

REF
201501 NeuMoDx™ EBV Quant Test Strip 2.0
R only

ATTENTION : pour exportation aux États-Unis uniquement

IVD

 Pour diagnostic *in vitro*, utiliser les NeuMoDx 288 et NeuMoDx 96 Molecular System.

 Pour les mises à jour des notices, consulter : www.qiaqen.com/neumodx-ifu

Pour des instructions détaillées, se reporter au Manuel d'utilisation du NeuMoDx 288 Molecular System ; réf. 40600108

Pour des instructions détaillées, se reporter au Manuel d'utilisation du NeuMoDx 96 Molecular System ; réf. 40600317

UTILISATION PRÉVUE

Le NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 est un test automatisé d'amplification d'acide nucléique *in vitro* destiné à la quantification de l'ADN du virus d'Epstein-Barr (EBV) humain dans le plasma EDTA de patients greffés immunodéprimés.

Le NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0, tel qu'il est effectué sur le NeuMoDx 288 Molecular System et le NeuMoDx 96 Molecular System, comprend une extraction automatisée de l'ADN pour isoler les acides nucléiques cibles de l'échantillon et une PCR en temps réel ciblant deux régions hautement conservées du génome de l'EBV.

Le dosage est destiné à être utilisé comme aide à l'analyse des niveaux d'ADN d'EBV dans le sang périphérique pour évaluer la réponse virale au traitement. Ce dosage est destiné à être utilisé en conjonction avec la présentation clinique et d'autres marqueurs de laboratoire de la progression de la maladie pour la gestion clinique et l'analyse de l'infection par l'EBV.

Le dosage n'est pas destiné à être utilisé comme un test de dépistage de la présence d'ADN d'EBV dans le sang ou les produits sanguins. Le NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 est destiné à être utilisé par un personnel de laboratoire clinique formé et spécifiquement sensibilisé et formé aux techniques de PCR en temps réel et aux procédures de diagnostic *in vitro* et/ou aux NeuMoDx Molecular Systems. Le NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 n'est pas destiné à être utilisé en auto-test ou en point d'intervention.

RÉSUMÉ ET EXPLICATIONS

Le sang total humain prélevé dans des tubes à échantillon sanguin stériles contenant de l'EDTA comme agent anticoagulant peut être utilisé pour la préparation du plasma. Pour lancer le test, le plasma contenu dans un tube à échantillon compatible avec le NeuMoDx System est placé dans un porte-tubes à échantillon et chargé sur la table de travail du NeuMoDx System. Pour chaque échantillon, une aliquote de 550 µl de l'échantillon de plasma est mélangée avec le NeuMoDx Lysis Buffer 1 et le NeuMoDx System effectue automatiquement toutes les étapes nécessaires pour extraire l'acide nucléique cible, préparer l'ADN isolé pour l'amplification par PCR en temps réel et, s'il y en a, amplifier et détecter les produits de l'amplification (deux zones très bien préservées du génome du EBV). Le NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 comprend un contrôle des processus de traitement d'échantillons (Sample Process Control, SPC1) d'ADN qui permet de contrôler la présence de substances potentiellement inhibitrices ainsi que les défaillances du NeuMoDx System ou des réactifs pouvant survenir durant le processus d'extraction et d'amplification.

L'EBV est un virus à ADN double brin courant de la famille des herpèsvirus humains qui infecte les individus de tous âges. On estime que plus de > 90 % des individus à travers le monde sont ou ont été infectés par l'EBV.¹ L'EBV se transmet par les liquides organiques, tels que la salive, le sang, le sperme et par les greffes d'organes. Bon nombre de personnes sont infectées par l'EBV au cours de l'enfance. Ces personnes, bien qu'infectées par l'EBV, ne présentent en général aucun symptôme. Les personnes immunodéprimées peuvent développer des symptômes et des complications plus graves après une infection à EBV. Une infection à EBV latente constitue un risque majeur chez les patients ayant subi une greffe. Le syndrome lymphoprolifératif post-transplantation (SLPT) comprend la formation de tumeurs liées à EBV dans les lymphocytes B due à l'effet des immunosuppresseurs sur le contrôle immunitaire de l'EBV, l'une des principales causes de morbidité et mortalité chez les patients ayant subi une greffe d'organe.²

L'analyse de la charge virale EBV peut être utilisée comme aide au diagnostic et à la gestion du SLPT associé à l'EBV. Cependant, le diagnostic doit être effectué par une biopsie. L'analyse de la charge virale EBV peut également être utilisée pour analyser la réponse au traitement du SLPT associé à l'EBV, généralement avec du Rituximab et une réduction du traitement immunosuppresseur.³

PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

Le NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 sur le NeuMoDx System utilise le NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0, les NeuMoDx EBV Calibrators, les NeuMoDx EBV External Controls, le NeuMoDx Lysis Buffer 1 et les réactifs à usage général NeuMoDx pour effectuer l'analyse. Le NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 combine l'extraction, l'amplification et la détection automatisées de l'ADN par PCR en temps réel. Les échantillons de sang total sont prélevés dans des tubes contenant de l'EDTA pour la préparation du plasma. L'échantillon de plasma contenu dans un tube à échantillon compatible avec le NeuMoDx System est placé dans un porte-tubes à prélèvement chargé sur la table de travail du NeuMoDx System pour le traitement. Aucune autre intervention de l'opérateur n'est nécessaire.

Les NeuMoDx Systems font appel à une association entre chaleur, enzyme lytique et réactifs d'extraction pour effectuer automatiquement la lyse cellulaire, l'extraction de l'ADN et l'élimination des inhibiteurs. Les acides nucléiques libérés sont capturés par des microsphères d'affinité magnétiques. Les microsphères, avec les acides nucléiques qui leur sont liés, sont chargées dans la NeuMoDx Cartridge où les composants non liés et ne constituant pas d'ADN sont éliminés à l'aide du NeuMoDx Wash Reagent et l'ADN lié est élué à l'aide du NeuMoDx Release Reagent. Les NeuMoDx Systems utilisent alors l'ADN élué pour réhydrater les réactifs d'amplification exclusifs NeuDry™ contenant tous les éléments nécessaires à l'amplification de PCR des cibles spécifiques à l'EBV et au SPC1. Après reconstitution des réactifs de PCR NeuDry, le NeuMoDx System transfère la préparation prête pour la PCR dans la NeuMoDx Cartridge. L'amplification et la détection des séquences d'ADN du contrôle et de la cible (le cas échéant) se produisent dans la chambre de PCR de la NeuMoDx Cartridge. La NeuMoDx Cartridge est conçue pour accueillir l'amplificateur généré par la PCR en temps réel, éliminant ainsi tout risque de contamination postamplification.

Le NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 cible deux régions hautement conservées, BALF5 et BXFL1, du génome de l'EBV. La conception à double cible réduit le risque de résultats faussement négatifs en cas de mutations dans une région cible, ce qui augmente la robustesse du dosage. Les cibles amplifiées sont détectées en temps réel grâce à des substances chimiques (sondes) impliquant une réaction d'hydrolyse (communément appelée « chimie TaqMan® »). Cela se produit à l'aide de molécules d'oligonucléotidique fluorogènes spécifiques aux amplicons pour leurs cibles respectives.

Les sondes TaqMan comportent un fluorophore lié par liaison covalente à l'extrémité 5' de la sonde oligonucléotidique et un quencher à l'extrémité 3'. Tant que la sonde est intacte, le fluorophore et le quencher sont à proximité l'un de l'autre, ce qui entraîne l'extinction par le quencher de la fluorescence émise par le fluorophore par le biais du mécanisme de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (Förster Resonance Energy Transfer, FRET).

Les sondes TaqMan sont conçues pour s'hybrider dans une région d'ADN amplifiée par un ensemble spécifique d'amorces. À mesure que la Taq ADN polymérase assure l'élongation de l'amorce et la synthèse du nouveau brin, son activité exonucléase 5'-3' dégrade la sonde qui s'est hybridée sur la matrice. La dégradation de la sonde libère le fluorophore et met fin à sa proximité avec le quencher, supprimant l'extinction due au FRET et permettant la détection du fluorophore par fluorescence. Le signal de fluorescence détecté qui en résulte est directement proportionnel au fluorophore libéré ; il peut donc être corrélé à la quantité d'ADN cible présent.

Une sonde TaqMan marquée par un fluorophore (excitation : 490 nm et émission : 521 nm) à l'extrémité 5' et un quencher foncé à l'extrémité 3' sont utilisés pour détecter les cibles de l'ADN d'EBV. Pour la détection du contrôle des processus de traitement d'échantillons (Sample Process Control, SPC1), la sonde TaqMan est marquée par un autre colorant fluorescent (excitation : 535 nm et émission : 556 nm) à l'extrémité 5' et un quencher foncé à l'extrémité 3'. Le logiciel du NeuMoDx System contrôle le signal fluorescent émis par les sondes TaqMan à la fin de chaque cycle d'amplification. Une fois l'amplification terminée, il analyse les données et rapporte un résultat (POSITIVE [Positif] / NEGATIVE [Négatif] / INDETERMINATE [Indéterminé] / NO RESULT [Aucun résultat] / UNRESOLVED [Non résolu]). Si un résultat est POSITIVE (Positif), le logiciel du NeuMoDx System fournit aussi une valeur quantitative associée avec l'échantillon ou indique si la concentration calculée est hors de la gamme linéaire.



RÉACTIFS/CONSOMMABLES

Matériel fourni

RÉF	Contenu	Unités par paquet	Tests par unité	Tests par paquet
201501	NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 <i>Réactifs de RT-PCR déshydratés contenant la sonde et les amorces TaqMan spécifiques à l'EBV et au SPC1.</i>	6	16	96

Matériel nécessaire, mais non fourni (disponible séparément auprès de QIAGEN)

RÉF	Contenu
800501	NeuMoDx EBV Calibrators <i>Paires d'étalons d'EBV fortement et faiblement positifs à usage unique pour établir la validité de la courbe d'étalonnage (1 flacon de chaque contrôle = 1 paire)</i>
900502	NeuMoDx EBV External Controls <i>Paires à usage unique de contrôles positif faible, positif fort et négatif à EBV pour établir la validité quotidienne du NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 (1 flacon de chaque contrôle = 1 paire)</i>
100200	NeuMoDx Extraction Plate <i>Particules paramagnétiques, enzyme lytique et contrôles des processus de traitement d'échantillons déshydratés</i>
400500	NeuMoDx Lysis Buffer 1
400100	NeuMoDx Wash Reagent
400200	NeuMoDx Release Reagent
100100	NeuMoDx Cartridge
235903	Pointes Hamilton® CO-RE / CO-RE II (300 µl) avec filtres
235905	Pointes Hamilton CO-RE / CO-RE II (1000 µl) avec filtres

Instruments requis

NeuMoDx 288 Molecular System [RÉF.500100] ou NeuMoDx 96 Molecular System [RÉF. 500200]

NeuMoDx System Software version 1.9.2.6 ou ultérieure



AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- La NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 est destinée à une utilisation pour le diagnostic *in vitro* avec les NeuMoDx Systems uniquement.
- Ne pas utiliser les réactifs ou les consommables après la date de péremption indiquée.
- Ne pas utiliser les réactifs si le sceau de sécurité est brisé ou si l'emballage est endommagé à réception.
- Ne pas utiliser de réactifs ou de consommables si l'enveloppe protectrice est ouverte ou brisée à réception.

- Un étalonnage de test valide (généralisé par le traitement des NeuMoDx EBV Calibrators fortement et faiblement positifs [RÉF 800501]) doit être disponible avant que les résultats de test puissent être générés pour les échantillons cliniques.
- Les NeuMoDx EBV External Controls [RÉF. 900502] doivent être traités toutes les 24 heures lors des tests avec le NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0.
- Le volume d'échantillon minimal des aliquotes secondaires de plasma EDTA est détaillé ci-dessous dans la section Préparation du test. Tout volume inférieur au minimum spécifié peut entraîner l'erreur suivante : « Quantity Not Sufficient » (Quantité insuffisante).
- L'utilisation d'échantillons conservés à des températures inappropriées ou plus longtemps que les durées de stockage spécifiées peut entraîner des résultats non valides ou erronés.
- Éviter la contamination de tous les réactifs et consommables par des microbes ou une désoxiribonucléase (ADNase). L'utilisation de pipettes de transfert jetables, stériles et exemptes d'ADNase est recommandée en cas d'utilisation de tubes secondaires. Utiliser une nouvelle pipette pour chaque échantillon.
- Afin d'éviter la contamination, ne pas manipuler ou démonter la NeuMoDx Cartridge après amplification. Ne jamais récupérer de NeuMoDx Cartridges dans le récipient pour déchets à risque biologique (NeuMoDx 288 Molecular System) ni dans la poubelle pour déchets à risque biologique (NeuMoDx 96 Molecular System). La NeuMoDx Cartridge est conçue de façon à empêcher la contamination.
- Dans le cas où des tests de PCR à tube ouvert sont également effectués par le laboratoire, des précautions doivent être prises pour s'assurer que la NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0, les consommables et les réactifs supplémentaires nécessaires pour le test, l'équipement de protection individuelle comme les gants et les blouses, et le NeuMoDx System ne sont pas contaminés.
- Des gants en nitrile sans poudre propres doivent être enfilés avant la manipulation des réactifs et consommables NeuMoDx. Prendre des précautions pour éviter de toucher la surface supérieure de la NeuMoDx Cartridge, la surface d'aluminium de la NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 et de la NeuMoDx Extraction Plate ou la surface supérieure du récipient du NeuMoDx Lysis Buffer. Manipuler les consommables et les réactifs en touchant uniquement les surfaces latérales.
- Les fiches de données de sécurité (FDS) sont fournies pour chaque réactif (le cas échéant) sur www.qiagen.com/neumodx-ifu.
- Se laver les mains soigneusement après avoir réalisé le test.
- Ne pas pipetter à la bouche. Ne pas fumer, manger ou boire dans les zones de manipulation des échantillons ou des réactifs.
- Toujours manipuler les échantillons comme s'ils étaient infectieux et conformément aux procédures de sécurité des laboratoires, telles que mentionnées dans *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁴ (Sécurité biologique au sein des laboratoires d'analyses microbiologiques et biomédicales) et dans le document du CLSI M29-A4.⁵
- Pour travailler avec des produits chimiques, il convient de toujours porter une blouse adaptée, des gants jetables et des lunettes de protection. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées.
- Éliminer les réactifs non utilisés et les déchets conformément aux réglementations nationales, fédérales, provinciales, étatiques et locales. Suivre les recommandations de la fiche de données de sécurité (FDS).

NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0



Contient: acide borique. Danger! Provoque une sévère irritation des yeux. Peut nuire à la fertilité ou au fœtus. EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin. Garder sous clef. Éliminer le contenu/récipient dans une installation d'élimination des déchets agréée. Se procurer les instructions avant utilisation. Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité. Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.

Informations sur les urgences

CHEMTREC

En dehors des États-Unis et du Canada, +1 703-527-3887



STOCKAGE, MANIPULATION ET STABILITÉ DU PRODUIT

1. Les NeuMoDx EBV Quant Test Strips 2.0 sont stables dans leur emballage primaire jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'elles sont conservées entre 15 et 28 °C.
2. Une fois chargée, la NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 peut rester à bord du NeuMoDx System pendant 14 jours. Le logiciel suit la durée de vie restante des bandelettes de test chargées et l'indique à l'utilisateur en temps réel. Le système invite l'utilisateur à retirer toute bandelette de test dont l'utilisation a dépassé la durée autorisée.
3. Bien qu'ils ne soient pas infectieux, les NeuMoDx EBV Calibrators et les NeuMoDx EBV External Controls doivent être éliminés après utilisation dans les déchets à risque du laboratoire afin de limiter le risque de contamination.

PRÉLÈVEMENT, TRANSPORT ET STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS

Manipuler tous les échantillons comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des agents infectieux.

1. Ne pas congeler d'échantillons de sang total ni aucun échantillon conservé dans des tubes primaires.
2. Pour préparer des échantillons de plasma, le sang total doit être prélevé dans des tubes stériles contenant de l'EDTA comme anticoagulant. Respecter les consignes du fabricant des tubes à échantillon d'échantillon.
3. Le sang total prélevé dans les tubes indiqués précédemment peut être conservé et/ou transporté pendant 24 heures maximum entre 2 °C et 25 °C avant la préparation du plasma. La préparation du plasma doit être réalisée suivant les consignes du fabricant.

- Les échantillons de plasma préparés peuvent rester dans le NeuMoDx System jusqu'à 8 heures avant le traitement. Si vous devez les conserver plus longtemps, il est recommandé de placer les échantillons au réfrigérateur ou au congélateur.
- Les échantillons de plasma préparés doivent être conservés entre 2 et 8 °C pendant 7 jours maximum avant le test et pendant 8 heures maximum à température ambiante.
- Les échantillons de plasma préparés peuvent être conservés à -20 °C pendant 8 semaines au maximum ; les échantillons de plasma ne doivent pas subir plus de 2 cycles de congélation/décongélation avant utilisation.
 - Si les échantillons sont congelés, laissez-les complètement décongeler à température ambiante (15 à 30 °C) puis passez-les au vortex pour générer un échantillon uniforme. Les échantillons doivent être à température ambiante avant d'être testés.
 - Lorsque des échantillons sont décongelés, le test doit intervenir dans les 8 heures.
- En cas de transport, les échantillons doivent être emballés et étiquetés conformément à la réglementation nationale et/ou internationale en vigueur.

MODE D'EMPLOI

Préparation du test

- Appliquer une étiquette code-barres pour échantillon sur un tube à échantillon compatible avec le NeuMoDx System, comme décrit ci-dessous.
- Transférer une aliquote d'échantillon (prélèvement) dans le tube de prélèvement à code-barres compatible avec le NeuMoDx System en respectant les volumes définis ci-dessous :
- Pour les échantillons de plasma :*
 - Porte-tubes à échantillon (32 tubes) : 11 à 14 mm de diamètre et 60 à 120 mm de hauteur ; volume de remplissage minimal $\geq 750 \mu\text{l}$
 - Porte-tubes à échantillon (24 tubes) : 14,5 à 18 mm de diamètre et 60 à 120 mm de hauteur ; volume de remplissage minimal $\geq 1100 \mu\text{l}$
 - Porte-tubes à échantillon faible volume (32 tubes) : tube de microcentrifugation de 1,5 ml à fond conique ; volume de remplissage minimal $\geq 650 \mu\text{l}$

Utilisation du NeuMoDx System

Pour des instructions détaillées, se reporter aux manuels d'utilisation des NeuMoDx 288 et 96 Molecular System (réf. no 40600108 et 40600317)

- Remplir un ou plusieurs supports de bandelettes de test NeuMoDx System avec une ou des NeuMoDx EBV Quant Test Strip(s) 2.0 et utiliser l'écran tactile pour charger le ou les supports de bandelettes de test dans le NeuMoDx System.
- Le cas échéant, à l'invite du logiciel du NeuMoDx System, ajouter les consommables nécessaires dans les supports de consommables du NeuMoDx System et utiliser l'écran tactile pour charger le ou les supports dans le NeuMoDx System.
- Si le logiciel du NeuMoDx System vous le demande, remplacer le NeuMoDx Wash Reagent et le NeuMoDx Release Reagent et vider le conteneur de déchets d'amorçage (NeuMoDx 288 Molecular System), le récipient pour déchets à risque biologique (NeuMoDx 96 Molecular System uniquement), la poubelle pour déchets à risque biologique (NeuMoDx 96 Molecular System uniquement), selon le cas.
- À l'invite du logiciel du NeuMoDx System, traiter les Calibrators [RÉF 800501] et/ou les External Controls [RÉF 900502] comme il convient. Vous trouverez des informations supplémentaires sur les étalons et les contrôles dans la section *Traitement des résultats*.
- Charger le ou les tubes à échantillon sur un porte-tubes à échantillon et veiller à ce que les bouchons et les écouvillons aient été retirés de tous les tubes.
- Placer le ou les porte-tubes à échantillon sur la tablette du chargeur automatique et utiliser l'écran tactile pour les charger dans le NeuMoDx System. Cela déclenche le traitement des échantillons chargés pour le ou les tests identifiés, à condition qu'une commande de test valide soit présente dans le système.

LIMITATIONS

- La NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 ne peut être utilisée que sur les NeuMoDx Systems.
- Les performances de la NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 ont été établies pour des échantillons de plasma préparés avec du sang total prélevé avec de l'EDTA comme anticoagulant. L'utilisation de la NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 avec d'autres sources n'a pas été évaluée et les caractéristiques de performance pour d'autres types d'échantillons sont inconnues.
- Dans la mesure où la détection des EBV dépend généralement du nombre de particules virales présentes dans l'échantillon, la fiabilité des résultats obtenus est fonction de la qualité du prélèvement, de la manipulation et du stockage des échantillons.
- La collecte, manipulation ou conservation inappropriée des échantillons, ainsi que les erreurs techniques ou les erreurs d'identification des tubes à échantillons, peut entraîner des résultats erronés. En outre, des faux négatifs peuvent se produire lorsque le nombre de particules virales présentes dans l'échantillon est inférieur à la limite de détection du NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0.
- L'utilisation du NeuMoDx System est limitée au personnel formé à son utilisation.
- Si les cibles de l'EBV et du SPC1 ne sont pas amplifiées, le résultat est non valide (Indeterminate [Indéterminé] ou Unresolved [Non résolu]) et le test doit être répété.
- Si une erreur système se produit avant la fin du traitement des échantillons, une erreur « No Result » (Aucun résultat) s'affichera et le test devra être répété.

8. Si l'événement d'ADN d'EBV détecté était supérieur à l'ULOQ, le NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 peut être répété avec une aliquote diluée de l'échantillon d'origine. Une dilution de 1:100 ou 1:1 000 dans du plasma négatif à EBV ou dans du Basematrix 53 Diluent (Basematrix, SeraCare®, Milford, MA) est recommandée. Le système calcule automatiquement la concentration de l'échantillon d'origine comme suit : Concentration de l'échantillon d'origine = log₁₀ (facteur de dilution) + concentration rapportée de l'échantillon dilué, à condition que le facteur de dilution ait été correctement sélectionné dans le logiciel avant la répétition.
9. La présence d'inhibiteurs de la PCR dans le plasma peut entraîner une erreur de quantification du système ; si cela se produit, il est recommandé de répéter le test avec le même échantillon dilué à 1:10 ou 1:100 dans du Basematrix.
10. Un résultat positif indique la présence de l'ADN d'EBV.
11. Bien que la possibilité soit faible, des délétions ou des mutations dans les régions conservées ciblées par le NeuMoDx EBV Quant Assay peuvent affecter la détection et/ou la quantification et pourraient conduire à un résultat erroné.
12. Les résultats du NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 doivent être utilisés en complément des observations cliniques et des autres informations à la disposition du médecin ; le test n'est pas conçu pour diagnostiquer une infection.
13. Il est recommandé d'observer les bonnes pratiques de laboratoire, comme le changement des gants entre chaque manipulation d'échantillons patient, afin d'éviter la contamination.

TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Les résultats disponibles peuvent être consultés ou imprimés à partir de l'onglet « Results » (Résultats) de la fenêtre Results (Résultats) sur l'écran tactile du NeuMoDx System. Les résultats du NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 sont générés automatiquement par le logiciel du NeuMoDx System à l'aide d'un algorithme de décision et des paramètres de traitement des résultats spécifiés dans le fichier de définition du NeuMoDx EBV Quant Assay (EBV Quant ADF version 4.0.0 ou ultérieure). Un résultat du NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 peut être rapporté comme étant Negative (Négatif), Positive (Positif) avec une concentration d'ADN d'EBV rapportée, Indeterminate (Indéterminé), No Result (Sans résultat) ou Unresolved (Non résolu), en fonction de l'état d'amplification de la cible et du contrôle du processus de l'échantillon. Les rapports sont basés sur l'algorithme de décision de traitement des résultats de l'ADF, résumés ci-dessous dans le *tableau 1*.

Tableau 1 : Interprétation des résultats du NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0

Résultat	Cibles EBV	Contrôle des processus de traitement d'échantillons (Sample Process Control, SPC1)
Positive (Positif)	AMPLIFIED (AMPLIFIÉ) [2 ≤ Ct < 28 AND (ET) EPR > 1.3 AND (ET) EP > 1200] OR (OU) [28 < Ct < 38 AND (ET) EP > 1200]	S. O.
Positive (Positif), au-dessus de la limite de quantification supérieure [ULOQ] (Log₁₀ UI/ml)	[CONC] > 8,0 Log ₁₀ UI/ml, NO QUANT (PAS DE QUANTIFICATION)	S. O.
Positive (Positif), au-dessous de la limite de quantification inférieure [LLOQ] (Log₁₀ UI/ml)	[CONC] < 1,48 Log ₁₀ UI/ml, NO QUANT (PAS DE QUANTIFICATION)	S. O.
Negative (Négatif)	NOT AMPLIFIED (NON AMPLIFIÉ) S. O. OR (OU) [2 ≤ Ct < 28 AND (ET) EPR ≤ 1,3 AND (ET) EP > 1200] OR (OU) [28 ≤ Ct < 38 AND (ET) EP > 1200] OR (OU) Ct > 38	AMPLIFIED (AMPLIFIÉ) [29 < Ct < 35 et EP ≥ 2000]
No Result* (Aucun résultat)	Not Amplified; System Error Detected; Sample Processing Aborted (Non amplifié ; erreur système détectée ; traitement des échantillons abandonné)	
Indeterminate* (Indéterminé)	Not Amplified; System Error Detected; Sample Processing Completed (Non amplifié ; erreur système détectée ; traitement des échantillons terminé)	
Unresolved* (Non résolu)	Not Amplified, No System Error Detected (Non amplifié, aucune erreur système détectée)	

EP = End Point Fluorescence (Fluorescence au point final) ; EPR = End Point Fluorescence Ratio (Rapport de fluorescence au point final) ; C_t = Cycling Threshold (Cycle seuil) ;

Quant = quantité calculée d'EBV présent exprimée en log₁₀ UI/ml. Voir la section Calcul du test ci-dessous.

* Le système prévoit en option une capacité Rerun/Repeat (Réexécuter/répéter) pour permettre le retraitement automatique des résultats non valides afin de réduire les délais de transmission de ces résultats.

Calcul du test : Échantillons

1. Pour les échantillons de la gamme linéaire du NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0, la concentration en ADN d'EBV dans les échantillons est calculée avec la courbe d'étalonnage enregistrée et avec le coefficient d'étalonnage.
 1. Un coefficient d'étalonnage est calculé d'après les résultats des NeuMoDx EBV Calibrators traités pour établir la validité de la courbe d'étalonnage, pour un lot particulier de NeuMoDx EBV Quant Test Strips 2.0, sur un NeuMoDx System spécifique.
 2. Le coefficient d'étalonnage est automatiquement intégré par le système dans la détermination finale de la concentration de l'ADN de l'EBV.
2. Les résultats du NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 sont exprimés en UI/ml et Log₁₀ UI/ml.
3. La quantification obtenue des échantillons inconnus est traçable à la 1^{re} norme étalon internationale de l'OMS pour le virus d'Epstein-Barr pour les techniques d'amplification d'acide nucléique.

Calcul du test : Étalons

Un étalonnage valide basé sur la courbe d'étalonnage est nécessaire pour quantifier l'ADN d'EBV dans les échantillons. Pour générer des résultats valides, il faut effectuer un étalonnage du test avec les étalons fournis par NeuMoDx Molecular, Inc.

1. Les NeuMoDx EBV Calibrators sont fournis dans un kit [RÉF 800501] ; ils contiennent une cible d'EBV non infectieux préparée dans du Basematrix.
2. Un ensemble d'EBV Calibrators doit être traité avec chaque nouveau lot de NeuMoDx EBV Quant Test Strips 2.0, ou si un nouveau fichier de définition du test de l'EBV est téléchargé dans le NeuMoDx System, si la période de validité de l'ensemble actuel d'étalons est dépassée (définie à 90 jours) ou si le logiciel du NeuMoDx System est modifié.
3. Le logiciel du NeuMoDx System indique à l'utilisateur quand il convient de traiter les étalons. Vous ne pouvez pas utiliser de nouveau lot de bandes de test tant que les étalons n'ont pas été correctement traités.
4. La validité de l'étalonnage est établie comme suit :
 1. Un ensemble de deux étalons – fortement et faiblement positifs – doit être traité pour établir la validité.
 2. Pour générer des résultats valides, au moins 2 réplicats sur 3 doivent donner des résultats conformes aux paramètres prédéfinis. La cible nominale de l'étalon faible est de 3 Log₁₀ UI/ml et la cible nominale de l'étalon fort est 5 Log₁₀ UI/ml.
 3. Un coefficient d'étalonnage est calculé de façon à tenir compte de l'écart attendu entre les lots de bandes de test, ce coefficient permet de déterminer la concentration finale de l'ADN d'EBV.
5. Si un étalon ou les deux échouent au contrôle de validité, répétez le traitement du ou des étalons en question avec un nouveau flacon. Si un étalon échoue au contrôle de validité, il est possible de répéter uniquement celui-là, car le système n'a pas besoin que l'utilisateur traite de nouveau les deux étalons.
6. Si le ou les étalons échouent au contrôle de validité une deuxième fois consécutive, contactez l'assistance technique de QIAGEN.

Résultats non valides

Si un NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 effectué sur le NeuMoDx System ne produit pas un résultat valide, il sera rapporté comme Indéterminé, Pas de résultat ou Non résolu ; selon le type d'erreur qui s'est produit, le test doit être répété pour obtenir un résultat valide.

Un résultat Indeterminate (Indéterminé) est rapporté si une erreur du NeuMoDx System est détectée pendant le traitement de l'échantillon. Dans le cas d'un résultat Indeterminate (Indéterminé), il est recommandé de répéter le test.

Un résultat No Result (Aucun résultat) est rapporté si une erreur du NeuMoDx System est détectée et si le traitement de l'échantillon est abandonné. Dans le cas d'un résultat No Result (Aucun résultat), il est recommandé de répéter le test.

Un résultat Unresolved (Non résolu) est rapporté si aucune cible n'est détectée et s'il n'y a pas d'amplification du contrôle des processus de traitement d'échantillons, ce qui indique une possible défaillance des réactifs ou la présence d'inhibiteurs. En cas de résultat Unresolved (Non résolu), il est recommandé de d'abord répéter le test. Si la répétition du test échoue, il est possible d'utiliser un échantillon dilué afin d'atténuer les effets d'une inhibition éventuelle (voir la section sur les limitations pour de plus amples instructions).

Voir le Manuel d'utilisation du NeuMoDx 288 Molecular System (N° de réf. : 40600108) ou le manuel d'utilisation du NeuMoDx 96 Molecular System (N° de réf. : 40600317) pour obtenir une liste des codes d'erreur qui peuvent être associés à des résultats non valides.

Contrôle qualité

Les réglementations locales spécifient normalement que le laboratoire a la responsabilité d'exécuter des procédures de contrôle permettant de vérifier l'exactitude et la précision de l'ensemble du processus d'analyse et qu'il doit établir le nombre, le type et la fréquence des tests de matériaux de contrôle en respectant les spécifications de performances approuvées pour un système de tests homologué et non modifié.

Contrôles externes

1. Les contrôles externes contenant une cible EBV encapsulée non infectieuse dans Basematrix pour les contrôles positifs, ou Basematrix pour les contrôles négatifs, sont fournis par QIAGEN dans un kit contenant les NeuMoDx EBV External Control [RÉF. 900502].
2. Les contrôles externes positifs et négatifs doivent être traités une fois toutes les 24 heures. Si l'utilisateur ne dispose pas d'un ensemble de contrôles externes valides, le logiciel du NeuMoDx System l'invite à traiter ces contrôles avant que les résultats de l'échantillon soient rapportés :

NeuMoDx EBV External Controls	Concentration attendue	Couleur de l'étiquette
NeuMoDx EBV High Positive Control (C1EBV)	1,5E4 UI/ml (4,18 Log ₁₀ UI/ml)	Rouge
NeuMoDx EBV Low Positive Control (C2EBV)	150 UI/ml (2,18 Log ₁₀ UI/ml)	Grise
NeuMoDx EBV Negative Control (NCEBV)	S. O.	Noire

- Lors du traitement des contrôles externes, placer les contrôles dans un porte-tubes à prélèvement et utiliser l'écran tactile pour charger le porte-tubes dans le NeuMoDx System depuis la tablette du chargeur automatique. Le NeuMoDx System reconnaît les code-barres et commence à traiter contrôles, sauf si les réactifs ou les consommables nécessaires à l'analyse ne sont pas disponibles.
- Le NeuMoDx System évalue la validité de ces contrôles externes en fonction des résultats attendus.

NeuMoDx EBV External Controls	Résultat EBV Quant	Résultat SPC1
NeuMoDx EBV High Positive Control (C1EBV)	EBV POSITIVE (POSITIF EBV) [Conc] 3,68 – 4,68 Log ₁₀ UI/ml	SPC1 positif
NeuMoDx EBV Low Positive Control (C2EBV)	EBV POSITIVE (POSITIF EBV) [Conc] 1,58 – 2,78 Log ₁₀ UI/ml	SPC1 positif
NeuMoDx EBV Negative Control (NCEBV)	EBV NEGATIVE (NÉGATIF VEB)	SPC1 positif

- Les résultats discordants pour les contrôles externes doivent être traités comme suit :
 - Un résultat Positive (Positif) rapporté pour un échantillon de contrôle négatif peut indiquer une contamination et les procédures de contrôle de la qualité du laboratoire doivent être examinées pour trouver la cause profonde. Veiller à utiliser des zones séparées pour la préparation des échantillons, la manipulation des contrôles et la mise en place de la RT-PCR. Se reporter au *manuel d'utilisation du NeuMoDx 288 ou 96 Molecular System* pour des conseils de dépannage supplémentaires.
 - Un résultat Negative (Négatif) rapporté pour un échantillon de contrôle positif peut indiquer qu'il y a un problème avec un réactif ou un instrument.
 - Dans l'un ou l'autre des cas ci-dessus, ou en cas de No Result (Absence de Résultat, NR), de Unresolved (Résultat non Résolu, UNR) ou de Indeterminate (Résultat Indéterminé, IND), répéter le contrôle qui a échoué avec des flacons fraîchement décongelés du ou des contrôles qui ont échoué le test de validité.
 - Si le contrôle externe positif continue à rapporter un résultat Negative (Négatif), contactez l'assistance technique de QIAGEN.
 - Si le contrôle externe négatif continue à rapporter un résultat Positive (Positif), essayer d'éliminer toutes les sources de contamination potentielle, notamment en remplaçant tous les réactifs, et répéter l'essai avant de contacter l'assistance technique de QIAGEN.
- Si les contrôles externes ne donnent pas les résultats escomptés, il est nécessaire de répéter un ensemble de contrôles positifs et négatifs. Les résultats des échantillons ne seront pas rapportés si les contrôles ne donnent pas les résultats attendus.
- Le NeuMoDx System est équipé d'une fonction automatique de réexécution/répétition que l'utilisateur peut choisir d'utiliser pour s'assurer qu'un résultat INVALID (NON VALIDE) est automatiquement retraité afin de minimiser les retards dans le rapport des résultats.

Contrôles (internes) des traitements d'échantillons

Un contrôle des processus de traitement d'échantillons (Sample Process Control, SPC1) exogène est intégré à la NeuMoDx Extraction Plate, et il subit tout le processus d'extraction de l'acide nucléique et d'amplification par RT-PCR en temps réel avec chaque échantillon/contrôle/étalon. Les amorces et la sonde spécifiques au SPC1 sont incluses dans chaque NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0. Ce SPC1 permet au NeuMoDx System d'analyser l'efficacité des processus d'extraction de l'ADN et d'amplification par RT-PCR.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCES

SENSIBILITÉ ANALYTIQUE – Limite de détection

La sensibilité analytique du NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 a été caractérisée en deux étapes séquentielles : 1. Évaluation préliminaire de la limite de détection (Limit of Detection, LoD) (analyse Probit) suivie de 2. Confirmation de la LoD. Dans la première partie, des échantillons négatifs et une série de dilutions de la 1^{re} norme internationale de l'OMS dans du plasma humain dépisté EBV négatif ont été testés pour déterminer le LoD préliminaire sur les NeuMoDx Systems. La LoD préliminaire a été définie comme le niveau minimal de concentration en cible détecté à un taux de 95 % selon une analyse Probit. Dans la partie 2, le LoD préliminaire a été confirmé en testant un panel artificiel au niveau de la LoD. Les deux phases de l'étude ont été réalisées en 3 jours sur plusieurs systèmes avec plusieurs lots de réactifs NeuMoDx. Dans la partie 1, un total de 144 répliques à chaque niveau de dilution a été traité. Les taux de détection sont représentés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Détermination préliminaire de la LoD du NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0

Concentration en cible [UI/ml]	Concentration en cible [log ₁₀ UI/ml]	PLASMA		
		Nombre de tests valides	Nombre de positifs	Taux de détection
35	1,54	144	139	96,5 %
30	1,48	144	140	97,2 %
25	1,40	143	133	93,0 %
10	1,00	144	97	67,4 %
5	0,70	143	75	52,4 %
NÉG	---	144	0	0,0 %

La LoD du NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 dans le plasma à l'aide de la 1^{re} norme internationale de l'OMS pour l'EBV était de 29,3 UI/ml (1,47 log₁₀ UI/ml) avec un intervalle de confiance à 95 % (IC) de 24,4 à 37,1 UI/ml, (1,39 à 1,57 log₁₀ UI/ml) [Figure 1]. Cette LoD a été confirmée par la suite par l'analyse du taux de réussite, comme le montre le tableau 3.

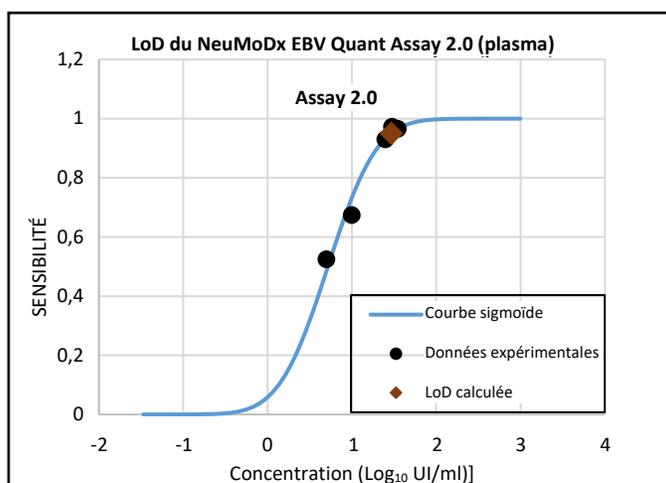


Figure 1 : Analyse de type Probit utilisée pour déterminer la LoD du test NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 dans les échantillons de plasma

Tableau 3 : Confirmation par la LoD du NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0

Système	Concentration en cible [UI/ml]	Concentration en cible [log ₁₀ UI/ml]	Nombre de tests valides	Nombre de positifs	Taux de détection
N96	29,3	1,47	96	94	97,9 %
N288			96	92	95,8 %
Tout			192	186	96,9 %

La LoD du génotype EBV 2 (GT2) a été confirmé à 29,3 UI/ml [1,47 Log₁₀ UI/ml] par l'analyse du taux de détection.

Sur la base des résultats des deux études, la LoD du NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 a été déterminé comme étant de 29,3 UI/ml [1,47 Log₁₀ UI/ml].

SENSIBILITÉ ANALYTIQUE – Limite de quantification inférieure (Lower Limit of Quantitation, LLoQ)

La LLoQ est définie comme le niveau cible minimal auquel la détection de > 95 % est obtenue ET le nombre total d'erreurs d'analyse (Total Analytical Error, TAE) est de ≤ 1,0. Pour déterminer la LLoQ, le TAE a été calculé pour chacun des niveaux cibles de l'EBV dont il a été démontré qu'ils rapportaient une détection > 95 % dans le cadre du calcul de la LoD. La TAE est définie comme suit :

$$\text{TAE} = \text{biais} + 2 \cdot \text{ÉT} \text{ (statistique de Westgard)}$$

Le biais est la valeur absolue de la différence entre la moyenne de la concentration calculée et la concentration attendue. ÉT indique l'écart-type de la valeur quantifiée de l'échantillon.

Les résultats compilés pour les 5 niveaux de la 1^{re} norme internationale de l'OMS pour les échantillons de plasma EBV utilisés dans l'étude LLoQ sont présentés dans le *tableau 4*. Sur la base de cet ensemble de données et de la LoD déterminée précédemment, la LLoQ a été déterminée comme étant de 30,0 UI/ml (1,48 Log₁₀ UI/ml) et a été confirmée par la suite pour le génotype EBV 2 (GT2).

Tableau 4 : LLoQ du NeuMoDx EBV Quant Assay, avec le biais et le TAE

Conc. cible [UI/ml]	Conc. cible [log ₁₀ UI/mL]	Plasma				
		Conc. moyenne [log ₁₀ UI/mL]	Taux de détection	ÉT	Biais	TAE
35	1,54	2,05	96,5 %	0,23	0,50	0,96
30	1,48	1,97	97,2 %	0,24	0,49	0,98
25	1,40	1,93	93,0 %	0,24	0,53	1,02
10	1,00	1,96	67,4 %	0,31	0,96	1,59
5	0,70	1,83	52,4 %	0,27	1,13	1,68

Sur la base des résultats de ces études, la LoD du NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 a été déterminée à 29,3 IU/ml (1,47 log₁₀ IU/ml) et la LLoQ a été déterminée à 30,0 IU/ml [1,48 log₁₀ IU/ml].

Linéarité et détermination de la limite de quantification supérieure (Upper Limit of Quantitation, ULoQ)

La linéarité et la limite de quantification supérieure (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) du NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 ont été établies dans le plasma en préparant une série de dilution avec la cible d'EBV encapsulée NeuMoDx et la culture d'EBV ATCC (ATCC, Manassas, VA). La traçabilité à la 1^{re} norme internationale de l'OMS pour l'EBV a été établie pour toutes les normes secondaires avant les tests. Un panel de 10 échantillons a été préparé dans du plasma négatif à EBV poolé pour créer un panel susceptible de couvrir une plage de concentration de 1,48 à 8,0 Log₁₀ UI/ml. L'ULoQ du NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 a été déterminée à 8,0 Log₁₀ UI/ml. Un panel de confirmation permettant d'évaluer la linéarité de la courbe d'étalonnage a été préparé, et les concentrations des dosages d'EBV rapportées par le NeuMoDx System comparées aux valeurs attendues sont présentées dans la *figure 2*.

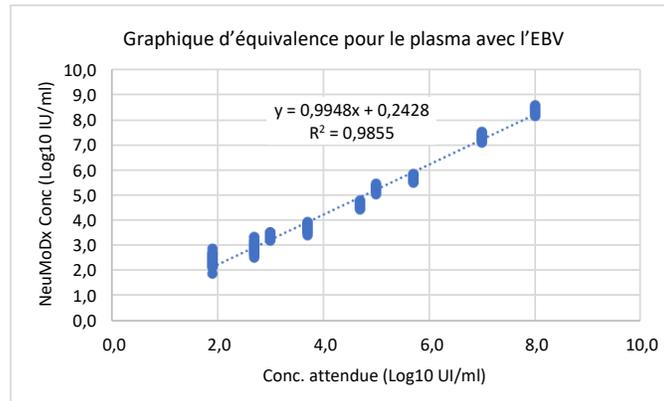


Figure 2 : Linéarité du NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0

Linéarité du génotype EBV 2 (GT2)

La linéarité du dosage NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 pour le génotype 2 (GT2) d'EBV a été caractérisée en testant onze concentrations différentes d'EBV GT2, dont la traçabilité est établie par la 1^{re} norme internationale de l'OMS pour l'EBV, préparées dans un pool de plasma négatif pour l'EBV. L'étude a été réalisée en testant 36 réplicats à 11 concentrations sur 2 NeuMoDx Systems et 3 lots de EBV Quant Test Strips 2.0. La linéarité pour le génotype EBV 2 (GT2) est présentée dans le *tableau 5* et la *figure 3*.

Tableau 5 : Linéarité du NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 pour le génotype EBV 2

Génotype	Équation de linéarité y = quantification du NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 x = quantification attendue	R ²
GT2	y = 0,9965x – 0,0982	0,9761

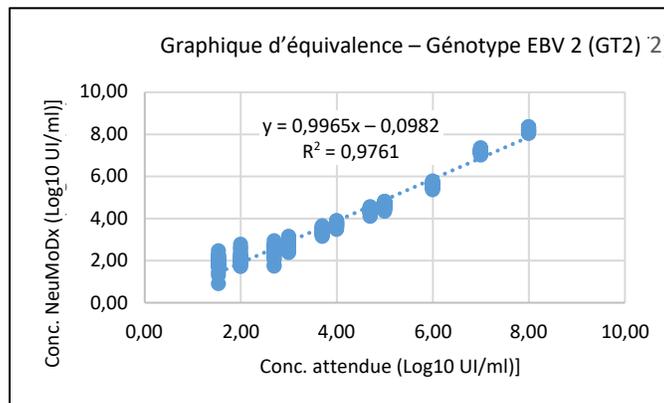


Figure 3 : Linéarité du NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 pour le génotype EBV 2

Spécificité analytique – Réactivité croisée

La spécificité analytique a été démontrée par le dépistage de 36 organismes susceptibles d'être présents dans les échantillons de sang/plasma ainsi que d'espèces phylogénétiquement équivalentes à l'EBV afin de tester la réactivité croisée. Les organismes à forte concentration ont été préparés dans des pools de 5 à 6 organismes. Les organismes testés sont affichés dans le *tableau 6*. Aucune réactivité croisée n'a été observée avec les organismes testés, confirmant une spécificité analytique de 100 % pour le NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0.

Tableau 6 : Agents pathogènes utilisés pour démontrer la spécificité analytique

Organismes non cibles					
Polyomavirus BK	Adénovirus de type 5	Virus herpes simplex de type 1	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Cytomégalovirus	Virus de l'hépatite C	Virus herpes simplex de type 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Herpèsvirus humain de type 6	Parvovirus B19	Virus de la varicelle et du zona	<i>Escherichia coli</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Herpèsvirus humain de type 7	Virus JC	VIH 1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Candida albicans</i>
Herpèsvirus humain de type 8	Papillomavirus humain 16	VIH 2	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Virus de l'hépatite B	Papillomavirus humain 18	SV 40	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>

Spécificité analytique – Substances interférentes, organismes commensaux

Les interférences du NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 ont été évaluées en présence d'organismes non cibles à l'aide des mêmes pools d'organismes préparés pour tester la réactivité croisée qui sont indiqués dans le *tableau 6*. Du plasma négatif à EBV a été enrichi avec des organismes poolés en groupes de 4 à 7 ; ces pools ont été enrichis avec une cible d'EBV à une concentration de UI/ml 90 UI/ml [1,95 Log₁₀ UI/ml]. Aucune interférence notable n'a été observée en présence de ces organismes, comme l'indique l'écart minimal de quantification par rapport aux échantillons de contrôle qui ne contenaient aucun agent interférent.

Spécificité analytique – Substances interférentes, substances endogènes et exogènes

Les performances du NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 ont été évaluées en présence de substances interférentes endogènes et exogènes fréquemment observées dans les échantillons cliniques de plasma avec EBV. Ces substances comprenaient des composants sanguins à des taux anormalement élevés ainsi que des médicaments antiviraux et immunosuppresseurs courants, classés dans le *tableau 7*. Chaque substance a été ajoutée à du plasma humain testé négatif pour l'EBV et enrichi à l'EBV à 90 UI/ml [1,95 Log₁₀ UI/ml], et les échantillons ont été analysés pour détecter les interférences en comparant la concentration rapportée au contrôle positif. En outre, un plasma à un stade classique de la maladie associée à une infection à EBV a été testé pour d'éventuelles interférences. La concentration moyenne et le biais de toutes les substances testées, par rapport aux échantillons de contrôles enrichis avec la même concentration d'EBV, sont indiqués dans le *tableau 8*. Aucune des substances exogènes et endogènes n'a affecté la spécificité du NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0.

Tableau 7 : Tests d'interférences – Agents exogènes (classifications des médicaments)

Pool	Nom du médicament	Classification	Pool	Nom du médicament	Classification
Pool 1	Azathioprine	Immunosuppresseur	Pool 4	Triméthoprime	Antibiotique
	Cyclosporine	Immunosuppresseur		Vancomycine	Antibiotique
	Foscarnet	Antiviral (Herpèsvirus)		Tacrolimus	Immunosuppresseur
	Ganciclovir	Antiviral (EBV)		Évérolimus	Immunosuppresseur
	Chlorhydrate de valganciclovir	Antiviral (EBV)		Clavulanate de potassium	Antibiotique
Pool 2	Prednisone	Corticostéroïde/ immunosuppresseur	Pool 5	Famotidine	Antagoniste du récepteur de l'histamine
	Cidofovir	Antiviral (EBV)		Sulfaméthoxazole	Antibiotique
	Céfotétan	Antibiotique (large spectre)		Valaciclovir	Antiviral (Herpèsvirus)
	Céfotaxime	Antibiotique (large spectre)		Létermovir	Antiviral (EBV)
	Fluconazole	Antifongique		Ticarilline disodique	Antibiotique
Pool 3	Mycophénolate mofétil	Immunosuppresseur		Léflunomide	Immunosuppresseur
	Mycophénolate sodique	Immunosuppresseur			
	Pipéracilline	Antibiotique			
	Sirolimus/rapamycine	Immunosuppresseur			
	Tazobactam	Antibiotique modifié			

Tableau 8 : Test d'interférence – Agents endogènes et exogènes

Endogène + état pathologique	Conc. moyenne	Biais
	Log ₁₀ UI/ml	Log ₁₀ UI/ml
Hémoglobine	2,19	0,32
Triglycérides	1,90	0,02
Bilirubine	2,12	0,24
Albumine	1,95	0,07
Lupus érythémateux systémique (LES)	2,08	0,20
Anticorps antinucléaire (AAN)	2,36	0,48
Polyarthrite rhumatoïde (PAR)	1,89	0,01
Contrôle positif	1,88	S. O.
Exogènes (médicaments)	Conc. moyenne	Biais
	Log ₁₀ UI/ml	Log ₁₀ UI/ml
Pool 1 : azathioprine, cyclosporine, foscarnet, ganciclovir, chlorhydrate de valganciclovir	2,19	0,09
Pool 2 : prednisone, cidofovir, céfotétan, céfotaxime, fluconazole	2,11	0,01
Pool 3 : mycophénolate mofétil, mycophénolate sodique, pipéracilline, sirolimus/rapamycine, tazobactam	2,16	0,06
Pool 4 : triméthoprime, vancomycine, tacrolimus, évérolimus, clavulanate de potassium	2,24	0,14
Pool 5 : famotidine, sulfaméthoxazole, létermovir, valacyclovir, ticarcilline disodique, léflunomide	2,26	0,16
Contrôle positif	2,10	S. O.

Précision intralaboratoire

La précision du NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 a été déterminée en testant 3 répliques d'un panel de 6 échantillons d'EBV préparés avec le NeuMoDx EBV Positive Control et la culture d'EBV (ATCC, Manassas, VA) deux fois par jour, en utilisant deux NeuMoDx 288 Systems et deux NeuMoDx 96 Systems pendant 12 jours. Les précisions intra-analyse, intrajournalière et intrasystème ont été caractérisées, et un écart-type total $\leq 0,18$ Log₁₀ UI/ml a été déterminé. Une excellente précision a été observée entre les systèmes, les jours et les analyses comme indiqué dans le *Tableau 9*. La précision interopérateurs n'a pas été définie, car l'opérateur ne joue pas un rôle prépondérant dans le traitement des échantillons avec le NeuMoDx System.

Tableau 9 : Précision intralaboratoire – NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 sur les NeuMoDx Systems

Conc. EBV cible [Log ₁₀ UI/ml]	Conc. EBV moyenne [Log ₁₀ UI/ml]	ÉT intrasystème	ÉT intrajournalier	ÉT intra-analyse	ÉT global (intralaboratoire)
7,70	7,82	0,10	0,08	0,08	0,11
6,00	6,07	0,12	0,11	0,11	0,13
5,00	4,75	0,13	0,12	0,11	0,13
4,00	3,78	0,13	0,11	0,11	0,14
3,00	2,93	0,15	0,14	0,13	0,16
1,95	2,19	0,17	0,16	0,16	0,18

Reproductibilité d'un lot à l'autre

La reproductibilité lot à lot du NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 a été déterminée en évaluant 3 lots de NeuMoDx EBV Quant Test Strips 2.0 dans le cadre de l'étude Within Lab Precision. Un panel de 6 échantillons de plasma positif à EBV a été utilisé pour évaluer les performances (*tableau 10*). Les résultats générés par l'ensemble des lots ont été analysés et présentés dans le *tableau 10*. Le biais maximal était de 0,29 Log₁₀ UI/ml, et l'écart-type maximal était de 0,18 Log₁₀ UI/ml pour les NeuMoDx EBV Quant Assay Test Strips 2.0. Des performances équivalentes ont été observées entre les lots, car la quantification de tous les éléments du panel était dans la spécification de tolérance.

Tableau 10 : Reproductibilité interlots – NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0, Test Strip

Conc. attendue (Log ₁₀ UI/ml)	Lot 1			Lot 2			Lot 3		
	Conc. moy. (Log ₁₀ UI/ml)	ÉT Log de conc.	Biais abs	Conc. moy. (Log ₁₀ UI/ml)	ÉT Log de conc.	Biais abs	Conc. moy. (Log ₁₀ UI/ml)	ÉT Log de conc.	Biais abs
7,70	7,82	0,11	0,12	7,84	0,10	0,14	7,79	0,09	0,09
6,00	6,08	0,12	0,08	6,10	0,10	0,10	6,04	0,10	0,04
5,00	4,77	0,13	0,23	4,78	0,13	0,22	4,71	0,10	0,29
4,00	3,80	0,15	0,20	3,81	0,13	0,19	3,74	0,11	0,26
3,00	2,96	0,16	0,04	2,96	0,15	0,04	2,87	0,16	0,13
1,95	2,20	0,18	0,25	2,22	0,18	0,27	2,16	0,16	0,21

Efficacité du contrôle des processus de traitement d'échantillons

Le contrôle des processus de traitement d'échantillons (Sample Process Control, SPC1) est inclus dans le NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 pour mettre en évidence une éventuelle défaillance dans les étapes de traitement ou une inhibition compromettant les performances du dosage. En prenant le NeuMoDx CMV Quant Assay comme modèle, l'efficacité du SPC1 a été testée pour les échantillons de plasma dans des conditions représentatives des défaillances affectant les étapes de traitement critiques susceptibles de se produire lors du traitement de l'échantillon et qui *pourraient ne pas être détectées* par les capteurs de contrôle des performances du NeuMoDx System. Les échantillons positifs (à 3 Log₁₀ UI/ml) et négatifs au cytomégalovirus ont été testés dans les conditions suivantes : présence d'inhibiteur, aucun lavage effectué et pas d'expulsion de la solution de lavage. Les inefficacités de traitement ayant eu un effet indésirable sur la détection/quantification de la cible virale ont été reflétées par les performances de la cible du SPC1, comme indiqué dans le *tableau 11*. Dans tous les cas testés, il a été démontré que soit le contrôle des processus de traitement d'échantillons permettait de détecter correctement les inefficacités du traitement et la présence d'inhibiteurs, soit que l'inefficacité anticipée du traitement n'avait aucun effet indésirable sur la détection du SPC1 ou sur la détection et la quantification de la cible virale. Par conséquent, l'efficacité du SPC1 a été démontrée pour le contrôle des performances du dosage sur le NeuMoDx System.

Tableau 11 : Efficacité du contrôle des processus des échantillons pour l'ADN viral dans le plasma*

Défaillance d'étape de traitement testée	Statut d'amplification du contrôle des processus de traitement d'échantillons 1	Statut d'amplification de la cible du CMV	Résultat du dosage
Presence of Inhibitor (Présence d'inhibiteur)	Not Amplified (Non amplifié)	Not Amplified (Non amplifié)	Unresolved (Non résolu)
No Wash Delivered (Aucun lavage effectué)	Not Amplified (Non amplifié)	Not Amplified (Non amplifié)	Unresolved (Non résolu)
No Wash Blowout (Pas d'expulsion de la solution de lavage)	Amplified (Amplifié)	Amplified (Amplifié)	Positive (Positif) avec une quantification à 0,3 Log ₁₀ UI/ml du contrôle

*Le cytomégalovirus (CMV) dans des échantillons de plasma a été utilisé comme système de modèle pour l'évaluation de l'efficacité du contrôle des processus de traitement de l'échantillon.

Contamination croisée

Le taux de contamination croisée pour les échantillons de plasma a été déterminé en traitant des échantillons fortement positifs et négatifs d'EBV. Cinq séries de ces tests sur plaque de microtitration ont été effectuées avec un total de 60 répliquats de plasma négatif à l'EBV et 60 répliquats de plasma additionné de l'EBV à 6.0 Log₁₀ UI/ml sur les NeuMoDx 288 et 96 Molecular Systems. Dans les deux types de systèmes, les 120 répliquats de l'échantillon négatif ont tous été rapportés comme négatifs, indiquant l'absence de contamination croisée lors du traitement de l'échantillon de plasma sur les NeuMoDx System.

Équivalence des matrices d'échantillons

Des tests ont été effectués pour démontrer l'équivalence entre les échantillons de plasma frais et congelés en utilisant un virus à diffusion hémotogène similaire, le CMV, comme modèle. Les échantillons frais ont été maintenus à 4 °C jusqu'à ce qu'on leur ajoute trois niveaux de CMV et que l'équivalence soit testée. Les échantillons ont été congelés pendant un minimum de 24 heures à -20 °C. Après cette période de stockage congelé, les échantillons ont été décongelés et retestés. Les résultats des échantillons de plasma frais et congelé ont été comparés pour l'équivalence par analyse de régression. Les données ont démontré une excellente équivalence entre les échantillons de plasma frais et congelés avec une pente de 1,0 et un biais très faible (ordonnée à l'origine), comme indiqué dans le *tableau 12* ci-dessous.

Tableau 12 : Équivalence des matrices d'échantillons

Paramètre requis	Frais vs congelé avec EDTA
Pente [0,9-1,1]	1,000
Ordonnée à l'origine < 0,5 Log ₁₀ UI/ml	0,020
Valeur <i>p</i> > 0,05	0,631

Caractérisation quantitative de la performance

La performance quantitative du NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 a été caractérisée en traitant deux panels de vérification d'EBV du commerce AcroMetrix et Exact Diagnostics (traçables à la 1^{re} norme internationale de l'OMS pour l'EBV) sur les NeuMoDx Molecular Systems.

Une excellente corrélation a été obtenue entre le NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 et les deux panels de vérification de l'EBV du commerce (Figure 4) après analyse avec la courbe de régression de Deming (Figure 4A) ou la méthode de Passing-Bablok (Figure 4B).

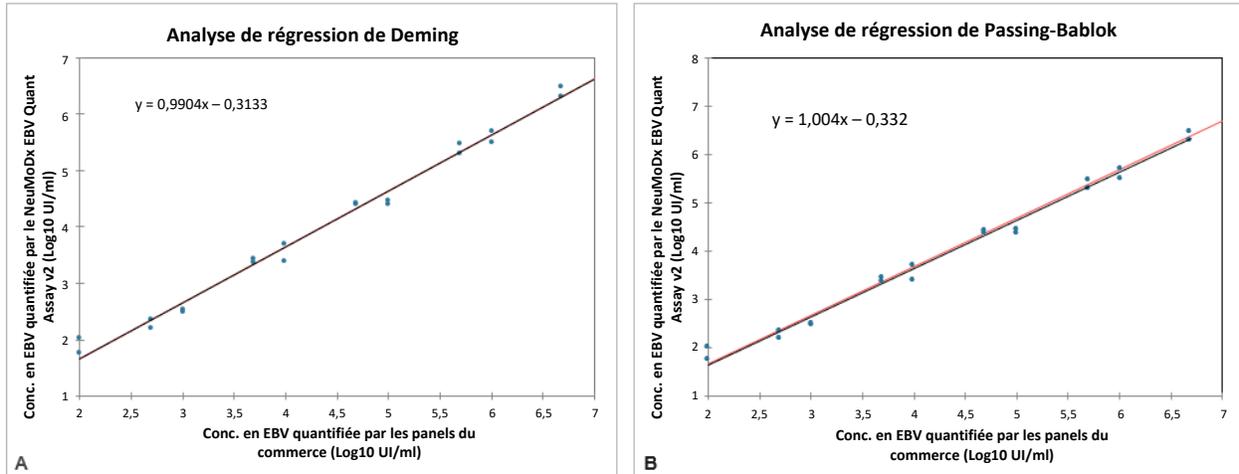


Figure 4. Graphique d'équivalence entre les panels de vérification AcroMetrix et Exact Diagnostics et le NeuMoDx EBV Quant Assay. A. Analyse de régression linéaire avec la méthode de Deming. B. Analyse de régression linéaire avec la méthode de Passing-Bablok.

La qualité de la courbe de régression de Deming est illustrée par un coefficient de pente global de 0,990 et une ordonnée à l'origine (biais) de -0,313, ce qui prouve que les résultats de concentration obtenus entre le NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 et les panels de vérification d'EBV sont fortement corrélés et présentent un biais acceptable. La courbe linéaire de Passing-Bablok confirme également l'importance de la corrélation entre les résultats obtenus avec le NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 et les panels de vérification d'EBV avec un coefficient de pente global de 1,004 et une ordonnée à l'origine (biais) de -0,332. La valeur *p* de l'analyse de Passing-Bablok a été calculée pour être de 0,988.

Tableau 13 : Synthèse des analyses de régression linéaire de Deming et de Passing-Bablok

Analyse de Deming		Analyse de Passing-Bablok	
Ordonnée à l'origine	Pente	Ordonnée à l'origine	Pente
-0,313	0,990	-0,332	1,004
IC 95 % (-0,620, -0,007)	IC 95 % (0,928, 1,053)	IC 95 % (-0,548, -0,116)	IC 95 % (0,950, 1,047)

RÉFÉRENCES

1. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*. 2000 Aug 17;343(7):481-92.
2. Epstein-Barr Virus–Positive Posttransplant Lymphoproliferative Disease After Solid Organ Transplantation: Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Management. *Transplant Direct*. 2016 Jan; 2(1): e48.
3. About Epstein-Barr Virus (EBV).” Centers for Disease Control and Prevention, Centers for Disease Control and Prevention, 28 Sept. 2020, www.cdc.gov/epstein-barr/about-ebv.html
4. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
5. Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4; May 2014.

MARQUES COMMERCIALES

NeuMoDx™ est une marque commerciale de NeuMoDx Molecular, Inc.

NeuDry™ est une marque commerciale de NeuMoDx Molecular, Inc.

Seracare® est une marque déposée de Seracare Life Sciences, Inc.

TaqMan® est une marque déposée de Roche Molecular Systems, Inc.

Tous les autres noms de produits, marques commerciales et marques déposées pouvant figurer dans ce document appartiennent à leurs propriétaires respectifs.

SYMBOLES

	Sur ordonnance uniquement		Contient des éléments suffisants pour <n> tests
	Fabricant		Consulter le mode d'emploi
	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>		Attention
	Représentant autorisé au sein de la Communauté européenne		Risque pour la santé
	Numéro de référence		Marquage CE
	Code de lot		Contient
	À utiliser avant		Contient du matériel biologique d'origine animale
	Limite de température		Acide borique
	Ne pas réutiliser		



NeuMoDx Molecular, Inc.
1250 Eisenhower Place
Ann Arbor, MI 48108, USA



Emergo Europe B.V.
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands

Support technique/Rapport de vigilance : support@giagen.com

Brevet : www.neumodx.com/patents

