $Nc (UI / mL) = 50 \times \text{Quantité}$

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

Formule simplifiée pour sang total et «ELITE STAR»

Fc = 2,09 UI / gEq
 $Nc (UI / mL) = Nc (gEq / mL) \times Fc$
 $Nc (UI / mL) = 58,5 \times \text{Quantité}$

EBV ELITE MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

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

Formule simplifiée pour plasma et «ELITE STAR»

Fc = 2,15 UI / gEq
 $Nc (UI / mL) = Nc (gEq / mL) \times Fc$
 $Nc (UI / mL) = 60,2 \times \text{Quantité}$

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

Formule simplifiée pour sang total et «ELITE GALAXY»

Fc = 0,89 UI / gEq
 $Nc (UI / mL) = Nc (gEq / mL) \times Fc$
 $Nc (UI / mL) = 31,2 \times \text{Quantité}$

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

Formule simplifiée pour plasma et «ELITE GALAXY»

Fc = 0,76 UI / gEq
 $Nc (UI / mL) = Nc (gEq / mL) \times Fc$
 $Nc (UI / mL) = 26,6 \times \text{Quantité}$

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

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

Fc = 1,7 UI / gEq
 $Nc (UI / mL) = Nc (gEq / mL) \times Fc$
 $Nc (UI / mL) = 85 \times \text{Quantité}$

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

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

Fc = 1,8 UI / gEq
 $Nc (UI / mL) = Nc (gEq / mL) \times Fc$
 $Nc (UI / mL) = 41 \times \text{Quantité}$

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

Formule simplifiée pour plasma et «QIASymphony® SP/AS»

Fc = 2,3 UI / gEq
 $Nc (UI / mL) = Nc (gEq / mL) \times Fc$
 $Nc (UI / mL) = 28 \times \text{Quantité}$

Fc est le facteur de conversion obtenu en utilisant le matériel de référence calibré et approuvé par l'OMS "1st WHO International Standard for Epstein Barr virus for Nucleic Acid Amplification Techniques", NIBSC, Royaume Uni, code 09/260 (voir caractéristiques des performances).

EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

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

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

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

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous:

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

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

| Limite de détection avec échantillons de sang total et ELITe STAR System (UI / mL) | | | |
|--|--------------------|---------------------------------|-------------------|
| | | Intervalle de confiance de 95 % | |
| | | valeur inférieure | valeur supérieure |
| 95% positivité | 212 UI / mL | 113 UI / mL | 805 UI / mL |

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

| Limite de détection avec échantillons de sang total et ELITe STAR System (gEq / mL) | | | |
|---|---------------------|---------------------------------|-------------------|
| | | Intervalle de confiance de 95 % | |
| | | valeur inférieure | valeur supérieure |
| 95% positivité | 101 gEq / mL | 54 gEq / mL | 385 gEq / mL |

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

| Limite de détection avec échantillons de plasma et ELITe STAR (UI / mL) | | | |
|---|--------------------|---------------------------------|-------------------|
| | | Intervalle de confiance de 95 % | |
| | | valeur inférieure | valeur supérieure |
| 95% positivité | 229 UI / mL | 108 UI / mL | 1571 UI / mL |

EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

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

| Limite de détection avec échantillons de plasma et ELITe STAR (gEq / mL) | | | |
|--|---------------------|---------------------------------|-------------------|
| | | Intervalle de confiance de 95 % | |
| | | valeur inférieure | valeur supérieure |
| 95% positivité | 107 gEq / mL | 50 gEq / mL | 731 gEq / mL |

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

| Limite de détection avec échantillons de sang total et ELITe GALAXY (UI / mL) | | | |
|---|-------------------|---------------------------------|-------------------|
| | | Intervalle de confiance de 95 % | |
| | | valeur inférieure | valeur supérieure |
| 95% positivité | 99 UI / mL | 57 UI / mL | 376 UI / mL |

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

| Limite de détection avec échantillons de sang total et ELITe GALAXY (gEq / mL) | | | |
|--|---------------------|---------------------------------|-------------------|
| | | Intervalle de confiance de 95 % | |
| | | valeur inférieure | valeur supérieure |
| 95% positivité | 111 gEq / mL | 64 gEq / mL | 422 gEq / mL |

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

| Limite de détection avec échantillons de plasma et ELITe GALAXY (UI / mL) | | | |
|---|-------------------|---------------------------------|-------------------|
| | | Intervalle de confiance de 95 % | |
| | | valeur inférieure | valeur supérieure |
| 95% positivité | 97 UI / mL | 66 UI / mL | 284 UI / mL |

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

| Limite de détection avec échantillons de plasma et ELITe GALAXY (gEq / mL) | | | |
|--|---------------------|---------------------------------|-------------------|
| | | Intervalle de confiance de 95 % | |
| | | valeur inférieure | valeur supérieure |
| 95% positivité | 128 gEq / mL | 87 gEq / mL | 374 gEq / mL |

EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

Sensibilité analytique: intervalle linéaire de mesure

Ce test permet de quantifier de 1.000.000 à 10 molécules d'ADN cible dans les 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La sensibilité analytique du test, ou l'intervalle linéaire de mesure, a été déterminée à partir d'un panel de dilutions (1 log₁₀ entre deux dilutions) d'ADN plasmidique. Le plasmide contient le produit d'amplification et sa concentration initiale a été mesurée au spectrophotomètre. Les solutions contenant 10⁷ molécules par réaction à 10¹ molécules par réaction ont été amplifiées 9 fois avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A.

L'analyse des résultats, réalisée par régression linéaire, a démontré que le test présente une linéarité pour tous les points du panel (coefficient de corrélation linéaire supérieur à 0,99).

Le seuil supérieur de l'intervalle linéaire de mesure a été fixé à 10⁶ molécules par réaction, correspondantes à une valeur d'un logarithme au dessus de la plus haute concentration des génomes Équivalents par réaction (10⁵ molécules / 20 µL).

Le seuil inférieur de l'intervalle linéaire de mesure a été fixé à 10 molécules par réaction, correspondantes à une valeur d'un logarithme en dessous de la plus basse concentration du standard (10² molécules / 20 µL).

Les résultats finaux sont résumés dans le tableau suivant:

| Intervalle linéaire de mesure (gEq / réaction) | |
|--|--------------------------|
| Seuil supérieur | 1.000.000 gEq / réaction |
| Seuil inférieur | 10 gEq / réaction |

À la page 29 sont indiquées les limites de l'intervalle linéaire de mesure exprimées en gEq / mL en fonction du kit d'extraction utilisé.

Sensibilité analytique: Précision et Fidélité

La précision du test, ou la variabilité des résultats au cours d'une même session d'amplification avec différents réplicas d'un échantillon, a permis d'obtenir un pourcentage de Coefficient moyen (CV%) de 21,0% pour l'intervalle compris entre 10⁶ molécules et 10 molécules dans les 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

L'étude de la fidélité du test, entendue comme différence entre la moyenne des résultats obtenus au cours d'une même étape d'amplification avec différentes répliques d'un échantillon et la valeur théorique de la concentration de l'échantillon, a permis d'obtenir un manque de fidélité moyen de 11,1% pour l'intervalle compris entre 10⁶ molécules et 10 molécules dans les 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

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

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

La sensibilité analytique du test, ou la reproductibilité des résultats comparés à ceux obtenus avec d'autres méthodes dans différents laboratoires, a été vérifiée avec un panel de matériel de référence.

Les essais ont été menés en utilisant, comme matériel de référence calibré, un panel de dilution d'EBV dans la limite de concentration (QCMD 2008 Epstein Barr virus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Scotland, Royaume Uni). Chaque échantillon du panel a été utilisé 2 fois en effectuant toutes les étapes de la procédure (extraction, amplification et analyse) avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A.

EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

| Essais avec produit de référence calibré | | | | |
|--|---|--------------------|-------------------------|---|
| Échantillon | Consensus des tests commerciaux Log ₁₀ conc. virale | Déviat standard | Positifs / Répliques | Moyenne des résultats Log ₁₀ gEq / mL |
| EBV08-01 | EBV, 2,394 | 0,473 | 2/2 | 1,937 |
| EBV08-02 | EBV, 3,177 | 0,476 | 2/2 | 3,185 |
| EBV08-03 | EBV, 3,443 | 0,400 | 2/2 | 3,021 |
| EBV08-04 | EBV, 4,159 | 0,391 | 2/2 | 4,089 |
| EBV08-05 | EBV, 2,707 | 0,504 | 2/2 | 2,408 |
| EBV08-06 | Négatif, NA | NA | 0/2 | Non détecté |
| EBV08-07 | EBV, 3,857 | 0,349 | 2/2 | 3,796 |
| EBV08-08 | EBV, 5,131 | 0,361 | 2/2 | 4,930 |
| EBV08-09 | EBV, 4,414 | 0,358 | 2/2 | 4,186 |
| EBV08-10 | EBV, 2,651 | 0,456 | 2/2 | 2,458 |

Tous les échantillons ont été correctement détectés. Les résultats quantitatifs obtenus s'inscrivent dans l'intervalle défini par la Consensus ± 1 Déviation Standard, sauf pour l'échantillon EBV08-03 qui est légèrement inférieur à la valeur minimale attendue.

D'autres tests ont été faits en utilisant comme matériel de référence un panel de dilution EBV (QCMD 2012 Epstein Barr virus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Royaume Uni.) Chaque échantillon du panel a été utilisé dans 2 répliques pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction, d'amplification, de révélation et d'interprétation des résultats avec «ELITe STAR» et les produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

| Essais avec produit de référence calibré et «ELITe STAR» | | | | |
|--|---|--------------------|-------------------------|---|
| Échantillon | Consensus des tests commerciaux conc. virale Log ₁₀ gEq / mL | Déviat standard | Positifs / Répliques | Moyenne des résultats Log ₁₀ gEq / mL |
| EBV12-01 | EBV, 2,719 | 0,446 | 1/2 | 1,885 |
| EBV12-02 | EBV, 3,802 | 0,417 | 2/2 | 3,794 |
| EBV12-03 | EBV, 5,173 | 0,358 | 2/2 | 5,168 |
| EBV12-04 | EBV, 4,790 | 0,421 | 2/2 | 4,569 |
| EBV12-05 | EBV, 4,313 | 0,371 | 2/2 | 4,064 |
| EBV12-06 | EBV, 4,458 | 0,373 | 2/2 | 4,334 |
| EBV12-07 | EBV, 4,769 | 0,384 | 2/2 | 4,416 |
| EBV12-08 | EBV, 3,471 | 0,403 | 2/2 | 3,324 |
| EBV12-09 | EBV, 3,313 | 0,446 | 2/2 | 3,128 |
| EBV12-10 | Négatif, NA | - | 0/2 | - |

Tous les échantillons ont été détectés avec succès. Dans l'analyse quantitative, 8/9 des échantillons positifs ont été correctement quantifiés dans la plage définie par le Consensus ± 1 Déviation Standard (SD). Un échantillon (EBV12-01) a été quantifié à ± 2 SD. Ce résultat peut être expliqué comme le titre de l'échantillon est proche de la limite de détection du système.

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

REF RTS020PLD

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

| Essais avec produit de référence calibré et «ELITe STAR» | | | | |
|--|--|---------------------|-------------------------|--|
| Échantillon | Consensus des tests commerciaux conc. virale Log ₁₀ gEq / mL | Déviati on standard | Positifs / Réplications | Moyenne des résultats Log ₁₀ gEq / mL |
| EBV12-01 | EBV, 2,473 | 0,386 | 1/2 | 2,217 |
| EBV12-02 | EBV, 3,635 | 0,422 | 2/2 | 4,126 |
| EBV12-03 | EBV, 4,987 | 0,307 | 2/2 | 5,500 |
| EBV12-04 | EBV, 4,646 | 0,295 | 2/2 | 4,901 |
| EBV12-05 | EBV, 4,138 | 0,300 | 2/2 | 4,396 |
| EBV12-06 | EBV, 4,345 | 0,333 | 2/2 | 4,666 |
| EBV12-07 | EBV, 4,631 | 0,270 | 2/2 | 4,749 |
| EBV12-08 | EBV, 3,470 | 0,442 | 2/2 | 3,657 |
| EBV12-09 | EBV, 3,161 | 0,394 | 2/2 | 3,460 |
| EBV12-10 | Négatif, NA | - | 0/2 | - |

Tous les échantillons ont été détectés avec succès. Dans l'analyse quantitative, 7/9 des échantillons positifs ont été correctement quantifiés dans la plage définie par le Consensus ± 1 Déviation Standard (SD). Un échantillon (EBV12-02 et EBV12-03) a été quantifiée à ± 2 SD.

D'autres tests ont été faits en utilisant comme matériel de référence un panel de dilution EBV (QCMD 2012 Epstein Barr virus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Royaume Uni.) Chaque échantillon du panel a été utilisé dans 2 répétitions pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction, d'amplification, de révélation et d'interprétation des résultats avec «ELITe GALAXY» et les produits ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

| Essais avec produit de référence calibré et «ELITe GALAXY» | | | | |
|--|--|---------------------|-------------------------|--|
| Échantillon | Consensus des tests commerciaux conc. virale Log ₁₀ gEq / mL | Déviati on standard | Positifs / Réplications | Moyenne des résultats Log ₁₀ gEq / mL |
| EBV12-01 | EBV, 2,719 | 0,446 | 2/2 | 2,763 |
| EBV12-02 | EBV, 3,802 | 0,417 | 2/2 | 3,638 |
| EBV12-03 | EBV, 5,173 | 0,358 | 2/2 | 5,060 |
| EBV12-04 | EBV, 4,790 | 0,421 | 2/2 | 4,598 |
| EBV12-05 | EBV, 4,313 | 0,371 | 2/2 | 4,063 |
| EBV12-06 | EBV, 4,458 | 0,373 | 2/2 | 4,319 |
| EBV12-07 | EBV, 4,769 | 0,384 | 2/2 | 4,597 |
| EBV12-08 | EBV, 3,471 | 0,403 | 2/2 | 3,258 |
| EBV12-09 | EBV, 3,313 | 0,446 | 2/2 | 3,224 |
| EBV12-10 | Négatif, NA | - | 0/2 | - |

Tous les échantillons négatifs et positifs ont été détectés correctement en fonction des résultats quantitatifs définis par le consensus des dosages commerciaux.

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

REF RTS020PLD

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

| Essais avec produit de référence calibré et «ELITe GALAXY» | | | | |
|--|--|---------------------|-------------------------|--|
| Échantillon | Consensus des tests commerciaux conc. virale Log ₁₀ gEq / mL | Déviati on standard | Positifs / Réplications | Moyenne des résultats Log ₁₀ gEq / mL |
| EBV12-01 | EBV, 2,473 | 0,386 | 2/2 | 2,644 |
| EBV12-02 | EBV, 3,635 | 0,422 | 2/2 | 3,518 |
| EBV12-03 | EBV, 4,987 | 0,307 | 2/2 | 4,941 |
| EBV12-04 | EBV, 4,646 | 0,295 | 2/2 | 4,479 |
| EBV12-05 | EBV, 4,198 | 0,300 | 2/2 | 3,944 |
| EBV12-06 | EBV, 4,345 | 0,333 | 2/2 | 4,200 |
| EBV12-07 | EBV, 4,631 | 0,270 | 2/2 | 4,478 |
| EBV12-08 | EBV, 3,470 | 0,442 | 2/2 | 3,139 |
| EBV12-09 | EBV, 3,161 | 0,394 | 2/2 | 3,105 |
| EBV12-10 | Négatif, NA | - | 0/2 | - |

Tous les échantillons négatifs et positifs ont été détectés correctement en fonction des résultats quantitatifs définis par le consensus des dosages commerciaux.

Sensibilité analytique : Facteur de conversion en Unités Internationales

Le facteur de conversion à utiliser avec ce test pour transformer le résultat quantitatif de gEq / mL en Unités Internationales / mL a été défini comme 2,0 Unités Internationales / gEq en cas d'utilisation d'échantillons de sang total et du kit d'extraction manuelle «EXTRAblood», comme 2,2 Unités Internationales / gEq en cas d'utilisation d'échantillons de sang total et le système d'extraction automatique ELITe STAR; comme 0,8 Unités Internationales / gEq en cas d'utilisation d'échantillons de sang total et le système d'extraction automatique ELITe GALAXY; comme 1,7 Unités Internationales / gEq en cas d'utilisation d'échantillons de sang total et de l'automate d'extraction «NucliSENS® easyMAG®» et comme 0,6 Unités Internationales / gEq en cas d'utilisation d'échantillons de sang total et de l'automate d'extraction «QIASymphony® SP/AS», comme 2,0 Unités Internationales / gEq en cas d'utilisation d'échantillons de plasma et le système d'extraction automatique ELITe STAR; comme 0,7 Unités Internationales / gEq en cas d'utilisation d'échantillons de plasma et le système d'extraction automatique ELITe GALAXY; comme 2,26 Unités Internationales / gEq en cas d'utilisation d'échantillons de plasma prélevé dans un tube EDTA et de l'automate d'extraction «QIASymphony® SP/AS».

Sang total prélevé dans un tube EDTA

Le facteur de conversion a été déterminé en utilisant un panel de quatre dilutions (0,5 Log₁₀ entre deux dilutions) de matériel de référence calibré approuvé par l'OMS ("1st WHO International Standard for Epstein Barr virus for Nucleic Acid Amplification Techniques", NIBSC, Royaume Uni, code 09/260), sur sang total prélevé dans un tube EDTA.

Les quatre points du panel ont été utilisés dans 8 répétitions pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction et d'amplification, avec les produits ELITechGroup S.p.A.

L'analyse des données obtenues a permis de calculer un facteur de conversion moyen (Fc) égal à 2,0 Unités Internationales (UI) par gEq d'EBV détecté. Les résultats finaux sont reportés dans le tableau ci-dessous :

| Conversion en Unités Internationales avec sang total et «EXTRAblood» (Fc = 2,0 UI / gEq) | | | | |
|--|--|---------------------------|--------------------------|--|
| Concentr. attendue UI / mL | Concentr. attendue Log ₁₀ UI / mL | Quantité moyenne gEq / mL | Quantité moyenne UI / mL | Quantité moyenne Log ₁₀ UI / mL |
| 316.255 | 5,500 | 154.718 | 304.034 | 5,48 |
| 100.000 | 5,000 | 51.264 | 100.737 | 5,00 |
| 31.625 | 4,500 | 15.602 | 30.660 | 4,49 |
| 10.000 | 4,000 | 5.438 | 10.686 | 4,03 |

EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

Chaque points du panel ont été utilisés dans 8 réplications pour exécuter toute la procédure d'analyse: extraction, avec le système d'extraction automatique «**ELITe STAR**» et amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A.

L'analyse des données obtenues a permis de calculer un facteur de conversion moyen (Fc) égal à 2,2 Unités Internationales (UI) par gEq d'EBV détecté. Les résultats finaux sont reportés dans le tableau ci-dessous :

| Conversion en Unités Internationales avec sang total et «ELITe STAR» (Fc = 2,09 UI / gEq) | | | | |
|---|--|---------------------------|--------------------------|--|
| Concentr. attendue UI / mL | Concentr. attendue Log ₁₀ UI / mL | Quantité moyenne gEq / mL | Quantité moyenne UI / mL | Quantité moyenne Log ₁₀ UI / mL |
| 3.162 | 3,500 | 1.295 | 2.709 | 3,339 |
| 10.000 | 4,000 | 5.116 | 10.703 | 3,976 |
| 31.623 | 4,500 | 18.300 | 38.283 | 4,559 |
| 100.000 | 5,000 | 55.188 | 115.453 | 5,034 |
| 316.228 | 5,500 | 177.128 | 370.551 | 5,537 |

Chaque points du panel ont été utilisés dans 8 réplications pour exécuter toute la procédure d'analyse: extraction, avec le système d'extraction automatique «**ELITe GALAXY**» et amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A.

L'analyse des données obtenues a permis de calculer un facteur de conversion moyen (Fc) égal à 2,2 Unités Internationales (UI) par gEq d'EBV détecté. Les résultats finaux sont reportés dans le tableau ci-dessous :

| Conversion en Unités Internationales avec sang total et «ELITe GALAXY» (Fc = 0,89 UI / gEq) | | | | |
|---|--|---------------------------|--------------------------|--|
| Concentr. attendue UI / mL | Concentr. attendue Log ₁₀ UI / mL | Quantité moyenne gEq / mL | Quantité moyenne UI / mL | Quantité moyenne Log ₁₀ UI / mL |
| 3.162 | 3,500 | 3821 | 3400 | 3,518 |
| 10.000 | 4,000 | 13623 | 12124 | 4,101 |
| 31.623 | 4,500 | 32547 | 28967 | 4,460 |
| 100.000 | 5,000 | 120239 | 107013 | 5,028 |
| 316.228 | 5,500 | 281782 | 250786 | 5,390 |

Chaque points du panel ont été utilisés dans 8 réplications pour exécuter toute la procédure d'analyse: extraction, avec automate d'extraction «NucliSENS® easyMAG®» et amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A.

L'analyse des données obtenues a permis de calculer un facteur de conversion moyen (Fc) égal à 1,73 Unités Internationales (UI) par gEq d'EBV détecté. Les résultats finaux sont reportés dans le tableau ci-dessous :

| Conversion en Unités Internationales avec «NucliSENS® easyMAG®» (Fc = 1,7 UI / gEq) | | | | |
|---|--|---------------------------|--------------------------|--|
| Concentr. attendue UI / mL | Concentr. attendue Log ₁₀ UI / mL | Quantité moyenne gEq / mL | Quantité moyenne UI / mL | Quantité moyenne Log ₁₀ UI / mL |
| 316.255 | 5,500 | 212.198 | 366.796 | 5,56 |
| 100.000 | 5,000 | 56.930 | 98.407 | 4,99 |
| 31.625 | 4,500 | 20.334 | 35.148 | 4,55 |
| 10.000 | 4,000 | 4.734 | 8.183 | 3,91 |

EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

Chaque points du panel ont été utilisés dans 8 réplications pour exécuter toute la procédure d'analyse : extraction, avec automate d'extraction «**QIASymphony® SP/AS**» et amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A.

L'analyse des données obtenues a permis de calculer un facteur de conversion moyen (Fc) égal à 0,57 Unités Internationales (UI) par gEq d'EBV détecté, en utilisant échantillons de sang total. Les résultats finaux sont reportés dans le tableau ci-dessous :

| Conversion en Unités Internationales avec sang totale et «QIASymphony® SP/AS» (Fc = 1,8 UI / gEq) | | | | |
|---|--|---------------------------|--------------------------|--|
| Concentr. attendue UI / mL | Concentr. attendue Log ₁₀ UI / mL | Quantité moyenne gEq / mL | Quantité moyenne UI / mL | Quantité moyenne Log ₁₀ UI / mL |
| 316.255 | 5,500 | 203251 | 365852 | 5,563 |
| 100.000 | 5,000 | 61830 | 111294 | 5,046 |
| 31.625 | 4,500 | 18174 | 32713 | 4,515 |
| 10.000 | 4,000 | 4546 | 8183 | 3,913 |
| 3.162 | 3,500 | 1850 | 3330 | 3,522 |
| 1.000 | 3,000 | 575 | 1035 | 3,015 |

Plasma prélevé dans un tube EDTA

Le facteur de conversion a été déterminé en utilisant un panel de quatre dilutions (0,5 Log₁₀ entre deux dilutions) de matériel de référence calibré approuvé par l'OMS ("1st WHO International Standard for Epstein Barr virus for Nucleic Acid Amplification Techniques", NIBSC, Royaume Uni, code 09/260), sur plasma prélevé dans un tube EDTA.

Les quatre points du panel ont été utilisés dans 15 réplications pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction avec le système d'extraction automatique «**ELITe STAR**» et amplification les produits ELITechGroup S.p.A.

L'analyse des données obtenues a permis de calculer un facteur de conversion moyen (Fc) égal à 2,2 Unités Internationales (UI) par gEq d'EBV détecté. Les résultats finaux sont reportés dans le tableau ci-dessous :

| Conversion en Unités Internationales avec plasma et «ELITe STAR» (Fc = 2,15 UI / gEq) | | | | |
|---|--|---------------------------|--------------------------|--|
| Concentr. attendue UI / mL | Concentr. attendue Log ₁₀ UI / mL | Quantité moyenne gEq / mL | Quantité moyenne UI / mL | Quantité moyenne Log ₁₀ UI / mL |
| 316.255 | 5,500 | 167105 | 359275 | 5,537 |
| 100.000 | 5,000 | 45185 | 97147 | 4,961 |
| 31.625 | 4,500 | 17428 | 37470 | 4,555 |
| 10.000 | 4,000 | 4536 | 9753 | 3,993 |
| 3.162 | 3,500 | 1435 | 3084 | 3,454 |

Chaque points du panel ont été utilisés dans 15 réplications pour exécuter toute la procédure d'analyse: extraction, avec le système d'extraction automatique «**ELITe GALAXY**» et amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A.

L'analyse des données obtenues a permis de calculer un facteur de conversion moyen (Fc) égal à 2,2 Unités Internationales (UI) par gEq d'EBV détecté. Les résultats finaux sont reportés dans le tableau ci-dessous :

| Conversion en Unités Internationales avec plasma et «ELITe GALAXY» (Fc = 0,76 UI / gEq) | | | | |
|---|--|---------------------------|--------------------------|--|
| Concentr. attendue UI / mL | Concentr. attendue Log ₁₀ UI / mL | Quantité moyenne gEq / mL | Quantité moyenne UI / mL | Quantité moyenne Log ₁₀ UI / mL |
| 3.162 | 3,500 | 5610 | 4263 | 3,608 |
| 10.000 | 4,000 | 15554 | 11821 | 4,050 |
| 31.623 | 4,500 | 39837 | 30276 | 4,451 |
| 100.000 | 5,000 | 148584 | 112924 | 5,035 |
| 316.228 | 5,500 | 308566 | 234510 | 5,334 |

EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

Chaque points du panel ont été utilisés dans 8 réplifications pour exécuter toute la procédure d'analyse : extraction, avec automate d'extraction «QIASymphony® SP/AS» et amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A.

L'analyse des données obtenues a permis de calculer un facteur de conversion moyen (Fc) égal à 0,57 Unités Internationales (UI) par gEq d'EBV détecté. Les résultats finaux sont reportés dans le tableau ci-dessous :

| Conversion en Unités Internationales avec plasma et «QIASymphony® SP/AS» (Fc = 2,3 UI / gEq) | | | | |
|--|--|---------------------------|--------------------------|--|
| Concentr. attendue UI / mL | Concentr. attendue Log ₁₀ UI / mL | Quantité moyenne gEq / mL | Quantité moyenne UI / mL | Quantité moyenne Log ₁₀ UI / mL |
| 316.255 | 5,500 | 110.437 | 249.588 | 5,39 |
| 100.000 | 5,000 | 37.691 | 85.181 | 4,93 |
| 31.625 | 4,500 | 14.498 | 32.765 | 4,51 |
| 10.000 | 4,000 | 7.442 | 16.819 | 4,22 |

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

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

L'alignement des séquences des amorces et de la sonde fluorescente sur les séquences disponibles dans la banque de données du gène codant EBNA1 d'EBV, a démontré leur conservation et l'absence de mutations significatives.

Sensibilité diagnostique: échantillons positifs

La sensibilité diagnostique du test, ou la confirmation d'échantillons cliniques positifs, a été évaluée en utilisant plusieurs échantillons cliniques positifs ou rendu positifs avec l'ADN d'EBV. Elle est supérieure à 97,6%.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant, comme matériel de référence, 21 échantillons positifs pour l'ADN d'EBV (testés avec un kit d'amplification en temps réel marqué CE IVD), de sang total prélevé dans un tube EDTA et 21 échantillons négatifs de liquide céphalo-rachidien. Ces échantillons ont été rendus positifs grâce aux points EBV09-04, EBV09-05 et EBV09-06 du QCMD 2009 Epstein-Barr virus DNA EQA Panel (Qnostics Ltd, Écosse, Royaume Uni). Chaque échantillon a été testé en effectuant toute la procédure (extraction, amplification et analyse) avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

| Échantillons | N | positifs | négatifs |
|---|----|----------|----------|
| Sang total prélevé sur EDTA positif pour l'ADN d'EBV | 21 | 21 | 0 |
| Liquide céphalorachidien rendu positif pour l'ADN d'EBV | 21 | 21 | 0 |

Tous les échantillons positifs pour l'ADN d'EBV ont été correctement détectés comme positifs.

La sensibilité diagnostique de l'essai a été de 100%.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 31 échantillons de plasma et 31 échantillons sang total positifs pour l'ADN d'EBV (testés avec un kit d'amplification en temps réel marqué CE IVD). Chaque échantillon du panel a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction, avec «ELITE STAR» et d'amplification, avec les produits ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

| Échantillons | N | positifs | négatifs |
|--|----|----------|----------|
| Plasma prélevé sur EDTA positif pour l'ADN d'EBV | 31 | 29 | 2 |
| Sang total prélevé sur EDTA positif pour l'ADN d'EBV | 31 | 30 | 1 |

Trois échantillons ont rapporté un résultat négatif avec les produits ELITechGroup S.p.A. Cette divergence peut s'expliquer par le fait que le titre EBV de l'échantillon est proche ou inférieur au seuil de révélation de la méthode utilisée.

La sensibilité diagnostique de l'essai a été de 95,2%.

EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 30 échantillons de plasma et 32 échantillons sang total positifs pour l'ADN d'EBV (testés avec un kit d'amplification en temps réel marqué CE IVD). Chaque échantillon du panel a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction, avec «ELITE GALAXY» et d'amplification, avec les produits ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

| Échantillons | N | positifs | négatifs |
|--|----|----------|----------|
| Plasma prélevé sur EDTA positif pour l'ADN d'EBV | 30 | 29 | 2 |
| Sang total prélevé sur EDTA positif pour l'ADN d'EBV | 32 | 32 | 0 |

Un échantillon de plasma a donné un résultat négatif avec les produits ELITechGroup S.p.A. Cette divergence peut s'expliquer probablement une mauvaise conservation des échantillons.

La sensibilité diagnostique de l'essai a été de 98 %.

Spécificité analytique: marqueurs potentiellement interférents

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

L'alignement des séquences des amorces et de la sonde fluorescente avec des séquences d'organismes différents d'EBV, notamment celles des génomes complets d'HHV8 (le virus herpétique humain le plus semblable à EBV) a démontré leur spécificité et l'absence d'homologies significatives.

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

La spécificité analytique a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 20 échantillons de sang total prélevé dans un tube EDTA. Ces échantillons sont négatifs pour l'ADN de EBV mais positifs pour l'ADN de CMV et d'HHV6 (testés avec des kits d'amplification en temps réel marqués CE IVD). Chaque échantillon a été testé en effectuant toute la procédure (extraction, amplification et analyse) avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

| Échantillons | N | positifs | négatifs |
|---|----|----------|----------|
| Sang total prélevé sur EDTA positif pour l'ADN de CMV | 11 | 0 | 11 |
| Sang total prélevé sur EDTA positif pour l'ADN d'HHV6 | 9 | 0 | 9 |

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

Spécificité diagnostique: échantillons négatifs

La spécificité diagnostique du test, ou la confirmation d'échantillons cliniques négatifs, a été évaluée en utilisant plusieurs échantillons cliniques négatifs pour l'ADN d'EBV. Elle est égale à 97,9%.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant, comme matériel de référence, 29 échantillons négatifs pour l'ADN d'EBV (testés avec un kit d'amplification en temps réel marqué CE IVD), de sang total prélevé dans un tube EDTA et 21 échantillons de liquide céphalo-rachidien. Ces échantillons sont tous négatifs. Chaque échantillon a été testé en effectuant toute la procédure (extraction, amplification et analyse) avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

| Échantillons | N | positifs | négatifs |
|---|----|----------|----------|
| Sang total prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN d'EBV | 29 | 1 | 28 |
| Liquide céphalorachidien rendu négatif pour l'ADN d'EBV | 21 | 0 | 18 |

A partir d'une première session d'analyses, un échantillon de sang total a donné un résultat positif pour l'ADN d'EBV avec un titre très bas de l'ADN d'EBV (environ 3 copies / réaction). Lors d'une seconde session le même échantillon s'est avéré négatif. Le résultat divergent peut s'expliquer par le titre très bas de l'ADN d'EBV, inférieur au seuil de détection de la méthode de référence.

Trois échantillons de liquide céphalo-rachidien ont donné un résultat non valide suite à la probable présence d'un inhibiteur. La spécificité diagnostique de l'essai a été de 97,9 %.

EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant, comme matériel de référence, 40 échantillons de plasma prélevé dans un tube EDTA et 60 échantillons de sang total prélevé dans un tube EDTA négatifs pour l'ADN d'EBV (testés avec un kit d'amplification en temps réel marqué CE IVD). Ces échantillons sont tous négatifs. Chaque échantillon a été testé en effectuant toute la procédure d'analyse, d'extraction, avec «**ELITe STAR**» et d'amplification, avec les produits ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

| Échantillons | N | positifs | négatifs |
|--|----|----------|----------|
| Plasma prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN d'EBV | 40 | 0 | 40 |
| Sang total prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN d'EBV | 60 | 3 | 53 |

Quatre échantillons ont donné un résultat non valide. Trois échantillons de sang total ont été positifs discordants (58 gEq / mL, 107 gEq / mL e 37 gEq / mL, respectivement). Le résultat divergent peut s'expliquer par le titre très bas de l'ADN d'EBV, inférieur au seuil de détection de la méthode de référence. Par conséquent, ces échantillons peuvent apporter au hasard un résultat négatif ou positif. Les résultats discordants peuvent être expliqués en considérant que le virus EBV est largement répandu parmi la population sous forme latente. La spécificité diagnostique de l'essai a été de 96,9 %.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant, comme matériel de référence, 30 échantillons de plasma prélevé dans un tube EDTA et 32 échantillons de sang total prélevé dans un tube EDTA négatifs pour l'ADN d'EBV (testés avec un kit d'amplification en temps réel marqué CE IVD). Ces échantillons sont tous négatifs. Chaque échantillon a été testé en effectuant toute la procédure d'analyse, d'extraction, avec «**ELITe GALAXY**» et d'amplification, avec les produits ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

| Échantillons | N | positifs | négatifs |
|--|----|----------|----------|
| Plasma prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN d'EBV | 30 | 0 | 30 |
| Sang total prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN d'EBV | 32 | 1 | 31 |

Un échantillon positif de sang total donné un résultat en désaccord (18 gEq / mL). Cette échantillon a une titre très bas de l'ADN d'EBV, inférieur au seuil de détection de la méthode de référence. Par conséquent, ces échantillons peuvent apporter au hasard un résultat négatif ou positif. Les résultats discordants peuvent être expliqués en considérant que le virus EBV est largement répandu parmi la population sous forme latente. La spécificité diagnostique de l'essai a été de 98 %.

Remarque: Les données et les résultats complets des essais effectués pour l'évaluation des caractéristiques des performances du produit avec les matrices et les instruments ont été enregistrés dans le Fascicule Technique de Produit "EBV ELITe MGB® Kit", FTP RTS020PLD.

EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

Roche cobas z 480 analyzer

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES**Échantillons**

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

Sang total prélevé sur EDTA

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

Remarque: pour procéder à l'extraction de l'ADN des échantillons de sang total à l'aide de l'instrument «**MagNA Pure 24 System**» et de la **version du logiciel 1.0** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction «**Pathogen200**» et suivez ces instructions: distribuer **350 µl** d'échantillon dans le tube MagNA Pure de 2,0 ml, charger le tube dans l'instrument et commencer l'extraction. Ce protocole comprend le traitement de 200 µl d'échantillon, l'ajout du **CPE** à 20 µl/extraction et l'élution des acides nucléiques dans 100 µl. Le **CPE** doit être dilué à 1:2 dans de l'eau ultra-pure de qualité pour biologie moléculaire. Pour plus de détails sur la procédure d'extraction, suivez scrupuleusement les instructions contenues dans le manuel d'utilisation du kit.

Plasma collecté dans EDTA

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

Remarque: pour procéder à l'extraction de l'ADN des échantillons de plasma à l'aide de l'instrument «**MagNA Pure 24 System**» et de la **version du logiciel 1.0** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction «**Pathogen200**» et suivez ces instructions: distribuer **350 µl** d'échantillon dans le tube MagNA Pure de 2,0 ml, charger le tube dans l'instrument et commencer l'extraction. Ce protocole comprend le traitement de 200 µl d'échantillon, l'ajout du **CPE** à 20 µl/extraction et l'élution des acides nucléiques dans 100 µl. Le **CPE** doit être dilué à 1:2 dans de l'eau ultra-pure de qualité pour biologie moléculaire. Pour plus de détails sur la procédure d'extraction, suivez scrupuleusement les instructions contenues dans le manuel d'utilisation du kit.

Substances interférentes

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

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

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

Contrôles d'amplification

Il est absolument indispensable de valider chaque session d'amplification avec une réaction de contrôle négatif et une réaction de contrôle positif.

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

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

Contrôles de qualité

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

PROCÉDURE**Paramétrage de la session d'amplification en temps réel**

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

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

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

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

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

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

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

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

Remarque: afin de déterminer la concentration de l'ADN dans l'échantillon source, il est nécessaire d'exécuter un ensemble de réactions avec l'étalon **Q - PCR Standard** (10⁵ copies, 10⁴ copies, 10³ copies, 10² copies) pour obtenir la **courbe d'étalonnage**.

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

| | | | | | | | | | | | |
|----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----|----|----|----|-----|-----|-----|
| C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | C9 | C10 | C11 | C12 |
| NC | 10 ² | 10 ³ | 10 ⁴ | 10 ⁵ | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |

Légende: C1 - C12: échantillons à analyser; NC: contrôle d'amplification négatif; 10²: étalon à 10² copies; 10³: étalon à 10³ copies; 10⁴: étalon à 10⁴ copies; 10⁵: étalon à 10⁵ copies.

Paramétrage de l'amplification

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

Avant de commencer la session, il est nécessaire de:

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

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

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

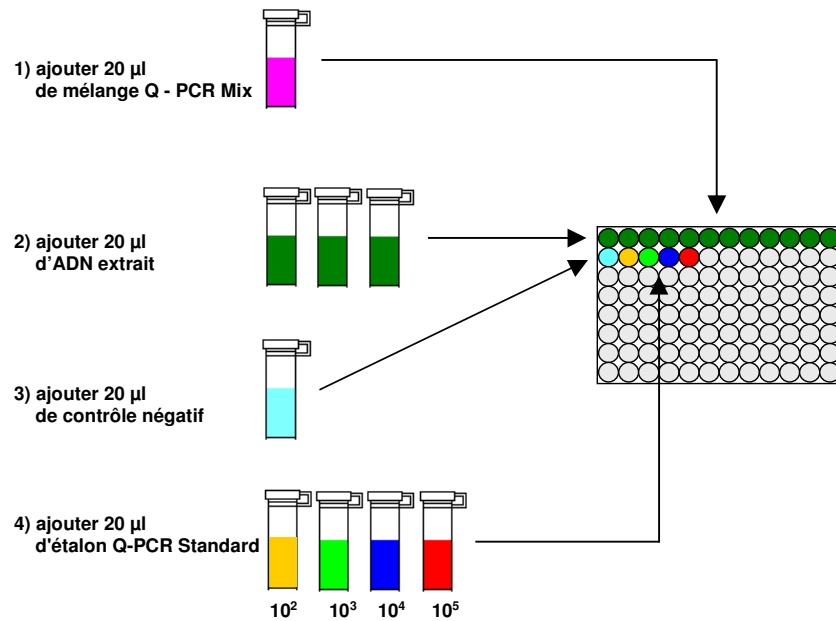
2. En le déposant avec précision dans le mélange réactionnel, transférer **20 µl** de l'**ADN extrait** du premier échantillon dans le puits correspondant de la **plaque AD**, comme précédemment établi dans le **Plan de travail**. Bien mélanger l'échantillon en pipetant l'**ADN extrait** à trois reprises dans le mélange réactionnel. Veiller à ne pas introduire de bulles. Procéder de la même manière avec tous les autres **ADN extraits**.
3. En le déposant avec précision dans le mélange réactionnel, transférer **20 µl** d'**eau ultra-pure de qualité pour biologie moléculaire** (non fournie avec le produit) dans le puits de la **plaque AD** contenant le contrôle d'amplification négatif, comme précédemment établi dans le **Plan de travail**. Bien mélanger le puits de contrôle négatif en pipetant l'**eau ultra-pure de qualité pour biologie moléculaire** à trois reprises dans le mélange réactionnel. Veiller à ne pas introduire de bulles.
4. En fonction du type de résultat souhaité (qualitatif ou quantitatif), suivez l'une des deux options:
 - Lorsqu'un résultat d'analyse **qualitatif** est requis (détection de l'ADN du EBV): transférer, en les déposant soigneusement dans le mélange réactionnel, **20 µL** de **EBV - Positive Control** ou bien **EBV - ELITe Positive Control RF**, dans le puits correspondant de la **plaque AD** comme précédemment établi sur le **Plan de travail**. Bien mélanger le contrôle positif en pipetant le **EBV - Positive Control** trois fois dans le mélange réactionnel. Attention à ne pas créer de bulles.

- Lorsqu'un résultat **quantitatif** de l'analyse est requis (quantification de l'ADN du VZV): transférer, en les déposant soigneusement dans le mélange réactionnel, **20 µL** de **EBV Q - PCR Standard 10²** dans le puits correspondant de la **plaque AD** comme précédemment établi dans le **Plan de travail**. Mélanger le puits standard en pipetant le **EBV Q - PCR Standard 10²** trois fois dans le mélange réactionnel. Attention à ne pas créer de bulles. Procédez de la même manière avec les **EBV Q - PCR Standard 10³, 10⁴, 10⁵**.

5. Sceller soigneusement la **plaque AD** à l'aide du **film de scellage**.
6. Transférer la **plaque AD** dans le thermocycleur en temps réel installé dans la zone d'amplification/de détection des produits d'amplification et lancer le cycle thermique d'amplification, en enregistrant les paramètres de la session sous un identifiant unique et reconnaissable (par exemple, «année-mois-jour-VZV-EGSpA»).

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

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



Analyse qualitative des résultats

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

Sélectionner le menu «Analysis» et choisir «Absolute Quant/Fit Points» (Absolute Quant/Fit Points) (2 points).

Sélectionner le groupe d'échantillons à analyser.

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

- saisir manuellement la plage de calcul (bouton Background) du **Background Fluorescence Level** du cycle 2 au cycle 6.

Pour les échantillons de **plasma**

- paramétrer manuellement le **Threshold** et la **Noiseband** pour le détecteur «HSV1» FAM à **0,55**;
- paramétrer manuellement le **Threshold** et la **Noiseband** pour le détecteur «IC» VIC à **1,2**.

Pour les échantillons de **sang total**

- paramétrer manuellement le **Threshold** et la **Noiseband** pour le détecteur «HSV1» FAM à **0,80**;
- paramétrer manuellement le **Threshold** et la **Noiseband** pour le détecteur «IC» VIC à **1,5**.

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

Les valeurs **Ct** pour ADV dans les réactions d'amplification des quatre étalons **Q - PCR Standard** sont utilisées pour calculer la **courbe d'étalonnage** (Results > Standard Curve) de la session d'amplification et pour valider l'amplification et la détection, comme indiqué dans le tableau suivant :

| Réaction Q - PCR Standard 10 ⁵ détecteur «EBV» | Résultat d'analyse | Amplification/Détection |
|---|--------------------|-------------------------|
| Ct ≤ 25 | POSITIF | CORRECT |

Si le résultat de la réaction d'amplification du **contrôle positif** est **Ct > 25** ou **Ct indéterminé** pour HSV1, l'ADN cible n'a pas été correctement détecté. Cela signifie que des problèmes sont survenus pendant l'étape d'amplification ou de détection (distribution incorrecte du mélange réactionnel ou du contrôle positif, dégradation du mélange réactionnel ou du contrôle positif, paramétrage incorrect de la position du contrôle positif, paramétrage incorrect du cycle thermique), ce qui peut générer des résultats incorrects. La session n'est pas valide et doit être répétée en commençant par l'étape d'amplification.

* **Remarque:** lorsque ce produit est utilisé pour la quantification de l'ADN de HSV1, les réactions des étalons **Q - PCR Standard** sont paramétrées à la place de la réaction du **contrôle positif**. Dans ce cas, valider l'amplification et la détection en se reportant à la réaction d'amplification de l'étalon **Q - PCR Standard 10⁵** (Ct ≤ 25).

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

| Réaction du contrôle négatif détecteur «EBV» | Résultat d'analyse | Amplification/Détection |
|--|--------------------|-------------------------|
| Ct Indéterminé | NÉGATIF | CORRECT |

Si le résultat de la réaction d'amplification du **contrôle négatif** est autre que **Ct indéterminé** pour HSV1, la présence de la cible d'ADN a été détectée. Des problèmes sont survenus pendant l'étape d'amplification (contamination), ce qui peut générer des résultats incorrects et des faux-positifs. La session n'est pas valide et doit être répétée en commençant par l'étape d'amplification.

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

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

EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

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

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

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

Si le résultat de la réaction d'amplification d'un échantillon est **Ct indéterminé** pour EBV et **Ct ≤ 35** pour le contrôle interne, l'ADN de EBV 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 de EBV soit présent à une concentration inférieure à la limite de détection du produit (se reporter à la section «Caractéristiques de performance»). Dans ce cas, le résultat constituerait un faux-négatif.

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

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

Analyse quantitative des résultats

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

Si le résultat de la réaction d'amplification de l'étalon **Q - PCR Standard 10⁵** est **Ct > 25** ou **Ct indéterminé** ou si les valeurs Ct des quatre étalons Q - PCR Standard ne sont pas régulièrement ajustées sur la courbe d'étalonnage, la cible d'ADN n'a pas été détectée correctement. Des problèmes sont survenus pendant l'étape d'amplification ou de détection (distribution incorrecte du mélange réactionnel ou des étalons, dégradation du mélange réactionnel ou des étalons, paramétrage incorrect des positions des étalons, paramétrage incorrect du cycle thermique), ce qui peut générer des résultats incorrects. La session n'est pas valide et doit être répétée en commençant par l'étape d'amplification.

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

EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

Ce produit est capable de quantifier 1.000.000 à environ 10 copies par réaction, 25.000.000 à 250 copies par ml de sang total en utilisant le système d'extraction **MagNA Pure 24** (se reporter à la section «Caractéristiques de performance»), comme indiqué dans le tableau suivant:

| Résultats de l'échantillon détecteur «EBV» FAM | Copies de EBV par réaction |
|--|----------------------------|
| Quantité > 1 x 10 ⁶ | PLUS DE 1.000.000 |
| 1,0 x 10 ¹ ≤ Quantité ≤ 1 x 10 ⁶ | = Quantité |
| Quantité < 1,0 x 10 ¹ | MOINS DE 10 |

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

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

dans laquelle:

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

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

Ve est le volume total obtenu à partir de l'extraction **exprimé en µl**;

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

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

En cas d'utilisation d'échantillons de sang total prélevé sur EDTA et du système d'extraction **MagNA Pure 24**, et si le résultat doit être **exprimé en copies/ml**, la formule est alors:

Formule simplifiée pour le sang total et MagNA Pure 24

$$Nc \text{ (copies/ml)} = 25 \times \text{Quantité}$$

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE**Sensibilité analytique: limite de détection**

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

La sensibilité analytique de ce test, en tant que limite de détection, a été testée en utilisant un ADN plasmidique contenant le produit d'amplification dont la concentration initiale a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. L'ADN plasmidique a été dilué à une concentration de 10 copies/20 µl dans 150.000 copies de pBETAGLOBIN / 20 µl. Cet échantillon a été utilisé en 18 réplicats afin de réaliser une amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. Les résultats finaux sont résumés dans le tableau suivant.

| Échantillons | N | positifs | négatifs |
|--|----|----------|----------|
| 10 copies d'ADN plasmidique + 150.000 copies de bêta-globine | 18 | 18 | 0 |

La sensibilité analytique du test avec le sang total et les matrices de plasma a été vérifiée en utilisant un panel de dilution EBV et en association avec **MagNA Pure 24**. Le panel a été préparé en diluant le «1er standard international de l'OMS pour le virus Barr d'Epstein humain pour l'acide nucléique Techniques d'amplification "(NIBSC, Royaume-Uni, code 09/260) dans la matrice négative EBV DNA. Le panel était composé de six points autour de la concentration limite et chaque point du panel a été testé en 12 répétitions effectuant la procédure entière d'analyse: extraction avec le système d'extraction automatique **MagNA Pure 24** et amplification avec les produits ELITechGroup SpA L'analyse statistique a été réalisée avec la régression Probit. La limite de détection a été définie comme la concentration à laquelle la probabilité d'obtenir un résultat positif est de 95%.

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

| Limite de détection avec MagNA Pure 24 (UI / mL) | | | |
|--|-------------------|-------------------------------|-------------------|
| Matrice | 95% de positivité | Intervalle de confiance à 95% | |
| | | valeur inférieure | valeur supérieure |
| sangue intero | 143 UI / mL | 87 UI / mL | 413 UI / mL |
| plasma | 163 UI / mL | 82 UI / mL | 1137 UI / mL |

La sensibilité analytique exprimée en copies / ml est calculée en appliquant le facteur de conversion spécifique indiqué à la page 55.

La sensibilité analytique de chaque matrice en copies / ml est indiquée ci-dessous.

| Limite de détection avec MagNA Pure 24 (copie / mL) | | | |
|---|-------------------|-------------------------------|-------------------|
| Matrice | 95% de positivité | Intervalle de confiance à 95% | |
| | | valeur inférieure | valeur supérieure |
| sangue intero | 102 copie / mL | 62 copie / mL | 295 copie / mL |
| plasma | 125 copie / mL | 63 copie / mL | 875 copie / mL |

Sensibilité analytique: plage de mesure linéaire

La sensibilité analytique de ce test, en tant que plage de mesure linéaire, permet de quantifier environ 1.000.000 à 10 copies dans 20 µl d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La sensibilité analytique de ce test a été évaluée en utilisant un panel de dilutions (1 log₁₀ d'une dilution à l'autre) d'un ADN plasmidique contenant le produit d'amplification, dont la concentration initiale a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. Les points du panel de 10⁷ molécules par réaction à 10¹ molécules par réaction ont été utilisés en 9 réplicats afin de réaliser une amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. Une analyse des données obtenues, utilisant une régression linéaire, a montré que le test présentait une réponse linéaire pour tous les points du panel (coefficient de corrélation linéaire supérieur à 0,99).

La limite inférieure de la plage de mesure linéaire a été définie à environ 10 copies / réaction à plus ou moins un logarithme de la concentration la plus faible de l'étalon d'amplification Q - PCR Standard (10² copies / 20 µl).

La limite supérieure de la plage de mesure linéaire a été définie à 10⁶ copies / réaction à plus ou moins un logarithme de la concentration la plus élevée de l'étalon d'amplification Q - PCR Standard (10⁵ copies / 20 µl).

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

| Plage de mesure linéaire en utilisant MagNA Pure 24 | | |
|---|-------------------|-------------------|
| | Limite inférieure | Limite supérieure |
| copies / ml | 250 | 25.000.000 |
| copies / réaction | 10 | 1.000.000 |

Les conversions de «copies / ml» en «copies / réaction», et vice-versa, ont été calculées comme indiqué à la page 51.

La linéarité du test avec les différentes matrices a été vérifiée à l'aide d'un panel de dilution EBV et en association avec MagNA Pure 24. Le panel a été préparé en diluant le "1er standard international de l'OMS pour le virus Barr d'Epstein humain pour les techniques d'amplification des acides nucléiques" (NIBSC, UK, code 09/260) dans une matrice négative pour l'ADN d'EBV. Le panel avait 5 niveaux de dilution de 1 Log de 10⁶ à 10² UI / mL. Chaque point du panel a été testé en 4 répétitions en effectuant la toute la procédure d'analyse: extraction avec le système d'extraction automatique MagNA Pure 24 et amplification avec les produits ELITechGroup SpA. L'analyse des données obtenues, réalisée par régression linéaire, a montré que le test a une réponse linéaire pour tous les points du panel au-dessus de la limite de détection.

Limite de quantification

La limite inférieure de la plage de mesure linéaire a été fixée à la concentration la plus basse qui présente une positivité de 100% et des résultats quantitatifs suffisamment précis et précis. La limite supérieure de la plage de mesure linéaire a été fixée à la concentration la plus élevée testée, ce qui fournit des résultats quantitatifs suffisamment précis et précis.

Les limites de la plage de mesure linéaire en copies / ml ont été calculées en appliquant le facteur de conversion spécifique indiqué à la page 55 pour chaque matrice

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

| Plage de mesure linéaire avec échantillons de sang total et MagNA Pure 24 | | |
|---|-------------------|-------------------|
| Unité de mesure | Limite inférieure | Limite supérieure |
| UI / mL | 178 | 1.000.000 |
| copies / mL | 127 | 714.286 |

| Plage de mesure linéaire avec échantillons de plasma et MagNA Pure 24 | | |
|---|-------------------|-------------------|
| Unité de mesure | Limite inférieure | Limite supérieure |
| UI / mL | 178 | 1.000.000 |
| copies / mL | 137 | 769.231 |

Sensibilité analytique: précision et exactitude

La précision de ce test, en termes de variabilité des résultats obtenus dans la même session d'amplification en utilisant différents réplicats d'un échantillon, a permis d'obtenir un pourcentage de coefficient de variation moyen (% CV) des valeurs Ct inférieur à 2% dans la plage de 10⁶ molécules à 10¹ molécules dans 20 µl d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La précision de ce test, en termes de variabilité des résultats obtenus dans la même session d'amplification en utilisant différents réplicats d'un échantillon, a permis d'obtenir un pourcentage de coefficient de variation moyen (% CV) des quantités mesurées d'environ 11 % dans la plage de 10⁶ molécules à 10¹ molécules dans 20 µl d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

L'exactitude de ce test, en termes de différence entre la moyenne des résultats obtenus dans la même session d'amplification en utilisant différents réplicats d'un échantillon et la valeur de la concentration théorique d'un échantillon, a permis d'obtenir un pourcentage d'inexactitude moyen de la quantité mesurée d'environ 1,1% dans la plage de 10⁶ molécules à 10¹ molécules dans 20 µl d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

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

Sensibilité analytique: reproductibilité avec un matériel de référence certifié

La sensibilité analytique du test a été évaluée en utilisant le «EBV Molecular« Q »Panel» (Qnostics, Ltd, Royaume-Uni) comme matériau de référence étalon. Chaque échantillon de panel a été testé en 2 répétitions effectuant toute la procédure d'analyse: extraction avec le système d'extraction automatique MagNA Pure 24 et amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats en UI / ml ont été déterminés en appliquant le facteur de conversion pour le système MagNA Pure 24 et le plasma et sont présentés dans le tableau suivant.

| Tests avec matériel de référence certifié et MagNA Pure 24 | | | | |
|--|-----------------------|---|---------------------|---|
| Échantillon | Titre nominal UI / mL | Titre nominal Log ₁₀ UI / mL | Positif / Réplicats | Moyenne des résultats Log ₁₀ UI / mL |
| EBVMQP01-High | 36.577 | 4,560 | 2/2 | 4,586 |
| EBVMQP01-Medium | 3.657 | 3,560 | 2/2 | 3,553 |
| EBVMQP01-Low | 365 | 2,560 | 2/2 | 2,664 |
| EBVMQP01-Negative | Négatif | - | 0/2 | - |

Tous les échantillons ont été correctement détectés comme positifs pour un titre qui se situe dans la plage de valeurs attendues ± 0,5 Log.

EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

D'autres tests ont été effectués en utilisant comme référence un panneau calibré «AcroMetrix® EBVtc Panel» (Acrometrix, Life Technologies; États-Unis). Chaque échantillon de panel a été testé en 2 répétitions effectuant toute la procédure d'analyse: extraction avec le système d'extraction automatique **MagNA Pure 24** et amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats en UI / ml ont été déterminés en appliquant le facteur de conversion pour le système **MagNA Pure 24** et le plasma et sont présentés dans le tableau suivant.

| Tests avec matériau de référence certifié et MagNA Pure 24 | | | | |
|--|-----------------------|---|---------------------|---|
| Échantillon | Titre nominal UI / mL | Titre nominal Log ₁₀ UI / mL | Positif / Réplicats | Moyenne des résultats Log ₁₀ UI / mL |
| Acrometrix EBV 1E6 | 10 ⁶ | 6,000 | 2/2 | 5,987 |
| Acrometrix EBV 1E5 | 10 ⁵ | 5,000 | 2/2 | 5,152 |
| Acrometrix EBV 1E4 | 10 ⁴ | 4,000 | 2/2 | 4,208 |
| Acrometrix EBV 1E3 | 10 ³ | 3,000 | 2/2 | 3,147 |
| Acrometrix EBV 1E2 | 10 ² | 2,000 | 2/2 | 2,246 |

Tous les échantillons ont été correctement détectés comme positifs pour un titre qui se situe dans la plage de valeurs attendues ± 0,5 Log.

D'autres tests ont été effectués en utilisant le panel EQA ADN du virus Epstein-Barr (Qnostics Ltd, Royaume-Uni), un panel de dilution d'EBV comme matériau de référence calibré. Chaque échantillon de panel a été testé en 2 répétitions effectuant toute la procédure d'analyse: extraction avec le système d'extraction automatique **MagNA Pure 24** et amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats en UI / ml ont été déterminés en appliquant le facteur de conversion pour le système **MagNA Pure 24** et le plasma et sont présentés dans le tableau suivant.

| Tests avec matériau de référence certifié et MagNA Pure 24 | | | |
|--|---|---------------------|---|
| Échantillon | Consensus virus conc. Log ₁₀ UI / mL | Positif / Réplicats | Moyenne des résultats Log ₁₀ UI / mL |
| EBVDNA17S-01 | 3,885 | 2/2 | 3,884 |
| EBVDNA17S-02 | 3,906 | 2/2 | 3,742 |
| EBVDNA17S-03 | 2,903 | 2/2 | 2,928 |
| EBVDNA17S-04 | 2,952 | 2/2 | 2,819 |
| EBVDNA17S-05 | 2,181 | 2/2 | 1,817 |
| EBVDNA17S-06 | 3,215 | 2/2 | 3,188 |
| EBVDNA17S-07 | 3,899 | 2/2 | 3,974 |
| EBVDNA17S-08 | 2,315 | 2/2 | 1,908 |
| EBVDNA17S-09 | - | 0/2 | - |
| EBVDNA17S-10 | 2,333 | 2/2 | 2,184 |

Tous les échantillons ont été correctement détectés comme positifs pour un titre qui se situe dans la plage de valeurs attendues ± 0,5 Log.

Facteur de conversion en unités internationales

Le facteur de conversion à utiliser avec ce test pour transformer le résultat quantitatif des copies / ml en unités internationales / ml a été déterminé en utilisant un panel de matériel de référence étaloné approuvé par l'OMS ("1st WHO International Standard for Epstein-Barr Virus (EBV) for Nucleic Acid Amplification Techniques", NIBSC, Royaume-Uni, code 09/162) dans les différentes matrices négatives pour l'ADN d'EBV et en association avec **MagNA Pure 24**. Le panel avait 6 étapes de dilution de 1 Log. Chaque point du panel a été testé en 16 répétitions effectuant la procédure d'analyse complète: extraction avec le système d'extraction automatique **MagNA Pure 24** et amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A.

L'analyse des données obtenues a permis de calculer un facteur de conversion moyen (Fc) égal à

1.4 Unités internationales (UI) pour les copies d'EBV détectées avec des échantillons de **sang total**. Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant.

EBV ELITe MGB® Kit

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

REF RTS020PLD

Conversion en unités internationales avec sang total et «MagNA Pure 24» (Fc = 1,4 UI / copies)

| Conc. attendre UI / mL | Conc. attendre Log ₁₀ UI / mL | Quantité moyenne copies / mL | Quantité moyenne UI / mL | Quantité moyenne Log ₁₀ UI / mL |
|------------------------|--|------------------------------|--------------------------|--|
| 111.055 | 5,046 | 81.828 | 119.952 | 5,074 |
| 34.903 | 4,543 | 26.663 | 38.395 | 4,575 |
| 10.970 | 4,040 | 7.705 | 11.095 | 4,033 |
| 3.448 | 3,538 | 2.275 | 3.276 | 3,503 |
| 1.084 | 3,035 | 711 | 1.024 | 2,994 |
| 341 | 2,532 | 275 | 395 | 2,572 |

L'analyse des données obtenues a permis de calculer un facteur de conversion moyen (Fc) égal à **1,3** Unités internationales (UI) pour les copies d'EBV détectées avec des échantillons de plasma. Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant.

Conversion en unités internationales avec plasma et «MagNA Pure 24» (Fc = 1,3 UI / copies)

| Conc. attendre UI / mL | Conc. attendre Log ₁₀ UI / mL | Quantité moyenne copies / mL | Quantité moyenne UI / mL | Quantité moyenne Log ₁₀ UI / mL |
|------------------------|--|------------------------------|--------------------------|--|
| 111.055 | 5,046 | 77.250 | 101.313 | 4,993 |
| 34.903 | 4,543 | 26.743 | 34.766 | 4,523 |
| 10.970 | 4,040 | 8.462 | 11.000 | 4,028 |
| 3.448 | 3,538 | 2.616 | 3.401 | 3,519 |
| 1.084 | 3,035 | 687 | 893 | 2,937 |
| 341 | 2,532 | 255 | 332 | 2,486 |

Sensibilité diagnostique: confirmation des échantillons positifs

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant 34 échantillons de sang total négatifs pour l'EDTA qui étaient négatifs pour l'ADN d'EBV comme matériau de référence et a ajouté «1ère Norme internationale de l'OMS pour le virus d'Epstein-Barr pour l'amplification des acides nucléiques Techniques (NIBSC, UK, code 09/260) et 30 échantillons de plasma prélevés dans l'EDTA négatif pour l'ADN EBV, qui étaient positifs pour l'ADN EBV en ajoutant «1er standard international de l'OMS pour le virus d'Epstein-Barr pour l'acide nucléique Techniques d'amplification (NIBSC, Royaume-Uni, code 09/260).

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

| Échantillons | N | positifs | négatifs |
|--|----|----------|----------|
| Sang total prélevé sur EDTA dopé par de l'ADN de EBV | 34 | 34 | 0 |
| Plasma prélevé sur EDTA dopé par de l'ADN de EBV | 30 | 30 | 0 |

Tous les échantillons étaient valides.

Tous les échantillons de sang total et de plasma ont été confirmés positifs pour l'ADN d'EBV.

La sensibilité diagnostique totale du test était de 100%.

Spécificité diagnostique: confirmation des échantillons négatifs

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant 34 échantillons d'EDTA présumés négatifs pour l'ADN d'EBV et 31 échantillons de plasma EDTA présumés négatifs pour l'ADN d'EBV comme matériel de référence.

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

| Échantillons | N | positifs | négatifs |
|---|----|----------|----------|
| Sang total prélevé sur EDTA présumé négatif pour l'ADN de EBV | 34 | 0 | 34 |
| Plasma prélevé sur EDTA présumé négatif pour l'ADN de EBV | 31 | 1 | 30 |

Tous les échantillons de sang total étaient valides dans la première analyse et étaient négatifs pour l'ADN d'EBV.

La spécificité diagnostique du test en association avec la matrice de sang total dans ce test était égale à 100%.

Tous les échantillons de plasma étaient valides dans la première analyse. Trente (30) des 31 échantillons de plasma ont été confirmés négatifs pour l'ADN d'EBV, tandis qu'un échantillon était positif discordant.

La spécificité diagnostique du test en association avec la matrice plasmatique dans ce test était égale à 96,8%.

La spécificité diagnostique totale du test était égale à 98,5%.

Remarque: Les données et les résultats complets des essais effectués pour l'évaluation des caractéristiques des performances du produit avec les matrices et les instruments ont été enregistrés dans la Fascicule Technique de Produit "VZV ELITe MGB® Kit", FTP RTS035PLD.

BIBLIOGRAPHIE

- S. W. Aberle et al (2002) *J Clin Virology* 25: S79 - S85.
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Utiliser uniquement de l'ADN extrait à partir des échantillons cliniques suivants: sang total prélevé dans un tube EDTA, plasma prélevé dans un tube EDTA et liquide céphalo-rachidien.

Ne pas utiliser de l'ADN extrait d'échantillons contenant de l'héparine: l'héparine inhibe la réaction d'amplification des acides nucléiques et engendre des résultats erronés.

Ne pas utiliser de l'ADN contaminé par de l'hémoglobine, du dextran, du Ficoll®, de l'éthanol ou du 2-propanol: ces substances inhibent la réaction d'amplification des acides nucléiques et peuvent engendrer des résultats erronés.

Ne pas utiliser de l'ADN contenant des quantités élevées d'ADN génomique humain car l'ADN génomique peut inhiber la réaction d'amplification des acides nucléiques.

Aucune donnée n'est disponible pour les performances de ce produit avec de l'ADN extrait des échantillons cliniques suivants: suspensions de leucocytes, suspensions de lymphomonocytes.

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

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

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

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

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

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

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

Les différentes technologies présentant des différences intrinsèques, avant de passer à un nouveau produit il est conseillé de procéder à des études de corrélation pour estimer ces différences.

Un résultat négatif obtenu avec ce produit indique que de l'ADN d'EBV n'a pas été détecté. Il ne faut pas exclure que de l'ADN d'EBV soit présent à un titre inférieur au seuil de détection du produit (voir Caractéristiques des performances, page 17); dans ce cas, le résultat serait un faux négatif.

Un résultat non valable obtenu avec ce produit indique qu'il n'a pas été possible de relever efficacement l'ADN du Contrôle Interne ; dans ce cas, l'analyse de l'échantillon devra être répétée à partir de l'extraction avec d'éventuels retards dans l'obtention du résultat.

Les polymorphismes éventuels de la région du génome viral dans lequel hybrident les oligonucléotides d'amorçage et la sonde du produit pourraient compromettre la détection et la quantification de l'ADN d'EBV.

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

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

PROBLÈMES ET SOLUTIONS

L'ADN cible n'est pas détecté dans la réaction des Q - PCR Standard ou le Coefficient de corrélation de la Courbe standard n'est pas valide

| Causes éventuelles | Solutions |
|--|--|
| Erreur de distribution dans la microplaque. | Distribuer soigneusement les réactifs dans la microplaque en suivant la grille de travail. Vérifier le volume du mélange de réaction distribué. Vérifier le volume du contrôle positif ou des standards distribué. |
| Configuration de session incorrecte sur ELITe InGenius | Vérifiez la position du mélange réactionnel, du contrôle positif ou des étalons. Vérifiez les volumes de mélange réactionnel, de contrôle positif ou d'étalons. |
| Dégradation de la sonde. | Utiliser un nouveau tube de mélange de réaction. |
| Dégradation du contrôle positif ou du standard. | Utiliser un nouveau tube de standard. |
| Erreur de paramétrage de l'instrument. | Vérifier le paramétrage de la position des standards. Vérifier le paramétrage du cycle de température. |
| Erreur d'instrument. | Contactez le service technique ELITechGroup. |

L'ADN cible est détecté dans la réaction du Contrôle négatif

| Causes éventuelles | Solutions |
|--|--|
| Erreur de distribution dans la microplaque. | Éviter de répandre le contenu des tubes d'échantillons. Changer toujours d'embout entre deux échantillons Distribuer soigneusement les échantillons, le contrôle négatif et les standards dans la microplaque en suivant la grille de travail. |
| Configuration de session incorrecte sur ELITe InGenius | Vérifiez la position du mélange réactionnel ou du contrôle négatif. Vérifiez les volumes de mélange réactionnel ou de contrôle négatif. |
| Erreur de paramétrage de l'instrument. | Vérifier le paramétrage de la position des échantillons, du contrôle négatif et des standards. |
| Microplaque mal scellée. | Sceller méticuleusement la microplaque. |
| Contamination de l'eau ultra pure pour la biologie. | Utiliser un nouveau tube d'eau. |
| Contamination du mélange de réaction. | Utiliser un nouveau tube de mélange de réaction. |
| Contamination de la zone d'extraction / préparation des réactions d'amplification. | Nettoyer les surfaces et les instruments à l'aide d'un détergent aqueux. Laver les blouses et remplacer les tubes et les embouts utilisés. |
| Erreur d'instrument. | Contactez le service technique ELITechGroup. |

ADN cible et contrôle interne non détectés dans les réactions de l'échantillon

| Causes éventuelles | Solutions |
|--|---|
| Distribution incorrecte dans les puits de microplaques. | Évitez de renverser le contenu du tube à essai d'échantillon. Changez toujours les conseils entre un échantillon et un autre. Soyez prudent lorsque vous distribuez des échantillons dans les puits de microplaques et respectez la feuille de travail. |
| Configuration de session incorrecte sur ELITe InGenius | Vérifiez la position du mélange réactionnel ou des échantillons. Vérifiez les volumes de mélange réactionnel ou d'échantillons. |
| Dégradation du contrôle interne. | Utilisez de nouvelles aliquotes de contrôle interne. |
| Inhibition due à des échantillons de substances interférentes. | Répétez l'amplification avec une dilution 1: 2 dans de l'eau de qualité de biologie moléculaire de l'échantillon élué dans une session "PCR uniquement". Répétez l'extraction et l'amplification de l'échantillon. |
| Stockage incorrect des réactifs. | Vérifiez que le mélange réactionnel n'a pas été exposé à la température ambiante pendant plus de 30 minutes. |
| Problèmes lors de l'extraction | Vérifiez la qualité et la concentration de l'ADN extrait. |
| Erreur d'instrument. | Contactez le service technique ELITechGroup. |

Une Présence de fluorescence de base irrégulière ou élevée dans les réactions

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


Présence d'une courbe de dissociation anormale

| Causes éventuelles | Solutions |
|---|--|
| Absence de pic défini. Pic défini mais différent de celui des autres échantillons et des standards | Contrôler que le Ct du détecteur FAM soit inférieur à 30. Des quantités élevées de produit d'amplification présentes à la fin de la réaction peuvent interférer avec l'analyse de la courbe de dissociation Répéter l'amplification de l'échantillon pour confirmer la présence d'un ADN cible avec une mutation possible. Pour confirmer la présence d'une mutation, l'ADN cible présent dans l'échantillon devrait être séquencé. |


| Erreur 30103 sur ELITe InGenius | |
|--|--|
| Causes éventuelles | Solutions |
| Concentration de cible trop élevée dans l'échantillon. | Si une amplification significative est observée dans la parcelle PCR: - répéter l'amplification avec une dilution 1:10 dans de l'eau de qualité de biologie moléculaire de l'échantillon élué dans une session "PCR uniquement" ou - répéter l'extraction avec une dilution 1:10 dans de l'eau de qualité biologie moléculaire de l'échantillon dans une session "Extraire + PCR". |

LÉGENDE DES SYMBOLES

REF Référence du catalogue.


 Seuil supérieur de température.


LOT Numéro de lot.

 Date de péremption (dernier jour du mois).


IVD Diagnostic *in vitro*.

CE Conforme aux exigences essentielles de la Directive européenne 98/79/CE concernant le diagnostic *in vitro*.

 Contenu suffisant pour "x" tests.

 Attention, consulter le mode d'emploi.

CONT Contenus.

 Conserver à l'abri de la lumière solaire.

 Fabriqué par.

NOTE POUR L'ACQUEREUR: LICENCE LIMITEE

Ce produit contient des réactifs fabriqués par Life Technologies Corporation et est vendu dans le cadre d'accords de licence entre ELITechGroup S.p.A. et ses sociétés affiliées et Life Technologies Corporation. Le prix d'achat de ce produit comprend des droits limités et non transférables d'utiliser uniquement cette quantité du produit uniquement pour les activités de l'acheteur qui sont directement liées aux diagnostics humains. Pour plus d'informations sur l'achat d'une licence pour ce produit à des fins autres que celles indiquées ci-dessus, contactez le service des licences, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Téléphone: +1(760)603-7200. Télécopie: +1(760)602-6500. Courriel: outlicensing@thermofisher.com.

Les réactifs de détection ELITe MGB® sont couverts par un ou plusieurs des États-Unis. Brevets nos. 6127121, 6485906, 6660845, 6699975, 6727356, 6790945, 6949367, 6972328, 7045610, 7319022, 7368549, 7381818, 7662942, 7671218, 7715989, 7723038, 7759126, 7767834, 7897736, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8969003, 8980855, 9 056 887, 9 085 800, 9 169 256 et numéros de brevet EP, 0819133, 1068358, 1144429, 1232157, 1261616 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939, ainsi que des demandes actuellement en instance.

Cette licence limitée autorise la personne ou l'entité juridique à laquelle ce produit a été fourni à utiliser le produit et les données générées par l'utilisation du produit, uniquement à des fins de diagnostic humain. Ni ELITechGroup S.p.A. ni ses concédants de licence n'accordent aucune autre licence, expresse ou implicite à d'autres fins.

"ELITe MGB" et le logo "ELITe MGB" sont des marques commerciales enregistrées pour l'Union européenne.

ELITe InGenius® et ELITe BeGenius® sont des marques déposées d'ELITechGroup.

«NucliSENS® easyMAG®» sont des marques déposées de bioMérieux.

«QIASymphony®» est une marque déposée de QIAGEN.

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

EBV ELITE MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTS020PLD



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

A. Intended use

The EBV ELITE MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection and quantification** of the DNA of **Epstein-Barr human herpesvirus**. The assay is CE-IVD validated in combination with the instruments **ELITE InGenius** and **ELITE BeGenius**.

B. Amplified sequence

| Target | Gene | Fluorophore |
|-------------------------|------------------------|-------------|
| EBV | EBNA-1 | FAM |
| Internal Control | Human beta globin gene | AP525 (VIC) |

C. Validated matrix

› **Whole blood** EDTA

› **Plasma** EDTA

D. Kit content

EBV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



X 4

- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 96
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> › ELITE InGenius instrument: INT030 › ELITE BeGenius instrument: INT040 › ELITE InGenius SP200 Extraction Cartridge: INT032SP200 › ELITE InGenius PCR Cassette: INT035PCR › ELITE InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS › CPE - Internal Control: CTCRPE | <ul style="list-style-type: none"> › EBV ELITE Standard : STD020PLD › EBV - ELITE Positive Control : CTR020PLD › ELITE InGenius Waste Box : F2102-000 › 300 µL Filter Tips Axygen : TF-350-L-R-S › 1000 µL Filter Tips Tecan : 30180118 |
|---|---|

F. Protocol

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> › Sample volume 200 µL › CPE Internal Control volume 10 µL › Total eluate volume 100 µL › PCR eluate input volume 20 µL › EBV Q-PCR Mix volume 20 µL | <ul style="list-style-type: none"> › Unit of quantitative result cp/mL or IU/mL › Frequency of controls 15 days › Frequency of calibration 60 days |
|--|---|

G. Performance

| Matrix | Limit of Detection | Diagnostic Sensitivity | Diagnostic Specificity |
|-----------------|-----------------------------|------------------------|------------------------|
| Whole Blood | 104 IU/mL – 36 cp/mL | 100% 30/30* | 90.6% 29/32* |
| Plasma (200 µL) | 124 IU/mL – 65 cp/mL | 100% 47/47* | 98.4% 60/61* |

*confirmed samples/ tested samples

| Matrix | Linearity (copies/mL) | Linearity (IU/mL) | Conversion factor cp/mL to IU/mL |
|-----------------|-----------------------|------------------------|----------------------------------|
| Whole Blood | 36 - 344,828 | 104 – 1,000,001 | 2.9 |
| Plasma (200 µL) | 65 - 526,316 | 124– 1,000,000- | 1.9 |

H. Reference material tested with ELITE InGenius

| Panel name | Provider | Qualitative results | Quantitative results |
|--|-------------------|-------------------------|---|
| EBV Molecular Q Panel | Qnostics | Concordance 100% (4/4)* | Titre as expected value ± 0.5 log |
| AcroMatrix EBV Plasma Panel | Life Technologies | Concordance 100% (5/5)* | Titre as expected value ± 0.5 log |
| QCMD 2014 Epstein-Barr Virus DNA EQA Panel | Qnostics | Concordance 100% (8/8)* | Titre as expected value ± 1 log 1 sample Titer as expected value ± 2 log |

*confirmed samples/ tested samples

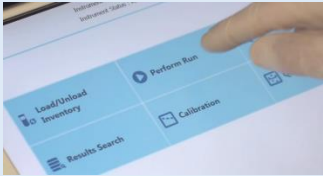
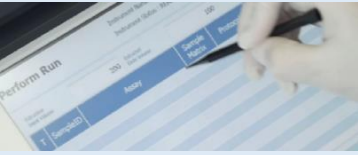



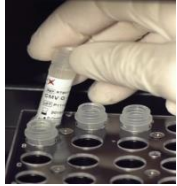

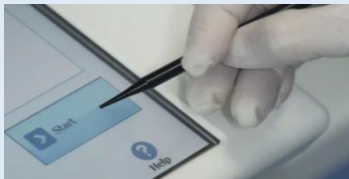

I. Procedures ELITE InGenius

The user is guided step-by-step by the ELITE InGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

| | | |
|--|---|--|
| <p>1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"</p> | <p>2. Verify calibrators: EBV Q-PCR standard in the "Calibration menu" Verify controls: EBV pos. and neg. controls in the "Control menu" <i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired</p> | <p>3. Thaw the EBV Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec</p> |
|--|---|--|

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

| | | |
|--|--|---|
| <p>1. Select "Perform Run" on the touch screen</p>  | <p>2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elute: "100 µL"</p>  | <p>3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID</p>  |
| <p>4. Select the "Assay protocol" of interest</p>  | <p>5. Select the sample position: Primary tube or sonication tube</p>  | <p>6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in the inventory block</p>  |
| <p>7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, sonication tube and primary sample racks</p>  | <p>8. Close the door Start the run</p>  | <p>9. View, approve and store the results</p>  |

Procedure 2 - PCR only

| | | |
|---|--|--|
| <p>1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above</p> | <p>5. Select the protocol "PCR only" and set the sample position "Extra tube"</p> | <p>6. Load the extracted nucleic acid tubes in the rack n°4</p> |
| <p>7. Load the PCR cassette rack Load the Q-PCR Mix in the inventory block</p> | <p>8. Close the door Start the run</p> | <p>9. View, approve and store the results</p> |

Procedure 3 - Extraction only

| | | |
|---|---|---|
| <p>1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above</p> | <p>5. Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position : Primary tube or Secondary tube</p> | <p>6. Load the CPE Internal Control in the inventory block</p> |
| <p>7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, sonication tube and primary sample racks</p> | <p>8. Close the door Start the run</p> | <p>9. Archive the eluate sample</p> |



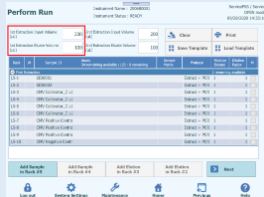
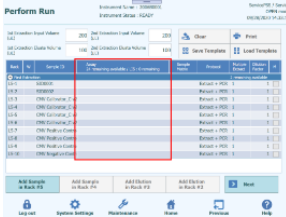
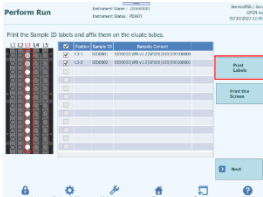


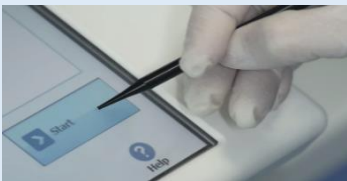

L. Procedures ELITE BeGenius

The user is guided step-by-step by the ELITE BeGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

1. Switch on ELITE BeGenius Identification with username and password
Select the mode "Closed"
2. Verify calibrators: EBV Q-PCR standard in the "Calibration menu"
Verify controls: EBV pos. and neg. controls in the "Control menu"
NB: Both have been run, approved and not expired
3. Thaw the EBV Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes
Vortex gently
Spin down 5 sec

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

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

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

3. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Eluate: "100 µL"

4. Select the "Assay protocol" of interest

5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area

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

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

8. Close the door. Start the run

9. View, approve and store the results


Procedure 2 - PCR only

1. Select "Perform Run" on the touch screen and the click on the run mode «PCR Only»
2. Load the extracted nucleic acid barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area
3. Select the "Assay protocol" of interest
4. Load the Q-PCR-Mix in Reagent Rack and insert it in the cooling area
Load filter tips and the PCR rack
5. Close the door.
Start the run
6. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

| | | |
|---|---|---|
| 1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above | 5. Select the protocol "Extraction Only" in the Assay Protocol selection screen. | 6. Load the CPE Internal Control in the Elution Rack and insert it in the cooling area |
| 7. Load : Filter Tips and the Extraction Rack | 8. Close the door Start the run | 9. Archive the eluate sample |

EBV ELITE MGB® kit used with ELITE InGenius®

Code: RTS020PLD



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

A. Intended use

The EBV ELITE MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection and quantification** of the DNA of **Epstein-Barr human herpesvirus**. The assay is CE-IVD validated in combination with the instrument **ELITE InGenius**.

B. Amplified sequence

| Target | Gene | Fluorophore |
|-------------------------|------------------------|-------------|
| | EBNA-1 | FAM |
| Internal Control | Human beta globin gene | AP525 (VIC) |

C. Validated matrix

› **Whole blood** EDTA

› **Plasma** EDTA

D. Kit content

EBV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 96
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- › **ELITE InGenius instrument:** INT030
- › **ELITE InGenius SP1000** Extraction Cartridge: INT033SP1000
- › **ELITE InGenius PCR Cassette** amplification cartridges: INT035PCR
- › **ELITE InGenius SP200 Consumable Set** consumables for extraction: INT032CS
- › **EBV ELITE Standard :** STD020PLD
- › **EBV ELITE Positive Control:** CTR020PLD
- › **CPE Internal Control:** CTCPE
- › **ELITE InGenius Waste Box:** F2102-000
- › **Filter Tips 300:** TF-350-L-R-S

F. ELITE InGenius protocol

- | | | | |
|-------------------------------|---------|-------------------------------|---------------------------|
| › Sample volume | 1000 µL | › Unit of quantitative result | International Unit: IU/mL |
| › CPE Internal Control volume | 10 µL | › Frequency of controls | 15 days |
| › Total eluate volume | 100 µL | › Frequency of calibration | 60 days |
| › PCR eluate input volume | 20 µL | | |
| › EBV Q-PCR Mix volume | 20 µL | | |

G. Performance

| Matrix | Limit of Detection | Diagnostic Sensitivity | Diagnostic Specificity |
|------------------|----------------------------|------------------------|--|
| Plasma (1000 µL) | 18 IU/mL – 11 cp/mL | 96.7% 29/30* | 96.8% 60/62 <small>*confirmed samples/ tested samples</small> |
| Matrix | Linearity (copies/mL) | Linearity (IU/mL) | Conversion factor cp/mL to IU/mL |
| Plasma (1000 µL) | 62 - 625,000 | 99 - 1,000,000 | 1.6 |

H. Reference material tested

| Panel name | Provider | Qualitative results | Quantitative results |
|--|----------|---------------------------|-----------------------------------|
| EBV Molecular Q Panel | Qnostics | Concordance 100% (4/4)* | Titre as expected value ± 0.5 log |
| QCMD 2015 Epstein-Barr virus DNA EQA Panel | Qnostics | Concordance 100% (10/10)* | Titre as expected value ± 1 log |

*confirmed samples/ tested samples

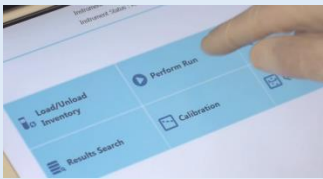
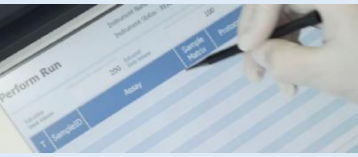

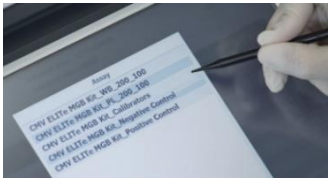

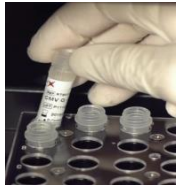



I. Procedures

The user is guided step-by-step by the ELITE InGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

| | | |
|--|---|--|
| <p>1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"</p> | <p>2. Verify calibrators: EBV Q-PCR standard in the "Calibration menu" Verify controls: EBV pos. and neg. controls in the "Control menu" <i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired</p> | <p>3. Thaw the EBV Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec</p> |
|--|---|--|

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

| | | |
|--|--|---|
| <p>1. Select "Perform Run" on the touch screen</p>  | <p>2. Verify the extraction volumes: Input: "1000 µL", eluate: "100 µL"</p>  | <p>3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID</p>  |
| <p>4. Select the "Assay protocol" of interest</p>  | <p>5. Select the sample position: Primary tube or sonication tube</p>  | <p>6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in the inventory block</p>  |
| <p>7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, sonication tube and primary sample racks</p>  | <p>8. Close the door Start the run</p>  | <p>9. View, approve and store the results</p>  |

Procedure 2 - PCR only

| | | |
|---|--|--|
| <p>1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above</p> | <p>5. Select the protocol "PCR only" and set the sample position "Extra tube"</p> | <p>6. Load the extracted nucleic acid tubes in the rack n°4</p> |
| <p>7. Load the PCR cassette rack Load the Q-PCR Mix in the inventory block</p> | <p>8. Close the door Start the run</p> | <p>9. View, approve and store the results</p> |

Procedure 3 - Extraction only

| | | |
|---|--|---|
| <p>1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above</p> | <p>5. Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position: Primary tube or Secondary tube</p> | <p>6. Load the CPE Internal Control in the inventory block</p> |
| <p>7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, sonication tube and primary sample racks</p> | <p>8. Close the door Start the run</p> | <p>9. Archive the eluate sample</p> |

EBV ELITe MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Code: RTS020PLD



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

A. Intended use

The EBV ELITe MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection and quantification** of the DNA of **Epstein-Barr human herpesvirus**.

The assay is CE-IVD validated in combination with **ABI PCR thermal cyclers** (Thermo-Fisher) and the following extraction systems: **ELITe STAR** (ELITechGroup), **ELITe GALAXY** (ELITechGroup), **easyMAG** (BioMérieux) or **QIASymphony** (Qiagen).

B. Amplified sequence

| Target | Gene | Fluorophore |
|------------------|------------------------|-------------|
| EBV | EBNA-1 | FAM |
| Internal Control | Human beta globin gene | AP525 (VIC) |

C. Validated matrix

› Whole blood EDTA

› Plasma EDTA

› Cerebrospinal fluid

D. Kit content

EBV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



X 4

- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 100
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

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

- › EBV ELITe Positive Control: CTR020PLD
- › EBV ELITe Standard: STD020PLD
- › CPE Internal Control: CTRCPE
- › easyMAG - Generic protocol 2.0.1
- › QIASymphony - DNA Mini kit or DSP Virus/Pathogen Midi kit
- › Molecular biology grade water

F. Performance

| System | Matrix | Limit of Detection | Diagnostic Sensitivity | Diagnostic Specificity |
|--------------------|-------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| ELITe STAR - ABI | Whole Blood | 212 IU/mL – 101 gEq/mL | 93.5% (30/31)* | 95% (53/60)* |
| | Plasma | 229 IU/mL – 107 IU/mL- | 97% (29/30)* | 100% (40/40)* |
| ELITe GALAXY - ABI | Whole Blood | 99 IU/mL – 111 gEq/mL | 100% (32/32)* | 98.9% (31/32)* |
| | Plasma | 97 IU/mL – 128 gEq/mL | 96.67% (29/30)* | 100% (30/30)* |

| System | Linearity | Conversion factor cp/reaction to cp/mL |
|--------------------|-------------------------------------|--|
| ELITe STAR - ABI | 280 → 28 x 10 ⁶ (WB, PL) | 28 (WB, PL) |
| ELITe GALAXY - ABI | 350 → 35 x 10 ⁶ (WB, PL) | 35 (WB, PL) |
| easyMAG - ABI | 500 → 50 x 10 ⁶ (WB) | 50 (WB) |
| QIASymphony - ABI | 230 → 23 x 10 ⁶ (WB) | 23 (WB) |
| | 120 → 12 x 10 ⁶ (PL) | 12 (PL) |

*confirmed samples/tested samples

G. Procedure

The procedure below summarized the main steps of the sample analysis with conventional PCR workflow: validated extraction systems, PCR instrument settings, PCR set-up and result interpretation.

Extraction - Validated systems

| Extraction | Validated matrix | Sample volume processed | Min. sample volume | Total eluate volume | CPE Internal Control volume |
|--------------|---------------------|-------------------------|--------------------|---------------------|-----------------------------|
| ELiTe Star | Whole Blood, Plasma | 200 µL | 700 µL | 100 µL | 200µL |
| ELiTe Galaxy | Whole Blood, Plasma | 300 µL | 400 µL | 200 µL | 10 µL |
| EasyMAG | Whole Blood, Plasma | 500 µL | - | 100 µL | 5 µL |
| QIASymphony | Whole Blood, Plasma | 500 µL | 600 µL | 85 µL | 6 µL |

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

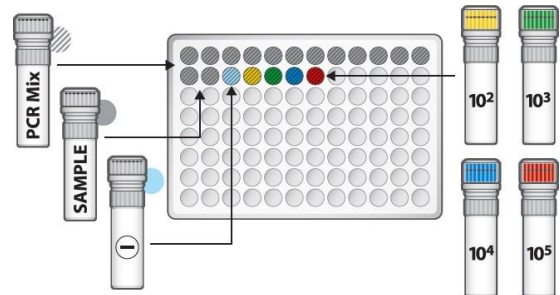
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "EBV" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profil as indicated. Fluorescence acquisition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

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

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

Amplification - PCR Set-up

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



Amplification - Threshold for qualitative analysis

| Instrument | EBV FAM | Internal Control VIC |
|----------------------------|---------|----------------------|
| 7500 Fast Dx Real Time PCR | 0.2 | 0.1 |
| 7300 Real Time PCR | 0.1 | 0.05 |

Interpretation - Qualitative results

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

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The EBV ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction.

The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶gEq/reaction.

EBV ELITE MGB® kit used with Cobas-Z 480 PCR instruments

Code: RTS020PLD



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

A. Intended use

The EBV ELITE MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection** and **quantification** of the DNA of **Epstein-Barr human herpesvirus**.
The assay is CE-IVD validated in combination with **Cobas – Z 480 analyzer (Roche)** and the following extraction systems: **MagNA Pure 24 System**.

B. Amplified sequence

| Target | Gene | Fluorophore |
|------------------|------------------------|-----------------|
| EBV | EBNA-1 | FAM (465 – 510) |
| Internal Control | Human beta globin gene | VIC (540 - 580) |

C. Validated matrix

- › Whole Blood
- › Plasma EDTA

D. Kit content

EBV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL X 4

- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 96
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- › Cobas – Z 480 analyzer PCR Instrument
- › MagNA Pure 24 System = software 1.0
- › EBV - ELITE Positive Control: CTR020PLD
EBV – ELITE Positive Control RF: CTR020PLD-R
- › EBV ELITE Standard: STD020PLD
- › CPE Internal Control: CTRCPE
- › Molecular biology grade water

F. Performance

| System | Matrix | Limit of Detection | Diagnostic Sensitivity | Diagnostic Specificity |
|---------------|-------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| MagNA Pure 24 | Whole Blood | 143 IU/mL - 10 cp/rxn | 100% (34/34)* | 100% (34/34)* |
| | Plasma | 163 IU/mL - 10 cp/rxn | 100% (30/30)* | 96.8% (30/31)* |

*confirmed samples/tested samples

G. Procedure

The procedure below summarized the main steps of the sample analysis with conventional PCR workflow: validated extraction systems, PCR instrument settings, PCR set-up and result interpretation.

Extraction - Validated systems

| Extraction | Validated matrix | Sample volume processed | Min. sample volume | Total eluate volume | CPE Internal Control volume |
|---------------|---------------------|-------------------------|--------------------|---------------------|-----------------------------|
| MagNA Pure 24 | Whole Blood, Plasma | 200 µL | 350 µL | 100 µL | 20 µL diluted 1:2 |

Amplification - Settings of Cobas-Z 480 PCR instruments

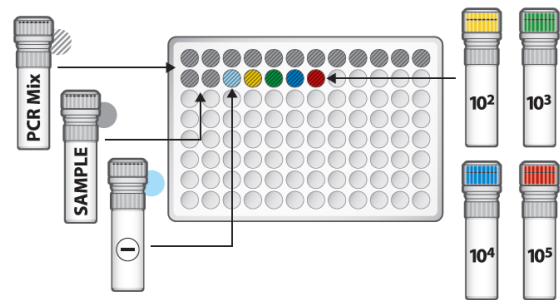
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "EBV" detector with "FAM (465 -510)".
3. Set "Internal Control" detector with "VIC (540 -580)".
4. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridation step at 60°C

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

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

Amplification - PCR Set-up

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



Amplification - Threshold for qualitative analysis*

| Instrument | Matrix | Background Fluorescence Level FAM | EBV FAM | Background Fluorescence Level VIC | Internal Control VIC |
|-----------------------------|-------------|-----------------------------------|---------|-----------------------------------|----------------------|
| Cobas-Z 480 PCR instruments | Whole Blood | from cycle 2 to cycle 6 | 0.80 | from cycle 6 to cycle 10 | 1.5 |
| Cobas-Z 480 PCR instruments | Plasma | from cycle 2 to cycle 6 | 0.55 | from cycle 6 to cycle 10 | 1.2 |

**manually set the Threshold and Noiseband*

Interpretation - Qualitative results

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

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The EBV Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction. The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ copies/reaction or approximately from 250 to 2.5 10⁷ copies/mL.

