

NOTICE of CHANGE dated 28/10/2022

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«HSV2 ELITe MGB® Kit» Ref. RTS032PLD

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

- Update for the use of the product for CSF matrix in association with «ELITe BeGenius®» instrument (REF INT040);
- Internal Control Ct cut-off update in association with «ELITe InGenius®» (REF INT030) and «ELITe BeGenius®» (REF INT040)

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

PLEASE NOTE

	LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT
	THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT
	CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT
	LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT
	A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT
	DIE REVIEW VON DIESER IFU IST KOMPATIBLE MIT DER VORIGE VERSION VON DEM TEST-KIT

HSV2 ELITE MGB® Kit

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

REF RTS032PLD

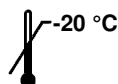


TABLE DES MATIÈRES

APPLICATION	page 2
PRINCIPES DU TEST	page 2
DESCRIPTION DU PRODUIT	page 3
MATÉRIEL FOURNI	page 3
MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI	page 3
AUTRES PRODUITS REQUIS	page 3
AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS	page 5
 ELITE InGenius	 page 6
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	page 6
PROCÉDURE	page 8
ELITE BeGenius	page 16
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	page 16
PROCÉDURE	page 17
CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE DES SYSTÈMES ELITE InGenius et ELITE BeGenius	page 23
 ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ABI 7300 Real-Time System	 page 34
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	page 34
PROCÉDURE	page 36
CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE	page 45
 Roche cobas z 480 analyzer	 page 51
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	page 51
PROCÉDURE	page 52
CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE	page 57
 BIBLIOGRAPHIE	 page 57
LIMITES DE LA PROCÉDURE	page 61
PROBLÈMES ET SOLUTIONS	page 62
LÉGENDE DES SYMBOLES	page 64
NOTE POUR L'ACQUÉREUR : LICENCE LIMITÉE	page 65

HSV2 ELITE MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel
de l'ADN

REF RTS032PLD

APPLICATION

Le produit « **HSV2 ELITE MGB® Kit** » fait partie d'un test qualitatif et quantitatif d'amplification des acides nucléiques pour la **détection et la quantification de l'ADN du virus Herpes Simplex humain de type 2 (HSV2)** dans des échantillons d'ADN extraits de liquide céphalo-rachidien (LCR), sang total prélevé sur EDTA et plasma prélevé sur EDTA.

Le produit est destiné à être utilisé dans le diagnostic et la surveillance des infections par le HSV2, en association avec les données cliniques du patient et d'autres résultats d'analyse de laboratoire.

PRINCIPES DU TEST

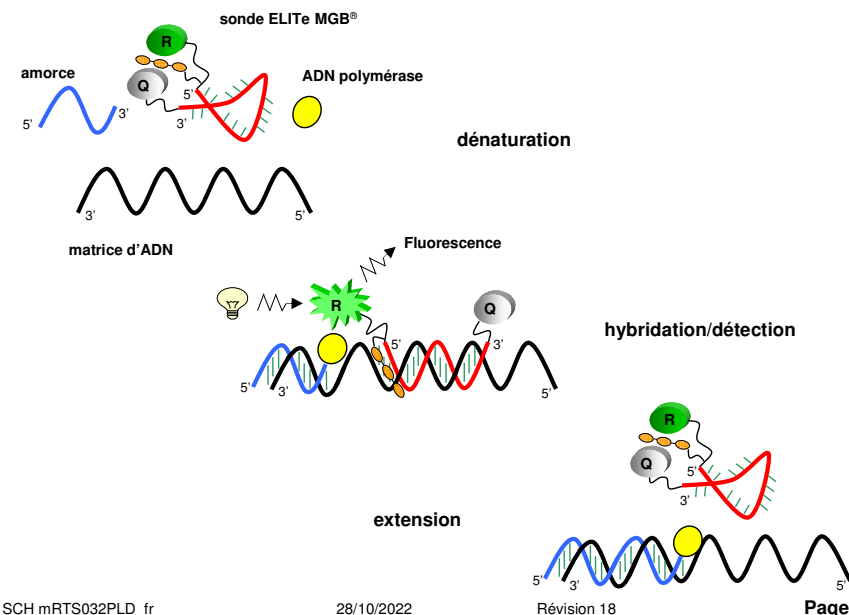
Le test consiste en une réaction d'amplification en temps réel effectuée par un thermostat programmable doté d'un système optique de détection de la fluorescence (thermocycleur d'amplification en temps réel).

Dans chaque puits, deux réactions d'amplification sont effectuées à partir de l'ADN extrait des échantillons à tester : une réaction spécifique pour une région de la **glycoprotéine G (gpG)** du HSV2 et une réaction spécifique pour une région du **gène de la bêta-globine humaine** (contrôle interne d'inhibition). La sonde spécifique au HSV2 dotée de la technologie ELITE MGB®, marquée par le fluorophore FAM, est activée lorsqu'elle s'hybride avec le produit spécifique de la réaction d'amplification du HSV2. La sonde spécifique au contrôle interne dotée de la technologie ELITE MGB®, marquée par le fluorophore AP525 (analogue à VIC), est activée lorsqu'elle s'hybride avec le produit spécifique de la réaction d'amplification du contrôle interne. Lorsque le produit spécifique de la réaction d'amplification augmente, l'émission de fluorescence augmente également et est mesurée et enregistrée par l'instrument. Le traitement des données permet de détecter la présence et le titre de l'ADN du HSV2 dans l'échantillon de départ.

À la fin de la session d'amplification, une analyse de la courbe de dissociation (courbe de fusion) peut être effectuée afin de déterminer la température de dissociation (température de fusion) et de confirmer la présence de la cible correcte ou d'identifier la présence de mutations.

Le test a été validé avec les systèmes décrits dans le présent mode d'emploi.

L'image suivante illustre de manière synthétique le mécanisme d'activation et l'émission de la fluorescence de la sonde dotée de la technologie ELITE MGB®. Noter que la sonde n'est pas hydrolysée pendant le cycle d'amplification si bien qu'elle peut être utilisée pour l'analyse de la courbe de dissociation.



DESCRIPTION DU PRODUIT

Le produit « **HSV2 ELITe MGB Kit** » fournit le mélange complet **prêt à l'emploi** « **HSV2 Q - PCR Mix** » pour l'amplification en temps réel dans une solution de stabilisation, **aliquoté dans quatre tubes à essai jetables**. Chaque tube contient **540 µL** de solution, un volume suffisant pour effectuer **24 tests** en association avec les systèmes « **ELITe InGenius®** » et « **ELITe BeGenius®** » et **25 tests** en association avec d'autres systèmes.

Les amorces et la sonde spécifique au HSV2 (stabilisées par le groupe MGB®, marquées par le fluorophore FAM et désactivées par une molécule non fluorescente) sont spécifiques à une région de la **gpG** du HSV2 (région US4).

Les amorces et la sonde du contrôle interne (stabilisées par le groupe MGB®, marquées par le fluorophore AP525, analogue à VIC, et désactivées par une molécule non fluorescente) sont spécifiques au **promoteur et à la région UTR 5'** du **gène de la bêta-globine humaine**.

Le mélange réactionnel fournit un tampon, du chlorure de magnésium, des nucléotides triphosphates, le fluorophore AP593 (utilisé à la place de ROX ou CY5) en tant que référence passive pour la normalisation de la fluorescence, l'enzyme uracile N-glycosidase (UNG) pour inactiver toute contamination par le produit d'amplification et l'enzyme ADN polymérase « hot start » (démarrage à chaud).

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

Le produit permet d'effectuer **100 tests en association avec d'autres systèmes**, en incluant les étalons et les contrôles.

MATÉRIEL FOURNI

Composant	Description	Quantité	Classification des risques
HSV2 Q - PCR Mix	Mélange réactionnel complet	4 x 540 µL	-

MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI

- Hotte à flux laminaire.
- Gants non poudrés en nitrile jetables ou matériel similaire.
- Agitateur de type vortex.
- Microcentrifugeuse de paillasse (12 000 - 14 000 tr/min).
- Micropipettes et cônes stériles avec filtre pour les aérosols ou cônes stériles à déplacement positif 0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Eau de qualité biologie moléculaire.
- Thermostat programmable avec système de détection optique de fluorescence 7300 Real Time PCR System ou 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument étalonné selon les instructions du fabricant.
- Thermostat programmable avec système de détection optique de fluorescence cobas z 480 analyzer, étalonné selon les instructions du fabricant.

AUTRES PRODUITS REQUIS

Les réactifs pour l'extraction de l'ADN des échantillons, le contrôle positif d'extraction, le contrôle positif de l'amplification, les étalons d'ADN en quantité connue et les consommables **ne sont pas** inclus dans ce produit.

Pour l'analyse automatique d'échantillons avec l'instrument « **ELITe InGenius** » (ELITechGroup S.p.A., réf. INT030), les produits génériques suivants sont requis : les cartouches d'extraction « **ELITe InGenius® SP 200** » (ELITechGroup S.p.A., réf. INT032SP200), les consommables pour l'extraction et l'amplification des acides nucléiques dans des échantillons biologiques « **ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set** » (ELITechGroup S.p.A., réf. INT032CS), le conteneur à déchets « **ELITe InGenius® Waste Box** » (ELITechGroup S.p.A., réf. F2102-000), la cassette de PCR « **ELITe InGenius® PCR Cassette** » (ELITechGroup S.p.A., réf. INT035PCR) et les cônes de 300 µL « **300 µL Filter Tips Axygen** » (Axygen BioScience Inc., CA, États-Unis, réf. TF-350-L-R-S).

Pour l'extraction automatique de l'ADN, l'amplification en temps réel et l'interprétation de l'analyse des échantillons, l'instrument « **ELITe InGenius** » (ELITechGroup S.p.A., réf. INT030) et les protocoles de test spécifiques suivants (ELITechGroup S.p.A.) sont requis :

- pour les calibrateurs « **HSV2 ELITe STD** »,
- pour le contrôle positif d'amplification « **HSV2 ELITe PC** »,
- pour le contrôle négatif d'amplification « **HSV2 ELITe NC** »,
- pour l'analyse des échantillons « **HVS2 ELITe_WB_200_100** », « **HSV2 ELITe_PL_200_100** » et « **HSV2 ELITe_CSF_200_100** ».

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

Pour l'extraction automatique de l'ADN, l'amplification en temps réel et l'interprétation de l'analyse des échantillons, l'instrument « **ELITe BeGenius** » (ELITechGroup S.p.A., réf. INT040) et les protocoles de test spécifiques suivants (ELITechGroup S.p.A.) sont requis :

- pour les calibrateurs « **HSV2 ELITe_Be STD** »,
- pour le contrôle positif d'amplification « **HSV2 ELITe_Be PC** »,
- pour le contrôle négatif d'amplification « **HSV2 ELITe_Be NC** »,
- pour l'analyse des échantillons « **HSV2 ELITe_Be_WB_200_100** », « **HSV2 ELITe_Be_PL_200_100** » et « **HSV2 ELITe_Be_CSF_200_100** ».

Pour l'extraction automatique de l'ADN des échantillons à analyser, le produit générique suivant a été validé : le kit d'extraction « **ELITe STAR 200 Extraction kit** » (ELITechGroup S.p.A., réf. INT011EX), un kit pour l'extraction de l'ADN et de l'ARN dans des échantillons acellulaires et cellulaires à l'aide de l'instrument « **ELITe STAR** » (ELITechGroup S.p.A., réf. INT010).

Pour l'extraction automatique de l'ADN et la préparation des microplaques pour l'amplification des échantillons à analyser, le produit générique suivant a été validé : le kit d'extraction « **ELITe GALAXY 300 Extraction Kit** » (ELITechGroup S.p.A., réf. INT021EX), un kit pour l'extraction de l'ADN et de l'ARN dans des échantillons acellulaires et cellulaires à l'aide de l'instrument « **ELITe GALAXY** » (ELITechGroup S.p.A., réf. INT020).

Pour l'extraction automatique de l'ADN des échantillons à analyser, les produits génériques suivant ont également été validés : les kits d'extraction « **NucliSENS® easyMAG® Reagents** » (bioMérieux SA, réf. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135), des kits pour l'extraction des acides nucléiques dans des échantillons biologiques, à l'aide de l'instrument « **NucliSENS® easyMAG®** » (bioMérieux SA, réf. 200111).

Pour l'extraction automatique de l'ADN des échantillons à analyser, les produits suivants ont également été validés : les kits « **QIASymphony® DNA Mini Kit** » (QIAGEN GmbH, réf. 931236) et « **QIASymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit** » (QIAGEN GmbH, réf. 937055), des kits pour l'extraction des acides nucléiques dans des échantillons biologiques, à l'aide de l'instrument « **QIASymphony® SP/AS** » (QIAGEN GmbH, réf. 9001297, 9001301) et des produits génériques apparentés.

Pour l'extraction automatique de l'ADN des échantillons à analyser, le produit suivant a également été validé : le kit « **MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit** » (Roche, réf. 07658036001), un kit pour l'extraction des acides nucléiques dans des échantillons biologiques, à l'aide de l'instrument « **MagNA Pure 24 System** » (Roche, réf. 07290519001).

À titre de contrôle positif d'extraction des acides nucléiques d'échantillons acellulaires et de contrôle d'inhibition, il est nécessaire d'utiliser le produit générique « **CPE - Internal Control** » (ELITechGroup S.p.A., réf. CTRCPE), une solution stabilisée contenant deux ADN plasmidiques et l'ARN génomique du phage MS2.

Avec le 7300 Real-Time PCR System, il est nécessaire d'utiliser le produit générique « **MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate** » (Life Technologies, réf. N8010560), des microplaques comprenant des puits de 0,2 mL et des feuilles de scellage adhésives pour l'amplification en temps réel.

HSV2 ELITe MGB® Kitréactif pour l'amplification en temps réel
de l'ADN

REF RTS032PLD

Avec le 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, il est nécessaire d'utiliser le produit générique : « **MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL** » (Life Technologies, réf. 4346906), des microplaques comprenant des puits de 0,1 mL et des feuilles de scellage adhésives pour l'amplification en temps réel.

Avec le cobas z 480 analyzer, il est nécessaire d'utiliser le produit générique « **AD-plate 0.3ml** » (Roche, réf. 05232724001), des microplaques comprenant des puits de 0,3 mL et des feuilles de scellage adhésives pour l'amplification en temps réel.

Si la détection de l'ADN du HSV2 est requise pour une analyse qualitative, utiliser le produit « **HSV2 - ELITe Positive Control** » (ELITeGroup S.p.A., réf. CTR032PLD) ou le produit « **HSV2 - ELITe Positive Control RF** » (ELITeGroup S.p.A., réf. CTR032PLD-R), un contrôle positif d'ADN plasmidique.

Si la détection et la quantification de l'ADN du HSV2 est requise pour une analyse quantitative, utiliser le produit « **HSV2 ELITe Standard** » (ELITeGroup S.p.A., réf. STD032PLD), quatre dilutions d'ADN plasmidique en quantité connue, afin d'obtenir la courbe d'étalonnage.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

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

Avertissements et précautions d'ordre général

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

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

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

Ne jamais pipeter les solutions avec la bouche.

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

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

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

Lire attentivement toutes les instructions fournies avec le produit avant d'exécuter le test.

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

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

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

Ne pas utiliser de réactifs provenant de lots différents.

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

Avertissements et précautions pour la biologie moléculaire

Les procédures de biologie moléculaire, telles que l'extraction des acides nucléiques, l'amplification et la détection, exigent du personnel qualifié et dûment formé pour éviter tout risque de résultats erronés, en particulier ceux dus à la dégradation des acides nucléiques contenus dans les échantillons ou à la contamination des échantillons par les produits d'amplification.

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

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

Les échantillons doivent être exclusivement utilisés pour ce type d'analyse. Les échantillons doivent être manipulés sous une hotte à flux laminaire. Les tubes contenant différents échantillons ne doivent jamais

HSV2 ELITe MGB® Kitréactif pour l'amplification en temps réel
de l'ADN

REF RTS032PLD

être ouverts en même temps. Les pipettes utilisées pour manipuler les échantillons doivent être exclusivement utilisées à cette fin spécifique. Les pipettes doivent être de type à déplacement positif ou être utilisées avec des cônes dotés d'un filtre pour les aérosols. Les cônes utilisés doivent être stériles, exempts de DNases et de RNases, et exempts d'ADN et d'ARN.

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

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

Avertissements et précautions spécifiques pour les composants

Le mélange **HSV2 Q - PCR Mix** doit être conservé à -20 °C dans l'obscurité.

Le mélange **HSV2 Q - PCR Mix** doit être utilisé dans le mois qui suit sa première ouverture.

Le **HSV2 Q - PCR Mix** peut être congelé et décongelé **cinq fois** au maximum : des cycles de congélation/décongélation supplémentaires risqueraient d'entraîner une réduction des performances du produit.

Système ELITe InGenius**ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES****Échantillons**

Ce produit doit être utilisé avec les 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 : lorsque l'extraction de l'ADN à partir de 200 µL de sang total est effectuée à l'aide du système **ELITe InGenius** et du **logiciel ELITe InGenius** version 1.3 (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **HSV2 ELITe_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 le tube primaire est utilisé, le volume de l'échantillon varie en fonction du type de tube chargé. Se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction pour obtenir de plus amples informations sur le paramétrage et l'exécution de la procédure d'extraction.

Plasma prélevé sur EDTA

Les échantillons de plasma pour l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés sur de l'EDTA 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 : lorsque l'extraction de l'ADN à partir de 200 µL de plasma est effectuée à l'aide du système **ELITe InGenius** et du **logiciel ELITe InGenius** version 1.3 (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **HSV2 ELITe_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 le tube primaire est utilisé, le volume de l'échantillon varie en fonction du type de tube chargé. Se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction pour obtenir de plus amples informations sur le paramétrage et l'exécution de la procédure d'extraction.

Liquide céphalorachidien (LCR)

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

Remarque : lorsque l'extraction d'ADN à partir de LCR est effectuée à l'aide du système **ELITe InGenius** et du logiciel **ELITe InGenius** version 1.1 (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **HSV2 ELITe_CSF_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 le tube primaire est utilisé, le volume de l'échantillon varie en fonction du type de tube chargé. Se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction pour obtenir de plus amples informations sur le paramétrage et l'exécution de la procédure d'extraction.

Autres échantillons

Il n'existe actuellement aucune donnée disponible en ce qui concerne les performances du produit avec d'autres échantillons cliniques, par exemple suspensions de leucocytes, suspensions de granulocytes et liquide amniotique.

Substances interférentes

L'échantillon ne doit pas contenir d'héparine afin de prévenir le problème 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.

Calibrateurs et contrôles d'amplification

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

- à titre de jeu de calibrateurs, utiliser les quatre niveaux de concentration du **HSV2 ELITe Standard**, en association avec le protocole « **HSV2 ELITe STD** »
- à titre de contrôle positif d'amplification, utiliser le **HSV2 - ELITe Positive Control**, en association avec le protocole « **HSV2 ELITe PC** »
- à titre de contrôle négatif d'amplification, utiliser de l'eau de qualité biologie moléculaire (non incluse dans ce kit), en association avec le protocole « **HSV2 ELITe_NC** ».

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

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

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

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

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

Contrôles de qualité

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

PROCÉDURE AVEC LE SYSTÈME ELITe InGenius

L'utilisation du « **HSV2 - ELITe MGB® Kit** » avec le système **ELITe InGenius** comporte trois étapes :

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

Vérification de la préparation du système

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

- mettre le système **ELITe InGenius** en marche et sélectionner le mode « **CLOSED** » (FERMÉ) ;
- vérifier que les calibrateurs (**HSV2 Q - PCR Standard**) ont été analysés, sont approuvés et ne présentent pas le statut (Status) Expiré. Ceci peut être vérifié dans le menu « Calibration » (Étalonnage) de la page Home (Accueil) ;
- vérifier que les contrôles d'amplification (**HSV2 - Positive Control**, **HSV2 Negative Control**) ont été analysés, sont approuvés et ne présentent pas le statut (Status) Expiré. Ceci peut être vérifié dans le menu « Control » (Contrôle) de la page Home (Accueil) ;
- choisir le type d'analyse et paramétrer l'analyse, en suivant les instructions de l'interface graphique utilisateur (GUI) concernant le paramétrage de la session d'analyse et en utilisant les protocoles de test fournis par ELITechGroup. Ces protocoles de DIV ont été spécifiquement validés avec les kits **ELITe MGB**, les matrices et l'instrument **ELITe InGenius**.

Les protocoles de test disponibles pour tester des échantillons à l'aide du produit « **HSV2 ELITe MGB Kit** » sont décrits dans le tableau ci-dessous :

Protocoles de test pour le HSV2 ELITe MGB Kit			
Nom	Matrice	Unités rapport	Caractéristiques
HSV2 ELITe MGB kit_WB_200_100	Sang total	copies/mL	Volume d'extraction initial : 200 µL Volume d'élution extrait : 100 µL Contrôle Interne : 10 µL Sonication : NON Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de l'échantillon PCR : 20 µL
HSV2 ELITe MGB kit_PL_200_100	Plasma	copies/mL	Volume d'extraction initial : 200 µL Volume d'élution extrait : 100 µL Contrôle Interne : 10 µL Sonication : NON Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de l'échantillon PCR : 20 µL
HSV2 ELITe MGB kit_CSF_200_100	LCR	copies/mL	Volume d'extraction initial : 200 µL Volume d'élution extrait : 100 µL Contrôle Interne : 10 µL Sonication : NON Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de l'échantillon PCR : 20 µL

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

Des protocoles d'analyse qualitative sont disponibles sur demande.

Paramétrage de la session d'analyse

Le **HSV2 ELITe MGB Kit**, en association avec le système **ELITe InGenius** peut être utilisé afin d'effectuer les opérations suivantes :

- Analyse intégrée (« Extract + PCR » [Extraction + PCR]),
- Analyse d'amplification (« PCR Only » [PCR uniquement]),
- Analyse d'étalonnage (« PCR Only » [PCR uniquement]),
- Analyse d'amplification du contrôle positif et négatif (« PCR Only » [PCR uniquement]).

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

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

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

A. Analyse intégrée

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

- Décongeler les échantillons à température ambiante (environ +25 °C) et les manipuler conformément aux directives du laboratoire et à la section « Échantillons et contrôles ».
- Décongeler un nombre de tubes de HSV2 Q - PCR Mix suffisant pour la session d'analyse. Chaque 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.

Remarque : protéger le HSV2 Q - PCR Mix de la lumière lors de la décongélation car ce réactif est photosensible.

- Décongeler les tubes de CPE pour la session d'analyse. Chaque tube permet d'effectuer 12 extractions. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
- Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
- Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initial) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élution extrait) est de 100 µL.
- Pour chaque « Track » (Position) d'intérêt, renseigner le « SampleID » (SID) (ID échantillon) en le saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.
- Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (c'est-à-dire HSV2 ELITe_WB_200_100).
- Vérifier que le « Protocol » (Protocole) affiché est : « Extract + PCR » (Extraction + PCR).
- Sélectionner la position de chargement de l'échantillon dans la colonne « Sample Position » (Position de l'échantillon) :
si un tube primaire est utilisé, sélectionner « Primary Tube » (Tube primaire),
si un tube secondaire est utilisé, sélectionner « Sonication Tube » (Tube de sonication).
Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger le CPE et le HSV2 Q-PCR Mix sur le « Inventory Block » (Bloc inventaire) sélectionné en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur le bouton « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la « Inventory Area » (Zone inventaire) sélectionnée en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur le bouton « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger les « PCR Cassettes » (Cassettes de PCR), les cartouches d'extraction « ELITe InGenius SP 200 », tous les consommables requis et les échantillons à extraire aux positions spécifiées à l'étape 8 en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Fermer le tiroir de l'instrument.
- Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

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

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

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

Remarque : à la fin de l'analyse, le mélange de PCR peut être conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant 16 heures au maximum.

B. Analyse d'amplification

Pour configurer le cycle d'amplification, effectuer les étapes suivantes comme indiqué par la GUI :

- Décongeler des tubes de HSV2 Q - PCR Mix en nombre suffisant pour la session d'analyse. Chaque tube permet d'effectuer 24 réactions dans des conditions de consommation de réactif optimales. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.

Remarque : protéger le HSV2 Q - PCR Mix de la lumière lors de la décongélation car ce réactif est photosensible.

- Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
- Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initial) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élution extrait) est de 100 µL.
- Pour chaque « Track » (Position) d'intérêt, renseigner le « SampleID » (SID) (ID échantillon) en le saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.
- Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (c'est-à-dire HSV2 ELITe_WB_200_100).
- Sélectionner « PCR Only » (PCR uniquement) dans la colonne « Protocol » (Protocole).
- Vérifier que la position de chargement de l'échantillon élué dans la colonne « Sample Position » (Position échantillons) est « Extra Tube (bottom row) » (Tube supplémentaire [ligne du bas]). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger le HSV2 Q-PCR Mix sur le « Inventory Block » (Bloc inventaire) sélectionné en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la « Inventory Area » (Zone inventaire) sélectionnée en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger les « PCR Cassettes » (Cassettes de PCR) et les échantillons d'acide nucléique extraits en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Fermer le tiroir de l'instrument.
- Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

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

Remarque : à la fin de l'analyse, l'échantillon extrait restant peut être retiré de l'instrument, bouché et conservé à -20 °C. Éviter tout déversement de l'échantillon extrait.

Remarque : à la fin de l'analyse, les PCR Cassettes (Cassettes de PCR) et les consommables doivent être mis au rebut conformément à l'ensemble des réglementations gouvernementales et environnementales. Éviter tout déversement des produits de la réaction.

Remarque : à la fin de l'analyse, le mélange de PCR peut être conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant 16 heures au maximum.

C. Analyse d'étalonnage

Pour configurer l'analyse d'étalonnage, effectuer les étapes suivantes comme indiqué par la GUI :

1. Décongeler un nombre de tubes de HSV2 Q - PCR Mix suffisant pour la session d'analyse. Chaque 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.

Remarque : protéger le HSV2 Q - PCR Mix de la lumière lors de la décongélation car ce réactif est photosensible.

2. Décongeler les tubes de HSV2 Q - PCR Standard (Cal1 : HSV2 Q - PCR Standards 10², Cal2 : HSV2 Q - PCR Standards 10³, Cal3 : HSV2 Q - PCR Standards 10⁴, Cal4 : HSV2 Q - PCR Standards 10⁵). Chaque tube permet d'effectuer 4 sessions d'analyse. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
3. Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
4. Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initial) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élution extrait) est de 100 µL.
5. Dans la « Track » (Position) d'intérêt, sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (HSV2 ELITe_STD) et renseigner le numéro de lot et la date de péremption du HSV2 Q - PCR Standard. Cliquer sur le bouton « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
6. Charger le HSV2 Q-PCR Mix sur le « Inventory Block » (Bloc inventaire) sélectionné en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
7. Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la « Inventory Area » (Zone inventaire) sélectionnée en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
8. Charger les tubes de calibrateur et les cassettes de PCR en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage. Veiller à charger les liquides de PCR Standard aux positions correctes comme indiqué par la GUI.
9. Fermer le tiroir de l'instrument.
10. Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

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

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

Remarque : les calibrateurs peuvent être utilisés pendant 4 sessions d'analyse distinctes de 3 heures chacune.

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

Remarque : à la fin de l'analyse, le mélange de PCR peut être conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant 16 heures au maximum.

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

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

1. Décongeler des tubes de HSV2 Q - PCR Mix en nombre suffisant pour la session d'analyse. Chaque 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.

Remarque : protéger le HSV2 Q - PCR Mix de la lumière lors de la décongélation car ce réactif est photosensible.

2. Décongeler le produit HSV2 - Positive Control, pour l'amplification du contrôle positif. Chaque tube permet d'effectuer 4 sessions d'analyse. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
3. Transférer au minimum 50 µL d'eau de qualité biologie moléculaire pour les sessions d'analyse dans un (1) « Elution tube » (Tube d'élution) fourni avec le « ELITe InGenius SP Consumable Set ».
4. Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
5. Dans la « Track » (Position) d'intérêt, sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test).
6. Pour le contrôle positif, sélectionner HSV2 ELITe_PC et renseigner le numéro de lot et la date de péremption du HSV2 Positive Control.
7. Pour le contrôle négatif, sélectionner HSV2 ELITe_NC et renseigner le numéro de lot et la date de péremption de l'eau de qualité biologie moléculaire.
8. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
9. Charger le HSV2 Q-PCR Mix sur le « Inventory Block » (Bloc inventaire) sélectionné en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
10. Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la « Inventory Area » (Zone inventaire) sélectionnée en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
11. Charger la « PCR Cassette » (Cassette de PCR) d'amplification, le contrôle positif et/ou le contrôle négatif en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
12. Fermer le tiroir de l'instrument.
13. Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

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

Remarque : le contrôle positif doit être analysé en tant que contrôle d'amplification, pour paramétrer le « Control Chart » (Graphique de contrôle). Quatre (4) valeurs de contrôle positif, provenant de 4 analyses différentes, sont requises pour configurer le graphique. Ensuite, les valeurs du contrôle positif sont utilisées pour surveiller l'étape d'amplification. Se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument pour plus de détails.

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

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

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

Remarque : le PCR Mix peut être conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant 16 heures au maximum.

Examen et approbation des résultats

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

À la fin de l'analyse, l'écran « Results Display » (Affichage des résultats) s'affiche automatiquement. 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 (« Sample Report » [Rapport échantillons] ou « Track Report » [Rapport des positions]).

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

Remarque : pour obtenir des informations détaillées, se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument **ELITe InGenius**.

L'instrument **ELITe InGenius** génère les résultats à l'aide du produit « **HSV2 ELITe MGB Kit** » en exécutant la procédure suivante :

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

A. Validation de la courbe d'étalonnage

Le logiciel **ELITe InGenius** interprète les résultats de la PCR pour la sonde spécifique au HSV2 (« HSV2 ») et la sonde de contrôle interne spécifique (« IC ») dans la réaction d'amplification des calibrateurs avec les paramètres de protocole de test HSV2 ELITe_STD. Les valeurs Ct résultantes sont utilisées pour valider le système (lots de réactifs et instrument).

La courbe d'étalonnage, spécifique au lot de réactifs d'amplification, est stockée dans la base de données après approbation du personnel disposant des privilèges « Administrator » (Administrateur) ou « Analyst » (Analyste) en suivant les instructions de la GUI.

La courbe d'étalonnage, spécifique au lot de réactifs d'amplification, expire **au bout de 60 jours**.

Avant d'analyser un échantillon, il est absolument indispensable de générer et d'approuver la courbe d'étalonnage pour le lot de réactifs d'amplification utilisé. La disponibilité des résultats de la courbe d'étalonnage dont le statut est « Approved » (Approuvé) est indiquée dans la fenêtre « Calibration » (Étalonnage) du logiciel **ELITe InGenius**.

Remarque : si la courbe d'étalonnage ne répond pas aux critères d'acceptation, le message « Failed » (Échec) s'affiche dans l'écran « Calibration » (Étalonnage). Dans ce cas, les résultats ne peuvent pas être approuvés et les réactions d'amplification du calibrateur doivent être répétées.

Remarque : si la courbe d'étalonnage est analysée avec des échantillons et que son résultat est non valide, l'intégralité de la session d'analyse est non valide et l'amplification de tous les échantillons doit être répétée.

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

Le logiciel **ELITe InGenius** interprète les résultats de la PCR pour la sonde spécifique au HSV2 (« HSV2 ») et la sonde de contrôle interne spécifique (« IC ») dans la réaction d'amplification du Contrôle Positif et Contrôle Négatif avec les paramètres des protocoles de test HSV2 ELITe_PC et HSV2 ELITe_NC. Les valeurs Ct résultantes sont utilisées pour valider le système (lots de réactifs et instrument).

Les résultats du contrôle positif et du contrôle négatif d'amplification, spécifiques au lot de réactifs d'amplification, sont stockés dans la base de données (« Controls » [Contrôles]) après approbation du personnel disposant des privilèges « Administrator » (Administrateur) ou « Analyst » (Analyste) en suivant les instructions de la GUI.

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

Les résultats du contrôle positif d'amplification, spécifiques au lot de réactifs d'amplification, expirent **au bout de 15 jours**.

Avant d'analyser un échantillon et après approbation de la courbe d'étalonnage, il est absolument indispensable de générer et d'approuver les résultats du contrôle positif et du contrôle négatif d'amplification pour le lot de réactifs d'amplification utilisé. La disponibilité des résultats du contrôle positif et du contrôle négatif d'amplification dont le statut est « Approved » (Approuvé) est indiquée dans la fenêtre « Controls » (Contrôles) du logiciel **ELITe InGenius**. Si les résultats du contrôle positif et du contrôle négatif d'amplification sont manquants, les générer comme décrit ci-dessus.

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

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

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

C. Validation des résultats des échantillons

Le logiciel **ELITe InGenius** interprète les résultats de la PCR pour la sonde HSV2 (canal « HSV2 ») et la sonde de contrôle interne (canal « IC ») avec les paramètres de protocole de test HSV2 ELITe_WB_200_100, HSV2 ELITe_PL_200_100 et HSV2 ELITe_CSF_200_100. Les valeurs Ct pour le HSV2 résultantes sont converties en concentration.

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

L'analyse de l'échantillon peut être approuvée lorsque les trois conditions indiquées dans le tableau ci-dessous sont satisfaites.

1) Courbe d'étalonnage	Statut
HSV2 Q - PCR Standard	APPROUVÉ
2) Contrôle Positif	Statut
HSV2 - Positive Control	APPROUVÉ
3) Contrôle Négatif	Statut
HSV2 - Negative Control	APPROUVÉ

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

Résultat de l'analyse de l'échantillon	Interprétation
HSV2: DNA Detected, quantity equal to XXX copies / mL (HSV1 : ADN détecté, quantité égale à XXX copies/mL)	L'ADN du HSV2 a été détecté dans la plage de mesure du test ; la quantité est celle affichée.
HSV2: DNA Detected, quantity below LLoQ copies / mL (HSV2 : ADN détecté, quantité inférieure au nombre de copies/mL de la LLoQ)	L'ADN du HSV2 a été détecté en une quantité inférieure à la limite inférieure de quantification du test.
HSV2: DNA Detected, quantity beyond ULoQ copies / mL (HSV2 : ADN détecté, quantité supérieure au nombre de copies/mL de la ULoQ)	L'ADN du HSV2 a été détecté en une quantité supérieure à la limite supérieure de quantification du test.
HSV2: DNA Not Detected or below LoD copies / mL (HSV2 : ADN non détecté ou inférieur au nombre de copies/mL de la LoD)	L'ADN du HSV2 n'a pas été détecté dans l'échantillon. L'échantillon est négatif pour l'ADN du HSV2 ou sa concentration est inférieure à la limite de détection du test.
Non valide - Tester à nouveau l'échantillon (Invalid - Retest Sample)	Résultat d'analyse non valide en raison d'un échec du Contrôle Interne (en raison, par exemple, d'une extraction incorrecte, d'un transfert d'inhibiteurs). Le test doit être répété.

HSV2 ELITe MGB® Kit

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

REF RTS032PLD

Les échantillons rapportés comme « HSV2: DNA Detected, quantity below LLoQ » (HSV2 : ADN détecté, quantité inférieure à la LLoQ) ne sont pas appropriés pour une quantification. La concentration de l'ADN du HSV2 détectée dans l'échantillon est inférieure au niveau auquel il peut être précisément quantifié. Si l'échantillon a été dilué avant l'extraction ou la PCR, il peut être à nouveau testé sans dilution.

Les échantillons rapportés comme « HSV2: DNA Detected, quantity beyond ULQ » (HSV2 : ADN détecté, quantité supérieure à la ULQ) ne sont pas appropriés pour une quantification. La concentration de l'ADN du HSV2 détectée dans l'échantillon est supérieure au niveau auquel il peut être précisément quantifié. L'échantillon peut être dilué avant l'extraction ou la PCR pour être testé à nouveau afin de générer des résultats compris dans la plage linéaire du test.

Les échantillons rapportés comme « HSV2 DNA Not Detected or below LoD » (ADN du HSV2 non détecté ou inférieur à la LoD) sont appropriés pour l'analyse mais il n'a pas été possible de détecter l'ADN du HSV2. Dans ce cas, l'échantillon peut être négatif pour l'ADN du HSV2 ou l'ADN du HSV2 est présent à une concentration inférieure à la limite de détection du test (se reporter à la section « Caractéristiques de performance »).

Les échantillons positifs pour l'ADN du HSV2 à une concentration inférieure à la LoD, s'ils sont détectés, sont rapportés comme « HSV2: DNA Detected, quantity below LLoQ » (HSV2 : ADN détecté, quantité inférieure à la LLoQ) (se reporter à la section « Caractéristiques de performance »).

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

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

Remarque : les résultats obtenus avec ce test doivent être interprétés en tenant compte de l'ensemble des données cliniques et des autres résultats d'analyse de laboratoire du patient.

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

D. Rapport des résultats des échantillons

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

Le « Sample Report » (Rapport échantillons) présente les détails d'une analyse d'échantillons triés par ID échantillon (SID).

Le « Track Report » (Rapport des positions) présente les détails d'une analyse d'échantillons triés par position sélectionnée.

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

HSV2 ELITe MGB® Kit

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

REF RTS032PLD

ELITe BeGenius

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES

Échantillons

Ce produit doit être utilisé avec les 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 : lorsque l'extraction de l'ADN à partir de 200 µL de sang total est effectuée à l'aide du système **ELITe BeGenius** et du logiciel **ELITe BeGenius** version **2.0** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **HSV2 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'éluat des acides nucléiques dans 100 µL.

Lorsque le tube primaire est utilisé, le volume de l'échantillon varie en fonction du type de tube chargé. Se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction pour obtenir de plus amples informations sur le paramétrage et l'exécution de la procédure d'extraction.

Plasma prélevé sur EDTA

Les échantillons de plasma pour l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés sur de l'EDTA 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 : lorsque l'extraction de l'ADN à partir de 200 µL de plasma est effectuée à l'aide du système **ELITe BeGenius** et du logiciel **ELITe BeGenius** version **2.0** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **HSV2 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'éluat des acides nucléiques dans 100 µL.

Lorsque le tube primaire est utilisé, le volume de l'échantillon varie en fonction du type de tube chargé. Se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction pour obtenir de plus amples informations sur le paramétrage et l'exécution de la procédure d'extraction.

Liquide céphalorachidien (LCR)

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

Remarque : lorsque l'extraction d'ADN à partir de LCR est effectuée à l'aide du système **ELITe BeGenius** et du logiciel **ELITe BeGenius** version **2.0.0** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **HSV2 ELITe_Be_CSF_200_100**. Ce protocole comprend le traitement de 200 µL d'échantillon, l'ajout du **CPE** (Contrôle interne) à 10 µL/extraction et l'éluat des acides nucléiques dans 100 µL.

Lorsque le tube primaire est utilisé, le volume de l'échantillon varie en fonction du type de tube chargé. Se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction pour obtenir de plus amples informations sur le paramétrage et l'exécution de la procédure d'extraction.

Autres échantillons :

Il n'existe actuellement aucune donnée disponible en ce qui concerne les performances du produit avec d'autres échantillons cliniques, par exemple suspensions de leucocytes, suspensions de granulocytes et liquide amniotique.

Substances interférentes

L'échantillon ne doit pas contenir d'héparine afin de prévenir le problème 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.

Calibrateurs et contrôles d'amplification

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

- à titre de jeu de calibrateurs, utiliser les quatre niveaux de concentration du **HSV2 ELITe Standard**, en association avec le protocole « **HSV2 ELITe_Be_STD** »
- à titre de contrôle positif d'amplification, utiliser le **HSV2 - ELITe Positive Control**, en association avec le protocole « **HSV2 ELITe_Be_PC** »
- à titre de contrôle négatif d'amplification, utiliser de l'eau de qualité biologie moléculaire (non incluse dans ce kit), en association avec le protocole « **HSV2 ELITe_Be_NC** ».

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

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

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

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

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

Contrôles de qualité

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

PROCÉDURE AVEC LE SYSTÈME ELITe BeGenius

L'utilisation du « **HSV2 ELITe MGB Kit** » avec le système **ELITe BeGenius** comporte trois étapes :

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

Vérification de la préparation du système

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

- mettre le système **ELITe BeGenius** en marche et sélectionner le mode « **CLOSED** » (FERMÉ) ;
- vérifier que les calibrateurs (**HSV2 Q-PCR Standard**) ont été analysés, sont approuvés et ne présentent pas le statut (Status) Expiré. Ceci peut être vérifié dans le menu « Calibration » (Étalonnage) de la page Home (Accueil) ;

- vérifier que les contrôles d'amplification (**HSV2 - Positive Control**, **HSV2 Negative Control**) ont été analysés, sont approuvés et ne présentent pas le statut (Status) Expiré. Ceci peut être vérifié dans le menu « Control » (Contrôle) de la page Home (Accueil) ;
- choisir le type d'analyse et paramétrer l'analyse, en suivant les instructions de l'interface graphique utilisateur (GUI) concernant le paramétrage de la session d'analyse et en utilisant les protocoles de test fournis par ELITechGroup. Ces protocoles de DIV ont été spécifiquement validés avec les kits **ELITe MGB**, les matrices et l'instrument **ELITe BeGenius**.

Les protocoles de test disponibles pour le « **HSV2 ELITe MGB Kit** » sont décrits dans le tableau ci-dessous.

Protocoles de test pour le « HSV2 ELITe MGB Kit » avec le système ELITe BeGenius			
Nom	Matrice	Unités du rapport	Caractéristiques
HSV2 ELITe_Be_PL_200_100	Plasma	copies/mL	Volume d'extraction initial : 200 µL Volume d'élution extrait : 100 µL Contrôle Interne : 10 µL Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de l'échantillon PCR : 20 µL
HSV2 ELITe_Be_WB_200_100	Sang total	copies/mL	Volume d'extraction initial : 200 µL Volume d'élution extrait : 100 µL Contrôle Interne : 10 µL Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de l'échantillon PCR : 20 µL
HSV2 ELITe_Be_CSF_200_100	LCR	copies/mL	Volume d'extraction initial : 200 µL Volume d'élution extrait : 100 µL Contrôle Interne : 10 µL Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de l'échantillon PCR : 20 µL

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

Paramétrage de la session d'analyse

Le produit **HSV2 ELITe MGB Kit** peut être utilisé sur le système **ELITe BeGenius** pour les opérations suivantes :

- A. Analyse d'échantillons (EXTR + PCR),
- B. Analyse d'amplification (« PCR Only » [PCR uniquement]),
- C. Analyse d'étalonnage (« PCR Only » [PCR uniquement]),
- D. Analyse d'amplification du contrôle positif et négatif (« PCR Only » [PCR uniquement]).

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

Remarque : 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 intégrée

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

1. Décongeler des tubes de HSV2 Q - PCR Mix en nombre suffisant pour la session d'analyse. Chaque nouveau tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions de consommation de réactif optimales. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.

Remarque : décongeler le HSV2 PCR Mix dans l'obscurité, car ce réactif est sensible à la lumière.

2. Décongeler des tubes de CPE en nombre suffisant pour la session d'analyse. Chaque nouveau tube permet d'effectuer 12 extractions. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
3. Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
4. Retirer tous les portoirs de la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement) et les placer sur la table de préparation.
5. Sélectionner le « run mode » (mode d'analyse) : « Extract + PCR » (Extraction + PCR).
6. Charger les échantillons dans la zone de refroidissement en commençant par le portoir d'échantillons L5.
7. Insérer le portoir dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.

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

8. Vérifier le Extraction Input Volume (Volume d'extraction initial) (200 µL) et le Extracted Elute Volume (Volume d'élution extrait) (100 µL).
9. Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (c'est-à-dire HSV2 ELITe_Be_PL_200_100). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
10. Si une deuxième extraction doit être exécutée, répéter les étapes 6 à 9 en utilisant le portoir d'échantillons L4.
11. Charger les tubes d'élution à codes-barres dans la zone de refroidissement en commençant par le portoir d'élution L3.

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

12. Insérer le portoir d'élution L3 dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
13. Répéter les étapes 11 et 12 en utilisant le portoir de réactif/élution L2.
14. Charger le CPE et le HSV2 Q-PCR Mix dans la zone de refroidissement.
15. Insérer le portoir de réactif L1 dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
16. Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la « Inventory Area » (Zone inventaire) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
17. Charger le portoir de PCR avec la « PCR Cassette » (Cassette de PCR) dans la Inventory Area (Zone inventaire) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
18. Charger le portoir d'extraction avec les cartouches d'extraction « ELITe InGenius SP 200 » et les consommables d'extraction requis en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
19. Fermer le tiroir de l'instrument.
20. Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

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

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

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

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

B. Analyse d'amplification

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

1. Décongeler des tubes de HSV2 Q - PCR Mix en nombre suffisant pour la session d'analyse. Chaque nouveau tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions de consommation de réactif optimales. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.

Remarque : décongeler le HSV2 PCR Mix dans l'obscurité, car ce réactif est sensible à la lumière.

2. Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
3. Retirer les portoirs 1, 2 et 3 de la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement) et les placer sur la table de préparation.
4. Sélectionner le « run mode » (mode d'analyse) : « PCR Only » (PCR uniquement).
5. Charger les échantillons dans la zone de refroidissement en commençant par le portoir d'élution L3.
6. Insérer le portoir dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
7. Même si aucune extraction n'est réalisée, vérifier le Extraction Input Volume (Volume d'extraction initial) (200 µL) et le Extracted Elute Volume (Volume d'élution extrait) (100 µL).
8. Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Analyse) (par ex. HSV2 ELITe_Be_PL_200_100). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
9. Charger le HSV2 Q-PCR Mix dans la zone de refroidissement.
10. Insérer le portoir dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
11. Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la « Inventory Area » (Zone inventaire) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
12. Charger le portoir de PCR avec la « PCR Cassette » (Cassette de PCR) dans la Inventory Area (Zone inventaire) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
13. Fermer le tiroir de l'instrument.
14. Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

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

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

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

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

C. Analyse d'étalonnage

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

1. Décongeler des tubes de HSV2 Q - PCR Mix en nombre suffisant pour la session d'analyse. Chaque nouveau tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions de consommation de réactif optimales. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.

Remarque : décongeler le **HSV2 PCR Mix** dans l'obscurité, car ce réactif est sensible à la lumière.

2. Décongeler les tubes de HSV2 Q - PCR Standard (Cal1 : HSV2 Q-PCR Standards 10², Cal2 : HSV2 Q-PCR Standards 10³, Cal3 : HSV2 Q-PCR Standards 10⁴, Cal4 : HSV2 Q-PCR Standards 10⁵). Chaque tube permet d'effectuer 4 sessions d'analyse. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
3. Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
4. Retirer les portoirs 1, 2 et 3 de la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement) et les placer sur la table de préparation.
5. Sélectionner le « run mode » (mode d'analyse) : « PCR Only » (PCR uniquement).
6. Charger les tubes de calibrateur dans le portoir d'élution L3.
7. Insérer le portoir dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
8. Même si aucune extraction n'est réalisée, vérifier le Extraction Input Volume (Volume d'extraction initial) (200 µL) et le Extracted Elute Volume (Volume d'élution extrait) (100 µL).
9. Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (HSV2 ELITe_Be_STD). Cliquer sur le bouton « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
10. Charger le HSV2 Q-PCR Mix dans le portoir de réactif/élution L2.
11. Insérer le portoir de réactif/élution L2 dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
12. Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la « Inventory Area » (Zone inventaire) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
13. Charger le portoir de PCR avec la « PCR Cassette » (Cassette de PCR) dans la Inventory Area (Zone inventaire) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
14. Fermer le tiroir de l'instrument.
15. Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

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

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

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

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

D. Analyse d'amplification 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 HSV2 Q - PCR Mix en nombre suffisant pour la session d'analyse. Chaque nouveau tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions de consommation de réactif optimales. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.

Remarque : décongeler le **HSV2 PCR Mix** dans l'obscurité, car ce réactif est sensible à la lumière.

2. Décongeler le produit HSV2 - ELITe Positive Control, pour l'amplification du contrôle positif. Chaque tube permet d'effectuer 4 sessions d'analyse. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
3. Transférer au minimum 50 µL d'eau de qualité biologie moléculaire (à titre de contrôle négatif) pour les sessions d'analyse dans un (1) « Elution tube » (Tube d'élution) fourni dans le kit de consommables ELITe InGenius SP Consumable Set.
4. Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
5. Retirer les portoirs 1, 2 et 3 de la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement) et les placer sur la table de préparation.
6. Sélectionner le « run mode » (mode d'analyse) : « PCR Only » (PCR uniquement).
7. Charger les tubes de contrôle positif et de contrôle négatif dans le portoir d'élution L3.
8. Insérer le portoir dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
9. Même si aucune extraction n'est réalisée, vérifier le Extraction Input Volume (Volume d'extraction initial) (200 µL) et le Extracted Elute Volume (Volume d'élution extrait) (100 µL).
10. Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (HSV2 ELITe_Be_PC et HSV2 ELITe_Be_NC). Cliquer sur le bouton « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
11. Charger le HSV2 Q-PCR Mix dans le portoir de réactif/élution L2.
12. Insérer le portoir de réactif/élution L2 dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
13. Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la « Inventory Area » (Zone inventaire) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
14. Charger le portoir de PCR avec la « PCR Cassette » (Cassette de PCR) dans la Inventory Area (Zone inventaire) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
15. Fermer le tiroir de l'instrument.
16. Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

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

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

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

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

Examen et approbation des résultats

À la fin de l'analyse, l'écran « Results Display » (Affichage des résultats) 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 (« Sample Report » [Rapport échantillons] ou « Track Report » [Rapport des positions]).

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

L'instrument **ELITe BeGenius** génère les résultats à l'aide du produit HSV2 ELITe MGB Kit en exécutant la procédure suivante :

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

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

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE Systèmes ELITe InGenius et ELITe BeGenius

Sensibilité analytique : limite de détection

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

La LoD de ce test a été testée en utilisant un ADN plasmidique contenant un produit d'amplification dont la concentration initiale a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. L'ADN plasmidique a été dilué à un titre de 10 copies/20 µL dans de l'ADN génomique humain à un titre de 500 ng/20 µL. Cet échantillon a été testé en 24 réplicats en effectuant l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A sur deux instruments différents. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
10 copies d'ADN plasmidique + 500 ng d'ADN génomique humain	24	24	0

La limite de détection (LoD) du HSV2 ELITe MGB Kit a été vérifiée en association avec des échantillons de **sang total** et de **plasma prélevés sur EDTA**, ainsi que de **LCR**, en association avec les systèmes **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** (Mode Extr + PCR).

Pour le sang total

La LoD de ce test a été vérifiée en testant 20 réplicats d'échantillons de sang total dopés à 171 copies/mL sur les systèmes **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR). Les échantillons ont été dopés en utilisant le matériel de référence certifié « Heat Inactivated HSV Type 2 Culture Fluid » (ZeptoMetrix Corporation).

La LoD était confirmée si au moins 18 des 20 réplicats généraient un résultat positif. Les résultats sont présentés dans les tableaux suivants.

Limite de détection pour des échantillons de sang total avec le système ELITe InGenius					
Échantillon	LoD	N	Valide	Positif	Négatif
Sang total prélevé sur EDTA	171 copies/mL	20	20	20	0

Limite de détection pour des échantillons de sang total avec le système ELITe BeGenius					
Échantillon	LoD	N	Valide	Positif	Négatif
Sang total prélevé sur EDTA	171 copies/mL	20	20	20	0

La valeur de la LoD pour la cible HSV2 a été confirmée à 171 copies/mL pour le sang total prélevé sur EDTA.

Pour le plasma

La LoD de ce test a été vérifiée en testant 20 réplicats d'échantillons de plasma dopés à 119 copies/mL sur les systèmes **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR). Les échantillons ont été dopés en utilisant le matériel de référence certifié « Heat Inactivated HSV Type 2 Culture Fluid » (ZeptoMetrix Corporation).

La LoD était confirmée si au moins 18 des 20 réplicats généraient un résultat positif. Les résultats sont présentés dans les tableaux suivants.

Limite de détection pour des échantillons de plasma avec le système ELITe InGenius					
Échantillon	LoD	N	Valide	Positif	Négatif
Plasma prélevé sur EDTA	119 copies/mL	20	20	20	0

Limite de détection pour des échantillons de plasma avec le système ELITe BeGenius					
Échantillon	LoD	N	Valide	Positif	Négatif
Plasma prélevé sur EDTA	119 copies/mL	20	20	20	0

La valeur de la LoD pour la cible HSV2 a été confirmée à 119 copies/mL pour le plasma prélevé sur EDTA.

Pour le liquide céphalorachidien (LCR)

La LoD de ce test a été vérifiée en testant 20 réplicats d'échantillons de LCR dopés à 119 copies/mL sur les systèmes **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR). Les échantillons ont été dopés en utilisant le matériel de référence « Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV-2) Culture Fluid Heat Inactivated », ZeptoMetrix.

La LoD était confirmée si au moins 18 des 20 réplicats généraient un résultat positif. Les résultats sont présentés dans les tableaux suivants.

Limite de détection pour des échantillons de LCR avec le système ELITe InGenius					
Échantillon	LoD	N	Valide	Positif	Négatif
Liquide céphalorachidien	119 copies/mL	20	20	20	0

Limite de détection pour des échantillons de LCR avec le système ELITe BeGenius					
Échantillon	LoD	N	Valide	Positif	Négatif
Liquide céphalorachidien	119 copies/mL	20	20	19	1

La valeur de la LoD pour la cible HSV2 a été confirmée à 119 copies/mL pour le liquide céphalorachidien.

Plage de mesure linéaire et limites de quantification

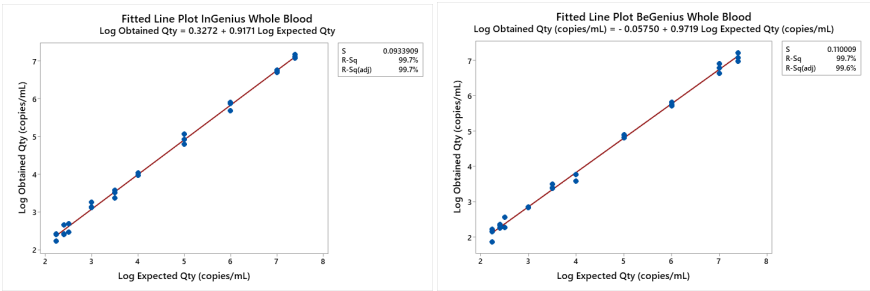
La plage de mesure linéaire du HSV2 ELITe MGB Kit utilisé en association avec des échantillons de **sang total** et de **plasma prélevés sur EDTA**, ainsi que de **LCR**, en association avec les systèmes **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** a été vérifiée avec un panel de dilutions du HSV2. Le panel a été préparé en diluant le matériel « Heat Inactivated HSV Type 2 Culture Fluid » (ZeptoMetrix Corporation) dans des matrices négatives pour l'ADN du HSV2.

Pour le sang total

Le panel consistait en dix points de dilution à partir de $2,5 \times 10^7$ copies/mL jusqu'à environ 171 copies/mL. Chaque échantillon du panel a été testé en 3 réplicats.

L'analyse des données obtenues, utilisant une analyse de régression linéaire, a démontré que le test effectué en association avec des échantillons de sang total présentait une réponse linéaire pour toutes les dilutions avec un coefficient de corrélation R-carré (R²) de 0,997 pour l'instrument **ELITe InGenius** et de 0,997 pour l'instrument **ELITe BeGenius**.

Les résultats sont présentés sur les graphiques 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 0,1081 log copies/mL pour l'instrument **ELITe InGenius** et à 0,1900 log copies/mL pour l'instrument **ELITe BeGenius**) et exacts (biais égal à -0,1221 log copies/mL pour l'instrument **ELITe InGenius** et à 0,1591 log copies/mL pour l'instrument **ELITe BeGenius**) : 171 copies/mL.

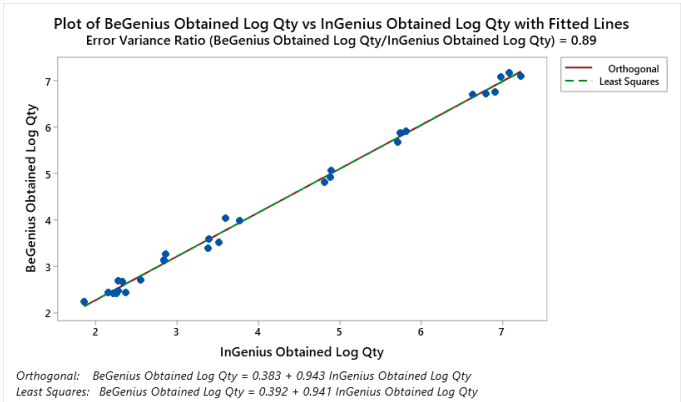
La limite supérieure de quantification (ULOQ) a été définie à la concentration la plus élevée testée qui génère des résultats quantitatifs précis (écart-type égal à 0,0472 log copies/mL pour l'instrument **ELITe InGenius** et à 0,1191 log copies/mL pour l'instrument **ELITe BeGenius**) et exacts (biais égal à 0,2744 log copies/mL pour l'instrument **ELITe InGenius** et à 0,3029 log copies/mL pour l'instrument **ELITe BeGenius**) : 25 000 000 copies/mL.

Les résultats finaux sont résumés dans le tableau suivant.

Plage de mesure linéaire pour les échantillons de sang total avec les instruments ELITe InGenius et ELITe BeGenius		
Unité de mesure	limite inférieure	limite supérieure
copies/mL	171	25 000 000

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

Les résultats sont résumés sur la figure suivante.



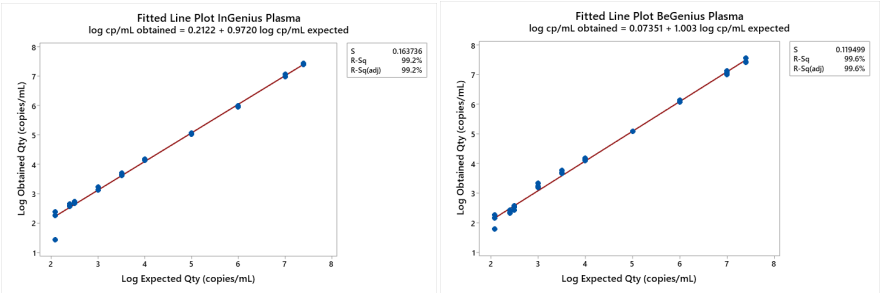
Dans ce test, l'analyse de régression orthogonale générait une pente de 0,943 (IC à 95 % : 0,919 ; 0,967) et une ordonnée à l'origine de 0,383 (IC à 95 % : 0,276 ; 0,491). L'analyse de régression linéaire générait un R2 de 0,996.

Pour le plasma

Le panel consistait en dix points de dilution à partir de 2,5 x 10⁷ copies/mL jusqu'à environ 119 copies/mL. Chaque échantillon du panel a été testé en 3 réplicats.

L'analyse des données obtenues, utilisant une analyse de régression linéaire, a démontré que le test effectué en association avec des échantillons de plasma présentait une réponse linéaire pour toutes les dilutions avec un coefficient de corrélation R-carré (R2) de 0,992 pour l'instrument **ELITe InGenius** et de 0,996 pour l'instrument **ELITe BeGenius**.

Les résultats sont présentés sur les graphiques 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 0,2529 log copies/mL pour l'instrument **ELITe InGenius** et à 0,2931 log copies/mL pour l'instrument **ELITe BeGenius**) et exacts (biais égal à 0,0503 log copies/mL pour l'instrument **ELITe InGenius** et à 0,0005 log copies/mL pour l'instrument **ELITe BeGenius**) : 119 copies/mL.

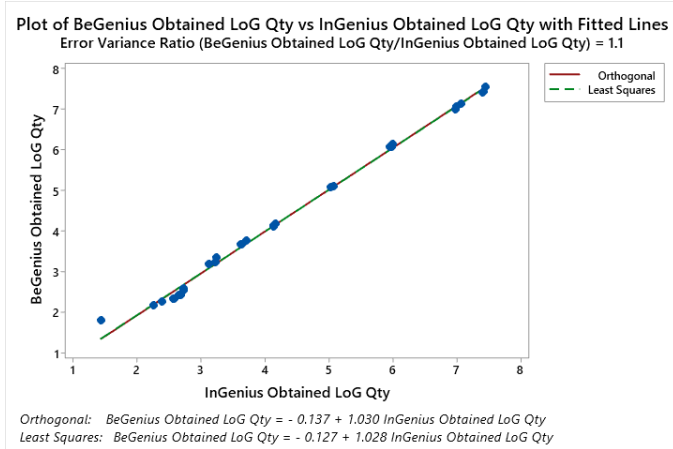
La limite supérieure de quantification (ULOQ) a été définie à la concentration la plus élevée testée qui génère des résultats quantitatifs précis (écart-type égal à 0,0234 log copies/mL pour l'instrument **ELITe InGenius** et à 0,0761 log copies/mL pour l'instrument **ELITe BeGenius**) et exacts (biais égal à -0,0258 log copies/mL pour l'instrument **ELITe InGenius** et à -0,0646 log copies/mL pour l'instrument **ELITe BeGenius**) : 25 000 000 copies/mL.

Les résultats finaux sont résumés dans le tableau suivant.

Plage de mesure linéaire pour les échantillons de plasma avec les instruments ELITe InGenius et ELITe BeGenius		
Unité de mesure	limite inférieure	limite supérieure
copies/mL	119	25 000 000

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

Les résultats sont résumés sur la figure suivante.



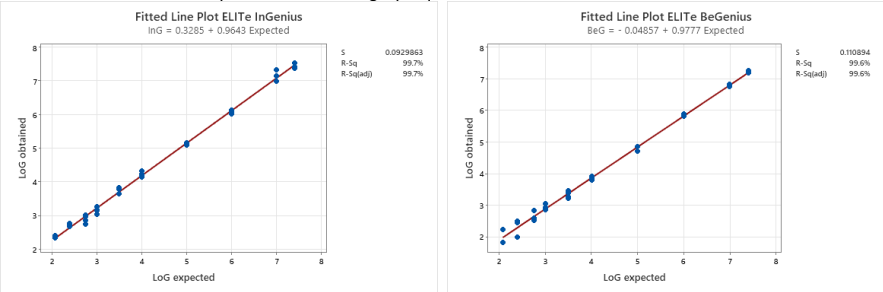
Dans ce test, l'analyse de régression orthogonale générait une pente de 1,030 (IC à 95 % : 1,005 ; 1,056) et une ordonnée à l'origine de -0,137 (IC à 95 % : - 0,257 ; -0,017). L'analyse de régression linéaire générait un R2 de 0,996.

Pour le liquide céphalorachidien (LCR) :

Le panel consistait en dix points de dilution à partir de $2,5 \times 10^7$ copies/mL jusqu'à environ 119 copies/mL. Chaque échantillon du panel a été testé en 4 réplicats. Deux réplicats ont été exclus car ils généraient des valeurs aberrantes.

L'analyse des données obtenues, utilisant une analyse de régression linéaire, a démontré que le test effectué en association avec des échantillons de LCR présentait une réponse linéaire pour toutes les dilutions avec un coefficient de corrélation R-carré (R2) de 0,997 pour l'instrument **ELITe InGenius** et de 0,996 pour l'instrument **ELITe BeGenius**.

Les résultats sont présentés sur les graphiques 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 0,0261 log copies/mL pour l'instrument **ELITe InGenius** et à 0,2349 log copies/mL pour l'instrument **ELITe BeGenius**) et exacts (biais égal à -0,2938 log copies/mL pour l'instrument **ELITe InGenius** et à 0,1138 log copies/mL pour l'instrument **ELITe BeGenius**) : 119 copies/mL.

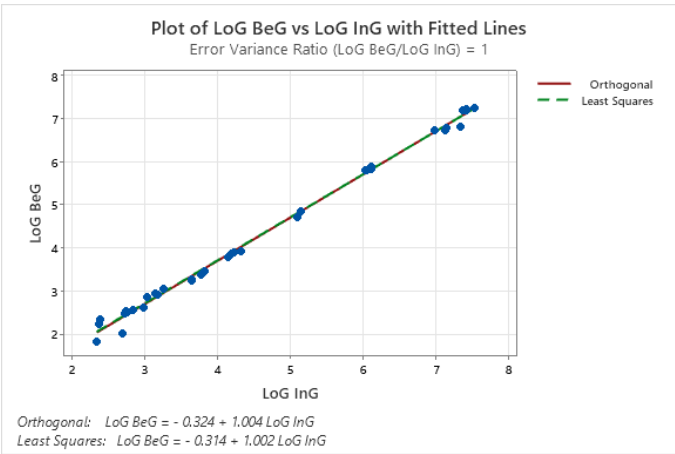
La limite supérieure de quantification (ULOQ) a été définie à la concentration la plus élevée testée qui génère des résultats quantitatifs précis (écart-type égal à 0,0637 log copies/mL pour l'instrument **ELITe InGenius** et à 0,0277 log copies/mL pour l'instrument **ELITe BeGenius**) et exacts (biais égal à -0,0345 log copies/mL pour l'instrument **ELITe InGenius** et à 0,1823 log copies/mL pour l'instrument **ELITe BeGenius**) : 25 000 000 copies/mL.

Les résultats finaux sont résumés dans le tableau suivant.

Plage de mesure linéaire pour les échantillons de LCR avec les instruments ELITe InGenius et ELITe BeGenius		
Unité de mesure	limite inférieure	limite supérieure
copies/mL	119	25 000 000

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

Les résultats sont résumés sur la figure suivante.



Dans ce test, l'analyse de régression orthogonale générait une pente de 1,004 (IC à 95 % : 0,9822 ; 1,0267) et une ordonnée à l'origine de 0,324 (IC à 95 % : -0,4334 ; -0,2147). L'analyse de régression linéaire générait un R2 de 0,995.

Répétabilité

La répétabilité des résultats obtenus avec le produit HSV2 ELITe MGB Kit en association avec les instruments **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** a été testée en analysant un panel d'échantillons de sang total prélevé sur EDTA. Le panel incluait un échantillon négatif et deux échantillons dopés avec un matériel de référence certifié du HSV2 « Heat Inactivated HSV Type 2 Culture Fluid » (Zeptomatrix) à une concentration de 3 x la LoD (environ 513 cp/mL) et de 10 x la LoD (environ 1710 cp/mL).

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

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

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

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

Répétabilité intra-session, ELITe InGenius								
Échantillon	HSV2				Contrôle Interne			
	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV
Négatif	0/8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	22,91	0,51	2,24
3 x la LoD	8/8	35,65	0,87	2,45				
10 x la LoD	8/8	33,96	0,20	0,58				

Répétabilité inter-sessions, ELITe InGenius								
Échantillon	HSV2				Contrôle Interne			
	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV
Négatif	0/16	N.A.	N.A.	N.A.	48/48	23,40	0,82	3,49
3 x la LoD	16/16	35,87	0,71	1,99				
10 x la LoD	16/16	33,92	0,22	0,66				

Dans le test de répétabilité sur l'instrument **ELITe InGenius**, l'analyse détectait la cible HSV2 comme attendu et montrait des valeurs Ct avec un % CV inférieur à 5 % pour le HSV2 et pour le Internal Control.

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

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

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

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

Répétabilité intra-session, ELITe BeGenius								
Échantillon	HSV2				Contrôle Interne			
	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV
Négatif	0/8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	27,16	0,87	3,19
3 x la LoD	8/8	37,58	0,67	1,78				
10 x la LoD	8/8	35,25	0,56	1,58				

Répétabilité inter-sessions, ELITe BeGenius								
Échantillon	HSV2				Contrôle Interne			
	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV
Négatif	0/16	N.A.	N.A.	N.A.	48/48	26,87	0,94	3,49
3 x la LoD	16/16	37,59	0,66	1,75				
10 x la LoD	16/16	35,41	0,84	2,37				

Dans le test de répétabilité sur l'instrument **ELITe BeGenius**, l'analyse détectait la cible HSV2 comme attendu et montrait des valeurs Ct avec un % CV inférieur à 5 % pour le HSV2 et pour le Contrôle Interne.

Reproductibilité

La reproductibilité des résultats obtenus avec le produit HSV2 ELITe MGB Kit en association avec les instruments **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** a été testée en analysant un panel d'échantillons de sang total prélevé sur EDTA. Le panel incluait un échantillon négatif et deux échantillons dopés avec un matériel de référence certifié du HSV2 « Heat Inactivated HSV Type 2 Culture Fluid » (Zeptomatrix) à une concentration de 3 x la LoD (environ 513 cp/mL) et de 10 x la LoD (environ 1710 cp/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 l'instrument **ELITe InGenius** en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

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

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

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

Reproductibilité inter-instruments, ELITe InGenius								
Échantillon	HSV2				Contrôle Interne			
	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV
Négatif	0/8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	23,91	0,35	1,45
3 x la LoD	8/8	36,33	0,55	1,51				
10 x la LoD	8/8	34,46	0,26	0,86				

Répétabilité inter-lots, ELITe InGenius								
Échantillon	HSV2				Contrôle Interne			
	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV
Négatif	0/8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	24,18	0,42	1,76
3 x la LoD	8/8	36,45	0,46	1,26				
10 x la LoD	8/8	34,66	0,26	0,76				

Dans le test de reproductibilité sur l'instrument **ELITe InGenius**, l'analyse détectait la cible HSV2 comme attendu et montrait des valeurs Ct avec un % CV inférieur à 5 % pour le HSV2 et pour le Contrôle Interne.

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

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

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

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

Répétabilité inter-instruments, ELITe BeGenius								
Échantillon	HSV2				Contrôle Interne			
	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV
Négatif	0/8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	28,32	0,41	1,46
3 x la LoD	8/8	37,43	0,42	1,15				
10 x la LoD	8/8	35,88	0,25	0,75				

Répétabilité inter-lots, ELITe BeGenius								
Échantillon	HSV2				Contrôle Interne			
	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV
Négatif	0/8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	27,86	0,66	2,37
3 x la LoD	8/8	36,90	0,58	1,59				
10 x la LoD	8/8	35,17	0,49	1,39				

Dans le test de reproductibilité sur l'instrument **ELITe BeGenius**, l'analyse détectait la cible HSV2 comme attendu et montrait des valeurs Ct avec un % CV inférieur à 5 % pour le HSV2 et pour le Contrôle Interne.

Sensibilité analytique : reproductibilité avec un matériel de référence certifié

La sensibilité analytique du test, en tant que reproductibilité de la valeur d'un matériel de référence étalonné, a été évaluée en utilisant, à titre de matériel de référence, le panel étalonné « AcroMetrix HSV2 Plasma Panel » (Life Technologies, US). Chaque échantillon du panel a été testé en 2 réplicats en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction, l'amplification, la détection et l'interprétation des résultats, à l'aide du système **ELITe InGenius** et des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tests avec un matériel de référence étalonné et le système ELITe InGenius				
Échantillon	Titre nominal copies/mL	Titre nominal log ₁₀ copies/mL	Positifs/Réplicats	Résultats moyens Log ₁₀ copies/mL
ADN du HSV2 1E6	10 ⁶	6,000	2/2	6,035
ADN du HSV2 1E5	10 ⁵	5,000	2/2	5,067
ADN du HSV2 1E4	10 ⁴	4,000	2/2	3,978
ADN du HSV2 1E3	10 ³	3,000	2/2	3,190
ADN du HSV2 1E2	10 ²	2,000	2/2	1,711

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

Des tests supplémentaires ont été réalisés en utilisant, à titre de matériel de référence, le panel « QCMD 2014 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel » (Qnostics Ltd, Royaume-Uni), un panel de dilutions du HSV2. Chaque échantillon du panel a été testé en 2 réplicats en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction, l'amplification, la détection et l'interprétation des résultats, à l'aide du système **ELITe InGenius** et des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tests avec un matériel de référence étalonné et le système ELITe InGenius		
Échantillon	Statut de l'échantillon	Positifs/Réplicats
HSVDNA14-01	Positif pour le HSV1, négatif pour le HSV2	0/2
HSVDNA14-02	Négatif pour le HSV1 et le HSV2	0/2
HSVDNA14-03	Positif pour le HSV1, négatif pour le HSV2	0/2
HSVDNA14-04	Positif pour le HSV1, négatif pour le HSV2	0/2
HSVDNA14-05	Positif pour le HSV1, négatif pour le HSV2	0/2
HSVDNA14-06	HSV2 fréquemment détecté	2/2
HSVDNA14-07	HSV2 détecté	2/2
HSVDNA14-08	HSV2 fréquemment détecté	2/2
HSVDNA14-09	Positif pour le HSV1, négatif pour le HSV2	0/2
HSVDNA14-10	Négatif pour le HSV1 et le HSV2	0/2

Tous les échantillons ont été correctement détectés.

Sensibilité diagnostique : confirmation des échantillons positifs

La sensibilité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons cliniques positifs, a été évaluée en analysant quelques échantillons cliniques de sang total prélevé sur EDTA, de plasma prélevé sur EDTA et de liquide céphalorachidien qui étaient positifs pour l'ADN du HSV2, en association avec le système **ELITe InGenius**. Étant donné que les performances analytiques du système **ELITe BeGenius** sont équivalentes à celles du système **ELITe InGenius**, les performances diagnostiques du test effectué sur les deux instruments sont également considérées comme équivalentes. En conséquence, la sensibilité diagnostique du test obtenue en association avec le système **ELITe InGenius** s'applique également au système **ELITe BeGenius**.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant 23 échantillons de sang total prélevé sur EDTA qui étaient négatifs pour l'ADN du HSV2 et avaient été dopés avec de l'ADN du HSV2 en ajoutant l'échantillon HSV2MQP01-Medium (concentration moyenne), issu du panel « HSV2 Molecular Q Panel » (Qnostics Ltd, Royaume-Uni), à un titre de 750 copies/mL ; 30 échantillons de plasma prélevé sur EDTA qui étaient négatifs pour l'ADN du HSV2 et avaient été dopés avec de l'ADN du HSV2 en ajoutant le matériel « HSV2 ELITe-IQC High » (ELITech Group S.p.A.) à un titre de 750 copies/mL et 20 échantillons de LCR qui étaient négatifs pour l'ADN du HSV2 et avaient été dopés avec de l'ADN du HSV2 en ajoutant le matériel « HSV2 ELITe-IQC High » (ELITech Group S.p.A.) à un titre de 750 copies/mL.

Chaque échantillon a été testé en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction, l'amplification, la détection et l'interprétation des résultats, à l'aide du système **ELITe InGenius** et des produits ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé sur EDTA positif pour l'ADN du HSV2	23	22	1
Plasma prélevé sur EDTA dopé avec de l'ADN du HSV2	30	30	0
Liquide céphalorachidien dopé avec de l'ADN du HSV2	20	20	0

Tous les échantillons de plasma et de liquide céphalorachidien étaient valides et positifs. Tous les échantillons de sang total étaient valides ; 22 échantillons ont été confirmés comme positifs. Un échantillon testé a généré un résultat négatif discordant, probablement en raison d'une inhibition. Dans ce test, la sensibilité diagnostique de l'analyse était de 99 %.

Spécificité diagnostique : confirmation des échantillons négatifs

La spécificité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons négatifs, a été évaluée en analysant quelques échantillons cliniques de sang total prélevé sur EDTA, de plasma prélevé sur EDTA et de liquide céphalorachidien qui étaient négatifs pour l'ADN du HSV2, en association avec le système **ELITe InGenius**. Étant donné que les performances analytiques du système **ELITe BeGenius** sont équivalentes à celles du système **ELITe InGenius**, les performances diagnostiques du test effectué sur les deux instruments sont également considérées comme équivalentes. En conséquence, la spécificité diagnostique du test obtenue en association avec le système **ELITe InGenius** s'applique également au système **ELITe BeGenius**.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant 34 échantillons de sang total prélevé sur EDTA issus de donneurs en bonne santé qui étaient présumés négatifs pour l'ADN du HSV2 ; 39 échantillons de plasma prélevé sur EDTA issus de donneurs en bonne santé qui étaient présumés négatifs pour l'ADN du HSV2 et 22 échantillons de LCR issus de donneurs en bonne santé qui étaient présumés négatifs pour l'ADN du HSV2. Chaque échantillon a été testé en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction, l'amplification, la détection et l'interprétation des résultats, à l'aide du système **ELITe InGenius** et des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du HSV2	34	0	34
Plasma prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du HSV2	39	0	39
Liquide céphalorachidien négatif pour l'ADN du HSV2	22	0	22

Tous les échantillons de sang total, de plasma et de liquide céphalorachidien étaient valides et négatifs. La valeur seuil Ct du Contrôle Interne (Ct de l'IC) est définie à 35. Dans ce test, la spécificité diagnostique de l'analyse était de 100 %.

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 biologiques suivants : liquide céphalorachidien (LCR), sang total prélevé sur EDTA, plasma prélevé sur EDTA.

Liquide céphalorachidien (LCR)

Les échantillons de LCR pour l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés conformément aux directives de laboratoire en évitant toute contamination par le sang du patient. Ils doivent être transportés entre +2° et +8 °C et conservés entre +2° et +8 °C pendant quatre heures au maximum. Sinon, ils doivent être congelés et conservés à -20 °C pendant trente jours au maximum ou à -70 °C pour des périodes plus longues.

Il est recommandé de diviser les échantillons en aliquotes avant la congélation afin d'éviter des cycles répétés de congélation et de décongélation.

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 du liquide céphalorachidien avec le système **ELITe STAR** et la **version logicielle 3.4.13** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **UUNI_E100S200_EL1**, qui traite 200 µL d'échantillon et effectue l'élution de l'extrait dans 100 µL. Les échantillons dans les tubes primaires peuvent être chargés directement sur le système **ELITe STAR**. Un volume minimum de 700 µL est toujours requis pour chaque échantillon. Ajouter **200 µL** de **CPE** dans un tube de protéinase-véhicule comme indiqué dans le manuel du kit d'extraction. Pour la procédure d'extraction, se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction.

Remarque : pour procéder à l'extraction de l'ADN du liquide céphalorachidien avec le système **ELITe GALAXY** et la **version logicielle 1.3.1** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **xNA Extraction (Universal)**, qui traite 300 µL d'échantillon et effectue l'élution de l'extrait dans 200 µL. Les échantillons dans les tubes primaires peuvent être chargés directement sur le système « **ELITe GALAXY** ». Un volume minimum de 400-650 µL, selon la classe de tube utilisée, est toujours requis pour chaque échantillon. Ajouter **10 µL/échantillon** de **CPE**. Le **CPE** doit être ajouté à la **solution IC + véhicule** comme indiqué dans le manuel du kit d'extraction. Pour la procédure d'extraction, se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction.

Remarque : pour procéder à l'extraction de l'ADN du liquide céphalorachidien avec l'instrument « **NucliSENS® easyMAG®** », utiliser le protocole d'extraction **Generic 2.0.1** et suivre ces instructions : transférer **500 µL** d'échantillon dans la barrette à 8 puits et effectuer l'extraction. Après l'incubation de 10 minutes, ajouter **5 µL** de **CPE** pour le contrôle interne avant d'ajouter la **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** et poursuivre l'extraction. Éluer les acides nucléiques dans **100 µL** de tampon d'élution.

Sang total prélevé sur EDTA

Les échantillons de sang total pour l'extraction de l'ADN doivent être prélevés sur de l'EDTA 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 du sang total avec le système **ELITe STAR** et la **version logicielle 3.4.13** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **UUNI_E100S200_EL1**, qui traite 200 µL d'échantillon et effectue l'élution de l'extrait dans 100 µL. Les échantillons dans les tubes primaires peuvent être chargés directement sur le système « **ELITe STAR** ». Un volume minimum de 700 µL est toujours requis pour chaque échantillon. Ajouter **200 µL** de **CPE** dans un tube de protéinase-véhicule comme indiqué dans le manuel du kit d'extraction. Pour la procédure d'extraction, se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction.

HSV2 ELITe MGB® Kitréactif pour l'amplification en temps réel
de l'ADN

REF RTS032PLD

Remarque : pour procéder à l'extraction de l'ADN du sang total avec le système **ELITe GALAXY** et la **version logicielle 1.3.1** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **xNA Extraction (Universal)**, qui traite 300 µL d'échantillon et effectue l'élution de l'extrait dans 200 µL. Les échantillons dans les tubes primaires peuvent être chargés directement sur le système « **ELITe GALAXY** ». Un volume minimum de 400-650 µL, selon la classe de tube utilisée, est toujours requis pour chaque échantillon. Ajouter **10 µL/échantillon** de **CPE**. Le **CPE** doit être ajouté à la **solution IC + véhicule** comme indiqué dans le manuel du kit d'extraction. Pour la procédure d'extraction, se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction.

Remarque : pour procéder à l'extraction de l'ADN du sang total à l'aide du kit « **EXTRAblood** », suivre le mode d'emploi : commencer avec **200 µL** d'échantillon (2 millions de leucocytes au maximum), puis éluer l'ADN dans **100 µL** de tampon d'élution.

Plasma prélevé sur EDTA

Les échantillons de plasma pour l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés sur de l'EDTA 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 du plasma avec le système **ELITe STAR** et la **version logicielle 3.4.13** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **UUNI_E100S200_ELI**, qui traite 200 µL d'échantillon et effectue l'élution de l'extrait dans 100 µL. Les échantillons dans les tubes primaires peuvent être chargés directement sur le système « **ELITe STAR** ». Un volume minimum de 700 µL est toujours requis pour chaque échantillon. Ajouter **200 µL** de **CPE** dans un tube de protéinase-véhicule comme indiqué dans le manuel du kit d'extraction. Pour la procédure d'extraction, se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction.

Remarque : pour procéder à l'extraction de l'ADN du plasma avec le système **ELITe GALAXY** et la **version logicielle 1.3.1** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **xNA Extraction (Universal)**, qui traite 300 µL d'échantillon et effectue l'élution de l'extrait dans 200 µL. Les échantillons dans les tubes primaires peuvent être chargés directement sur le système « **ELITe GALAXY** ». Un volume minimum de 400-650 µL, selon la classe de tube utilisée, est toujours requis pour chaque échantillon. Ajouter **10 µL/échantillon** de **CPE**. Le **CPE** doit être ajouté à la **solution IC + véhicule** comme indiqué dans le manuel du kit d'extraction. Pour la procédure d'extraction, se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction.

Remarque : pour procéder à l'extraction de l'ADN du plasma avec l'instrument « **NucliSENS® easyMAG®** », utiliser le protocole d'extraction **Generic 2.0.1** et suivre ces instructions : transférer **500 µL** d'échantillon dans la barrette à 8 puits et effectuer l'extraction. Après l'incubation de 10 minutes, ajouter **5 µL** de **CPE** pour le contrôle interne avant d'ajouter la **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** et poursuivre l'extraction. Éluer les acides nucléiques dans **100 µL** de tampon d'élution.

Remarque : pour procéder à l'extraction de l'ADN du plasma avec l'instrument « **QIASymphony® SP/AS** » et le kit « **QIASymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit** » avec la **version logicielle 3.5**, utiliser le protocole d'extraction « **Virus Cell free 500_V3_DSP_default IC** » et suivre ces instructions : l'instrument est capable d'utiliser un tube primaire, le volume d'échantillon requis pour l'extraction est **500 µL** et un volume mort minimum de 100 µL est toujours nécessaire. Préparer la solution contenant le tampon AVE et le véhicule d'ARN conformément au manuel d'instructions du kit d'extraction. Ajouter **6 µL/échantillon** de **CPE** à la solution pour chaque échantillon à analyser. Sur l'instrument, dans le compartiment « internal control » (contrôle interne), charger les tubes contenant la solution comme indiqué dans le mode d'emploi du kit ; indiquer la position où les éluats seront distribués et préciser le volume d'élution de **85 µL**. Pour obtenir plus de détails sur la procédure d'extraction, suivre les indications du mode d'emploi 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 le problème 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.

HSV2 ELITe MGB® Kitréactif pour l'amplification en temps réel
de l'ADN

REF RTS032PLD

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 amplification avec une réaction de contrôle négatif et une réaction de contrôle positif.

Pour le contrôle négatif, utiliser de l'eau de qualité biologie moléculaire (non fournie avec ce produit) pour l'ajouter à la réaction à la place de l'ADN extrait de l'échantillon.

Pour le contrôle positif, utiliser le produit « **HSV2 - ELITe Positive Control** » ou le produit « **HSV2 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)

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

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

- mettre le thermocycleur en temps réel en marche, puis l'ordinateur, lancer le logiciel dédié et ouvrir une session de « absolute quantification » (quantification absolue) ;
- paramétrer (à l'aide du « Detector Manager » [Gestionnaire de détecteur]) : le « detector » (détecteur) pour la sonde HSV2 avec le « reporter » (rapporteur) = « FAM » et le « quencher » (désactivateur) = « none » (aucun) (non fluorescent) et le nommer « HSV2 » ;
- paramétrer (à l'aide du Detector Manager [Gestionnaire de détecteur]) : le « detector » (détecteur) pour la sonde du contrôle interne, le « reporter » (rapporteur) = « VIC » (AP525 est analogue à VIC), et le « quencher » (désactivateur) = « none » (aucun) (non fluorescent) et le nommer « IC » ;
- pour chaque puits utilisé dans la microplaque, paramétrer (à l'aide du Well Inspector [Inspecteur de puits]) : le « detector » (détecteur) (type de fluorescence à mesurer), la « passive reference » (référence passive) = « ROX » (AP593 est utilisé à la place de ROX, pour la normalisation de la fluorescence mesurée) et le type de réaction (échantillon, contrôle d'amplification négatif, contrôle d'amplification positif ou étalon en quantité connue). Ajouter ces informations à la **Work Sheet** (Fiche de travail) jointe à la fin du présent manuel ou imprimer la configuration de la microplaque. La **Work Sheet** (Fiche de travail) doit être scrupuleusement suivie pendant le transfert du mélange réactionnel complet et des échantillons dans les puits.

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

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 d'analyse, il est important de procéder comme suit :

- sortir et décongeler les tubes à essai contenant les échantillons à analyser. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ;
- sortir et décongeler les tubes de **HSV2 Q - PCR Mix** requis pour la session d'analyse, en se rappelant que le contenu de chaque tube est suffisant pour préparer **25 réactions**. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ;
- sortir et décongeler les tubes de **HSV2 - Positive Control** ou de **HSV2 Q - PCR Standard**. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ;
- se munir de la **microplaque d'amplification** qui sera utilisée pendant la session d'analyse, en veillant à la manipuler avec des gants non poudrés et à ne pas endommager les puits.

1. Pipeter avec précision **20 µL** de **HSV2 Q - PCR Mix** au fond des puits de la **microplaque d'amplification**, comme précédemment établi dans la **Work Sheet** (Fiche de travail). Éviter d'introduire des bulles.

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

2. En le déposant dans le mélange réactionnel, pipeter avec précision **20 µL** de l'**ADN extrait** du premier échantillon dans le puits correspondant de la **microplaque d'amplification**, comme précédemment établi dans la **Work Sheet** (Fiche de travail). Bien mélanger l'échantillon en pipetant l'**ADN extrait** à trois reprises dans le mélange réactionnel. Éviter d'introduire des bulles. Procéder de la même manière avec les autres échantillons d'**ADN extrait**.
3. En le déposant dans le mélange réactionnel, pipeter avec précision **20 µL** d'**eau de qualité biologie moléculaire** (non incluse avec ce produit) dans le puits de la **microplaque d'amplification** destiné au contrôle négatif d'amplification, comme précédemment établi dans la **Work Sheet** (Fiche de travail). Bien mélanger le contrôle négatif en pipetant l'**eau de qualité biologie moléculaire** à trois reprises dans le mélange réactionnel. Éviter d'introduire des bulles.

4. Selon le résultat requis (qualitatif ou quantitatif), suivre l'une des ces deux options :

- Lorsqu'un résultat **qualitatif** est requis (détection de l'ADN du HSV2), pipeter avec précision, en le déposant dans le mélange réactionnel, **20 µL** de **HSV2 - Positive Control** dans le puits correspondant de la **microplaque d'amplification**, comme précédemment établi dans la **Work Sheet** (Fiche de travail). Bien mélanger le contrôle positif en pipetant le **HSV2 - Positive Control** à trois reprises dans le mélange réactionnel. Éviter d'introduire des bulles.

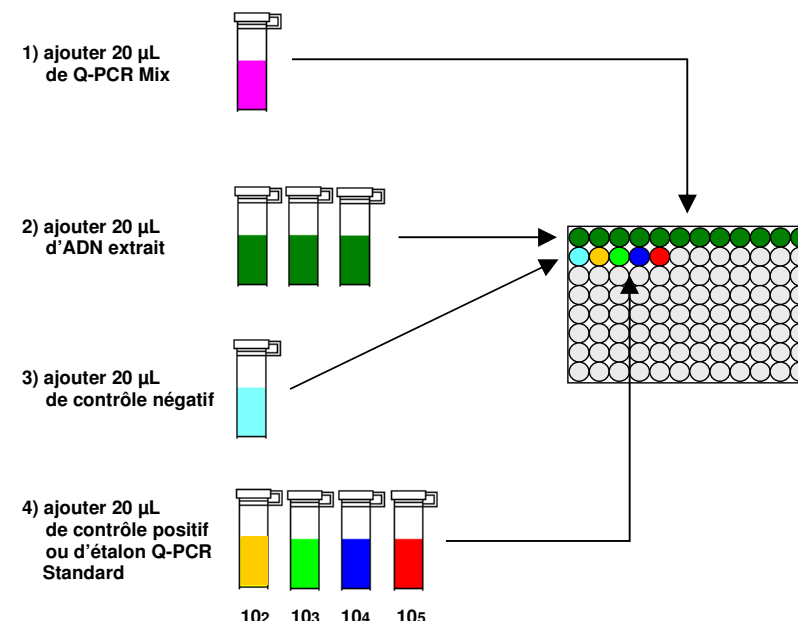
- Lorsqu'un résultat **quantitatif** est requis (quantification de l'ADN du HSV2), pipeter avec précision, en le déposant dans le mélange réactionnel, **20 µL** de **HSV2 Q - PCR Standard 102** dans le puits correspondant de la **microplaque d'amplification**, comme précédemment établi dans la **Work Sheet** (Fiche de travail). Bien mélanger l'étalon en pipetant le **HSV2 Q - PCR Standard 102** à trois reprises dans le mélange réactionnel. Éviter d'introduire des bulles. Procéder de la même manière avec les autres étalons **HSV2 Q - PCR Standards (103, 104, 105)**.

5. Sceller avec précision la **microplaque d'amplification** à l'aide de la **feuille de scellage d'amplification**.

6. Transférer la **microplaque d'amplification** dans le thermocycleur en temps réel placé dans la zone d'amplification/de détection des produits d'amplification, et lancer le cycle thermique d'amplification en enregistrant les paramètres de la session d'analyse avec un nom de fichier univoque et reconnaissable (p. ex., « année-mois-jour-HSV2-EGSpA »).

Remarque : à la fin du cycle thermique, la **microplaque d'amplification** et les produits de la réaction doivent être retirés de l'instrument et mis au rebut en évitant toute contamination environnementale. Afin d'éviter de renverser les produits de la réaction, la **feuille de scellage d'amplification ne doit pas être retirée de la microplaque d'amplification**.

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



Remarque : si la préparation de l'amplification est effectuée avec l'instrument « **QIASymphony® SP/AS** », insérer la microplaque contenant les extraits, les réactifs et la microplaque d'amplification dans les compartiments prévus à cet effet, en utilisant les adaptateurs spéciaux, puis suivre les indications du manuel d'utilisation pour paramétrer le module et les étapes requises par le logiciel.

Remarque : si la préparation de l'amplification est effectuée avec l'instrument « **ELITe GALAXY** », charger la microplaque d'élution, le mélange réactionnel complet et la microplaque d'amplification comme indiqué dans le manuel d'utilisation de l'instrument et suivre les étapes requises par la GUI.

Analyse qualitative des résultats

Les valeurs enregistrées de la fluorescence émise par la sonde spécifique pour le HSV2 (détecteur FAM « HSV2 ») et par la sonde du contrôle interne spécifique (détecteur VIC « IC ») dans les réactions d'amplification doivent être analysées par le logiciel de l'instrument.

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

- paramétrer manuellement (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle [Résultats > Tracé d'amplification > delta Rn vs Cycle]) la plage de calcul pour la **Baseline** (Référence) (niveau de bruit de fond de la fluorescence) du cycle 6 au cycle 15 ;

Remarque : avec un échantillon positif présentant un titre élevé d'ADN du HSV2, la fluorescence FAM de la sonde spécifique pour le HSV2 peut commencer à augmenter avant le cycle 15. Dans ce cas, la plage de calcul pour la **Baseline** (Référence) doit être adaptée à partir du cycle 6 jusqu'au cycle pendant lequel la fluorescence FAM de l'échantillon commence à augmenter, tel que détecté par le logiciel de l'instrument (Results > Component [Résultats > Composant]).

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

- paramétrer manuellement le **Threshold** (Seuil) pour le détecteur FAM « HSV2 » sur **0,1** ;
- paramétrer manuellement le **Threshold** (Seuil) pour le détecteur VIC « IC » sur **0,05**.

Avec un **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** :

- paramétrer manuellement le **Threshold** (Seuil) pour le détecteur FAM « HSV2 » sur **0,2** ;
- paramétrer manuellement le **Threshold** (Seuil) pour le détecteur VIC « IC » sur **0,1**.

Les valeurs de la fluorescence émise par les sondes spécifiques dans la réaction d'amplification et la valeur Threshold (Seuil) de la fluorescence permettent de déterminer le **Threshold Cycle (Ct)** (Cycle seuil [Ct]), le cycle pendant lequel la fluorescence atteint la valeur **Threshold** (Seuil).

Dans la réaction d'amplification du **contrôle positif***, la valeur **Ct** du HSV2 (Results > Report [Résultats > Rapport]) est utilisée pour valider l'amplification et la détection, comme décrit dans le tableau suivant :

Réaction du contrôle positif détecteur FAM « HSV2 »	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct ≤ 25	POSITIF	CORRECTE

Si le résultat de la réaction d'amplification du **contrôle positif** est **Ct > 25** ou **Ct indéterminé** pour le HSV2, l'ADN cible n'a pas été correctement détecté. Cela signifie que des problèmes sont survenus pendant l'étape d'amplification ou de détection (distribution incorrecte du mélange réactionnel ou du contrôle positif, dégradation du mélange réactionnel ou du contrôle positif, paramétrage incorrect de la position du contrôle positif, paramétrage incorrect du cycle thermique), ce qui peut générer des résultats incorrects. La session d'analyse n'est pas valide et doit être répétée en commençant par l'étape d'amplification.

***Remarque** : lorsque ce produit est utilisé pour la quantification de l'ADN du HSV2, les réactions des étalons **Q - PCR Standard** sont paramétrées à la place de la réaction du **contrôle positif**. Dans ce cas, valider l'amplification et la détection en se reportant à la réaction d'amplification de l'étalon **Q - PCR Standard 10s (Ct ≤ 25)**.

Dans la réaction d'amplification du **contrôle négatif**, la valeur **Ct** du HSV2 (Results > Report [Résultats > Rapport]) est utilisée pour valider l'amplification et la détection, comme décrit dans le tableau suivant :

Réaction du contrôle négatif détecteur FAM « HSV2 »	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct indéterminé	NÉGATIF	CORRECTE

Si le résultat de la réaction d'amplification du **contrôle négatif** est différent de **Ct Indéterminé** pour le HSV2, l'ADN cible a été détecté. Cela signifie que des problèmes sont survenus pendant l'étape d'amplification (contamination), ce qui peut générer des résultats incorrects et des faux positifs. La session d'analyse n'est pas valide et doit être répétée en commençant par l'étape d'amplification.

Dans la réaction d'amplification de chaque **échantillon**, la valeur **Ct** du HSV2 est utilisée pour détecter l'ADN cible alors que la valeur **Ct** du contrôle interne est utilisée pour valider l'extraction, l'amplification et la détection.

Remarque : à l'aide du logiciel de l'instrument (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle [Résultats > Tracé d'amplification > delta Rn vs Cycle]), vérifier que le **Ct** a été déterminé par une augmentation rapide et régulière des valeurs de la fluorescence, et non par des pics ou une augmentation du bruit de fond (bruit de fond irrégulier ou important).

Le produit est capable de détecter une quantité minimale d'environ 10 copies d'ADN du gène gpG du HSV2 dans la réaction d'amplification, ce qui correspond à 10 équivalents génomiques par réaction (limite de détection, se reporter au paragraphe « Caractéristiques de performance »).

Les résultats, en tant que valeur **Ct** des réactions d'amplification de chaque **échantillon** (Results > Report [Résultats > Rapport]), sont utilisés comme indiqué dans le tableau suivant :

Réaction d'échantillon		Adéquation de l'échantillon	Résultat du test	ADN du HSV2
détecteur FAM « HSV2 »	détecteur VIC « IC »			
Ct indéterminé	Ct > 35 ou Ct indéterminé	non adéquat	non valide	-
	Ct ≤ 35	adéquat	valide, négatif	NON DÉTECTÉ
Ct déterminé	Ct > 35 ou Ct indéterminé	adéquat*	valide, positif	DÉTECTÉ
	Ct ≤ 35	adéquat	valide, positif	DÉTECTÉ

Si le résultat de la réaction d'amplification d'un échantillon est **Ct indéterminé** pour le HSV2 et **Ct > 35** ou **Ct indéterminé** pour le contrôle interne, cela signifie qu'il n'a pas été possible de détecter efficacement l'ADN du contrôle interne. Dans ce cas, des problèmes sont survenus pendant l'étape d'amplification (amplification inefficace ou nulle) ou pendant l'étape d'extraction (perte d'ADN pendant l'extraction ou présence d'inhibiteurs), ce qui peut générer des résultats incorrects et des faux négatifs. L'échantillon n'est pas adéquat, le test n'est pas valide et doit être répété en commençant par l'extraction d'un nouvel échantillon.

Si le résultat de la réaction d'amplification d'un échantillon est **Ct indéterminé** pour le HSV2 et **Ct ≤ 35** pour le contrôle interne, cela signifie que l'ADN du HSV2 n'a pas été détecté dans l'ADN extrait de l'échantillon ; toutefois, il n'est pas possible d'exclure le fait que de l'ADN du HSV2 soit présent à un titre inférieur à la limite de détection du produit (se reporter à la section « Caractéristiques de performance »). Dans ce cas, le résultat pourrait être un faux négatif.

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

***Remarque** : lorsque l'ADN du HSV2 est détecté dans la réaction d'amplification d'un échantillon, le résultat du contrôle interne peut être **Ct > 35** ou **Ct indéterminé**. En fait, la réaction d'amplification de faible efficacité du contrôle interne peut être déplacée par compétition avec la réaction d'amplification de l'ADN du HSV2 hautement efficace. Dans ce cas, l'échantillon reste néanmoins adéquat et le résultat positif du test est valide.

Analyse quantitative des résultats

Après avoir réalisé la procédure d'analyse qualitative des résultats, il est possible d'effectuer l'analyse quantitative des résultats pour les échantillons positifs.

Dans les réactions d'amplification des quatre **Q - PCR standards**, les valeurs **Ct** du HSV2 sont utilisées pour calculer la **courbe d'étalonnage** (Results > Standard Curve [Résultats > Courbe d'étalonnage]) de la session d'amplification, afin de valider l'amplification et la détection comme indiqué dans le tableau suivant :

Courbe d'étalonnage détecteur FAM « HSV2 »	Plage d'acceptabilité	Amplification/Détection
Coefficient de corrélation (R2)	0,990 ≤ R2 ≤ 1,000	CORRECTE

Si la valeur du **coefficient de corrélation (R2)** ne se situe pas dans les limites, cela signifie que des problèmes sont survenus pendant l'étape d'amplification ou de détection (distribution incorrecte du mélange réactionnel ou des étalons, dégradation du mélange réactionnel ou des étalons, paramétrage incorrect de la position des étalons, paramétrage incorrect du cycle thermique), ce qui peut générer des résultats incorrects. La session d'analyse n'est pas valide et doit être répétée en commençant par l'étape d'amplification.

HSV2 ELITe MGB® Kitréactif pour l'amplification en temps réel
de l'ADN

REF RTS032PLD

Les valeurs **Ct** du HSV2 dans la réaction d'amplification de chaque **échantillon** et la **courbe d'étalonnage** de la session d'amplification sont utilisées pour calculer la **quantité** de l'ADN cible présente dans les réactions d'amplification des échantillons.

Le produit est capable de quantifier environ 1 000 000 à 10 copies d'ADN du gène gpG du HSV2 dans la réaction d'amplification, correspondant aux équivalents génomiques par réaction (plage de mesure linéaire, se reporter au paragraphe « Caractéristiques de performance »), comme indiqué dans le tableau suivant :

Résultat de l'échantillon détecteur FAM « HSV2 »	Équivalents génomiques du HSV2 par réaction
Quantité > 1 x 10 ⁶	PLUS DE 1 000 000
1 x 10 ¹ ≤ Quantité ≤ 1 x 10 ⁶	= Quantité
Quantité < 1 x 10 ¹	MOINS DE 10

Les résultats (**Quantité**) de chaque **échantillon** (Results > Report [Résultats > Rapport]) sont utilisés pour calculer les équivalents génomiques (**cp**) du HSV2 présents dans l'échantillon extrait (**Nc**) selon la formule suivante :

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

Dans laquelle :

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

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

Ve est le volume total du produit d'extraction **exprimé en µL** ;

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

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

En cas d'utilisation du système « **ELITe STAR** » avec des échantillons de sang total et de plasma prélevé sur EDTA, ou des échantillons de liquide céphalorachidien, et si le résultat doit être **exprimé en cp/mL**, la formule est la suivante :

Formule simplifiée pour le sang total, le plasma, le liquide céphalorachidien avec le système « ELITe STAR »

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

En cas d'utilisation du système « **ELITe GALAXY** » avec des échantillons de sang total et de plasma prélevé sur EDTA, ou des échantillons de liquide céphalorachidien, et si le résultat doit être **exprimé en cp/mL**, la formule est la suivante :

Formule simplifiée pour le sang total, le plasma, le liquide céphalorachidien avec le système « ELITe GALAXY »

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

En cas d'utilisation du kit d'extraction « **EXTRAblood** » avec des échantillons de sang total prélevé sur EDTA et si le résultat doit être **exprimé en cp/mL**, la formule est la suivante :

Formule simplifiée pour le sang total avec le kit « EXTRAblood »

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

En cas d'utilisation du système d'extraction « **NucliSENS® easyMAG®** » avec des échantillons de plasma prélevé sur EDTA ou des échantillons de liquide céphalorachidien et si le résultat doit être **exprimé en cp/mL**, la formule est la suivante :

Formule simplifiée pour le plasma et le liquide céphalorachidien avec le système « NucliSENS® easyMAG® »

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

HSV2 ELITe MGB® Kitréactif pour l'amplification en temps réel
de l'ADN

REF RTS032PLD

En cas d'utilisation du système d'extraction « **QIAasymphony® SP/AS** » avec des échantillons de plasma prélevé sur EDTA et si le résultat doit être **exprimé en cp/mL**, la formule est la suivante :

Formule simplifiée pour le plasma avec le système « QIAasymphony® SP/AS »

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

Calcul des limites de la plage de mesure linéaire

Lorsqu'une méthode d'extraction particulière est utilisée, les limites de la plage de mesure linéaire de l'échantillon, exprimées en cp/mL, peuvent être calculées à partir de la plage de mesure linéaire de la réaction d'amplification selon la formule suivante :

$$\text{Limite inférieure (cp/mL)} = \frac{Ve \times 10 \text{ cp}}{Vc \times Va \times Ep}$$

$$\text{Limite supérieure (cp/mL)} = \frac{Ve \times 1\,000\,000 \text{ cp}}{Vc \times Va \times Ep}$$

En cas d'utilisation du kit d'extraction « **EXTRAblood** » avec des échantillons de sang total prélevé sur EDTA, la formule est la suivante :

Limites de la plage de mesure (cp/mL) avec le kit « EXTRAblood »

$$\text{Limite inférieure (cp/mL)} = 25 \times 10 \text{ cp}$$

$$\text{Limite supérieure (cp/mL)} = 25 \times 1\,000\,000 \text{ cp}$$

de 250 à 25 000 000 cp/mL

En cas d'utilisation du système d'extraction « **ELITe STAR** » avec des échantillons de sang total et de plasma prélevé sur EDTA, ou des échantillons de liquide céphalorachidien, la formule est la suivante :

Limites de la plage de mesure (cp/mL) avec le système « ELITe STAR »

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

$$\text{Limite supérieure (cp/mL)} = 28 \times 1\,000\,000 \text{ cp}$$

de 280 à 28 000 000 cp/mL

En cas d'utilisation du système d'extraction « **ELITe GALAXY** » avec des échantillons de sang total et de plasma prélevé sur EDTA, ou des échantillons de liquide céphalorachidien, la formule est la suivante :

Limites de la plage de mesure (cp/mL) avec le système « ELITe GALAXY »

$$\text{Limite inférieure (cp/mL)} = 35 \times 10 \text{ cp}$$

$$\text{Limite supérieure (cp/mL)} = 35 \times 1\,000\,000 \text{ cp}$$

de 350 à 35 000 000 cp/mL

En cas d'utilisation du système d'extraction « **NucliSENS® easyMAG®** » avec des échantillons de plasma prélevé sur EDTA ou des échantillons de liquide céphalorachidien, la formule est la suivante :

Limites de la plage de mesure (cp/mL) avec le système « NucliSENS® easyMAG® »

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

$$\text{Limite supérieure (cp/mL)} = 10 \times 1\,000\,000 \text{ cp}$$

de 100 à 10 000 000 cp/mL

En cas d'utilisation du système d'extraction « **QIASymphony® SP/AS** » avec des échantillons de plasma prélevés sur EDTA, la formule est la suivante :

Limites de la plage de mesure (cp/mL) avec le système « QIASymphony® SP/AS »	
Limite inférieure (cp/mL) =	12 x 10 cp
Limite supérieure (cp/mL) =	12 x 1 000 000 cp
de 120 à 12 000 000 cp/mL	

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Sensibilité analytique : limite de détection

La sensibilité analytique de ce test permet de détecter la présence d'environ 10 molécules d'ADN cible 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 un titre de 10 copies/20 µL dans de l'ADN génomique humain à un titre de 500 ng/20 µL. Cet échantillon a été utilisé en 50 réplicats en effectuant l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant :

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

La sensibilité analytique de ce test utilisé en association avec des échantillons de sang total et le système « **ELITe GALAXY** » a été vérifiée avec un panel de dilutions du HSV2 comprises dans la plage de la concentration limite. Le panel a été préparé en diluant l'échantillon HSV08-12 du panel « QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel » (Qnostics, Ltd, Royaume-Uni) dans du sang total prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du HSV2. Les concentrations virales étaient comprises entre 10 cp/mL et 560 cp/mL. Chaque échantillon du panel a été testé en 12 réplicats en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction et le paramétrage de la PCR avec le système « **ELITe GALAXY** », et l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. L'analyse statistique a été effectuée en utilisant une régression des probits. La limite de détection a été calculée pour les concentrations auxquelles la probabilité de résultat positif était de 95 %.

La sensibilité analytique, en cp/mL, est indiquée ci-dessous.

Limite de détection pour des échantillons de sang total avec le système « ELITe GALAXY » (cp/mL)			
		Intervalle de confiance à 95 %	
		limite inférieure	limite supérieure
Positivité de 95 %	171 cp/mL	112 cp/mL	505 cp/mL

La sensibilité analytique de ce test utilisé en association avec des échantillons de plasma et le système « **ELITe GALAXY** » a été vérifiée avec un panel de dilutions du HSV2 comprises dans la plage de la concentration limite. Le panel a été préparé en diluant l'échantillon HSV08-12 du panel « QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel » (Qnostics, Ltd, Royaume-Uni) dans du plasma prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du HSV2. Les concentrations virales étaient comprises entre 10 cp/mL et 560 cp/mL. Chaque échantillon du panel a été testé en 12 réplicats en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction et le paramétrage de la PCR avec le système « **ELITe GALAXY** », et l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

L'analyse statistique a été effectuée en utilisant une régression des probits. La limite de détection a été calculée pour les concentrations auxquelles la probabilité de résultat positif était de 95 %.

La sensibilité analytique, en cp/mL, est indiquée ci-dessous.

Limite de détection pour des échantillons de plasma avec le système « ELITe GALAXY » (cp/mL)			
		Intervalle de confiance à 95 %	
		limite inférieure	limite supérieure
Positivité de 95 %	119 cp/mL	75 cp/mL	547 cp/mL

Sensibilité analytique : plage de mesure linéaire

La sensibilité analytique de ce test permet de quantifier entre 1 000 000 et 10 molécules d'ADN cible dans 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La sensibilité analytique de ce test, en tant que plage de mesure linéaire, a été déterminée 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. Des dilutions de 10⁷ molécules par réaction à 10¹ molécules par réaction ont été testées en 9 réplicats en réalisant l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

L'analyse des données obtenues, utilisant une régression linéaire, a montré que le test présentait une réponse linéaire pour tous les points du panel (coefficient de corrélation linéaire supérieur à 0,99).

La limite supérieure de la plage de mesure linéaire a été définie à 10⁶ molécules par réaction, correspondant aux équivalents génomiques par réaction, à plus ou moins un logarithme de la concentration la plus élevée de l'étalon d'amplification Q - PCR Standard (10⁵ molécules/20 µL).

La limite inférieure de la plage de mesure linéaire a été définie à 10 molécules par réaction, correspondant aux équivalents génomiques par réaction, à plus ou moins un logarithme de la concentration la plus faible de l'étalon d'amplification Q - PCR Standard (10² molécules/20 µL).

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant :

Plage de mesure linéaire (cp/réaction)	
Limite supérieure	1 000 000 cp/réaction
Limite inférieure	10 cp/réaction

Les limites de la plage de mesure linéaire, exprimées en cp/mL et en référence au kit d'extraction utilisé, sont calculées à la page 26.

Sensibilité analytique : Précision et exactitude

La précision du test, en tant que variabilité des résultats obtenus avec plusieurs réplicats du même échantillon testé au cours de la même session d'analyse, a permis d'obtenir un pourcentage de coefficient de variation moyen (% CV) d'environ 18,6 % des quantités mesurées, dans la plage de 10⁶ molécules à 10 molécules dans les 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

L'exactitude du test, en tant que différence entre la moyenne des résultats obtenus avec plusieurs réplicats d'un échantillon au cours de la même session d'analyse et la concentration théorique de l'échantillon, a permis d'obtenir un pourcentage d'imprécision moyen (% Imprécision) d'environ 14,4 % des quantités mesurées, dans la plage de 10⁶ molécules à 10 molécules dans les 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

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

Sensibilité analytique : reproductibilité avec un matériel de référence étalonné

La sensibilité analytique du test, en tant que reproductibilité des résultats par comparaison aux résultats obtenus avec d'autres tests dans différents laboratoires, a été vérifiée en testant un panel de référence.

Les tests ont été effectués en utilisant, à titre de matériel de référence étalonné, un panel de dilutions du HSV2 comprises dans la limite de concentration (QCMD 2009 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Royaume-Uni). Chaque échantillon a été testé en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction à l'aide du système « **ELITe STAR** » et l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tests avec un matériel de référence étalonné et le système « ELITe STAR »				
Échantillon	Virus	Consensus du test commercial Log ₁₀ conc. virus	Écart-type	Résultats moyens Log ₁₀ cp/mL
HSV09-01	HSV1	2,215	0,789	-
HSV09-02	HSV2	2,236	0,938	1,687
HSV09-03	HSV2	3,293	0,915	3,700
HSV09-04	HSV2	2,314	0,898	2,329
HSV09-05	Négatif	N.A.	-	-
HSV09-06	HSV1	2,402	0,665	-
HSV09-07	HSV1	4,189	0,599	-
HSV09-08	HSV2	2,389	0,827	2,352
HSV09-09	Négatif	N.A.	-	-
HSV09-10	HSV1	3,205	0,767	-

Tous les échantillons ont été correctement détectés. Les résultats quantitatifs sont compris dans la plage définie par le consensus ± 1 écart-type.

Des tests supplémentaires ont été effectués en utilisant, à titre de matériel de référence étalonné, un panel de dilutions du HSV2 comprises dans la limite de concentration (QCMD 2012 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Royaume-Uni). Chaque échantillon a été testé en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction à l'aide du système « **ELITe GALAXY** » et l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant en cp/mL.

Tests avec un matériel de référence étalonné et le système « ELITe GALAXY »				
Échantillon	Consensus du test commercial Log ₁₀ conc. virus	Écart-type	Positifs/Réplicats	Résultats moyens Log ₁₀ cp/mL
HSV12-01	Négatif, N.A.	-	0/2	-
HSV12-02	HSV1, 3,910	0,582	0/2	-
HSV12-03	HSV2, 1,948	0,305	1/2	2,128
HSV12-04	HSV1, 3,680	0,547	0/2	-
HSV12-05	HSV2, 1,352	0,629	0/2	-
HSV12-06	HSV1, 2,318	0,441	0/2	-
HSV12-07	HSV1, 2,014	0,296	0/2	-
HSV12-08	HSV2, 3,424	1,098	2/2	3,634
HSV12-09	Négatif, N.A.	-	0/2	-
HSV12-10	HSV2, 3,417	1,042	2/2	3,861

Tous les échantillons négatifs ont été correctement détectés. Les échantillons positifs compris dans la limite de détection théorique du système (350 copies/mL) ont été correctement détectés dans la plage de la valeur « consensus » moyenne du test commercial ± 1 écart-type. Un échantillon en dessous de la limite de détection théorique du système (22,5 copies/mL) a été rapporté comme négatif. Les échantillons ayant un titre inférieur à la limite de détection peuvent être rapportés de manière stochastique comme positifs ou négatifs.

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

La sensibilité diagnostique du test, en ce qui concerne l'efficacité de détection et de quantification de différents génotypes/sous-types, a été évaluée par une comparaison de séquences avec des bases de données de nucléotides.

L'analyse des régions choisies pour l'hybridation des amorces et des sondes fluorescentes dans l'alignement des séquences disponibles dans la base de données pour le gène gpG du HSV2 a montré leur conservation et une absence de mutations significatives.

Sensibilité diagnostique : confirmation des échantillons positifs

La sensibilité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons cliniques positifs, a été testée en analysant quelques échantillons cliniques de sang total prélevé sur EDTA qui étaient positifs pour l'ADN du HSV2.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant, à titre de matériel de référence, 20 échantillons de sang total prélevé sur EDTA issus de donneurs présumés négatifs (Biological Sample Library Europe S.A.S., Lyon, France), qui étaient positifs à un faible titre pour l'ADN du HSV2 à l'aide du panel « QCMD 2008 Herpes simplex virus EQA Panel » (Qnostics Ltd, Royaume-Uni). Chaque échantillon de sang total a été testé en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction avec le kit « **EXTRAblood** » et l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé sur EDTA positif pour l'ADN du HSV2	20	20	0

Tous les échantillons dopés ont été correctement détectés comme positifs pour l'ADN du HSV2. Dans ce test, la sensibilité diagnostique de l'analyse était de 100 %.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant 22 échantillons de liquide céphalorachidien négatifs pour l'ADN du HSV2, qui avaient été dopés avec de l'ADN du HSV2 en ajoutant l'échantillon IQC032RH de ELITechGroup S.p.A., 30 échantillons de plasma négatifs pour l'ADN du HSV2, qui avaient été dopés avec de l'ADN du HSV2 en ajoutant l'échantillon HSV08-12 du panel « QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel » (Qnostics Ltd, Royaume-Uni) et 30 échantillons de sang total négatifs pour l'ADN du HSV2, qui avaient été dopés avec de l'ADN du HSV2 en ajoutant l'échantillon HSV08-12 du panel « QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel » (Qnostics Ltd, Royaume-Uni). Chaque échantillon a été utilisé en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction à l'aide du système « **ELITe STAR** » et l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Liquide céphalorachidien dopé avec de l'ADN du HSV2	22	22	0
Plasma prélevé sur EDTA dopé avec de l'ADN du HSV2	30	30	0
Sang total prélevé sur EDTA dopé avec de l'ADN du HSV2	30	29	0

Un échantillon positif pour le HSV2 a généré un résultat non valide. Dans ce test, la sensibilité diagnostique de l'analyse était de 100 %.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant 21 échantillons de liquide céphalorachidien négatifs pour l'ADN du HSV2, qui avaient été dopés avec de l'ADN du HSV2 en ajoutant l'échantillon HSV2MQP01 - High (concentration élevée) du panel « Molecular Q Panel » (Qnostics Ltd, Royaume-Uni), 30 échantillons de plasma négatifs pour l'ADN du HSV2, qui avaient été dopés avec de l'ADN du HSV2 en ajoutant l'échantillon HSV08-12 du panel « QCMD 2008 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel » (Qnostics Ltd, Royaume-Uni) et 32 échantillons de sang total négatifs pour l'ADN du HSV2, qui avaient été dopés avec de l'ADN du HSV2 en ajoutant l'échantillon HSV08-12 du panel « QCMD 2008 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel », (Qnostics Ltd, Royaume-Uni) et l'échantillon HSV10-01 du panel « QCMD 2010 Herpes Simplex Human virus DNA EQA Panel », (Qnostics Ltd, Royaume-Uni). Chaque échantillon a été utilisé en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction à l'aide du système « **ELITe GALAXY** » et l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Liquide céphalorachidien dopé avec de l'ADN du HSV2	21	21	0
Plasma prélevé sur EDTA dopé avec de l'ADN du HSV2	30	30	0
Sang total prélevé sur EDTA dopé avec de l'ADN du HSV2	32	32	0

Tous les échantillons dopés ont été correctement détectés comme positifs pour l'ADN du HSV2.
Dans ce test, la sensibilité diagnostique de l'analyse était égale à 100 %.

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

La spécificité analytique du test, en ce qui concerne l'absence de réactivité croisée avec des marqueurs potentiellement interférents, a été évaluée par une comparaison de séquences avec des bases de données de nucléotides.

L'analyse de l'alignement des séquences des amorces et de la sonde fluorescente avec les séquences disponibles dans des bases de données d'organismes autres que le HSV2, y compris les génomes complets du HSV1 et du VZV, l'herpèsvirus humain le plus similaire au HSV2, a montré leur spécificité et l'absence d'homologie significative.

La spécificité analytique du test, en ce qui concerne l'absence de réactivité croisée avec d'autres marqueurs potentiellement interférents, a été vérifiée en testant un panel de référence.

La spécificité analytique a été évaluée en utilisant, à titre de matériel de référence étalon, un panel incluant des échantillons positifs pour le HSV1 et positifs pour le VZV (QCMD 2007 Herpes simplex virus EQA Panel, Qnostics Ltd, Royaume-Uni). Chaque échantillon a été testé en double en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir une extraction et une amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont présentés au paragraphe « Sensibilité analytique : reproductibilité avec un matériel de référence étalon ».

Aucune réactivité croisée n'a été détectée avec les échantillons positifs pour le HSV1 et le VZV.

Spécificité diagnostique : confirmation des échantillons négatifs

La spécificité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons négatifs, a été testée à l'aide de quelques échantillons cliniques de sang total prélevé sur EDTA qui étaient négatifs pour l'ADN du HSV2.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant, à titre de matériel de référence, 24 échantillons de sang total prélevé sur EDTA issus de donneurs présumés négatifs pour l'ADN du HSV2 (Biological Sample Library Europe S.A.S., Lyon, France). Chaque échantillon de sang total a été testé en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction avec le kit « **EXTRAblood** » et l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du HSV2	24	0	24

Tous les échantillons ont été détectés comme négatifs pour l'ADN du HSV2.

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

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant 24 échantillons de liquide céphalorachidien qui étaient négatifs pour l'ADN du HSV2, 30 échantillons de plasma prélevé sur EDTA qui étaient négatifs pour l'ADN du HSV2 et 30 échantillons de sang total prélevé sur EDTA qui étaient négatifs pour l'ADN du HSV2 (testés avec un produit d'amplification en temps réel de DIV portant le marquage CE). Chaque échantillon a été utilisé en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction à l'aide du système « **ELITe STAR** » et l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Liquide céphalorachidien négatif pour l'ADN du HSV2	24	0	24
Plasma prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du HSV2	30	0	30
Sang total prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du HSV2	30	0	30

Tous les échantillons ont été détectés comme négatifs pour l'ADN du HSV2.

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

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant 22 échantillons de liquide céphalorachidien qui étaient négatifs pour l'ADN du HSV2, 34 échantillons de plasma prélevé sur EDTA qui étaient présumés négatifs pour l'ADN du HSV2 et 36 échantillons de sang total prélevé sur EDTA qui étaient présumés négatifs pour l'ADN du HSV2. Chaque échantillon a été utilisé en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction à l'aide du système « **ELITe GALAXY** » et l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Liquide céphalorachidien négatif pour l'ADN du HSV2	22	0	22
Plasma prélevé sur EDTA présumé négatif pour l'ADN du HSV2	34	0	34
Sang total prélevé sur EDTA présumé négatif pour l'ADN du HSV2	36	0	36

Tous les échantillons ont été correctement détectés comme négatifs pour l'ADN du HSV2.

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

Remarque : les données complètes et les résultats des tests effectués pour évaluer les caractéristiques de performance du produit avec les matrices et les instruments sont présentés à la section 7 de la Fiche technique du produit « HSV2 ELITe MGB Kit », FTP RTS032PLD.

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 « **Système MagNA Pure 24** » et de la **version logicielle 1.0** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction « **Pathogen200** » et suivre 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 biologie moléculaire. Pour plus de détails sur la procédure d'extraction, suivre scrupuleusement les instructions contenues dans le mode d'emploi du kit.

Plasma prélevé sur EDTA

Les échantillons de plasma pour l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés sur de l'EDTA 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 « **Système MagNA Pure 24** » et de la **version logicielle 1.0** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction « **Pathogen200** » et suivre 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 biologie moléculaire. Pour plus de détails sur la procédure d'extraction, suivre scrupuleusement les instructions contenues dans le mode d'emploi 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 « **HSV2 - ELITe Positive Control** » ou autrement le produit « **HSV2 - ELITe Positive Control RF** » ou le produit « **HSV2 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)

Avant de commencer la session d'analyse, en se référant 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 » (Nouvelle expérience) ;
- paramétrer le volume de la réaction (« Reaction volume » [Volume de réaction]) à 40 µL ;
- attribuer un identifiant à chaque échantillon (« Sample editor » [Éditeur d'échantillons]) ;
- 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 (facultatif)	95 °C	15 s
	40 °C	30 s
	80 °C	15 s

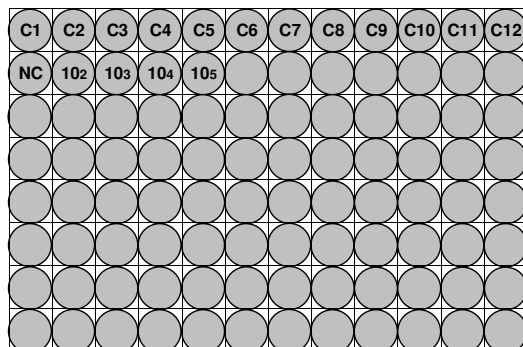
Remarque : l'acquisition de la fluorescence se produit individuellement ; paramétrer le « Ramp Rate » (Rampe) (°C/s) à 4,4 °C/s.

- sélectionner les canaux de détection du signal : « detector » (détecteur) pour le capteur HSV2 avec le « channel FAM 465-510 » (canal FAM 465-510) et « detector » (détecteur) pour le capteur du contrôle interne (IC) avec le « channel VIC 540-580 » (canal VIC 540-580) ;

Compléter le **Work Plan** (Plan de travail) joint à la fin du présent manuel d'utilisation, en renseignant ces informations ou en imprimant la disposition de la microplaque. Ce **Work Plan** (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.



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 HSV2 Q - PCR Mix requis pour la session d'analyse, 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 les tubes à essai contenant le HSV2 - Positive Control ou autrement le HSV2 - ELITe Positive Control RF ou les tubes à essai contenant le HSV2 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 d'analyse, 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 HSV2 Q - PCR Mix dans les puits de la **plaque AD**, comme précédemment établi dans le **Work Plan** (Plan de travail).

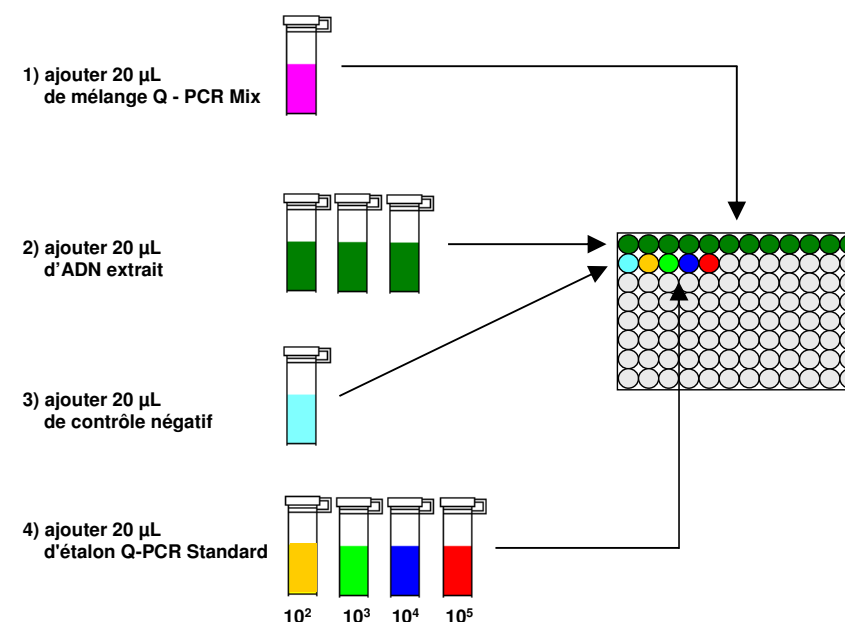
Remarque : si le mélange réactionnel n'est pas utilisé en intégralité, conserver le mélange restant à -20 °C pendant un mois au maximum. Congeler et décongeler le mélange réactionnel **5 FOIS** au maximum.

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 **Work Plan** (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 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 **Work Plan** (Plan de travail). Bien mélanger le puits de contrôle négatif en pipetant l'**eau ultra-pure de qualité biologie moléculaire** à trois reprises dans le mélange réactionnel. Veiller à ne pas introduire de bulles.

4. Selon le résultat requis (qualitatif ou quantitatif), suivre l'une des ces deux options :
 - Lorsqu'un résultat **qualitatif** est requis (détection de l'ADN du HSV2), pipeter avec précision, en le déposant dans le mélange réactionnel, **20 µL** de HSV2 - **Positive Control** ou autrement « HSV2 - **ELITe Positive Control RF** » dans le puits correspondant de la **microplaque d'amplification**, comme précédemment établi dans le **Work Sheet** (Fiche de travail). Bien mélanger le contrôle positif en pipetant le HSV2 - **Positive Control** à trois reprises dans le mélange réactionnel. Éviter d'introduire des bulles.
 - Lorsqu'un résultat **quantitatif** est requis (quantification de l'ADN du HSV2), pipeter avec précision, en le déposant dans le mélange réactionnel, **20 µL** de HSV2 Q - **PCR Standard 102** dans le puits correspondant de la **microplaque d'amplification**, comme précédemment établi dans le **Work Sheet** (Fiche de travail). Bien mélanger l'étalon en pipetant le HSV2 Q - **PCR Standard 102** à trois reprises dans le mélange réactionnel. Éviter d'introduire des bulles. Procéder de la même manière avec les autres étalons HSV2 Q - **PCR Standards** (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-HSV2-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 HSV2 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 » (Analyse) et choisir « Absolute Quant/Fit Points » (Quantification absolue/Points d'ajustement) (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 [Bruit de fond]) du **Background Fluorescence Level** (Niveau de fluorescence de bruit de fond) du cycle 2 au cycle 6.

Pour les échantillons de **plasma**

- paramétrer manuellement le **Threshold** (Seuil) et la **Noiseband** (Bande de bruit) pour le détecteur FAM « HSV2 » à **0,55** ;
- paramétrer manuellement le **Threshold** (Seuil) et la **Noiseband** (Bande de bruit) pour le détecteur VIC « IC » à **1,2**.

Pour les échantillons de **sang total**

- paramétrer manuellement le **Threshold** (Seuil) et la **Noiseband** (Bande de bruit) pour le détecteur FAM « HSV2 » à **0,80** ;
- paramétrer manuellement le **Threshold** (Seuil) et la **Noiseband** (Bande de bruit) pour le détecteur VIC « IC » 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** (Seuil) et de la **Noiseband** (Bande de bruit) sont utilisées pour déterminer le **Threshold Cycle (Ct)** (Cycle seuil [Ct]), c'est-à-dire le cycle pendant lequel le **Threshold** (Seuil) de fluorescence est atteint.

Les valeurs **Ct** pour le HSV2 dans les réactions d'amplification des quatre étalons **Q - PCR Standard** sont utilisées pour calculer la **courbe d'étalonnage** (Results > Standard Curve [Résultats > Courbe d'étalonnage]) 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 « HSV2 »	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct ≤ 25	POSITIF	CORRECTE

Si le résultat de la réaction d'amplification du **contrôle positif** est **Ct > 25** ou **Ct indéterminé** pour le HSV2, l'ADN cible n'a pas été correctement détecté. Cela signifie que des problèmes sont survenus pendant l'étape d'amplification ou de détection (distribution incorrecte du mélange réactionnel ou du contrôle positif, dégradation du mélange réactionnel ou du contrôle positif, paramétrage incorrect de la position du contrôle positif, paramétrage incorrect du cycle thermique), ce qui peut générer des résultats incorrects. La session d'analyse n'est pas valide et doit être répétée en commençant par l'étape d'amplification.

* **Remarque** : lorsque ce produit est utilisé pour la quantification de l'ADN du HSV2, 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 le HSV2 (fenêtre Analysis [Analyse]) est utilisée pour valider l'amplification et la détection, comme indiqué dans le tableau suivant :

Réaction du contrôle négatif détecteur « HSV2 »	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct indéterminé	NÉGATIF	CORRECTE

Si le résultat de la réaction d'amplification du **contrôle négatif** est autre que **Ct indéterminé** pour le HSV2, 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 d'analyse 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 le HSV2 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 Analysis [Analyse]), 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).

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

Réaction d'échantillon		Adéquation de l'échantillon	Résultat du test	ADN du HSV2
Détecteur « HSV2 »	Détecteur « IC »			
Ct indéterminé	Ct > 35 Ct indéterminé	non adéquat	non valide	-
	Ct ≤ 35	adéquat	valide, négatif	NON DÉTECTÉ
Ct déterminé	Ct > 35 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 le HSV2 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 le HSV2 et **Ct ≤ 35** pour le contrôle interne, l'ADN du HSV2 n'a pas été détecté dans l'ADN extrait de l'échantillon ; toutefois, il n'est pas possible d'exclure le fait que de l'ADN du HSV2 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 du HSV2 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 du HSV2 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 d'analyse n'est pas valide et doit être répétée en commençant par l'étape d'amplification.

Les valeurs **Ct** pour le HSV2 dans les réactions d'amplification de chaque **échantillon** et la **courbe d'étalonnage** (bouton **Standard Curve** [Courbe d'étalonnage]) de la session d'amplification sont utilisées pour calculer la **quantité** de la cible d'ADN présente dans les réactions d'amplification des échantillons.

Ce produit est capable de quantifier 1 000 000 à environ 10 copies par réaction, 25 000 000 à 250 copies par mL pour le sang total et le plasma en utilisant le système d'extraction **MagNA Pure 24** (se reporter à la section « Caractéristiques de performance »), comme indiqué dans le tableau suivant :

Résultat de l'échantillon détecteur FAM « HSV2 »	Copies du HSV2 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 [Analyse]) sont utilisés pour calculer les **copies** du HSV2 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 ou de plasma prélevé sur EDTA et du système d'extraction **MagNA Pure 24**, et si le résultat doit être **exprimé en copies/mL**, la formule est la suivante :

Formule simplifiée pour le sang total et le plasma avec le système 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 27 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	27	27	0

Sensibilité analytique : plage de mesure linéaire

La sensibilité analytique de ce test, en tant que plage de mesure linéaire, permet de quantifier environ 25 000 000 à 25 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 10⁶copies/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 le système 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 39.

Sensibilité analytique : Précision et exactitude

La précision de ce test, en termes de variabilité des résultats obtenus au cours de 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 1 % 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 au cours de 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 9 % 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 au cours de 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 logarithmique mesurée d'environ 6,4 % 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, en tant que reproductibilité de la valeur d'un matériel de référence étalonné, a été évaluée en utilisant, à titre de matériel de référence, le panel « HSV2 Molecular 'Q' Panel » (Qnostics Ltd, Royaume-Uni). Chaque échantillon du panel a été testé en 2 réplicats 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 présentés dans le tableau suivant.

Tests avec des matériels de référence étalonnés et le système « MagNA Pure 24 »	
Échantillon	Positifs/Réplicats
HSV2MQP01-High (concentration élevée)	2/2
HSV2MQP01-Medium (concentration moyenne)	2/2
HSV2MQP01-Low (concentration faible)	2/2
HSV2MQP01-Negative (négatif)	0/2

Tous les échantillons ont été correctement détectés.

La sensibilité analytique du test, en tant que reproductibilité de la valeur d'un matériel de référence étalonné, a été évaluée en utilisant, à titre de matériel de référence, le panel « QCMD 2017 Herpes Simplex Virus DNA Panel » (HSVDNA17S, Qnostics Ltd, Royaume-Uni), un panel de dilutions du HSV2. Chaque échantillon du panel a été testé en 2 réplicats 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 présentés dans le tableau suivant.

Tests avec des matériels de référence étalonnés et le système « MagNA Pure 24 »		
Échantillon	Statut de l'échantillon	Positifs/Réplicats
HSVDNA17S-01	Positif pour le HSV1, négatif pour le HSV2	0/2
HSVDNA17S -02	Positif pour le HSV1, négatif pour le HSV2	0/2
HSVDNA17S -03	Positif pour le HSV1, négatif pour le HSV2	0/2
HSVDNA17S -04	Positif pour le HSV1, négatif pour le HSV2	0/2
HSVDNA17S -05	Positif pour le HSV1, négatif pour le HSV2	0/2
HSVDNA17S -06	HSV2 fréquemment détecté	2/2
HSVDNA17S -07	HSV2 fréquemment détecté	2/2
HSVDNA17S -08	HSV2 fréquemment détecté	2/2
HSVDNA17S -09	HSV2 détecté	2/2
HSVDNA17S -10	HSV2 fréquemment détecté	2/2

Tous les échantillons ont été correctement détectés.

Sensibilité diagnostique : confirmation des échantillons positifs

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant, à titre de matériel de référence, 30 échantillons de sang total prélevé sur EDTA négatifs pour l'ADN du HSV2, qui avaient été dopés avec l'ADN du HSV2 en ajoutant l'échantillon HSV2MQP01-High (concentration élevée) (Qnostics Ltd, Royaume-Uni) et 30 échantillons de plasma prélevé sur EDTA négatifs pour l'ADN du HSV2, qui avaient été dopés avec l'ADN du HSV2 en ajoutant l'échantillon HSV2MQP01-High (concentration élevée) (Qnostics Ltd, Royaume-Uni).

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 avec de l'ADN du HSV2	30	30	0
Plasma prélevé sur EDTA dopé avec de l'ADN du HSV2	30	30	0

Tous les échantillons étaient valides lors du premier test ; ils ont été confirmés comme étant positifs pour l'ADN du HSV2.

La sensibilité diagnostique totale du test était de 100 %.

Spécificité diagnostique : confirmation des échantillons négatifs

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant, à titre de matériel de référence, 40 échantillons de sang total prélevé sur EDTA présumés négatifs pour l'ADN du HSV2 et 34 échantillons de plasma prélevé sur EDTA présumés négatifs pour l'ADN du HSV2.

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 du HSV2	40	0	40
Plasma prélevé sur EDTA présumé négatif pour l'ADN du HSV2	34	0	34

Tous les échantillons étaient valides lors du premier test ; ils ont été confirmés comme étant négatifs pour l'ADN du HSV2.

La spécificité diagnostique totale du test était de 100 %.

REMARQUE : les données complètes et les résultats des tests effectués pour évaluer les caractéristiques de performance du produit avec les matrices et les instruments sont présentés à la section 7 de la Fiche technique du produit « HSV2 ELITe MGB Kit », FTP RTS032PLD.

BIBLIOGRAPHIE

- E. Aurelius et al. (1993) *J. Med. Virology* **39**: 179 - 186
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**: e30

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Utiliser exclusivement ce produit avec de l'ADN extrait des échantillons cliniques suivants : liquide céphalo-rachidien (LCR), sang total prélevé sur EDTA, plasma prélevé sur EDTA.

Ne pas utiliser d'ADN extrait d'échantillons héparinés avec ce produit : l'héparine inhibe la réaction d'amplification des acides nucléiques et génère des résultats non valides.

Ne pas utiliser d'ADN extrait contaminé par de l'hémoglobine, du dextrane, du Ficol®, de l'éthanol ou du 2-propanol avec ce produit : ces substances inhibent la réaction d'amplification des acides nucléiques et peuvent générer des résultats non valides.

Ne pas utiliser ce produit avec de l'ADN extrait contenant une grande quantité d'ADN génomique humain, qui risque d'inhiber la réaction d'amplification des acides nucléiques.

Il n'existe actuellement aucune donnée disponible en ce qui concerne les performances du produit avec de l'ADN extrait des échantillons cliniques suivants : suspensions de leucocytes, suspensions de granulocytes et liquide amniotique.

Utiliser ce produit uniquement avec les instruments validés et les échantillons clinique associés indiqués à la section « Échantillons et Contrôles ».

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

Les résultats obtenus avec ce produit dépendent de l'identification, du prélèvement, du transport, de la conservation et du traitement corrects des échantillons. Afin d'éviter tout résultat incorrect, il est par conséquent nécessaire de prendre des précautions particulières pendant ces étapes et de suivre scrupuleusement le mode d'emploi fourni avec les produits pour l'extraction des acides nucléiques.

La méthode d'amplification en temps réel utilisée dans ce produit présente une sensibilité analytique élevée qui la rend sensible aux contaminations croisées par les échantillons positifs pour le HSV2, les contrôles positifs et les produits d'amplification eux-mêmes. Les contaminations croisées peuvent générer des résultats faux positifs. Le format du produit est capable de limiter les contaminations croisées. Toutefois, les contaminations croisées ne peuvent être évitées qu'en respectant les bonnes pratiques de laboratoire et en suivant le présent mode d'emploi.

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

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

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

Il est nécessaire de disposer de zones distinctes pour l'extraction/la préparation des réactions d'amplification et l'amplification/la détection des produits d'amplification afin d'éviter d'obtenir des résultats faux positifs.

Ce produit nécessite l'utilisation de vêtements et d'instruments spéciaux pour l'extraction/la préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification/la détection des produits d'amplification afin d'éviter d'obtenir des résultats faux positifs.

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

Un résultat négatif obtenu avec ce produit signifie que l'ADN du HSV2 n'a pas été détecté dans l'ADN extrait de l'échantillon ; toutefois, il n'est pas possible d'exclure le fait que de l'ADN du HSV2 soit présent à un titre inférieur à la limite de détection du produit (se reporter à la section « Caractéristiques de performance »). Dans ce cas, le résultat pourrait être un faux négatif.

Les résultats obtenus avec ce produit peuvent parfois être non valides en raison d'une défaillance du contrôle interne et nécessitent d'effectuer un nouveau test, à partir de l'extraction, ce qui peut entraîner un retard d'obtention des résultats finaux.

D'éventuels polymorphismes au sein de la région du génome viral couverte par les amorces et les sondes du produit peuvent affecter la détection et la quantification de l'ADN du HSV2.

Comme avec tout autre dispositif médical de diagnostic, les résultats obtenus avec ce produit doivent être interprétés en tenant compte de l'ensemble des données cliniques et des autres analyses de laboratoire effectuées chez le patient.

PROBLÈMES ET SOLUTIONS

ADN cible non détecté dans les réactions du contrôle positif ou de l'étalon Q - PCR Standard ou coefficient de corrélation non valide dans la courbe d'étalonnage	
Causes possibles	Solutions
Distribution incorrecte dans les puits de la microplaque.	Faire attention lors de la distribution des réactions dans les puits de la microplaque et respecter la fiche de travail. Vérifier le volume du mélange réactionnel distribué. Vérifier le volume du contrôle positif ou de l'étalon distribué.
Paramétrage incorrect de la session sur le système ELITe InGenius.	Vérifier la position du mélange réactionnel, du contrôle positif ou des étalons. Vérifier le volume du mélange réactionnel, du contrôle positif ou des étalons.
Dégradation de la sonde.	Utiliser une nouvelle aliquote du mélange réactionnel.
Dégradation du contrôle positif ou d'un étalon.	Utiliser une nouvelle aliquote du contrôle positif ou de l'étalon.
Erreur de paramétrage de l'instrument.	Vérifier le paramétrage des positions pour les réactions du contrôle positif ou de l'étalon sur l'instrument. Vérifier le paramétrage du cycle thermique sur l'instrument.
Erreur de l'instrument.	Contactez le service technique d'ELITechGroup.

ADN cible détecté dans la réaction du contrôle négatif	
Causes possibles	Solutions
Distribution incorrecte dans les puits de la microplaque.	Éviter de renverser le contenu des tubes à essai d'échantillon. Toujours changer de cônes entre les échantillons. Faire attention lors de la distribution des échantillons, des contrôles négatifs, des contrôles positifs et des étalons dans les puits de la microplaque, et se conformer à la feuille de travail.
Paramétrage incorrect de la session d'analyse sur le système ELITe InGenius.	Vérifier la position du mélange réactionnel ou du contrôle négatif. Vérifier le volume du mélange réactionnel ou du contrôle négatif.
Erreur lors du paramétrage de l'instrument.	Vérifier les réglages de position des échantillons, des contrôles négatifs, des contrôles positifs et des étalons sur l'instrument.
Microplaque mal scellée.	Faire attention lors du scellage de la microplaque.
Contamination de l'eau de qualité biologie moléculaire.	Utiliser une nouvelle aliquote d'eau.
Contamination du mélange réactionnel.	Utiliser une nouvelle aliquote du mélange réactionnel.
Contamination de la zone d'extraction/de préparation des réactions d'amplification.	Nettoyer les surfaces et les instruments avec des détergents aqueux, laver les blouses de laboratoire, remplacer les tubes à essai et les cônes utilisés.
Erreur de l'instrument.	Contactez le service technique d'ELITechGroup.

ADN cible et du contrôle interne non détectés dans les réactions de l'échantillon	
Causes possibles	Solutions
Distribution incorrecte dans les puits de la microplaque.	Éviter de renverser le contenu des tubes à essai d'échantillon. Toujours changer de cônes entre les échantillons. Faire attention lors de la distribution des échantillons dans les puits de la microplaque et respecter la fiche de travail.
Paramétrage incorrect de la session sur le système ELITe InGenius.	Vérifier la position du mélange réactionnel ou des échantillons. Vérifier le volume du mélange réactionnel ou des échantillons.
Dégradation du contrôle interne.	Utiliser de nouvelles aliquotes du contrôle interne.
Inhibition due à des substances interférentes dans l'échantillon.	Répéter l'amplification avec une dilution à 1:2 de l'échantillon élué dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, lors d'une session d'analyse « PCR Only » (PCR uniquement). Répéter l'extraction et l'amplification de l'échantillon.
Stockage incorrect du réactif.	Vérifier que le mélange réactionnel n'a pas été exposé à la température ambiante pendant plus de 30 minutes.
Problèmes lors de l'extraction.	Vérifier la qualité et la concentration de l'ADN extrait.
Erreur de l'instrument.	Contactez le service technique d'ELITechGroup.

Niveaux de fluorescence de bruit de fond irréguliers ou élevés dans les réactions	
Causes possibles	Solutions
Distribution incorrecte de l'échantillon.	Veiller à bien mélanger les échantillons, les contrôles négatifs et les contrôles positifs ou les étalons avec le mélange réactionnel en pipetant à trois reprises. Éviter d'introduire des bulles.
Erreur de paramétrage de la référence.	Paramétrer la plage de calcul de la référence dans les cycles au cours desquels la fluorescence de bruit de fond s'est déjà stabilisée (vérifier les données « Results » [Résultats], « Component » [Composant]) et dans lesquels la fluorescence du signal n'a pas encore commencé à augmenter, par ex., du cycle 6 au cycle 15. Utiliser le calcul automatique de la référence en activant l'option « Auto Baseline » (Référence auto).

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

Avec le système ELITe InGenius : Erreur 30103	
Causes possibles	Solutions
Concentration trop élevée de la cible dans l'échantillon.	En cas d'observation d'une amplification significative sur la courbe de PCR : - répéter l'amplification de l'échantillon élué dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, au cours d'une session « PCR only » (PCR uniquement), ou - répéter l'extraction avec une dilution de l'échantillon primaire dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, lors d'une session d'analyse « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

LÉGENDE DES SYMBOLES

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

HSV2 ELITe MGB® Kit**réactif pour l'amplification en temps réel
de l'ADN****REF RTS032PLD****NOTE POUR L'ACQUÉREUR : LICENCE LIMITÉE**

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

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

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

ELITe MGB®, le logo ELITe MGB®, ELITe InGenius® et ELITe BeGenius® sont des marques déposées au sein de l'Union européenne.

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

« QIAAsymphony® » est une marque déposée de QIAGEN GmbH.

Ficoll® est une marque déposée de GE Healthcare.

HSV2 ELITE MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTS032PLD



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 «**HSV2 ELITE MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of type 2 Herpes Simplex human virus (HSV2)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HSV2 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay is CE-IVD validated in combination with the instruments **ELITE InGenius®** and **ELITE BeGenius®**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
HSV2	Glicoprotein G (gpG)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

- › **Whole Blood** EDTA, **Plasma** EDTA, **CSF**

D. Kit content

HSV2 Q-PCR Mix

 X 4

Ready-to-use PCR Master Mix
4 tubes of 540 µL
96 reactions per kit
5 freeze-thaw cycles per tube

- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- › **ELITE InGenius®** instrument: INT030
- › **ELITE BeGenius®** instrument: INT040
- › **ELITE InGenius SP200** extraction cartridge: INT032SP200
- › **ELITE InGenius PCR Cassette** amplification cartridge: INT035PCR
- › **ELITE InGenius SP200 Consumable Set** consumable for extraction: INT032CS
- › **HSV2 - ELITE Standard:** STD032PLD
- › **HSV2 - ELITE Positive Control:** CTR032PLD
- › **CPE – Internal Control:** CTRCPE
- › **ELITE InGenius Waste Box:** F2102-000
- › **300 µL Filter Tips Axygen:** TF-350-L-R-S
- › **1000 µL Filter Tips Tecan :** 30180118

F. Protocol

- | | | | |
|-------------------------------|--------|-------------------------------|-----------|
| › Sample volume | 200 µL | › Unit of quantitative result | Copies/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 | | |
| › Q-PCR Mix volume | 20 µL | | |

G. Performance ELITE InGenius® and ELITE BeGenius®

Matrix	Limit of Detection	Linearity Range	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	171 cp / mL	171 – 25,000,000	96% 22/23*	100% 34/34*
Plasma	119 cp /mL	119 – 25,000,000	100% 30/30*	100% 39/39*
CSF	119 cp /mL	119 – 25,000,000	100% 20/20*	100% 22/22*

*confirmed samples/ tested samples

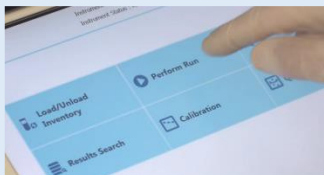
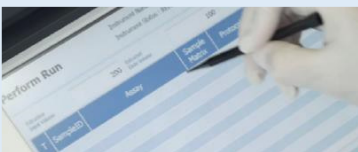
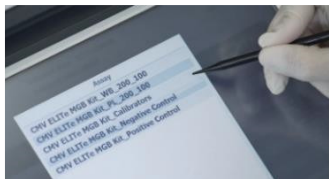
H. Procedures ELITE InGenius®

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

1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"	2. Verify calibrators: HSV2 Q-PCR Standard in the "Calibration menu" Verify controls: HSV2 positive and negative controls in the "Control menu" <i>N.B:</i> Both have been run, approved and not expired	3. Thaw the Q-PCR-Mix and the Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec
---	--	--

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen 	2. Verify the extraction volume: Input: "200 µL", eluate: "100 µL" 	3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID 
4. Select the "Assay protocol" of interest 	5. Select the sample position: Primary tube or extraction tube 	6. Load the Q-PCR Mix and the Internal Control in the inventory block 
7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, extraction tube and primary sample racks 	8. Close the door Start the run 	9. View, approve and store the results 

Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above	5. Select the protocol “Extraction Only” and set the sample position : Primary tube or Secondary tube	6. Load the Internal Control in the inventory block
7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, extraction tube and primary sample racks	8. Close the door Start the run	9. Archive the eluate sample

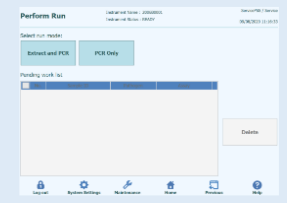
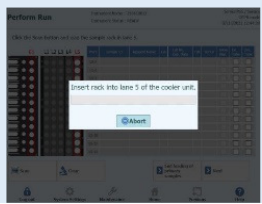
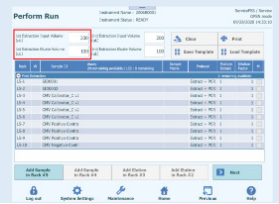
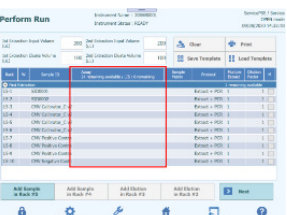
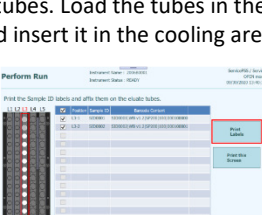
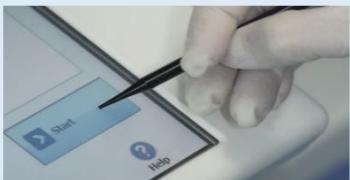
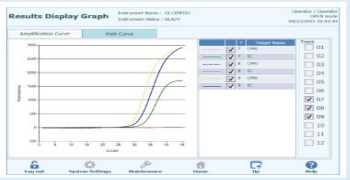
L. Procedures ELITE BeGenius®

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: HSV2 Q-PCR standard in the “Calibration menu” Verify controls: HSV2 pos. and neg. controls in the “Control menu” <i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired	3. Thaw the HSV2 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 

Note: if a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4

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

HSV2 ELITE MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Ref: RTS032PLD



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 «**HSV2 ELITE MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of type 2 Herpes Simplex human virus (HSV2)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HSV2 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. 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 **QIAasymphony** (Qiagen).

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
HSV2	Glicoprotein G (gpG)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

› Whole blood EDTA

› Plasma EDTA

› Cerebrospinal fluid

D. Kit content

HSV2 Q-PCR Mix



X 4

Ready-to-use PCR Master Mix
4 tubes of 540 µL
100 reactions per kit
5 freeze-thaw cycles per tube

- › 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
- ›

- › **HSV2 ELITE Standard**: STD032PLD
- › **HSV2 - ELITE Positive Control**: CTR032PLD
- › **CPE - Internal Control**: CTCRPE
- › **easyMAG** - Generic protocol 2.0.1
- › **QIAasymphony** - 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	10 gEq/reaction	100% (30/30)*	100% (30/30)*
	Plasma	10 gEq/reaction	100% (30/30)*	100% (30/30)
	CSF	10 gEq/reaction	100% (22/22)*	100% (24/24)*
ELITE GALAXY - ABI	Whole blood	171 gEq/mL	100% (32/32)*	100% (36/36)*
	Plasma	119 gEq/mL	100% (30/30)*	100% (34/34)*
	CSF	10 gEq/reaction	100% (21/21)*	100% (22/22)*

*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	WB, Plasma, CSF	200 µL	700 µL	100 µL	200 µL
ELITE Galaxy	WB, Plasma	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL
EasyMAG	CSF, Plasma	500 µL	-	100 µL	5 µL
QIAasympphony	Plasma	500 µL	700 µL	85 µL	10 µL

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

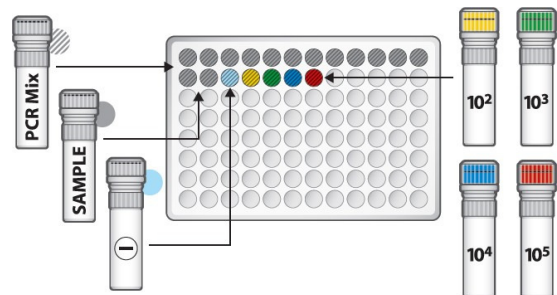
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "HSV2" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridization step at 60°C

Stage	Temperature	Timing
Decontamination	50°C	2 min
Denaturation	94°C	2 min
Amplification and detection	94°C	10 sec
	60°C	30 sec
45 cycles	72°C	20 sec

The melt curve analysis is optional, refer to the complete IFU

Amplification - PCR Set -up

1. Thaw HSV2 Q-PCR Mix and Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet **20 µL** of Q-PCR-Mix in all microplate wells in use
4. Add, **20 µL** of extracted DNA in sample wells, **20 µL** of molecular grade water in Negative Control well, and **20 µL** of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells. Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification – Baseline and Threshold for qualitative analysis

Instrument	Baseline	HSV2 FAM	Internal Control VIC
7500 Fast Dx Real Time PCR	6 - 15	0.2	0.1
7300 Real Time PCR	6 - 15	0.1	0.05

Interpretation - Qualitative results

HSV2 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 HSV2 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 cp/reaction or approximately from 100 to 10⁷ cp/mL.

HSV2 ELITE MGB® Kit used with Cobas-Z 480 PCR instruments

Ref.: RTS032PLD



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 «**HSV2 ELITE MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for **the detection and quantification of the DNA of type 2 Herpes Simplex human virus (HSV2)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HSV2 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. 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
HSV2	Glicoprotein G (gpG)	FAM
Internal Control	human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

- › **Whole blood** EDTA
- › **Plasma** EDTA

D. Kit content

HSV2 Q-PCR Mix



X 4

Ready-to-use PCR Master Mix
4 tubes of 540 µL
100 reactions per kit
5 freeze-thaw cycles per tube

- › 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
- › **HSV2 - ELITE Positive Control**: CTR032PLD
- › **HSV2 ELITE Standard**: STD032PLD
- › **CPE Internal Control**: CTRCPE

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
MagNA Pure 24	Whole blood	10 cp/reaction	100% (30/30)*	100% (40/40)*
	Plasma	10 cp/reaction	100% (30/30)*	100% (34/34)*

*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	WB, Plasma	200 µL	350 µL	100 µL	20 µL

Amplification - Settings of Cobas-Z 480 PCR instruments

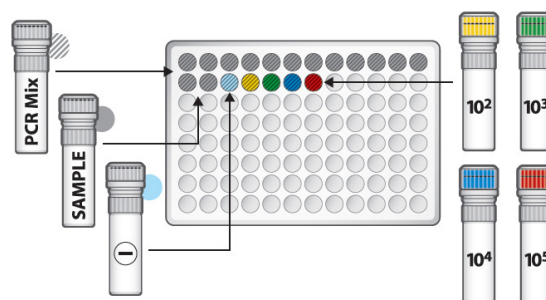
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "HSV2" detector with "FAM" and quencher "465 - 510"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "540 -580"

Stage	Temperature	Timing
Decontamination	50°C	2 min
Denaturation	94°C	2 min
Amplification and detection	94°C	10 sec
	60°C	30 sec
45 cycles	72°C	20 sec

The melt curve analysis is optional, refer to the complete IFU

Amplification - PCR Set-up

1. Thaw HSV2 Q-PCR Mix and Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet **20 µL** of Q-PCR Mix in all microplate wells in use
4. Add, **20 µL** of extracted DNA in sample wells, **20 µL** of molecular grade water in Negative Control well, and **20 µL** of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells
Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification – Background and Threshold for qualitative analysis*

Instrument	Matrix	Background	HSV2 FAM	Internal Control VIC
Cobas-Z 480 PCR instruments	Plasma	2 - 6	0.55	1.2
Cobas-Z 480 PCR instruments	WB	2 - 6	0.8	1.5

**manually set the Threshold and Noiseband*

Interpretation - Qualitative results

HSV-1 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 HSV2 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 100 to 10⁷ copies/mL.

GRILLE DE TRAVAIL

[illegible]