

Mode d'emploi

AltoStar[®] HAV RT-PCR Kit 1.5

12/2025 FR

AltoStar[®]

HAV RT-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)



AS0241543



96



12 2025



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12
22767 Hamburg • Germany

Table des matières

1.	À propos du présent mode d'emploi.....	8
2.	Usage prévu.....	9
3.	Composants du kit.....	10
3.1	Réactifs.....	10
3.2	Plugin d'essai du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5.....	11
4.	Stockage et manipulation.....	11
4.1	Stockage.....	11
4.2	Manipulation	12
4.2.1	Master A et Master B	13
4.2.2	Positive Control (contrôle positif) et No Template Control (contrôle négatif).....	13
5.	Description du produit.....	13
5.1	Informations contextuelles.....	14
5.2	Description du réactif.....	15
5.2.1	Master A et Master B	15
5.2.2	Positive Control (contrôle positif).....	15
5.2.3	No Template Control (contrôle négatif).....	15
5.3	Flux de travail	16
5.3.1	AltoStar® Workflow (flux de travail).....	16
5.3.2	Autres flux de travail	17
5.4	Échantillons	17
5.4.1	Types d'échantillon	17
5.4.2	Prélèvement et manipulation des échantillons	18
6.	Mises en garde, précautions et limites	19

7.	Utilisation du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 avec l'AltoStar® Workflow (flux de travail)	21
7.1	Volume d'échantillon.....	21
7.2	Tubes d'échantillon.....	22
7.3	Codes-barres de l'échantillon	22
7.4	Matériel et dispositifs nécessaires mais non fournis pour l'AltoStar® Workflow (flux de travail)	22
7.5	Matériel et dispositifs généraux	24
7.6	Procédure.....	24
7.6.1	Présentation de l'AltoStar® Workflow (flux de travail).....	24
7.6.2	Programmer un AltoStar® run	30
7.6.3	Démarrer un run de configuration PCR.....	30
7.6.3.1	Préparer les réactifs pour un run de configuration PCR.....	31
7.6.3.2	Charger l'AltoStar® AM16 pour un run de configuration PCR.....	32
7.6.3.3	Pendant le run de configuration PCR.....	36
7.6.4	Fin du run de configuration PCR	36
7.6.4.1	Résultats du run de configuration PCR.....	37
7.6.5	Sceller la PCR plate (plaque PCR).....	39
7.6.5.1	Stabilité du mélange PCR	40
7.6.6	Démarrer un PCR run.....	41
7.6.6.1	Pendant le PCR run	42
7.6.7	Analyse des données de PCR avec le logiciel CFX Manager™ Dx.....	43
7.6.7.1	Affecter des essais à des groupes de puits.....	44
7.6.7.2	Correction de la référence.....	48
7.6.7.3	Exclusion des signaux PCR irréguliers	50
7.6.7.4	Définir des seuils.....	54
7.6.8	Validité des résultats de PCR.....	58
7.6.8.1	Exclusion des puits contenant des données non valides.....	58
7.6.8.2	Validité d'un PCR run de diagnostic.....	61

7.6.8.3	Validité des résultats pour un échantillon	61
7.6.9	Exporter les résultats de PCR pour une interprétation des résultats par le SIL	62
7.6.10	Exporter les résultats de PCR pour une interprétation manuelle des résultats	63
7.6.10.1	Interprétation manuelle des résultats	64
7.6.11	Analyse des données de PCR et interprétation automatisée des résultats avec FastFinder	66
8.	Utilisation du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 avec d'autres instruments PCR en temps réel que le CFX96™ Deep Well Dx System	67
8.1	Matériel et dispositifs nécessaires mais non fournis	67
8.2	Procédure	69
8.2.1	Préparation de l'échantillon	69
8.2.2	Configuration du master mix.....	69
8.2.3	Configuration des réactions.....	70
8.2.4	PCR run.....	71
8.2.4.1	Programmation de l'instrument PCR en temps réel.....	71
8.2.4.2	Paramètres de run.....	72
8.2.5	Analyse des données	73
9.	Données de performances	74
9.1	Plasma.....	74
9.1.1	Sensibilité analytique.....	74
9.1.2	Spécificité analytique.....	75
9.1.2.1	Échantillons négatifs	76
9.1.2.2	Substances interférentes.....	76
9.1.2.3	Réactivité croisée	77
9.1.3	Réactivité.....	78
9.1.4	Précision.....	78

9.1.5	Taux global de défaillance	81
9.1.6	Contamination croisée.....	82
9.1.7	Performances cliniques	82
10.	Élimination.....	83
11.	Contrôle qualité.....	84
12.	Assistance technique	84
13.	Résumé de la sécurité et des performances	85
14.	Bibliographie	85
15.	Marques de commerce et clauses de non-responsabilité	86
16.	Symboles	87
17.	Protocole d’essai pour le logiciel AltoStar® Connect software et informations pour l’intégration SIL	89
18.	Historique de révision	91

1. À propos du présent mode d'emploi

Ce mode d'emploi guide l'opérateur dans l'utilisation du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5. Les chapitres 1 à 6 et 9 à 14 contiennent des informations et des instructions générales qui s'appliquent à chaque flux de travail utilisé avec le kit AltoStar® HAV RT-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 software (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® HAV RT-PCR Kit 1.5 avec d'autres instruments PCR en temps réel. Pour en savoir plus sur l'utilisation de l'AltoStar® AM16, du logiciel AltoStar® Connect software, du kit AltoStar® Purification Kit 1.5, de l'AltoStar® Internal Control 1.5 (contrôle interne) et du CFX96™ DW Dx, reportez-vous aux modes 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)

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® HAV RT-PCR Kit 1.5 est un test de diagnostic *in vitro* basé sur la technologie PCR en temps réel permettant la détection qualitative de l'ARN (génotypes I-III) spécifique du virus de l'hépatite A (HAV) dans du plasma humain EDTA et du plasma humain citraté. Il est destiné à être utilisé comme une aide au diagnostic des infections HAV.

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

Le kit AltoStar® HAV RT-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. Composants du kit

Le kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 est un carton comprenant des réactifs et le plugin d'essai du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5.

3.1 Réactifs

La boîte du kit AltoStar® HAV RT-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	PC 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⁾ Positive Control (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® HAV RT-PCR Kit 1.5 contient suffisamment de réactifs pour effectuer 96 des réactions dans 8 runs maximum.

La boîte du kit est livrée sur de la neige carbonique. Lors de la réception et avant la première utilisation, inspectez la boîte du kit 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 abîmés 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).

3.2 Plugin d'essai du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5

La version 1.0 du plugin d'essai du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 peut être utilisée de manière facultative en association avec le logiciel FastFinder Standalone à des fins d'analyse des données et d'interprétation automatisée des résultats. Il n'est pas fourni avec les réactifs du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 et doit être commandé séparément dans le cadre du pack d'analyse automatisée AltoStar® Automated Analysis Package (N° de commande VK000045).

4. Stockage et manipulation

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

4.1 Stockage

Tous les réactifs du kit AltoStar® HAV RT-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 Positive Control (contrôle positif) et No Template Control (contrôle négatif)

1. Une fois décongelés, les composants Positive Control (PC, contrôle positif) 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 PC et NTC à chaque utilisation et utilisez de nouveaux capuchons pour éviter la contamination des réactifs.
3. Après utilisation, fermez les tubes de PC 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 PC et NTC : *Décongélation 1* → *Congélation 1* → *Décongélation 2* → *Congélation 2* → *Décongélation 3* → *Congélation 3* → *Décongélation 4*

5. Description du produit

Le kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 est un test de diagnostic *in vitro* permettant la détection qualitative de l'ARN spécifique du HAV dans du plasma humain EDTA et du plasma humain citraté.

Ce kit s'appuie sur la technologie RT-PCR en temps réel, en utilisant la réaction de transcriptase inverse pour convertir l'ARN en ADN complémentaire (ADNc), la réaction en chaîne par polymérase (PCR) pour l'amplification des séquences cibles spécifiques au HAV, et des sondes cibles spécifiques marquées par fluorescence pour la détection de l'ADN amplifié.

Outre les systèmes d'amplification et de détection spécifiques à l'ARN du HAV, ciblant les régions GS1, GP1 et GP2 (jonction 3C/3D de la polyprotéine) du génome viral, l'essai comprend des oligonucléotides pour l'amplification et la détection du contrôle interne [abrégié en IC ; AltoStar® Internal Control 1.5 (contrôle interne)].

La sonde spécifique à l'ARN du HAV est marquée 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'ARN spécifique au HAV et l'IC des canaux de détection correspondants dans l'instrument PCR en temps réel utilisé.

5.1 Informations contextuelles

Le virus de l'hépatite A (HAV) est l'un des cinq virus de l'hépatite reconnus responsables de l'infection humaine. Il appartient à la famille des *Picornaviridae* et au genre *Hepatovirus*. Il s'agit d'un virus non enveloppé et icosaédrique dont le génome est constitué d'ARN simple brin à polarité positive linéaire (ARNs). La taille totale du génome du HAV est d'environ 7,5 kb.

Le HAV est principalement transmis par la voie oro-fécale par contact ou par contact de surfaces contaminées. Il se transmet généralement par la consommation d'eau ou d'aliments contaminés (comme les crustacés), ainsi que par un contact étroit avec une personne déjà infectée. Le virus est répandu dans le monde entier. Dans les pays en développement, presque tous les individus ont un risque élevé d'infection et ont été en contact avec le HAV durant leur enfance. Dans les régions développées plus industrialisées comme l'Europe et l'Amérique du Nord, le risque d'infection est beaucoup plus faible, car de meilleures normes sanitaires sont établies. Après une infection par le HAV, une immunité permanente est obtenue.

Les premiers symptômes apparaissent entre 14 et 28 jours après la contamination. Les symptômes les plus courants sont la fièvre, les malaises, la perte d'appétit, la diarrhée, les nausées, la coloration foncée des urines et la jaunisse. La plupart du temps, les enfants infectés ne présentent pas de symptômes ou seulement des symptômes légers.

En revanche, les adultes présentent souvent des symptômes (graves). En général, la mortalité est faible et les infections par le HAV ne se transforment pas en maladie chronique du foie. Il n'existe aucun traitement thérapeutique connu pour l'infection par le HAV, mais une vaccination préventive est possible [1,2].

5.2 Description du réactif

5.2.1 Master A et Master B

Le Master A et le Master B contiennent tous les composants (tampon PCR, transcriptase inverse, ADN-polymérase, sel de magnésium, amorces et sondes) nécessaires à la transcription inverse, ainsi qu'à l'amplification médiée par PCR et à la détection de l'ARN spécifique au HAV et de l'IC en une seule réaction.

5.2.2 Positive Control (contrôle positif)

Le PC contient des concentrations normalisées d'ARN spécifique au HAV. Il est étalonné conformément à la norme internationale de l'OMS « 3rd WHO International Standard for Hepatitis A Virus VL For Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 15/276) ». Le PC est utilisé pour vérifier les fonctions des systèmes d'amplification et de détection spécifiques au HAV inclus dans le kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5.

5.2.3 No Template Control (contrôle négatif)

Le NTC ne contient pas d'ARN spécifique au HAV mais contient la matrice de l'IC. Le NTC est utilisé comme contrôle négatif pour la RT-PCR en temps réel de l'ARN spécifique au HAV, 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 suivants :

- AltoStar® Automation System AM16 (système d'automatisation) (Hamilton)
- Logiciel AltoStar® Connect software 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)
- *Facultatif* : FastFinder Standalone version 1.0 ou ultérieure (UgenTec NV) et plugin d'essai AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 pour l'analyse des données et l'interprétation automatisée des résultats. La version du plugin d'essai valide est spécifiée au chapitre 3.2 Plugin d'essai du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5.

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 RT-PCR sur l'AltoStar® AM16 à l'aide du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5.
4. RT-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® HAV RT-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® HAV RT-PCR Kit 1.5 peut être utilisé avec des flux de travail compatibles. Les instruments PCR en temps réel et les logiciels suivants ont été validés pour une utilisation avec le kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 :

- ABI Prism® 7500 SDS et le logiciel 7500 Software v2.3 (Applied Biosystems)
- CFX96™ Deep Well Dx System avec le logiciel CFX Manager™ Dx version 3.1 (Bio-Rad)
- CFX96™ Dx System avec le logiciel CFX Manager™ Dx version 3.1 (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II et le logiciel LightCycler® 480 Software version 1.5.1 (Roche)
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System avec le logiciel QuantStudio™ 5 Dx Software v1.0.2 (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform avec le logiciel Rotor-Gene® Q Software version 2.3.1 (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® HAV RT-PCR Kit 1.5 :

- Plasma humain en présence d'EDTA
- Plasma humain citraté

ATTENTION



Ce test a uniquement été validé à des fins d'utilisation avec du plasma humain EDTA et du plasma humain citraté. 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). Le contenu des tubes doit être mélangé directement après le prélèvement des échantillons. Les échantillons de sang doivent être livrés refroidis 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.

Pour la génération de plasma EDTA ou de plasma citraté, le sang total doit être centrifugé conformément aux instructions fournies par le fabricant du système de prélèvement dans un délai de 24 heures suivant le prélèvement. Avant son utilisation, le plasma EDTA ou le plasma citraté 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.

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



Un prélèvement, une expédition, un stockage ou une préparation incorrects de l'échantillon peuvent compromettre les performances du produit.

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 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.
- Ce test a uniquement été validé à des fins d'utilisation avec du plasma humain EDTA et du plasma humain citraté. 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 prélèvement, une expédition, un stockage ou une préparation incorrects de l'échantillon peuvent compromettre les performances du produit.

- Un stockage inapproprié des éluats peut entraîner une dégradation de la séquence cible du HAV 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 HAV, 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 HAV couvertes par les amorces et/ou les sondes utilisées dans le kit peuvent empêcher de détecter la présence du pathogène.

- Ce produit n'est pas destiné à être utilisé pour détecter la présence de HAV dans le sang, les composants du sang, les cellules, les tissus, les organes ou tout autre de leurs dérivés afin d'attester de leur adéquation pour la transfusion, la transplantation ou l'administration de cellules.

7. Utilisation du kit AltoStar® HAV RT-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® HAV RT-PCR Kit 1.5 avec l'AltoStar® Workflow (flux de travail). L'AltoStar® Workflow (flux de travail) comprend différents produits [AltoStar® AM16, le logiciel AltoStar® Connect software, le kit AltoStar® Purification Kit 1.5, l'AltoStar® Internal Control 1.5 (contrôle interne), le CFX96™ DW Dx, FastFinder Standalone et le plugin d'essai AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 pour l'analyse des données et l'interprétation automatisée des résultats (facultatif)]. 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)
- Mode d'emploi FastFinder Standalone (UgenTec NV)

7.1 Volume d'échantillon

Le kit AltoStar® HAV RT-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 2 doivent être commandés auprès d'altona Diagnostics GmbH.

Tableau 2: 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 software (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), 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)	PK15-46

Matériel	Description	N° de commande
AltoStar® Internal Control 1.5	Contrôle de l'extraction, de l'amplification et de la détection des acides nucléiques	IC15-46
AltoStar® Automated Analysis Package	Ordinateur équipé du logiciel FastFinder Standalone (version 1.0 ou ultérieure) et du plugin d'essai pour l'analyse des données et l'interprétation automatisée des résultats	VK000045
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
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 pour les tubes PC (rouge)	VK000012
Screw Cap - blue	Capuchon pour les tubes Master A (bleu)	VK000013
Screw Cap - purple	Capuchon pour les tubes Master B (violet)	VK000015
Screw Cap - white	Capuchon pour les tubes NTC (blanc)	VK000016

Tableau 3: Matériel et appareils de laboratoire supplémentaires

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

7.5 Matériel et dispositifs généraux

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

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 4. Les informations relatives aux paramètres spécifiques à utiliser avec le kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 sont fournies au chapitre 7.6.2 Programmer un AltoStar® run. Pour en savoir plus sur les étapes 1 à 5, reportez-vous au mode d'emploi du kit AltoStar® Purification Kit 1.5, du logiciel AltoStar® Connect software et de l'AltoStar® AM16.

Les étapes 6 à 9 sont détaillées du chapitre 7.6.3 Démarrer un run de configuration PCR au chapitre 7.6.6 Démarrer un PCR run.

En cas d'interprétation des résultats manuelle ou automatisée, les étapes 10 et 11 diffèrent. Pour en savoir plus sur l'interprétation manuelle des résultats, reportez-vous aux chapitres 7.6.7 Analyse des données de PCR avec le logiciel CFX Manager™ Dx à 7.6.10 Exporter les résultats de PCR pour une interprétation manuelle des résultats.

Les étapes à suivre pour procéder, le cas échéant, à l'analyse des données et à l'interprétation automatisée des résultats avec FastFinder sont détaillées dans le chapitre 7.6.11 Analyse des données de PCR et interprétation automatisée des résultats avec FastFinder.

Tableau 4: Présentation de l'AltoStar® Workflow (flux de travail)

Étape	Action
1. Démarrer l'AltoStar® AM16	<ul style="list-style-type: none"> • Mettez en marche l'AltoStar® AM16. • Mettez en marche l'ordinateur et l'écran. • Démarrez le logiciel AltoStar® Connect software.
2. Effectuer la maintenance	<ul style="list-style-type: none"> • Dans la barre de menus, cliquez sur Application → Instrument Maintenance (Application → Maintenance de l'instrument). <ul style="list-style-type: none"> ◦ 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.
3. Programmer un AltoStar® run	<ul style="list-style-type: none"> • 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. • Soumettez les échantillons à l'essai suivant sauf s'ils ont déjà été importés du SIL : <ul style="list-style-type: none"> ◦ AltoStar® HAV RT-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
<p>4. Démarrer un run de purification</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 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 : <ul style="list-style-type: none"> ◦ Vérifiez que les réactifs de 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 ($\leq +50$ °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 couvercle. • 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. • Cliquez sur OK pour confirmer le message Loading complete (Chargement terminé) ou patientez 10 secondes. <p>Le système procède alors automatiquement au run de purification.</p>

Étape	Action
<p>5. Terminer le run de purification</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 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 et confirmez en cliquant sur OK. • Scellez les composants réutilisables du kit AltoStar® Purification Kit 1.5 et rangez-les. <p>Les éluats présents dans la plaque d'éluat non scellée restent stables à température ambiante (max. +30 °C) pendant 4 heures.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Si le run de configuration PCR associé n'est pas démarré tout de suite, scellez la plaque d'éluat avec un 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.
<p>6. Démarrer un run de configuration PCR</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 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 : <ul style="list-style-type: none"> ◦ 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 la 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. • Cliquez sur OK pour confirmer le message Loading complete (Chargement terminé) ou patientez 10 secondes. <p>Le système procède alors automatiquement au run de configuration PCR.</p>

Étape	Action
7. Terminer le run de configuration PCR	<ul style="list-style-type: none"> • 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 et confirmez en cliquant sur OK. • Scellez les composants réutilisables du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 et rangez-les. • Consultez les résultats du run de configuration PCR pour confirmer le traitement réussi de chaque échantillon.
8. Sceller la plaque PCR	<ul style="list-style-type: none"> • Scellez la plaque PCR avec un film protecteur de plaque PCR.
9. Démarrer le PCR run	<ul style="list-style-type: none"> • 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 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 plaque PCR à l'aide du scanner de code-barres à main. • 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. <p>Le CFX96™ DW Dx procède alors automatiquement au PCR run.</p>

Étape	Action	
Étape	<p>Action pour l'analyse des données et la création de rapports avec le logiciel CFX Manager™ Dx en vue de procéder ensuite à une interprétation manuelle des résultats ou une interprétation des résultats par le SIL</p>	<p>Action pour l'analyse facultative des données et l'interprétation automatisée des résultats avec FastFinder</p>
10. Séparer les essais pour une analyse individuelle	<ul style="list-style-type: none"> Séparez tous les essais du PCR run en groupes de puits distincts. 	Non requis.
11. Analyser les données et interpréter les résultats du PCR run	<p>Pour chaque groupe de puits, séparément :</p> <ul style="list-style-type: none"> 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. 	<ul style="list-style-type: none"> Utilisez FastFinder Standalone et le plugin d'essai AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 pour l'analyse des données et l'interprétation automatisée des résultats.

ATTENTION



Un stockage inapproprié des éluats peut entraîner une dégradation de la séquence cible du HAV 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 software et de l'AltoStar® AM16. Vous trouverez ci-dessous les paramètres spécifiques à l'utilisation du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 :

- Les PC et NTC sont sélectionnés.
- 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® HAV RT-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 17. Protocole d'essai pour le logiciel AltoStar® Connect software 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 software, 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 software 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 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'eluante 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 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 software.

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'eluante plate (plaque d'éluat) préparée et les réactifs préparés sur leurs portoirs correspondants.

- Remplacez uniquement des rails de cônes de 1000 µl **complètement vides** par des rails de cônes de 1000 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'éluat 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-péréemption 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 software.

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 endommager 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'éluatate plate (plaque d'éluat) actuellement chargée, l'éluatate 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'éluatate 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'eluante 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 software.

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 5).

Tableau 5: Résultats du run de configuration PCR

Status (État)	Résultat du run de configuration PCR
Processed (Traité)	<ul style="list-style-type: none"> L'éluat a été traité avec succès lors du run de configuration PCR. Le mélange RT-PCR résultant est prêt à être utilisé dans un PCR run.
Error (Erreur)	<ul style="list-style-type: none"> Le traitement de l'éluat a échoué. Le mélange RT-PCR correspondant sera automatiquement omis lors de l'analyse PCR suivante.

- 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 software :

- 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 software.

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 plaque PCR doit être scellée à l'aide d'un film protecteur de 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 6: Paramètres du scelleur de plaque

Scelleur de plaque	Paramètres	
	Température [°C]	Temps [s]
AltoStar® Plate Sealer [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 plaque PCR sur l'adaptateur de plaques du scelleur de plaque.
5. Placez un film protecteur de plaque PCR sur la 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 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 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 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 à l'aide du bouton **Operate** (Marche)*/ **.
8. Placez l'ensemble comprenant l'adaptateur de plaques, la plaque PCR, le 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 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 RT-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 ouvrir 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 software 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.

7.6.7 Analyse des données de PCR avec le logiciel CFX Manager™ Dx

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 1.

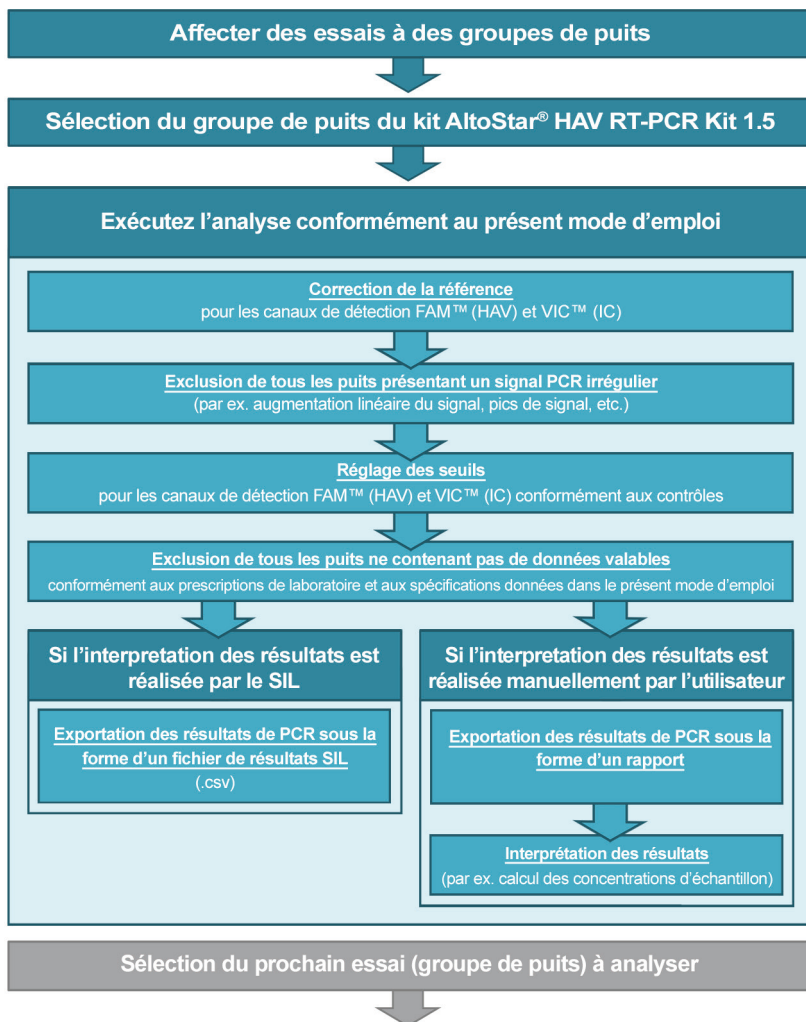


Figure 1: Processus d'analyse des données de PCR avec le logiciel CFX Manager™ Dx

7.6.7.1 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 2).

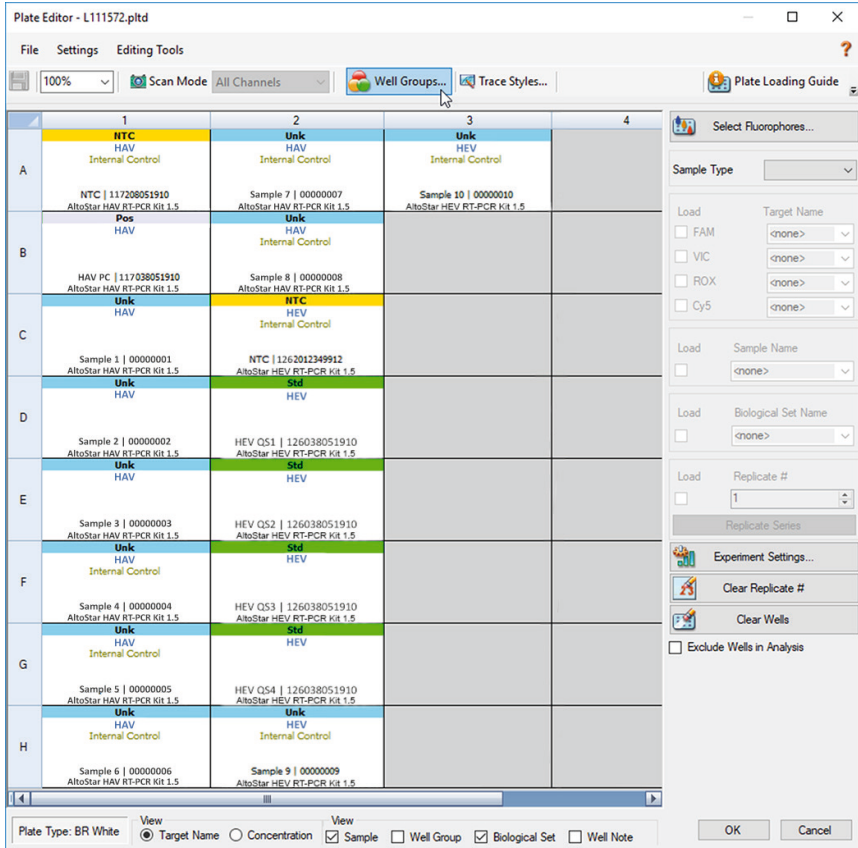


Figure 2: Boîte de dialogue Plate Editor (Éditeur de plaque)

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 3).
3. Cliquez sur le bouton **Add** (Ajouter).
4. Saisissez le nom du premier essai dans la zone de texte.

- Sélectionnez tous les puits de la PCR plate (plaque PCR) situés dans la zone appartenant au premier essai (voir la figure 3). Les puits associés à un essai particulier peuvent être identifiés dans la boîte de dialogue Plate Editor (Éditeur de plaque) grâce aux éléments saisis dans le champ **Biological Set** (Ensemble biologique).

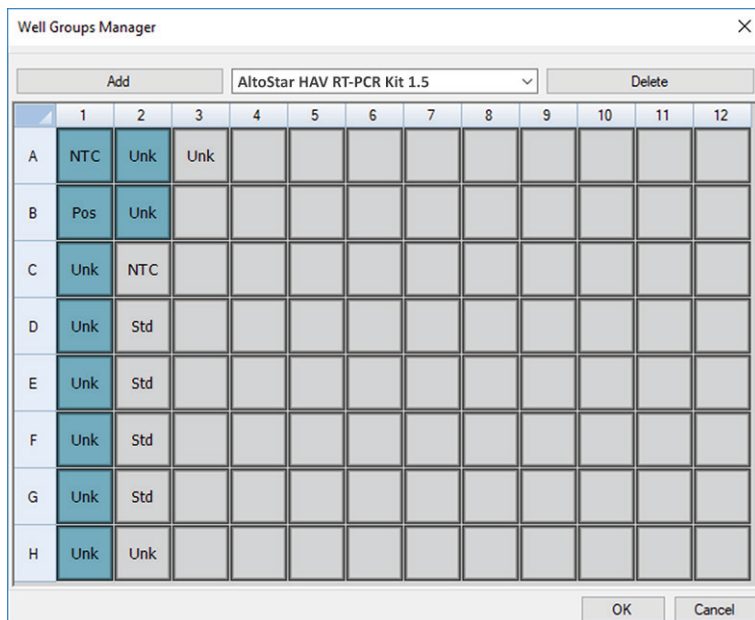


Figure 3: Boîte de dialogue Well Groups Manager (Gestionnaire de groupes de puits)

- Répétez les étapes 3 à 5 pour tous les essais sur la PCR plate (plaque PCR).
- 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.
- Cliquez sur **OK** pour fermer la boîte de dialogue Plate Editor (Éditeur de plaque).
- Cliquez sur **Yes** (Oui) pour confirmer et appliquer les modifications.

Dans la fenêtre Data Analysis (Analyse des données), veillez à sélectionner le **Well Group** (Groupe de puits) du kit AltoStar® HAV RT-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® HAV RT-PCR Kit 1.5 inclut tous les puits du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 et aucun puits d'autres essais.

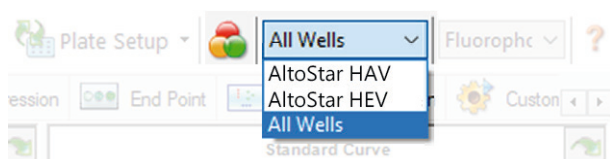


Figure 4: Bouton Well Group (Groupe de puits) et menu déroulant Well Group (Groupe de puits)

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.

7.6.7.2 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® HAV RT-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 HAV.
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 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).

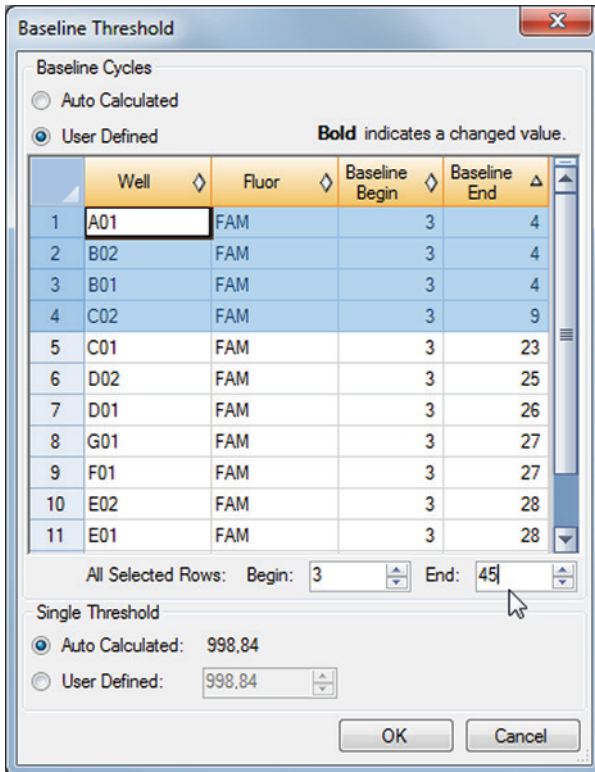


Figure 5: Boîte de dialogue Baseline Threshold (Seuil de référence)

- Définissez la valeur dans le champ **End:** (Extrémité :) sur 45 pour les lignes sélectionnées (voir la figure 5).
- Confirmez les paramètres en cliquant sur **OK**.
- 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.
- Répétez les étapes 3 à 7 pour le canal de détection VIC™ (IC).

7.6.7.3 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 RT-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® HAV RT-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.

- 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 HAV) et VIC™ (IC) (voir la figure 6).

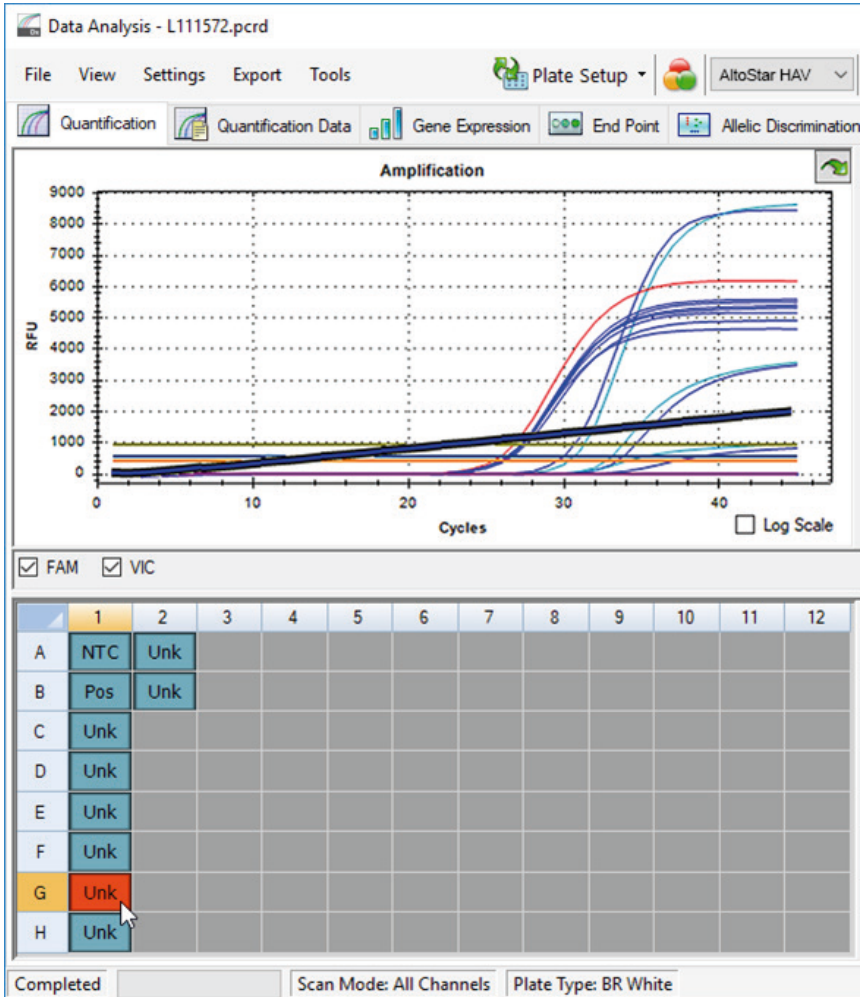


Figure 6: Fenêtre Data Analysis (Analyse des données) : signal PCR irrégulier

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).

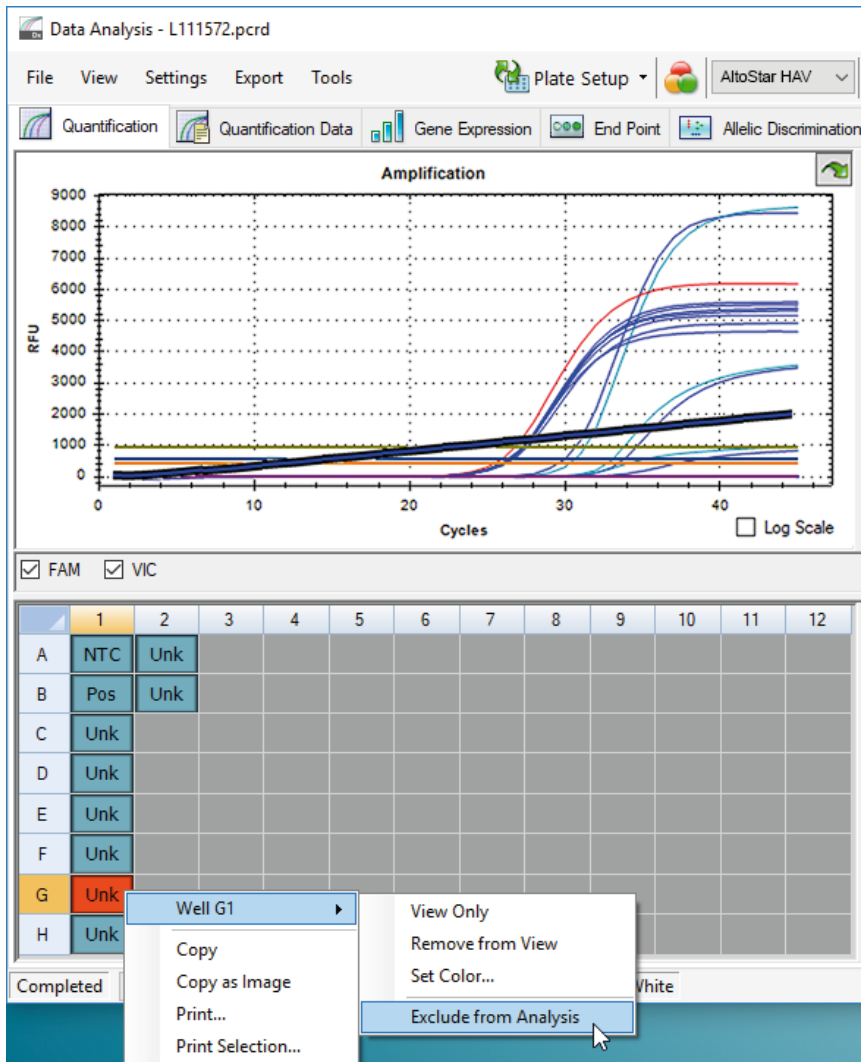


Figure 7: Fenêtre Data Analysis (Analyse des données) : exclure le puits de l'analyse

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

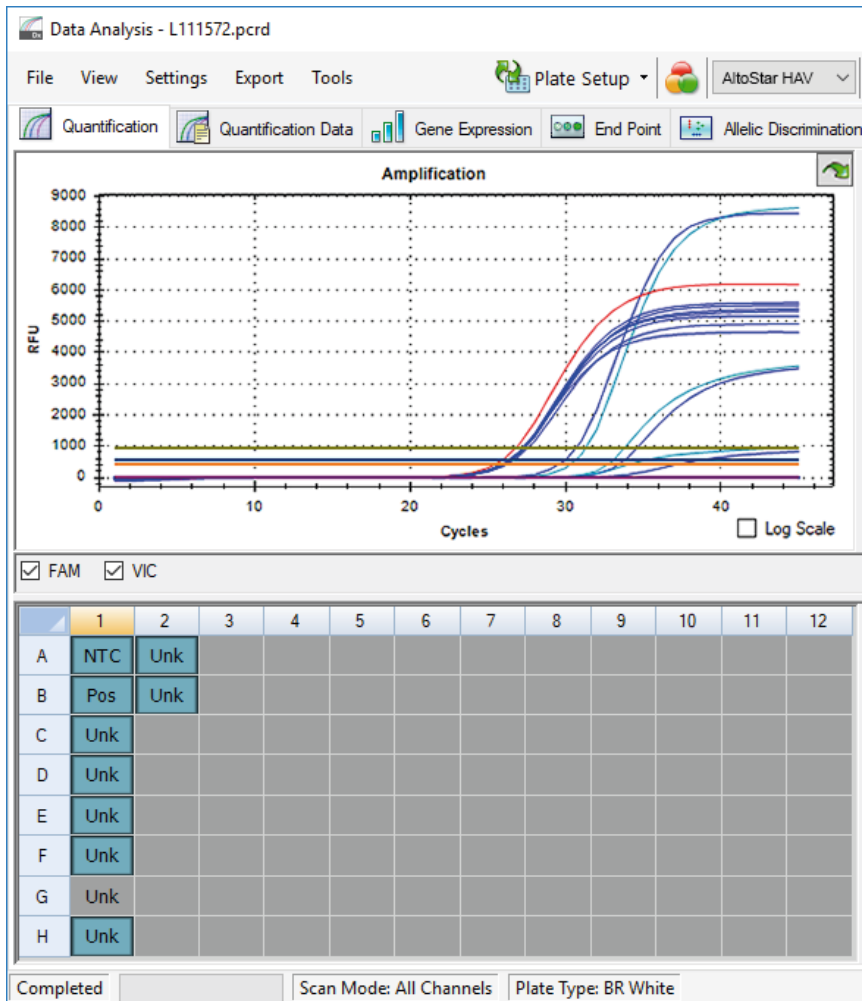


Figure 8: Fenêtre Data Analysis (Analyse des données) : puits exclu

7.6.7.4 Définir des seuils

Les seuils des canaux de détection FAM™ (cible HAV) 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® HAV RT-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).

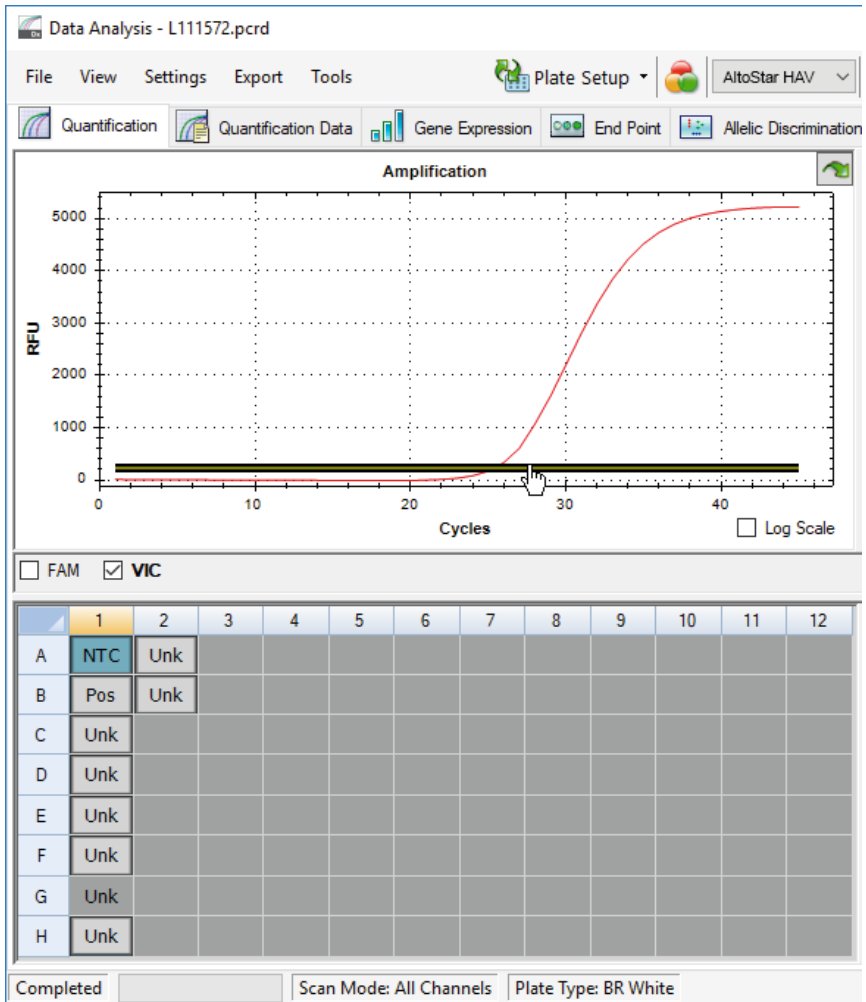


Figure 9: Fenêtre Data Analysis (Analyse des données) : définir le seuil VIC™

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 HAV (voir la figure 10).

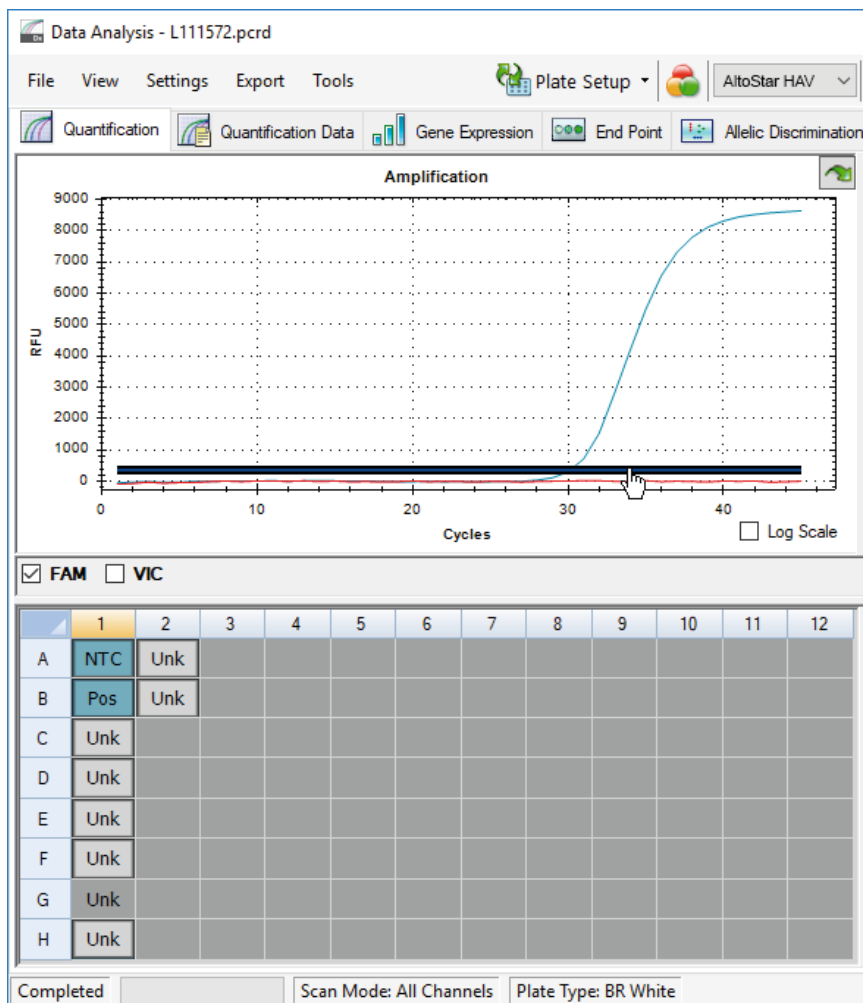


Figure 10: Fenêtre Data Analysis (Analyse des données) : définir le seuil FAM™

- Sélectionnez uniquement les puits contenant le NTC et le PC sur la représentation visuelle de la plaque dans la fenêtre Data Analysis (Analyse des données) (voir la figure 10).
- Faites glisser le seuil situé bien au-dessus du signal du NTC dans la zone exponentielle du signal du PC (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® HAV RT-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).
 - b) Les données des puits ne satisfont pas les conditions de contrôle pour aboutir à un résultat valide (voir le chapitre 7.6.8.3 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 à 7.6.8.3 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).

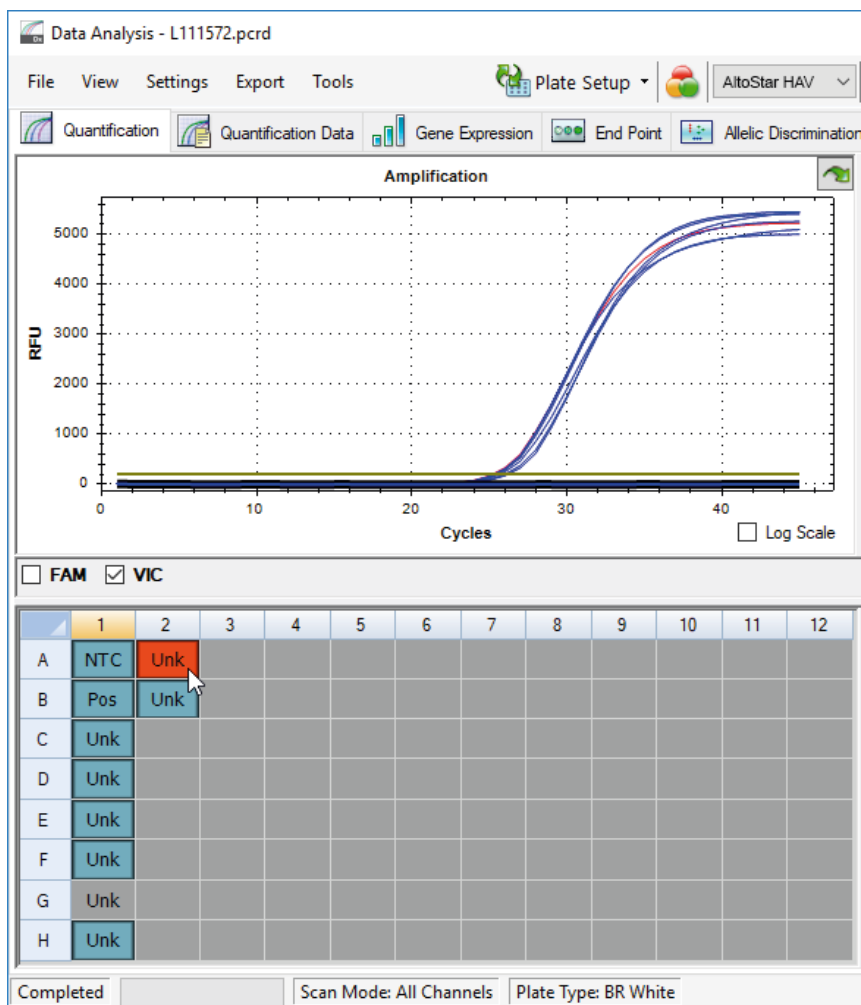


Figure 11: Fenêtre Data Analysis (Analyse des données) : puits non valide

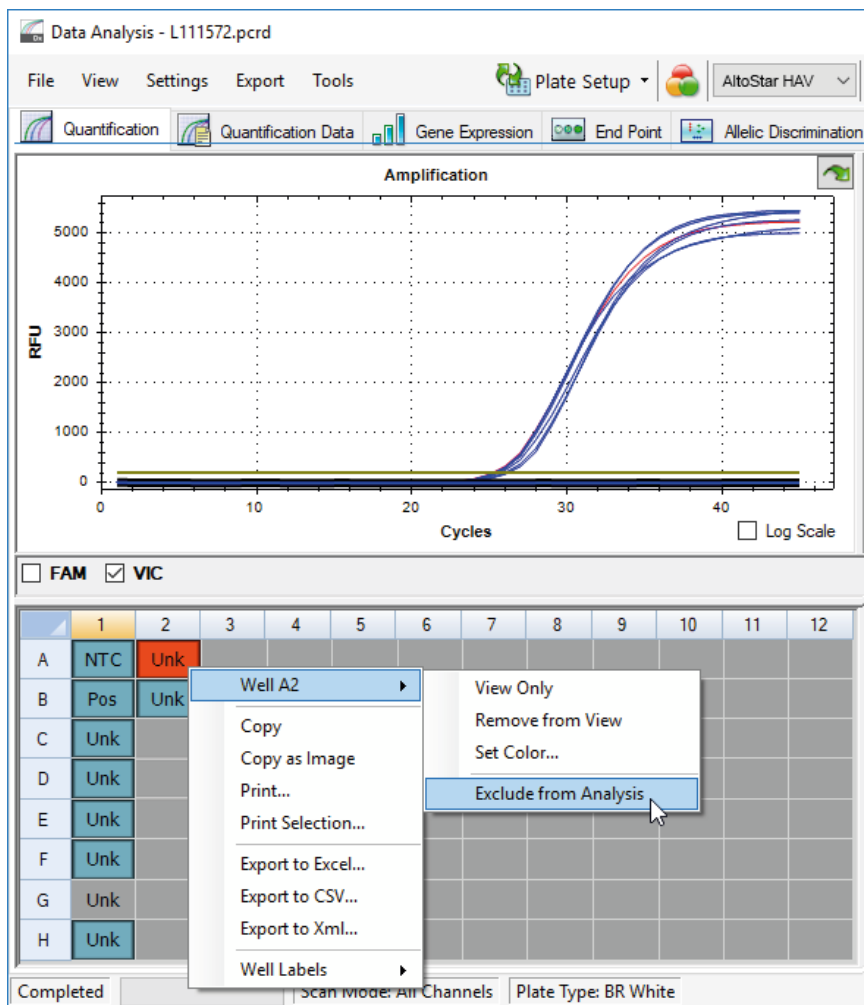


Figure 12: Fenêtre Data Analysis (Analyse des données) : exclure le puits non valide de l'analyse

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

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

Tableau 7: Conditions de contrôle pour un PCR run valide

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

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

- Le run n'est pas terminé.
- L'une des conditions de contrôle d'un PCR run de diagnostic 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 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 HAV) sont négatifs (voir le tableau 8). 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 8: Validité des résultats

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

* La détection de l'IC n'est pas nécessaire lorsque la cible HAV est détectée. Une charge élevée d'ARN spécifique au HAV 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 des résultats par le SIL

Pour une interprétation des résultats par un SIL connecté, les résultats du PCR run doivent être exportés dans 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® HAV RT-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 7.6.7.2 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® HAV RT-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**i**

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 17. Protocole d'essai pour le logiciel AltoStar® Connect software et informations pour l'intégration SIL et/ou contactez l'assistance technique d'altona Diagnostics (voir le chapitre 12. Assistance technique).

REMARQUE**i**

L'enregistrement des résultats de plusieurs essais (groupe de puits) d'un PCR run dans le même dossier entraîne le remplacement des fichiers de résultats SIL du premier essai (groupe de puits) par les fichiers de résultats SIL 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 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® HAV RT-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 7.6.7.2 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® HAV RT-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).

- 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 13) :

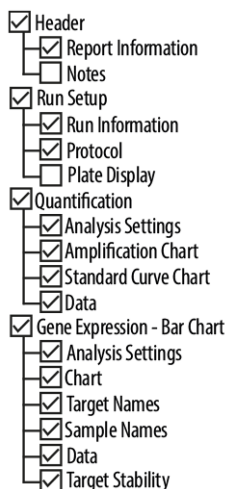


Figure 13: Boîte de dialogue Report (Rapport)

- Sélectionnez ou désélectionnez d'autres éléments du rapport en cochant les cases correspondantes, s'il y a lieu.
- 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).
- Dans la boîte de dialogue Save Report (Enregistrer le rapport), indiquez le nom et l'emplacement du rapport à générer, puis cliquez sur **Save** (Enregistrer).

7.6.10.1 Interprétation manuelle des résultats

- Ouvrez le fichier de Report (Rapport) généré pour le groupe de puits du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 (voir le chapitre 7.6.10 Exporter les résultats de PCR pour une interprétation manuelle des résultats).
- Consultez le tableau Quantification Data (Données de quantification) dans le rapport (voir la figure 14). Le tableau est constitué de 2 lignes pour chaque **Sample** (Échantillon), une pour la **Target** (Cible) *HAV* 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	Well Note
A01	FAM	HAV	NTC	NTC 117201022202	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	
A02	FAM	HAV	Unkn	Sample 7 00000007	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	35.44	35.44	0.000	qualitative
B01	FAM	HAV	Pos Ctrl	HAV PC 117111022206	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	31.37	31.37	0.000	
B02	FAM	HAV	Unkn	Sample 8 00000008	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	35.08	35.08	0.000	qualitative
C01	FAM	HAV	Unkn	Sample 1 00000001	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	36.33	36.33	0.000	qualitative
D01	FAM	HAV	Unkn	Sample 2 00000002	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	36.57	36.57	0.000	qualitative
E01	FAM	HAV	Unkn	Sample 3 00000003	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	34.26	34.26	0.000	qualitative
F01	FAM	HAV	Unkn	Sample 4 00000004	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	35.39	35.39	0.000	qualitative
G01	FAM	HAV	Unkn	Sample 5 00000005	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	35.96	35.96	0.000	qualitative
H01	FAM	HAV	Unkn	Sample 6 00000006	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	34.93	34.93	0.000	qualitative
A01	VIC	Internal Control	NTC	NTC 117201022202	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	28.77	28.77	0.000	
A02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 7 00000007	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	29.43	29.43	0.000	qualitative
B02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 8 00000008	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	29.54	29.54	0.000	qualitative
C01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 1 00000001	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	29.22	29.22	0.000	qualitative
D01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 2 00000002	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	29.49	29.49	0.000	qualitative
E01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 3 00000003	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	29.50	29.50	0.000	qualitative
F01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 4 00000004	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	29.49	29.49	0.000	qualitative
G01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 5 00000005	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	29.27	29.27	0.000	qualitative
H01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 6 00000006	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	29.67	29.67	0.000	qualitative

Figure 14: Rapport : Quantification 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 Quantification Data (Données de quantification).

- Identifiez chaque ligne avec la **Target** (Cible) *HAV* et le terme *qualitative* (qualitatif) dans la colonne **Well Note** (Commentaire sur le puits).
- Dans ces lignes, consultez la colonne **C_q** pour le résultat du **Sample** (Échantillon) respectif.
- Consultez le tableau 9 pour une interprétation des résultats.

Tableau 9: Interprétation des résultats

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

7.6.11 Analyse des données de PCR et interprétation automatisée des résultats avec FastFinder

Le cas échéant, l'analyse des données de PCR et l'interprétation automatisée des résultats peuvent être réalisées avec FastFinder Standalone et le plugin d'essai du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5. La version valide du plugin d'essai est répertoriée dans le chapitre 3.2 Plugin d'essai du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5.

Pour de plus amples informations sur FastFinder Standalone, reportez-vous au mode d'emploi.

REMARQUE



Le plugin d'essai du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 est destiné à être utilisé comme une aide à l'interprétation des résultats générés avec le kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 sur le CFX96™ DW Dx. La validité et l'exactitude de tous les résultats générés avec le plugin d'essai doivent être contrôlées par un opérateur humain.

1. Lancez l'application FastFinder Standalone sur le poste de travail AltoStar® Automated Analysis PC.
2. Saisissez votre nom d'utilisateur et votre mot de passe pour vous connecter. L'écran d'accueil s'affiche. Toutes les analyses en cours et autorisées sont accessibles.
3. Cliquez sur **Create new analysis** (Créer une nouvelle analyse).
4. Recherchez le fichier de données à analyser et cliquez sur **Open** (Ouvrir) pour le sélectionner. Seuls les fichiers .PCRD sont pris en charge. Le fichier est chargé et analysé. Une fois l'analyse terminée, le message **Ready for review** (Prêt pour l'évaluation) s'affiche.

REMARQUE



Il est vivement conseillé d'analyser un fichier de données PCR (.PCRD) à la fois plutôt que d'analyser des lots de PCR runs.

5. Cliquez sur le PCR run pour démarrer le processus d'évaluation.
6. Vérifiez les contrôles et corrigez les messages d'erreur en fonction de l'avertissement émis pour chaque échantillon.

REMARQUE



Veillez à confirmer que les résultats des échantillons non résolus sont peu concluants, puis à extraire et tester de nouveau les échantillons.

7. Autorisez ou relancez l'analyse.

Après avoir cliqué sur **Authorize** (Autoriser), l'analyse est automatiquement téléchargée au format .CSV. Les PDF peuvent être téléchargés à partir d'analyses autorisées. Cliquez sur le bouton **Actions** (Actions) dans le coin supérieur droit et sélectionnez **Generate PDF Export** (Générer une exportation PDF). Accédez à **Downloads** (Téléchargements) via le même menu pour ouvrir le fichier.

8. Utilisation du kit AltoStar® HAV RT-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® HAV RT-PCR Kit 1.5 a été validé avec d'autres instruments PCR en temps réel (voir le chapitre 5.3.2 Autres flux de travail). Les chapitres suivants 8.1 Matériel et dispositifs nécessaires mais non fournis et 8.2 Procédure décrivent comment utiliser le kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 avec ces instruments.

8.1 Matériel et dispositifs nécessaires mais non fournis

Les instruments, logiciels et matériel suivants sont nécessaires :

- Matériel et dispositifs généraux (voir le chapitre 7.5 Matériel et dispositifs généraux)
- CFX96™ Deep Well Dx System avec le logiciel CFX Manager™ Dx version 3.1 (Bio-Rad)
 - PCR plates (plaques PCR) 96 puits et film protecteur (pour plus de détails, voir le tableau 2)

- CFX96™ Dx System avec le logiciel CFX Manager™ Dx version 3.1 (Bio-Rad)
 - PCR plates (plaques PCR) 96 puits et film protecteur (pour plus de détails, voir le tableau 2)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform avec le logiciel Rotor-Gene® Q Software version 2.3.1 (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 avec le logiciel QuantStudio™ 5 Dx Software v1.0.2 et ABI Prism® 7500 SDS avec le logiciel 7500 Software v2.3 (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 et le logiciel LightCycler® 480 Software version 1.5.1 (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® HAV RT-PCR Kit 1.5 a été validé à l'aide de l'AltoStar® AM16 en combinaison avec le kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

Le kit AltoStar® HAV RT-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 RT-PCR suivante.

Le volume d'IC qui est ajouté au mélange échantillon/tampon de lyse dépend du volume d'élution. Il représente 50 % du volume d'élution.

ATTENTION



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

8.2.2 Configuration du master mix

Tous les composants du kit AltoStar® HAV RT-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 10: 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 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 (PC ou NTC).

Tableau 11: 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 qu'au moins 1 PC et 1 NTC sont utilisés par run.
4. Mélangez soigneusement les échantillons et les contrôles avec le master mix en pipetant de haut en bas.
5. Fermez la plaque PCR 96 puits avec un 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 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).

Le NTC contient toujours la matrice de l'IC avec la bonne concentration.

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 consulter le mode d'emploi de l'instrument concerné.

Pour obtenir des instructions détaillées concernant l'utilisation du kit AltoStar® HAV RT-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 12: 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 13: Détecteurs de fluorescence

Cible	Nom du détecteur	Rapporteur	Extincteur
HAV	HAV	FAM™	(Aucun)
IC	Internal Control	JOE™	(Aucun)

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

Tableau 14: Profil de température et acquisition de coloration

	Étape	Répétitions de cycles	Acquisition	Température [°C]	Durée [min:s]
Transcription inverse	Maintien	1	-	55	20:00
Dénaturation	Maintien	1	-	95	02:00
Amplification	Cycle	45	-	95	00:15
			Oui	55	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 détaillées concernant l'analyse des données générées avec le kit AltoStar® HAV RT-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 à 7.6.8.3 Validité des résultats pour un échantillon, le chapitre 7.6.10.1 Interprétation manuelle des résultats et le tableau 9.

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® HAV RT-PCR Kit 1.5 a été réalisée à l'aide des normes internationales de l'OMS « 2nd and 3rd WHO International Standard for hepatitis A virus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 00/562 et 15/276, respectivement) » et des matériaux standard HAV étalonnés par rapport à la norme internationale de l'OMS.

Les données de performance ont été obtenues avec l'AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 en utilisant l'AltoStar® Workflow (flux de travail). Des performances équivalentes en termes de spécificité, de sensibilité et de précision ont été démontrées pour les autres instruments de PCR en temps réel énumérés au chapitre 5.3.2 Autres flux de travail.

9.1 Plasma

9.1.1 Sensibilité analytique

Pour déterminer de la limite de détection (LoD), une série de dilutions conforme à la norme internationale de l'OMS « 3rd WHO International Standard for hepatitis A virus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 15/276) » dans le plasma de 1,00E+02 à 2,50E-01 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® HAV RT-PCR Kit 1.5
- 3 lots de kit AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 lots d'AltoStar® Internal Control 1.5
- 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 15: Résultats de PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5

Concentration [UI/ml]	N [total]	N [positif]	Taux de réussite [%]
1,00E+02	24	24	100
5,00E+01	24	24	100
2,50E+01	24	24	100
1,00E+01	24	24	100
5,00E+00	24	23	96
2,50E+00	24	16	67
1,00E+00	24	12	50
5,00E-01	24	4	17
2,50E-01	24	3	13

La LoD du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 pour la détection du HAV dans le plasma est 6,31 UI/ml (intervalle de confiance à 95 % : 4,17-11,99 UI/ml).

9.1.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du kit AltoStar® HAV RT-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 HAV pertinents seraient détectés.

Pour la vérification de la spécificité analytique du kit AltoStar® HAV RT-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 au HAV prélevés sur des donneurs individuels ont été testés à l'aide du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5. Tous les échantillons (35 sur 35) ont été testés négatifs pour l'ARN spécifique au HAV et positifs pour l'IC. La spécificité analytique du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 pour les échantillons de plasma est $\geq 95\%$.

9.1.2.2 Substances interférentes

Pour évaluer l'influence des substances endogènes susceptibles de perturber les performances du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5, des substances choisies ont été ajoutées aux échantillons de plasma. Ces échantillons de plasma contenaient du HAV dans une concentration de $3 \times \text{LoD}$ ($1,90\text{E}+01$ UI/ml), et pas de HAV, 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 réplicats.

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

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® HAV RT-PCR Kit 1.5 en ce qui concerne la réactivité croisée avec des pathogènes autres que HAV a été évaluée en testant :

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

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

- Coxsackievirus A3
- Cytomégalovirus (CMV)
- Entérovirus 71
- Virus d'Epstein-Barr (EBV)
- Virus de l'hépatite B (HBV)
- Virus de l'hépatite C (HCV)
- Virus de l'hépatite E (HEV)
- Virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1)
- Virus de l'herpès simplex de type 2 (HSV-2)
- Virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1)
- Parvovirus B19
- Virus de la rubéole
- Rubulavirus (RuV)
- Virus varicelle-zona (VZV)
- Virus de la fièvre jaune

ATTENTION



Si l'échantillon contient d'autres pathogènes que le HAV, 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 Réactivité

La spécificité du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 en ce qui concerne la détection de génotypes de HAV est surtout assurée par le choix des amorces et des sondes. Afin de vérifier que le kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 permet la détection d'autres génotypes du HAV que le HAV 1a [« 2nd WHO International Standard for hepatitis A virus (NIBSC code: 00/562) »] et 1b [« 3rd WHO International Standard for hepatitis A virus (NIBSC code: 15/276) »], les HAV 2a et 3a ont été testés avec le kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5. Les HAV 2a et 3a ont été détectés positifs avec le kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5.

ATTENTION



Les mutations potentielles dans les régions cibles du génome du HAV couvertes par les amorces et/ou les sondes utilisées dans le kit peuvent entraîner empêcher de détecter la présence du pathogène.

9.1.4 Précision

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

- 1 échantillon de plasma fortement positif au HAV (3,15E+02 UI/ml)
- 1 échantillon de plasma faiblement positif au HAV [1,90E+01 UI/ml (3 x LoD)]
- 1 échantillon de plasma négatif au HAV

Les données ont été déterminées sur la base de :

- Valeurs de cycle seuil (C_q^*) pour l'échantillon fortement positif au HAV
- Valeurs de cycle seuil (C_q^*) pour l'IC dans l'échantillon négatif au HAV

* 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).

Les données de répétabilité ont été générées conformément aux recommandations de la ligne directrice EP05-A3 du CLSI (« Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline—Third Edition ») [3]. Chaque membre du panel a été testé en double, à raison de 2 runs par jour pendant 20 jours, par un seul opérateur utilisant :

- 1 lot de kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5
- 1 lot de kit AltoStar® Purification Kit 1.5
- 1 lot d'AltoStar® Internal Control 1.5
- 1 instrument AltoStar® AM16
- 1 instrument CFX96™ DW Dx

Dans le tableau 16, les estimations de répétabilité et de précision intra-laboratoire sont fournies à la fois comme l'écart-type (SD) et comme coefficient de variation (CV %) basé sur les valeurs C_q obtenues pour les échantillons fortement positifs au HAV et pour l'IC dans les échantillons négatifs au HAV. Les données de précision affichées ont été obtenues en analysant les données manuellement avec le logiciel CFX Manager™ Dx et en utilisant l'interprétation automatisée des résultats de FastFinder Standalone et du plugin d'essai du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5.

Tableau 16: Répétabilité et précision intra-laboratoire pour le kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5

		Répétabilité		Précision intra-laboratoire	
Logiciel CFX Manager™ Dx					
Échantillon	Moyenne (valeurs C_q)	SD (valeurs C_q)	CV %	SD (valeurs C_q)	CV %
Fortement positif	30,27	0,11	0,36	0,13	0,42
Négatif	29,37	0,10	0,35	0,14	0,47

		Répétabilité		Précision intra-laboratoire	
Plugin d'essai du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5					
Échantillon	Moyenne (valeurs C _q)	SD (valeurs C _q)	CV %	SD (valeurs C _q)	CV %
Fortement positif	28,29	0,12	0,44	0,32	1,12
Négatif	27,84	0,13	0,46	0,36	1,30

Tous les échantillons testés à 3 x LoD (échantillons faiblement positifs) ont été détectés positifs et tous les échantillons négatifs ont donné un résultat négatif avec le logiciel CFX Manager™ Dx et le plugin d'essai AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5.

Pour la reproductibilité, chaque membre du panel a été testé en 6 répliques dans 3 runs par 3 opérateurs en utilisant :

- 3 lots de kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5
- 3 lots de kit AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 lots d'AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 instruments AltoStar® AM16
- 3 instruments CFX96™ DW Dx

Dans le tableau 17, les estimations de reproductibilité sont fournies à la fois comme l'écart-type (SD) et comme coefficient de variation (CV %) basé sur les valeurs C_q obtenues pour les échantillons fortement positifs obtenus pour les échantillons fortement positifs au HAV et pour l'IC dans les échantillons négatifs au HAV. Les données de précision affichées ont été obtenues en analysant les données manuellement avec le logiciel CFX Manager™ Dx et en utilisant l'interprétation automatisée des résultats de FastFinder Standalone et du plugin d'essai du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5.

Tableau 17: Reproductibilité du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5

		Reproductibilité	
Logiciel CFX Manager™ Dx			
Échantillon	Moyenne (valeurs C _q)	SD (valeurs C _q)	CV %
Fortement positif	30,53	0,26	0,85
Négatif	29,57	0,19	0,66
Plugin d'essai du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5			
Échantillon	Moyenne (valeurs C _q)	SD (valeurs C _q)	CV %
Fortement positif	28,37	0,17	0,61
Négatif	27,30	0,17	0,63

Tous les échantillons testés à 3 x LoD (échantillons faiblement positifs) ont été détectés positifs et tous les échantillons négatifs ont donné un résultat négatif avec le logiciel CFX Manager™ Dx et le plugin d'essai AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5.

9.1.5 Taux global de défaillance

La fiabilité du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 a été évaluée en testant 33 échantillons de plasma négatifs au HAV prélevés chez des donneurs individuels et enrichis en HAV à une concentration finale de 3 x LoD (1,90E+01 UI/ml). Tous les échantillons (33 sur 33) ont été testés positifs dans le canal de détection de fluorescence (FAM™) spécifique au HAV.

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, 5 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® HAV RT-PCR Kit 1.5 a été évalué dans le cadre d'une étude comparative avec le kit AmpliSens® HAV-FRT PCR (AmpliSens Ecoli Dx, s.r.o.) portant le marquage CE. Rétrospectivement, 145 échantillons de plasma humain ont été testés en parallèle :

Le kit AmpliSens® HAV-FRT PCR (AmpliSens Ecoli Dx, s.r.o.) a été utilisé en association avec l'instrument NucliSENS® easyMAG (bioMérieux) et l'instrument RotorGene® 6000 (QIAGEN), respectivement l'instrument Mx3000P (Agilent).

Le kit AltoStar® HAV RT-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 ont été exclus.

Les résultats des 139 échantillons restants figurent dans le tableau 18.

Tableau 18: Résultats de l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité du diagnostic pour le HAV dans les échantillons de plasma

		AmpliSens® HAV-FRT PCR Kit (AmpliSens Ecoli Dx, s.r.o.)	
		POSITIF	NÉGATIF
AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5	POSITIF	68	2
	NÉGATIF	0	69

La sensibilité et la spécificité du diagnostic obtenues à l'aide du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 par rapport au kit AmpliSens® HAV-FRT PCR Kit (AmpliSens Ecoli Dx, s.r.o.) étaient de 100 % et 97 %, respectivement.

10. Élimination

Éliminez les déchets dangereux et biologiques conformément aux réglementations locales et nationales. Les restes 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 plaque PCR doit être éliminée à l'état scellé, car le 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® HAV RT-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. Résumé de la sécurité et des performances

Le résumé de la sécurité et des performances rédigé pour le kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 figurera dans la base de données européennes sur les dispositifs médicaux [European Database on Medical Devices (EUDAMED)] : <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

14. Bibliographie

- [1] Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th Edition. ASM Press, 2011.
- [2] Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. *Infectious Diseases*, Third Edition. Mosby, 2010.
- [3] CLSI. *Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline—Third Edition*. CLSI document EP05-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.

15. Marques de commerce et clauses de non-responsabilité

4s3™ (4titude) ; AltoStar® (altona Diagnostics) ; AmpliSens® (AmpliSens Ecoli Dx, s.r.o.) ; ABI Prism®, QuantStudio™ (Applied Biosystems) ; NucliSENS® (bioMérieux) ; CFX96™, CFX Manager™ (Bio-Rad) ; Rotor-Gene® (QIAGEN) ; LOINC® (Regenstrief Institute, Inc.) ; LightCycler® (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® HAV RT-PCR Kit 1.5 est un produit marqué CE conformément au règlement (UE) 2017/746 relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*.

Produit non homologué auprès de Santé Canada, non approuvé par la FDA.

Produit disponible dans certains pays uniquement.

© 2025 altona Diagnostics GmbH ; tous droits réservés.

16. Symboles

Symbole	Explication
	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Numéro d'article pour le commerce international
	Code du lot
	Contenu
	Couleur du capuchon
	Numéro de catalogue
	Numéro
	Composant
	Numéro de matériel
	Numéro de version
	Version
	Consulter le mode d'emploi

Symbole	Explication
	Contenu suffisant pour « n » tests/réactions (rxns)
	Limite de température
	Date de péremption
	Fabricant
	Date de fabrication
	Attention
	Remarque
	Contient des matériaux biologiques d'origine animale

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

Le code-barres 2D de la figure 15 doit être utilisé pour installer le dernier protocole d'essai en vue d'utiliser le kit AltoStar® HAV RT-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. Veuillez 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 software. Pour en savoir plus sur l'intégration SIL, reportez-vous au tableau 20.

AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5



Protocol Version:

Checksum: C326507A464335D02618D2794862824FFF75E7DB

Figure 15: Code-barres du protocole d'essai pour le kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5

Tableau 19: Journal de modifications du protocole d'essai

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

Tableau 20: Informations sur l'intégration SIL

Utilisation	Données
Ordre de test (SIL → AltoStar® AM16)	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5
Unité de résultat du test (CFX96™ DW Dx → SIL)	N/A
Canal 1 de résultat du test (CFX96™ DW Dx → SIL)	HAV
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).

18. Historique de révision

Tableau 21: Historique de révision

Identifiant	Date de publication [mois/année]	Modifications
MAN-AS0241540-FR-S04	12/2025	<ul style="list-style-type: none"> • Chapitre 1 : suppression de la section de texte « méthodes d'extraction des acides nucléiques et » • Chapitres 2, 5, 5.4.2 : spécification des types d'échantillons • Chapitre 3 : chapitre renommé « Composants du kit » • Chapitre « 3.1 Réactifs » ajouté avec le contenu de l'ancien chapitre 3 • Chapitre « 3.2 Plugin d'essai du kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 » ajouté • Chapitre 5 : ajout de la région cible • Chapitre 5.2 : chapitre renommé « Description du réactif » • Chapitres 5.3.1, 7, 7.4, 7.6.1, 7.6.11 : ajout de FastFinder pour l'analyse des données et l'interprétation automatisée des résultats (facultatif) • Chapitre 5.3.2 : ajout de contenu issu du chapitre précédemment désigné 5.3.2.2 • Chapitres 5.3.2, 8.1 : ajout de versions logicielles • Suppression des chapitres 5.3.2.1 et 5.3.2.2 • Chapitres 5.4.2, 6 : ajout des mentions « Attention » • Chapitre 8.2.1 : suppression de la description concernant la marche à suivre pour les procédés d'extraction des acides nucléiques autres qu'avec l'AltoStar® AM16 • Chapitre 9 : ajout d'informations concernant les données de performance d'autres instruments de PCR en temps réel

Identifiant	Date de publication [mois/année]	Modifications
MAN-AS0241540-FR-S04	12/2025	<ul style="list-style-type: none">• Chapitre 9.1.4 : échange de données de précision basé sur 5 runs avec des données de précision générées conformément à la recommandation CLSI EP05-A3• Chapitre « 13 Résumé de la sécurité et des performances » ajouté• Chapitre 14 : ajout d'une référence pour la recommandation EP05-A3 de la CLSI• Chapitre 15 : remplacement de « Directive européenne de diagnostic <i>in vitro</i> 98/79/CE » par « Règlement (UE) 2017/746 relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic <i>in vitro</i> »• Modifications rédactionnelles

page laissée vierge intentionnellement

page laissée vierge intentionnellement

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