



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 18/06/19

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«TOXOPLASMA g. ELITe MGB[®] Kit» Ref. RTST01PLD

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

- *Extension of use in association with ELITe InGenius[®] instrument.*

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

PLEASE NOTE



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



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



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



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



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



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

TOXOPLASMA g. ELITE MGB® Kit

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

REF RTST01PLD



TABLE DES MATIÈRES

APPLICATION	Page 1
PRINCIPE DU TEST	Page 2
DESCRIPTION DU PRODUIT	Page 3
MATÉRIEL FOURNI	Page 3
MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI	Page 3
AUTRES PRODUITS REQUIS	Page 3
AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS	Page 4
ELITE INGENIUS®	Page 6
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	Page 6
PROCÉDURE	Page 7
CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES	Page 14
OTHER SYSTEMS	Page 17
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	Page 17
PROCÉDURE	Page 18
CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES	Page 23
BIBLIOGRAPHIE	Page 30
LIMITES DE LA PROCÉDURE	Page 31
PROBLÈMES ET SOLUTIONS	Page 32
LÉGENDE DES SYMBOLES	Page 34
NOTE POUR L'ACQUEREUR: LICENCE LIMITEE	Page 35

APPLICATION

Le produit «TOXOPLASMA g. ELITE MGB® Kit» est un test qualitatif d'amplification des acides nucléiques pour la détection de l'ADN de *Toxoplasma gondii* à partir d'ADN extraits de sang total prélevé dans un tube EDTA, de liquide amniotique et de liquide céphalorachidien (CSF).

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

TOXOPLASMA g. ELITE MGB® Kit

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

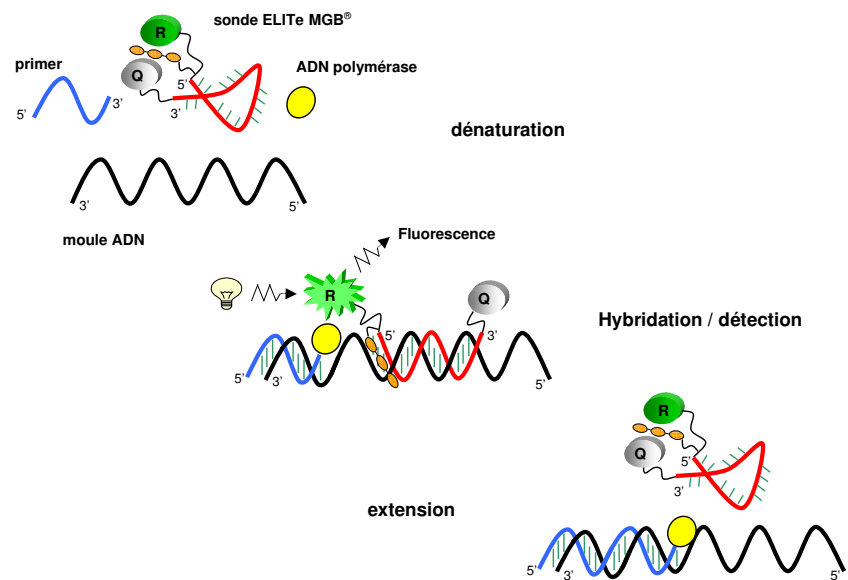
REF RTST01PLD

PRINCIPE DU TEST

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

Dans chaque puits deux réactions d'amplification sont réalisées à partir de l'ADN extrait des échantillons à étudier: une réaction spécifique à la région du gène **RE** de *Toxoplasma gondii* (répétées de 200 à 300 fois dans le génome) et une spécifique pour une séquence d'ADN artificielle (IC-ADN, l'ADN du contrôle interne cible) en utilisant l'ADN extrait à partir des échantillons en cours d'examen. Toutes les sondes sont fabriquées avec la technologie ELITE MGB®. La sonde spécifique à *Toxoplasma gondii* est marquée avec le fluorophore FAM et elle est activée lorsqu'elle s'hybride avec le produit spécifique de la réaction d'amplification de *Toxoplasma gondii*. La sonde spécifique au Contrôle Interne est marquée avec le fluorophore AP525 (un analogue à VIC) et elle est activée lorsqu'elle s'hybride avec le produit de la réaction d'amplification du Contrôle Interne. L'émission de la fluorescence augmente au fur et à mesure qu'augmentent les produits spécifiques de la réaction d'amplification et elle est mesurée et enregistrée par l'instrument. Le traitement des données permet de détecter la présence de *Toxoplasma gondii* contenue dans l'échantillon initial.

Le test a été validé sur les systèmes présentés sur ce manuel d'instruction.
 La figure ci-dessous synthétise le mécanisme d'activation et d'émission de la fluorescence de la sonde fabriquée avec la technologie ELITE MGB®. La sonde n'est pas hydrolysée pendant le cycle d'amplification et elle peut donc être utilisée pour l'analyse de la courbe de dissociation.



DESCRIPTION DU PRODUIT

Le produit «**TOXOPLASMA g. ELiTe MGB® Kit**» contient le mélange «**TOXO Q - PCR Mix**» pour l'amplification en temps réel. Ce mélange est complet, **prêt à l'emploi**, stabilisé dans une solution stabilisante et **pré-aliquotée en quatre tubes**. Chaque tube contient **540 µL** de solution, une quantité suffisante pour **25 tests**.

Les amorces et la sonde pour *Toxoplasma gondii* (stabilisée par le groupe MGB®, marquée avec le fluorophore FAM et inactivée par le quencher non fluorescent) sont spécifiques de la région **RE** de *Toxoplasma gondii*.

Les amorces et la sonde pour le contrôle interne (stabilisée par le groupe MGB®, marquée avec le fluorophore AP525, un analogue à VIC et inactivée par un quencher non fluorescent) sont spécifiques pour la séquence d'ADN artificielle.

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

Le produit permet d'effectuer **96 tests associé au système ELiTe InGenius**, en incluant les standards et les contrôles

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

MATÉRIEL FOURNI

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

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

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

AUTRES PRODUITS REQUIS

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

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

Pour l'extraction automatique de l'ADN des échantillons à analyser, avec l'automate «**ELiTe InGenius**» (ELiTechGroup S.p.A., code INT030), il est conseillé d'utiliser les produits génériques suivants: cartouches d'extraction «**ELiTe InGenius® SP 200**» (ELiTechGroup S.p.A., code INT032SP200) et consommables pour extraction et amplification à partir d'échantillons biologiques «**ELiTe InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELiTechGroup S.p.A., code INT032CS) «**ELiTe InGenius® Waste Box**» (ELiTechGroup S.p.A., code F2102-000), «**ELiTe InGenius® PCR Cassette**» (ELiTechGroup S.p.A., code INT035PCR) et «**300 µL Filter Tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, USA, code TF-350-L-R-S).

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

- pour le Contrôle Positif d'amplification «**TOXO ELiTe_PC**»,
- pour le Contrôle Négatif d'amplification «**TOXO ELiTe_NC**»,
- pour les échantillons à analyser «**TOXO ELiTe_WB_200_100**», «**TOXO ELiTe_AF_200_100**» e «**TOXO ELiTe_CSF_200_100**».

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

Comme contrôle positif d'extraction d'acides nucléiques d'échantillons non-cellulaires et contrôle d'inhibition, il est nécessaire d'utiliser le produit générique «**CPE - Internal Control**» (ELiTechGroup S.p.A., code CTRCPE), une solution stabilisée contenant deux ADN plasmidique et l'ARN génomique du phage MS2.

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

Avec un instrument 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, il est conseillé d'utiliser le produit générique «**Q - PCR Microplates Fast**» (ELiTechGroup S.p.A., code RTSACC02) contenant des microplaques de 0,1 mL et des film adhésifs, pour l'amplification en temps réel.

Comme contrôle positif d'ADN plasmidique il est requis d'utiliser le produit principal «**TOXOPLASMA g. RE - ELiTe Positive Control**» (ELiTechGroup S.p.A., code CTRT01PLD).

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

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

Avertissements et précautions

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

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

Porter des vêtements de protection et des gants et protéger les yeux et le visage.
Ne jamais pipeter les solutions à la bouche.
Ne pas manger, boire, fumer ou se maquiller dans l'environnement de travail.
Se laver parfaitement les mains après avoir manipulé les échantillons et les réactifs.
Éliminer les réactifs en surplus et les déchets en respectant les réglementations en vigueur.
Lire attentivement toutes les instructions fournies dans le produit avant de procéder au test.
Respecter scrupuleusement les consignes fournies dans le produit pendant l'exécution du test.
Respecter la date de péremption du produit.
N'utiliser que les réactifs présents dans le produit et ceux conseillés par le producteur.
Ne pas utiliser des réactifs provenant de lots différents.
Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants.

Avertissements et précautions à adopter en biologie moléculaire

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

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

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

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

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

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

Avertissements et précautions concernant les composants

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

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

ELiTe InGenius®

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES

Échantillons

Ce produit doit être utilisé avec les échantillons cliniques suivants :

Sang total prélevé dans un tube EDTA

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

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

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN à partir de sang total avec **ELiTe InGenius** et avec **ELiTe InGenius® Software version 1.3** (ou version suivante équivalent) suivre le protocole d'extraction **TOXO ELiTe_WB_200_100**. Ce protocole utilise 200 µL d'échantillon, avec ajout de **CPE** avec 10 µL / extraction et élution des acides nucléiques dans 100 µL d'eau.

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

Liquide amniotique

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

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

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN à partir de liquide amniotique avec **ELiTe InGenius** et **ELiTe InGenius Software version 1.3** (ou version suivante), suivre le protocole d'extraction **TOXO ELiTe_AF_200_100**. Ce protocole utilise 200 µL d'échantillon, en présence de **CPE** à 10 µL / extraction et élution des acides nucléiques dans 100 µL.

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

Liquide céphalorachidien (CSF)

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

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

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN à partir de liquide céphalorachidien (CSF) avec **ELiTe InGenius** et **ELiTe InGenius Software version 1.3** (ou version suivante), suivre le protocole d'extraction **TOXO ELiTe_CSF_200_100**. Ce protocole utilise 200 µL d'échantillon, en présence de **CPE** à 10 µL / extraction et élution des acides nucléiques dans 100 µL.

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

Substances interférentes

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

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

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

Contrôles d'amplification

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

- comme Contrôle Positif, utiliser le produit «**TOXOPLASMA g. RE - ELITE Positive Control**», en association avec le protocole **TOXO ELITE_PC**,
- comme Contrôle Négatif, utiliser de l'eau ultra pure pour la biologie (non incluse dans le produit), en association avec le protocole «**TOXO ELITE_NC**».

Remarque: le système **ELITE InGenius** nécessite la présence de résultats de contrôle d'amplification approuvés et valides pour chaque lot de réactif d'amplification stocké dans sa base de données.

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

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

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

PROCÉDURE

La procédure d'utilisation du produit « **TOXOPLASMA g. ELITE MGB® Kit** » avec le système **ELITE InGenius** se déroule en trois étapes :

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

Vérification du système

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

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

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

Protocole du test pour le kit TOXOPLASMA g. ELITE MGB® Kit			
Nom	Matrice	Unité	Caractéristiques
TOXO ELITE_WB_200_100	Sang total	gEq/mL or UI/mL	Volume d'extraction initial: 200 µL Volume de l'éluat: 100 µL Contrôle interne: 10 µL Sonication: NO Facteur de dilution: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume d'éluat utilisé pour la PCR: 20 µL
TOXO ELITE_AF_200_100	Liquide amniotique	gEq/mL or UI/mL	Volume d'extraction initial: 200 µL Volume de l'éluat: 100 µL Contrôle interne: 10 µL Sonication: NO Facteur de dilution: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume d'éluat utilisé pour la PCR: 20 µL
TOXO ELITE_CSF_200_100	Liquide céphalorachidien	gEq/mL or UI/mL	Volume d'extraction initial: 200 µL Volume de l'éluat: 100 µL Contrôle interne: 10 µL Sonication: NO Facteur de dilution: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume d'éluat utilisé pour la PCR: 20 µL

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

Les protocoles d'analyse qualitative sont disponibles sur demande.

Configuration de l'étape

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

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

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

Remarque: le système ELITE InGenius peut être relié au «serveur d'informations de Laboratoire» (LIS) grâce auquel vous pouvez envoyer les informations de réglage de session. Pour plus de détails, reportez-vous au mode d'emploi de l'instrument.

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

A Cycle complet

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

1. Décongeler une quantité de tubes de TOXO Q - PCR Mix suffisante pour le cycle. Chaque tube permet la préparation de 24 réactions dans des conditions optimales de consommation de réactif. Mélanger délicatement le contenu et centrifuger pendant 5 secondes.
2. Décongeler une quantité de tubes de CPE suffisante pour le cycle. Chaque tube permet la préparation de 12 extractions. Mélanger délicatement le contenu et centrifuger pendant 5 secondes.
3. Sélectionner "Perform Run" dans la page d'accueil.
4. Vérifier que le volume d'extraction initial est de 200 µL pour traiter 200 µL d'échantillon ou 1000 µL pour traiter 1000 µL d'échantillon et le volume de l'éluat extrait de 100 µL.
5. Pour chaque trace à réaliser, renseigner le "SampleID" (SID) en saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.
6. Sélectionner le protocole du test à utiliser dans la colonne "Assay" (par exemple TOXO ELITe_WB_200_100).
7. Vérifier que le Protocole affiché soit: "Extract + PCR".
8. Sélectionner la position de chargement de l'échantillon dans la colonne "Sample Position":
en cas d'utilisation d'un tube primaire, sélectionner "Primary Tube"; le tube primaire ne peut être utilisé qu'à partir de 200 µL d'échantillon;
en cas d'utilisation d'un tube secondaire, sélectionner "Sonication Tube". Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
9. Charger le CPE et le TOXO Q - PCR Mix dans le gestionnaire des réactifs sélectionné en suivant les instructions de l'interface graphique. Si nécessaire, se reporter au Manuel d'Utilisation de l'automate pour configurer le gestionnaire des réactifs. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
10. Charger / contrôler les racks d'embouts dans la zone sélectionnée en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
11. Charger les échantillons à extraire dans la position indiquée au point 8, ainsi que les cartouches d'extraction et les cassettes de PCR outre tous les consommables, en suivant les instructions GUI. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
12. Fermer le volet de l'automate.
13. Appuyer sur "Start" pour lancer la course.

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

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

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

Remarque: Les mélanges PCR peuvent être stockés dans le bloc réfrigéré pour un maximum de 5 séances de travail de 3 heures.

B Cycle d'amplification

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

1. Décongeler une quantité de tubes de TOXO Q - PCR Mix suffisante pour réaliser le cycle. Chaque tube permet la préparation de 24 réactions dans des conditions optimales de consommation de réactif. Mélanger délicatement le contenu et centrifuger pendant 5 secondes.
2. Sélectionner "Perform Run" dans la page d'accueil.
3. Vérifier que le volume d'extraction initial soit de 200 µL pour traiter 200 µL d'échantillon ou 1000 µL pour traiter 1000 µL d'échantillon et le volume de l'éluat extrait de 100 µL.
4. Pour chaque trace à réaliser, renseigner le "SampleID" (SID) en saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.
5. Sélectionner le protocole du test à utiliser dans la colonne "Assay" (par exemple TOXO ELITe_WB_200_100).
6. Sélectionner "PCR only" dans la colonne "Protocol".
7. Contrôler que la position de chargement de l'échantillon élué dans la colonne "Sample Position" soit "Extra Tube" (position 1)". Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
8. Charger le TOXO Q - PCR Mix dans le gestionnaire de réactifs sélectionné en suivant les instructions GUI. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
9. Charger / contrôler les racks des embouts dans la zone sélectionnée en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
10. Charger les échantillons des acides nucléiques extraits et la cassette PCR, en suivant les instructions GUI. Si nécessaire, se reporter au Manuel de l'Opérateur de l'automate pour configurer le gestionnaire des réactifs. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
11. Fermer la porte de l'automate.
12. Appuyer sur "Start" pour lancer la course.

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

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

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

Remarque: Les mélanges PCR peuvent être stockés dans le bloc réfrigéré pour un maximum de 5 séances de travail de 3 heures.

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

Pour configurer le cycle d'amplification du contrôle positif et du contrôle négatif, suivre les indications ci-après :

1. Décongeler une quantité de tubes de TOXO Q - PCR Mix suffisante pour le cycle. Chaque tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions optimales de consommation de réactif. Mélanger délicatement le contenu et centrifuger pendant 5 secondes.

Remarque: décongeler les tubes contenant TOXO Q - PCR Mix à l'abri de la lumière car les réactifs sont photosensibles.

2. Décongeler le produit TOXO RE - Positive Control pour l'amplification du Contrôle Positif. Décongeler un tube à température ambiante. Chaque tube permet la préparation de 4 cycles. Mélanger délicatement le contenu et centrifuger pendant 5 secondes.
3. Transférer au moins 50 µL d'eau ultra pure nécessaire aux étapes dans un tube d'éluion fourni avec ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
4. Sélectionner "Perform Run" dans la page d'accueil.
5. Bien que l'étape d'extraction n'est pas nécessaire, vérifier que le volume d'entrée de l'extraction (« Extraction Input Volume ») est de 200 µL et que le volume d'éluion extrait (« Extracted Elute Volume ») est de 100 µL.
6. Dans la trace d'intérêt, sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne Essai (« Assay »).
7. Sélectionner TOXO ELITe_PC pour le contrôle positif et indiquer le numéro de lot et la date d'expiration pour - Positive Control (Contrôle positif),
8. Sélectionner TOXO ELITe_NC et indiquer le numéro de lot et la date d'expiration pour le Contrôle négatif.
9. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
10. Charger le TOXO Q - PCR Mix Mix dans le gestionnaire des réactifs sélectionné en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
11. Charger / contrôler les racks d'embouts dans la zone sélectionnée en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
12. Charger la cassette PCR, le Contrôle Positif et le Contrôle Négatif en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
13. Fermer la porte de l'automate.
14. Appuyer sur "Start" pour lancer le cycle.

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

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

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

Remarque: Les mélanges PCR peuvent être stockés dans le bloc réfrigéré pour un maximum de 5 séances de travail de 3 heures.

Évaluation et approbation des résultats

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

Remarque : le système ELITe InGenius peut être connecté au "Laboratory Information System" (LIS) à travers lequel il est possible d'envoyer automatiquement les résultats approuvés de la session de travail au centre de traitement des données du laboratoire. Pour des informations détaillées, reportez-vous au manuel d'instructions de l'instrument.

ELITe InGenius génère les résultats avec le kit «TOXOPLASMA g. ELITe MGB® Kit», en suivant cette procédure :

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

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

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

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

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

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

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

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

B. Validation des résultats de l'échantillon

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

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

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

1) Contrôles Positif	Statut
TOXO RE - Positive Control	APPROVED
2) Contrôles Négatif	Statut
TOXO RE Negative Control	APPROVED

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

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

Résultat du cycle de l'échantillon	Interprétation
TOXO: DNA Detected	ADN du <i>Toxoplasma gondii</i> détecté
TOXO: DNA Not Detected or below LoD	ADN du <i>Toxoplasma gondii</i> n'a pas été détectée ou est inférieure à la limite de détection dans le test.
Invalid - Retest Sample	Résultat du test non valide suite à une erreur du contrôle interne

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Sensibilité analytique : limite de détection (LoD)

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 10 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 de 10 copies/10 µl avec un IC-ADN à un titre de 20 000 copies/10 µl. Cet échantillon a été testé en 18 réplicats 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.

Echantillons	N	Positifs	Négatifs
10 copies d'ADN plasmidique + 20 000 copies de IC-ADN	18	18	0

La sensibilité analytique de ce test (LoD) a été calculée en testant un panel d'échantillons de sang total, de liquide amniotique ou de LCR dopés avec un matériel d'échantillon de référence « *Toxoplasma gondii* (RH) » (Qnostics Ltd, Scotland, Royaume-Uni) dont le titre était connu. Six niveaux de dilution ont été préparés, en commençant à une concentration plus élevée que la valeur de LoD attendue. Chaque niveau de dilution a été traité en 12 réplicats sur le système ELITE InGenius en mode «Extraction + PCR» (Extract + PCR). La valeur de LoD a été obtenue comme la concentration correspondant à une probabilité de résultat positif de 95 % par une analyse de régression des probits des données. La valeur de LoD revendiquée a été vérifiée en testant le taux de positivité de 20 échantillons dopés à cette concentration.

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant.

Limite de détection (organismes/ml) avec le système ELITE InGenius			
Matrice	LoD	Intervalle de confiance à 95 %	
		limite inférieure	limite inférieure
Sang total	11	8,1	17,3
Liquide amniotique	5	3,7	7,1
LCR	7	6,2	9,0

Sensibilité analytique : reproductibilité avec un matériel de référence certifié

La sensibilité analytique du test, en tant que reproductibilité de la valeur d'un matériel de référence étalonné, a été évaluée en utilisant, à titre de matériel de référence, le panel « QCMD 2015 *Toxoplasma gondii* DNA Panel » (Qnostics Ltd, Royaume-Uni), un panel de dilutions de *Toxoplasma gondii*. Chaque échantillon du panel a été testé en 2 réplicats en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction, l'amplification, la détection et l'interprétation des résultats, à l'aide du système «**ELITE InGenius**» et des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tests avec du matériel de référence étalonné et le système ELiTe InGenius				
Échantillon	Matrice	Statut de l'échantillon	Positifs/ Réplicats	Ct moyen
TGDNA15-01	Liquide amniotique	Détecté	2/2	34,04
TGDNA15-02	Liquide amniotique	Fréquemment détecté	2/2	35,16
TGDNA15-03	Liquide amniotique	Fréquemment détecté	2/2	34,63
TGDNA15-04	Liquide amniotique	Négatif	0/2	n.a.
TGDNA15-05	Liquide amniotique	Fréquemment détecté	2/2	32,66
TGDNA15-06	Plasma	Négatif	0/2	n.a.
TGDNA15-07	Plasma	Fréquemment détecté	2/2	32,90
TGDNA15-08	Plasma	Détecté	2/2	33,46
TGDNA15-09	Plasma	Fréquemment détecté	2/2	31,41
TGDNA15-10	Plasma	Négatif	0/2	n.a.

Tous les échantillons ont été détectés correctement.

Sensibilité diagnostique : confirmation des échantillons positifs

La sensibilité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons cliniques positifs, a été évaluée en analysant quelques échantillons cliniques de sang total prélevés sur EDTA, de liquide amniotique et de liquide céphalorachidien, qui étaient positifs ou ont été dopés avec l'ADN de *Toxoplasma gondii*.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant :

- 11 échantillons de sang total prélevés sur EDTA qui étaient positifs pour l'ADN de *Toxoplasma gondii* et 49 échantillons de sang total prélevés sur EDTA qui étaient négatifs pour l'ADN de *Toxoplasma gondii*, qui ont été dopés avec l'ADN de *Toxoplasma gondii* en ajoutant un matériel de référence (Qnostics Ltd, Royaume-Uni) à un titre de 3 x la LoD ;
- 51 échantillons de liquide amniotique qui étaient positifs pour l'ADN de *Toxoplasma gondii* ;
- 7 échantillons de LCR qui étaient positifs pour l'ADN de *Toxoplasma gondii* et 14 échantillons de LCR qui étaient négatifs pour l'ADN de *Toxoplasma gondii*, qui ont été dopés avec l'ADN de *Toxoplasma gondii* en ajoutant un matériel de référence (Qnostics Ltd, Royaume-Uni) à un titre de 3 x la LoD ;

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 présentés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	Positifs	Négatifs
Sang total prélevé sur EDTA positif ou dopé avec l'ADN de <i>Toxoplasma gondii</i>	59	57	2
Liquide amniotique positif pour l'ADN de <i>Toxoplasma gondii</i>	51	50	1
Liquide céphalorachidien positif ou dopé avec l'ADN de <i>Toxoplasma gondii</i>	21	21	0

57 échantillons de sang total sur 59 se sont avérés être positifs pour *Toxoplasma gondii* et deux échantillons se sont avérés être négatifs discordants et valides. Dans ce test, la sensibilité diagnostique de l'analyse était égale à 96,6 %.

50 échantillons de liquide amniotique sur 51 se sont avérés être positifs pour *Toxoplasma gondii* et un échantillon s'est avéré être négatif discordant et valide. Dans ce test, la sensibilité diagnostique de l'analyse était égale à 98 %.

21 échantillons de LCR sur 21 se sont avérés être positifs pour *Toxoplasma gondii*. Dans ce test, la sensibilité diagnostique de l'analyse était égale à 100 %.

Dans ces tests, la sensibilité diagnostique totale de l'analyse était égale à 97,7 %.

Spécificité diagnostique : confirmation des échantillons négatifs

La spécificité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons négatifs, a été évaluée en analysant quelques échantillons cliniques de sang total prélevés sur EDTA, de liquide amniotique et de liquide céphalorachidien, qui étaient négatifs pour l'ADN de *Toxoplasma gondii*.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant 58 échantillons de sang total prélevé sur EDTA, 66 échantillons de liquide amniotique et 20 échantillons de liquide céphalorachidien qui étaient négatifs pour l'ADN de *Toxoplasma gondii*.

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 présentés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	Positifs	Négatifs
Sang total prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN de TOXOPLASMA g.	58	1	57
Liquide amniotique négatif pour l'ADN de TOXOPLASMA g.	66	0	66
Liquide céphalorachidien négatif pour l'ADN de TOXOPLASMA g.	20	0	20

57 échantillons de sang total sur 59 se sont avérés être négatifs pour *Toxoplasma gondii* et un échantillon s'est avéré être positif discordant. Dans ce test, la spécificité diagnostique de l'analyse était égale à 98 %.

Tous les échantillons de liquide amniotique et de liquide céphalorachidien étaient valides et négatifs. Dans ces tests, la spécificité diagnostique de l'analyse était égale à 100 %.

Dans ce test, la spécificité diagnostique totale de l'analyse était égale à 99,3 %.

Robustesse : résultats d'échantillons cliniques non valides

La robustesse du test, en tant qu'évaluation du pourcentage de résultats non valides obtenus lors de la première analyse des échantillons cliniques, a été vérifiée à partir des résultats des études de sensibilité et de spécificité diagnostiques obtenus sur différentes matrices.

Les résultats non valides obtenus pendant l'analyse des échantillons cliniques négatifs et positifs pour l'ADN de *Toxoplasma gondii* analysés avec le système ELiTe InGenius et les produits ELiTechGroup S.p.A. ont été comptabilisés.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	Non valides	%
Sang total prélevé sur EDTA	117	3	2,56
Liquide amniotique	117	0	0
Liquide céphalorachidien	41	0	0

OTHER SYSTEMS

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES

Échantillons

Ce produit doit être utilisé avec l'ADN extrait à partir de sang total prélevé dans un tube EDTA ou de liquide amniotique.

Sang total prélevé dans un tube EDTA

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

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

Remarque : lors de l'extraction de l'ADN à partir de sang total (échantillon cellulaire) avec le kit «EXTRAblood», suivre les indications fournies dans la Notice d'instructions et d'utilisation: partir d'un échantillon de **200 µL**, comme contrôle interne ajouter au début de l'extraction **5 µL** de **CPE**, éluer l'ADN dans **100 µL** de tampon d'élution.

Remarque : lors de l'extraction d'ADN avec l'instrument «NucliSENS® easyMAG®», suivre le protocole d'extraction Generic 2.0.1 et les indications ci-dessous : distribuer **100 µL** d'échantillon dans la bande de 8 puits, charger la bande sur l'instrument et lancer l'extraction sans incubation pour la lyse; après ajout de NucliSENS® EasyMAG® Lysis Buffer par l'instrument, mélanger trois fois le contenu de la bande, directement sur l'instrument, en utilisant la pipette multicanaux fournie. Utiliser le programme 3, laisser incubé pendant 10 minutes puis, à l'aide de la pipette multicanaux, comme contrôle interne ajouter au début de l'extraction **5 µL** de **CPE** et le NucliSENS® EasyMAG® Magnetic Silica au contenu de la bande, et suivre le programme 3; poursuivre avec l'extraction, récupérer l'ADN avec **50 µL** de tampon d'élution.

Liquide amniotique

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

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

Remarque : lors de l'extraction de l'ADN à partir de sang total (échantillon non cellulaire) avec le kit «EXTRAblood», suivre les indications fournies dans la Notice d'instructions et d'utilisation: partir d'un échantillon de **200 µL**, comme contrôle interne ajouter au début de l'extraction **5 µL** de **CPE**, éluer l'ADN dans **60 µL** de tampon d'élution.

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

Substances interférentes

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

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

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

Contrôles d'amplification

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

Pour le contrôle négatif, remplacer l'ADN extrait par de l'eau bi-distillée stérile (non incluse dans le produit).

Pour le contrôle positif, utiliser le produit «TOXOPLASMA g. RE - ELiTe Positive Control».

Contrôles de la qualité

Il est conseillé de valider l'ensemble de la procédure d'analyse, de l'extraction à l'amplification, en utilisant un échantillon négatif et un échantillon positif déjà testés ou du matériel de référence calibré.

PROCÉDURE

Mise en place de l'amplification en temps réel

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

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

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

- allumer le thermocycleur pour amplification en temps réel, allumer l'ordinateur, lancer le logiciel dédié et ouvrir une étape de quantification absolue;
- paramétrer (Detecteur Manager) le "détecteur" pour la sonde pour *Toxoplasma gondii* avec le "reporter" = "FAM" et le "quencher" = "none" (non fluorescent) et l'appeler "TOXO";
- paramétrer (Detecteur Manager) le "détecteur" pour la sonde du contrôle interne avec le "reporter" = "VIC" (AP525 est un analogue à VIC) et le "quencher" = "none" (non fluorescent) et l'appeler "CI";
- pour chaque puits utilisé, paramétrer (Well Inspector) les "détecteurs" (type de fluorescence à mesurer), la "référence passive" = "ROX" (AP593 est utilisé en remplacement du ROX, normalisation de la fluorescence mesurée) et le type de réaction (échantillon, contrôle négatif d'amplification, contrôle positif d'amplification ou standard en indiquant le titre). Reporte ces informations dans la **Grille de travail** annexée à cette notice d'instructions et d'utilisation ou imprimer l'organisation de la microplaque. La **Grille de travail** doit être suivie scrupuleusement pendant le transfert du mélange de réaction et des échantillons dans les puits.

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

C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
CN	CP										

Légende: C1 - C12: Échantillons à analyser; CN: Contrôle négatif d'amplification; CP: Contrôle positif d'amplification.

A l'aide de la documentation de l'instrument, configurer sur le logiciel dédié (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile) les paramètres du **cycle de température** :

- Ajouter à la phase d'amplification l'étape (Add Step) **d'extension à 72°C**;

Remarque : l'acquisition de la fluorescence (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection) doit être paramétrée lors de l'étape d'hybridation à 60°C.

- modifier les temps selon les valeurs fournies dans le tableau suivant "**Cycle de température**";
- paramétrer **45 cycles**;
- paramétrer un volume de réaction de **30 µL** pour la simulation logicielle du transfert thermique à la réaction ("Sample volume").

Cycle de température		
Phase	Températures	Temps
Décontamination	50° C	2 min.
Dénaturation initiale	94° C	2 min.
Amplification et détection (45 cycles)	94° C	10 sec.
	60° C (acquisition de la fluorescence)	30 sec.
	72° C	20 sec.

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

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

- allumer le thermocycleur pour amplification en temps réel, allumer l'ordinateur, lancer le logiciel dédié, ouvrir une étape de quantification absolue et paramétrer "Run mode: Fast 7500";
- paramétrer (Detecteur Manager) le "détecteur" pour la sonde de *Toxoplasma gondii* avec le "reporter" = "FAM" et le "quencher" = "none" (non fluorescent) et l'appeler "TOXO";
- paramétrer (Detecteur Manager) le "détecteur" pour la sonde du contrôle interne avec le "reporter" = "VIC" (AP525 est un analogue à VIC) et le "quencher" = "none" (non fluorescent) et l'appeler "CI";
- pour chaque puits utilisé, paramétrer (Well Inspector) les "détecteurs" (type de fluorescence à mesurer), la "référence passive" = "Cy5" (AP593 est utilisé en remplacement du Cy5, normalisation de la fluorescence mesurée) et le type de réaction (échantillon, contrôle négatif d'amplification, contrôle positif d'amplification ou standard en indiquant le titre). Reporter ces informations dans la **Grille de travail** annexée à cette notice d'instructions et d'utilisation ou imprimer l'organisation de la microplaque. La **Grille de travail** doit être suivie scrupuleusement pendant le transfert du mélange de réaction et des échantillons dans les puits.

Le modèle d'organisation d'une analyse qualitative de 12 échantillons est illustré à titre d'exemple dans la section précédente concernant la procédure relative à l'instrument **7300 Real Time PCR System**.

A l'aide de la documentation de l'instrument, configurer sur le logiciel dédié (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile) les paramètres du **cycle de température**:

- Ajouter à la phase d'amplification l'étape (Add Step) **d'extension à 72°C**;

Remarque : l'acquisition de la fluorescence (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection) doit être paramétrée lors de l'étape d'hybridation à 60°C.

- modifier les temps selon les valeurs fournies dans le tableau suivant "Cycle de température";
- paramétrer **45 cycles**;
- paramétrer un volume de réaction de **30 µL** pour la simulation logicielle du transfert thermique à la réaction ("Sample volume").

Cycle de température		
Phase	Températures	Temps
Décontamination	50° C	2 min.
Dénaturation initiale	94° C	2 min.
Amplification et détection (45 cycles)	94° C	10 sec.
	60° C (acquisition de la fluorescence)	30 sec.
	72° C	20 sec.

Préparation de l'amplification

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

Avant de commencer, il faut:

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

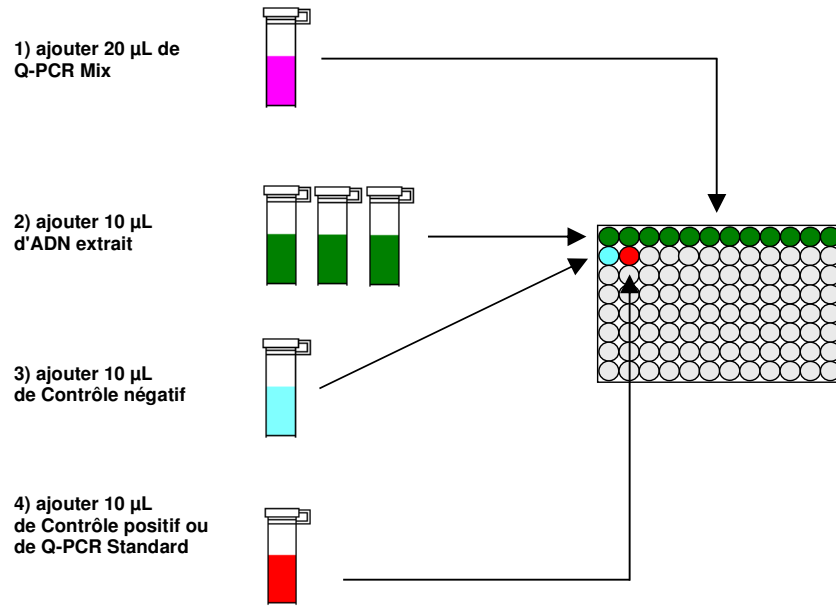
1. Déposer délicatement et sans faire de bulles, **20 µL** du mélange de réaction «**TOXO Q - PCR Mix**», dans le fond de l'**Amplification microplate** en suivant l'organisation définie précédemment dans la Grille de travail.

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

2. Conformément à la **Grille de travail** transférer délicatement **10 µL d'ADN** du premier échantillon dans le puits correspondant de l'**Amplification microplate**. Mélanger soigneusement l'échantillon en pipetant trois fois le volume dans le mélange de réaction. Ne pas faire de bulles. Procéder de la même façon avec tous les **ADN extraits**.
3. Pour le contrôle négatif d'amplification déposer délicatement dans le mélange de réaction **10 µL d'Eau bidistillée stérile** (non incluse dans le produit), dans le puits correspondant de l'**Amplification microplate** conformément à l'organisation définie précédemment dans la Grille de travail. Mélanger soigneusement le contrôle négatif et pipeter trois fois l'**Eau bidistillée stérile** dans le mélange de réaction. Ne pas faire de bulles.
4. Déposer délicatement dans le mélange de réaction, **10 µL de TOXO RE - Positive Control** dans le puits correspondant de l'**Amplification microplate**, conformément à l'organisation définie précédemment dans la **Grille de travail**. Mélanger soigneusement le contrôle positif et pipeter trois fois le **TOXO - Positive Control** dans le mélange de réaction. Ne pas faire de bulles.
5. Sceller soigneusement l'**Amplification microplate** à l'aide de l'**Amplification Sealing Sheet**.
6. Transférer l'**Amplification microplate** dans le thermocycleur à temps réel, placé dans la zone d'amplification / détection des produits d'amplification et lancer le cycle de température d'amplification en sauvegardant, avec un nom identifiable et ne pouvant prêter à confusion, les données de l'étape (p.ex. "année-mois-jour-TOXO-EGSpA").

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

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



Analyse qualitative des résultats

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ce produit peut détecter une quantité minimale d'environ 1 copie d'ADN de *Toxoplasma gondii* dans 10 µL d'ADN ajouté à la réaction d'amplification (seuil de détection du produit, voir Caractéristiques des performances, page 14).

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

Réaction de l'échantillon		Conformité de l'échantillon	Résultat du test	ADN d'HHV7
détecteur FAM "TOXO"	détecteur VIC "CI"			
Ct Non interprétable	Ct > 35 ou Ct Non interprétable	non conforme	non valable	-
	Ct ≤ 35	conforme	valable, négatif	NON DETECTE
Ct Interprétable	Ct > 35 ou Ct Non interprétable	conforme	valable, positif	DETECTE
	Ct ≤ 35	conforme	valable, positif	DETECTE

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

Si le résultat d'un échantillon est Ct Non interprétable pour *Toxoplasma gondii* et Ct ≤ 35 pour le Contrôle interne, cela indique que l'ADN de *Toxoplasma gondii* n'a pas été détecté dans l'échantillon. Il ne faut pas exclure la possibilité que l'ADN de *Toxoplasma gondii* soit présent à un titre inférieur au seuil de détection du produit (voir Caractéristiques des performances, page 14). Dans ce cas, le résultat serait un faux négatif.

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

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

CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES

Sensibilité analytique: seuil de détection

Le seuil de détection du test avec **sang total prélevé sur EDTA** et extraction manuelle avec «EXTRABlood» a été déterminée à l'aide d'un panel de dilutions de *Toxoplasma gondii*. Le panel a été préparé à partir d'échantillons de sang total négatif pour l'ADN de *Toxoplasma gondii* rendus positifs avec le matériel de référence calibré et certifié "Toxoplasma gondii (RH)" (Qnostics Ltd, Écosse, Royaume Uni). Les concentrations des échantillons du panel varie de 100 *T. gondii* / mL à 1 *T. gondii* / mL. Chacun des échantillons du panel a été testé en 24 réplicats pour effectuer l'extraction manuelle et l'amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A. L'amplification a été effectuée à l'aide de l'instrument 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument. L'analyse statistique a été effectuée par régression binomiale via le modèle de Probit. Le seuil de détection a été défini comme concentration à laquelle la probabilité d'atteindre un résultat positif est de 95%.

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Seuil de détection avec échantillons de sang total et «EXTRABlood» (<i>T. gondii</i> / mL)			
Intervalle de confiance de 95%			
		valeur inférieure	valeur supérieure
95% positivité	34 <i>T. gondii</i> / mL	23 <i>T. gondii</i> / mL	64 <i>T. gondii</i> / mL

Le seuil de détection du test avec **sang total prélevé sur EDTA** et extraction automatique avec «NucliSENS® easyMAG®» a été déterminé à l'aide d'un panel de dilutions de *Toxoplasma gondii*. Le panel a été préparé à partir d'échantillons de sang total négatif pour l'ADN de *Toxoplasma gondii* rendus positifs avec le matériel de référence calibré et certifié "Toxoplasma gondii (RH)" (Qnostics Ltd, Écosse, Royaume Uni). Les concentrations des échantillons du panel varie de 100 *T. gondii* / mL à 0,316 *T. gondii* / mL. Chacun des échantillons du panel a été testé en 24 réplicats pour effectuer l'extraction automatique avec les produits bioMérieux SA et l'amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A. L'amplification a été effectuée à l'aide de l'instrument 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument. L'analyse statistique a été effectuée par régression binomiale via le modèle de Probit. Le seuil de détection a été défini comme concentration à laquelle la probabilité d'atteindre un résultat positif est de 95%.

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Seuil de détection avec échantillons de sang total et «NucliSENS® easyMAG®» (<i>T. gondii</i> / mL)			
Intervalle de confiance de 95%			
		valeur inférieure	valeur inférieure
95% positivité	89 <i>T. gondii</i> / mL	57 <i>T. gondii</i> / mL	174 <i>T. gondii</i> / mL

Le seuil de détection du test avec **liquide amniotique** et extraction manuelle avec «EXTRABlood» a été interprété à l'aide d'un panel de dilutions de *Toxoplasma gondii*. Le panel a été préparé à partir d'échantillons de liquide amniotique négatifs pour l'ADN de *Toxoplasma gondii* rendus positifs en utilisant le matériel de référence calibré et certifié "Toxoplasma gondii (RH)" (Qnostics Ltd, Écosse, Royaume Uni). Les concentrations des échantillons du panel varie de 56,2 *T. gondii* / mL à 0,316 *T. gondii* / mL. Chacun des échantillons du panel a été utilisé dans 24 réplications pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction manuelle et d'amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A. L'amplification a été effectuée à l'aide de l'instrument 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument. L'analyse statistique a été effectuée par régression Probit. Le seuil de détection a été défini comme concentration à laquelle la probabilité d'atteindre un résultat positif est de 95%.

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Seuil de détection avec échantillons de liquid amniotique et «EXTRABlood» (<i>T. gondii</i> / mL)			
Intervalle de confiance de 95%			
		valeur inférieure	valeur inférieure
95% positivité	5 <i>T. gondii</i> / mL	4 <i>T. gondii</i> / mL	8 <i>T. gondii</i> / mL

Les échantillons de liquide amniotique étant généralement concentrés par une phase de centrifugation de l'échantillon pendant le prétraitement, le seuil de détection se réfère à la quantité présente dans la phase d'extraction et non pas au volume d'échantillon, assujetti aux procédures de laboratoire.

Le seuil de détection du test avec **liquide amniotique** et extraction automatique «NucliSENS® easyMAG®» a été déterminé à l'aide d'un panel de dilutions de *Toxoplasma gondii*. Le panel a été préparé à partir d'échantillons de liquide amniotique négatifs pour l'ADN de *Toxoplasma gondii* rendus positifs en utilisant le matériel de référence calibré et certifié "Toxoplasma gondii (RH)" (Qnostics Ltd, Écosse, Royaume Uni). Les concentrations des échantillons du panel varie de 31,6 *T. gondii* / mL à 0,316 *T. gondii* / mL. Chacun des échantillons du panel a été utilisé dans 24 réplications pour effectuer l'extraction automatique avec les produits bioMérieux SA et l'amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A. L'amplification a été effectuée à l'aide de l'instrument 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument. L'analyse statistique a été effectuée par régression Probit. Le seuil de détection a été défini comme concentration à laquelle la probabilité d'atteindre un résultat positif est de 95%.

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Seuil de détection avec échantillons de liquid amniotique et «NucliSENS® easyMAG®» (<i>T. gondii</i> / mL)			
Intervalle de confiance de 95%			
		valeur inférieure	valeur inférieure
95% positivité	2 <i>T. gondii</i> / mL	1 <i>T. gondii</i> / mL	3 <i>T. gondii</i> / mL

Les échantillons de liquide amniotique étant généralement concentrés par une phase de centrifugation de l'échantillon pendant le prétraitement, le seuil de détection se réfère à la quantité présente dans la phase d'extraction et non pas au volume d'échantillon, assujetti aux procédures de laboratoire.

Sensibilité analytique : intervalle linéaire dynamique

Ce test permet la détection de 10 000 000 à 10 copies d'ADN cible de la séquence RE.

La sensibilité analytique du test, ou l'intervalle linéaire de mesure, a été déterminée à partir d'un panel de dilutions (1 log₁₀ entre deux dilutions) d'ADN plasmidique. Le plasmide contient le produit d'amplification et sa concentration initiale a été mesurée au spectrophotomètre. Les solutions contenant 10⁷ molécules par réaction à 10¹ molécules par réaction ont été amplifiées 9 fois avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A. en association avec l'instrument 7300 Real-Time PCR System et avec l'instrument 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument.

L'analyse des résultats a montré que la réaction d'amplification pour *Toxoplasma gondii* a donné 9 réponses positives sur 9 réplicats pour toutes les dilutions de 10 à 10 000 000 copies par réaction avec les deux instruments de PCR en temps réel.

Dans cet intervalle, le coefficient de variation moyen en pourcentage (CV%) des valeurs de la réaction d'amplification de *Toxoplasma gondii* était inférieur à 2%.

Reproductibilité avec un panel de matériel de référence certifié

La reproductibilité des résultats obtenus avec ce test par rapport aux résultats obtenus avec d'autres méthodes et dans différents laboratoires, a été vérifiée avec un panel de matériel de référence certifié.

Les tests ont été réalisés en utilisant un panel de dilution dilué de *Toxoplasma gondii* comme matériau de référence calibré dans la concentration limite basée sur le panel «QCMD 2011 *Toxoplasma gondii* DNA EQA Program» (Qnostics Ltd, Ecosse, Royaume-Uni). Chaque échantillon de panneau a été testé avec extraction manuelle «EXTRAblood» et avec extraction automatique «NucliSENS® easyMAG®» suivie d'une amplification en deux répétitions avec ELITechGroup S.p.A. L'amplification a été réalisée en association avec l'instrument de PCR en temps réel 7500 Fast Dx.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tests avec du matériel de référence certifié					
échantillon	Matrice	Pathogène	Concentration T. gondii / mL	"EXTRAblood" Positif / Répliqué	"NucliSENS® easyMAG®" Positif / Répliqué
TGDNA15-01	Liquide Amniotique	T. gondii (Type II)	8±7	2 / 2	2 / 2
TGDNA15-02	Liquide Amniotique	T. gondii (Type II)	8±7	2 / 2	2 / 2
TGDNA15-03	Liquide Amniotique	T. gondii (Type II)	8±7	2 / 2	2 / 2
TGDNA15-04	Liquide Amniotique	T. gondii Negative	-	0 / 2	0 / 2
TGDNA15-05	Liquide Amniotique	T. gondii (Type II)	23±9	2 / 2	2 / 2
TGDNA15-06	Plasma	T. gondii Negative	-	0 / 2	0 / 2
TGDNA15-07	Plasma	T. gondii (Type II)	31±24	2 / 2	2 / 2
TGDNA15-08	Plasma	T. gondii (Type RH)	7±7	2 / 2	2 / 2
TGDNA15-09	Plasma	T. gondii (Type II)	86±65	2 / 2	2 / 2
TGDNA15-10	Plasma	T. gondii Negative	-	0 / 2	0 / 2

Tous les échantillons ont été correctement détectés par ELITechGroup S.p.A. en association avec les deux méthodes d'extraction.

Sensibilité analytique : efficacité de détection sur différents génotypes

L'efficacité de détection sur différents génotypes a été évaluée par comparaison des séquences avec des banques de données nucléotidiques.

L'examen des régions choisies pour l'hybridation des oligonucléotides d'amorçage et de la sonde fluorescente sur l'alignement des séquences disponibles dans la banque de données de la région RE de *Toxoplasma gondii* a démontré leur conservation et l'absence de mutations significatives.

L'efficacité de détection sur différents génotypes a été vérifiée à l'aide de plusieurs échantillons positifs pour différents génotypes de *Toxoplasma gondii*.

L'efficacité de détection sur différents génotypes a été vérifiée en utilisant comme matériel de référence 7 échantillons d'ADN extrait d'exsudat péritonéal de rat ou provenant de culture cellulaire, positifs pour différents génotypes de *Toxoplasma gondii* (génotype atypique, type III, type II et type I) testés par mise en culture et séquençage de l'ADN. Chaque échantillon a été utilisé pour effectuer l'amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A. L'amplification a été effectuée à l'aide de l'instrument 7300 Real-Time PCR System.

Tous les échantillons ont été confirmés positifs.

L'efficacité de détection sur différents génotypes a été vérifiée à l'aide d'un panel de matériel de référence certifié.

L'efficacité de détection sur différents génotypes a été vérifiée en utilisant comme matériel de référence certifié et calibré un panel comprenant des échantillons positifs pour différents génotypes de *Toxoplasma gondii* (Tipo II e Tipo RH) le panel de "QCMD 2011 *Toxoplasma gondii* DNA EQA Programme" (Qnostics Ltd, Ecosse, Royaume-Uni). Chaque échantillon du panel a été testé avec extraction manuelle «EXTRAblood» et avec extraction automatique «NucliSENS® easyMAG®» suivi d'amplification en deux répétitions avec les produits ELITechGroup S.p.A. L'amplification a été effectuée à l'aide de l'instrument 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument.

Tous les échantillons ont été confirmés positifs et les résultats obtenus sont reportés dans le paragraphe "Sensibilité analytique : reproductibilité avec panel de matériel de référence certifié".

Absence de réactivité croisée avec des marqueurs potentiellement interférents

L'absence de réactivité croisée avec d'autres marqueurs potentiellement interférents a été évaluée par comparaison de séquences avec des bases de données nucléotidiques.

L'examen de l'alignement des séquences des oligonucléotides amorces et de sonde fluorescente avec les séquences disponibles dans la banque de données de différents organismes de *Toxoplasma gondii*, y compris ceux de *Leishmania donovani* et *Plasmodium falciparum*, a démontré leur spécificité et l'absence de homologies significatives.

L'absence de réactivité croisée avec d'autres marqueurs potentiellement interférents, a été vérifiée à l'aide de quelques-uns des échantillons négatifs pour l'ADN de *Toxoplasma gondii* mais positifs pour l'ADN d'autres agents pathogènes. Les échantillons ont été confirmés négatifs.

L'absence de réactivité croisée a été testée en utilisant en tant que matériau de référence 23 échantillons de sang entier prélevés sur EDTA, négatifs pour l'ADN de *Toxoplasma gondii* (testé avec une amplification en temps réel produit commercial) et positifs pour l'ADN d'autres agents pathogènes (*Leishmania donovani*, CMV, VZV, adénovirus, Parvovirus B19, *Neospora caninum*). Chaque échantillon a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction et d'amplification, avec ELITechGroup S.p.A. L'amplification a été réalisée en association avec le système de PCR en temps réel 7300.

La spécificité analytique a également été testée en utilisant comme matériau de référence « 1er OMS Norme internationale pour *Plasmodium falciparum* ADN Nucleic techniques d'amplification des acides » (NIBSC, le code 04/176, Royaume-Uni), un échantillon de sang total lyophilisé infectés par *Plasmodium falciparum*. L'échantillon a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction et d'amplification avec les produits ELITechGroup. L'amplification a été réalisée en association avec l'instrument de PCR en temps réel 7500 Fast Dx.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Echantillon	N	positifs	negatifs
<i>Leishmania donovani</i>	9	0	9
CMV	5	0	5
VZV	1	0	1
Adenovirus	1	0	1
Parvovirus B19	6	0	6
<i>Neospora caninum</i>	1	0	1
<i>Plasmodium falciparum</i>	1	0	1

Tous les échantillons ont été confirmés négatifs.

Robustesse : absence de contamination croisée

La robustesse de l'analyse, tels que l'absence de contamination croisée, a été vérifiée par l'analyse des résultats de cinq sessions, dans lequel les échantillons négatifs pour l'ADN de *Toxoplasma gondii* sont alternées avec des échantillons positivisées pour l'ADN de *Toxoplasma gondii*. Aucun échantillon négatif pour l'ADN de *Toxoplasma gondii* n'était positif.

L'absence de contamination croisée avec le «**EXTRABlood**» kit d'extraction manuelle a été vérifiée en utilisant comme produit de référence d'échantillons de sang total prélevés sur EDTA à partir de donneurs volontaires testés négatifs pour l'ADN de *Toxoplasma gondii* et les mêmes échantillons avec le matériel de positivisée référence certifié et calibré "*Toxoplasma gondii* (RH)" (Qnostics Ltd, Ecosse, Royaume-Uni) à un compte d'environ 200 T. *gondii* / mL. Cinq séries de 12 échantillons, en alternance positivée un échantillon avec un échantillon négatif, ont été employées pour effectuer l'ensemble de la procédure d'analyse, l'extraction et l'amplification, les produits ELITechGroup S.p.A. L'amplification a été réalisée en association avec l'instrument de PCR en temps réel 7500 Fast Dx.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

échantillon	N	positifs	negatifs
Sang total prélevé sur EDTA rendu positif pour <i>Toxoplasma gondii</i>	30	30	0
Sang total prélevé sur EDTA négatif pour <i>Toxoplasma gondii</i>	30	0	30

Aucune contamination croisée de l'ADN n'a été détectée avec des échantillons négatifs de *Toxoplasma gondii*.

L'absence de contamination croisée avec le système d'extraction automatique «**NucliSENS® easyMAG®**» a été vérifiée à l'aide d'échantillons de sang total prélevés sur EDTA provenant d'un donneur volontaire testé négatif pour l'ADN de *Toxoplasma gondii* et les mêmes échantillons ont été positif le matériel de référence certifié et calibré "*Toxoplasma gondii* (RH)" (Qnostics Ltd, Ecosse, Royaume-Uni) pour un titre d'environ 400 T. *gondii* / mL. Cinq séries de 12 échantillons, alternant un échantillon positif avec un échantillon négatif, ont été utilisées pour réaliser une extraction automatique avec les produits bioMérieux SA et une amplification avec ELITechGroup S.p.A. L'amplification a été réalisée en association avec l'instrument de PCR en temps réel 7500 Fast Dx.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

échantillon	N	positifs	negatifs
Sang total prélevé sur EDTA rendu positif pour <i>Toxoplasma gondii</i>	30	30	0
Sang total prélevé sur EDTA négatif pour <i>Toxoplasma gondii</i>	30	0	30

Robustesse : taux d'erreur global du système

La robustesse du test, en tant que taux global d'erreur système conduisant à des résultats faussement négatifs, a été vérifiée en effectuant une analyse en panel d'échantillons positifs avec l'ADN de *Toxoplasma gondii*.

Le taux d'erreur global a été vérifié en utilisant comme matériel de référence un panel de 54 échantillons de sang total, testés négatifs pour l'ADN de *Toxoplasma gondii*, positifs avec le matériel de référence certifié et calibré "*Toxoplasma gondii* (RH)" (Qnostics Ltd, Ecosse, Royaume-Uni) à un titre d'environ 150 T. *gondii* / mL. Chaque échantillon de panel a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction et d'amplification avec ELITechGroup S.p.A. L'amplification a été réalisée en association avec l'instrument de PCR en temps réel 7500 Fast Dx.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

échantillon	N	positifs	negatifs
Sang total prélevé sur EDTA rendu positif pour <i>Toxoplasma gondii</i>	54	54	0

Le taux d'erreur global du système est inférieur à 1,9%.

Sensibilité diagnostique : validation des échantillons positifs

La sensibilité diagnostique du test, entendue comme confirmation d'échantillons positifs, a été évaluée en utilisant plusieurs échantillons cliniques de sang total et de liquide amniotique rendus positifs pour l'ADN de *Toxoplasma gondii*.

La sensibilité diagnostique avec le kit d'extraction manuelle «**EXTRABlood**» a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 52 échantillons de sang total prélevé sur EDTA, négatifs pour l'ADN de *Toxoplasma gondii* (testé à l'aide d'un produit d'amplification en temps réel du commerce) et rendus positifs à un titre d'environ 150 T. *gondii* / mL avec le matériel de référence certifié et calibré "*Toxoplasma gondii* (RH)" (Qnostics Ltd, Ecosse, Royaume Uni). Chaque échantillon a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction manuelle et d'amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A. L'amplification a été effectuée à l'aide de l'instrument 7300 Real-Time PCR System.

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Échantillons	N	positifs	negatifs
Sang total prélevé sur EDTA positif pour <i>Toxoplasma gondii</i>	52	51	1

Un échantillon a donné un résultat négatif valable avec les produits ELITechGroup S.p.A. Cette divergence peut s'expliquer par un événement aléatoire dû au faible titre de *Toxoplasma gondii* présent dans l'échantillon.

Dans ce test, la sensibilité diagnostique a été de 98,1%.

La sensibilité diagnostique avec le système d'extraction automatique «**NucliSENS® easyMAG®**» a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 52 échantillons de sang total prélevé sur EDTA, négatifs pour l'ADN de *Toxoplasma gondii* (testé à l'aide d'un produit d'amplification en temps réel du commerce) et rendus positifs à un titre d'environ 270 T. *gondii* / mL avec le matériel de référence certifié et calibré "*Toxoplasma gondii* (RH)" (Qnostics Ltd, Ecosse, Royaume Uni). Chacun des échantillons a été utilisé pour effectuer l'extraction automatique avec les produits bioMérieux SA et l'amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A. L'amplification a été effectuée à l'aide de l'instrument 7300 Real-Time PCR System.

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Échantillons	N	positifs	negatifs
Sang total prélevé sur EDTA positif pour <i>Toxoplasma gondii</i>	52	52	0

Dans ce test, la sensibilité diagnostique a été supérieure à 98,1%.

TOXOPLASMA g. ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTST01PLD

La sensibilité diagnostique avec le kit d'extraction manuelle «EXTRAblood» a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 56 échantillons de **liquide amniotique**, négatifs pour l'ADN de *Toxoplasma gondii* (testé à l'aide d'un produit d'amplification en temps réel du commerce) et rendus positifs à un titre d'environ 50 T. gondii / mL (correspondant à environ 10 T. gondii / extraction) avec le matériel de référence certifié et calibré "Toxoplasma gondii (RH)" (Qnostics Ltd, Écosse, Royaume Uni). Chaque échantillon a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction manuelle et d'amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A. L'amplification a été effectuée à l'aide de l'instrument 7300 Real-Time PCR System.

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Liquide amniotique positif pour <i>Toxoplasma gondii</i>	56	55	1

Un échantillon a donné un résultat négatif valable avec les produits ELITechGroup S.p.A. Cette divergence peut s'expliquer par un événement aléatoire induit par le faible titre de *Toxoplasma gondii* présent dans l'échantillon.

Dans ce test, la sensibilité diagnostique a été de 98,2%.

La sensibilité diagnostique avec le système d'extraction manuelle «NucliSENS® easyMAG®» a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 56 échantillons de **liquide amniotique**, négatifs pour l'ADN de *Toxoplasma gondii* (testé à l'aide d'un produit d'amplification en temps réel du commerce) et rendus positifs à un titre d'environ 20 T. gondii / mL (correspondant à environ 10 T. gondii / extraction) avec le matériel de référence certifié et calibré "Toxoplasma gondii (RH)" (Qnostics Ltd, Écosse, Royaume Uni). Chacun des échantillons a été utilisé pour effectuer l'extraction automatique avec les produits bioMérieux SA et l'amplification avec les produits EGSpA. L'amplification a été effectuée à l'aide de l'instrument 7300 Real-Time PCR System.

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Liquide amniotique positif pour <i>Toxoplasma gondii</i>	56	56	0

Dans ce test, la sensibilité diagnostique a été supérieure à 98,2%.

Spécificité diagnostique : validation des échantillons négatifs

La spécificité diagnostique du test, entendue comme confirmation d'échantillons négatifs, a été évaluée en utilisant plusieurs échantillons cliniques de sang total et de liquide amniotique négatifs pour l'ADN de *Toxoplasma gondii*.

La spécificité diagnostique avec le kit d'extraction manuelle «EXTRAblood» a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 52 échantillons de **sang total prélevé sur EDTA**, négatifs pour l'ADN de *Toxoplasma gondii* (testés avec un produit d'amplification en temps réel du commerce). Chaque échantillon a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction et d'amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A. L'amplification a été effectuée à l'aide de l'instrument 7300 Real-Time PCR System.

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé sur EDTA négatif pour <i>Toxoplasma gondii</i>	52	0	52

Dans ce test, la spécificité diagnostique a été de 98,1 %.

La spécificité diagnostique avec le système d'extraction automatique «NucliSENS® easyMAG®» a été évaluée en utilisant comme matériau de référence 52 échantillons de **sang total prélevé sur EDTA**, négatifs pour l'ADN de *Toxoplasma gondii* (testés avec un produit d'amplification commercial en temps réel). Chaque échantillon a été utilisé pour réaliser une extraction automatique avec les produits bioMérieux SA et une amplification avec ELITechGroup S.p.A. L'amplification a été réalisée en association avec le système de PCR en temps réel 7300.

TOXOPLASMA g. ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTST01PLD

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé sur EDTA négatif pour <i>Toxoplasma gondii</i>	52	2	50

Deux échantillons de sang total prélevés sur EDTA ont donné un résultat faiblement positif divergent pour l'ADN de *Toxoplasma gondii* (Ct FAM 40,25 et 39,15.) Ces échantillons ont été ré-amplifiés et ré-extraits et amplifiés; dans les deux cas avec résultat négatif. La divergence peut s'expliquer par le fait que les échantillons avec des titres aussi bas peuvent donner alternativement et de façon tout à fait aléatoire, des résultats positifs et négatifs. De plus, comme l'a déclaré le centre de validation extérieur, ces échantillons proviennent de patients dont l'histoire clinique qui ne permet pas d'exclure une faible positivité pour l'ADN de *Toxoplasma gondii*.

Dans ce test, la spécificité diagnostique a été égale à 96,1%.

La spécificité diagnostique avec le kit d'extraction manuelle «EXTRAblood» a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 56 échantillons de **liquide amniotique**, négatifs pour l'ADN de *Toxoplasma gondii* (testés avec un produit d'amplification en temps réel du commerce). Chaque échantillon a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction et d'amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A. L'amplification a été effectuée à l'aide de l'instrument 7300 Real-Time PCR System.

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Liquide amniotique négatif pour <i>Toxoplasma gondii</i>	56	0	56

Dans ce test, la spécificité diagnostique a été supérieure à 98,2%.

La spécificité diagnostique avec le système d'extraction automatique «NucliSENS® easyMAG®» a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 56 échantillons de **liquide amniotique**, négatifs pour l'ADN de *Toxoplasma gondii* (testés avec un produit d'amplification en temps réel du commerce). Chacun des échantillons a été utilisé pour effectuer l'extraction automatique avec les produits bioMérieux SA et l'amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A. L'amplification a été effectuée à l'aide de l'instrument 7300 Real-Time PCR System.

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Liquide amniotique négatif pour <i>Toxoplasma gondii</i>	56	0	56

Dans ce test, la spécificité diagnostique a été supérieure à 98,2%.

Remarque: Les données et les résultats complets des essais effectués pour l'évaluation des caractéristiques des performances du produit avec les matrices et les instruments ont été enregistrés dans la Section 7 du Fascicule Technique de Produit "TOXOPLASMA g. ELITe MGB® Kit", FTP RTST01PLD.

BIBLIOGRAPHIE

S. Cassaing et al. (2006) J. Clin. Microbiol 44: 720 - 724.
F. Robert-Gangneux and M. L.Dardé (2012) Clin. Microbiol. Rev. 25: 264 - 296
E. A. Lukhtanov et al. (2007) Nucleic Acids Res. 35: e30

LIMITES DE LA PROCÉDURE

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

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

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

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

Aucune donnée n'est disponible pour les performances de ce produit avec de l'ADN extrait des échantillons cliniques suivants: liquide céphalo-rachidien.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Un résultat négatif obtenu avec ce produit indique que de l'ADN de *Toxoplasma gondii* n'a pas été détecté. Il ne faut pas exclure que de l'ADN de *Toxoplasma gondii* soit présent à un titre inférieur au seuil de détection du produit (voir Caractéristiques des performances, page 14); dans ce cas, le résultat serait un faux négatif.

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

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

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

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

PROBLÈMES ET SOLUTIONS

L'ADN cible n'est pas détecté dans la réaction du Positive Control	
Causes éventuelles	Solutions
Erreur de distribution dans la microplaque.	Distribuer soigneusement les réactifs dans la microplaque en suivant la grille de travail. Vérifier le volume du mélange de réaction distribué. Vérifier le volume du contrôle positif ou des standards distribué.
Dégradation de la sonde.	Utiliser un nouveau tube de mélange de réaction.
Dégradation du contrôle positif ou du standard.	Utiliser un nouveau tube de contrôle positif ou de standard.
Erreur de paramétrage de l'instrument.	Vérifier le paramétrage de la position du contrôle positif ou des standards. Vérifier le paramétrage du cycle de température.












L'ADN cible est détecté dans la réaction du Contrôle négatif	
Causes éventuelles	Solutions
Erreur de distribution dans la microplaque.	Éviter de répandre le contenu des tubes d'échantillons. Changer toujours d'embout entre deux échantillons Distribuer soigneusement les échantillons, le contrôle négatif et le contrôle positif (ou les standards) dans la microplaque en suivant la grille de travail.
Erreur de paramétrage de l'instrument.	Vérifier le paramétrage de la position des échantillons, du contrôle négatif et du contrôle positif (ou des standards).
Microplaque mal scellée.	Sceller méticuleusement la microplaque.
Contamination de l'eau bi-distillée stérile.	Utiliser un nouveau tube d'eau stérile.
Contamination du mélange de réaction.	Utiliser un nouveau tube de mélange de réaction.
Contamination de la zone d'extraction / préparation des réactions d'amplification.	Nettoyer les surfaces et les instruments à l'aide d'un détergent aqueux. Laver les blouses et remplacer les tubes et les embouts utilisés.

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

Réaction d'échantillon non valide	
Causes éventuelles	Solutions
Erreur de distribution de microplaques.	Répartissez soigneusement les réactions dans la microplaque en suivant la surface de travail. Vérifiez les volumes du mélange réactionnel distribué. Vérifiez le volume des échantillons.
Préparation incorrecte de la session avec ELITE InGenius.	Vérifiez la position du mélange PCR et de l'échantillon. Vérifiez le mélange PCR et les volumes d'échantillons.
Dégradation du contrôle interne.	Utilisez de nouveaux taux de contrôle interne.
Inhibition due à des substances interférant avec l'échantillon.	Répétez la réaction d'amplification de l'échantillon avec une dilution 1: 2 dans l'eau pour la biologie moléculaire de l'échantillon élué dans une session en mode «PCR uniquement». Répétez l'extraction et l'amplification de l'échantillon.
Dégradation du Mix PCR.	Utilisez de nouvelles aliquotes de PCR Mix.
Erreur d'instrument.	Contactez l'assistance technique ELITechGroup.

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

LÉGENDE DES SYMBOLES

-  Référence du catalogue.
-  Seuil supérieur de température.
-  Numéro de lot.
-  Date de péremption (dernier jour du mois).
-  Diagnostic *in vitro*.
-  Conforme aux exigences essentielles de la Directive européenne 98\79\CE concernant le diagnostic *in vitro*.
Certifiée per DEKRA certification B.V. ; Pys bas.
-  Contenu suffisant pour "x" tests.
-  Attention, consulter le mode d'emploi.
-  Contenus.
-  Conserver à l'abri de la lumière solaire.
-  Fabriqué par.

NOTE POUR L'ACQUEREUR: LICENCE LIMITEE

Les réactifs de détection ELITe MGB® sont protégés aux Etats-Unis par un ou plusieurs brevets déposés sous les 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 brevets EP n. 0819133, 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939 ainsi que par les dépôts de brevets en cours d'homologation.

Cette licence limitée permet à la personne ou à l'entité légale ayant acquis ce produit de l'utiliser, ainsi que tous les résultats obtenus d'une telle utilisation, exclusivement dans le domaine de l'analyse médicale humaine. Ni ELITechGroup S.p.A. ni ses partenaires concédant des licences n'accordent expressément ou de façon implicite une licence pour d'autres utilisations.

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

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

