



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

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

NOTICE of CHANGE dated 19/01/2022

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«HHV8 ELITe MGB[®] Kit» Ref. RTS038PLD

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

- *Update for the use of the product in association with «ELITe BeGenius[®]» instrument (REF INT040).*
- *Update of PERFORMANCE CHARACTERISTICS (pag.20):*
 - *Change in Limit of Detection (LoD)*
 - *Addition of Linear measuring range*
 - *Addition of Repeatability*
 - *Addition of Reproducibility*

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

APPLICATION

Le produit « **HHV8 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 de l'herpèsvirus humain de type 8 (HHV8)** dans des échantillons d'ADN extraits de liquide céphalorachidien (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 HHV8, en association avec les données cliniques du patient et d'autres résultats d'analyse de laboratoire.

PRINCIPES DU TEST

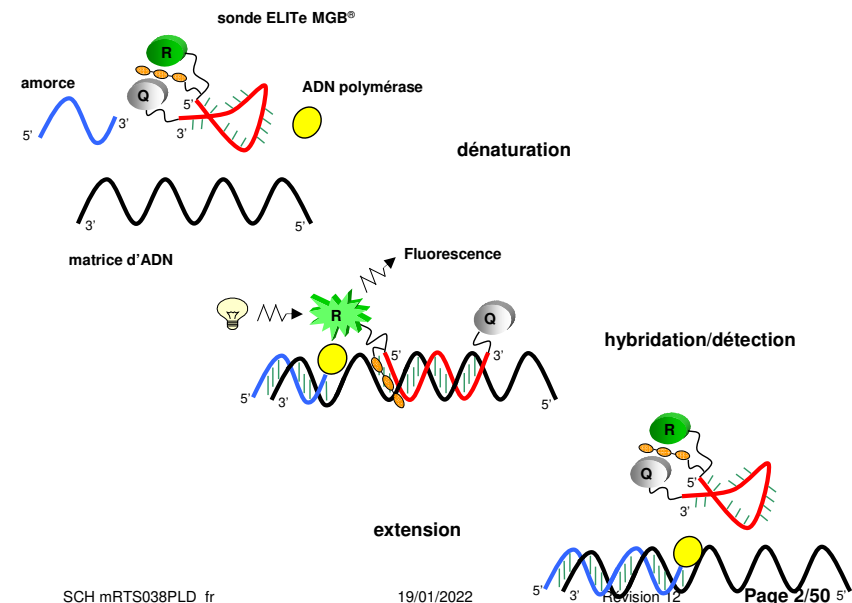
Le test consiste en une réaction d'amplification en temps réel effectuée par un thermostat programmable doté d'un système optique de détection de la fluorescence.

Dans chaque puits, deux réactions d'amplification sont effectuées à partir de l'ADN extrait des échantillons à tester : une réaction spécifique pour la région du gène de la **protéine mineure de capsid** (ORF26) du HHV8 et une réaction spécifique pour une région du gène de la **bêta-globine humaine** (contrôle interne d'inhibition). La sonde spécifique au HHV8 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 HHV8. 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 HHV8 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.



HHV8 ELITE MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS038PLD

CE IVD

-20 °C

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
SYSTÈME ELITE INGENIUS	page 6
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	page 6
PROCÉDURE AVEC LE SYSTÈME ELITE INGENIUS	page 7
SYSTÈME ELITE BEGENIUS	page 16
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	page 16
PROCÉDURE AVEC LE SYSTÈME ELITE BEGENIUS	page 17
CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE	page 22
AUTRES SYSTÈMES	page 30
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	page 30
PROCÉDURE	page 32
CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE DES SYSTÈMES ELITE INGENIUS ET ELITE BEGENIUS	page 41
BIBLIOGRAPHIE	page 45
LIMITES DE LA PROCÉDURE	page 45
PROBLÈMES ET SOLUTIONS	page 46
LÉGENDE DES SYMBOLES	page 49
NOTE POUR L'ACQUÉREUR : LICENCE LIMITÉE	page 50

DESCRIPTION DU PRODUIT

Le produit « **HHV8 ELiTe MGB® Kit** » fournit le mélange complet prêt à l'emploi « **HHV8 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 HHV8 (stabilisées par le groupe MGB®, marquées par le fluorophore FAM et désactivées par une molécule non fluorescente) sont spécifiques à la région du gène de la **protéine mineure de capsid** du HHV8.

Les amorces et la sonde spécifique au 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
HHV8 Q - PCR Mix	mélange réactionnel complet	4 x 540 µl	-

MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI

- Hotte à flux laminaire.
- Gants non poudrés jetables en nitrile 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 à déplacement positif (2-20 µl, 5-50 µl, 50-200 µl, 200-1 000 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.

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'extraction manuelle de l'ADN des échantillons à analyser, le produit générique « **EXTRABlood** » (ELiTechGroup S.p.A., réf. EXTB01), un kit pour l'extraction de l'ADN d'échantillons cellulaires et acellulaires, a été validé.

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 « **Filter tips 300** » (Axygen BioScience Inc., CA, États-Unis, réf. TF-350-L-R-S).

Pour l'extraction automatique de l'ADN, l'amplification et l'interprétation de l'analyse d'un échantillon, 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 « **HHV8 ELiTe STD** »,
- pour le contrôle positif d'amplification « **HHV8 ELiTe_PC** »,
- pour le contrôle négatif d'amplification « **HHV8 ELiTe_NC** »,
- pour l'analyse des échantillons « **HHV8 ELiTe_WB_200_100** » et « **HHV8 ELiTe_PL_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 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 1000 µl « **1000 µL Filter Tips Tecan** » (Tecan, Suisse, réf. 30180118).

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

- pour les calibrateurs « **HHV8 ELiTe_Be_STD** »,
- pour le contrôle positif d'amplification « **HHV8 ELiTe_Be_PC** »,
- pour le contrôle négatif d'amplification « **HHV8 ELiTe_Be_NC** »,
- pour l'analyse des échantillons « **HHV8 ELiTe_Be_WB_200_100** » et « **HHV8 ELiTe_Be_PL_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 des acides nucléiques dans des échantillons biologiques 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 des acides nucléiques dans des échantillons biologiques 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, l'utilisation des produits génériques suivants a également été validée : les kits « **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, l'utilisation du produit suivant a également été validée : le kit « **QIASymphony® DNA Mini Kit** » (QIAGEN GmbH, réf. 931236), un kit pour l'extraction des acides nucléiques dans des échantillons biologiques à l'aide de l'instrument « **QIASymphony® SP/AS** » (QIAGEN GmbH, réf. 9001297, 9001301), ainsi que de produits génériques apparentés.

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.

HHV8 ELiTe MGB® Kit

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

REF RTS038PLD

Avec le 7300 Real-Time PCR System, il est nécessaire d'utiliser le produit générique « **Q - PCR Microplates** » (ELITechGroup S.p.A., réf. RTSACC01), des microplaques comprenant des puits de 0,2 ml et des feuilles de scellage adhésives pour l'amplification en temps réel.

Avec le 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, il est nécessaire d'utiliser le produit générique : « **Q - PCR Microplates Fast** » (ELITechGroup S.p.A., réf. RTSACC02), des microplaques comprenant des puits de 0,1 ml et des feuilles de scellement adhésives pour l'amplification en temps réel.

Si la détection de l'ADN du HHV8 est requise (analyse qualitative), il est nécessaire d'utiliser le produit « **HHV8 - ELiTe Positive Control** » (ELITechGroup S.p.A., réf. CTR038PLD), un contrôle positif d'ADN plasmidique.

Si la détection et la quantification de l'ADN du HHV8 est requise (analyse quantitative), il est nécessaire d'utiliser le produit « **HHV8 ELiTe Standard** » (ELITechGroup S.p.A., réf. STD038PLD), quatre dilutions d'ADN plasmidique de quantité connue, afin d'obtenir la courbe d'étalonnage.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Ce produit est exclusivement 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 % ou autoclavé pendant une (1) heure à 121 °C avant d'être mis au rebut.

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 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

HHV8 ELiTe MGB® Kit

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

REF RTS038PLD

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 réactifs nécessaires à l'amplification doivent être préparés de manière à pouvoir être utilisés au cours d'une seule session. 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 **HHV8 Q - PCR Mix** doit être conservé à -20 °C dans l'obscurité.

Le **HHV8 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.

Le **HHV8 Q - 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.

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'acide nucléique 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.

N.B. : lorsque l'extraction de l'ADN à partir 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 **HHV8 ELiTe_WB_200_100**. Ce protocole comprend le traitement de 200 µl d'échantillon, l'ajout du **CPE** à 10 µl/extraction et l'éluion 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.

N.B. : lorsque l'extraction de l'ADN à partir 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 **HHV8 ELiTe_PL_200_100**. Ce protocole comprend le traitement de 200 µl d'échantillon, l'ajout du **CPE** à 10 µl/extraction et l'éluion 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 concernant les performances du produit avec l'ADN extrait des échantillons cliniques suivants : liquide céphalorachidien et biopsies cutanées.

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.

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 **HHV8 ELITE Standard**, en association avec le protocole « **HHV8 ELITE_Be_STD** » pour le système **ELITE InGenius**
- à titre de contrôle positif d'amplification, utiliser le **HHV8 - ELITE Positive Control**, en association avec le protocole « **HHV8 ELITE_PC** » pour le système **ELITE InGenius**,
- 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 « **HHV8 ELITE_NC** » pour le système **ELITE InGenius**.

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 externes doivent être utilisés conformément aux exigences des organismes d'accréditation locaux, régionaux et nationaux en vigueur.

PROCÉDURE AVEC LE SYSTÈME ELITE InGenius®

La procédure d'utilisation du « **HHV8 - 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 exportation 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 de connexion « **CLOSED** » (FERMÉ) ;
- vérifier que les calibrateurs (**HHV8 Q-PCR Standard**) ont été analysés, sont approuvés et ne présentent pas le statut (Status) Expiré en association avec le lot de réactifs d'amplification à utiliser.

Ceci peut être vérifié dans le menu « Calibration » (Étalonnage) de la page Home (Accueil) ; En l'absence de calibrateurs approuvés ou valides, il convient de les analyser comme décrit aux paragraphes suivants ;

- vérifier que les contrôles d'amplification (**HHV8 Positive Control**, **HHV8 Negative Control**) ont été analysés, sont approuvés et ne présentent pas le statut (Status) expiré en association avec le lot de réactifs d'amplification à utiliser. Ceci peut être vérifié dans le menu « Control » (Contrôle) de la page Home (Accueil) ; En l'absence de contrôles d'amplification approuvés ou valides, il convient de les analyser comme décrit aux paragraphes suivants,

- 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** et l'instrument **ELITE InGenius** et les matrices indiquées.

Les protocoles de test disponibles pour le « **HHV8 ELITE MGB® Kit** » sont décrits dans le tableau ci-dessous.

Protocoles de test pour le « HHV8 ELITE MGB® Kit »			
Nom	Matrice	Indication du rapport	Caractéristiques
HHV8 ELITE_WB_200_100	Sang total	copies/ml	Volume d'extraction initial : 200 µl Volume d'élué extrait : 100 µl Contrôle interne : 10 µl Sonication : NON Volume de PCR Mix : 20 µl Volume initial de PCR de l'échantillon : 20 µl
HHV8 ELITE_PL_200_100	Plasma	copies/ml	Volume d'extraction initial : 200 µl Volume d'élué extrait : 100 µl Contrôle interne : 10 µl Sonication : NON Volume de PCR Mix : 20 µl Volume initial de PCR de l'échantillon : 20 µl

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

Des protocoles d'analyse qualitative sont disponibles sur demande.

Paramétrage de la session d'analyse

Le produit **HHV8 ELITE MGB® Kit** peut être utilisé avec le système **ELITE InGenius** pour les opérations suivantes :

- A. Analyse intégrée (« Extract + PCR » [Extraction + PCR]),
- B. Analyse d'amplification (« PCR Only » [PCR uniquement]),
- C. Analyse d'étalonnage (« PCR Only » [PCR uniquement]),
- D. Analyse d'amplification du contrôle positif et 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 InGenius** 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 trois types d'analyse sont décrites dans les paragraphes suivants.

A. Analyse intégrée

Pour paramétrer une analyse intégrée avec une extraction et une amplification d'échantillon, effectuer les étapes suivantes comme indiqué par la GUI :

1. Décongeler les tubes de **HHV8 Q - PCR Mix** à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes en un 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 : décongeler le **HHV8 Q - PCR Mix** dans l'obscurité, car ce réactif est sensible à la lumière.

2. Décongeler les tubes CPE à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes pour la session. Chaque 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. 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. Pour chaque « Track » (Position) d'intérêt, renseigner le « SampleID » (SID) (ID échantillon) en le saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.
6. Sélectionner le protocole d'analyse à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (par ex. HHV8 ELiTe_PL_200_100).
7. Vérifier que le « Protocol » (Protocole) affiché est : « Extract + PCR » (Extraction + PCR).
8. 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 « Extraction Tube » (Tube d'extraction).Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
9. Charger le CPE et le HHV8 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.
10. 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.
11. Charger les « PCR Cassettes » (Cassettes de PCR), les cartouches d'extraction « ELiTe InGenius SP 200 », tous les consommables requis et les échantillons à extraire 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 aux utilisateurs de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, puis d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

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

Remarque : au terme de l'analyse, les « PCR Cassettes » (Cassettes de PCR) contenant les produits de réaction et les autres consommables doivent être retirés de l'instrument et mis 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.

B. Analyse d'amplification

Pour paramétrer l'analyse d'amplification à partir d'ADN extrait, effectuer les étapes suivantes comme indiqué par la GUI :

1. Décongeler les tubes de **HHV8 Q - PCR Mix** à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes en un 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 : décongeler le **HHV8 Q - 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. Même si aucune extraction ne sera réalisée, 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.
4. Pour chaque « Track » (Position) d'intérêt, renseigner le SID en le saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.
5. Sélectionner le protocole d'analyse à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (par ex. HHV8 ELiTe_PL_200_100).
6. Sélectionner « PCR Only » (PCR uniquement) dans la colonne « Protocol » (Protocole).
7. Vérifier que la position de chargement de l'échantillon dans la colonne « Sample Position » (Position échantillons) est « Elution Tube (bottom row) » (Tube d'élution [ligne inférieure]). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
8. Charger le **HHV8 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.
9. 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.
10. Charger les « PCR Cassettes » (Cassettes de PCR) et les échantillons d'acide nucléique extraits en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
11. Fermer le tiroir de l'instrument.
12. Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

Au terme du processus, 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 : au terme de l'analyse, l'échantillon extrait restant dans le « Elution tube » (Tube d'élution) doit être retiré de l'instrument, bouché et conservé à -20 °C pendant un mois. Éviter tout déversement de l'échantillon extrait.

Remarque : au terme de l'analyse, les « PCR Cassettes » (Cassettes de PCR) contenant les produits de réaction et les autres consommables doivent être retirés de l'instrument et mis 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.

C. Analyse d'étalonnage

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

1. Décongeler les tubes de **HHV8 Q - PCR Mix** à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes en un 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 : décongeler le HHV8 Q - PCR Mix dans l'obscurité, car ce réactif est sensible à la lumière.

2. Décongeler les tubes **HHV8 Q - PCR Standard** (Cal1 : HHV8 Q - PCR Standards 10^2 , Cal2 : HHV8 Q - PCR Standards 10^3 , Cal3 : HHV8 Q - PCR Standards 10^4 , Cal4 : HHV8 Q - PCR Standards 10^5) à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes. 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. Même si aucune extraction ne sera effectuée, vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initial) est de 200 µl et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'éluéon extrait) est de 100 µl.
5. Dans la « Track » (Position) d'intérêt, sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test).
6. Sélectionner le protocole de test « HHV8 ELITe_STD » dans la colonne « Assay » (Test) et renseigner le numéro de lot et la date de péremption du HBV Q-PCR Standard.
7. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
8. Charger le **HHV8 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.
9. 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.
10. Charger les « PCR Cassettes » (Cassettes de PCR) et les tubes **HHV8 Q-PCR Standard** en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
11. Fermer le tiroir de l'instrument.
12. Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

Au terme du processus, 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 : au terme de l'analyse, l'échantillon extrait restant dans le « Elution tube » (Tube d'éluéon) doit être retiré de l'instrument, bouché et conservé à -20 °C pendant un mois. Éviter tout déversement de l'échantillon extrait.

Remarque : au terme de l'analyse, les « PCR Cassettes » (Cassettes de PCR) contenant les produits de réaction et les autres consommables doivent être retirés de l'instrument et mis 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 d'amplification du contrôle positif et du contrôle négatif, effectuer les étapes suivantes comme indiqué par la GUI :

1. Décongeler les tubes de **HHV8 Q - PCR Mix** à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes en un 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 : décongeler le **HHV8 Q - PCR Mix** dans l'obscurité, car ce réactif est sensible à la lumière.

2. Décongeler les tubes de **HHV8 - Positive Control** à température ambiante (environ +25 °C) pendant 30 minutes pour la session d'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'éluéon) fourni avec le « ELITe InGenius SP Consumable Set ».
4. Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
5. Même si aucune extraction ne sera réalisée, vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initial) est de 200 µl et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'éluéon extrait) est de 50 µl.
6. Dans la « Track » (Position) d'intérêt, sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test).
7. Pour le contrôle positif, sélectionner le protocole de test « HHV8 ELITe_PC » dans la colonne « Assay » (Test) et renseigner le numéro de lot et la date de péremption du HHV8 Positive Control.
8. Pour le contrôle négatif, sélectionner le protocole de test « HHV8 ELITe_NC » et renseigner le numéro de lot et la date de péremption de l'eau de qualité biologie moléculaire.
9. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
10. Charger le **HHV8 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.
11. Charger/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.
12. Charger les « PCR Cassettes » (Cassettes de PCR), le tube HHV8 Positive Control et le tube du contrôle négatif 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 InGenius** permet aux utilisateurs 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 : au terme de l'analyse, le contrôle positif restant peut être retiré de l'instrument, bouché et conservé à -20 °C. Le contrôle négatif restant doit être mis au rebut.

Remarque : au terme de l'analyse, le contrôle positif restant peut être retiré de l'instrument, bouché et conservé à -20 °C. Le contrôle négatif restant doit être mis au rebut.

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

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

Examen et approbation des résultats

Au terme de l'analyse, l'écran « Results Display » (Affichage des résultats) s'affiche automatiquement. Dans cet écran, les résultats de l'échantillon/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]). Se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument pour plus de détails.

Remarque : le système ELiTe InGenius 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.

Le système ELiTe InGenius génère les résultats à l'aide du produit « HHV8 ELiTe MGB® Kit » en exécutant la procédure suivante :

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

A. Validation de la courbe d'étalonnage

Les signaux de fluorescence émis par la sonde spécifique au HHV8 (« HHV8 ») dans les réactions d'amplification du calibrateur sont analysés automatiquement et interprétés par le logiciel de l'instrument avec les paramètres inclus dans le protocole de test « HHV8 ELiTe_STD ».

La courbe d'étalonnage, spécifique au lot de réactifs d'amplification, est enregistrée dans la base de données (Calibration [Étalonnage]). Elle peut être visualisée et approuvée par du personnel qualifié 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**.

Remarque : si la courbe d'étalonnage ne satisfait pas les critères d'acceptation, le message « Failed » (Échec) s'affiche dans l'écran « Calibration » (Étalonnage) et elle ne peut pas être approuvée. Les réactions d'amplification des calibrateurs doivent être répétées.

Remarque : si la courbe d'étalonnage est analysée avec des échantillons et que son résultat est non valide, les échantillons ne sont pas quantifiés et ne peuvent pas être approuvés. Dans ce cas, l'amplification de tous les échantillons doit être également répétée.

B. Validation des résultats du contrôle positif et du contrôle négatif d'amplification

Les signaux de fluorescence émis par la sonde spécifique au HHV8 (« HHV8 ») et par la sonde de contrôle interne spécifique (« IC ») dans la réaction d'amplification du contrôle positif et du contrôle négatif sont analysés automatiquement et interprétés par le logiciel de l'instrument avec les paramètres inclus dans les protocoles de test « HHV8 ELiTe_PC » et « HHV8 ELiTe_NC ».

Les résultats de l'amplification du contrôle positif et du contrôle négatif, spécifiques au lot de réactifs d'amplification utilisé, sont enregistrés dans la base de données (Controls [Contrôles]). Ils peuvent être visualisés et approuvés par du personnel qualifié disposant des privilèges « Administrator » (Administrateur) ou « Analyst » (Analyste), en suivant les instructions de la GUI.

Les résultats de l'amplification du contrôle positif et du contrôle négatif, spécifiques au lot de réactif d'amplification, expirent au bout de 15 jours.

Avant d'analyser un échantillon, il est impératif de vérifier que le contrôle positif et le contrôle négatif d'amplification ont été analysés avec le lot de réactif d'amplification à utiliser, et que les résultats sont approuvés et valides. 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) de l'interface graphique. Si les résultats du contrôle positif et du contrôle négatif d'amplification sont manquants, les générer comme décrit ci-dessus.

Les résultats des analyses de l'amplification du contrôle positif et du contrôle négatif sont utilisés par le logiciel de l'instrument pour paramétrer les « Control Charts » (Graphiques de contrôle). Quatre résultats de contrôle positif et de contrôle négatif, provenant de quatre analyses différentes, sont nécessaires pour configurer le « Control Chart » (Graphique de contrôle). Ensuite, les résultats du contrôle positif et du contrôle négatif sont utilisés pour surveiller les performances de l'étape d'amplification. Se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument pour plus de détails.

Remarque : si les résultats du contrôle positif ou du contrôle négatif d'amplification ne satisfont pas les critères d'acceptation, le message « Échec » (Failed) s'affiche dans l'écran « Contrôles » (Controls) et il ne peuvent pas être approuvés. Dans ce cas, la réaction du contrôle positif ou du contrôle négatif d'amplification doit être répétée.

Remarque : si le contrôle positif ou le contrôle négatif est analysé avec des échantillons à tester et que son résultat est non valide, les échantillons peuvent être approuvés mais les résultats ne sont pas validés. Dans ce cas, l'amplification de tous les échantillons doit être également répétée.

C. Validation des résultats des échantillons

Les signaux de fluorescence émis par la sonde spécifique au HHV8 (« HHV8 ») et par la sonde de contrôle interne spécifique (« IC ») dans chaque réaction d'amplification d'échantillon sont analysés automatiquement et interprétés par le logiciel de l'instrument avec les paramètres inclus dans le protocole de test.

Remarque : Avant d'analyser un échantillon, il est absolument indispensable de générer et d'approuver la courbe d'étalonnage et le résultat des contrôles d'amplification pour le lot de réactifs utilisé. Il est recommandé, mais non obligatoire, d'analyser le contrôle positif et négatif en même temps que les calibrateurs. La disponibilité des résultats de la courbe d'étalonnage et du contrôle positif et négatif d'amplification dont le statut est « Approved » (Approuvé) est indiquée dans les fenêtres « Calibration » (Étalonnage) et « Controls » (Contrôles) du logiciel ELiTe InGenius et ils sont rapportés dans la section « Assay Parameters » (Paramètres du test).

Les résultats sont décrits dans les rapports générés par l'instrument (« Results Display » [Affichage des résultats]).

L'analyse de l'échantillon est valide lorsque les deux conditions indiquées dans le tableau ci-dessous sont satisfaites.

1) Courbe d'étalonnage	Statut
HHV8 Q-PCR Standard	APPROUVÉ
2) Contrôle positif	Statut
HHV8 Positive Control	APPROUVÉ
3) Contrôle négatif	Statut
HHV8 Negative Control	APPROUVÉ

Pour chaque échantillon, le résultat du test est automatiquement interprété par le système selon l'algorithme du **logiciel ELiTe InGenius** et les paramètres du protocole de test.

Les messages des résultats possibles d'un échantillon sont répertoriés dans le tableau ci-dessous.

Résultat de l'analyse de l'échantillon	Interprétation
HHV8 : ADN détecté, quantité égale à XXX copies/ml (HHV8: DNA Detected, quantity equal to XXX copies/mL)	L'ADN du HHV8 a été détecté dans la plage de mesure du test ; la quantité est celle affichée.
HHV8 : ADN détecté, quantité inférieure au nombre de copies/ml de la LLoQ (HHV8: DNA Detected, quantity below LLoQ copies/mL)	L'ADN du HHV8 a été détecté en une quantité inférieure à la limite inférieure de quantification du test.
HHV8 : ADN détecté, quantité supérieure au nombre de copies/ml de la ULQ (HHV8: DNA Detected, quantity beyond ULQ copies/mL)	L'ADN du HHV8 a été détecté en une quantité supérieure à la limite supérieure de quantification du test.
HHV8 : ADN non détecté ou inférieur au nombre de copies/ml de la LoD (HHV8: DNA Not Detected or below LoD copies/mL)	L'ADN du HHV8 n'a pas été détecté ou est inférieur 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 (extraction incorrecte ou contamination par des inhibiteurs).

Les échantillons non appropriés pour l'interprétation des résultats sont rapportés comme « Non valide - Tester à nouveau l'échantillon » (Invalid - Retest Sample) par le logiciel ELiTe InGenius. Dans ce cas, l'ADN du contrôle interne n'a pas été efficacement détecté en raison de problèmes lors de l'étape d'amplification ou d'extraction (dégradation d'ADN, perte d'ADN pendant l'extraction ou contamination par des inhibiteurs dans l'éluat), ce qui peut générer des résultats faux-négatifs.

Lorsque le volume d'éluat est suffisant, l'échantillon extrait peut être à nouveau testé 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'une nouvelle aliquote à l'aide du mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

Les échantillons pouvant être analysés mais pour lesquels il n'a pas été possible de détecter de l'ADN du HHV8 sont rapportés comme suit : « ADN non détecté ou inférieur à la LoD » (DNA Not Detected or below LoD). Dans ce cas, il n'est pas possible d'exclure le fait que de l'ADN du HHV8 soit présent à une concentration inférieure à la limite de détection du test (se reporter à la section « Caractéristiques de performance »).

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 « 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 visualisés 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 (c'est-à-dire par patient).

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

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

Système 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'acide nucléique 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 d'ADN à partir de sang total est effectuée avec l'instrument ELiTe BeGenius et avec le logiciel ELiTe BeGenius version 2.0.0 (ou versions équivalentes ultérieures), utiliser le protocole d'extraction HHV8 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 d'ADN à partir de sang total est effectuée avec l'instrument ELiTe BeGenius et avec le logiciel ELiTe BeGenius version 2.0.0 (ou versions équivalentes ultérieures), utiliser le protocole d'extraction HHV8 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.

Autres échantillons :

Il n'existe actuellement aucune donnée disponible concernant les performances du produit avec l'ADN extrait des échantillons cliniques suivants : liquide céphalorachidien et biopsies cutanées.

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 HHV8 ELiTe Standard,

en association avec le protocole « **HHV8 ELITe_Be_STD** » pour le système **ELITe BeGenius**, à titre de contrôle positif d'amplification, utiliser le **HHV8 - ELITe Positive Control**, en association avec le protocole « **HHV8 ELITe_Be_PC** » pour le système **ELITe BeGenius**, 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 « **HHV8 ELITe_Be_NC** » pour le système **ELITe BeGenius**.

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.

PROCÉDURE AVEC LE SYSTÈME ELITe BeGenius®

La procédure d'utilisation du « **HHV8 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 « **FERMÉ** » (CLOSED) ;
- vérifier que les calibrateurs (**HHV8 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 (**HHV8 - Positive Control**, **HHV8 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 « **HHV8 ELITe MGB® Kit** » sont décrits dans le tableau ci-dessous.

Protocoles de test pour le « HHV8 ELITe MGB Kit » avec le système ELITe BeGenius®			
Nom	Matrice	Indication du rapport	Caractéristiques
HHV8 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 Volume de PCR Mix : 20 µl Volume initial de PCR de l'échantillon : 20 µl
HHV8 ELITe_Be_PL_200_100	Plasma	copies/ml	Volume d'extraction initial : 200 µl Volume d'élution extrait : 100 µl Contrôle interne : 10 µl Volume de PCR Mix : 20 µl Volume initial de PCR de l'échantillon : 20 µl

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

Les protocoles d'analyse qualitative sont disponibles sur demande.

Paramétrage de la session d'analyse

Le kit **HHV8 ELITe MGB Kit**, en association avec le système **ELITe BeGenius** peut être utilisé afin d'effectuer les opérations suivantes :

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

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

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

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

A. Analyse d'échantillons

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

1. Décongeler des tubes de mélange HHV8 Q - PCR Mix en nombre suffisant pour la session d'analyse. Chaque nouveau tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions de consommation de réactif optimales. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
2. Décongeler 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 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 les portoirs 5 et 4 (toujours commencer par le portoir 5).
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.

- Vérifier le Extraction Input Volume (Volume d'Extraction Initial) (200 µl) et le Extracted Elute Volume (Volume d'Élution Extrait) (100 µl).
- Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (c'est-à-dire HHV8 ELiTe_Be_WB_200_100). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- S'il est utilisé, répéter les étapes 7 à 9 pour le portoir 4.
- Charger les tubes d'éluion dans les portoirs 3 et 2 (toujours commencer par le portoir 3).

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

- Insérer le portoir dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- S'il est utilisé, répéter l'étape 12 pour le portoir 2.
- Charger le CPE et le HHV8 Q-PCR Mix dans le portoir 1.
- Insérer le portoir 1 dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- 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.
- Charger le panier avec la « PCR Cassette » (Cassette de PCR) dans la « Inventory Area » (Zone inventaire) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger le panier avec les cartouches d'extraction « ELiTe InGenius SP 200 » et les consommables d'extraction requis en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Fermer le tiroir de l'instrument.
- Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

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

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

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

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

B. Analyse d'amplification

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

- Décongeler des tubes de mélange HHV8 Q - PCR Mix en nombre suffisant pour la session d'analyse. Chaque nouveau tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions de consommation de réactif optimales. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
- Décongeler des tubes de CPE en nombre suffisant pour la session d'analyse. Chaque nouveau tube permet d'effectuer 12 extractions. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
- Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).

- Retirer les portoirs 1, 2 et 3 de la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement) et les placer sur la table de préparation.
- Sélectionner le « run mode » (mode d'analyse) : « PCR only » (PCR uniquement).
- Charger les échantillons dans les portoirs 3 et 2 (toujours commencer par le portoir 3).
- Insérer le portoir dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Même si aucune extraction n'est réalisée, vérifier le Extraction Input Volume (Volume d'Extraction Initial) (200 µl) et le Extracted Elute Volume (Volume d'Élution Extrait) (100 µl).
- Sélectionner le protocole d'analyse à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (par ex. HHV8 ELiTe_Be_WB_200_100). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Répéter les étapes 7 à 9 pour le portoir 2.
- Charger le CPE et le HHV8 Q-PCR Mix dans le portoir 1.
- Insérer le portoir 1 dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- 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.
- Charger le panier avec la « PCR Cassette » (Cassette de PCR) dans la « Inventory Area » (Zone inventaire) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Fermer le tiroir de l'instrument.
- Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

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

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

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

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

C. Analyse d'étalonnage

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

- Décongeler des tubes de mélange HHV8 Q - PCR Mix en nombre suffisant pour la session d'analyse. Chaque nouveau tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions de consommation de réactif optimales. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
- Décongeler les tubes de HHV8 Q - PCR Standard (Cal1 : HHV8 Q-PCR Standards 10², Cal2 : HHV8 Q-PCR Standards 10³, Cal3 : HHV8 Q-PCR Standards 10⁴, Cal4 : HHV8 Q-PCR Standards 10⁵). Chaque tube permet d'effectuer 4 sessions d'analyse. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
- Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
- Retirer les portoirs 1, 2 et 3 de la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement) et les placer sur la table de préparation.
- Sélectionner le « run mode » (mode d'analyse) : « PCR only » (PCR uniquement).
- Charger les tubes de calibrateur dans les portoirs 3.

- Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (HHV8 ELiTe_Be_STD). Cliquer sur le bouton « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger le HHV8 Q-PCR Mix dans le portoir 2.
- Insérer le portoir 2 dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- 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.
- Charger le panier avec la « PCR Cassette » (Cassette de PCR) dans la « Inventory Area » (Zone inventaire) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Fermer le tiroir de l'instrument.
- Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

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

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

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

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

D. Analyse du contrôle positif et du contrôle négatif

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

- Décongeler des tubes de mélange HHV8 Q - PCR Mix en nombre suffisant pour la session d'analyse. Chaque nouveau tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions de consommation de réactif optimales. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
- Décongeler le produit HHV8 - 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.
- 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'éluion) fourni dans le kit de consommables ELiTe InGenius SP Consumable Set.
- Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
- Retirer les portoirs 1, 2 et 3 de la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement) et les placer sur la table de préparation.
- Sélectionner le « run mode » (mode d'analyse) : « PCR only » (PCR uniquement).
- Charger les tubes de contrôle positif et de contrôle négatif dans les portoirs 3.
- Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (HHV8 ELiTe_Be_PC et HHV8 ELiTe_Be_NC). Cliquer sur le bouton « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger le HHV8 Q-PCR Mix dans le portoir 2.
- Insérer le portoir 2 dans la « Cooler Unit » (Unité de refroidissement). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- 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.

- Charger le panier avec la « PCR Cassette » (Cassette de PCR) dans la « Inventory Area » (Zone inventaire) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Fermer le tiroir de l'instrument.
- Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

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

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

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

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

Examen et approbation des résultats

Au terme de l'analyse, l'écran « Results Display » (Affichage des résultats) s'affiche automatiquement. Dans cet écran, les résultats de l'échantillon/du 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]).

L'instrument ELiTe BeGenius génère les résultats à l'aide du produit HHV8 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 DES SYSTÈMES ELiTe InGenius et ELiTe BeGenius

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 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 d'environ 10 copies/20 µl en présence d'ADN plasmidique contenant le contrôle interne à un titre de 150 000 copies/20 µl. Cet échantillon a été testé en 18 répliquats (mode « PCR Only » [PCR uniquement]) en effectuant l'amplification à l'aide des produits ELiTechGroup S.p.A sur deux instruments différents. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
10 copies d'ADN plasmidique de HHV8 + 150 000 copies de contrôle interne	18	18	0

La limite de détection (LoD) du HHV8 ELiTe MGB® Kit a été vérifiée en association avec des échantillons de **plasma** et de **sang total** prélevés sur EDTA et 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 répliquats d'échantillons de sang total dopés à 117 copies/ml sur les systèmes **ELiTe InGenius** et **ELiTe BeGenius** en mode « Extract + PCR » (Extraction

HHV8 ELITE MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS038PLD

+ PCR). Les échantillons ont été dopés en utilisant le matériel de référence « Human Herpes Virus Type 8 (HHV-8) Infectious Culture Fluid » (ZeptoMetrix Corporation).

La LoD était confirmée si au moins 18 des 20 réplicats généraient un résultat positif conformément à la directive CLSI EP17-A.

Les résultats sont présentés dans les tableaux suivants.

Limite de détection pour des échantillons de sang total avec le système ELITE InGenius					
Échantillon	LoD	N	Valide	Positif	Négatif
Sang total prélevé sur EDTA	117 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	117 copies/ml	20	20	20	0

La valeur de la LoD pour la cible HHV8 a été confirmée à 117 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 98 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 « Human Herpes Virus Type 8 (HHV-8) Infectious Culture Fluid » (ZeptoMetrix Corporation).

La LoD était confirmée si au moins 18 des 20 réplicats généraient un résultat positif conformément à la directive CLSI EP17-A.

Les résultats sont présentés dans les tableaux suivants.

Limite de détection pour des échantillons de plasma avec le système ELITE InGenius®					
Échantillon	LoD	N	Valide	Positif	Négatif
Plasma prélevé sur EDTA	98 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	98 copies/ml	20	20	20	0

La valeur de la LoD pour la cible HHV8 a été confirmée à 98 copies/ml pour le plasma prélevé sur EDTA.

Plage de mesure linéaire et limites de quantification

La plage de mesure linéaire du HHV8 ELITE MGB® Kit utilisé en association avec du **sang total** et du **plasma** prélevés sur EDTA et les systèmes **ELITE InGenius** et **ELITE BeGenius** a été vérifiée avec un panel de dilutions du HHV8. Le panel a été préparé en diluant le matériel « Human Herpes Virus Type 8 (HHV-8) Infectious Culture Fluid » (ZeptoMetrix Corporation) dans des matrices négatives pour l'ADN du HHV8. Le panel consistait en cinq points de dilution à partir de 1×10^6 copies/ml jusqu'à environ 2×10^2 copies/ml. Chaque échantillon du panel a été testé en 3 réplicats.

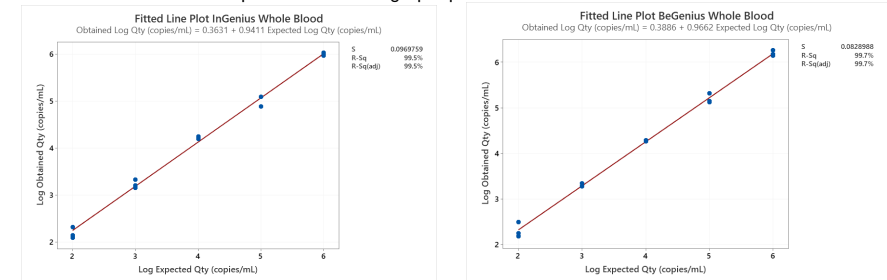
Pour le sang total :

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 0,995 pour l'instrument **ELITE InGenius** et de 0,997 pour l'instrument **ELITE BeGenius**.

HHV8 ELITE MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS038PLD

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 0,1839 log copies/ml pour l'instrument **ELITE InGenius** et à 0,3488 log copies/ml pour l'instrument **ELITE BeGenius**) et exacts (biais égal à 0,0014 log copies/ml pour l'instrument **ELITE InGenius** et à 0,1329 log copies/ml pour l'instrument **ELITE BeGenius**) : 117 copies/ml.

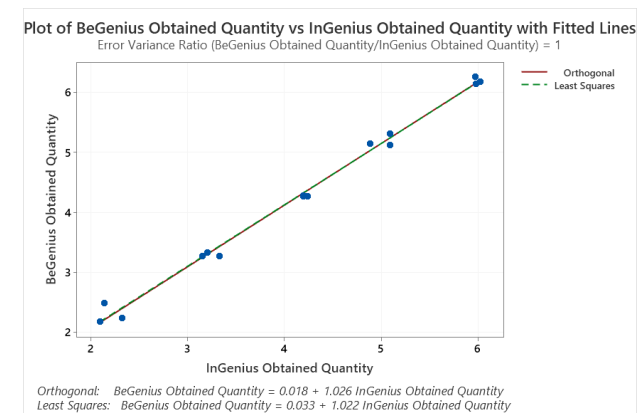
La limite supérieure de quantification (ULOQ) a été définie à la concentration la plus élevée testée qui génère des résultats quantitatifs précis (écart-type égal à 0,0302 log copies/ml pour l'instrument **ELITE InGenius** et à 0,06107 log copies/ml pour l'instrument **ELITE BeGenius**) et exacts (biais égal à 0,0078 log copies/ml pour l'instrument **ELITE InGenius** et à -0,1914 log copies/ml pour l'instrument **ELITE BeGenius**) : 1 000 000 copies/ml.

Les résultats suivants 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	117	1 000 000

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 générerait une pente de 1,026 (IC à 95 % : 0,980 ; 1,072) et une ordonnée à l'origine de 0,018 (IC à 95 % : - 0,183 ; 0,219). L'analyse de régression linéaire générerait un R² de 0,993.

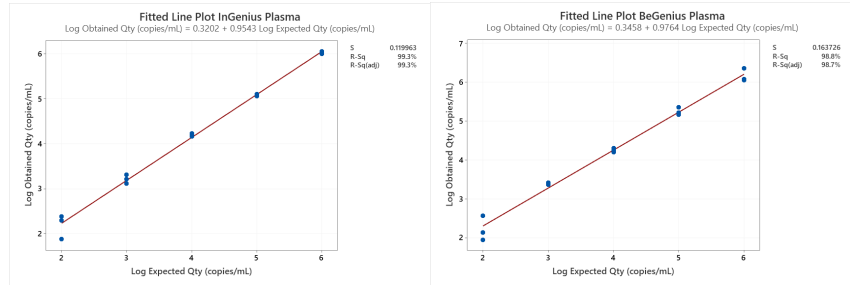
HHV8 ELITE MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS038PLD

Pour le plasma :

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 0,993 pour l'instrument **ELITE InGenius** et de 0,988 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 0,1971 log copies/ml pour l'instrument **ELITE InGenius** et à 0,090 log copies/ml pour l'instrument **ELITE BeGenius**) et exacts (biais égal à 0,1537 log copies/ml pour l'instrument **ELITE InGenius** et à 0,2693 log copies/ml pour l'instrument **ELITE BeGenius**) : 98 copies/ml.

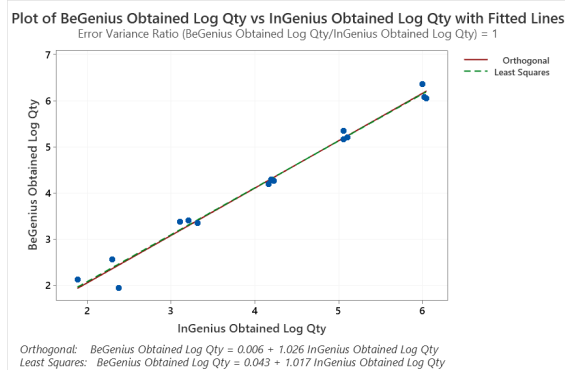
La limite supérieure de quantification (ULoQ) a été définie à la concentration la plus élevée testée qui génère des résultats quantitatifs précis (écart-type égal à 0,0245 log copies/ml pour l'instrument **ELITE InGenius** et à 0,1731 log copies/ml pour l'instrument **ELITE BeGenius**) et exacts (biais égal à -0,0249 log copies/ml pour l'instrument **ELITE InGenius** et à -0,1647 log copies/ml pour l'instrument **ELITE BeGenius**) : 1 000 000 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	98	1 000 000

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.



HHV8 ELITE MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS038PLD

Dans ce test, l'analyse de régression orthogonale générerait une pente de 1,026 (IC à 95 % : 0,953 ; 1,099) et une ordonnée à l'origine de 0,006 (IC à 95 % : - 0,312 ; 0,324). L'analyse de régression linéaire générerait un R² de 0,983.

Répétabilité

La répétabilité des résultats obtenus avec le produit HHV8 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 HHV8 (Human Herpes Virus Type 8 (HHV-8) Infectious Culture Fluid ZeptoMetrix) à une concentration de 3 x la LoD (environ 351 copies/ml) et de 10 x la LoD (environ 1170 copies/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	HHV8				Contrôle interne			
	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV
Négatif	0/8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	25,39	0,44	1,75
3 x la LoD	8/8	35,66	0,39	1,10				
10 x la LoD	8/8	33,95	0,28	0,84				

Répétabilité inter-sessions, ELITE InGenius								
Échantillon	HHV8				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	25,22	0,93	3,69
3 x la LoD	16/16	35,58	0,51	1,44				
10 x la LoD	16/16	33,93	0,56	1,65				

Dans le test de répétabilité sur l'instrument **ELITE InGenius**, l'analyse détectait la cible HHV8 comme attendu et montrait un faible % CV des valeurs Ct qui n'excédait pas 1,65 % pour le HHV8 et 3,69 % pour le contrôle interne.

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

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

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

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

Répétabilité intra-session, ELITE BeGenius								
Échantillon	HHV8				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	28,70	0,95	3,29
3 x la LoD	8/8	36,36	0,42	1,16				
10 x la LoD	8/8	34,43	0,11	0,31				

Répétabilité inter-sessions, ELITE BeGenius								
Échantillon	HHV8				Contrôle interne			
	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV
Négatif	0/16	N.A.	N.A.	N.A.	48/48	28,54	1,16	4,05
3 x la LoD	16/16	36,10	0,52	1,44				
10 x la LoD	16/16	34,25	0,32	0,93				

Dans le test de répétabilité sur l'instrument **ELITE BeGenius**, l'analyse détectait la cible HHV8 comme attendu et montrait un faible % CV des valeurs Ct qui n'excédait pas 1,44 % pour le HHV8 et 4,05 % pour le contrôle interne.

Reproductibilité

La reproductibilité des résultats obtenus avec le produit HHV8 ELITE MGB Kit en association avec les instruments **ELITE InGenius** et **ELITE BeGenius** a été testée en analysant un panel d'échantillons de plasma. Le panel incluait un échantillon négatif et deux échantillons dopés avec un matériel de référence certifié du HHV8 (Human Herpes Virus Type 8 (HHV-8) Infectious Culture Fluid ZeptoMetrix) à une concentration de 3 x la LoD (environ 351 copies/ml) et de 10 x la LoD (environ 1170 copies/ml).

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

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

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

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

Reproductibilité inter-instruments, ELITE InGenius								
Échantillon	HHV8				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	24,40	1,49	6,11
3 x la LoD	8/8	35,27	0,28	0,78				
10 x la LoD	8/8	33,87	0,37	1,09				

Répétabilité inter-lots, ELITE InGenius								
Échantillon	HHV8				Contrôle interne			
	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV	Pos./Rép.	Ct moyenne	EC	% CV
Négatif	0/8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	25,69	1,03	3,99
3 x la LoD	8/8	35,47	0,49	1,38				
10 x la LoD	8/8	33,84	0,31	0,92				

Dans le test de reproductibilité sur l'instrument **ELITE InGenius**, l'analyse détectait la cible HHV8 comme attendu et montrait un faible % CV des valeurs Ct qui n'excédait pas 1,38 % pour le HHV8 et 6,11 % 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	HHV8				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	28,39	1,37	4,82
3 x la LoD	8/8	36,19	0,61	1,70				
10 x la LoD	8/8	24,24	0,42	1,22				

Répétabilité inter-lots, ELITE BeGenius								
Échantillon	HHV8				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	28,83	1,02	3,55
3 x la LoD	8/8	35,79	0,58	1,73				
10 x la LoD	8/8	34,10	0,40	1,17				

Dans le test de reproductibilité sur l'instrument **ELITE BeGenius**, l'analyse détectait la cible HHV8 comme attendu et montrait un faible % CV des valeurs Ct qui n'excédait pas 1,7 % pour le HHV8 et 4,8 % pour le contrôle interne.

Sensibilité diagnostique : confirmation des échantillons positifs

La sensibilité diagnostique de l'analyse, en tant que confirmation des échantillons cliniques positifs, a été évaluée en analysant quelques échantillons cliniques de sang total ou de plasma prélevé sur EDTA qui étaient positifs pour l'ADN du HHV8, en association avec l'instrument **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 30 échantillons de sang total prélevé sur EDTA qui étaient négatifs pour l'ADN du HHV8 et qui avaient été dopés avec l'ADN du HHV8 en ajoutant le matériel « HUMAN HERPES VIRUS TYPE 8 (HHV-8) Infectious Culture Fluid » (ZeptoMetrix Corporation) à un titre de 750 copies/ml, et 30 échantillons de plasma prélevé sur EDTA qui étaient négatifs pour l'ADN du HHV8 et qui avaient été dopés avec l'ADN du HHV8 en ajoutant le matériel « HHV8 Infectious Culture Fluid » (ZeptoMetrix Corporation) 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 dopé avec de l'ADN du HHV8	30	30	0
Plasma prélevé sur EDTA dopé avec de l'ADN du HHV8	30	30	0

Tous les échantillons ont été confirmés comme positifs.

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

Spécificité diagnostique : confirmation des échantillons négatifs

La spécificité diagnostique de l'analyse, en tant que confirmation des échantillons négatifs, a été évaluée en analysant quelques échantillons cliniques de sang total ou de plasma prélevé sur EDTA qui étaient négatifs pour l'ADN du HHV8, en association avec l'instrument **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 32 échantillons de sang total prélevé sur EDTA issus de donneurs sains qui étaient présumés négatifs pour l'ADN du HHV8 et 32 échantillons de plasma prélevé sur EDTA issus de donneurs sains qui étaient présumés négatifs pour l'ADN du HHV8.

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 HHV8	32	0	32
Plasma prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du HHV8	32	0	32

Tous les échantillons ont été correctement détectés.

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

AUTRES SYSTÈMES

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES

Échantillons

Ce produit doit être utilisé avec de l'**ADN extrait** des échantillons cliniques 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.

N.B. : pour procéder à l'extraction de l'ADN des échantillons de 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'éluion.

Sang total prélevé sur EDTA

Les échantillons de sang total 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.

N.B. : 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'éluion.

N.B. : 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_E100_S200_ELI**, qui traite 200 µl d'échantillon et effectue l'éluion 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 véhicule de protéinase comme indiqué dans le manuel du kit d'extraction. Pour la procédure d'extraction, se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction.

N.B. : 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'éluion 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.

N.B. : pour procéder à l'extraction de l'ADN du sang total avec l'instrument « **NucliSENS® easyMAG®** », utiliser le protocole d'extraction **Generic 2.0.1** et suivre ces instructions : transférer **100 µl** d'échantillon dans la barrette à 8 puits, charger la barrette sur l'instrument et effectuer l'extraction sans incubation de lyse. Sans retirer la barrette, après l'ajout du **EasyMAG® Lysis Buffer** par l'instrument, mélanger le contenu de la barrette à trois reprises à l'aide de la pipette multicanaux fournie en utilisant le programme numéro 3. Incuber pendant 10 minutes, puis ajouter la **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** au contenu de la barrette à l'aide de la pipette multicanaux en utilisant le programme numéro 3, puis procéder à l'extraction. Éluer les acides nucléiques dans **50 µl** de tampon d'éluion.

N.B. : l'acquisition de la fluorescence (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection [Instrument > Protocole du thermocycleur > Paramètres > Collecte de données]) doit être paramétrée pendant l'étape d'hybridation à 60 °C.

- modifier le temps comme indiqué dans le tableau « **Cycle thermique** » ;
- paramétrer le nombre de cycles sur **45** ;
- paramétrer le volume pour l'émulsion logicielle du transfert thermique à la réaction (« Sample volume » [Volume d'échantillon]) sur **30 µl** ;
- facultatif : ajouter l'étape de dissociation (Add Dissociation Stage [Ajouter étape de dissociation]) et paramétrer la température entre **40 °C** et **80 °C**.

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

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

Avant de commencer la session d'analyse, en se reportant 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, ouvrir une session de « absolute quantification » (quantification absolue) et choisir le « Run mode: Fast 7500 » (Mode d'exécution : Fast 7500) ;
- paramétrer (à l'aide du « Detector Manager » [Gestionnaire de détecteur]) : le « detector » (détecteur) pour la sonde HHV8 avec le « reporter » (rapporteur) = « FAM » et le « quencher » (désactivateur) = « none » (aucun) (non fluorescent) et le nommer « HHV8 » ;
- 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 similaire à VIC), et le « quencher » (désactivateur) = « none » (aucun) (non fluorescent) et le nommer « IC » ;
- pour chaque puits utilisés dans la microplaque, paramétrer (à l'aide du Well Inspector [Inspecteur de puits]) : le « detector » (détecteur) (type de fluorescence à mesurer), la « passive référence » (référence passive) = « Cy5 » (AP593 est utilisé à la place de Cy5, 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.

N.B. : 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**.

Le paramétrage de l'analyse quantitative de quelques échantillons est présentée, à titre d'exemple, dans le paragraphe précédent décrivant la procédure pour l'instrument **7300 Real Time PCR System**.

En se reportant à la documentation de l'instrument, définir les paramètres du **cycle thermique** sur le logiciel dédié (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile [Instrument > Protocole du thermocycleur > Profil thermique]) :

- à l'étape d'amplification, ajouter l'étape (Add Step [Ajouter étape]) d'**extension à 72 °C** ;

N.B. : l'acquisition de la fluorescence (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection [Instrument > Protocole du thermocycleur > Paramètres > Collecte de données]) doit être paramétrée pendant l'étape d'hybridation à 60 °C.

- modifier le temps comme indiqué dans le tableau « **Cycle thermique** » ;
- paramétrer le nombre de cycles sur **45** ;
- paramétrer le volume pour l'émulsion logicielle du transfert thermique à la réaction (« Sample volume » [Volume d'échantillon]) sur **30 µl** ;
- facultatif : ajouter l'étape de dissociation (Add Dissociation Stage [Ajouter étape de dissociation]) et paramétrer la température entre **40 °C** et **80 °C**.

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

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 :

- 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 **HHV8 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 **HHV8 - Positive Control** ou de **HHV8 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 **HHV8 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.

N.B. : 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 deux options :
- Lorsqu'un résultat **qualitatif** est requis (détection de l'ADN du HHV8), pipeter avec précision, en le déposant dans le mélange réactionnel, **20 µl** de **HHV8 - Positive Control** dans le puits correspondant

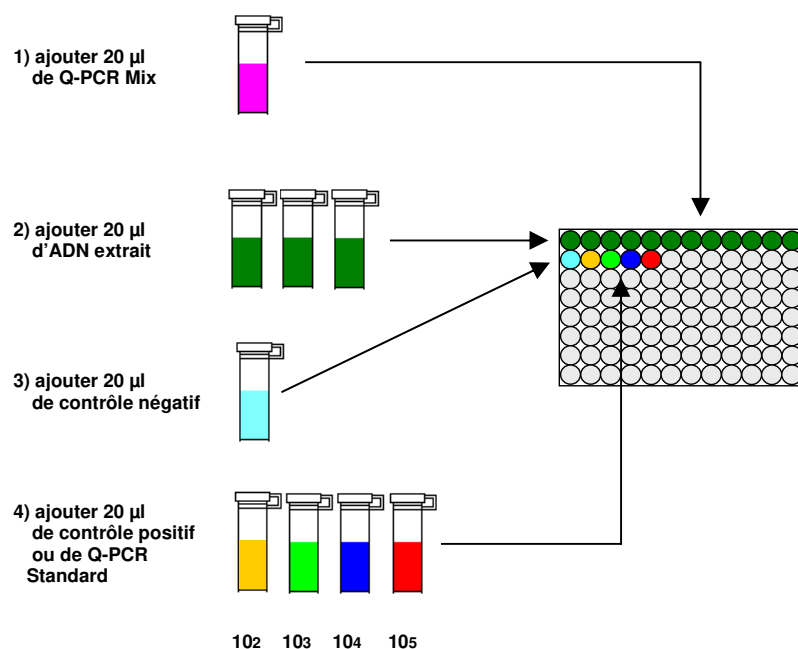
de la **microplaque d'amplification**, comme précédemment établi dans la **Work Sheet** (Fiche de travail). Bien mélanger le contrôle positif en pipetant le volume de 20 µl à trois reprises dans le mélange réactionnel. Éviter d'introduire des bulles.

- Lorsqu'un résultat **quantitatif** est requis (quantification de l'ADN du HHV8), pipeter avec précision, en le déposant dans le mélange réactionnel, **20 µl de HHV8 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 volume de 20 µl à trois reprises dans le mélange réactionnel. Éviter d'introduire des bulles. Procéder de la même manière avec les étalons **HHV8 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-HHV8-EGSpA »).

N.B. : à la fin du cycle thermique, la **microplaque d'amplification** contenant les produits de la réaction doit être retirée de l'instrument et mise 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.



N.B. : si la préparation de l'amplification est effectuée avec l'instrument « **ELiTe GALAXY** », charger la microplaque d'éluat, le mélange Q-PCR Mix et la microplaque d'amplification comme indiqué dans le manuel d'utilisation de l'instrument et suivre les étapes requises par la GUI.

N.B. : 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.

Analyse qualitative des résultats

Les valeurs enregistrées de la fluorescence émise par la sonde spécifique pour le HHV8 (détecteur FAM « HHV8 ») et par la sonde de 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 ;

N.B. : avec un échantillon positif présentant un titre élevé d'ADN du HHV8, la fluorescence FAM de la sonde spécifique pour le HHV8 peut commencer à augmenter avant le 15^e cycle. 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 « HHV8 » sur **0,1** ;
- paramétrer manuellement le **Seuil** (Threshold) 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 « HHV8 » 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 HHV8 (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 « HHV8 »	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 HHV8, 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.

***N.B.** : lorsque ce produit est utilisé pour la quantification de l'ADN du HHV8, 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).

Dans la réaction d'amplification du **contrôle négatif**, la valeur Ct du HHV8 (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 « HHV8 »	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 HHV8, 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 HHV8 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.

N.B. : 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 de la protéine mineure de capsid du HHV8 dans la réaction d'amplification, ce qui correspond aux équivalents génomiques par réaction (limite de détection du produit, se reporter à la section « 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 HHV8
détecteur FAM « HHV8 »	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 HHV8 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, 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 HHV8 et **Ct ≤ 35** pour le contrôle interne, cela signifie que l'ADN du HHV8 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 HHV8 soit présent à un titre inférieur à la limite de détection du produit (se reporter à la section concernant les « 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.

N.B. : lorsque l'ADN du HHV8 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 HHV8 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 HHV8 sont utilisées pour calculer la **courbe d'étalonnage** (Results > Standard Curve [Résultats > Courbe

d'étalonnage]) de la session d'amplification, pour valider l'amplification et la détection comme indiqué dans le tableau suivant :

Courbe d'étalonnage détecteur FAM « HHV8 »	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.

Les valeurs **Ct** du HHV8 dans la réactions 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 de la protéine mineure de capsid du HHV8 dans la réaction d'amplification, ce qui correspond aux équivalents génomiques par réaction (plage de mesure linéaire du produit, se reporter à la section « Caractéristiques de performance »), comme indiqué dans le tableau suivant :

Résultat de l'échantillon détecteur FAM « HHV8 »	Équivalents génomiques du HHV8 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**) des réactions d'amplification pour les **échantillons** (Results > Report [Résultats > Rapport]) sont utilisés pour calculer les équivalents génomiques (**gEq**) du HHV8 présents dans l'échantillon extrait (**Nc**) selon la formule suivante :

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

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 gEq par réaction**.

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

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

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

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

En cas d'utilisation du système d'extraction « **NucliSENS® easyMAG®** » avec des échantillons de

sang total prélevé sur EDTA et si le résultat doit être exprimé en gEq/ml, la formule est la suivante :

Formule simplifiée pour le sang total avec le système « NucliSENS® easyMAG® »
$Nc \text{ (gEq/ml)} = 50 \times \text{Quantité}$

En cas d'utilisation du système d'extraction « NucliSENS® easyMAG® » avec des échantillons de liquide céphalorachidien et qu'il est nécessaire que le résultat exprimé en gEq/ml, la formule est la suivante :

Formule simplifiée pour le liquide céphalorachidien avec le système « NucliSENS® easyMAG® »
$Nc \text{ (gEq/ml)} = 10 \times \text{Quantité}$

En cas d'utilisation du système d'extraction « QIASymphony® SP/AS » avec des échantillons de sang total prélevé sur EDTA et si le résultat doit être exprimé en gEq/ml, la formule est la suivante :

Formule simplifiée pour le sang total avec le système « QIASymphony® SP/AS »
$Nc \text{ (gEq/ml)} = 23 \times \text{Quantité}$

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 gEq/ml, la formule est la suivante :

Formule simplifiée pour le sang total avec le kit « EXTRAblood »
$Nc \text{ (gEq/ml)} = 25 \times \text{Quantité}$

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 gEq/ml, peuvent être calculées à partir de la plage de mesure linéaire de la réaction d'amplification selon la formule suivante :

$\text{Limite inférieure (gEq/ml)} = \frac{V_e \times 10 \text{ gEq}}{V_c \times V_a \times E_p}$

$\text{Limite supérieure (gEq/ml)} = \frac{V_e \times 1\,000\,000 \text{ gEq}}{V_c \times V_a \times E_p}$
--

En cas d'utilisation du système « ELITE STAR » avec des échantillons de sang total et de plasma prélevé sur EDTA, la formule est la suivante :

Limites de la plage de mesure (gEq/ml) avec le système « ELITE STAR »
$\text{Limite inférieure (gEq/ml)} = 28 \times 10 \text{ gEq}$
$\text{Limite supérieure (gEq/ml)} = 28 \times 1\,000\,000 \text{ gEq}$
de 280 à 28 000 000 gEq/ml

En cas d'utilisation du système « ELITE GALAXY » avec des échantillons de sang total et de plasma prélevé sur EDTA, la formule est la suivante :

Limites de la plage de mesure (gEq/ml) avec le système « ELITE GALAXY »
$\text{Limite inférieure (gEq/ml)} = 35 \times 10 \text{ gEq}$
$\text{Limite supérieure (gEq/ml)} = 35 \times 1\,000\,000 \text{ gEq}$
de 350 à 35 000 000 gEq/ml

En cas d'utilisation du système d'extraction « NucliSENS® easyMAG® » avec des échantillons

cellulaires, la formule est la suivante :

Limites de la plage de mesure (gEq/ml) avec le système « NucliSENS® easyMAG® »
$\text{Limite inférieure (gEq/ml)} = 50 \times 10 \text{ gEq}$
$\text{Limite supérieure (gEq/ml)} = 50 \times 1\,000\,000 \text{ gEq}$
de 500 à 50 000 000 gEq/ml

En cas d'utilisation du système d'extraction « NucliSENS® easyMAG® » avec des échantillons acellulaires, la formule est la suivante :

Limites de la plage de mesure (gEq/ml) avec le système « NucliSENS® easyMAG® »
$\text{Limite inférieure (gEq/ml)} = 10 \times 10 \text{ gEq}$
$\text{Limite supérieure (gEq/ml)} = 10 \times 1\,000\,000 \text{ gEq}$
de 100 à 10 000 000 gEq/ml

En cas d'utilisation du système d'extraction « QIASymphony® SP/AS » avec des échantillons cellulaires, la formule est la suivante :

Limites de la plage de mesure (gEq/ml) avec le système « QIASymphony® SP/AS »
$\text{Limite inférieure (gEq/ml)} = 23 \times 10 \text{ gEq}$
$\text{Limite supérieure (gEq/ml)} = 23 \times 1\,000\,000 \text{ gEq}$
de 230 à 23 000 000 gEq/ml

En cas d'utilisation du kit d'extraction « EXTRAblood » avec des échantillons cellulaires, la formule est la suivante :

Limites de la plage de mesure linéaire (gEq/ml) avec le kit « EXTRAblood »
$\text{Limite inférieure (gEq/ml)} = 25 \times 10 \text{ gEq}$
$\text{Limite supérieure (gEq/ml)} = 25 \times 1\,000\,000 \text{ gEq}$
de 250 à 25 000 000 gEq/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 les 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

HHV8 ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS038PLD

humain à un titre de 500 ng/20 µl. Cet échantillon a été testé 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 HHV8 comprises dans la plage de la concentration limite. Le panel a été préparé en diluant le produit « HHV8 Culture Fluid » (ZeptoMetrix Corporation) dans du sang total prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du HHV8. Les concentrations virales étaient comprises entre 10 gEq/ml et 560 gEq/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 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 gEq/ml, est indiquée ci-dessous.

Limite de détection pour des échantillons de sang total avec le système ELITe GALAXY (gEq/ml)			
Intervalle de confiance à 95 %			
		limite inférieure	limite supérieure
Positivité de 95 %	117 gEq/ml	72 gEq/ml	326 gEq/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 HHV8 comprises dans la plage de la concentration limite. Le panel a été préparé en diluant le produit « HHV8 Culture Fluid » (ZeptoMetrix Corporation) dans du plasma prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du HHV8. Les concentrations virales étaient comprises entre 10 gEq/ml et 560 gEq/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 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 gEq/ml, est indiquée ci-dessous.

Limite de détection pour des échantillons de plasma avec le système ELITe GALAXY (gEq/ml)			
Intervalle de confiance à 95 %			
		limite inférieure	limite supérieure
Positivité de 95 %	98 gEq/ml	58 gEq/ml	336 gEq/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 toutes les dilutions (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, en 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, en 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 (gEq/réaction)

HHV8 ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS038PLD

Limite supérieure	1 000 000 gEq/réaction
Limite inférieure	10 gEq/réaction

Les limites de la plage de mesure linéaire, exprimées en gEq/ml et en référence au kit d'extraction utilisé, sont calculées à la page 23.

Sensibilité analytique : Précision et exactitude

La précision du test, en tant que variabilité des résultats obtenus avec plusieurs réplicats d'un échantillon testé dans la même session d'amplification, a permis d'obtenir un pourcentage de coefficient de variation moyen (% CV) d'environ 24,5 % des quantités mesurées, dans la plage de 10⁶ molécules à 10¹ 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 dans la même session d'amplification et la concentration théorique de l'échantillon, a permis d'obtenir un pourcentage d'imprécision moyen (% Imprécision) d'environ 8,8 % des quantités mesurées, dans la plage de 10⁶ molécules à 10¹ 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 diagnostique : efficacité de détection et de quantification avec 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 de la protéine mineure de capsid du HHV8 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 HHV8.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant, à titre de matériel de référence, 19 échantillons de sang total prélevé sur EDTA qui étaient tous positifs pour l'ADN du HHV8 (testés avec un produit d'amplification en temps réel de DIV portant le marquage CE). Chaque échantillon a été testé 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 résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N°	positifs	négatifs
Sang total prélevé sur EDTA positif pour l'ADN du HHV8	19	18	1

Un échantillon a généré un résultat négatif avec les produits ELITechGroup S.p.A. Cette discordance peut s'expliquer par un très faible titre du HHV8, inférieur à la limite de détection de la méthode utilisée (250 gEq/ml).

Dans ce test, la sensibilité diagnostique de l'analyse était de 94,7 %.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant 30 échantillons de plasma prélevé sur EDTA négatifs pour l'ADN du HHV8, qui avaient été dopés avec l'ADN du HHV8 en ajoutant le matériel « HHV-8 Culture fluid sample » (ZeptoMetrix, États-Unis) et 30 échantillons de sang total prélevé sur EDTA négatifs pour l'ADN du HHV8, qui avaient été dopés avec l'ADN du HHV8 en ajoutant le matériel « HHV-8 Culture fluid sample » (ZeptoMetrix, États-Unis). 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.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

HHV8 ELiTe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS038PLD

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé sur EDTA dopé avec de l'ADN du HHV8	30	30	0
Plasma prélevé sur EDTA dopé avec de l'ADN du HHV8	30	30	0

Tous les échantillons dopés ont été correctement détectés comme positifs pour l'ADN du HHV8. Dans ce test, la sensibilité diagnostique de l'analyse était égale à 100 %.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant 31 échantillons de plasma prélevé sur EDTA négatifs pour l'ADN du HHV8, qui avaient été dopés avec l'ADN du HHV8 en ajoutant le matériel « HHV-8 Culture fluid sample » (ZeptoMetrix, États-Unis) et 30 échantillons de sang total prélevé sur EDTA négatifs pour l'ADN du HHV8, qui avaient été dopés avec l'ADN du HHV8 en ajoutant le matériel « HHV-8 Culture fluid sample » (ZeptoMetrix, États-Unis). Chaque échantillon a été utilisé en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction et le paramétrage de la PCR 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
Sang total prélevé sur EDTA dopé avec de l'ADN du HHV8	30	30	0
Plasma prélevé sur EDTA dopé avec de l'ADN du HHV8	31	30	0

Un échantillon de plasma a été exclu de l'étude en raison d'un résultat non valide lors de l'amplification. Ce résultat, confirmé par une seconde amplification, est probablement dû à la présence d'un inhibiteur.

30 échantillons de plasma étaient valides pour l'analyse et ont tous été confirmés comme positifs. Tous les échantillons de sang total dopés ont été correctement détectés comme positifs pour l'ADN du HHV8.

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 HHV8, y compris le génome complet de l'EBV, l'herpèsvirus humain le plus similaire au HHV8, 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 quelques échantillons cliniques négatifs pour l'ADN du HHV8 et positifs pour l'ADN d'autres agents pathogènes.

La spécificité analytique a été vérifiée en utilisant, à titre de matériel de référence, 20 échantillons de sang total prélevé sur EDTA, qui étaient négatifs pour l'ADN du HHV8 mais positifs pour l'ADN du BKV, de l'EBV, du HHV8 (testés avec des produits d'amplification de DIV portant le marquage CE). Chaque échantillon a été testé 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 résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N°	positifs	négatifs
Échantillons de sang total prélevé sur EDTA positifs pour l'ADN du BKV	4	0	4
Échantillons de sang total prélevé sur EDTA positifs pour l'ADN de l'EBV	7	0	7
Échantillons de sang total prélevé sur EDTA positifs pour l'ADN du HHV8	9	0	9

HHV8 ELiTe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS038PLD

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

Spécificité diagnostique : confirmation des échantillons négatifs

La spécificité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons cliniques négatifs, a été testée en analysant quelques échantillons cliniques de sang total prélevé sur EDTA qui étaient négatifs pour l'ADN du HHV8.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant, à titre de matériel de référence, 20 échantillons de sang total prélevé sur EDTA qui étaient tous négatifs pour l'ADN du HHV8 (testés avec un produit d'amplification en temps réel de DIV portant le marquage CE). Chaque échantillon a été testé 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 résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N°	positifs	négatifs
Sang total prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du HHV8	20	0	20

Dans ce test, la spécificité diagnostique de l'analyse était supérieure à 95 %.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant 30 échantillons de plasma prélevé sur EDTA qui étaient présumés négatifs pour l'ADN du HHV8 et 30 échantillons de sang total prélevé sur EDTA qui étaient présumés négatifs pour l'ADN du HHV8 (testés avec une méthode d'amplification en temps réel). 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.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du HHV8	30	0	27
Plasma prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du HHV8	30	0	30

Trois échantillons ont généré un résultat non valide.

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

HHV8 ELiTe MGB® Kit

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

REF RTS038PLD

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant 30 échantillons de plasma prélevé sur EDTA qui étaient présumés négatifs pour l'ADN du HHV8 et 30 échantillons de sang total prélevé sur EDTA qui étaient présumés négatifs pour l'ADN du HHV8 (testés avec une méthode d'amplification en temps réel). Chaque échantillon a été utilisé en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction et le paramétrage de la PCR 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
Plasma prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du HHV8	30	0	30
Sang total prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du HHV8	30	0	30

Tous les échantillons ont été correctement détectés comme négatifs pour l'ADN du HHV8. Dans ce test, la spécificité diagnostique de l'analyse était égale à 100 %.

N. B. : 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 dans la Fiche technique du produit « HHV8 ELiTe MGB® Kit », FTP RTS038PLD.

BIBLIOGRAPHIE

B. Bigoni et al (1996) *J Inf Dis* **173**: 542 - 549
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 : sang total prélevé sur EDTA, plasma prélevé sur EDTA et liquide céphalorachidien (LCR).

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 dextran, du Ficoll®, 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 l'ADN extrait des échantillons cliniques suivants : biopsies cutanées.

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 cliniques positifs pour le HHV8, 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

HHV8 ELiTe MGB® Kit

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

REF RTS038PLD

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.

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 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 HHV8 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 HHV8 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 HHV8.

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.

Comme avec tout autre dispositif médical de diagnostic, il existe un risque résiduel d'obtention de résultats non valides, faux positifs et faux négatifs avec ce produit. Ce risque résiduel ne peut pas être éliminé ni davantage réduit. Dans certains cas, comme en cas de diagnostic d'urgence, ce risque résiduel pourrait contribuer à prendre de mauvaises décisions, avec des effets potentiellement dangereux pour 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 d'analyse sur le système ELiTe InGenius et ELiTe BeGenius.	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.
--	---

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 les cônes entre les échantillons. Faire attention lors de la distribution des échantillons, des contrôles négatifs, des contrôles positifs ou 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 et ELITE BeGenius.	Vérifier la position du mélange réactionnel, du contrôle positif ou des étalons. Vérifier le volume du mélange réactionnel, du contrôle positif ou des étalons.
Erreur lors du réglage de l'instrument.	Vérifier les réglages de position des échantillons, des contrôles négatifs, des contrôles positifs ou 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.

ADN cible et du contrôle interne non détecté 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 les 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 d'analyse sur le système ELITE InGenius et ELITE BeGenius.	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.

Fluorescence de bruit de fond irrégulière ou élevée 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 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 avec une éventuelle mutation. L'ADN cible de l'échantillon doit être séquencé pour confirmer la mutation.

LÉGENDE DES SYMBOLES

Numéro de référence.



Limite supérieure de température.



Numéro de lot



Date de péremption (dernier jour du mois).



Dispositif médical de diagnostic *in vitro*.



Conforme aux exigences de la directive européenne 98\79\CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*.



Contenu suffisant pour « N » tests.



Attention, consulter le mode d'emploi.



Contenu.



Tenir à l'abri de la lumière du soleil.



Fabricant.

NOTE POUR L'ACQUÉREUR : LICENCE LIMITÉE

Ce produit contient des réactifs faisant l'objet d'une licence détenue par LTC.

Ce produit est commercialisé selon des accords de licence entre ELITechGroup S.p.A. et ses filiales et LTC. 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, LTC Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Téléphone : +1(760)603-7200. Fax : +1(760)602-6500. E-mail : outlicensing@LTC.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 par les brevets EP numéros 0819133, 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® » et le logo « ELITe MGB® » sont des marques déposées au sein de l'Union européenne.

ELITe InGenius® et ELITe BeGenius® sont des marques déposées de ELITechGroup.

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

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

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

HHV8 ELITE MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTS038PLD



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 HHV8 ELITE MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection and quantification of Herpes human virus 8 (HHV8)**. The assay is CE-IVD validated in combination with the instruments **ELITE InGenius®** and **ELITE BeGenius®**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
HHV8	minor capsid protein gene (ORF26)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525 (VIC)

C. Validated matrix

› **Whole blood** EDTA

› **Plasma** EDTA

D. Kit content

HHV8 Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



X 4

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

E. Material required not provided in the kit

- › **ELITE InGenius instrument:** INT030
- › **ELITE BeGenius instrument:** INT040
- › **ELITE InGenius SP200 Extraction Cartridge:** INT032SP200
- › **ELITE InGenius PCR Cassette:** INT035PCR
- › **ELITE InGenius SP200 Consumable Set:** INT032CS
- › **CPE - Internal Control:** CTCRCPE
- › **HHV8 ELITE Standard :** STD038PLD
- › **HHV8 - ELITE Positive Control :** CTR038PLD
- › **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 | cp/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 | | |
| › HHV8 Q-PCR Mix volume | 20 µL | | |

G. Performance

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	117 cp/mL	100% 30/30*	100% 32/32*
Plasma	98 cp/mL	100% 30/30*	100% 32/32*

*confirmed samples/ tested samples

Matrix	Linearity (copies/mL)
Whole Blood	117 – 1,000,000
Plasma	98 – 1,000,000

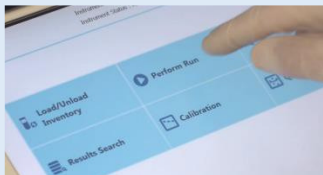
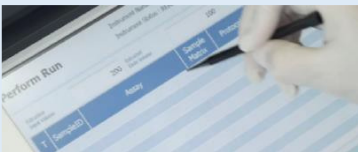

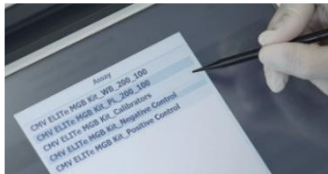
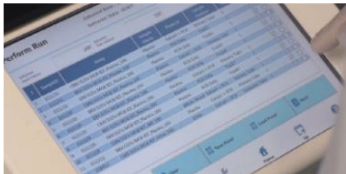




H. Procedures ELITE InGenius

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

<p>1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"</p>	<p>2. Verify calibrators: HHV8 Q-PCR standard in the "Calibration menu" Verify controls: HHV8 pos. and neg. controls in the "Control menu" <i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired</p>	<p>3. Thaw the HHV8 Q- PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec</p>
--	---	--

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

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

Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

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


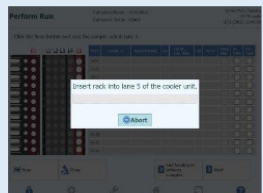
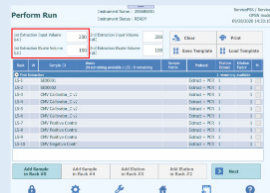
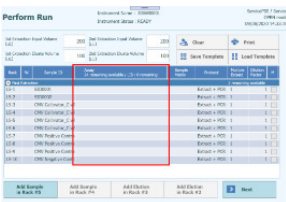
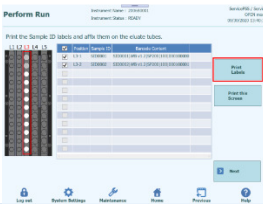




I. Procedures ELITE BeGenius

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: HHV8 Q-PCR standard in the "Calibration menu"
Verify controls: HHV8 pos. and neg. controls in the "Control menu"
NB: Both have been run, approved and not expired
3. Thaw the HHV8 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", Elute: "100 µL"

4. Select the "Assay protocol" of interest

5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area

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

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

8. Close the door. Start the run

9. View, approve and store the results


Procedure 2 - PCR only

1. Select "Perform Run" on the touch screen and the click on the run mode «PCR Only»
2. Load the extracted nucleic acid barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area
3. Select the "Assay protocol" of interest
4. Load the Q-PCR-Mix in Reagent Rack and insert it in the cooling area
Load filter tips and the PCR rack
5. Close the door.
Start the run
6. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

- 1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above
5. Select the protocol "Extraction Only" in the Assay Protocol selection screen.
6. Load the CPE Internal Control in the Elution Rack and insert it in the cooling area
7. Load : Filter Tips and the Extraction Rack
8. Close the door
Start the run
9. Archive the eluate sample

HHV8 ELITE MGB® Kit used with ABI PCR instrument



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 HHV8 ELITE MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection** and **quantification** of the DNA of **Herpes human virus 8 (HHV8)**.

The assay is CE-IVD validated in combination with **ABI PCR thermal cyclers** (Thermo-Fisher) and the following extraction systems: **ELITE STAR** (ELITechGroup), **ELITE GALAXY** (ELITechGroup), **easyMAG** (BioMérieux) or **QIASymphony** (Qiagen).

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
HHV8	minor capsid protein gene (ORF26)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525 (VIC)

C. Validated matrix

› Whole blood EDTA

› Plasma EDTA

› Cerebrospinal fluid

D. Kit content

HHV8 Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



X 4

- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 100
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- › 7500 Fast Dx and 7300 PCR Instrument
- › ELITE STAR: INTO10
- › ELITE STAR 200 extraction kit: INTO11EX
- › ELITE GALAXY: INTO20
- › ELITE GALAXY 300 extraction kit: INTO21EX

- › HHV8 ELITE Positive Control: CTR038PLD
- › HHV8 ELITE Standard: STD038PLD
- › CPE Internal Control: CTRCPE
- › easyMAG - Generic protocol 2.0.1
- › QIASymphony - DNA Mini kit or DSP Virus/Pathogen Midi kit
- › Molecular biology grade water

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
ELITE STAR - ABI	Whole Blood	–	100% (30/30)*	100% (27/30)*
	Plasma	–	100% (30/30)*	100% (30/30)*
ELITE GALAXY - ABI	Whole Blood	117 gEq/mL	100% (30/30)*	100% (30/30)*
	Plasma	98 gEq/mL	100% (30/30)*	100% (30/30)*

System	Linearity	Conversion factor cp/reaction to cp/mL
ELITE STAR - ABI	280 → 28 x 10 ⁶ (WB, PL)	28 (WB, PL)
ELITE GALAXY - ABI	350 → 35 x 10 ⁶ (WB, PL)	35 (WB, PL)
easyMAG - ABI	500 → 50 x 10 ⁶ (WB)	50 (WB)
QIASymphony - ABI	230 → 23 x 10 ⁶ (WB)	23 (WB)
	120 → 12 x 10 ⁶ (PL)	12 (PL)
EXTRAblood - ABI	250 → 25 x 10 ⁶ (WB)	25 (WB)

G. Procedure

The procedure below summarized the main steps of the sample analysis with conventional PCR workflow: validated extraction systems, PCR instrument settings, PCR set-up and result interpretation.

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
ELiTe Star	Whole Blood, Plasma	200 µL	700 µL	100 µL	200µL
ELiTe Galaxy	Whole Blood, Plasma	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL
EasyMAG	CSF	500 µL	-	100 µL	5 µL
EasyMAG	Whole Blood	100	-	50	
QIASymphony	Whole Blood,	200 µL	400 µL	95 µL	10 µL

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

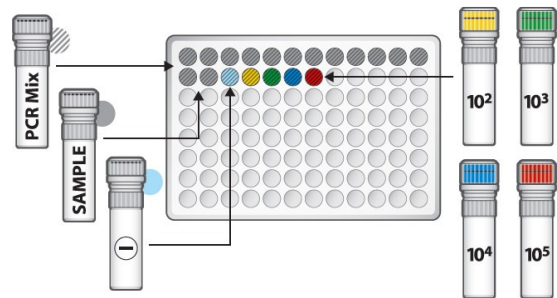
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "HHV8" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profil as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridization step at 60°C

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

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

Amplification - PCR Set -up

1. Thaw HHV8 Q PCR-Mix and Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet **20 µL** of Q-PCR-Mix in all microplate wells in use
4. Add, **20 µL** of extracted DNA in sample wells, **20 µL** of molecular grade water in Negative Control well, and **20µL** of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells, if quantitative, **20 µL** of the Positive Control, if qualitative. Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification - Threshold for qualitative analysis

Instrument	HHV8 FAM	Internal Control VIC
7500 Fast Dx Real Time PCR	0.2	0.1
7300 Real Time PCR	0.1	0.05

Interpretation - Qualitative results

HHV8 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 HHV8 ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction.

The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ gEq/reaction.

