altona DIAGNOSTICS

Mode d’emploi

AltoStar®
BKV PCR Kit 1.5

04/2022 FR

AltoStar®

AltoStar®

BKV PCR Kit 1.5

Pour utilisation avec

ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)

CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)

CFX96™ Dx System (Bio-Rad)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

CE

IVD

REF AS0031543

Σ 96

04 2022

altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

MAN-AS0031540-FR-S03

Sommaire

1. À propos du présent mode d'emploi ... 9

2. Usage prévu ... 10

3. Contenu du kit ... 11

4. Stockage et manipulation ... 12

4.1 Stockage ... 12

4.2 Manipulation ... 13

4.2.1 Master A et Master B ... 13

4.2.2 Standards de quantification et No Template Control (contrôl négatif) ... 14

5. Description du produit ... 14

5.1 Informations contextuelles ... 15

5.2 Description des composants ... 15

5.2.1 Master A et Master B ... 15

5.2.2 Standard de quantification ... 16

5.2.3 No Template Control (contrôle négatif) ... 16

5.3 Flux de travail ... 16

5.3.1 AltoStar® Workflow (flux de travail) ... 16

5.3.2 Autres flux de travail ... 17

5.3.2.1 Extraction de l'acide nucléique ... 18

5.3.2.2 Instruments PCR en temps réel ... 18

5.4 Échantillons ... 19

5.4.1 Types d'échantillon ... 19

5.4.2 Prélèvement et manipulation des échantillons ... 19

6. Mises en garde, précautions et limites ... 21

7. Utilisation du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 avec l'AltoStar® Workflow (flux de travail) 23

7.1 Volume d'échantillon 23

7.2 Tubes d'échantillon 23

7.3 Codes-barres de l'échantillon 24

7.4 Matériel et dispositifs nécessaires mais non fournis pour l'AltoStar® Workflow (flux de travail) 24

7.5 Matériel et dispositifs généraux 26

7.6 Procédure 27

7.6.1 Présentation de l'AltoStar® Workflow (flux de travail) 27

7.6.2 Programmer un AltoStar® run 33

7.6.3 Démarrer un run de configuration PCR 34

7.6.3.1 Préparer les réactifs pour un run de configuration PCR 35

7.6.3.2 Charger l'AltoStar® AM16 pour un run de configuration PCR 35

7.6.3.3 Pendant le run de configuration PCR 39

7.6.4 Fin du run de configuration PCR 39

7.6.4.1 Résultats du run de configuration PCR 40

7.6.5 Sceller la PCR plate (plaque PCR) 42

7.6.5.1 Stabilité du mélange PCR 44

7.6.6 Démarrer un PCR run 44

7.6.6.1 Pendant le PCR run 45

7.6.6.2 Affecter des essais à des groupes de puits 46

7.6.7 Analyse des données de PCR 49

7.6.7.1 Correction de la référence 51

7.6.7.2 Exclusion des signaux PCR irréguliers 53

7.6.7.3 Definir des seuils 57

7.6.8 Validité des résultats de PCR 61

7.6.8.1 Exclusion des puits contenant des données non valides 61

7.6.8.2 Validité d'un PCR run de diagnostic (qualitatif) 64

7.6.8.3 Validité d'un PCR run de diagnostic (quantitatif) 64
7.6.8.4 Validité des résultats pour un échantillon 66
7.6.9 Exporter les résultats de PCR pour une interprétation automatisée des résultats 66
7.6.10 Exporter les résultats de PCR pour une interprétation manuelle des résultats 67
7.6.10.1 Interprétation manuelle des résultats 69

8. Utilisation du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 avec d'autres instruments PCR en temps réel que le CFX96™ Deep Well Dx System 72
8.1 Matériel et dispositifs nécessaires mais non fournis 72
8.2 Procédure 73
8.2.1 Préparation de l'échantillon 73
8.2.2 Configuration du master mix 74
8.2.3 Configuration des réactions 75
8.2.4 PCR run 76
8.2.4.1 Programmation de l'instrument PCR en temps réel 76
8.2.4.2 Paramètres de run 76
8.2.5 Analyse des données 77

9. Données de performances 79
9.1 Plasma 79
9.1.1 Sensibilité analytique 79
9.1.2 Spécificité analytique 81
9.1.2.1 Échantillons négatifs 81
9.1.2.2 Substances interférentes 81
9.1.2.3 Réactivité croisée 82
9.1.3 Plage linéaire 84
9.1.4 Précision 85
9.1.5 Taux global de défaillance 86

9.1.6 Contamination croisée 87
9.1.7 Performances cliniques 87
9.2 Sang total 89
9.2.1 Sensibilité analytique 89
9.2.2 Spécificité analytique 91
9.2.2.1 Échantillons négatifs 91
9.2.2.2 Substances interférentes 91
9.2.2.3 Réactivité croisée 92
9.2.3 Plage linéaire 93
9.2.4 Précision 94
9.2.5 Taux global de défaillance 95
9.2.6 Contamination croisée 95
9.2.7 Performances cliniques 96
9.3 Urine 98
9.3.1 Sensibilité analytique 98
9.3.2 Spécificité analytique 99
9.3.2.1 Échantillons négatifs 100
9.3.2.2 Substances interférentes 100
9.3.2.3 Réactivité croisée 101
9.3.3 Plage linéaire 102
9.3.4 Précision 103
9.3.5 Taux global de défaillance 104
9.3.6 Contamination croisée 104
9.3.7 Performances cliniques 105

10. Élimination 107

11. Contrôle qualité 107

12. Assistance technique 108

13. Bibliographie 108

14. Marques de commerce et clauses de non-responsabilité 109

15. Symboles 110

16. Protocole d'essai pour le logiciel AltoStar® Connect et informations pour l'intégration SIL 112

17. Historique de révision 114

1. À propos du présent mode d'emploi

Ce mode d'emploi guide l'opérateur dans l'utilisation du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5. Les chapitres 1-6 et 9-14 contiennent des informations et des instructions générales qui s'appliquent à chaque flux de travail utilisé avec le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5. Le chapitre 7 fournit des instructions sur l'utilisation du produit avec l'AltoStar® Automation System AM16 (système d'automatisation) (Hamilton ; abrégé dans ce qui suit en AltoStar® AM16) avec le logiciel AltoStar® Connect (version 1.7.4 ou supérieure, Hamilton) pour la configuration PCR automatisée et sur le système CFX96™ Deep Well Dx System* (Bio-Rad, abrégé dans ce qui suit en CFX96™ DW Dx) avec le logiciel CFX Manager™ Dx (version 3.1, Bio-Rad) pour PCR en temps réel. Le chapitre 8 fournit des instructions sur l'utilisation du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 avec d'autres méthodes d'extraction de l'acide nucléique et instruments PCR en temps réel. Pour en savoir plus sur l'utilisation de l'AltoStar® AM16, du logiciel AltoStar® Connect, du kit AltoStar® Purification Kit 1.5, de l'AltoStar® Internal Control 1.5 (contrôle interne) et du CFX96™ DW Dx, reportez-vous au mode d'emploi respectifs répertoriés ci-dessous :

- AltoStar® Automation System AM16 Manuel d'utilisation DIV (Hamilton)
- AltoStar® Connect Software Manuel DIV (Hamilton)
- Mode d'emploi AltoStar® Purification Kit 1.5
- Mode d'emploi AltoStar® Internal Control 1.5
- Systèmes CFX96™ Dx et CFX96™ Deep Well Dx Manuel d'utilisation (Bio-Rad)

* « CFX96™ Deep Well Dx System » est le nouveau nom de la version DIV du CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (système de détection) (Bio-Rad).

Tout au long de ce manuel d'utilisation les termes ATTENTION et REMARQUE ont les significations suivantes :

ATTENTION

Attire l'attention sur des instructions de fonctionnement ou procédures qui, si elles ne sont pas correctement respectées, peuvent engendrer des blessures corporelles ou nuire au bon fonctionnement du produit. Contactez l'assistance technique d'altona Diagnostics pour obtenir de l'aide.

REMARQUE

Les informations fournies à l'utilisateur sont utiles mais non essentielles à la tâche à accomplir.

Lisez attentivement le mode d'emploi avant d'utiliser le produit.

2. Usage prévu

Le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 est un test de diagnostic *in vitro* basé sur la technologie PCR en temps réel, servant à la détection et la quantification de l'ADN spécifique au virus BK (BKV) dans le plasma humain, le sang humain total et l'urine humaine.

Il est destiné à être utilisé comme une aide au diagnostic des infections par BKV et à la surveillance de la charge de BKV chez les personnes infectées par le BKV.

Les résultats obtenus avec le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 doivent être interprétés en tenant compte des autres constatations cliniques et résultats de laboratoire.

Le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 est destiné à être utilisé par des opérateurs professionnels formés aux techniques propres à la biologie moléculaire et aux procédures de diagnostic *in vitro*.

3. Contenu du kit

Le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 comprend les composants suivants :

Tableau 1: Composants du kit

Couleur du capuchon	Composant	Nombre de tubes	Volume nominal [µl/tube]
Bleu	Master A[1)]	8	60[2)]
Violet	Master B[1)]	8	180[3)]
Rouge	QS1[4)]	2	250
Rouge	QS2[4)]	2	250
Rouge	QS3[4)]	2	250
Rouge	QS4[4)]	2	250
Blanc	NTC[5)]	2	250

[1)] Contient du matériel biologique d'origine animale

[2)] Contient un volume supplémentaire de 25 µl pour compenser le volume mort de la manipulation des liquides de l'AltoStar® AM16.

[3)] Contient un volume supplémentaire de 55 µl pour compenser le volume mort de la manipulation des liquides de l'AltoStar® AM16.

[4)] Standard de quantification (contrôle positif)

[5)] No Template Control (contrôle négatif)

ATTENTION

Avant la première utilisation, vérifiez que le produit et ses composants sont complets quant au nombre, au type et au remplissage. N'utilisez pas un produit défectueux ou incomplet, ses performances pourraient être compromises.

Le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 contient suffisamment de réactifs pour effectuer 96 des réactions dans 8 runs maximum.

Le produit est livré sur de la neige carbonique. Lors de la réception et avant la première utilisation, inspectez le produit et ses composants afin de vérifier :

- Intégrité
- Complétude (nombre, type et remplissage)
- Étiquetage correct
- Date d'expiration
- État de congélation
- Clarté et absence de particules

Si un ou plusieurs composants du produit n'étaient pas congelés à leur réception, si des tubes ont été abîmées lors de leur transport ou sont manquantes, contactez l'assistance technique d'altona Diagnostics pour obtenir de l'aide (voir le chapitre 12. Assistance technique).

4. Stockage et manipulation

Tous les réactifs compris dans le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 sont des solutions prêtes à l'emploi.

4.1 Stockage

Tous les composants du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 doivent être stockés entre -25 °C et -15 °C après réception.

ATTENTION

De mauvaises conditions de stockage pourraient compromettre les performances du produit.

ATTENTION

N'utilisez pas de produits dont la date d'expiration est dépassée. L'utilisation de produits périmés pourrait compromettre leurs performances.

4.2 Manipulation

ATTENTION

Ne dépassez pas les séquences de décongélation-congélation et les manipulations indiquées dans le présent mode d'emploi. Cela pourrait compromettre les performances du produit.

ATTENTION

Une manipulation incorrecte des composants du produit et des échantillons peut entraîner une contamination et compromettre les performances du produit :

- N'intervertissez pas les capuchons des bouteilles et des flacons.
- Conservez le matériel positif et/ou potentiellement positif à l'écart des composants du kit.
- Utilisez des zones de travail distinctes pour les activités de préparation de l'échantillon/de configuration des réactions et d'amplification/de détection.
- Jetez toujours vos gants après avoir manipulé du matériel positif et/ou potentiellement positif.
- N'ouvrez pas les tubes ou PCR plates (plaques PCR) après amplification.

ATTENTION

Ne mélangez pas les composants provenant de différents lots de kits. L'utilisation de lots de kits différents pourrait compromettre les performances du produit.

4.2.1 Master A et Master B

Une fois décongelés, le Master A et le Master B restent stables pendant 5 heures à une température maximale de +30 °C.

REMARQUE

Si les composants Master A et Master B ont été décongelés mais pas utilisés, ils peuvent être recongelés et redécongelés en vue de runs d'analyse ultérieurs. S'ils sont ouverts, jetez les capuchons et utilisez de nouveaux capuchons afin d'éviter toute contamination des réactifs.

4.2.2 Standards de quantification et No Template Control (contrôl négatif)

1. Une fois décongelés, les composants standards de quantification (QS) et No Template Control (NTC, contrôle négatif) sont stables pour une durée de 5 heures à une température maximale de +30 °C.
2. Jetez les capuchons des tubes QS et NTC à chaque utilisation et utilisez de nouveaux capuchons pour éviter la contamination des réactifs.
3. Après utilisation, fermez les tubes de QS et NTC au moyen de capuchons neufs et congelez-les immédiatement.
4. Ne dépassez pas le nombre de séquences de décongélation-congélation suivant pour chacun des tubes de QS et NTC : *Décongélation 1 → Congélation 1 → Décongélation 2 → Congélation 2 → Décongélation 3 → Congélation 3 → Décongélation 4*

5. Description du produit

Le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 est un test de diagnostic *in vitro* servant à la détection et la quantification de l'ADN spécifique au BKV dans le plasma humain, le sang humain total et l'urine humaine.

Il se fonde sur la technologie PCR en temps réel, utilisant la réaction en chaîne par polymérase (PCR) pour l'amplification des séquences cibles spécifiques au BKV, et des sondes spécifiques aux cibles marquées par fluorescence pour la détection de l'ADN amplifié.

Outre le système d'amplification et de détection spécifique à l'ADN du BKV, le test comprend des oligonucléotides pour l'amplification et la détection de le contrôle interne [abrégé en IC ; AltoStar® Internal Control 1.5 (contrôle interne)].

Les sondes spécifiques à l'ADN du BKV sont marquées avec le fluorophore FAM™. La sonde spécifique à l'IC est marquée avec un fluorophore (JOE™) détectable dans le canal VIC™ par exemple.

L'utilisation de sondes reliées à des colorations identifiables permet une détection parallèle de l'ADN spécifique au BKV et l'IC des canaux de détection correspondant dans l'instrument PCR en temps réel utilisé.

5.1 Informations contextuelles

La famille *Polyomaviridae* comprend au moins 16 membres, qui infectent différentes espèces de mammifères [1]. Deux d'entre eux, *polyomavirus BK* (BKV, virus BK) et *polyomavirus JC* (JCV, virus JC) sont à l'origine chez l'Homme d'infections omniprésentes à l'échelle de la planète [1].

Les polyomavirus sont de petits virus icosaédriques sans enveloppe présentant un génome d'ADN bicaténaire superenroulé comprenant environ 5 000 paires de bases (pb) [2]. Les polyomavirus humains partagent ~70 % d'identité séquentielle avec le *virus simien 40* (SV40) [3]. En dépit de cette forte homologie de séquence, les polyomavirus présentent une plage d'hôtes restreinte avec des comportements biologiques et une pathogenèse distincts [3].

Les infections primaires au BKV se produisent généralement tôt dans l'enfance et sont normalement sous-cliniques, suivies d'une persistance tout au long de la vie [4]. Les cellules épithéliales des reins, de l'urètre et de la vessie ont été identifiées comme les principaux types de cellules infectés de façon persistante par le BKV [5].

Tandis que les infections au polyomavirus restent non apparentes chez les individus immunocompétents, la réactivation du BKV et/ou du JCV dans le cadre d'une immunosuppression peut conduire à des maladies graves. La réactivation du BKV est plus commune chez les patients ayant subi une transplantation de moelle osseuse et rénale, provoquant une cystite hémorragique (HC) et une néphropathie associée à Polyomavirus (PVAN), respectivement [5].

5.2 Description des composants

5.2.1 Master A et Master B

Le Master A et le Master B contiennent tous les composants (tampon PCR, ADN-polymérase, sel de magnésium, amorces et sondes) nécessaires à l'amplification médiée par PCR et à la détection de l'ADN spécifique au BKV et de l'IC en un seule réaction.

5.2.2 Standard de quantification

Les QS contiennent des concentrations normalisées d'ADN spécifique au BKV (voir le tableau 2). Ils ont été calibrés par rapport à la norme internationale de l'OMS « 1st WHO International Standard for ADN for BK Virus Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 14/212) » [6]. Les QS sont utilisés pour vérifier la fonctionnalité du système d'amplification et de détection de l'ADN spécifique au BKV, ainsi que pour générer une standard curve (courbe d'étalonnage) permettant la quantification de l'ADN spécifique au BKV dans un échantillon.

Tableau 2: Standards de quantification

Standard de quantification	Concentration [UI/µl]
QS1	1,00E+04
QS2	1,00E+03
QS3	1,00E+02
QS4	1,00E+01

5.2.3 No Template Control (contrôle négatif)

Le NTC ne contient pas d'ADN spécifique au BKV mais contient la matrice de l'IC. Le NTC est utilisé comme contrôle négatif pour la PCR en temps réel de l'ADN spécifique au BKV, et il indique une possible contamination du Master A et du Master B.

5.3 Flux de travail

5.3.1 AltoStar® Workflow (flux de travail)

L'AltoStar® Workflow (flux de travail) comprend les produits DIV suivants :

- AltoStar® Automation System AM16 (système d'automatisation) (Hamilton)
- Logiciel AltoStar® Connect version 1.7.4 ou supérieure (Hamilton)
- CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad) avec le logiciel CFX Manager™ Dx version 3.1 (Bio-Rad)

Le flux de travail comprend les étapes suivantes :

1. Programmation d'un AltoStar® run.
2. Run de purification sur l'AltoStar® AM16 à l'aide du kit AltoStar® Purification Kit 1.5 et de l'AltoStar® Internal Control 1.5 (contrôle interne).
3. Run de configuration PCR sur l'AltoStar® AM16 à l'aide du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5.
4. PCR run en temps réel sur un CFX96™ DW Dx.

Pour plus de détails sur les étapes 3 et 4 du flux de travail, reportez-vous au chapitre 7. Utilisation du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 avec l'AltoStar® Workflow (flux de travail). Tous les types d'échantillons et volumes d'échantillons spécifiés pour une utilisation avec le kit AltoStar® Purification Kit 1.5 peuvent être traités simultanément sur l'AltoStar® AM16. Tous les échantillons peuvent être analysés avec autant d'essais PCR en temps réel en parallèle que le volume d'éluat disponible le permet.

REMARQUE

Les essais présentant des profils de température de PCR différents sont automatiquement triés et placés sur des PCR plates (plaques PCR) différentes.

5.3.2 Autres flux de travail

Le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 peut être utilisé avec des flux de travail compatibles (manuels ou automatisés). Les instruments PCR en temps réel qui ont été validés pour être utilisés avec le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 sont répertoriés au chapitre 5.3.2.2 Instruments PCR en temps réel. L'utilisation de procédures d'extraction alternatives doit être validée par l'utilisateur.

5.3.2.1 Extraction de l'acide nucléique

Le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 peut être utilisé avec d'autres systèmes d'extraction de l'acide nucléique que l'AltoStar® AM16. Les procédures alternatives utilisées pour l'extraction de l'acide nucléique doivent être validées par l'utilisateur. Reportez-vous au chapitre 8.2.1 Préparation de l'échantillon pour obtenir des instructions concernant l'utilisation de l'AltoStar® Internal Control 1.5 (contrôle interne) avec d'autres méthodes d'extraction que le kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

5.3.2.2 Instruments PCR en temps réel

Le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 a été développé et validé avec les instruments PCR en temps réel suivants :

- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)
- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

En utilisant l'un des instruments PCR en temps réel répertoriés ci-dessus (à l'exception du CFX96™ Deep Well Dx System), la configuration PCR, la programmation de l'instrument ainsi que l'analyse des données doivent être effectuées manuellement (pour plus de détails, voir les chapitres 8.2.2 Configuration du master mix à 8.2.5 Analyse des données).

5.4 Échantillons

5.4.1 Types d'échantillon

L'utilisation des types d'échantillons suivants a été validée pour le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 :

- Plasma humain en présence d'EDTA
- Plasma humain citraté
- Sang total humain en présence d'EDTA
- Sang total humain citraté
- Urine humaine

ATTENTION

N'utilisez pas d'autres types d'échantillons ! L'utilisation d'autres types d'échantillons pourrait compromettre les performances du produit.

5.4.2 Prélèvement et manipulation des échantillons

Le sang doit être prélevé avec des systèmes de prélèvement de sang standard disponibles dans le commerce (p. ex. Sarstedt, Becton Dickinson, Greiner ou équivalent). Les contenus des tubes doivent être mélangés directement après le prélèvement des échantillons. Les échantillons de sang doivent être livrés refroidés entre +2 °C et +8 °C. Le transport doit être effectué conformément aux instructions locales et nationales en vigueur concernant le transport de matériel biologique. Avant utilisation, le sang ne doit pas être conservé plus de 48 heures à température ambiante (entre +20 °C et +25 °C), 3 jours entre +2 °C et +8 °C ou 7 jours entre -25 °C et -15 °C.

Pour produire du plasma EDTA, le sang total doit être centrifugé selon les instructions fournies par le fabricant du système de prélèvement dans les 24 heures suivant le prélèvement. Avant utilisation, le plasma EDTA ne doit pas être conservé plus de 48 heures à température ambiante (entre +20 °C et +25 °C), 5 jours entre +2 °C et +8 °C ou 2 mois entre -25 °C et -15 °C.

Les échantillons d'urine doivent être prélevés dans un récipient stérile. Les échantillons d'urine doivent être conservés à une température comprise entre +2 °C et +8 °C pour une durée maximale de 24 heures.

ATTENTION

Considérez systématiquement les échantillons comme étant des matériaux infectieux et présentant un danger (biologique) conformément aux procédures de sécurité de votre laboratoire. En cas de déversement d'échantillon, utilisez rapidement un désinfectant adapté. Manipulez les matériaux contaminés comme présentant un danger biologique.

REMARQUE

Le stockage des échantillons par congélation n'altère pas les performances du kit. Si vous travaillez avec des échantillons congelés, vérifiez que les échantillons sont complètement décongelés et correctement mélangés avant d'être utilisés.

6. Mises en garde, précautions et limites

- Avant la première utilisation, vérifiez que le produit et ses composants sont complets quant au nombre, au type et au remplissage. N'utilisez pas un produit défectueux ou incomplet, ses performances pourraient être compromises.
- De mauvaises conditions de stockage pourraient compromettre les performances du produit.
- N'utilisez pas de produits dont la date d'expiration est dépassée. L'utilisation de produits périmés pourrait compromettre leurs performances.
- Ne dépassez pas les séquences de décongélation-congélation et les manipulations indiquées dans le présent mode d'emploi. Cela pourrait compromettre les performances du produit.
- Une manipulation incorrecte des composants du produit et des échantillons peut entraîner une contamination et compromettre les performances du produit :
  - N'intervertissez pas les capuchons des bouteilles et des flacons.
  - Conservez le matériel positif et/ou potentiellement positif à l'écart des composants du kit.
  - Utilisez des zones de travail distinctes pour les activités de préparation de l'échantillon/de configuration des réactions et d'amplification/de détection.
  - Jetez toujours vos gants après avoir manipulé du matériel positif et/ou potentiellement positif.
  - N'ouvrez pas les tubes ou PCR plates (plaques PCR) après amplification.
- Ne mélangez pas les composants provenant de différents lots de kits. L'utilisation de lots de kits différents pourrait compromettre les performances du produit.
- N'utilisez pas d'autres types d'échantillons ! L'utilisation d'autres types d'échantillons pourrait compromettre les performances du produit.
- Considérez systématiquement les échantillons comme étant des matériaux infectieux et présentant un danger (biologique) conformément aux procédures de sécurité de votre laboratoire. En cas de déversement d'échantillon, utilisez rapidement un désinfectant adapté. Manipulez les matériaux contaminés comme présentant un danger biologique.
- Un stockage inapproprié des éluats peut entraîner une dégradation de la séquence cible du BKV et pourrait compromettre les performances du produit.

- N'utilisez pas une autre version du protocole d'essai que celle indiquée sur le code-barres 2D dans ce mode d'emploi. L'utilisation d'une version incorrecte du protocole d'essai peut compromettre les performances du produit.
- L'absence de centrifugation des composants du produit après la décongélation peut entraîner leur contamination par des résidus de réactifs dans les couvercles et pourrait compromettre les performances du produit.
- Ne réutilisez pas les capuchons des tubes afin d'éviter de contaminer les réactifs, car cela pourrait compromettre les performances du produit.
- Comme pour tout test de diagnostic, les résultats doivent être interprétés en tenant compte des autres constatations cliniques et résultats de laboratoire.
- La présence d'inhibiteurs de PCR (p. ex. l'héparine) peut donner des résultats faussement négatifs ou non valides.
- N'utilisez pas des volumes de Master A et Master B différents de ceux spécifiés dans ce mode d'emploi pour la configuration du master mix, car cela pourrait compromettre les performances du produit.
- Ne dépassez pas la durée de stockage du mélange PCR, car cela pourrait compromettre la performance du produit.
- Ne mélangez pas les échantillons ou les ID d'échantillons pendant la configuration PCR ou le transfert vers l'instrument PCR. Cela pourrait conduire à des résultats faussement positifs ou faussement négatifs en raison d'une affectation incorrecte des échantillons.
- N'utilisez pas d'autres conditions de cycle que celles spécifiées dans ce mode d'emploi, car cela pourrait compromettre les performances du produit.
- N'utilisez pas d'autres paramètres de contrôle pour l'analyse des données que ceux spécifiés dans ce mode d'emploi, car cela pourrait donner des résultats d'examen DIV incorrects.
- Si l'échantillon contient d'autres pathogènes que le BKV, il peut y avoir compétition avec l'amplification de la cible ou des réactions croisées, donnant ainsi des résultats d'examen DIV incorrects.
- L'élimination des déchets dangereux et biologiques doit être conforme aux réglementations locales et nationales afin d'éviter toute contamination de l'environnement.
- Les mutations potentielles dans les régions cibles du génome du BKV couvertes par les amorces et/ou les sondes utilisées dans le kit peuvent entraîner une sous-quantification et/ou empêcher de détecter la présence du pathogène.

7. Utilisation du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 avec l'AltoStar® Workflow (flux de travail)

La partie suivante de ce mode d'emploi décrit l'utilisation du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 avec l'AltoStar® Workflow (flux de travail). L'AltoStar® Workflow (flux de travail) comprend différents produits DIV [AltoStar® AM16, le logiciel AltoStar® Connect, le kit AltoStar® Purification Kit 1.5, l'AltoStar® Internal Control 1.5 (contrôle interne) et le CFX96™ DW Dx]. L'utilisation de ces produits est décrite en détail dans leurs modes d'emploi respectifs.

- AltoStar® Automation System AM16 Manuel d'utilisation DIV (Hamilton)
- AltoStar® Connect Software Manuel DIV (Hamilton)
- Mode d'emploi AltoStar® Purification Kit 1.5
- Mode d'emploi AltoStar® Internal Control 1.5
- Systèmes CFX96™ Dx et CFX96™ Deep Well Dx Manuel d'utilisation (Bio-Rad)

7.1 Volume d'échantillon

Le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 est validé pour les purifications des acides nucléiques d'un volume d'échantillon de 500 µl si vous utilisez l'AltoStar® AM16. Un volume d'échantillon supplémentaire doit être fourni afin de compenser le volume mort du tube d'échantillon utilisé (voir le chapitre 7.2 Tubes d'échantillon).

7.2 Tubes d'échantillon

Les tubes d'échantillon adaptés à une utilisation sur l'AltoStar® AM16 peuvent être achetés auprès d'altona Diagnostics (tube de 7 ml avec capuchon, 82 x 13 mm, VK000010). La compatibilité d'autres tubes d'échantillon peut être testée par l'utilisateur. Pour en savoir plus, consultez le mode d'emploi du kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

7.3 Codes-barres de l'échantillon

Pour une identification automatisée des échantillons par l'AltoStar® AM16, tous les tubes d'échantillon doivent porter une étiquette comportant un code-barres adapté. Pour en savoir plus, consultez le mode d'emploi du kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

7.4 Matériel et dispositifs nécessaires mais non fournis pour l'AltoStar® Workflow (flux de travail)

Le matériel et les dispositifs indiqués dans le tableau 3 doivent être commandés auprès d'altona Diagnostics GmbH.

Tableau 3: Matériel et dispositifs nécessaires

Matériel	Description	N° de commande
AltoStar® Molecular Diagnostic Workflow	Lot de produits contenant l'AltoStar® Automation System AM16 (système d'automatisation), le logiciel AltoStar® Connect (Version 1.7.4 ou ultérieure) et l'équipement informatique.	AM16
AltoStar® Detection	Lot de produits contenant le CFX96™ Deep Well Dx System (système de détection) avec le logiciel CFX Manager™ Dx (Version 3.1), un scanner de code-barres et l'équipement informatique.	DT16
AltoStar® Purification Kit 1.5	Kit de purification et d'isolement des acides nucléiques à utiliser avec l'AltoStar® Automation System AM16 (système d'automatisation).	PK15-16/ PK15-46
AltoStar® Internal Control 1.5	Contrôle de l'extraction, de l'amplification et de la détection des acides nucléiques	IC15-16/ IC15-46
PCR Plate	Plaque à demi-jupe 96 puits, avec code-barres et puits blancs	VK000005
PCR Plate Sealing Foil	Film protecteur pour la PCR plate (plaque PCR)	VK000006

Matériel	Description	N° de commande
1.000 µl CO-RE Tips	Cônes à filtre 1 000 µl à utiliser avec l'AltoStar® Automation System AM16 (système d'automatisation)	VK000007
300 µl CO-RE Tips	Cônes à filtre 300 µl à utiliser avec l'AltoStar® Automation System AM16 (système d'automatisation)	VK000008
Pooling Tube	Tube avec code-barres pour mélanger les réactifs PCR	VK000002
Waste Bag	Sac stérilisé en autoclave à utiliser avec l'AltoStar® Automation System AM16 (système d'automatisation)	VK000009
Screw Cap - red	Capuchon à vis rouge pour les tubes QS1-QS4 (rouge)	VK000012
Screw Cap - blue	Capuchon à vis bleu pour les tubes Master A (bleu)	VK000013
Screw Cap - purple	Capuchon à vis violet pour les tubes Master B (violet)	VK000015
Screw Cap - white	Capuchon à vis blanc pour les tubes NTC (blanc)	VK000016

Tableau 4: Matériel et appareils de laboratoire supplémentaires

Matériel	Description	N° de commande
Scelleur de plaque	p. ex. AltoStar® Plate Sealer (scelleur de plaque)	VK000023
	ex. PX1 Plate Sealer (Bio-Rad)	VK000033

7.5 Matériel et dispositifs généraux

- Agitateur vortex
- Gants non poudrés (jetables)
- Centrifugeuse pour la centrifugation des composants du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5
- Centrifugeuse pour la centrifugation des PCR plates (plaques PCR)

Contrôles de processus

Les contrôles de processus positifs et négatifs, qui sont traités comme des échantillons et soumis à la même procédure d'isolement des acides nucléiques, doivent être testés conformément aux directives ou aux exigences des réglementations en vigueur, ou des organismes d'homologation, afin de contrôler la totalité du processus.

Les contrôles de processus ne sont pas fournis par altona Diagnostics. Les échantillons ou matériaux précédemment caractérisés de ZeptoMetrix (NATtrol™ BK Virus External Run Controls ; réf. NATBK-ERCL et NATBK-ERCM) peuvent être utilisés pour ce contrôle et doivent être validés par le laboratoire.

7.6 Procédure

7.6.1 Présentation de l'AltoStar® Workflow (flux de travail)

Les étapes de l'AltoStar® Workflow (flux de travail) sont résumées dans le tableau 5. Les informations relatives aux paramètres spécifiques à utiliser avec le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 sont fournies au chapitre 7.6.2 Programmer un AltoStar® run. Pour en savoir plus sur les étapes 1-5, reportez-vous au mode d'emploi du kit AltoStar® Purification Kit 1.5, du logiciel AltoStar® Connect et de l'AltoStar® AM16.

Les étapes 6-11 sont décrites plus en détail dans les chapitres 7.6.3 Démarrer un run de configuration PCR à 7.6.10 Exporter les résultats de PCR pour une interprétation manuelle des résultats.

Tableau 5: Présentation de l'AltoStar® Workflow (flux de travail)

Étape	Action
1. Démarrer l'AltoStar® AM16	• Mettez en marche l'AltoStar® AM16. • Mettez en marche l'ordinateur et l'écran. • Démarrez le logiciel AltoStar® Connect.
2. Effectuer la maintenance	• Dans la barre de menus, cliquez sur **Application → Instrument Maintenance** (Application → Maintenance de l'instrument). ◦ S'il est temps d'effectuer la maintenance hebdomadaire, cliquez sur **Start Weekly Maintenance** (Démarrer maintenance hebdomadaire). ◦ S'il est temps d'effectuer la maintenance quotidienne, cliquez sur **Start Daily Maintenance** (Démarrer maintenance journalière). • Suivez les instructions sur l'écran pour effectuer le processus de maintenance.

Étape	Action
3. Programmer un AltoStar® run	• Dans la barre de menus, cliquez sur **Program Run** → **Program Run** (**AltoStar® Purification**) [Programmer le run → Programmer le run (AltoStar® Purification)]. Sinon, retournez à l'écran d'accueil et cliquez sur le bouton **Program Run** (Programmer le run). • Saisissez les données relatives aux échantillons ou importez-les du SIL. • Sélectionnez l'essai à utiliser pour les échantillons sauf si déjà importé du SIL : ◦ AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 • Cliquez sur le bouton **Create Run** (Créer un run) dans la barre d'outils pour créer l'AltoStar® run.

Étape	Action
4. Démarrer un run de purification	• Dans la barre de menus, cliquez sur **Purification → Start Purification** (Purification → Démarrer purification). Sinon, retournez à l'écran d'accueil et cliquez sur le bouton **Start Purification** (Démarrer purification). • Sélectionnez le run de purification à démarrer afin d'afficher les échantillons compris dans le run de purification sélectionné. • Préparez les réactifs de purification : ◦ Vérifiez que les réactifs utilisés pour la purification ont le même numéro de chargement [à l'exception de l'AltoStar® Internal Control 1.5 (contrôle interne)] et ne sont pas périmés. ◦ Si des précipités sont visibles dans le Lysis Buffer (tampon de lyse), chauffez-le (≤ +50 °C) jusqu'à dissolution complète. ◦ Décongelez l'IC [AltoStar® Internal Control 1.5 (contrôle interne)] et passez-le au vortex pendant 5 secondes. ◦ Passez au vortex les Magnetic Beads (billes magnétiques) pendant 5 secondes sans mouiller le capuchon. • Préparez les échantillons pour le run de purification à démarrer comme décrit dans le mode d'emploi du kit AltoStar® Purification Kit 1.5. • Cliquez sur le bouton **Start Run** (Démarrer run) dans la barre d'outils. • Suivez les instructions des boîtes de dialogue Loading (Chargement) afin de charger l'instrument correctement. • Confirmez le message Loading complete (Chargement terminé) en cliquant sur **OK** ou patientez 10 secondes. Le système va maintenant effectuer le run de purification automatiquement.

Étape	Action
5. Terminer le run de purification	• Assurez-vous que le plateau de chargement est vide et confirmez la boîte de dialogue Run finished (Run terminé) en cliquant sur **OK**. • Suivez les instructions de la boîte de dialogue Maintenance (Maintenance) et confirmez en cliquant sur **OK**. • Scellez les composants réutilisables du kit AltoStar® Purification Kit 1.5 et rangez-les. Les éluats présents dans la plaque d'éluat non scellée restent stables à température ambiante (max. +30 °C) pendant 4 heures. • Si le run de configuration PCR associé n'est pas démarré tout de suite, scellez l'eluate plate (plaque d'éluat) avec un Eluate Plate Sealing Foil (film protecteur de la plaque d'éluat) et stockez-la entre +2 °C et +8 °C pendant 24 heures au maximum. • Observez les résultats du run de purification pour vérifier que chaque échantillon a été traité correctement.

Étape	Action
6. Démarrer un run de configuration PCR	• Dans la barre de menus, cliquez sur **PCR Setup** → **Start PCR Setup** (Configuration PCR → Démarrer configuration PCR). Sinon, retournez à l'écran d'accueil et cliquez sur le bouton **Start PCR Setup** (Démarrer configuration PCR). • Sélectionnez le run de configuration PCR qui doit être lancé pour afficher la plaque d'éluat et les réactifs inclus dans celui-ci. • Préparez les réactifs PCR : ◦ Assurez-vous que les masters et les contrôles à utiliser proviennent d'un même lot de kits et qu'ils ne sont pas périmés. ◦ Décongelez la quantité de tubes de master et de contrôle appropriée, passez-les brièvement au vortex et centrifugez-les. • Si l'eluate plate (plaque d'éluat) est scellée, centrifugez brièvement la plaque et ouvrez-la avec précaution. • Cliquez sur le bouton **Start Run** (Démarrer run) dans la barre d'outils. • Suivez les instructions de la boîte de dialogue Loading (Chargement) afin de charger l'instrument correctement. • Confirmez le message Loading complete (Chargement terminé) en cliquant sur **OK** ou patientez 10 secondes. Le système procède alors automatiquement au run de configuration PCR.
7. Terminer le run de configuration PCR	• Assurez-vous que le plateau de chargement est vide et confirmez la boîte de dialogue Run finished (Run terminé) en cliquant sur **OK**. • Suivez les instructions de la boîte de dialogue Maintenance (Maintenance) et confirmez en cliquant sur **OK**. • Scellez les composants réutilisables du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 et rangez-les. • Consultez les résultats du run de configuration PCR pour confirmer le traitement réussi de chaque échantillon.

Étape	Action
8. Sceller la PCR plate (plaque PCR)	• Scellez la PCR plate (plaque PCR) avec un PCR plate Sealing Foil (film protecteur de la plaque PCR).
9. Démarrer le PCR run	• Mettez en marche le CFX96™ DW Dx, l'ordinateur raccordé et le moniteur. • Démarrez le logiciel CFX Manager™ Dx. • Ouvrez le CFX96™ DW Dx. • Centrifugez la PCR plate (plaque PCR) et insérez-la dans le CFX96™ DW Dx. • Sélectionnez **File** → **Open** → **LIMS File…** (Fichier → Ouvrir → Fichier SIL...) dans la barre de menus. • Scannez le code-barres de la PCR plate (plaque PCR) à l'aide du scanner de code-barres portatif. • Fermez le CFX96™ DW Dx. • Cliquez sur le bouton **Start Run** (Démarrer run) pour démarrer le PCR run. Nommez et enregistrez le fichier du PCR run. Le CFX96™ DW Dx procède alors automatiquement au PCR run.
10. Séparer les essais pour une analyse individuelle	• Séparez tous les essais du PCR run en groupes de puits distincts.
11. Analyser les données et interpréter les résultats du PCR run	Pour chaque groupe de puits, séparément : • Appliquez la correction de la référence dans tous les puits pour tous les canaux de détection utilisés. • Excluez les puits présentant des signaux PCR irréguliers. • Définissez les seuils de tous les canaux de détection en fonction des contrôles. • Excluez les puits contenant des données non valides. • Générez le fichier de résultats du SIL permettant d'exporter les résultats vers le SIL. • Générez le rapport de résultats pour une interprétation manuelle des résultats.

ATTENTION

Un stockage inapproprié des éluats peut entraîner une dégradation de la séquence cible du BKV et pourrait compromettre les performances du produit.

7.6.2 Programmer un AltoStar® run

Pour obtenir des informations détaillées sur le démarrage d'un AltoStar® run, reportez-vous au mode d'emploi du kit AltoStar® Purification Kit 1.5, du logiciel AltoStar® Connect et de l'AltoStar® AM16. Vous trouverez ci-dessous les paramètres spécifiques à l'utilisation du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 :

- Les QS1-4 et NTC sont sélectionnés pour les essais de nature quantitative, tandis que le QS4 et le NTC sont sélectionnés pour les essais de nature qualitative.
- Le volume d'échantillon requis est de 500 µl plus le volume mort pour le tube d'échantillon correspondant (voir les chapitres 7.1 Volume d'échantillon et 7.2 Tubes d'échantillon).
- Le volume requis d'éluat pour le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 est 10 µl.
- Assurez-vous que la version correcte du protocole d'essai est utilisée pour le run. Pour obtenir des informations sur la version actuelle du protocole, voir le chapitre 16. Protocole d'essai pour le logiciel AltoStar® Connect et informations pour l'intégration SIL. Le protocole d'essai respectif est encodé dans le code-barres 2D affiché. Pour obtenir des informations sur le kit de purification et l'importation du protocole d'essai dans le logiciel AltoStar® Connect, reportez-vous aux modes d'emploi respectifs.

ATTENTION

N'utilisez pas une autre version du protocole d'essai que celle indiquée sur le code-barres 2D dans ce mode d'emploi. L'utilisation d'une version incorrecte du protocole d'essai peut compromettre les performances du produit.

7.6.3 Démarrer un run de configuration PCR

1. Sélectionnez **PCR Setup** → **Start PCR Setup** (Configuration PCR → Démarrer configuration PCR) dans la barre de menus. Sinon, retournez à l'écran d'accueil du logiciel AltoStar® Connect et sélectionnez le bouton **Start PCR Setup** (Démarrer configuration PCR). L'écran Start PCR Setup Run (Démarrer le run de configuration PCR) s'affiche.

Les runs de configuration PCR en attente s'affichent dans le tableau Programmed PCR Setup Runs (Runs de configuration PCR programmés) situé à gauche de l'écran.

2. Sélectionnez le run de configuration PCR à démarrer dans le tableau Programmed PCR Setup Runs (Runs de configuration PCR programmés).

   - Les échantillons inclus dans le run de configuration PCR sélectionné s'affichent dans le tableau en haut à droite de l'écran [Samples in selected PCR Setup Run (Échantillons figurant dans le run de configuration PCR sélectionné)].
   - Les QS et contrôles nécessaires au run de configuration PCR sélectionné s'affichent dans le tableau au milieu à droite de l'écran [Controls in selected PCR Setup Run (Contrôles dans le run de configuration PCR sélectionné)].
   - Le nombre de tubes de master requis pour le run de configuration PCR sélectionné s'affiche dans le tableau en bas à droite de l'écran [Required master tubes for the selected PCR Setup Run (Tubes de master requis pour le run de configuration PCR sélectionné)].

REMARQUE

Le nombre d'échantillons prioritaires dans un run de configuration PCR s'affiche dans la colonne **No. of prioritized Samples** (Nombre d'échantillons prioritaires). Effectuez les runs de configuration PCR avec les échantillons prioritaires en premier pour permettre un traitement plus rapide des échantillons prioritaires.

Avant de cliquer sur le bouton **Start Run** (Démarrer run) dans la barre d'outils, préparez les réactifs requis comme décrit dans le chapitre 7.6.3.1 Préparer les réactifs pour un run de configuration PCR. Si l'eluate plate (plaque d'éluat) requise pour le run de configuration PCR sélectionné a été scellée en vue de son stockage, préparez-la comme décrit dans le mode d'emploi du kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

7.6.3.1 Préparer les réactifs pour un run de configuration PCR

1. Décongelez complètement les QS, les contrôles nécessaires ainsi que le nombre requis de tubes de master à température ambiante (max. +30 °C).
2. Mélangez les réactifs en agitant doucement au vortex.
3. Centrifugez brièvement les tubes afin d'éliminer les éventuelles gouttes du capuchon.

ATTENTION

L'absence de centrifugation des composants du produit après la décongélation peut entraîner leur contamination par des résidus de réactifs dans les couvercles et pourrait compromettre les performances du produit.

7.6.3.2 Charger l'AltoStar® AM16 pour un run de configuration PCR

Pour obtenir des informations détaillées sur la procédure de chargement, reportez-vous au mode d'emploi de l'AltoStar® AM16 et du logiciel AltoStar® Connect.

1. Cliquez sur le bouton **Start Run** (Démarrer run) de la barre d'outils dans l'écran Start PCR Setup Run (Démarrer le run de configuration PCR) pour afficher la boîte de dialogue Loading (Chargement).

La boîte de dialogue Loading (Chargement) est constituée d'une représentation visuelle de la plateforme de l'AltoStar® AM16 dans la moitié supérieure et d'un tableau indiquant les portoirs, les glissières correspondant à chaque portoir sur la plateforme de l'AltoStar® AM16, le matériel à charger sur chaque portoir ainsi que des commentaires concernant le chargement des portoirs.

REMARQUE

Afin de visualiser la position d'un élément sur un portoir et la position du portoir sur la plateforme de l'AltoStar® AM16, sélectionnez la ligne respective du tableau dans la boîte de dialogue Loading (Chargement).

La position de l'élément et de son portoir est affichée :

- En surbrillance rouge dans la représentation visuelle de la plateforme de l'instrument
- Sur l'AltoStar® AM16 par des voyants de chargement qui clignotent au-dessus des glissières où le portoir sélectionné doit être placé

2. Chargez le matériel requis, l'eluate plate (plaque d'éluat) préparée et les réactifs préparés sur leurs portoirs correspondants.

- Remplacez uniquement des rails de cônes de 1 000 µl **complètement vides** par des rails de cônes de 1 000 µl **complètement pleins** sur le portoir des cônes.
- Remplacez uniquement les rails de cônes de 300 µl **complètement vides** par des rails de cônes de 300 µl **complètement pleins** sur le portoir des cônes et de la plaque.

REMARQUE

Remplacer des rails de cônes qui ne sont pas complètement vides et manipuler des cônes individuels peut interférer avec la gestion automatique des cônes et conduire à des abandons du run.

- Placez l'eluate plate (plaque d'éluat) requise avec le puits A1 sur la gauche de la position de la plaque noire.
- Placez la PCR plate (plaque PCR) de sorte que le puits A1 soit au niveau de la position de la plaque avant argentée.
- Chargez un portoir pour 24 tubes avec un tube de mélange inutilisé pour chaque essai du run de configuration PCR.
- Poussez délicatement les tubes jusqu'au fond du portoir et tournez-les de manière à ce que leurs codes-barres soient visibles à travers la fenêtre du portoir.
- Chargez le portoir pour 32 tubes de réactif avec les composants de l'essai requis pour le run de configuration PCR.

- Poussez délicatement les tubes jusqu'au fond du portoir et tournez-les de manière à ce que leurs codes-barres soient visibles à travers la fenêtre du portoir.

REMARQUE

La position des différents tubes sur les portoirs est arbitraire.

REMARQUE

Le volume des composants chargés n'est pas vérifié par le système avant le traitement. Un volume insuffisant des composants entravera une configuration PCR réussie pour l'essai concerné.

REMARQUE

Démarrer un run de configuration PCR avec les capuchons toujours en place sur les tubes peut entraîner l'abandon du run en cours de traitement.

3. Chargez les portoirs avec le code-barres du portoir à l'arrière à droite.
4. Insérez les portoirs remplis dans leurs glissières respectives entre les blocs coulissants avant et arrière du plateau de chargement jusqu'à ce qu'ils touchent les crochets d'arrêt du côté opposé du plateau de chargement.

REMARQUE

Pousser les portoirs au-delà des crochets d'arrêt pourrait endommager l'instrument et perturber la procédure de chargement.

5. Vérifiez que la plaque d'éjection des cônes et le récipient de déchets des cônes sont dans la bonne position et qu'un nouveau sac de déchets est placé dans le récipient.
6. Cliquez sur **OK** dans la boîte de dialogue Loading (Chargement) pour poursuivre la procédure de chargement.

REMARQUE

Cliquer sur **Cancel** (Annuler) annulera le run de configuration PCR sans l'empêcher d'être redémarré ultérieurement (voir le chapitre 7.6.3 Démarrer un run de configuration PCR).

L'AltoStar® AM16 entraîne les portoirs dans l'instrument et procède à la vérification des codes-barres.

REMARQUE

L'AltoStar® AM16 vérifie automatiquement :

- La conformité du type et la bonne localisation des portoirs chargés
- L'identité et la position correctes des éléments chargés sur les portoirs
- La concordance du lot des composants de chaque kit d'essai AltoStar®
- La non-péremption de tous les composants d'essai AltoStar®
- Le positionnement correct de la plaque d'éjection des cônes

Si l'une de ces vérifications ne donne pas les résultats escomptés, l'utilisateur est averti par un message d'avertissement précisant le problème en cause et les instructions pour y remédier convenablement. Pour en savoir plus sur la gestion des erreurs, reportez-vous au mode d'emploi du logiciel AltoStar® Connect.

REMARQUE

Modifier les positions des éléments chargés une fois que le portoir a été introduit dans l'instrument pourrait interrompre le run de configuration PCR et/ou endommage l'instrument.

Lorsque toutes les vérifications ont été correctement effectuées, la boîte de dialogue Loading complete (Chargement terminé) s'affiche.

7. Confirmez la boîte de dialogue Loading complete (Chargement terminé) en cliquant sur **OK** ou patientez 10 secondes avant le démarrage automatique du processus.

REMARQUE

Cliquer sur **Cancel** (Annuler) annulera le run de configuration PCR sans l'empêcher d'être redémarré ultérieurement (voir le chapitre 7.6.3 Démarrer un run de configuration PCR).

Le run de configuration PCR démarre et se déroule sans intervention de l'utilisateur.

7.6.3.3 Pendant le run de configuration PCR

Aucune autre interaction de l'utilisateur n'est nécessaire jusqu'à la fin du run de configuration PCR. L'écran Processing Status (État du traitement) s'affiche indiquant l'état du run de configuration PCR ainsi qu'une estimation de la durée restante.

REMARQUE

Pousser ou tirer les portoirs ou la porte de l'AltoStar® AM16 au cours d'un run de configuration PCR pourrait interrompre le run.

7.6.4 Fin du run de configuration PCR

En fin de run de configuration PCR, la boîte de dialogue Run finished (Run terminé) s'affiche.

1. Assurez-vous que le plateau de chargement est vide.
2. Confirmez la boîte de dialogue Run finished (Run terminé) en cliquant sur **OK**.

L'AltoStar® AM16 va décharger les portoirs. Veillez à ne pas gêner les portoirs en cours de déchargement.

Après le déchargement, la boîte de dialogue Maintenance (Maintenance) s'affiche.

3. Suivez les instructions indiquées dans la boîte de dialogue Maintenance (Maintenance).

Le tableau figurant dans la boîte de dialogue indique le nombre de réactions dans les tubes de master inutilisés au cours du run de configuration PCR.

4. S'il est prévu de démarrer immédiatement un autre run de configuration PCR avec l'eluate plate (plaque d'éluat) actuellement chargée, l'eluate plate (plaque d'éluat) peut rester sans être scellée en position sur son portoir. Si ce n'est **pas** le cas, scellez et stockez l'eluate plate (plaque d'éluat). Pour en savoir plus, consultez le mode d'emploi du kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

REMARQUE

Les éluats présents dans l'eluate plate (plaque d'éluat) restent stables à température ambiante (max. +30 °C) pour une durée maximale de 4 heures après la fin du run de purification.

5. Rebouchez les tubes de réactif avec des capuchons adaptés n'ayant jamais servi.

ATTENTION

Ne réutilisez pas les capuchons des tubes afin d'éviter de contaminer les réactifs, car cela pourrait compromettre les performances du produit.

6. Stockez les réactifs pour une utilisation ultérieure en respectant la méthode décrite dans le chapitre 4.2 Manipulation.
7. Éliminez le matériel usagé (voir le chapitre 10. Élimination).
8. Confirmez la boîte de dialogue Maintenance (Maintenance) en cliquant sur **OK**.

7.6.4.1 Résultats du run de configuration PCR

Les résultats du run de configuration PCR sont enregistrés dans le logiciel AltoStar® Connect.

1. Cliquez sur **PCR Setup** → **PCR Setup Results** (Configuration PCR → Résultats de la configuration PCR) dans la barre de menus pour afficher l'écran Results (Résultats).

L'écran Results (Résultats) affiche un tableau comprenant tous les échantillons utilisés lors du dernier run de configuration PCR. Une de ses colonnes à droite, **Status** (État) indique si le procédé de configuration PCR pour un échantillon donné s'est correctement déroulé (voir le tableau 6).

Tableau 6: Résultats du run de configuration PCR

Status (État)	Résultat du run de configuration PCR
Processed (Traité)	• L'éluat a été traité avec succès lors du run de configuration PCR. • Le mélange PCR résultant est prêt à être utilisé dans un PCR run.
Error (Erreur)	• Le traitement de l'éluat a échoué. • Le mélange PCR correspondant sera automatiquement omis lors de l'analyse PCR suivante.

2. Pour afficher les résultats de runs de configuration PCR antérieurs, cliquez sur le bouton **Load** (Charger) dans la barre de menus, sélectionnez le run de configuration PCR souhaité dans la liste qui s'affiche à l'ouverture de la boîte de dialogue Load Results (Charger les résultats) et cliquez sur **OK**.

3 fichiers de résultats du run de configuration PCR sont automatiquement générés par le logiciel AltoStar® Connect :

- Un fichier SIL (.xml) permettant de renvoyer au SIL des informations détaillées concernant le run de configuration PCR, notamment les résultats.
- Un rapport (.pdf) contenant des informations détaillées concernant le run de configuration PCR, y compris les résultats, à des fins de documentation.
- Un fichier du thermocycleur (.plrn) pour la programmation automatique du CFX96™ DW Dx.

Ces fichiers sont enregistrés à l'emplacement indiqué dans les paramètres du système du logiciel AltoStar® Connect.

REMARQUE

Les fichiers de résultats du run de configuration PCR peuvent de nouveau être générés en chargeant le run de configuration PCR correspondant et en cliquant sur le bouton **Create LIMS File** (Créer un fichier SIL) qui permet de générer le fichier SIL, le bouton **Create Report** (Créer rapport) qui permet de générer le rapport ou le bouton **Create Bio-Rad Cycler File** (Créer le fichier du thermocycleur Bio-Rad) qui permet de générer le fichier du thermocycleur.

7.6.5 Sceller la PCR plate (plaque PCR)

À la fin du run de configuration PCR, la PCR plate (plaque PCR) doit être scellée à l'aide d'un PCR Plate Sealing Foil (film protecteur de la plaque PCR). Il est recommandé d'utiliser l'AltoStar® Plate Sealer (scelleur de plaque) [4s3™ Semi-Automatic Sheet Heat Sealer (4titude)] ou le PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad). La compatibilité des scelleurs de plaque autres que les scelleurs de plaque recommandés doit être évaluée par l'utilisateur.

Si l'un des scelleurs de plaque recommandés est utilisé pour assurer le scellement, procédez comme suit :

1. Mettez en marche le scelleur de plaque et vérifiez que l'adaptateur de plaques ne se trouve pas dans le tiroir.
2. Assurez-vous que les paramètres du scelleur de plaque sont les suivants :

Tableau 7: Paramètres du scelleur de plaque

Scelleur de plaque	Paramètres	
	Température [°C]	Temps [s]
AltoStar® Plate Sealer (scelleur de plaque) [4s3™ Semi-Automatic Sheet Heat Sealer (4titude)]	170	2
PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad)	175	3

3. Attendre que la température définie soit atteinte. Cela peut prendre plusieurs minutes.
4. Placez la PCR plate (plaque PCR) sur l'adaptateur de plaques du scelleur de plaque.
5. Placez un PCR Plate Sealing Foil (film protecteur de la plaque PCR) sur la PCR plate (plaque PCR) de manière à ce que l'inscription « THIS SIDE UP » (ce côté vers le haut) soit lisible. Assurez-vous que tous les puits de la PCR plate (plaque PCR) sont recouverts de film et qu'aucun puits n'est dissimulé par l'inscription.

REMARQUE

L'utilisation du scelleur de plaque sans avoir placé l'adaptateur de plaques dans le tiroir peut rendre le scelleur inopérant. Dans ce cas, contactez l'assistance technique d'altona Diagnostics pour obtenir de l'aide (voir le chapitre 12. Assistance technique).

REMARQUE

Si le PCR Plate Sealing Foil (film protecteur de la plaque PCR) ou son cadre est incorrectement positionné, le film protecteur risque d'adhérer à la plaque de chauffage du scelleur de plaque lors du processus de scellement. Cela rendrait le scelleur inopérant. Dans ce cas, ou si le processus de scellement a été démarré sans le PCR Plate Sealing Foil (film protecteur de la plaque PCR), laissez le scelleur de plaque refroidir à température ambiante et contactez l'assistance technique d'altona Diagnostics pour obtenir de l'aide (voir le chapitre 12. Assistance technique).

6. Positionnez le cadre de protection sur le haut de l'ensemble pour maintenir le film protecteur.

7. Ouvrez le tiroir en appuyant sur le bouton **Operate** (Marche)*/ ⏏**.
8. Placez l'ensemble comprenant l'adaptateur de plaques, la PCR plate (plaque PCR), le PCR Plate Sealing Foil (film protecteur de la plaque PCR) et le cadre de protection dans le scelleur de plaque, puis appuyez sur le bouton **Operate** (Marche)*/ ⏏**.
9. Le tiroir se ferme automatiquement, procède au scellement pendant la durée déterminée et se rouvre automatiquement.
10. Retirez la PCR plate (plaque PCR) scellée et l'adaptateur de plaques du scelleur de plaque, puis fermez le scelleur de plaque en appuyant sur le bouton **Close** (Fermer)*/ ⏏**.

* AltoStar® Plate Sealer (scelleur de plaque) [4s3™ Semi-Automatic Sheet Heat Sealer (4titude)]

**PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad)

7.6.5.1 Stabilité du mélange PCR

À la fin du run de configuration PCR, le mélange PCR présent dans la PCR plate (plaque PCR) scellée reste stable à température ambiante (max. +30 °C) pendant 30 minutes.

ATTENTION

Ne dépassez pas la durée de stockage du mélange PCR, car cela pourrait compromettre la performance du produit.

7.6.6 Démarrer un PCR run

Le PCR run est effectué sur un CFX96™ DW Dx contrôlé par le logiciel CFX Manager™ Dx.

1. Mettez en marche le CFX96™ DW Dx, l'ordinateur raccordé et le moniteur.
2. Démarrez le logiciel CFX Manager™ Dx.
3. Dans la barre de menus du logiciel CFX Manager™ Dx, sélectionnez **File** → **Open** → **LIMS File…** (Fichier → Ouvrir → Fichier SIL...) pour ouvroir la boîte de dialogue Open LIMS File (Ouvrir le fichier SIL).

4. Lorsque la boîte de dialogue Open LIMS File (Ouvrir le fichier SIL) s'ouvre, assurez-vous que le curseur clignote dans le champ du bas **File name** (Nom du fichier). Si ce n'est pas le cas, cliquez dans le champ **File name** (Nom du fichier).
5. Scannez le code-barres de la PCR plate (plaque PCR) à l'aide du scanner de code-barres à main pour sélectionner et ouvrir automatiquement le bon fichier SIL. La boîte de dialogue Run Setup (Configuration du run) s'affiche.

REMARQUE

Tous les paramètres requis pour démarrer le PCR run sont automatiquement transférés du logiciel AltoStar® Connect au CFX96™ DW Dx à l'aide du fichier du thermocycleur.

6. Cliquez sur le bouton **Open Lid** (Ouvrir le capuchon) dans la boîte de dialogue Run Setup (Configuration du run) pour ouvrir le capuchon du CFX96™ DW Dx.
7. Centrifugez brièvement la PCR plate (plaque PCR) scellée pour s'assurer que tout le liquide est au fond des puits.
8. Insérez la PCR plate (plaque PCR) scellée dans le bloc chauffant du CFX96™ DW Dx avec le puits A1 placé sur la gauche.
9. Fermez le CFX96™ DW Dx en cliquant sur le bouton **Close Lid** (Fermer le capuchon) dans la boîte de dialogue Run Setup (Configuration du run).
10. Démarrez le PCR run en cliquant sur le bouton **Start Run** (Démarrer run) dans la boîte de dialogue Run Setup (Configuration du run).

7.6.6.1 Pendant le PCR run

Aucune autre interaction de l'utilisateur n'est nécessaire jusqu'à la fin du PCR run. La boîte de dialogue Run Details (Détails du run) s'affiche indiquant l'état du PCR run ainsi qu'une estimation de la durée restante.

REMARQUE

Soulever le capuchon du CFX96™ DW Dx durant un PCR run en actionnant le bouton sur le devant du capuchon ou en cliquant sur **Open Lid** (Ouvrir le capuchon) dans la boîte de dialogue Run Details (Détails du run) entraînera l'abandon du run et invalidera tous les résultats.

La fenêtre Data Analysis (Analyse des données) contenant les courbes d'amplification, la disposition de la plaque et les résultats s'affiche à la fin du PCR run.

7.6.6.2 Affecter des essais à des groupes de puits

L'AltoStar® Workflow (flux de travail) traite un ou plusieurs essais PCR en même temps sur une même PCR plate (plaque PCR). En revanche, chaque essai doit être analysé séparément par l'utilisateur conformément aux instructions données dans le mode d'emploi de l'essai correspondant.

Pour cette raison, tous les essais d'une PCR plate (plaque PCR) doivent être affectés par l'utilisateur à des groupes de puits individuels dans le logiciel CFX Manager™ Dx.

1. Dans la fenêtre Data Analysis (Analyse des données), cliquez sur le bouton **Plate Setup** (Configuration de la plaque) dans la barre d'outils et sélectionnez **View/Edit Plate** (Afficher/Modifier la plaque). La boîte de dialogue Plate Editor (Éditeur de plaque) s'affiche (voir la figure 1).

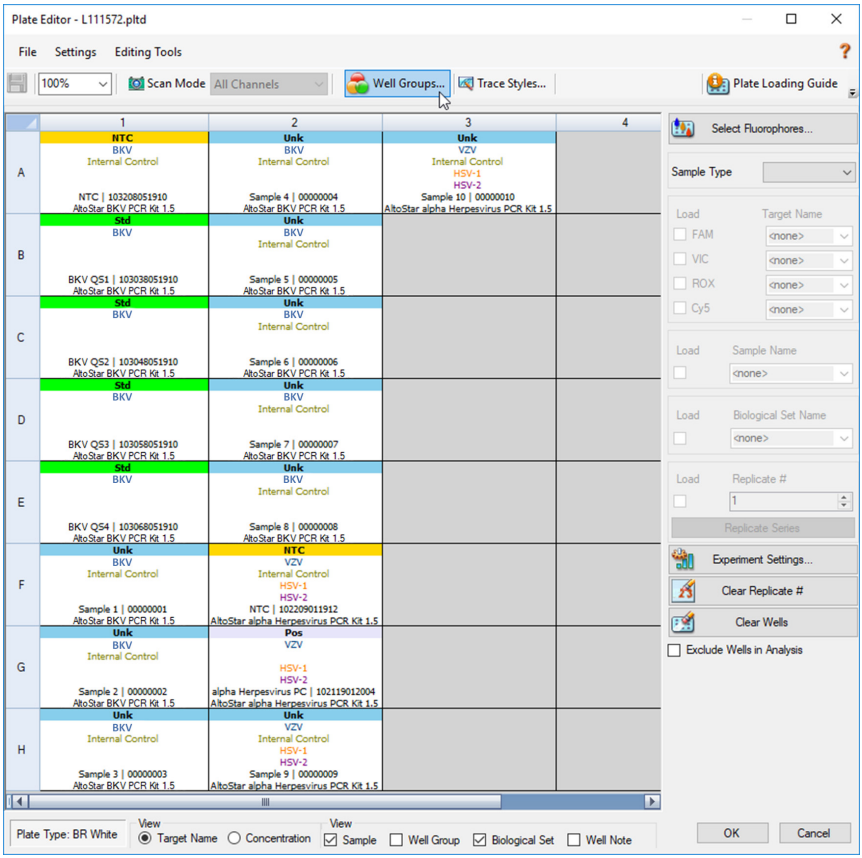

Figure 1: Boîte de dialogue Plate Editor (Éditeur de plaque)

2. Dans la boîte de dialogue Plate Editor (Éditeur de plaque), cliquez sur **Well Groups**… (Groupes de puits...) dans la barre d'outils. La boîte de dialogue Well Groups Manager (Gestionnaire de groupes de puits) s'affiche (voir la figure 2).
3. Cliquez sur le bouton **Add** (Ajouter).
4. Saisissez le nom du premier essai dans la zone de texte.

5. Sélectionnez tous les puits de la PCR plate (plaque PCR) situés dans la zone appartenant au premier essai (voir la figure 2). Les puits appartenant à un essai spécifique peuvent être identifiés dans la boîte de dialogue Plate Editor (Éditeur de plaque) grâce aux éléments saisis dans le champ **Biological Set** (Ensemble biologique).

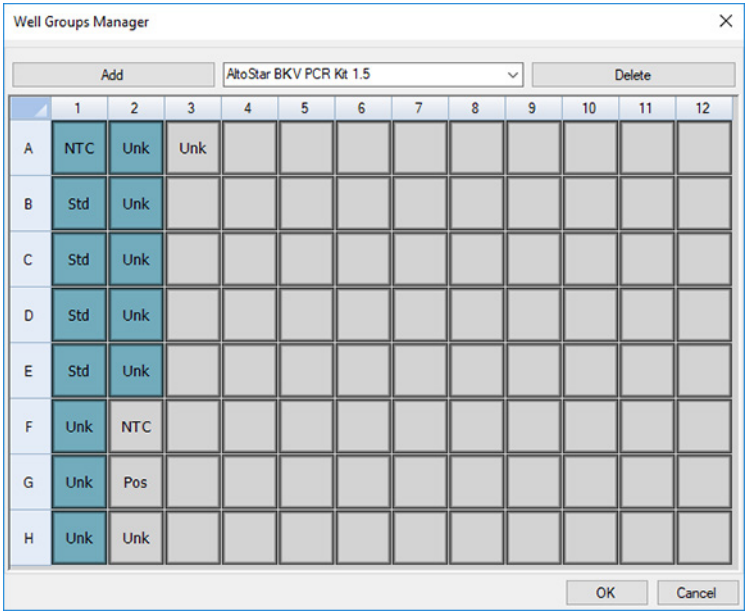

Figure 2: Boîte de dialogue Well Groups Manager (Gestionnaire de groupes de puits)

6. Répétez les étapes 3 à 5 pour tous les essais sur la PCR plate (plaque PCR).
7. Confirmez l'affectation du groupe de puits en cliquant sur **OK**. La boîte de dialogue Well Groups Manager (Gestionnaire de groupes de puits) se ferme.
8. Cliquez sur **OK** pour fermer la boîte de dialogue Plate Editor (Éditeur de plaque).
9. Cliquez sur **Yes** (Oui) pour confirmer et appliquer les modifications.

7.6.7 Analyse des données de PCR

Les résultats de tous les essais (groupes de puits) de la PCR plate (plaque PCR) doivent être analysés dans l'ordre décrit sur la figure 3.

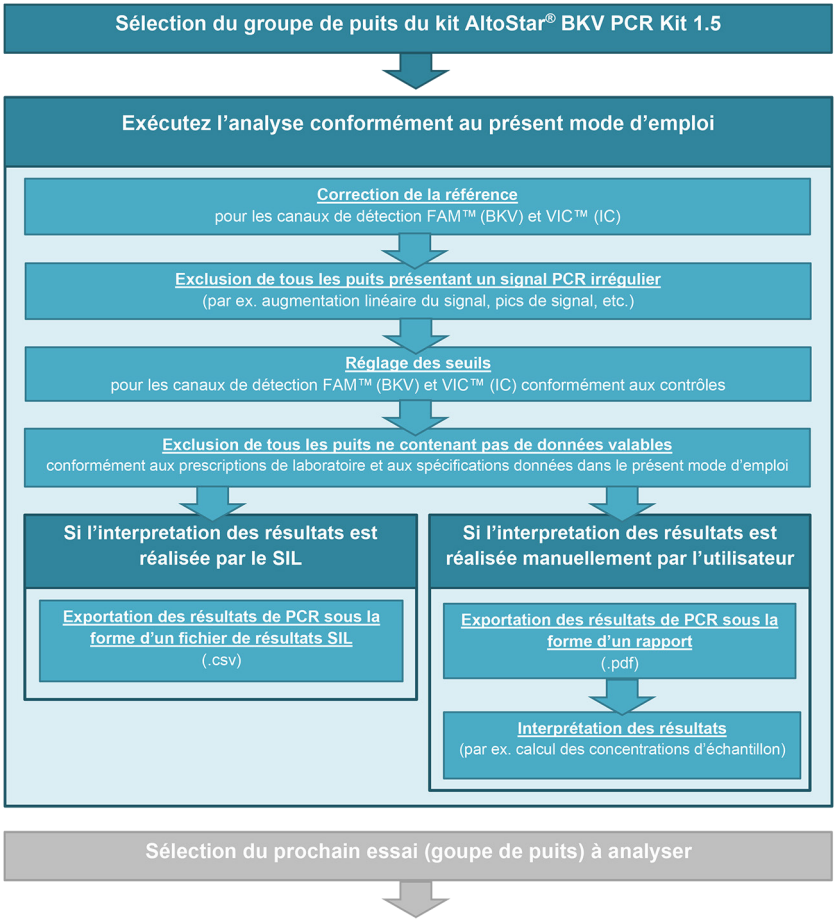

Figure 3: Processus Data Analysis (Analyse des données)

Dans la fenêtre Data Analysis (Analyse des données), veillez à sélectionner le **Well Group** (Groupe de puits) du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5. Pour cela, cliquez sur le menu déroulant **Well Group** (Groupe de puits) à droite en regard du bouton **Well Group** (Groupe de puits) (voir la figure 4) sur la barre d'outils. N'utilisez pas le **Well Group** (Groupe de puits) *All Wells* (Tous les puits). La sélection de la figure 4 est utilisée comme vue d'exemple général.

Avant d'analyser les résultats, assurez-vous que le groupe de puits du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 inclut tous les puits du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 et aucun puits d'autres essais.

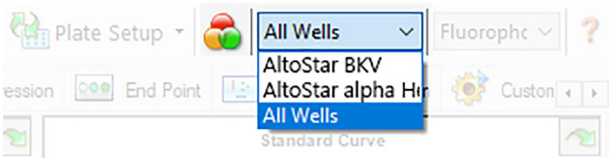

Figure 4: Bouton Well Group (Groupe de puits) et menu déroulant Well Group (Groupe de puits)

REMARQUE

Une analyse combinée de plusieurs essais entraînerait des résultats incorrects.

ATTENTION

Comme pour tout test de diagnostic, les résultats doivent être interprétés en tenant compte des autres constatations cliniques et résultats de laboratoire.

7.6.7.1 Correction de la référence

Les paramètres de référence utilisés par le logiciel CFX Manager™ Dx doivent éventuellement être modifiés pour les puits individuels de l'essai [**Well Group** (Groupe de puits)] en cours d'analyse.

1. Dans la fenêtre Data Analysis (Analyse des données), veillez à sélectionner le **Well Group** (Groupe de puits) du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5. Pour cela, cliquez sur le menu déroulant **Well Group** (Groupe de puits) à droite en regard du bouton **Well Group** (Groupe de puits) (voir la figure 4) sur la barre d'outils.
2. Sur la gauche de la fenêtre Data Analysis (Analyse des données), cochez uniquement la case **FAM** pour le canal de détection ciblé du BKV.
3. Dans la barre de menus de la fenêtre Data Analysis (Analyse des données), cliquez sur **Settings** → **Baseline Threshold...** (Paramètres → Seuil de référence...) pour ouvrir la boîte de dialogue Baseline Threshold (Seuil de référence) (voir la figure 5).
4. Cliquez une fois sur le symbole ◊ dans l'en-tête de la colonne **Baseline End** (Extrémité de référence) pour trier le tableau par valeurs **Baseline End** (Extrémité de référence) croissantes.
5. Sélectionnez toutes les lignes qui indiquent une valeur **Baseline End** (Extrémité de référence) comprise entre 1-9 (voir la figure 5).

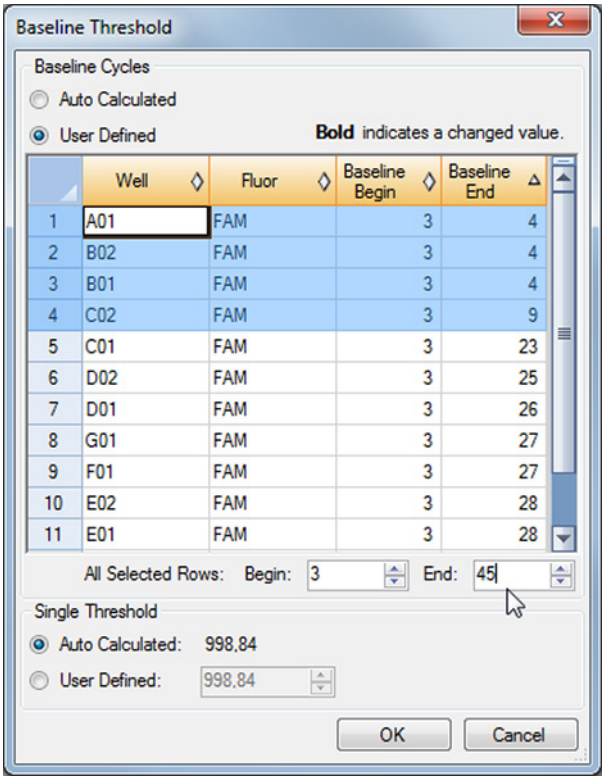

Figure 5: Boîte de dialogue Baseline Threshold (Seuil de référence)

6. Définissez la valeur dans le champ **End:** (Extrémité :) sur 45 pour les lignes sélectionnées (voir la figure 5).
7. Confirmez les paramètres en cliquant sur **OK**.
8. Sur la gauche de la fenêtre Data Analysis (Analyse des données), décochez la case **FAM** et cochez uniquement la case **VIC** pour le canal de détection ciblé sur l'IC.
9. Répétez les étapes 3 à 7 pour le canal de détection VIC™ (IC).

7.6.7.2 Exclusion des signaux PCR irréguliers

Des résultats valides peuvent uniquement être dérivés de signaux PCR exempts d'artefacts, qui peuvent être causés p. ex. par des impuretés ou des bulles dans le mélange PCR. Les signaux PCR présentant des artefacts devront être exclus par l'utilisateur.

1. Dans la fenêtre Data Analysis (Analyse des données), veillez à sélectionner le **Well Group** (Groupe de puits) du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5. Pour cela, cliquez sur le menu déroulant **Well Group** (Groupe de puits) à droite en regard du bouton **Well Group** (Groupe de puits) (voir la figure 4) sur la barre d'outils.

2. Identifiez les puits présentant des signaux PCR irréguliers (augmentation linéaire du signal, pics de signal, etc.) dans l'un des canaux de détection FAM™ (cible BKV) et VIC™ (IC) (voir la figure 6).

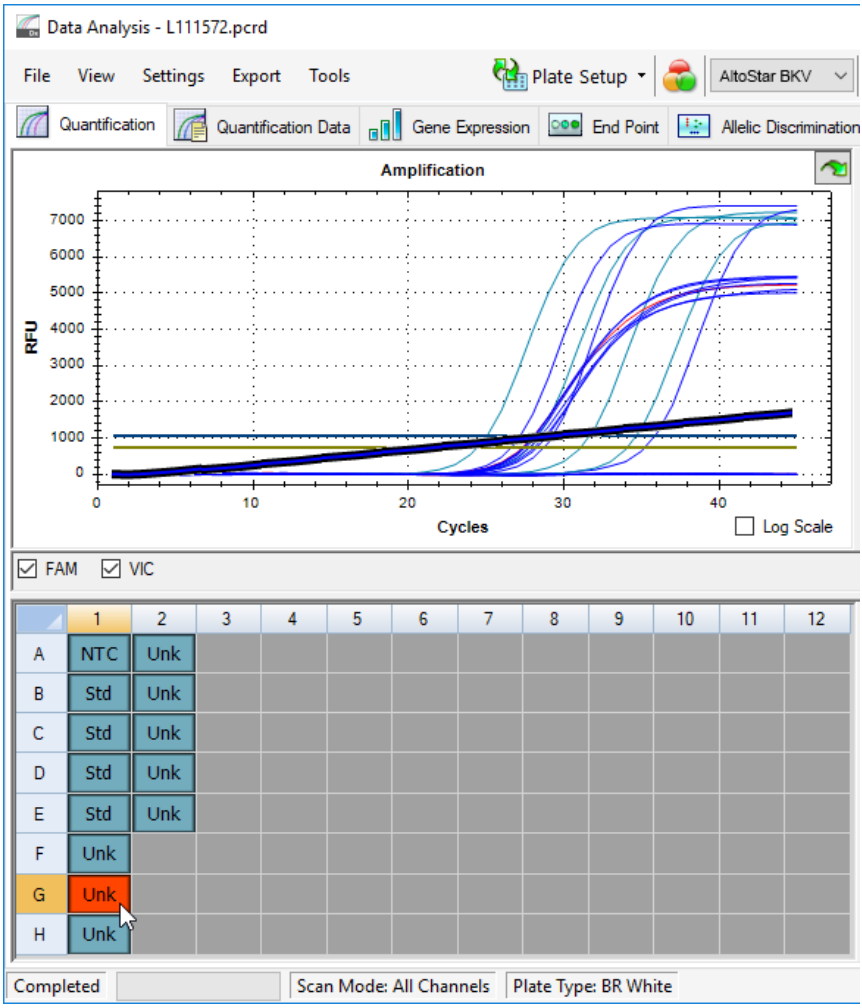

Figure 6: Fenêtre Data Analysis (Analyse des données) : signal PCR irrégulier

3. Cliquez avec le bouton droit de la souris sur chacun des puits concernés et sélectionnez **Well... → Exclude from Analysis** (Puits... → Exclure le puits de l'analyse) (voir la figure 7).

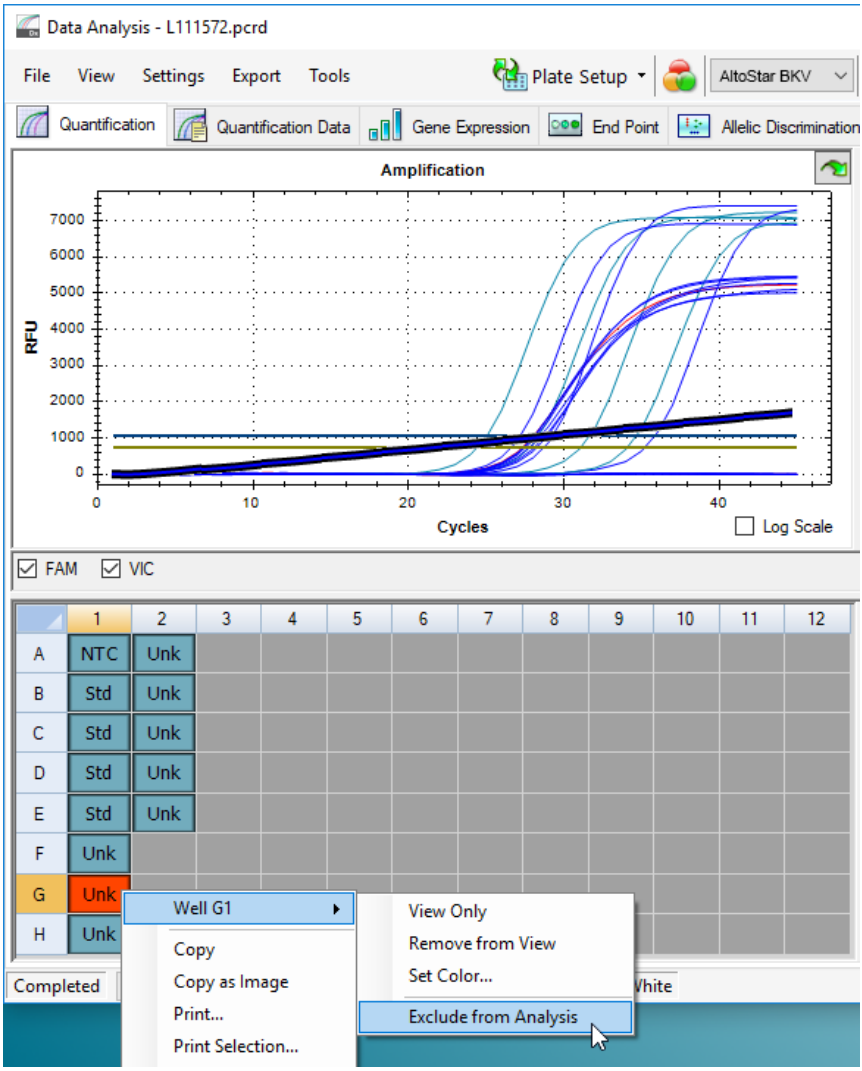

Figure 7: Fenêtre Data Analysis (Analyse des données) : exclure le puits de l'analyse

4. Le puits sélectionné est exclu de l'analyse. Aucun résultat ne sera généré pour ce puits (voir la figure 8).

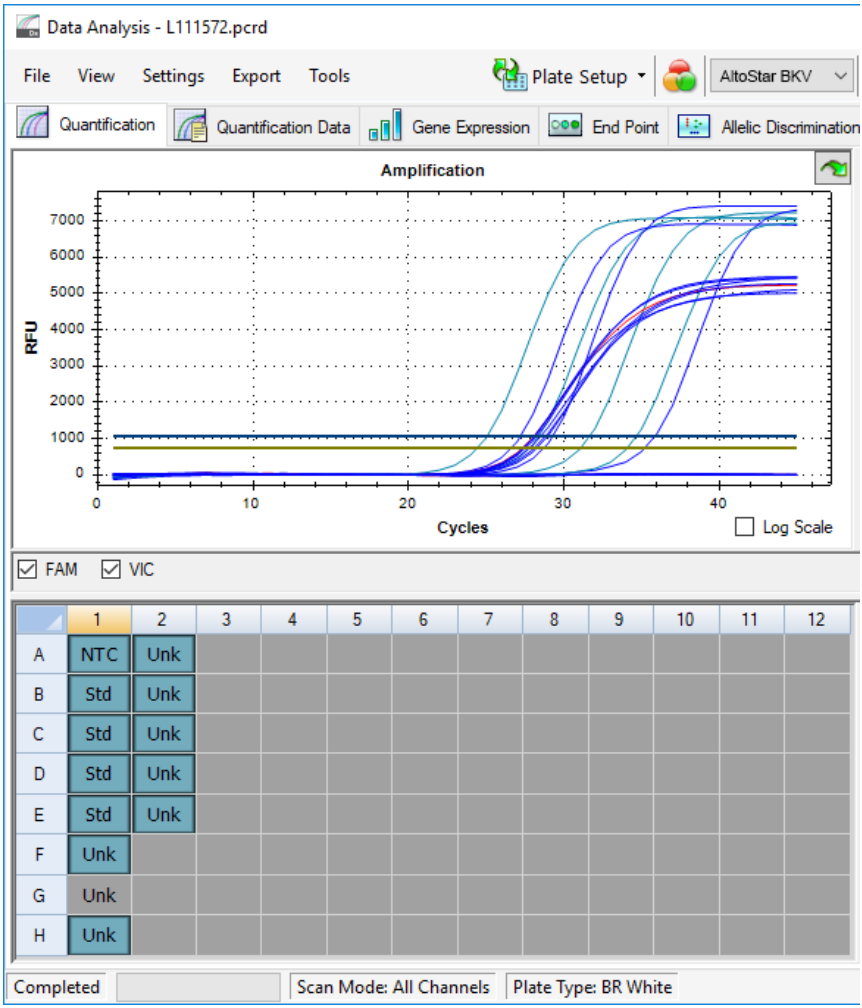

Figure 8: Fenêtre Data Analysis (Analyse des données) : puits exclu

7.6.7.3 Definir des seuils

Les seuils des canaux de détection FAM™ (cible BKV) et VIC™ (IC) doivent être définis manuellement par l'utilisateur en fonction des signaux obtenus pour les contrôles.

1. Dans la fenêtre Data Analysis (Analyse des données), veillez à sélectionner le **Well Group** (Groupe de puits) du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5. Pour cela, cliquez sur le menu déroulant **Well Group** (Groupe de puits) à droite en regard du bouton **Well Group** (Groupe de puits) (voir la figure 4) sur la barre d'outils.

2. Sur la gauche de la fenêtre Data Analysis (Analyse des données), ne cochez que la case **VIC** pour le canal de détection de l'IC (voir la figure 9).

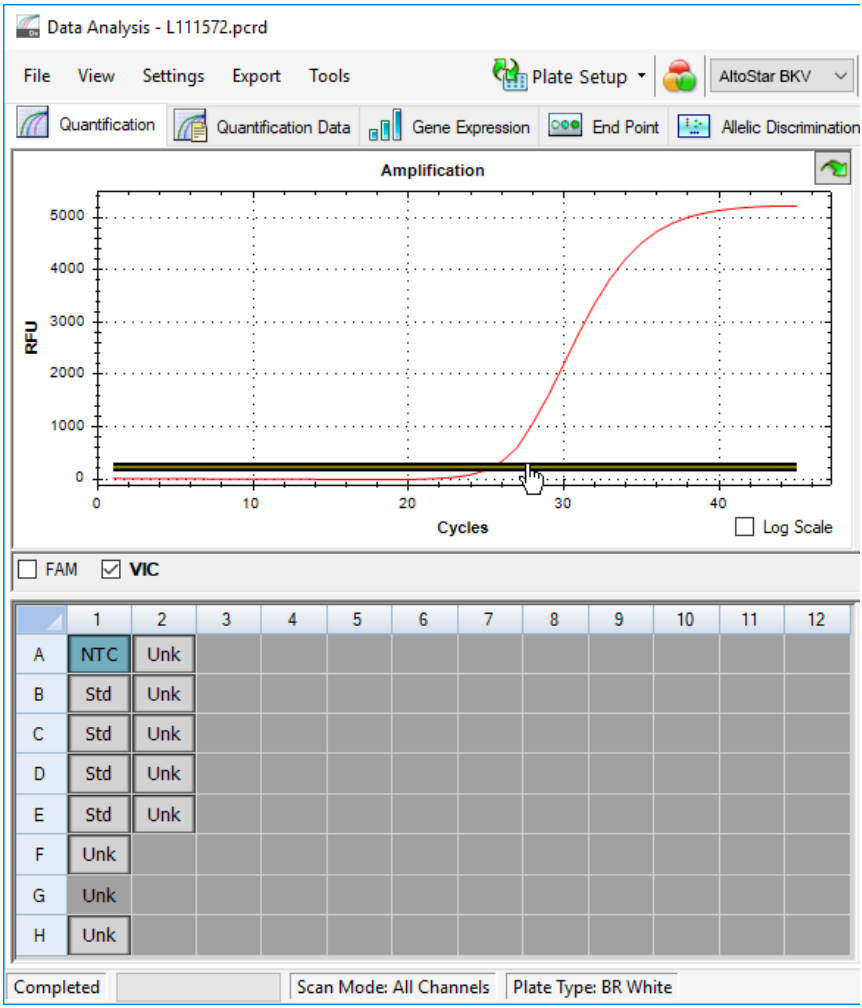

Figure 9: Fenêtre Data Analysis (Analyse des données) : définir le seuil VIC™

3. Sélectionnez uniquement le puits NTC sur la représentation visuelle de la plaque dans la fenêtre Data Analysis (Analyse des données) (voir la figure 9).
4. Faites glisser le seuil dans la zone exponentielle du signal NTC (voir la figure 9).

REMARQUE

Le NTC contient la matrice de l'IC qui aboutit à un signal IC dans un puits NTC valide.

5. Sur la gauche de la fenêtre Data Analysis (Analyse des données), décochez la case **VIC** et cochez la case **FAM** pour le canal de détection ciblé du BKV (voir la figure 10).

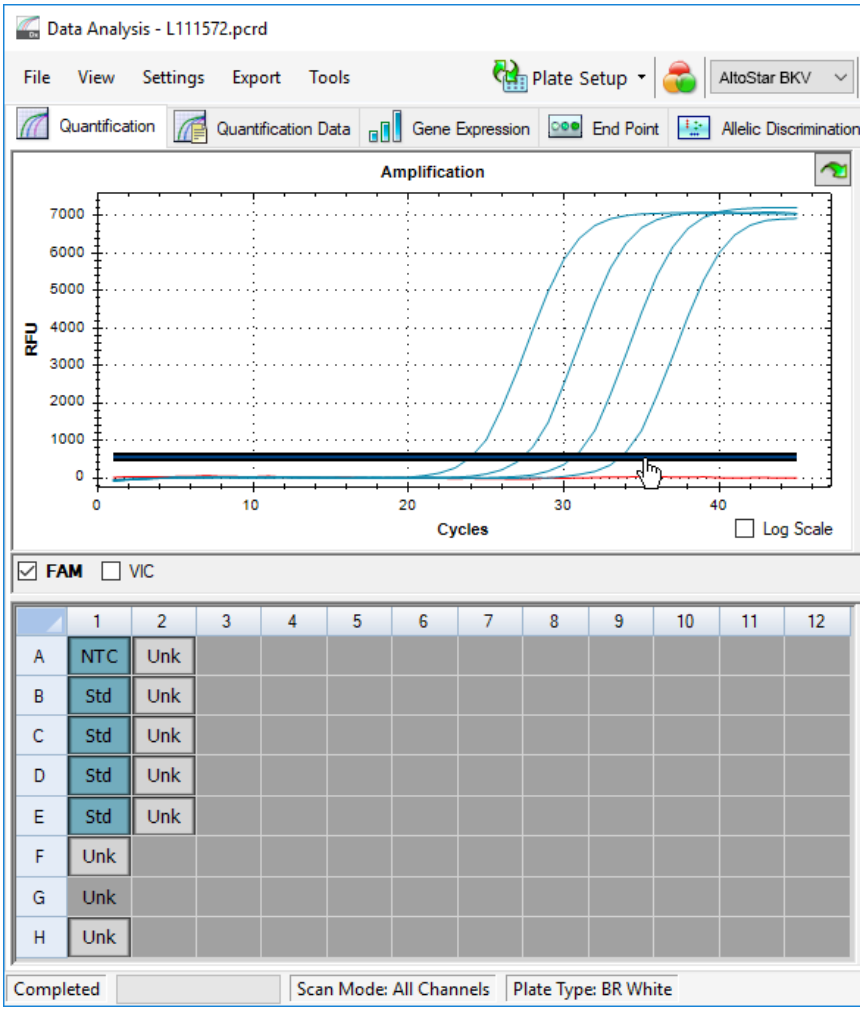

Figure 10: Fenêtre Data Analysis (Analyse des données) : définir le seuil FAM™

6. Sélectionnez uniquement les puits contenant le NTC et les QS sur la représentation visuelle de la plaque dans la fenêtre Data Analysis (Analyse des données) (voir la figure 10).
7. Faites glisser le seuil situé bien au-dessus du signal du NTC dans la zone exponentielle des signaux des QS (voir la figure 10).

7.6.8 Validité des résultats de PCR

7.6.8.1 Exclusion des puits contenant des données non valides

Les puits qui ne contiennent pas de données valides doivent être exclus par l'utilisateur lors de la production des résultats.

1. Dans la fenêtre Data Analysis (Analyse des données), veillez à sélectionner le **Well Group** (Groupe de puits) du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5. Pour cela, cliquez sur le menu déroulant **Well Group** (Groupe de puits) à droite en regard du bouton **Well Group** (Groupe de puits) (voir la figure 4) sur la barre d'outils.
2. Identifiez tous les puits contenant des données non valides. Un puits est non valide si l'une des conditions suivantes s'applique :

   a) Le run dans son intégralité n'est pas valide [voir le chapitre 7.6.8.2 Validité d'un PCR run de diagnostic (qualitatif) et le chapitre 7.6.8.3 Validité d'un PCR run de diagnostic (quantitatif)].

   b) Les données des puits ne satisfont pas les conditions de contrôle pour aboutir à un résultat valide (voir le chapitre 7.6.8.4 Validité des résultats pour un échantillon).

3. Cliquez avec le bouton droit de la souris sur chaque puits contenant des données non valides conformément aux chapitres 7.6.8.2 Validité d'un PCR run de diagnostic (qualitatif) à 7.6.8.4 Validité des résultats pour un échantillon, et sélectionnez **Well**... → **Exclude from Analysis** (Puits... → Exclure le puits de l'analyse) (voir les figures 11 et 12).

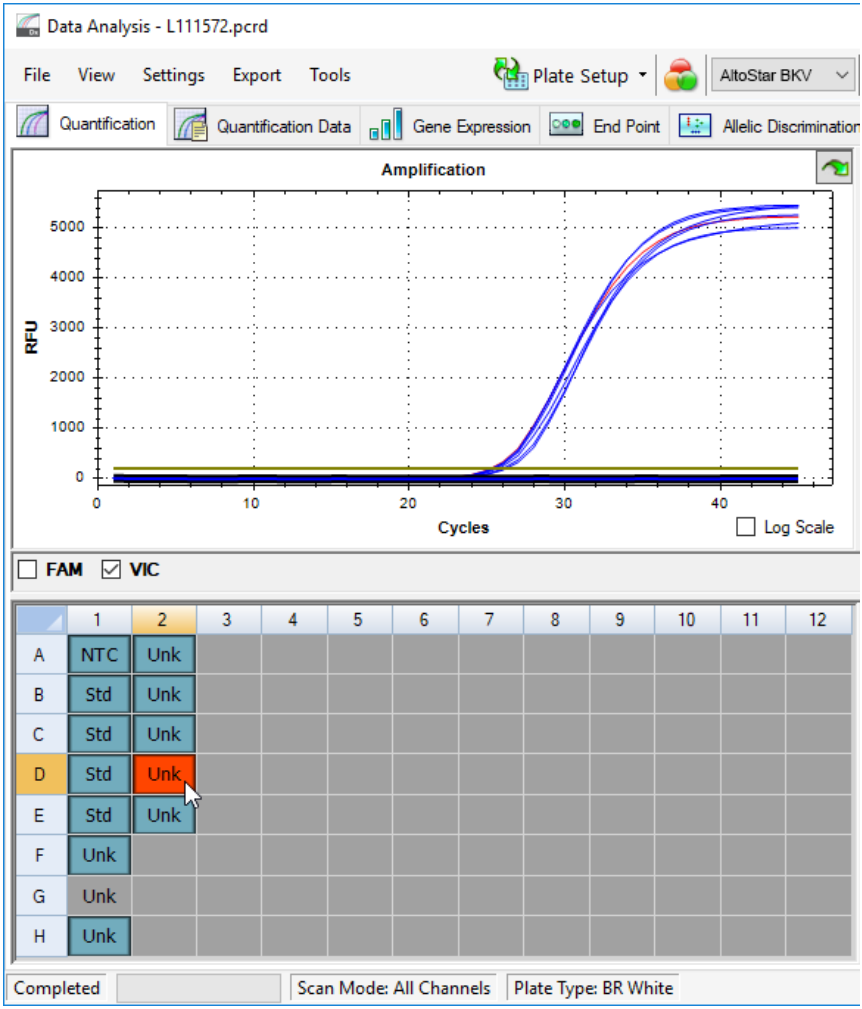

Figure 11: Fenêtre Data Analysis (Analyse des données) : puits non valide

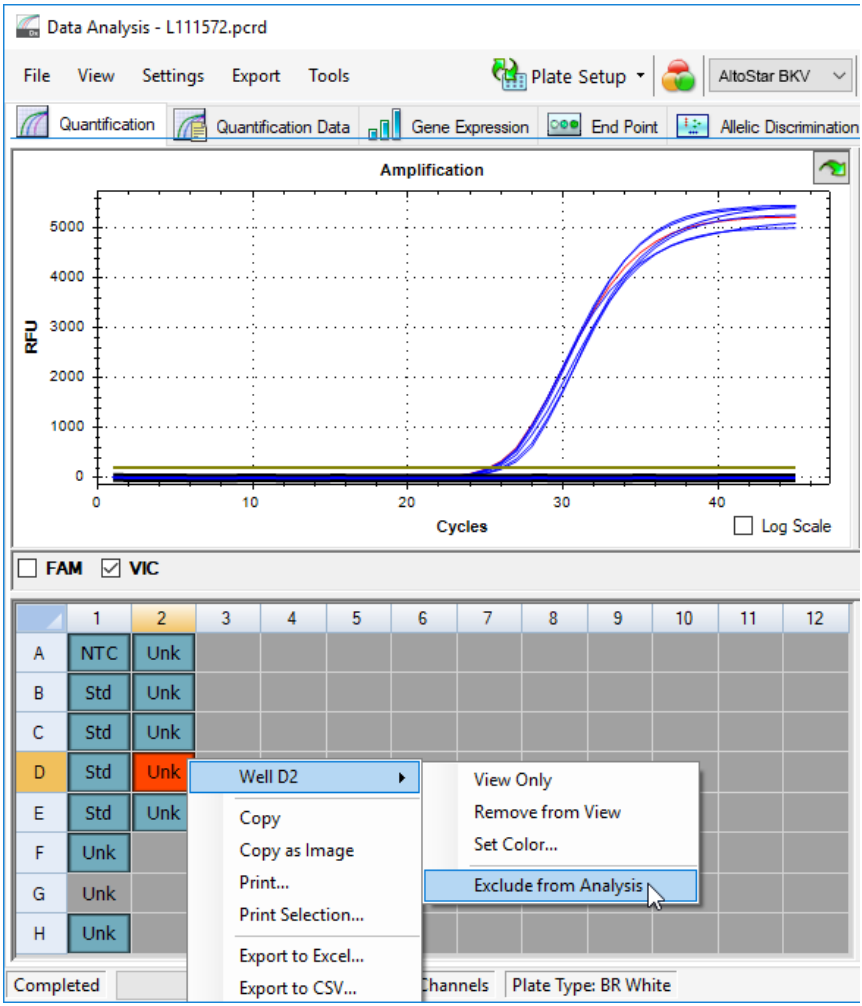

Figure 12: Fenêtre Data Analysis (Analyse des données) : exclure le puits de l'analyse

Le puits sélectionné est exclu de l'analyse. Aucun résultat ne sera généré pour ce puits.

7.6.8.2 Validité d'un PCR run de diagnostic (qualitatif)

Un PCR run de diagnostic qualitatif est **valide** si les conditions de contrôle suivantes sont satisfaites :

Tableau 8: Conditions de contrôle pour un PCR run valide (qualitatif)

Contrôle	Canal de détection	
	FAM™ (cible BKV)	VIC™ (IC)
QS	+	Sans objet
NTC	-	+

Un PCR run de diagnostic qualitatif est **non valide** si :

- Le run n'est pas terminé.
- L'une des conditions de contrôle d'un PCR run de diagnostic qualitatif valide n'est pas satisfaite.

En cas de PCR run de diagnostic non valide, excluez tous les puits de l'analyse et répétez l'AltoStar® run en reprenant les échantillons de départ.

7.6.8.3 Validité d'un PCR run de diagnostic (quantitatif)

Un PCR run de diagnostic quantitatif est **valide** si toutes les conditions de contrôle suivantes sont satisfaites :

- Toutes les conditions de contrôle pour un run PCR de diagnostic qualitatif valide sont satisfaites [voir le chapitre 7.6.8.2 Validité d'un PCR run de diagnostic (qualitatif)].
- La courbe d'étalonnage générée atteint la valeur de paramètre de contrôle suivante :

Tableau 9: Paramètre de contrôle de la courbe d'étalonnage

Paramètre de contrôle	Valeur valide
R au carré (R^2)	≥ 0,98

Le paramètre de contrôle de la courbe d'étalonnage s'affiche sous le graphique courbe d'étalonnage dans la fenêtre Data Analysis (Analyse des données) (voir la figure 13).

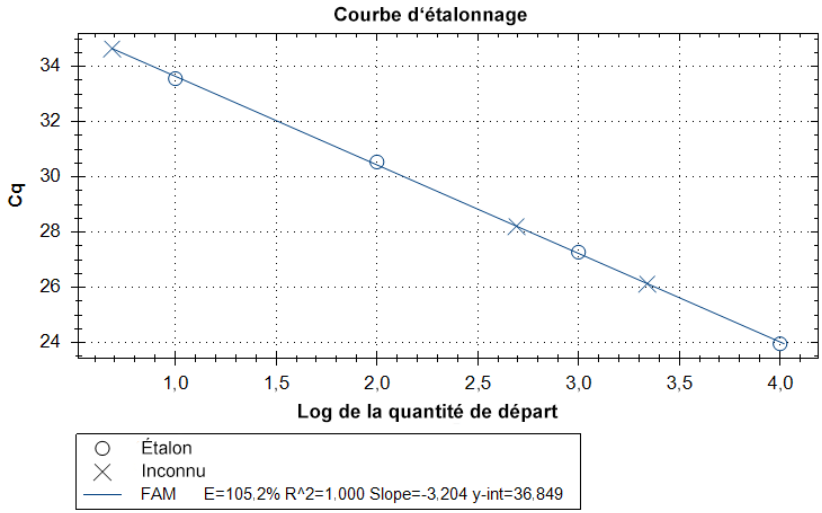

Figure 13: Données de la courbe d'étalonnage

Un PCR run de diagnostic quantitatif est **non valide** si :

- Le run n'est pas terminé.
- L'une des conditions de contrôle d'un PCR run de diagnostic quantitatif valide n'est pas satisfaite.

En cas de PCR run de diagnostic non valide, excluez tous les puits de l'analyse et répétez l'AltoStar® run en reprenant les échantillons de départ.

7.6.8.4 Validité des résultats pour un échantillon

Le résultat d'un échantillon individuel est **non valide** si les signaux du canal de détection VIC™ (IC) et du canal de détection FAM™ (cible BKV) sont négatifs (voir le tableau 10). En cas de résultat non valide pour un échantillon, excluez le puits de l'analyse et répétez le test à partir des échantillons de départ ou prélevez et testez un nouvel échantillon.

Tableau 10: Validité des résultats

Canal de détection		Validité des résultats
FAM™ (cible BKV)	VIC™(IC)	
+	+	Résultat valide
+	-	Résultat valide*
-	+	Résultat valide
-	-	**Résultat non valide**

* La détection de l'IC n'est pas nécessaire lorsque la cible BKV est détectée. Une charge élevée d'ADN spécifique au BKV dans l'échantillon peut entraîner une réduction ou une absence du signal de l'IC.

7.6.9 Exporter les résultats de PCR pour une interprétation automatisée des résultats

Pour que les résultats du PCR run soient disponibles sur un SIL connecté pour l'interprétation automatisée des résultats, ils doivent être exportés sous la forme d'un fichier de résultats SIL (.csv).

1. Dans la fenêtre Data Analysis (Analyse des données), veillez à sélectionner le **Well Group** (Groupe de puits) du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5. Pour cela, cliquez sur le menu déroulant **Well Group** (Groupe de puits) à droite en regard du bouton **Well Group** (Groupe de puits) (voir la figure 4) sur la barre d'outils.
2. Vérifiez que toutes les étapes du processus d'analyse (voir les chapitres 7.6.7.1 Correction de la référence à 7.6.8.1 Exclusion des puits contenant des données non valides) ont été effectuées pour le groupe de puits du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5.

3. Dans la barre de menus de la fenêtre Data Analysis (Analyse des données), cliquez sur **Export** → **Export All Data Sheets** (Exporter → Exporter toutes les feuilles de données) pour ouvrir la boîte de dialogue Browse For Folder (Rechercher un dossier).
4. Dans la boîte de dialogue Browse For Folder (Rechercher un dossier), précisez l'emplacement choisi pour les fichiers de résultats SIL à générer et cliquez sur **OK**.

REMARQUE

L'intégration SIL doit être mise en œuvre selon les spécifications d'altona Diagnostics. Pour en savoir plus sur l'intégration SIL, reportez-vous au chapitre 16. Protocole d'essai pour le logiciel AltoStar® Connect et informations pour l'intégration SIL et/ou contactez l'assistance technique d'altona Diagnostics (voir le chapitre 12. Assistance technique).

REMARQUE

Enregister les résultats de plusieurs essais (groupe de puits) d'un PCR run dans le même dossier entraine le remplacement des fichiers de résultats SIL du premier essai (groupe de puits) par les fichiers SIL de résultats du deuxième essai (groupe de puits). Dans ce cas, les fichiers de résultats SIL du premier essai (groupe de puits) peuvent de nouveau être exportés.

7.6.10 Exporter les résultats de PCR pour une interprétation manuelle des résultats

Si les résultats ne sont pas transmis à un SIL pour l'interprétation automatique des résultats, l'interprétation des résultats doit être effectuée manuellement par l'utilisateur. À cet effet, les résultats de l'analyse de chaque essai (groupe de puits) doivent être exportés sous la forme d'un rapport.

1. Dans la fenêtre Data Analysis (Analyse des données), veillez à sélectionner le **Well Group** (Groupe de puits) du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5. Pour cela, cliquez sur le menu déroulant **Well Group** (Groupe de puits) à droite en regard du bouton **Well Group** (Groupe de puits) (voir la figure 4) sur la barre d'outils.
2. Sur la gauche de la fenêtre Data Analysis (Analyse des données), cochez la case **VIC** ainsi que la case **FAM**.

3. Vérifiez que toutes les étapes du processus d'analyse (voir les chapitres 7.6.7.1 Correction de la référence à 7.6.8.1 Exclusion des puits contenant des données non valides) ont été effectuées pour le (groupe de puits) du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5.

4. Dans la barre de menus de la fenêtre Data Analysis (Analyse des données), cliquez sur **Tools** → **Reports…** (Outils → Rapports...) pour ouvrir la boîte de dialogue Report (Rapport).

5. Assurez-vous que les éléments suivants situés en haut à gauche de la boîte de dialogue Report (Rapport) sont sélectionnés pour la génération du rapport (voir la figure 14) :

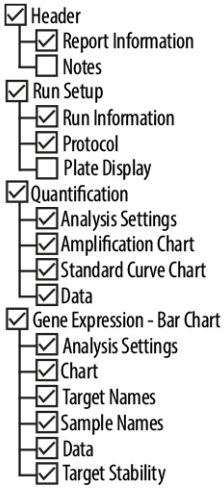

Figure 14: Boîte de dialogue Report (Rapport)

6. Sélectionnez ou désélectionnez d'autres éléments du rapport en cochant les cases correspondantes, s'il y a lieu.

7. Dans la barre de menus de la boîte de dialogue Report (Rapport), cliquez sur **File** → **Save As**... (Fichier → Enregistrer sous...) pour ouvrir la boîte de dialogue Save Report (Enregistrer le rapport).

8. Dans la boîte de dialogue Save Report (Enregistrer le rapport), indiquez le nom et le futur emplacement du rapport à générer et cliquez sur **Save** (Enregistrer).

7.6.10.1 Interprétation manuelle des résultats

1. Ouvrez le fichier de Report (Rapport) généré pour le groupe de puits du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 (voir le chapitre 7.6.10 Exporter les résultats de PCR pour une interprétation manuelle des résultats).

2. Consultez le tableau Quantification Data (Données de quantification) dans le rapport (voir la figure 15). Le tableau est constitué de 2 lignes pour chaque **Sample** (Échantillon), une pour la **Target** (Cible) *BKV* et l'autre pour la **Target** (Cible) *Internal Control* (contrôle interne).

Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Biological Set Name	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Starting Quantity (SQ)	Log Starting Quantity	SQ Mean	SQ Std. Dev	Well Note
A01	FAM	BKV	NTC	NTC | 103208051910	AltoStar BKV PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00	
A02	FAM	BKV	Unkn	Sample 4 | 00000004	AltoStar BKV PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
B01	FAM	BKV	Std	BKV QS1 | 103038051910	AltoStar BKV PCR Kit 1.5	23.97	23.97	0.000	1.000E+04	4.000	1.00E+04	0.00E+00	
B02	FAM	BKV	Unkn	Sample 5 | 00000005	AltoStar BKV PCR Kit 1.5	34.65	34.65	0.000	4.855E+00	0.686	4.85E+00	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
C01	FAM	BKV	Std	BKV QS2 | 103048051910	AltoStar BKV PCR Kit 1.5	27.28	27.28	0.000	1.000E+03	3.000	1.00E+03	0.00E+00	
C02	FAM	BKV	Unkn	Sample 6 | 00000006	AltoStar BKV PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
D01	FAM	BKV	Std	BKV QS3 | 103058051910	AltoStar BKV PCR Kit 1.5	30.54	30.54	0.000	1.000E+02	2.000	1.00E+02	0.00E+00	
E01	FAM	BKV	Std	BKV QS4 | 103068051910	AltoStar BKV PCR Kit 1.5	33.56	33.56	0.000	1.000E+01	1.000	1.00E+01	0.00E+00	
E02	FAM	BKV	Unkn	Sample 8 | 00000008	AltoStar BKV PCR Kit 1.5	28.22	28.22	0.000	4.924E+02	2.692	4.92E+02	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
F01	FAM	BKV	Unkn	Sample 1 | 00000001	AltoStar BKV PCR Kit 1.5	26.14	26.14	0.000	2.195E+03	3.341	2.20E+03	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
H01	FAM	BKV	Unkn	Sample 3 | 00000003	AltoStar BKV PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
A01	VIC	Internal Control	NTC	NTC | 103208051910	AltoStar BKV PCR Kit 1.5	25.27	25.27	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	
A02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 4 | 00000004	AltoStar BKV PCR Kit 1.5	26.08	26.08	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
B02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 5 | 00000005	AltoStar BKV PCR Kit 1.5	25.46	25.46	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
C02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 6 | 00000006	AltoStar BKV PCR Kit 1.5	25.33	25.33	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
E02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 8 | 00000008	AltoStar BKV PCR Kit 1.5	26.25	26.25	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
F01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 1 | 00000001	AltoStar BKV PCR Kit 1.5	25.45	25.45	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
H01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 3 | 00000003	AltoStar BKV PCR Kit 1.5	25.70	25.70	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml

Figure 15: Rapport : Quantitation Data (Données de quantification)

Les résultats qualitatifs sont signalés par le terme *qualitative* (qualitatif) dans la colonne **Well Note** (Commentaire sur le puits) du tableau Quantitation Data (Données de quantification).

3. Identifiez chaque ligne avec la **Target** (Cible) *BKV* et le terme *qualitative* (qualitatif) dans la colonne **Well Note** (Commentaire sur le puits).

4. Dans ces lignes, consultez la colonne $\mathbf{C_q}$ pour le résultat du **Sample** (Échantillon) respectif.

5. Consultez le tableau 11 pour une interprétation des résultats qualitatifs.

Tableau 11: Résultats qualitatifs : interprétation des résultats

Cycle seuil (C_q) de la cible BKV	Interprétation des résultats
1-45	ADN spécifique au BKV détecté.
S.O.	Aucun ADN spécifique au BKV détecté. L'échantillon ne contient pas de quantités détectables d'ADN spécifique au BKV.

Les résultats quantitatifs sont signalés par un *Concentration factor* (facteur de concentration) dans la colonne **Well Note** (Commentaire sur le puits) du tableau Quantitation Data (Données de quantification) (voir la figure 15).

6. Identifiez chaque ligne avec la **Target** (Cible) *BKV* et un *Concentration factor* (facteur de concentration) dans la colonne **Well Note** (Commentaire sur le puits).
7. Dans ces lignes, consulter la colonne **Starting Quantity (SQ)** [Quantité initiale (SQ)] pour connaître la concentration de la cible BKV mesurée dans l'éluat du **Sample** (Échantillon) correspondant. Pour calculer le résultat pour l'échantillon patient de départ, la valeur **Starting Quantity (SQ)** [Quantité initiale (SQ)] doit être multipliée par le *Concentration factor* (facteur de concentration) correspondant (unité comprise) par l'utilisateur.
8. Consultez le tableau 12 pour une interprétation des résultats quantitatifs.

Tableau 12: Résultats quantitatifs : interprétation des résultats

Starting Quantity (SQ) [Quantité initiale (SQ)] de la cible BKV	Interprétation des résultats
> 0	ADN spécifique au BKV détecté. Multipliez la valeur de **Starting Quantity (SQ)** [Quantité initiale (SQ)] par le *Concentration factor* (facteur de concentration) indiqué dans la colonne **Well Note** (Commentaire sur le puits) (unité incluse) pour calculer la concentration dans l'échantillon patient de départ.
S.O.	Aucun ADN spécifique au BKV détecté. L'échantillon ne contient pas de quantités détectables d'ADN spécifique au BKV.

8. Utilisation du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 avec d'autres instruments PCR en temps réel que le CFX96™ Deep Well Dx System

Outre le CFX96™ DW Dx, le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 a été validé avec d'autres instruments PCR en temps réel (voir le chapitre 5.3.2.2 Instruments PCR en temps réel). Les chapitres suivants 8.1 Matériel et dispositifs nécessaires mais non fournis et 8.2 Procédure décrivent comment utiliser le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 avec ces instruments.

8.1 Matériel et dispositifs nécessaires mais non fournis

Les instruments et le matériel suivants sont nécessaires :

- Matériel et dispositifs généraux (voir le chapitre 7.5 Matériel et dispositifs généraux)
- CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)
  - PCR plates (plaques PCR) 96 puits et film protecteur (pour plus de détails, voir le tableau 3)
- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
  - PCR plates (plaques PCR) 96 puits et film protecteur (pour plus de détails, voir le tableau 3)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
  - Tubes à bandes de 0,1 ml et capuchons [STRIP Tubes 0.1 ml pour thermocycleurs Rotor-Gene® (LTF Labortechnik) ou équivalent].
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System et ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
  - PCR plates (plaques PCR) 96 puits et film protecteur [MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate et MicroAmp™ Optical Adhesive Film (Applied Biosystems) ou équivalent]

- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
  - PCR plates (plaques PCR) 96 puits et film protecteur [LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, blanc et LightCycler® 480 Sealing Foil (Roche) ou équivalent]

REMARQUE

Il est déconseillé d'utiliser d'autres matériaux ou dispositifs que ceux spécifiés dans le présent mode d'emploi.

8.2 Procédure

8.2.1 Préparation de l'échantillon

Le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 a été validé à l'aide de l'AltoStar® AM16 en combinaison avec le kit AltoStar® Purification Kit 1.5

D'autres systèmes et kits d'extraction des acides nucléiques pourraient également convenir. L'utilisateur doit s'assurer qu'une procédure donnée d'extraction des acides nucléiques est compatible avec le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5.

Le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 doit être utilisé avec un IC hétérologue [AltoStar® Internal Control 1.5 (contrôle interne)], qui permet de contrôler la procédure de préparation de l'échantillon (extraction de l'acide nucléique) et l'analyse PCR suivante.

- En cas d'utilisation d'autres méthodes d'extraction de l'acide nucléique que l'AltoStar® AM16 en combinaison avec le kit AltoStar® Purification Kit 1.5, l'IC doit être ajouté pendant l'étape de lyse de la procédure d'extraction de l'acide nucléique.
- L'IC doit toujours être ajouté au mélange échantillon/lysis buffer (tampon de lyse).
- Le volume d'IC à ajouter dépend toujours et uniquement du volume d'élution. Il représente 50 % du volume d'élution. Par exemple, si l'acide nucléique doit être élué dans 60 µl d'elution buffer (tampon d'élution) ou d'eau, 30 µl d'IC par échantillon doivent être ajoutés au mélange échantillon/lysis buffer (tampon de lyse).

ATTENTION

Un stockage inapproprié des éluats peut entraîner une dégradation de la séquence cible du BKV et pourrait compromettre les performances du produit.

8.2.2 Configuration du master mix

Tous les composants du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 et échantillons doivent être complètement décongelés, mélangés (par pipetage ou agitation douce) et centrifugés brièvement avant utilisation. Préparez le master mix selon le schéma de pipetage suivant :

Tableau 13: Schéma de pipetage (configuration du master mix)

Nombre de réactions (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Volume de master mix	**20 µl**	**240 µl**

ATTENTION

N'utilisez pas des volumes de Master A et Master B différents de ceux spécifiés dans ce mode d'emploi pour la configuration du master mix, car cela pourrait compromettre les performances du produit.

ATTENTION

L'absence de centrifugation des composants du produit après la décongélation peut entraîner leur contamination par des résidus de réactifs dans les couvercles et pourrait compromettre les performances du produit.

8.2.3 Configuration des réactions

1. Pipetez 20 µl du master mix dans chaque puits requis d'une PCR plate (plaque PCR) 96 puits optique appropriée ou d'un tube de réaction optique approprié.
2. Ajoutez 10 µl de l'échantillon (éluat d'extraction de l'acide nucléique) ou 10 µl des contrôles (QS1-4 ou NTC).

Tableau 14: Schéma de pipetage (configuration des réactions)

Configuration des réactions	
Master mix	20 µl
Échantillon ou contrôle	10 µl
Volume total	**30 µl**

3. Assurez-vous que pour l'analyse quantitative, QS1-4 et 1 NTC sont utilisés. Pour l'analyse qualitative, assurez-vous qu'au moins QS4 et 1 NTC sont utilisés.
4. Mélangez soigneusement les échantillons et les contrôles avec le master mix en pipetant de haut en bas.
5. Fermez la PCR plate (plaque PCR) 96 puits avec un PCR Plate Sealing Foil (film protecteur de la plaque PCR) et les tubes de réaction avec les capuchons appropriés (voir le chapitre 8.1 Matériel et dispositifs nécessaires mais non fournis).
6. Centrifugez la PCR plate (plaque PCR) 96 puits dans une centrifugeuse équipée d'un rotor pour microplaques pendant 30 secondes à environ 1 000 x g (~ 3 000 tr/min).

Après la fin de la configuration PCR, le mélange PCR est stable à température ambiante (max. +30 °C) pendant 30 minutes.

ATTENTION

Ne dépassez pas la durée de stockage du mélange PCR, car cela pourrait compromettre la performance du produit.

ATTENTION

Ne mélangez pas les échantillons ou les ID d'échantillons pendant la configuration PCR ou le transfert vers l'instrument PCR. Cela pourrait conduire à des résultats faussement positifs ou faussement négatifs en raison d'une affectation incorrecte des échantillons.

8.2.4 PCR run

8.2.4.1 Programmation de l'instrument PCR en temps réel

Pour obtenir des informations de base concernant la configuration et la programmation des différents instruments PCR en temps réel, veuillez consulte le mode d'emploi de l'instrument concerné.

Pour obtenir des instructions détaillés concernant l'utilisation du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 sur des instruments PCR en temps réel spécifiques, veuillez contacter notre assistance technique (voir le chapitre 12. Assistance technique).

8.2.4.2 Paramètres de run

Définissez les paramètres de base suivants :

Tableau 15: Paramètres de run

Paramètres	
Volumes de réaction	30 µl
Taux de rampe	Par défaut
Référence passive*	ROX™

* Le cas échéant

Définissez les détecteurs de fluorescence (colorations) suivants :

Tableau 16: Détecteurs de fluorescence

Cible	Nom du détecteur	Rapporteur	Extincteur
BKV	BKV	FAM™	(Aucun)
Internal Control (contrôle interne)	Internal Control	JOE™	(Aucun)

Définissez le profil de température et l'acquisition de coloration suivants :

Tableau 17: Profil de température et acquisition de coloration

	Étape	Répétitions de cycles	Acquisition	Température [°C]	Durée [min:s]
Dénaturation	Maintien	1	-	95	02:00
Amplification	Cycle	45	-	95	00:15
			Oui	58	00:45
			-	72	00:15

ATTENTION

N'utilisez pas d'autres conditions de cycle que celles spécifiées dans ce mode d'emploi, car cela pourrait compromettre les performances du produit.

8.2.5 Analyse des données

Pour obtenir des informations de base concernant l'analyse des données sur des instruments PCR en temps réel, veuillez consulter le manuel d'utilisation de l'instrument concerné.

Pour obtenir des instructions détaillés concernant l'analyse des données générées avec le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 sur différents instruments PCR en temps réel, veuillez contacter notre assistance technique (voir le chapitre 12. Assistance technique).

Les critères de validité des PCR runs de diagnostic et d'interprétation des résultats, quel que soit l'instrument PCR en temps réel, sont décrits dans les chapitres 7.6.8.2 Validité d'un PCR run de diagnostic (qualitatif) à 7.6.8.4 Validité des résultats pour un échantillon, le chapitre 7.6.10.1 Interprétation manuelle des résultats et les tableaux 11 et 12.

REMARQUE

La concentration de « l'échantillon » est affichée en UI/µl et se réfère à la concentration dans l'éluat.

Pour déterminer la **charge virale de l'échantillon de départ**, il convient d'appliquer la formule suivante :

$$\text{Charge virale (}\textbf{Échantillon}\text{) [UI/ml]} = \frac{\text{Volume (}\textbf{Éluat}\text{) [µl]} \cdot \text{Charge virale (}\textbf{Éluat}\text{) [UI/µl]}}{\text{Entrée d'échantillon [ml]}}$$

ATTENTION

N'utilisez pas d'autres paramètres de contrôle pour l'analyse des données que ceux spécifiés dans ce mode d'emploi, car cela pourrait donner des résultats d'examen DIV incorrects.

ATTENTION

Comme pour tout test de diagnostic, les résultats doivent être interprétés en tenant compte des autres constatations cliniques et résultats de laboratoire.

9. Données de performances

L'évaluation de la performance du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 a été réalisée à l'aide de la norme international de l'OMS « 1st WHO International Standard for BK Virus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 14/212) » et du matériel de référence du BKV calibré par rapport à la norme internationale de l'OMS.

9.1 Plasma

9.1.1 Sensibilité analytique

Pour déterminer la limite de détection (LoD), une série de dilutions de la norme international de l'OMS « 1st WHO International Standard for BK Virus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 14/212) » dans le plasma allant de 1,00E+03 à 1,00E+00 UI/ml a été réalisée.

Chaque dilution a été testée en 8 réplicats sur 3 runs différents (total n = 24 par dilution) à l'aide de combinaisons de :

- 3 lots de kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5
- 3 lots de kit AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 lots d'AltoStar® Internal Control 1.5 (contrôle interne)
- 3 instruments AltoStar® AM16
- 3 instruments CFX96™ DW Dx

Les données de tous les runs ont été combinées et une analyse probit a été réalisée pour déterminer la valeur de la LoD à 95 %.

Tableau 18: Résultats de PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5

Concentration [UI/ml]	N [total]	N [positif]	Taux de réussite [%]
1,00E+03	24	24	100
5,00E+02	23*	23	100
2,50E+02	24	24	100
2,00E+02	24	24	100
1,50E+02	24	24	100
1,00E+02	24	24	100
5,00E+01	24	23	96
2,00E+01	24	16	67
1,00E+01	24	13	54
5,00E+00	24	4	17
1,00E+00	24	1	4

* Un échantillon n'a pas été traité.

La LoD du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 pour la détection du BKV dans le plasma est 66 UI/ml (intervalle de confiance à 95 % : 45-120 UI/ml).

9.1.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 est assurée par la sélection minutieuse des oligonucléotides (amorces et sondes). Les oligonucléotides ont été vérifiés par analyse comparative de séquences par rapport à des séquences librement accessibles au public pour s'assurer que tous les génotypes du BKV pertinents seraient détectés.

Pour la vérification de la spécificité analytique du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5, les expériences suivantes ont été réalisées (voir les chapitres 9.1.2.1 Échantillons négatifs à 9.1.2.3 Réactivité croisée) :

9.1.2.1 Échantillons négatifs

35 échantillons de plasma négatifs pour le BKV provenant de donneurs individuels ont été testés avec le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5. Tous les échantillons (35 sur 35) ont été testés négatifs pour l'ADN spécifique au BKV et positifs pour l'IC. La spécificité analytique du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 pour les échantillons de plasma est ≥ 95 %.

9.1.2.2 Substances interférentes

Pour évaluer l'influence des substances endogènes et exogènes susceptibles de perturber les performances du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5, des substances choisies ont été ajoutées aux échantillons de plasma. Ces échantillons de plasma contenaient du BKV dans une concentration de 3 x LoD (1,98E+02 UI/ml), 1,00E+04 UI/ml et pas de BKV, respectivement.

Les résultats obtenus pour les échantillons contenant des substances potentiellement interférentes ont été comparés aux résultats obtenus pour les échantillons de plasma ne contenant aucune substance interférente ajoutée. Chaque échantillon a été traité en 3 répliques.

Aucune interférence n'a été observée pour les échantillons contenant des niveaux élevés de :

- Substances endogènes
  - Bilirubine
  - Hémoglobine
  - ADN génomique humain
  - Albumine de sérum humain
  - Triglycérides
- Substances exogènes
  - Azathioprine
  - Cyclosporine
  - Foscarnet
  - Ganciclovir

ATTENTION

La présence d'inhibiteurs de PCR (p. ex. l'héparine) peut donner des résultats faussement négatifs ou non valides.

9.1.2.3 Réactivité croisée

La spécificité analytique du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 en ce qui concerne la réactivité croisée avec des pathogènes autres que BKV a été évaluée en testant :

- des virus apparentés à BKV
- des virus provoquant des symptômes similaires à une infection par BKV
- des virus susceptibles d'être présents chez les patients souffrant d'une infection par BKV

Le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 ne présente pas de réactivité croisée avec les pathogènes suivants :

- Adénovirus (ADV)
- Cytomégalovirus (CMV)
- Virus d'Epstein-Barr (EBV)
- Virus de l'hépatite A (HAV)
- Virus de l'hépatite B (HBV)
- Virus de l'hépatite C (HCV)
- Virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1)
- Virus de l'herpès simplex de type 2 (HSV-2)
- Virus de l'herpès humain de type 6A (HHV-6A)
- Virus de l'herpès humain de type 6B (HHV-6B)
- Virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1)
- Virus JC (JCV)
- Parvovirus B19
- Virus varicelle-zona (VZV)

ATTENTION

Si l'échantillon contient d'autres pathogènes que le BKV, il peut y avoir compétition avec l'amplification de la cible ou des réactions croisées, donnant ainsi des résultats d'examen DIV incorrects.

9.1.3 Plage linéaire

Pour déterminer la plage linéaire du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5, une série de dilutions du BKV de 1,00E+08 à 2,00E+02 UI/ml dans du plasma a été testée.

- Des dilutions avec une concentration comprise entre 1,00E+08 et 1,00E+06 UI/ml ont été testées en 4 répétitions.
- Des dilutions avec une concentration comprise entre 1,00E+05 et 2,00E+02 UI/ml ont été testées en 8 répétitions.

L'analyse a été effectuée sur la base d'une régression polynomiale.

La plage linéaire du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 pour la quantification du BKV dans le plasma est de 2,00E+02 à 1,00E+08 UI/ml. Une représentation graphique des données est présentée à la figure 16.

Concentration estimée en log10 vs. concentration nominale en log10 du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5

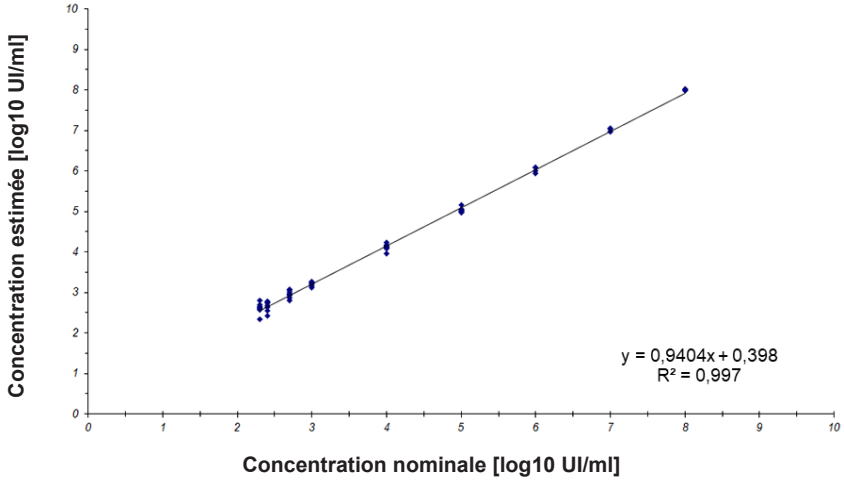

Figure 16: Analyse de régression linéaire du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 avec échantillons de plasma

9.1.4 Précision

La précision du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 a été évaluée à l'aide d'un ensemble comprenant :

- 1 échantillon de plasma fortement positif au BKV (1,00E+04 UI/ml)
- 1 échantillon de plasma faiblement positif au BKV [1,00E+03 UI/ml (5 x la limite inférieure de quantification (LLoQ)]
- 1 échantillon de plasma négatif au BKV

Chaque élément de l'ensemble a été testé sur au moins 4 répliques par run.

5 runs ont été effectués sur 5 jours utilisant des combinaisons de :

- 3 lots de kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5
- 3 lots de kit AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 lots d'AltoStar® Internal Control 1.5 (contrôle interne)
- 3 instruments AltoStar® AM16
- 3 instruments CFX96™ DW Dx

La répétabilité (variabilité intra-run), la variabilité inter-lot et la reproductibilité (variabilité totale) ont été déterminées sur la base de :

- Valeurs de quantification pour les échantillons fortement et faiblement positifs au BKV (voir le tableau 19)
- Valeurs de cycle seuil (C_q*) pour l'IC dans les échantillons négatifs au BKV (voir le tableau 20)

* Veuillez noter que le terme choisi C_q est équivalent à la désignation de C_t, qui pourrait être utilisée par d'autres thermocycleurs que le système CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad).

Tableau 19: Données de précision (% du CV log10 des données de quantification) pour des échantillons de plasma fortement et faiblement positifs au BKV

	Échantillon fortement positif au BKV (1,00E+04 UI/ml)	Échantillon faiblement positif au BKV (1,00E+03 UI/ml)
Variabilité intra-run	0,76-1,34	1,81-5,76
Variabilité inter-lot	0,92	4,52
Variabilité totale	1,30	4,58

Tableau 20: Données de précision (CV % des valeurs de C_q) pour l'IC dans les échantillons de plasma négatifs au BKV

	IC
Variabilité intra-run	0,10-0,32
Variabilité inter-lot	0,25
Variabilité totale	0,40

9.1.5 Taux global de défaillance

La fiabilité du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 a été évaluée en testant 30 échantillons de plasma négatifs au BKV prélevés chez des donneurs individuels et enrichis en BKV à une concentration finale de 3 x LoD (1,98E+02 UI/ml). Tous les échantillons testés (30 sur 30) ont été testés positifs dans le canal de détection de fluorescence spécifique (FAM™) au BKV.

9.1.6 Contamination croisée

La contamination croisée est un risque qui dépend essentiellement du flux de travail de l'essai PCR utilisé. Pour AltoStar® Workflow (flux de travail), le kit AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5 a été utilisé comme modèle exemplaire. L'éventuelle contamination croisée par transfert des échantillons fortement positifs a été évaluée en testant en alternance des échantillons fortement positifs au parvovirus B19 (1,00E+07 UI/ml) et des échantillons négatifs (n = 44 à chaque run, 2 runs) à l'aide du kit AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5. Aucune contamination croisée n'a été observée, c'est-à-dire que tous les échantillons négatifs au parvovirus B19 ont été testés négatifs.

9.1.7 Performances cliniques

Le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 a été évalué dans le cadre d'une étude comparative avec le kit BK Virus R-gene® (bioMérieux) portant le marquage CE. Rétrospectivement, 147 échantillons de plasma ont été testés en parallèle :

Le kit BK Virus R-gene® (bioMérieux) a é té utilisé en combinaison avec le système NucliSENS® easyMAG® System (bioMérieux).

Le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 a été utilisé avec le kit AltoStar® Purification Kit 1.5 et l'AltoStar® Internal Control 1.5 (contrôle interne) dans l'AltoStar® AM16 et le CFX96™ DW Dx.

Pour l'analyse qualitative, tous les échantillons dont le résultat était non valide pour un essai ou les deux ainsi que les échantillons dont le résultat quantitatif était inférieur à la LoD de l'un ou des deux essais ont été exclus.

Les résultats des 128 échantillons restants figurent dans le tableau 21.

Tableau 21: Résultats de l'évaluation de la sensibilité et la spécificité du diagnostic pour le BKV dans des échantillons de plasma

		Kit BK Virus R-gene® (bioMérieux)	
		POSITIF	NÉGATIF
AltoStar® BKV PCR Kit 1.5	POSITIF	73	1
	NÉGATIF	0	54

La sensibilité et la spécificité du diagnostic obtenues à l'aide du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 par rapport au kit BK Virus R-gene® (bioMérieux) étaient de 100 % et 98 %, respectivement.

Pour la corrélation quantitative, tous les échantillons dont le résultat était négatif pour un essai ou les deux ainsi que les échantillons dont le résultat quantitatif était inférieur à la LLoQ de l'un ou des deux essais ont été exclus.

Les résultats des 67 échantillons restants ont été utilisés pour la corrélation quantitative par analyse de régression linéaire (voir la figure 17).

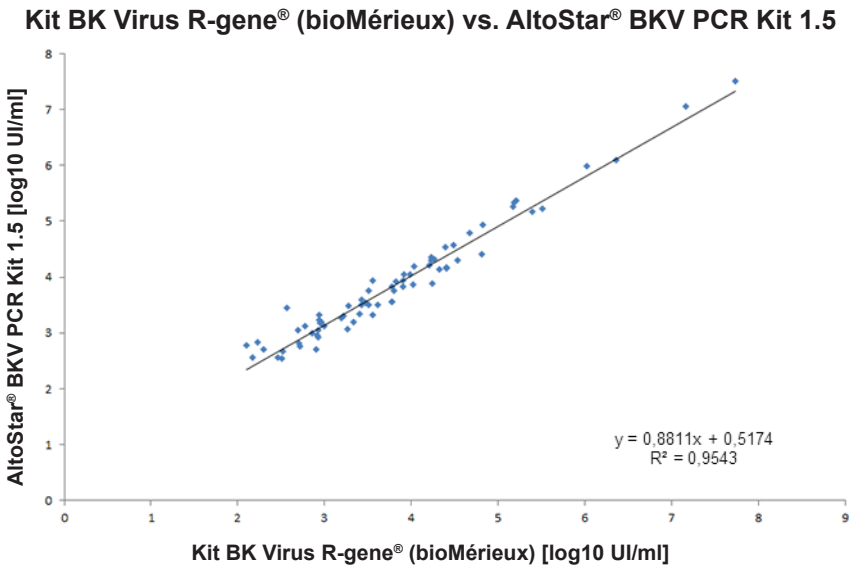

Figure 17: Analyse de régression linéaire des résultats obtenus avec le kit BK Virus R-gene® (bioMérieux) (référence) et le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5

Très bonne corrélation entre les résultats quantitatifs obtenus avec le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 et avec le kit BK Virus R-gene® (bioMérieux) [coefficient de corrélation R = 0,98 (R^2 = 0,95)].

9.2 Sang total

9.2.1 Sensibilité analytique

Pour déterminer la LoD, une série de dilutions de la norme international de l'OMS « 1st WHO International Standard for BK Virus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 14/212) » dans le sang total allant de 1,00E+03 à 5,00E+00 UI/ml a été réalisée.

Chaque dilution a été testée en 8 réplicats sur 3 runs différents (total n = 24 par dilution) à l'aide de combinaisons de :

- 3 lots de kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5
- 3 lots de kit AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 lots d'AltoStar® Internal Control 1.5 (contrôle interne)
- 3 instruments AltoStar® AM16
- 3 instruments CFX96™ DW Dx

Les données de tous les runs ont été combinées et une analyse probit a été réalisée pour déterminer la valeur de la LoD à 95 %.

Tableau 22: Résultats de PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5

Concentration [UI/ml]	N [total]	N [positif]	Taux de réussite [%]
1,00E+03	24	24	100
5,00E+02	24	24	100
2,50E+02	24	24	100
2,00E+02	24	24	100
1,00E+02	24	22	92
5,00E+01	24	21	88
2,00E+01	24	13	54
1,00E+01	24	5	21
5,00E+00	24	6	25

La LoD du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 pour la détection du BKV dans le sang total est 105 UI/ml (intervalle de confiance à 95 % : 70-200 UI/ml).

9.2.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 est assurée par la sélection minutieuse des oligonucléotides (amorces et sondes). Les oligonucléotides ont été vérifiés par analyse comparative de séquences par rapport à des séquences librement accessibles au public pour s'assurer que tous les génotypes du BKV pertinents seraient détectés.

Pour la vérification de la spécificité analytique du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5, les expériences suivantes ont été réalisées (voir les chapitres 9.2.2.1 Échantillons négatifs à 9.2.2.3 Réactivité croisée) :

9.2.2.1 Échantillons négatifs

30 échantillons de sang total négatifs pour le BKV provenant de donneurs individuels ont été testés avec le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5. Tous les échantillons (30 sur 30) ont été testés négatifs pour l'ADN spécifique au BKV et positifs pour l'IC. La spécificité analytique du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 pour les échantillons de sang total est ≥ 95 %.

9.2.2.2 Substances interférentes

Pour évaluer l'influence des substances endogènes et exogènes susceptibles de perturber les performances du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5, des substances choisies ont été ajoutées aux échantillons de sang total. Ces échantillons de sang total contenaient du BKV dans une concentration de 3 x LoD (3,15E+02 UI/ml), 1,00E+04 UI/ml et pas de BKV, respectivement.

Les résultats obtenus pour les échantillons contenant des substances potentiellement interférentes ont été comparés aux résultats obtenus pour les échantillons de sang total ne contenant aucune substance interférente ajoutée. Chaque échantillon a été traité en 3 répliques.

Aucune interférence n'a été observée pour les échantillons contenant des niveaux élevés de :

- Substances endogènes
  - Bilirubine
  - Hémoglobine
  - ADN génomique humain
  - Albumine de sérum humain
  - Triglycérides
- Substances exogènes
  - Azathioprine
  - Cyclosporine
  - Foscarnet
  - Ganciclovir

ATTENTION

La présence d'inhibiteurs de PCR (p. ex. l'héparine) peut donner des résultats faussement négatifs ou non valides.

9.2.2.3 Réactivité croisée

Les mêmes agents pathogènes étant susceptibles d'être trouvés dans le plasma et le sang total, aucun agent pathogène supplémentaire n'a été testé pour le sang total. Pour l'évaluation de la réactivité croisée, voir le chapitre 9.1.2.3 Réactivité croisée.

ATTENTION

Si l'échantillon contient d'autres pathogènes que le BKV, il peut y avoir compétition avec l'amplification de la cible ou des réactions croisées, donnant ainsi des résultats d'examen DIV incorrects.

9.2.3 Plage linéaire

Pour déterminer la plage linéaire du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5, une série de dilutions du BKV de 1,00E+08 à 2,00E+02 UI/ml dans du sang total a été testée.

- Des dilutions avec une concentration comprise entre 1,00E+08 et 1,00E+06 UI/ml ont été testées en 4 répliques.
- Des dilutions avec une concentration comprise entre 1,00E+05 et 2,00E+02 UI/ml ont été testées en 8 répliques.

L'analyse a été effectuée sur la base d'une régression polynomiale.

La plage linéaire du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 pour la quantification du BKV dans le sang total est de 2,00E+02 à 1,00E+08 UI/ml. Une représentation graphique des données est présentée à la figure 18.

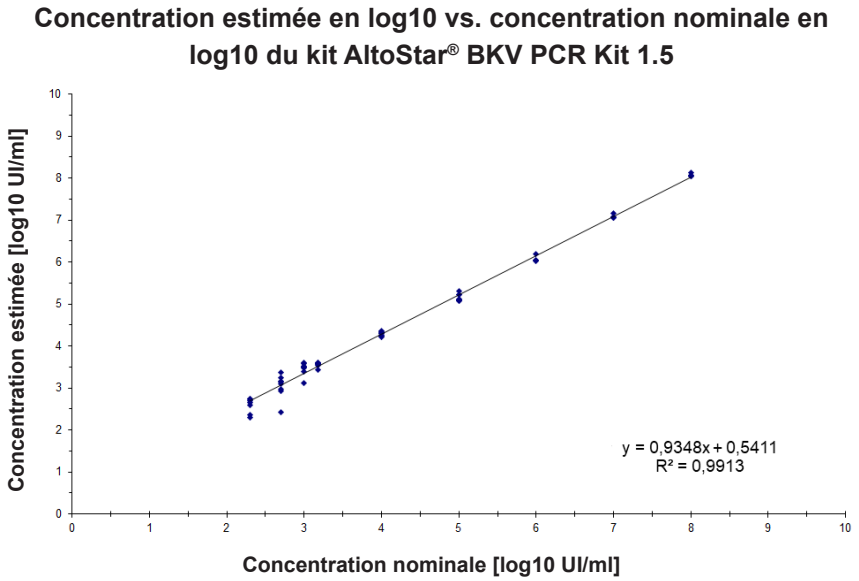

Figure 18: Analyse de régression linéaire du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 avec échantillons de sang total

9.2.4 Précision

La précision du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 a été évaluée à l'aide d'un ensemble comprenant :

- 1 échantillon de sang total fortement positif au BKV (1,00E+04 UI/ml)
- 1 échantillon de sang total faiblement positif au BKV [1,00E+03 UI/ml (5 x LLoQ)]
- 1 échantillon de sang total négatif au BKV

Chaque élément de l'ensemble a été testé sur au moins 4 répliques par run.

5 runs ont été effectués sur 5 jours utilisant des combinaisons de :

- 3 lots de kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5
- 3 lots de kit AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 lots d'AltoStar® Internal Control 1.5 (contrôle interne)
- 3 instruments AltoStar® AM16
- 3 instruments CFX96™ DW Dx

La répétabilité (variabilité intra-run), la variabilité inter-lot et la reproductibilité (variabilité totale) ont été déterminées sur la base de :

- Valeurs de quantification pour les échantillons fortement et faiblement positifs au BKV (voir le tableau 23)
- Valeurs de cycle seuil (C_q*) pour l'IC dans les échantillons négatifs au BKV (voir le tableau 24)

* Veuillez noter que le terme choisi C_q est équivalent à la désignation de C_t, qui pourrait être utilisée par d'autres thermocycleurs que le système CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad).

Tableau 23: Données de précision (% du CV log10 des données de quantification) pour des échantillons de sang total fortement et faiblement positifs au BKV

	Échantillon fortement positif au BKV (1,00E+04 UI/ml)	Échantillon faiblement positif au BKV (1,00E+03 UI/ml)
Variabilité intra-run	0,36-1,10	1,75-4,49
Variabilité inter-lot	0,88	2,91
Variabilité totale	2,40	3,36

Tableau 24: Données de précision (CV % des valeurs de C_q) pour l'IC dans les échantillons de sang total négatifs au BKV

	IC
Variabilité intra-run	0,08-0,56
Variabilité inter-lot	0,76
Variabilité totale	1,27

9.2.5 Taux global de défaillance

La fiabilité du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 a été évaluée en testant 30 échantillons de sang total négatifs au BKV prélevés chez des donneurs individuels et enrichis en BKV à une concentration finale de 3 x LoD (3,15E+02 UI/ml). Tous les échantillons testés (30 sur 30) ont été testés positifs dans le canal de détection de fluorescence spécifique (FAM™) au BKV.

9.2.6 Contamination croisée

Reportez-vous au chapitre 9.1.6 Contamination croisée.

9.2.7 Performances cliniques

Le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 a été évalué dans le cadre d'une étude comparative avec le kit BK Virus R-gene® (bioMérieux) portant le marquage CE. Rétrospectivement, 72 échantillons de sang total ont été testés en parallèle :

Le kit BK Virus R-gene® (bioMérieux) a été utilisé en combinaison avec le kit MagNa Pure® 96 DNA and Viral Nucleic Acid Small Volume Kit (Roche) sur l'instrument MagNa Pure® 96 Instrument (Roche).

Le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 a été utilisé avec le kit AltoStar® Purification Kit 1.5 et l'AltoStar® Internal Control 1.5 (contrôle interne) dans l'AltoStar® AM16 et le CFX96™ DW Dx.

Pour l'analyse qualitative, tous les échantillons dont le résultat était non valide pour un essai ou les deux ainsi que les échantillons dont le résultat quantitatif était inférieur à la LoD de l'un ou des deux essais ont été exclus.

Les résultats des 70 échantillons restants figurent dans le tableau 25.

Tableau 25: Résultats de l'évaluation de la sensibilité et la spécificité du diagnostic pour le BKV dans des échantillons de sang total

		Kit BK Virus R-gene® (bioMérieux)	
		POSITIF	NÉGATIF
AltoStar® BKV PCR Kit 1.5	POSITIF	47	0
	NÉGATIF	0	23

La sensibilité et la spécificité du diagnostic obtenues à l'aide du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 par rapport au kit BK Virus R-gene® (bioMérieux) étaient de 100 %.

Pour la corrélation quantitative, tous les échantillons dont le résultat était négatif pour un essai ou les deux ainsi que les échantillons dont le résultat quantitatif était inférieur à la LLoQ de l'un ou des deux essais ont été exclus.

Les résultats des 45 échantillons restants ont été utilisés pour la corrélation quantitative par analyse de régression linéaire (voir la figure 19).

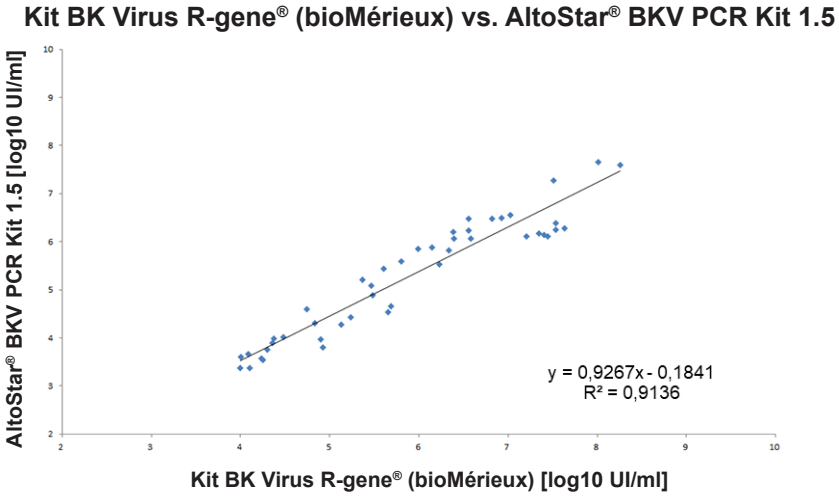

Figure 19: Analyse de régression linéaire des résultats obtenus avec le kit BK Virus R-gene® (bioMérieux) (référence) et le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5

Très bonne corrélation entre les résultats quantitatifs obtenus avec le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 et avec le kit BK Virus R-gene® (bioMérieux) [coefficient de corrélation R = 0,96 (R^2 = 0,91)].

9.3 Urine

9.3.1 Sensibilité analytique

Pour déterminer la LoD, une série de dilutions de la norme international de l'OMS « 1st WHO International Standard for BK Virus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 14/212) » dans l'urine allant de 5,00E+02 à 1,00E+00 UI/ml a été réalisée.

Chaque dilution a été testée en 8 réplicats sur 3 runs différents (total n = 24 par dilution) à l'aide de combinaisons de :

- 3 lots de kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5
- 3 lots de kit AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 lots d'AltoStar® Internal Control 1.5 (contrôle interne)
- 3 instruments AltoStar® AM16
- 3 instruments CFX96™ DW Dx

Les données de tous les runs ont été combinées et une analyse probit a été réalisée pour déterminer la valeur de la LoD à 95 %.

Tableau 26: Résultats de PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5

Concentration [UI/ml]	N [total]	N [positif]	Taux de réussite [%]
5,00E+02	24	24	100
2,50E+02	24	24	100
2,00E+02	23*	23	100
1,00E+02	24	24	100
5,00E+01	24	24	100
2,00E+01	24	23	96
1,00E+01	24	20	83
5,00E+00	24	14	58
1,00E+00	24	5	21

* Un échantillon n'a pas été traité.

La LoD du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 pour la détection du BKV dans l'urine est 21 UI/ml (intervalle de confiance à 95 % : 14-45 UI/ml).

9.3.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 est assurée par la sélection minutieuse des oligonucléotides (amorces et sondes). Les oligonucléotides ont été vérifiés par analyse comparative de séquences par rapport à des séquences librement accessibles au public pour s'assurer que tous les génotypes du BKV pertinents seraient détectés.

Pour la vérification de la spécificité analytique du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5, les expériences suivantes ont été réalisées (voir les chapitres 9.3.2.1 Échantillons négatifs à 9.3.2.3 Réactivité croisée) :

9.3.2.1 Échantillons négatifs

34 échantillons d'urine négatifs au BKV provenant de donneurs individuels ont été testés avec le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5. 33 sur 34 échantillons ont été testés négatifs à l'ADN spécifique au BKV. Tous les échantillons (34 sur 34) ont été testés positifs pour l'Internal Control (contrôle interne). La spécificité analytique du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 pour les échantillons d'urine est ≥ 95 %.

9.3.2.2 Substances interférentes

Pour évaluer l'influence des substances endogènes et exogènes susceptibles de perturber les performances du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5, des substances choisies ont été ajoutées aux échantillons d'urine. Ces échantillons d'urine contenaient du BKV dans une concentration de 3 x LoD (6,30E+01 UI/ml), 1,00E+04 UI/ml et pas de BKV, respectivement.

Les résultats obtenus pour les échantillons contenant des substances potentiellement interférentes ont été comparés aux résultats obtenus pour les échantillons d'urine ne contenant aucune substance interférente ajoutée. Chaque échantillon a été traité en 3 répliques.

Aucune interférence n'a été observée pour les échantillons contenant des niveaux élevés de :

- Substances endogènes
  - Bilirubine
  - Glucose
  - Albumine de sérum humain
  - Sang total humain
- Substances exogènes
  - Azathioprine
  - Cyclosporine
  - Foscarnet
  - Ganciclovir

ATTENTION

La présence d'inhibiteurs de PCR (p. ex. l'héparine) peut donner des résultats faussement négatifs ou non valides.

9.3.2.3 Réactivité croisée

La spécificité analytique du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 en ce qui concerne la réactivité croisée avec des pathogènes autres que BKV a été évaluée. Outre les agents pathogènes testés pour les échantillons de plasma et de sang total (voir les chapitres 9.1.2.3 Réactivité croisée à 9.2.2.3 Réactivité croisée), des agents pathogènes potentiellement présents dans l'urine de la matrice de l'échantillon (par ex. les agents pathogènes associés aux infections urinaires et aux maladies sexuellement transmissibles) ont été testés.

Le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 ne présente pas de réactivité croisée avec les pathogènes suivants :

- *Chlamydia trachomatis*
- *Escherichia coli*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Mycoplasma hominis*
- *Proteus mirabilis*
- *Ureaplasma urealyticum*
- *Ureaplasma parvum*

ATTENTION

Si l'échantillon contient d'autres pathogènes que le BKV, il peut y avoir compétition avec l'amplification de la cible ou des réactions croisées, donnant ainsi des résultats d'examen DIV incorrects.

9.3.3 Plage linéaire

Pour déterminer la plage linéaire du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5, une série de dilutions du BKV de 1,00E+08 à 2,00E+02 UI/ml dans l'urine a été testée.

- Des dilutions avec une concentration comprise entre 1,00E+08 et 1,00E+06 UI/ml ont été testées en 4 répétitions.
- Des dilutions avec une concentration comprise entre 1,00E+05 et 2,00E+02 UI/ml ont été testées en 8 répétitions.

L'analyse a été effectuée sur la base d'une régression polynomiale.

La plage linéaire du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 pour la quantification du BKV dans l'urine est de 2,00E+02 à 1,00E+08 UI/ml. Une représentation graphique des données est présentée à la figure 20.

Concentration estimée en log10 vs. concentration nominale en log10 du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5

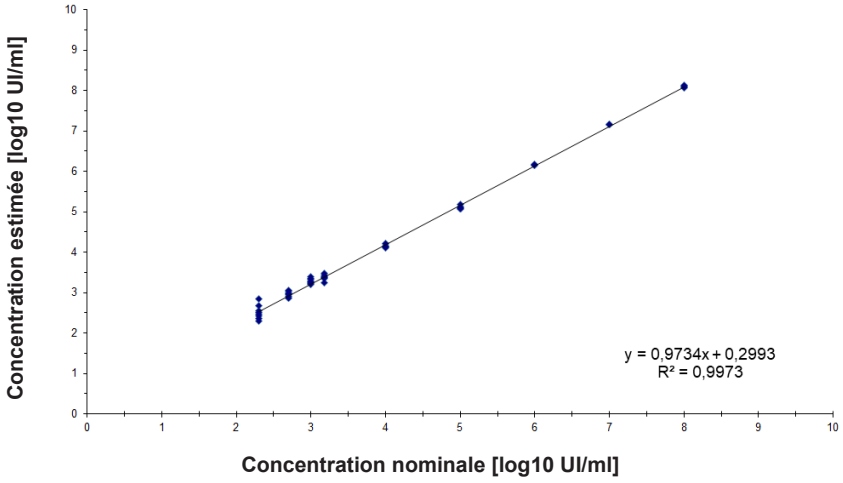

Figure 20: Analyse de régression linéaire du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 avec échantillons d'urine

9.3.4 Précision

La précision du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 a été évaluée à l'aide d'un ensemble comprenant :

- 1 échantillon d'urine fortement positif au BKV (1,00E+04 UI/ml)
- 1 échantillon d'urine faiblement positif au BKV [1,00E+03 UI/ml (5 x LLoQ)]
- 1 échantillon d'urine négatif au BKV

Chaque élément de l'ensemble a été testé sur au moins 4 répliques par run.

5 runs ont été effectués sur 5 jours utilisant des combinaisons de :

- 3 lots de kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5
- 3 lots de kit AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 lots d'AltoStar® Internal Control 1.5 (contrôle interne)
- 3 instruments AltoStar® AM16
- 3 instruments CFX96™ DW Dx

La répétabilité (variabilité intra-run), la variabilité inter-lot et la reproductibilité (variabilité totale) ont été déterminées sur la base de :

- Valeurs de quantification pour les échantillons fortement et faiblement positifs au BKV (voir le tableau 27)
- Valeurs de cycle seuil (C_q*) pour l'IC dans les échantillons négatifs au BKV (voir le tableau 28)

* Veuillez noter que le terme choisi C_q est équivalent à la désignation de C_t, qui pourrait être utilisée par d'autres thermocycleurs que le système CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad).

Tableau 27: Données de précision (% du CV log10 des données de quantification) pour des échantillons d'urine fortement et faiblement positifs au BKV

	Échantillon fortement positif au BKV (1,00E+04 UI/ml)	Échantillon faiblement positif au BKV (1,00E+03 UI/ml)
Variabilité intra-run	0,35-1,20	1,88-2,71
Variabilité inter-lot	0,95	2,17
Variabilité totale	1,15	2,44

Tableau 28: Données de précision (CV % des valeurs de C_q) pour l'IC dans les échantillons d'urine négatifs au BKV

	IC
Variabilité intra-run	0,06-0,39
Variabilité inter-lot	0,18
Variabilité totale	0,85

9.3.5 Taux global de défaillance

La fiabilité du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 a été évaluée en testant 30 échantillons d'urine négatifs au BKV prélevés chez des donneurs individuels et enrichis en BKV à une concentration finale de 3 x LoD (6,30E+01 UI/ml). Tous les échantillons testés (30 sur 30) ont été testés positifs dans le canal de détection de fluorescence spécifique (FAM™) au BKV.

9.3.6 Contamination croisée

Reportez-vous au chapitre 9.1.6. Contamination croisée.

9.3.7 Performances cliniques

Le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 a été évalué dans le cadre d'une étude comparative avec le kit BK Virus R-gene® (bioMérieux) portant le marquage CE. Rétrospectivement, 148 échantillons d'urine ont été testés en parallèle :

Le kit BK Virus R-gene® (bioMérieux) a é té utilisé en combinaison avec le lit NucliSENS® easyMAG® Reagents (bioMérieux) sur le système NucliSENS® easyMAG® System (bioMérieux).

Le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 a été utilisé avec le kit AltoStar® Purification Kit 1.5 et l'AltoStar® Internal Control 1.5 (contrôle interne) dans l'AltoStar® AM16 et le CFX96™ DW Dx.

Pour l'analyse qualitative, tous les échantillons dont le résultat était non valide pour un essai ou les deux ainsi que les échantillons dont le résultat quantitatif était inférieur à la LoD de l'un ou des deux essais ont été exclus.

Les résultats des 141 échantillons restants figurent dans le tableau 29.

Tableau 29: Résultats de l'évaluation de la sensibilité et la spécificité du diagnostic pour le BKV dans des échantillons d'urine

		Kit BK Virus R-gene® (bioMérieux)	
		POSITIF	NÉGATIF
AltoStar® BKV PCR Kit 1.5	POSITIF	114	1
	NÉGATIF	1	25

La sensibilité et la spécificité du diagnostic obtenues à l'aide du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 par rapport au kit BK Virus R-gene® (bioMérieux) étaient de 99 % et 96 %, respectivement.

Pour la corrélation quantitative, tous les échantillons dont le résultat était négatif pour un essai ou les deux ainsi que les échantillons dont le résultat quantitatif était inférieur à la LLoQ de l'un ou des deux essais ont été exclus.

Les résultats des 97 échantillons restants ont été utilisés pour la corrélation quantitative par analyse de régression linéaire (voir la figure 21).

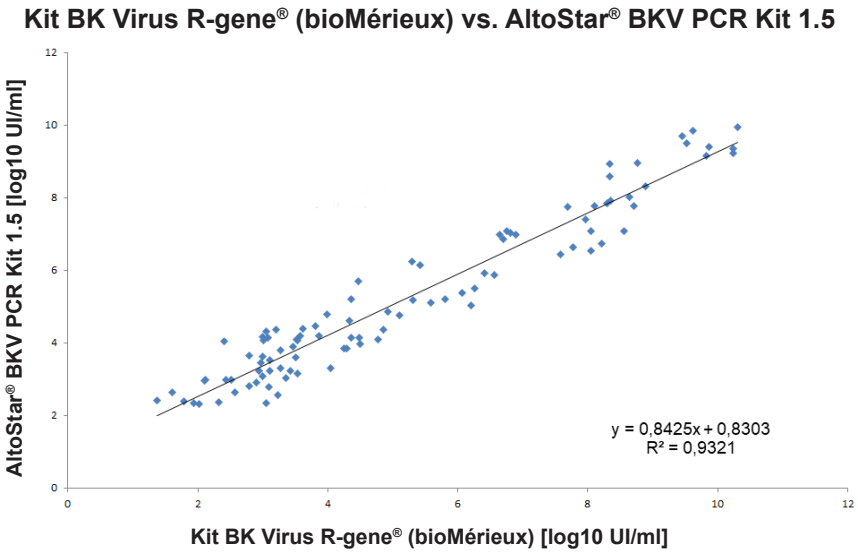

Figure 21: Analyse de régression linéaire des résultats obtenus avec le kit BK Virus R-gene® (bioMérieux) (référence) et le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5

Très bonne corrélation entre les résultats quantitatifs obtenus avec le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 et avec le kit BK Virus R-gene® (bioMérieux) [coefficient de corrélation R = 0,97 (R^2 = 0,93)]

10. Élimination

Éliminez les déchets dangereux et biologiques conformément aux réglementations locales et nationales. Les reliquats de composants du produit et les déchets ne doivent pas entrer en contact avec les eaux usées, les cours d'eau ou le sol.

ATTENTION

Considérez systématiquement les échantillons comme étant des matériaux infectieux et présentant un danger (biologique) conformément aux procédures de sécurité de votre laboratoire. En cas de déversement d'échantillon, utilisez rapidement un désinfectant adapté. Manipulez les matériaux contaminés comme présentant un danger biologique.

ATTENTION

L'élimination des déchets dangereux et biologiques doit être conforme aux réglementations locales et nationales afin d'éviter toute contamination de l'environnement.

REMARQUE

La PCR plate (plaque PCR) doit être éliminée à l'état scellé, car le PCR Plate Sealing Foil (film protecteur de la plaque PCR) ne peut pas être retiré.

11. Contrôle qualité

Conformément au système de gestion de la qualité d'altona Diagnostics GmbH certifié EN ISO 13485, chaque lot du kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 est testé sur la base de spécifications prédéterminées afin d'assurer une qualité constante du produit.

12. Assistance technique

Pour bénéficier d'un service après-vente, contactez l'assistance technique d'altona Diagnostics aux coordonnées suivantes :

e-mail : **support@altona-diagnostics.com**

téléphone : **+49-(0)40-5480676-0**

REMARQUE

Tout incident grave survenu en rapport avec ce produit doit être signalé à altona Diagnostics et aux autorités compétentes de votre pays.

13. Bibliographie

[1] Wojciech Kozdrun: Polyomaviruses; chap. 81; Molecular Detection of Animal Viral Pathogens 2016.

[2] Bofill-Mas et al.: Potential Transmission of Human Polyomaviruses through the Gastrointestinal Tract after Exposure to Virions or Viral DNA; Journal of Virology 2001.

[3] Barbanti-Brodano et al.: BK Virus, JC Virus and Simian Virus 40 Infection in Humans, and Association with Human Tumors; Madame Curie Bioscience Database.

[4] Gardner: Prevalence in England of Antibody to Human Polyomavirus (B.K.); British Medical Journal 1973.

[5] An et al.: Human polyomavirus BKV infection of endothelial cells results in interferon pathway induction and persistence, PLOS Pathogen 2019.

[6] Sheila Govind, Jason Hockley, Clare Morris and the Collaborative Study Group. Collaborative Study to establish the 1st WHO International Standard for BKV DNA for nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays (WHO/BS/2015.2270).

14. Marques de commerce et clauses de non-responsabilité

4s3™ (4titude) ; AltoStar® (altona Diagnostics) ; ABI Prism®, QuantStudio™ (Applied Biosystems) ; NucliSENS®, R-gene® (bioMérieux) ; CFX96™, CFX Manager™ (Bio-Rad) ; Rotor-Gene® (QIAGEN) ; LOINC® (Regenstrief Institute, Inc.) ; LightCycler®, MagNA Pure® (Roche) ; FAM™, JOE™, MicroAmp™, VIC™ (Thermo Fisher Scientific).

Les noms déposés, marques de commerce, etc. utilisés dans ce document, même s'ils ne sont pas expressément désignés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés juridiquement.

Le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 est un kit de diagnostic portant le marquage CE conformément à la directive européenne de diagnostic *in vitro* 98/79/CE.

Produit non homologué par la FDA.

Produit disponible dans certains pays uniquement.

© 2022 altona Diagnostics GmbH ; tous droits réservés.

15. Symboles

Symbole	Explication
IVD	Dispositif médical de diagnostic *in vitro*
GTIN	Numéro d'article pour le commerce international
LOT	Code du lot
CONT	Sommaire
CAP	Couleur du capuchon
REF	Numéro de catalogue
NUM	Numéro
COMP	Composant
	Consultez le mode d'emploi
Σ	Contenu suffisant pour « n » tests/réactions (rxns)
	Limite de température
	Date de péremption
	Fabricant
	Attention
MAT	Numéro de matériel

Symbole	Explication
	Version
	Remarque
BIO	Contient du matériel biologique d'origine animale

16. Protocole d'essai pour le logiciel AltoStar® Connect et informations pour l'intégration SIL

Le code-barres 2D de la figure 22 doit être utilisé pour installer le dernier protocole d'essai en vue d'utiliser le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5 sur l'AltoStar® AM16. Le code-barres ne peut être scanné que sous forme imprimée. Vous pouvez scanner le code-barres directement depuis le manuel d'utilisation ou l'imprimer sur une feuille séparée. Notez que la taille de l'impression affecte la lisibilité du code-barres. Veillez à définir la taille de l'échelle sur 100 %. Pour le scanner, orientez le scanner de codes-barres vers la ligne rouge du code-barres. Pour en savoir plus sur la gestion des protocoles d'essai, reportez -vous au chapitre correspondant du mode d'emploi du logiciel AltoStar® Connect. Pour en savoir plus sur l'intégration SIL, reportez-vous au tableau 31.

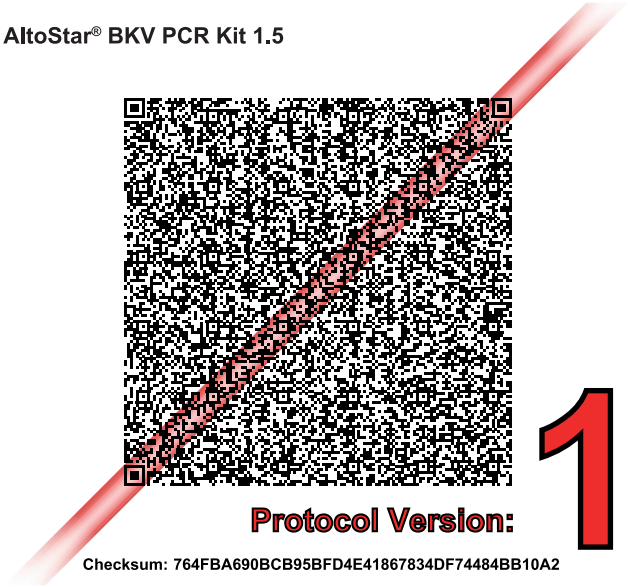

Figure 22: Code-barres du protocole d'essai pour le kit AltoStar® BKV PCR Kit 1.5

Tableau 30: Journal de modifications du protocole d'essai

Version du protocole	Mises à jour de la version
1	Première version

Tableau 31: Informations sur l'intégration SIL

Utilisation	Données
Ordre de test (SIL → AltoStar® AM16)	AltoStar BKV PCR Kit 1.5
Unité de résultat du test (CFX96™ DW Dx → SIL)	IU/ml
Canal 1 de résultat du test (CFX96™ DW Dx → SIL)	BKV
Canal 2 de résultat du test (CFX96™ DW Dx → SIL)	Internal Control

Pour en savoir plus sur LOINC® (Logical Observation Identifiers Names and Codes), veuillez vous référer au site Web d'altona Diagnostics GmbH (www.altona-diagnostics.com) ou contacter l'assistance technique d'altona Diagnostics (voir le chapitre 12. Assistance technique).

17. Historique de révision

Tableau 32: Historique de révision

Identifiant	Date de publication [mois/année]	Modifications
MAN-AS0031540-FR-S02	03/2022	Suppression de « non homologué auprès de Santé Canada » dans la phrase « Produit non homologué auprès de Santé Canada, non approuvé par la FDA » dans le chapitre 14.
MAN-AS0031540-FR-S03	04/2022	• Chapitre 7.5 : Contrôles de processus ajoutés. • Chapitres 9.1.7; 9.2.7; 9.3.7 : rationalisation de la formulation • Autres modifications rédactionnelles

always a drop ahead.

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0
fax +49 40 548 0676 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com