Instructions for use

BKV ELITe MGB® Kit

réactifs de PCR en temps réel de l'ADN

ELITechGroup
A BRUKER COMPANY

REF RTS175PLD

UDI 08033891483654

CE 0123

IVD

HISTORIQUE DES MODIFICATIONS

Rév.	Avis de modification	Date (jj/mm/aaaa)
22–R	Extension de l'utilisation du produit en association avec l'instrument MyGenius PRO (réf. INT050) avec la matrice de plasma. Extension de l'utilisation du produit en association avec les instruments ELITe InGenius® et ELITe BeGenius®et la matrice de sang total prélevé sur EDTA (sang total-EDTA). Mise à jour des Annexes : détails sur la procédure de congélation/décongélation.	05/10/2026
21–R	Correction d'erreurs typographiques : Répétabilité inter-sessions sur le ELITe BeGenius (Tableau 20) et Limite de détection pour les échantillons de plasma avec l'instrument ELITe GALAXY (Tableau 38).	15/05/2026
20–R	Extension de l'utilisation du produit en association avec l'instrument MyGenius PRO (réf. INT050) avec la matrice d'urine. Mise à jour du paragraphe « Note pour l'acquéreur : licence limitée ». Mise à jour au « Model 2 version 4.0.2 » des protocoles de test pour les instruments ELITe InGenius® (RÉF INT030) et ELITe BeGenius® (RÉF INT040).	26/02/2026
19–R	Mise à jour pour garantir la conformité aux exigences du Règlement (UE) 2017/746 relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* (IVDR). Mise à jour des performances analytiques et diagnostiques au paragraphe CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE Mise à jour de la section « Application » : • Validation des produits en association avec les instruments ELITe InGenius (RÉF INT030) et ELITe BeGenius (RÉF INT040) avec les matrices de plasma prélevé sur EDTA et d'urine collectée sans conservateurs. • Validation des produits en association avec la matrice de plasma prélevé sur EDTA et les instruments suivants : ELITe GALAXY et ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument. **NOTE!** La composition du produit reste inchangée Nouveaux graphiques et contenu du mode d'emploi.	26/09/2024
18	Extension de l'utilisation du produit en association avec l'instrument ELITe BeGenius® Mise à jour des CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE : • Modification de la limite de détection (LoD) • Modification de la plage de mesure linéaire • Ajout de la répétabilité • Ajout de la reproductibilité	22/10/2021
17	Ajout de la référence au nouveau produit « BKV – ELITe Positive Control RF » (réf. CTR175PLD-R). Extension de l'utilisation du produit en association avec l'analyseur Roche cobas z 480.	25/01/2021
16	Correction de la valeur du % CV indiquée dans le tableau « Précision avec les échantillons de plasma sur le ELITe InGenius (volume d'échantillon de 1000 µL)	01/08/2019
15	Modification des valeurs de la LoD et la LoQ pour le plasma et l'urine en association avec l'instrument ELITe InGenius®.	11/06/2019
14	Extension de l'utilisation avec le kit d'extraction ELITe InGenius® SP 1000	05/07/2018
13	Mise à jour de la section Caractéristiques de performance (ULoQ).	27/04/2018

12	Mise à jour de la section Caractéristiques de performance (LoD et linéarité)	22/12/ 2017
00 - 11	Développement de nouveaux produits et modifications ultérieures	-

SOMMAIRE

1 APPLICATION 5
2 PRINCIPE DU TEST 5
3 DESCRIPTION DU PRODUIT 5
4 MATÉRIEL FOURNI 6
5 MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI 6
6 AUTRES PRODUITS REQUIS 6
7 AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS 8
8 ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES pour les ELITe InGenius, ELITe BeGenius et MyGenius PRO 10
9 PROCÉDURE AVEC LE ELITe InGenius 14
10 PROCÉDURE AVEC LE ELITe BeGenius 21
11 PROCÉDURE MyGenius PRO 27
12 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC ELITe InGenius, ELITe BeGenius et MyGenius PRO 33
13 ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES pour l'instrument ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument 44
14 PROCÉDURE AVEC L'INSTRUMENT ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument 45
15 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC L'INSTRUMENT ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument 52
16 BIBLIOGRAPHIE 55
17 LIMITES DE LA PROCÉDURE 56
18 PROBLÈMES ET SOLUTIONS 58
19 LÉGENDE DES SYMBOLES 65
20 AVIS AUX UTILISATEURS 66
21 NOTE POUR L'ACQUÉREUR : LICENCE LIMITÉE 66
Appendix A QUICK START GUIDE 67
Appendix B QUICK START GUIDE 72
Appendix C QUICK START GUIDE 75

1 APPLICATION

Le produit **BKV ELITe MGB® Kit** est un dispositif médical de diagnostic *in vitro* destiné à être utilisé par les professionnels de santé en tant que test quantitatif de PCR en temps réel des acides nucléiques pour la détection et la quantification de **l'ADN du polyomavirus BK (BKV) humain** extrait d'échantillons cliniques.

Le test est validé en association avec les instruments **ELITe InGenius®** et **ELITe BeGenius®**, des systèmes intégrés et automatisés d'extraction, de PCR en temps réel et d'interprétation des résultats, en utilisant des échantillons humains de plasma prélevé sur EDTA, d'urine collectée sans conservateurs et de sang total prélevé sur EDTA.

Le test est également validé en association avec l'instrument **MyGenius PRO®** (nom d'enregistrement ELIVERSE®), un système intégré et automatisé d'extraction, de PCR en temps réel et d'interprétation des résultats, en utilisant des échantillons humains de plasma prélevé sur EDTA et d'urine collectée sans conservateurs.

Le test est également validé en association avec l'instrument **ELITe GALAXY**, un système automatisé d'extraction et de paramétrage de PCR, et la plateforme de PCR en temps réel **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**, en utilisant des échantillons humains de plasma prélevé sur EDTA.

Le produit est destiné à être utilisé en tant qu'aide au diagnostic et à la surveillance des infections par le BKV chez les patients suspectés de présenter une infection ou surveillés pour une infection par le BKV.

Les résultats doivent être interprétés en association avec l'ensemble des observations cliniques pertinentes et des résultats du laboratoire.

2 PRINCIPE DU TEST

Le test est une PCR quantitative en temps réel qui détecte l'ADN du BKV isolé à partir d'échantillons et amplifié à l'aide du réactif du test, le BKV Q - PCR Mix, qui contient des amorces et des sondes dotées de la technologie ELITe MGB®.

Les sondes ELITe MGB sont activées lorsqu'elles s'hybrident aux produits de PCR associés. **ELITe InGenius**Les instruments **ELITe BeGenius** et **MyGenius PRO** surveillent l'augmentation de la fluorescence et calculent les cycles seuil (Ct) ainsi que les températures de fusion (Tm). La quantité de BKV est calculée en se basant sur une courbe d'étalonnage enregistrée.

L'instrument **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** mesure et enregistre l'augmentation de l'émission de la fluorescence. Le traitement ultérieur des données permet la détection et la quantification du BKV dans l'échantillon primaire.

Dans les sondes ELITe MGB, les fluorophores sont désactivés lorsque la sonde est à l'état simple brin et enroulée de manière aléatoire. Les fluorophores sont actifs dans le duplex sonde/amplicon étant donné que le désactivateur est spatialement séparé du fluorophore. Noter que le fluorophore n'est pas clivé pendant la PCR et peut être utilisé pour l'analyse de dissociation et le calcul de la température de fusion.

3 DESCRIPTION DU PRODUIT

Le **BKV ELITe MGB Kit** fournit le réactif du test, le **BKV Q-PCR Mix**, un mélange de PCR optimisé et stabilisé qui contient les amorces et les sondes spécifiques pour :

- une région du gène du **grand antigène T** du BKV, détectée dans le Canal **BKV** ; la sonde est stabilisée par le groupe MGB, désactivée par le désactivateur Eclipse Dark Quencher® et marquée par le colorant FAM,
- le Contrôle interne, spécifique pour la**région du promoteur et de l'UTR 5'**du**gène de la bêta-globine humaine**, détecté dans le Canal**IC** ; la sonde est stabilisée par le groupe MGB, désactivée par le désactivateur Eclipse Dark Quencher et marquée par le colorant AquaPhluor® 525 (AP525).

Le**BKV Q-PCR Mix**contient également un tampon, du chlorure de magnésium, des nucléotides triphosphates, le fluorophore AP593 (utilisé à la place de ROX ou Cy5) en tant que référence passive pour normaliser la fluorescence, l'enzyme uracile N-glycosidase (UNG) pour inactiver toute contamination par le produit d'amplification, et l'enzyme ADN polymérase « hot start » (démarrage à chaud). Le produit**BKV ELITe MGB Kit**contient suffisamment de réactifs pour effectuer**96 tests**sur les instruments **ELITe InGenius**, **ELITe BeGenius**et**MyGeniusPROen utilisant 20** µl par réaction.

Le produit**BKV ELITe MGB Kit**contient suffisamment de réactifs pour effectuer**100 tests sur d'autres systèmes**, en utilisant**20** µL par réaction.

NOTE!
Un facteur de conversion est requis pour exprimer les résultats de l'analyse quantitative du BKV en unités internationales, conformément au « 1er étalon international de l'OMS pour l'ADN du virus BK » (NIBSC, code 14/212, Royaume-Uni).

4 MATÉRIEL FOURNI

Tableau 1

Composant	Description	Quantité	Classification des risques
BKV Q-PCR Mix réf. RTS175PLD	Mélange de réactifs pour la PCR en temps réel dans un tube doté d'un capuchon NATUREL	**4 x 540 µL**	**-**

5 MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI

- Hotte à flux laminaire.

- Gants non poudrés en nitrile jetables ou matériel similaire.

- Agitateur de type vortex.

- Centrifugeuse de paillasse (~5 000 tr/min).

- Microcentrifugeuse de paillasse (~13 000 tr/min).

- Micropipettes et embouts stériles avec filtre pour aérosols ou embouts stériles à déplacement positif (plage de volumes : 0,5-1000 µL).

- Tubes stériles à capuchon vissant de 2,0 mL (Sarstedt, réf. 72.694.005).

- Tubes stériles à capuchon vissant de 0,5 mL (Sarstedt, réf. 72.730.005)

- Eau de qualité biologie moléculaire.

6 AUTRES PRODUITS REQUIS

Les réactifs pour l'extraction de l'ADN des échantillons, le contrôle interne d'extraction et d'inhibition, les contrôles positif et négatif d'amplification, les étalons d'ADN et les consommables ne sont **pas** fournis avec ce produit.

Pour l'extraction des acides nucléiques, la PCR en temps réel et l'interprétation des résultats des échantillons, les produits suivants sont requis :

Tableau 2

Instruments et logiciels	Produits et réactifs
ELITe InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA réf. INT030) **ELITe InGenius Software** version 1.4.0 (ou versions ultérieures) **BKV ELITe_STD**, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des calibrateurs **BKV ELITe _PC**, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse du Contrôle positif **BKV ELITe _NC**, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse du Contrôle négatif **BKV ELITe_PL_200_100**, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des échantillons de plasma **BKV ELITe_U_200_100**, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des échantillons d'urine **BKV ELITe_WB_200_100**, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des échantillons de sang total	**BKV - ELITe Standard** (EG SpA, réf. STD175PLD) **BKV - ELITe Positive Control** (EG SpA, réf. CTR175PLD) **CPE - Internal Control** (EG SpA, réf. CTRCPE) Consommables pour les **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** (se reporter au mode d'emploi des instruments ELITe InGenius et ELITe BeGenius)
ELITe BeGenius (EG SpA réf. INT040) **ELITe BeGenius Software** version 2.3.0 (ou versions ultérieures) **BKV ELITe_Be_STD**, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des calibrateurs **BKV ELITe_Be_PC**, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse du Contrôle positif **BKV ELITe_Be_NC**, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse du Contrôle négatif **BKV ELITe_Be_PL_200_100**, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des échantillons de plasma **BKV ELITe_Be_U_200_100**, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des échantillons d'urine **BKV ELITe_Be_WB_200_100**, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des échantillons de sang total	

Tableau 2 (continued)

Instruments et logiciels	Produits et réactifs
MyGenius PRO (EG SpA réf. : INT050). **MyGenius PRO Software** version BB-04 (ou versions ultérieures) **BKV ELITe_My_STD**, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des calibrateurs **BKV ELITe_My_PC**, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse du Contrôle positif **BKV ELITe_My_NC**, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse du Contrôle négatif **BKV ELITe_My_U_IU_200_100**, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des échantillons d'urine avec un résultat en UI/mL **BKV ELITe_My_U_cmL_200_100**, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des échantillons d'urine avec un résultat en copies/mL **BKV ELITe_My_PL_IU_200_100**, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des échantillons de plasma avec un résultat en UI/mL **BKV ELITe_My_PL_cmL_200_100**, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des échantillons de plasma avec un résultat en copies/mL	**BKV - ELITe Standard** (EG SpA, réf. STD175PLD) **BKV - ELITe Positive Control** (EG SpA, réf. CTR175PLD) **Negative Control** (EG SpA, réf. CTRNEG) **Internal Control Maxi** (EG SpA, réf. ICMAXI) Consommables pour le **MyGenius PRO** (se reporter au mode d'emploi de l'instrument MyGenius PRO)
ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (ThermoFisher Scientific, réf. 4406985) **ELITe GALAXY** (EG SpA, réf. INT020) avec la **version du logiciel 1.3.1** (ou versions ultérieures). Protocole d'extraction pour le ELITe GALAXY, xNA Extraction (Universel)	**BKV - ELITe Standard** (EG SpA, réf. STD175PLD) **BKV - ELITe Positive Control** (EG SpA, réf. CTR175PLD) **CPE - Internal Control** (EG SpA, réf. CTRCPE) Consommables pour **ELITe GALAXY** (se reporter au mode d'emploi de l'instrument ELITe GALAXY) **MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL** (Life Technologies, réf. 4346906), des microplaques comprenant des puits de 0,1 mL et des feuilles de scellage adhésives pour l'amplification en temps réel.

7 AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Ce produit est exclusivement réservé à une utilisation in vitro.

7.1 Avertissements et précautions d'ordre général

- Manipuler et éliminer tous les échantillons biologiques comme s'ils étaient infectieux. Éviter tout contact direct avec les échantillons biologiques. Éviter de provoquer des éclaboussures ou des pulvérisations. Les tubes, embouts et tout autre matériel qui a été en contact avec les échantillons biologiques doivent être traités pendant au moins 30 minutes avec de l'hypochlorite de sodium à 3 % (eau de Javel) ou autoclavés pendant une (1) heure à 121 °C avant d'être mis au rebut.
- Manipuler et éliminer tous les réactifs et l'ensemble du matériel qui ont été utilisés pour réaliser le test comme s'ils étaient infectieux. Éviter tout contact direct avec les réactifs. Éviter de provoquer des éclaboussures ou des pulvérisations. Les déchets doivent être manipulés et éliminés dans le respect des normes de sécurité adéquates. Le matériel combustible jetable doit être incinéré. Les déchets liquides contenant des acides ou des bases doivent être neutralisés avant d'être éliminés. Éviter tout contact des réactifs d'extraction avec l'hypochlorite de sodium (eau de Javel).
- Porter des vêtements et des gants de protection appropriés et se protéger les yeux et le visage.
- Ne jamais pipeter les solutions avec la bouche.
- Ne pas manger, boire, fumer ou appliquer de produits cosmétiques dans les zones de travail.

- Se laver soigneusement les mains après toute manipulation des échantillons et des réactifs.
- Éliminer les réactifs restants et les déchets conformément aux réglementations en vigueur.
- Lire attentivement toutes les instructions indiquées avant d'exécuter le test.
- Lors de l'exécution du test, suivre les instructions fournies avec le produit.
- Ne pas utiliser le produit au-delà de la date de péremption indiquée.
- Utiliser uniquement les réactifs fournis avec le produit et ceux recommandés par le fabricant.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant de lots différents.
- Ne pas utiliser de réactifs commercialisés par d'autres fabricants.

7.2 Avertissements et précautions pour la biologie moléculaire

Les procédures de biologie moléculaire exigent du personnel qualifié et dûment formé pour éviter tout risque de résultats erronés, en particulier ceux dus à la dégradation des acides nucléiques des échantillons ou à la contamination des échantillons par les produits de PCR.

Ne jamais transférer de blouses, de gants ni d'outils de laboratoire de la zone désignée pour l'amplification/la détection des produits d'amplification vers la zone désignée pour l'extraction/la préparation des réactions d'amplification.

Lorsque la session d'amplification doit être effectuée avec l'instrument 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, il est nécessaire de disposer de zones distinctes pour l'extraction/la préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification/la détection des produits d'amplification. Ne jamais introduire un produit d'amplification dans la zone réservée à l'extraction/la préparation des réactions d'amplification.

Il est nécessaire d'utiliser des blouses de laboratoire, des gants et des instruments dédiés à la session de travail.

Les échantillons doivent être adaptés et, si possible, dédiés à ce type d'analyse. Les échantillons doivent être manipulés sous une hotte à flux laminaire. Les pipettes utilisées pour manipuler les échantillons doivent être exclusivement utilisées à cette fin spécifique. Les pipettes doivent être de type à déplacement positif ou doivent être utilisées avec des cônes dotés d'un filtre pour les aérosols. Les cônes utilisés doivent être stériles, exempts de DNases et de RNases, et exempts d'ADN et d'ARN.

Les réactifs doivent être manipulés sous une hotte à flux laminaire. Les pipettes utilisées pour la manipulation des réactifs doivent être utilisées exclusivement à cette fin. Les pipettes doivent être de type à déplacement positif ou doivent être utilisées avec des cônes dotés d'un filtre pour les aérosols. Les cônes utilisés doivent être stériles, exempts de DNases et de RNases, et exempts d'ADN et d'ARN.

Les produits d'extraction doivent être manipulés de manière à éviter leur dispersion dans l'environnement et à prévenir toute contamination de la zone de travail de l'instrument.

Les PCR Cassettes (Cassettes de PCR) doivent être manipulées avec précaution et ne doivent jamais être ouvertes afin d'éviter la diffusion des produits de PCR et toute contamination croisée.

7.3 Avertissements et précautions spécifiques pour les composants

Tableau 3

Composant	Température de stockage	Utilisation après la première ouverture	Cycles de congélation/décongélation	Stabilité à bord de l'instrument (ELITe InGenius et ELITe BeGenius)	Stabilité à bord de l'instrument (MyGenius PRO)
BKV Q-PCR Mix	-20 °C ou température plus basse (à l'abri de la lumière)	60 jours	jusqu'à cinq	jusqu'à cinq sessions d'analyse distinctes* de trois heures chacune ou jusqu'à 7 heures consécutives (2 sessions d'analyse de 3 heures chacune et durée nécessaire au paramétrage d'une troisième session d'analyse)	jusqu'à 7 heures consécutives ou jusqu'à 3 heures consécutives pour cinq fois*

* avec congélation intermédiaire.

8 ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES pour les ELITe InGenius, ELITe BeGenius et MyGenius PRO

8.1 Échantillons et protocoles de test

Ce produit est destiné à être utilisé sur les instruments **ELITe InGenius**, **ELITe BeGenius** et **MyGenius PRO** avec les échantillons cliniques validés correspondants, identifiés et manipulés selon les directives du laboratoires, et prélevés, transportés et conservés dans les conditions suivantes :

Tableau 4

Échantillon	Exigences de prélèvement	Conditions de transport/conservation			
		+16/+26 °C (température ambiante)	+2/+8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Plasma	EDTA	≤ 1 j	≤ 3 j	≤ 30 j	≤ 30 j
Urine	sans conservateurs	≤ 4 heures	≤ 1 j	≤ 30 j	≤ 30 j
Sang total	EDTA	≤ 1 j	≤ 3 j	≤ 30 j	≤ 30 j

EDTA, acide éthylènediaminetétraacétique ; j, jour.

Même si des périodes de conservation plus longues à -70 °C sont possibles, tel que largement rapporté dans la littérature scientifique, leur application doit être évaluée en interne par les utilisateurs finaux de ce produit.

Il est recommandé de diviser les échantillons en aliquotes avant la congélation afin d'éviter des cycles répétés de congélation/décongélation. En cas d'utilisation d'échantillons congelés, les décongeler juste avant l'extraction afin d'éviter une éventuelle dégradation des acides nucléiques.

Utiliser les protocoles de test (Assay Protocols) suivants pour procéder au test des échantillons sur les **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius**. Ces protocoles de DIV ont été spécifiquement validés avec les ELITe MGB Kits et le **ELITe InGenius** ou **ELITe BeGenius** avec les matrices indiquées.

Tableau 5

Échantillon	Instrument	Nom du protocole de test	Rapport	Caractéristiques
Plasma prélevé sur EDTA	ELITe InGenius	BKV ELITe_PL_200_100	copies/mL ou UI/mL	Volume d'extraction : 200 µL Volume d'élution de l'extraction : 100 µL Contrôle Interne : 10 µL Sonication : NON Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de PCR de l'échantillon : 20 µL
	ELITe BeGenius	BKV ELITe_Be_PL_200_100	copies/mL ou UI/mL	Volume d'extraction : 200 µL Volume d'élution de l'extraction : 100 µL Contrôle Interne : 10 µL Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de PCR de l'échantillon : 20 µL
Urine	ELITe InGenius	BKV ELITe_U_200_100	copies/mL ou UI/mL	Volume d'extraction : 200 µL Volume d'élution de l'extraction : 100 µL Contrôle Interne : 10 µL Sonication : NON Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de PCR de l'échantillon : 20 µL
	ELITe BeGenius	BKV ELITe_Be_UL_200_100	copies/mL ou UI/mL	Volume d'extraction : 200 µL Volume d'élution de l'extraction : 100 µL Contrôle Interne : 10 µL Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de PCR de l'échantillon : 20 µL
Sang total	ELITe InGenius	BKV ELITe_WB_200_100	copies/mL ou UI/mL	Volume d'extraction : 200 µL Volume d'élution de l'extraction : 100 µL Contrôle interne : 10 µL Sonication : NON Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de PCR de l'échantillon : 20 µL
	ELITe BeGenius	BKV ELITe_Be_WB_200_100	copies/mL ou UI/mL	Volume d'extraction : 200 µL Volume d'élution de l'extraction : 100 µL Contrôle interne : 10 µL Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de PCR de l'échantillon : 20 µL

UI, unités internationales

Utiliser les protocoles de test (Assay Protocols) suivants pour procéder au test des échantillons sur l'instrument **MyGenius PRO**. Ces protocoles de DIV ont été spécifiquement validés avec les kits ELITe MGB et l'instrument **MyGenius PRO** avec les matrices indiquées.

Tableau 6 Protocoles de test pour le kit BKV ELITe MGB Kit avec l'instrument MyGeniusPRO

Échantillon	Instrument	Nom du protocole de test	Rapport	Caractéristiques
Urine	MyGenius PRO	BKV ELITe_My_U_IU_200_100	UI/ml	Volume d'extraction : 200 µl Volume d'élution de l'extraction : 100 µl Contrôle Interne : 10 µl Sonication : NON Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µl Volume initial de PCR de l'échantillon : 20 µl
Urine	MyGenius PRO	BKV ELITe_My_U_cmL_200_100	copies/ml	Volume d'extraction : 200 µl Volume d'élution de l'extraction : 100 µl Contrôle Interne : Sonication de 10 µl : NON Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µl Volume initial de PCR de l'échantillon : 20 µl
Plasma	MyGenius PRO	BKV ELITe_My_PL_IU_200_100	UI/mL	Volume d'extraction : 200 µL Volume d'élution de l'extraction : 100 µL Contrôle interne : 10 µL Sonication : NON Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de PCR de l'échantillon : 20 µL
Plasma	MyGenius PRO	BKV ELITe_My_PL_cmL_200_100	copies/mL	Volume d'extraction : 200 µL Volume d'élution de l'extraction : 100 µL Contrôle Interne : 10 µL Sonication : NON Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de PCR de l'échantillon : 20 µL

NOTE!

Vérifier si le tube primaire et le volume de l'échantillon sont compatibles avec l'instrument ELITe InGenius, ELITe BeGenius ou MyGeniuS PRO, d'après le mode d'emploi de ces instruments.

Le volume de l'échantillon contenu dans un tube primaire varie selon le type de tube chargé. Se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction pour obtenir de plus amples informations sur le paramétrage et l'exécution de la procédure d'extraction.

Si requis, 200 µl d'échantillon doivent être transférés dans un tube d'extraction (pour l'instrument ELITe InGenius) ou dans un tube Sarstedt de 2 ml (pour l'instrument ELITe BeGenius), et 260 µl d'échantillon dans un tube Sarstedt de 2 ml (pour l'instrument MyGenius PRO).

NOTE!

Le pipetage des échantillons dans le **tube d'extraction** ou le **tube Sarstedt de 2 ml** peut **entraîner une contamination.** Utiliser les pipettes appropriées et suivre toutes les recommandations indiquées à la section « 7 AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS page 8 ».

Les acides nucléiques purifiés peuvent être laissés à température ambiante pendant 16 heures et conservés à -20 °C ou à une température plus basse pendant un mois maximum.

Se reporter au paragraphe « Substances potentiellement interférentes » de la section 12 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC ELITe InGenius, ELITe BeGenius et MyGenius PRO page 33 pour vérifier les informations concernant les substances interférentes.

8.2 Calibrateurs et contrôles de la PCR

La courbe d'étalonnage doit être générée et approuvée pour chaque lot de réactifs de PCR.

- Pour la courbe d'étalonnage, utiliser les quatre niveaux du produit **BKV ELITe Standard** (non inclus dans ce kit) avec les protocoles de test (Assay Protocols) **BKV ELITe_STD**, **BKV ELITe_Be_STD** ou **BKV ELITe_My_STD**

NOTE!

Les concentrations des étalons Q – PCR Standards sont exprimées en copies/réaction (10^5 copies/réaction, 10^4 copies/réaction, 10^3 copies/réaction, 10^2 copies/réaction). Se reporter au paragraphe « Incertitude de la courbe d'étalonnage » de la section 12 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC ELITe InGenius, ELITe BeGenius et MyGenius PRO page 33.

Les résultats des contrôles de la PCR doivent être générés et approuvés pour chaque lot de réactifs de PCR.

- Pour le Contrôle positif, utiliser le produit **BKV - ELITe Positive Control** (non inclus dans ce kit) avec les protocoles de test (Assay Protocols) **BKV ELITe_PC**, **BKV ELITe_Be_PC** ou **BKV ELITe_My_PC**
- Pour le Contrôle négatif, utiliser de l'eau de qualité biologie moléculaire (non incluse dans ce kit) avec les protocoles de test (Assay Protocols) **BKV ELITe_NC**, **BKV ELITe_Be_NC**, ou utiliser le produit **Negative Control** (non inclus dans ce kit) avec le protocole de test (Assay Protocol) **BKV ELITe_My_NC**

NOTE!

Les instruments **ELITe InGenius**, **ELITe BeGenius** et **MyGenius PRO** permettent de générer et de stocker la courbe d'étalonnage et de valider les contrôles de la PCR pour chaque lot de réactifs de PCR.

NOTE!

Les courbes d'étalonnage expirent au bout de **60 jours**, après quoi il est nécessaire d'effectuer à nouveau l'étalonnage

Les résultats des contrôles de la PCR expirent au bout de **15 jours**, après quoi il est nécessaire de réanalyser les contrôles positif et négatif.

Les calibrateurs et les contrôles de la PCR doivent être à nouveau analysés en cas de survenue de l'une des situations suivantes :

- un nouveau lot de réactifs est utilisé,
- les résultats de l'analyse du contrôle de qualité (se reporter au paragraphe suivant) sont en dehors des spécifications,
- les instruments **ELITe InGenius**, **ELITe BeGenius** et **MyGenius PRO** sont soumis à une procédure de maintenance ou d'entretien majeure.

8.3 Contrôles de qualité

Il est recommandé de vérifier la procédure d'extraction et de PCR. Il est possible d'utiliser des échantillons archivés ou du matériel de référence certifié. Les contrôles externes doivent être utilisés conformément aux exigences des organismes d'accréditation locaux, régionaux et fédéraux, selon le cas.

9 PROCÉDURE AVEC LE ELITe InGenius

La procédure d'utilisation du **BKV ELITe MGB Kit** avec le **ELITe InGenius** comporte trois étapes :

Tableau 7

ÉTAPE 1	Vérification de la préparation du système	
ÉTAPE 2	Paramétrage de la session d'analyse	A) Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR])
		B) Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement])
		C) Analyse d'étalonnage (PCR Only [PCR seulement])
		D) Analyse du Contrôle positif et du Contrôle négatif (PCR Only [PCR seulement])
ÉTAPE 3	Examen et approbation des résultats	1) Validation de la courbe d'étalonnage
		2) Validation des résultats du Positive Control et du Negative Control
		3) Validation des résultats des échantillons
		4) Rapport des résultats de l'échantillon

9.1 ÉTAPE 1 – Vérification de la préparation du système

Avant de commencer la session d'analyse :

- mettre le **ELITe InGenius** en marche et se connecter en mode « **CLOSED** » (FERMÉ),
- dans le menu « Calibration » (Étalonnage) de la page Home (Accueil), vérifier que les calibrateurs (**Q - PCR Standard**) sont approuvés et valides (Status [Statut]) pour le lot de **PCR Mix** à utiliser. Si aucun calibrateur valide n'est disponible pour le lot de **PCR Mix**, effectuer un étalonnage comme décrit dans les sections suivantes,
- dans le menu « Controls » (Contrôles) de la page Home (Accueil), vérifier que les contrôles de PCR (**Positive Control**, **Negative Control**) sont approuvés et valides (Status [Statut]) pour le lot de PCR Mix à utiliser. Si aucun contrôle de PCR valide n'est disponible pour le lot de **PCR Mix**, analyser les contrôles de PCR comme décrit dans les sections suivantes,
- sélectionner le type d'analyse, en suivant les instructions de l'interface graphique (GUI) pour le paramétrage de la session d'analyse, et utiliser les protocoles de test (Assay Protocols) fournis par EG SpA (se reporter à la section 8 ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES pour les ELITe InGenius, ELITe BeGenius et MyGenius PRO page 10).

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

9.2 ÉTAPE 2 – Paramétrage de la session d'analyse

Le **BKV ELITe MGB Kit** peut être utilisé sur le **ELITe InGenius** pour effectuer les opérations suivantes :

A. Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR]),

B. Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement]),

C. Analyse d'étalonnage (« PCR Only » [PCR seulement]),

D. Analyse du Contrôle positif et du Contrôle négatif (PCR Only [PCR seulement]).

Tous les paramètres requis sont inclus dans les protocoles de test disponibles sur l'instrument et sont chargés automatiquement lorsque le protocole de test est sélectionné.

NOTE!

Le **ELITe InGenius** peut être connecté au « Laboratory Information System » (système de gestion des informations de laboratoire - LIS) qui permet de télécharger les informations relatives à la session d'analyse. Se reporter au manuel de l'instrument pour plus de détails.

Avant de paramétrer une analyse :

Décongeler les tubes de **PCR Mix** nécessaires à température ambiante pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer **24 tests**. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré.

NOTE!

Conserver le **PCR Mix** à l'abri de la lumière lors de la décongélation, car ce réactif est photosensible.

Pour paramétrer l'un des quatre types d'analyse, suivre les étapes ci-dessous tout en se reportant à la GUI :

	A. Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR])	**B. Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement])**
1	**Identifier les échantillons** et, si nécessaire, les décongeler à température ambiante, mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré. Si requis, transférer 200 µL d'échantillon dans un tube d'extraction préalablement étiqueté. **Décongeler** les **tubes de CPE** nécessaires à température ambiante pendant 30 minutes. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré. Chaque tube permet d'effectuer 12 extractions.	**Décongeler** le **tube d'élution** contenant les acides nucléiques extraits à température ambiante. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré.
2	Sélectionner « **Perform Run** » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil).	Sélectionner « **Perform Run** » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil).
3	Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élution de l'extraction) est de 100 µL.	Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élution de l'extraction) est de 100 µL.
4	Pour chaque échantillon, attribuer une « Track » (Position) et renseigner le « SampleID » (ID échantillon - SID) en le saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.	Pour chaque échantillon, attribuer une « Track » (Position) et renseigner le « SampleID » (ID échantillon - SID) en le saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.
5	**Sélectionner** le « **Assay Protocol** » (Protocole de test) dans la colonne « Assay » (Analyse) (se reporter à la section « Échantillons et contrôles »).	Sélectionner le « **Assay Protocol** » (Protocole de test) dans la colonne « Assay » (Analyse) (se reporter à la section « Échantillons et contrôles »).
6	Vérifier que le « Protocol » (Protocole) affiché est : « Extract + PCR » (Extraction + PCR).	Sélectionner « PCR Only » (PCR seulement) dans la colonne « Protocol » (Protocole).
7	Sélectionner la position de chargement de l'échantillon en tant que « Primary tube » (Tube primaire) ou « Extraction Tube » (Tube d'extraction) dans la colonne « Sample Position » (Position de l'échantillon). Vérifier que le « **Dilution factor** » (Facteur de dilution) est « **1** ».	Vérifier que la position de chargement de l'échantillon dans la colonne « Sample Position » (Position échantillons) est « Elution Tube (bottom row) » (Tube d'élution [ligne du bas]). Vérifier que le « **Dilution factor** » (Facteur de dilution) est « **1** ».
8	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.

	A. Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR])	**B. Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement])**
9	**Charger le CPE** et le **PCR Mix** sur le « Inventory Block » (Gestionnaire de stocks) en se reportant à la « Load List » (Liste) et saisir le numéro de lot et la date de péremption du CPE et du PCR Mix ainsi que le nombre de réactions pour chaque tube.	**Charger** le **PCR Mix** sur le « Inventory Block » (Gestionnaire de stocks) en se reportant à la « Load List » (Liste) et saisir le numéro de lot et la date de péremption du PCR Mix ainsi que le nombre de réactions pour chaque tube.
10	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
11	Vérifier les embouts dans les « Tip Racks » (Compartiments à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer les « Tip Racks » si nécessaire.	Vérifier les embouts dans les « Tip Racks » (Compartiments à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer les « Tip Racks » si nécessaire.
12	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
13	**Charger** la PCR Cassette (Cassette de PCR), les cartouches d'extraction ELITe InGenius SP 200, et tous les consommables requis et échantillons à extraire.	**Charger** la PCR Cassette (Cassette de PCR) et les tubes d'élution avec les échantillons extraits.
14	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
15	Fermer le tiroir de l'instrument.	Fermer le tiroir de l'instrument.
16	Appuyer sur « Start » (Début).	Appuyer sur « Start » (Début).

	C. Analyse d'étalonnage (PCR Only [PCR seulement])	D. Analyse du Contrôle positif et du Contrôle négatif (PCR Only [PCR seulement])
1	**Décongeler** les **tubes de Q-PCR Standard** nécessaires (Cal1 : Q-PCR Standard 10^2, Cal2 : Q-PCR Standard 10^3, Cal3 : Q-PCR Standard 10^4, Cal4 : Q-PCR Standard 10^5) à température ambiante pendant 30 minutes. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré.	**Décongeler les tubes de Contrôle positif** à température ambiante pendant 30 minutes. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré. **Préparer** le **Contrôle négatif** en transférant au minimum 50 µL d'eau de qualité biologie moléculaire dans un « Elution tube » (Tube d'élution) fourni avec le ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil).	Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil).
3	Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élution de l'extraction) est de 100 µL.	Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élution de l'extraction) est de 100 µL.
4	Pour le Q-PCR Standard, attribuer la « Track » (Position), **sélectionner** le **Assay Protocol** (Protocole de test) dans la colonne « Assay » (Analyse) et saisir le numéro de lot et la date de péremption du réactif.	**Sélectionner** le « **Assay Protocol** » (Protocole de test) dans la colonne « Assay » (Analyse) (se reporter à la section « Échantillons et contrôles »). Saisir le numéro de lot et la date de péremption du Contrôle positif et de l'eau de qualité biologie moléculaire.
5	Vérifier que « PCR Only » (PCR seulement) est sélectionné dans la colonne « Protocol » (Protocole).	Vérifier que « PCR Only » (PCR seulement) est sélectionné dans la colonne « Protocol » (Protocole).
6	Vérifier que la position de chargement de l'échantillon dans la colonne « Sample Position » (Position échantillons) est « Elution Tube (bottom row) » (Tube d'élution [ligne du bas]).	Vérifier que la position de chargement de l'échantillon dans la colonne « Sample Position » (Position échantillons) est « Elution Tube (bottom row) » (Tube d'élution [ligne du bas]).
7	**Charger** le **PCR Mix** sur le « Inventory Block » (Gestionnaire de stocks) en se reportant à la « Load List » (Liste) et saisir le numéro de lot et la date de péremption du PCR Mix ainsi que le nombre de réactions pour chaque tube.	**Charger** le **PCR Mix** sur le « Inventory Block » (Gestionnaire de stocks) en se reportant à la « Load List » (Liste) et saisir le numéro de lot et la date de péremption du PCR Mix ainsi que le nombre de réactions pour chaque tube.
8	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
9	Vérifier les embouts dans le (s) « Tip Rack (s) » (Compartiment(s) à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer le(s) « Tip Rack(s) » si nécessaire.	Vérifier les embouts dans le (s) « Tip Rack (s) » (Compartiment (s) à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer le (s) « Tip Rack (s) » si nécessaire.
10	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
11	**Charger** la PCR Cassette (Cassette de PCR) et les tubes de Q-PCR Standard.	**Charger** la PCR Cassette (Cassette de PCR), le Contrôle positif et le Contrôle négatif.
12	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
13	Fermer le tiroir de l'instrument.	Fermer le tiroir de l'instrument.
14	Appuyer sur « Start » (Début).	Appuyer sur « Start » (Début).

Au terme de la session d'analyse, le **ELITe InGenius** permet aux utilisateurs de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

NOTE!

À la fin de l'analyse, l'échantillon extrait restant dans le **tube d'élution** doit être retiré de l'instrument, bouché, identifié et conservé à -20 ± 10 °C pendant un mois maximum. Éviter de renverser l'échantillon extrait.

NOTE!

À la fin de l'analyse, le **PCR Mix** peut être retiré de l'instrument, bouché et stocké à -20 °C ou à une température plus basse ou peut conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant un maximum de 7 heures (2 sessions d'analyse de 3 heures chacune et durée nécessaire au paramétrage d'une troisième session d'analyse). Mélanger délicatement et centrifuger le contenu pendant 5 secondes avant de commencer la session d'analyse suivante.

NOTE!

À la fin de l'analyse, les étalons **Q - PCR Standard** restants peuvent être retirés de l'instrument, bouchés et conservés à -20 °C ou à une température plus basse. Éviter de renverser les étalons Q - PCR Standard.

NOTE!

Les étalons **Q - PCR Standard** peuvent être utilisés pendant 4 sessions d'analyse distinctes de 2 heures chacune.

NOTE!

À la fin de l'analyse, le **Positive Control** restant peut être retiré de l'instrument, bouché et conservé à -20 °C ou à une température plus basse. Éviter de renverser le Contrôle positif. Le **Negative Control** restant doit être jeté.

NOTE!

Le **Positive Control** peut être utilisé pendant 4 sessions d'analyse distinctes de 3 heures chacune.

NOTE!

À la fin de l'analyse, la **PCR Cassette** (Cassette de PCR) et les autres consommables doivent être éliminés conformément à toutes les réglementations gouvernementales et environnementales. Éviter de renverser les produits de la réaction.

9.3 ÉTAPE 3 - Examen et approbation des résultats

Le **ELITe InGenius** surveille les signaux de fluorescence cibles et de contrôle interne pour chaque réaction et applique automatiquement les paramètres du Assay Protocol (Protocole de test) pour générer des courbes de PCR qui sont ensuite interprétées en résultats.

At the end of the run, the "Results Display" screen is automatically shown. Cet écran présente les résultats et les informations de l'analyse. À partir de cet écran, les résultats peuvent être approuvés et les rapports imprimés ou enregistrés (« Sample Report » [Rapport échantillons] ou « Track Report » [Rapport des positions]). Se reporter au manuel de l'instrument pour plus de détails.

NOTE!

Le **ELITe InGenius** peut être connecté au « Laboratory Information System » (Système de gestion des informations de laboratoire - LIS) qui permet de charger les résultats de la session d'analyse pour les transmettre au centre de données du laboratoire. Se reporter au manuel de l'instrument pour plus de détails.

Le **ELITe InGenius** génère les résultats à l'aide du **BKV ELITe MGB Kit** en exécutant la procédure suivante :

1. Validation de la courbe d'étalonnage,
2. Validation des résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif,
3. validation des résultats des échantillons,
4. rapport des résultats de l'échantillon.

9.3.1 Validation de la courbe d'étalonnage

Le **ELITe InGenius Software** interprète les résultats de la PCR pour la cible des réactions des calibrateurs avec les paramètres du Assay Protocol (Protocole de test) **ELITe STD**. Les valeurs Ct versus la concentration génèrent la courbe d'étalonnage.

Les courbes d'étalonnage, spécifiques au lot de réactifs de PCR, sont enregistrées dans la base de données (Calibration [Étalonnage]). Elles peuvent être visualisées et approuvées par des utilisateurs « Administrator » (Administrateur) ou « Analyst » (Analyste) en suivant les instructions de la GUI.

La courbe d'étalonnage expire **au bout de 60 jours**.

NOTE!

Si la courbe d'étalonnage ne répond pas aux critères d'acceptation, le message « Failed » (Échec) s'affiche dans l'écran « Calibration » (Étalonnage). Dans ce cas, les résultats ne peuvent pas être approuvés et les réactions d'amplification du calibrateur doivent être répétées. De plus, si des échantillons ont été inclus dans l'analyse, ceux-ci ne sont pas quantifiés et doivent également être répétés pour générer des résultats quantitatifs.

9.3.2 Validation des résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif d'amplification

Le **ELITe InGenius software** interprète les résultats de la PCR pour la cible des réactions du Contrôle positif et du Contrôle négatif avec les paramètres des protocoles de test (Assay Protocols) **ELITe_PC** et **ELITe_NC**. Les valeurs Ct résultantes sont converties en concentration et utilisées pour vérifier le système (lots de réactifs et instrument).

Les résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif, spécifiques au lot de réactifs de PCR, sont enregistrés dans la base de données (Controls [Contrôles]). Ils peuvent être visualisés et approuvés par des utilisateurs « Administrator » (Administrateur) ou « Analyst » (Analyste) en suivant les instructions de la GUI.

Les résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif expirent **au bout de 15 jours**.

Le ELITe InGenius Software traite les résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif et génère des Control Charts (Graphiques de contrôle). L'approbation du Contrôle positif est basée sur l'évaluation de la quantité logarithmique obtenue qui doit se situer dans la plage de quantité logarithmique attendue (Graphique PC). Ceci permet de s'assurer que les performances du système sont conformes aux critères d'acceptation. Le deuxième graphique (Graphique L-J) est exclusivement consacré à la surveillance de la tendance du Contrôle positif au cours du temps. Se reporter au manuel de l'instrument pour plus de détails.

NOTE!

si les résultats du Contrôle positif ou du Contrôle négatif ne satisfont pas les critères d'acceptation, le message « Failed » (Échec) s'affiche dans l'écran « Controls » (Contrôles). Dans ce cas, les résultats ne peuvent pas être approuvés et les analyses du Contrôle Positif ou du Contrôle Négatif doivent être répétées.

NOTE!

si le résultat du Contrôle positif ou du Contrôle négatif n'est pas valide et que des échantillons ont été inclus dans la même analyse, les échantillons peuvent être approuvés mais leurs résultats ne sont pas validés. Dans ce cas, le(s) contrôle(s) en échec et les échantillons doivent tous être répétés.

9.3.3 Validation des résultats de l'échantillon

Le logiciel **ELITe InGenius Software** interprète les résultats de la PCR pour la cible (canal **BKV**) et le Contrôle interne (canal **IC**) avec les paramètres des protocoles de test (Assay Protocols) **BKV ELITe_PL_200_100**, **BKV ELITe_U_200_100** ou **BKV ELITe_WB_200_100**. Les valeurs Ct des cibles résultantes sont converties en concentration.

Les résultats sont présentés dans l'écran « Results Display » (Affichage des résultats).

Les résultats de l'échantillon peuvent être approuvés lorsque les trois conditions du tableau ci-dessous sont remplies.

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

Les résultats des échantillons sont automatiquement interprétés par le **ELITe InGenius Software** en utilisant les paramètres du Assay Protocol (Protocole de test).

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

Pour chaque échantillon, le système rapporte une combinaison des messages suivants spécifiant si les ADN de l'agent pathogène sont détectés ou non détectés.

Résultat de l'analyse de l'échantillon	**Interprétation**
BKV:DNA Detected, quantity equal to XXX copies / mL or IU/mL (BKV:ADN détecté, quantité égale à XXX copies/ml ou UI/ml)	**L'ADN du BKV a été détecté** dans l'échantillon dans la plage de mesure de l'analyse ; sa concentration est celle affichée.
BKV:DNA Detected, quantity below LLoQ copies / mL or IU/mL (BKV:ADN détecté, quantité inférieure à LLoQ copies/ml ou UI/ml)	**L'ADN du BKV a été détecté**dans l'échantillon ; sa concentration est inférieure à la limite inférieure de quantification de l'analyse.
BKV:DNA Detected, quantity beyond ULoQ copies / mL or IU/mL (BKV:ADN détecté, quantité supérieure à ULoQ copies/ml ou UI/ml)	**L'ADN du BKV a été détecté**dans l'échantillon ; sa concentration est supérieure à la limite supérieure de quantification de l'analyse.
BKV:DNA Not Detected or below LoD copies / mL or IU/mL (BKV:ADN non détecté ou inférieur à LoD copies/ml ou UI/ml)	**L'ADN du BKV n'a pas été détecté**dans l'échantillon. L'échantillon est négatif pour l'ADN du BKV ou sa concentration est inférieure à la limite de détection de l'analyse.
Invalid-Retest Sample (Non valide - Tester à nouveau l'échantillon)	**Résultat d'analyse non valide**en raison d'un échec du Contrôle Interne (en raison, par exemple, d'une extraction incorrecte ou d'un transfert d'inhibiteurs). Le test doit être répété.

Échantillons rapportés comme « Invalid-Retest Sample » (Non valide - Tester à nouveau l'échantillon) : dans ce cas, l'ADN du Contrôle Interne n'a pas été efficacement détecté, ce qui peut être dû à des problèmes lors des étapes de prélèvement de l'échantillon, d'extraction ou de PCR (par ex. échantillonnage incorrect, dégradation ou perte d'ADN pendant l'extraction ou inhibiteurs dans l'éluat), ce qui peut générer des résultats incorrects.

S'il reste un volume d'éluat suffisant, l'éluat peut être à nouveau testé (pur ou dilué), par une analyse d'amplification en mode « PCR Only » (PCR seulement). Si le deuxième résultat est non valide, l'échantillon doit être à nouveau testé en procédant à l'extraction d'un nouvel échantillon en utilisant le mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR) (se reporter à la section 18 PROBLÈMES ET SOLUTIONS page 58).

Les échantillons rapportés comme « BKV:DNA Not Detected or below "LoD" copies/mL or IU/mL (BKV:ADN non détecté ou inférieur à « LoD » copies/ml ou UI/ml) » sont appropriés pour l'analyse mais il n'a pas été possible de détecter le BKV. Dans ce cas, l'échantillon peut être négatif pour l'ADN du BKV ou l'ADN du BKV est présent à une concentration inférieure à la limite de détection de l'analyse (se reporter à la section 12 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC ELITe InGenius, ELITe BeGenius et MyGenius PRO page 33).

Les échantillons positifs pour l'ADN du BKV à une concentration inférieure à la limite de détection (et à la limite inférieure de quantification) de l'analyse, s'ils sont détectés, sont rapportés comme « BKV: DNA Detected, quantity below "LLoQ" copies/mL or IU/mL » (BKV:ADN détecté, quantité inférieure à « LLoQ » copies/mL ou UI/mL) (se reporter à la section 12 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC ELITe InGenius, ELITe BeGenius et MyGenius PRO page 33).

Les échantillons positifs pour l'ADN du BKV dans la plage de mesure linéaire sont détectés et rapportés comme « BKV:DNA Detected, quantity equal to "XXX" copies/mL or IU/mL » (BKV:ADN détecté, quantité égale à « XXX » copies/mL ou UI/mL) (se reporter à la section 12 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC ELITe InGenius, ELITe BeGenius et MyGenius PRO page 33).

Les échantillons positifs pour l'ADN du BKV qui sont au-dessus de la limite supérieure de quantification sont rapportés comme « BKV: DNA Detected, quantity beyond "ULoQ" copies/mL or IU/mL » (BKV: ADN détecté, quantité supérieure à « ULoQ » copies/mL ou UI/mL) (se reporter à la section 12 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC ELITe InGenius, ELITe BeGenius et MyGenius PRO page 33) et ne sont pas appropriés pour une quantification. Si nécessaire, l'échantillon peut être dilué avant l'extraction ou la PCR pour être testé à nouveau afin de générer des résultats compris dans la plage de mesure linéaire du test.

NOTE!

les résultats obtenus avec ce test doivent être interprétés en association avec l'ensemble des observations cliniques pertinentes et des résultats du laboratoire.

Les résultats de l'échantillon sont stockés dans la base de données et, s'ils sont valides, peuvent être approuvés (Result Display [Affichage des résultats]) par des utilisateurs « Administrator » (Administrateur) ou « Analyst » (Analyste) en suivant les instructions de la GUI. Dans la fenêtre « Result Display » (Affichage des résultats), il est possible d'imprimer et d'enregistrer les résultats de l'analyse des échantillons sous forme de « Sample Report » (Rapport échantillons) et « Track Report » (Rapport des positions).

9.3.4 Rapport des résultats de l'échantillon

Les résultats de l'échantillon sont stockés dans la base de données et les rapports peuvent être exportés sous forme de « Sample Report » (Rapport échantillons) et « Track Report » (Rapport des positions).

Le « Sample Report » (Rapport échantillons) présente les détails des résultats par échantillon sélectionné (SID).

Le « Track Report » (Rapport des positions) présente les détails des résultats par position sélectionnée.

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

10 PROCÉDURE AVEC LE ELITe BeGenius

La procédure d'utilisation du **BKV ELITe MGB Kit** avec le **ELITe BeGenius** comporte trois étapes :

Tableau 8

ÉTAPE 1	Vérification de la préparation du système	
ÉTAPE 2	Paramétrage de la session d'analyse	A) Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR])
		B) Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement])
		C) Analyse d'étalonnage (PCR Only [PCR seulement])
		D) Analyse du Contrôle positif et du Contrôle négatif (PCR Only [PCR seulement])
ÉTAPE 3	Examen et approbation des résultats	1) Validation de la courbe d'étalonnage
		2) Validation des résultats du Positive Control et du Negative Control
		3) Validation des résultats des échantillons
		4) Rapport des résultats de l'échantillon

10.1 ÉTAPE 1 - Vérification de la préparation du système

Avant de commencer la session d'analyse :

- mettre l'instrument **ELITe BeGenius** en marche et se connecter en mode « **CLOSED** » (FERMÉ),
- dans le menu « Calibration » (Étalonnage) de la page Home (Accueil), vérifier que les calibrateurs (**Q - PCR Standard**) sont approuvés et valides (Status [Statut]) pour le lot de **PCR Mix** à utiliser. Si aucun calibrateur valide n'est disponible pour le lot de **PCR Mix**, effectuer un étalonnage comme décrit dans les sections suivantes,
- dans le menu « Controls » (Contrôles) de la page Home (Accueil), vérifier que les contrôles de PCR (**Positive Control, Negative Control**) sont approuvés et valides (Status [Statut]) pour le lot de **PCR Mix** à utiliser. Si aucun contrôle de PCR valide n'est disponible pour le lot de **PCR Mix**, analyser les contrôles de PCR comme décrit dans les sections suivantes,
- sélectionner le type d'analyse, en suivant les instructions de l'interface graphique (GUI) pour le paramétrage de la session d'analyse et utiliser les protocoles de test (Assay Protocols) fournis par EG SpA (se reporter à la section 8 ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES pour les ELITe InGenius, ELITe BeGenius et MyGenius PRO page 10).

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

10.2 ÉTAPE 2 – Paramétrage de la session d'analyse

Le **BKV ELITe MGB Kit** peut être utilisé sur le **ELITe BeGenius** pour effectuer les opérations suivantes :

A. Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR]),

B. Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement]),

C. Analyse d'étalonnage (« PCR Only » [PCR seulement]),

D. Analyse du Contrôle positif et du Contrôle négatif (PCR Only [PCR seulement]).

Tous les paramètres requis sont inclus dans les protocoles de test disponibles sur l'instrument et sont chargés automatiquement lorsque le protocole de test est sélectionné.

NOTE!

Le **ELITe BeGenius** peut être connecté au « Laboratory Information System » (système de gestion des informations de laboratoire - LIS) qui permet de télécharger les informations relatives à la session d'analyse. Se reporter au manuel de l'instrument pour plus de détails.

Avant de paramétrer une analyse :

Décongeler les tubes de **PCR Mix** nécessaires à température ambiante pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer **24 tests**. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré.

NOTE!

Conserver le **PCR Mix** à l'abri de la lumière lors de la décongélation, car ce réactif est photosensible.

Pour paramétrer l'un des quatre types d'analyse, suivre les étapes ci-dessous tout en se reportant à la GUI :

	A. Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR])	B. Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement])
1	**Identifier les échantillons** et, si nécessaire, les décongeler à température ambiante, mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré. Si requis, transférer 200 µL d'échantillon dans un tube Sarstedt de 2 mL préalablement étiqueté. **Décongeler** les **tubes de CPE** nécessaires à température ambiante pendant 30 minutes. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré. Chaque tube permet d'effectuer 12 extractions.	**Décongeler** le **tube d'élution** contenant les acides nucléiques extraits à température ambiante. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver le tube sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré.
2	Sélectionner « **Perform Run** » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil).	Sélectionner « **Perform Run** » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil).
3	Retirer tous les « Racks » de la « Cooler Unit » et les placer sur la table de préparation.	Retirer les « Racks » des « Lane 1, 2 and 3 » (Lane 1, 2 et 3) (L1, L2, L3) de la « Cooler Unit » et les placer sur la table de préparation.
4	Sélectionner le « Run mode » (run mode) : « Extract + PCR » (Extraction + PCR).	Sélectionner le « Run mode » (run mode) : « PCR Only » (PCR seulement).
5	Charger les échantillons dans le « Sample Rack » (Compartiment des échantillons). (Remarque : lorsque des tubes secondaires « 2 mL Tubes » sont chargés, utiliser les adaptateurs bleus pour le « Sample Rack » (Compartiment des échantillons).	Charger les échantillons dans le « Elution Rack » (Rack d'élution).
6	**Insérer le « Sample Rack »** (Compartiment des échantillons) dans la « Cooler Unit », en commençant par la « Lane 5 » (L5). Si nécessaire, insérer le « Sample ID » (ID échantillon) (SID) pour chaque « Position » utilisée. (Si des tubes secondaires sont chargés, les marquer « 2 mL Tube » (Tube de 2 mL). Si les tubes secondaires ne comportent pas de codes-barres, saisir manuellement le « Sample ID » [ID échantillon]).	**Insérer le « Elution Rack »** (Rack d'élution) dans la « Cooler Unit », en commençant par la « Lane 3 » (L3). Si nécessaire, pour chaque « Position », saisir le « Sample ID » (ID échantillon), la « Sample Matrix » (Matrice d'échantillon), le « Extraction kit » (Kit d'extraction) et le « Extracted eluate vol. » (Volume d'éluat extrait).
7	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
8	Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élution de l'extraction) est de 100 µL.	Non applicable
9	Sélectionner le « Assay Protocol » (Protocole de test) dans la colonne « Assay » (Analyse) (se reporter à la section « Échantillons et contrôles »).	Sélectionner le « Assay Protocol » (Protocole de test) dans la colonne « Assay » (Analyse) (se reporter à la section « Échantillons et contrôles »).
10	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
11	En cas de traitement de plus de 12 échantillons, répéter la procédure à partir du point 6.	En cas de traitement de plus de 12 échantillons, répéter la procédure à partir du point 6.
12	Charger les « Elution tubes » (Tubes d'élution) dans le « Elution Rack » (Rack d'élution) (les tubes d'élution peuvent être étiquetés avec un code-barres pour améliorer la traçabilité).	Non applicable
13	Insérer le « Elution Rack » (Rack d'élution) dans la « Cooler Unit », en commençant par la « Lane 3 » (L3). En cas de traitement de plus de 12 échantillons, répéter la procédure en utilisant la « Lane 2 » (L2).	Non applicable

	A. Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR])	B. Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement])
14	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Non applicable
15	Charger le CPE et le PCR Mix dans le « Reagent/ Elution Rack » (Rack de réactifs/d'élution).	Charger le PCR Mix dans le « Reagent/Elution Rack » (Rack de réactifs/d'élution).
16	Insérer le « Reagent/Elution Rack » (Rack de réactifs/ d'élution) dans la « Lane 2 » (L2) si disponible, ou dans la « Lane 1 » (L1) de la « Cooler Unit ». Si nécessaire, pour chaque PCR Mix et/ou CPE, saisir le « S/N » (numéro de série), le « Lot No. » (numéro de lot), la « Exp. Date » (date de péremption) et le « T/ R » (nombre de réactions).	Insérer le « Reagent/Elution Rack » (Rack de réactifs/ d'élution) dans la « Lane 2 » (L2) si disponible, ou dans la « Lane 1 » (L1) de la « Cooler Unit ». Si nécessaire, pour chaque PCR Mix, saisir le « S/N » (numéro de série), le « Lot No. » (numéro de lot), la « Exp. Date » (date de péremption) et le « T/R » (nombre de réactions).
17	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
18	Vérifier les embouts dans le (s) « Tip Rack (s) » (Compartiment(s) à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer le(s) « Tip Rack(s) » si nécessaire.	Vérifier les embouts dans le (s) « Tip Rack (s) » (Compartiment (s) à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer le (s) « Tip Rack (s) » si nécessaire.
19	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
20	Charger le « PCR Rack » (Portoir de PCR) avec la « PCR Cassette » (Cassette de PCR) dans la « Inventory Area » (Zone de Stockage).	Charger le « PCR Rack » (Portoir de PCR) avec la « PCR Cassette » (Cassette de PCR) dans la « Inventory Area » (Zone de Stockage).
21	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
22	Charger le « Extraction Rack » (Rack d'extraction) avec les cartouches d'extraction « ELITe InGenius SP 200 » et les consommables d'extraction requis.	Non applicable
23	Fermer le tiroir de l'instrument.	Fermer le tiroir de l'instrument.
24	Appuyer sur « Start » (Début).	Appuyer sur « Start » (Début).

	C. Analyse d'étalonnage (PCR Only [PCR seulement])	D. Analyse du Contrôle positif et du Contrôle négatif (PCR Only [PCR seulement])
1	**Décongeler** les **tubes de Q-PCR Standard** nécessaires (Cal1 : Q-PCR Standard 10^2, Cal2 : Q-PCR Standard 10^3, Cal3 : Q-PCR Standard 10^4, Cal4 : Q-PCR Standard 10^5) à température ambiante pendant 30 minutes. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré.	**Décongeler les tubes de Contrôle positif** à température ambiante pendant 30 minutes. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré. **Préparer** le **Contrôle négatif** en transférant au minimum 50 µL d'eau de qualité biologie moléculaire dans un « Elution tube » (Tube d'élution) fourni avec le ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil).	Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil).
3	Retirer les « Racks » des « Lane 1, 2 and 3 » (Lane 1, 2 et 3) (L1, L2, L3) de la « Cooler Unit » et les placer sur la table de préparation.	Retirer les « Racks » des « Lane 1, 2 and 3 » (Lane 1, 2 et 3) (L1, L2, L3) de la « Cooler Unit » et les placer sur la table de préparation.
4	Sélectionner le « Run mode » (run mode) : « PCR Only » (PCR seulement).	Sélectionner le « Run mode » (run mode) : « PCR Only » (PCR seulement).
5	**Charger les tubes de Q-PCR Standard** dans le « Elution Rack » (Rack d'élution).	**Charger** les **tubes de Contrôle positif et de Contrôle négatif** dans le « Elution Rack » (Rack d'élution).
6	**Insérer** le « **Elution Rack**» (Rack d'élution) dans la « Cooler Unit », en commençant par la « Lane 3 » (L3). Si nécessaire, pour chaque « Position », saisir le « Reagent name » (Nom du réactif) et le « S/N » (numéro de série), le « Lot No. » (numéro de lot), la « Exp. Date » (date de péremption) et le « T/R » (nombre de réactions).	**Insérer** le « **Elution Rack**» (Rack d'élution) dans la « Cooler Unit », en commençant par la « Lane 3 » (L3). Si nécessaire, pour chaque « Position », saisir le « Reagent name » (Nom du réactif) et le « S/N » (numéro de série), le « Lot No. » (numéro de lot), la « Exp. Date » (date de péremption) et le « T/R » (nombre de réactions).
7	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
8	Sélectionner le **Assay Protocol** (Protocole de test) dans la colonne « Assay » (Analyse) (se reporter à la section « Échantillons et contrôles »).	Sélectionner le **Assay Protocol** (Protocole de test) dans la colonne « Assay » (Analyse) (se reporter à la section « Échantillons et contrôles »).
9	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
10	**Charger** le **PCR Mix** dans le « Reagent/Elution Rack » (Rack de réactifs/d'élution).	**Charger** le **PCR Mix** dans le « Reagent/Elution Rack » (Rack de réactifs/d'élution).
11	**Insérer** le « **Reagent/Elution Rack** » (Rack de réactifs/d'élution) dans la « Lane 2 » (L2) de la « Cooler Unit ». Si nécessaire, pour chaque PCR Mix, saisir le « S/N » (numéro de série), le « Lot No. » (numéro de lot), la « Exp. Date » (date de péremption) et le « T/R » (nombre de réactions).	Insérer le « Reagent/Elution Rack » (Rack de réactifs/d'élution) dans la « Lane 2 » (L2) de la « Cooler Unit ». Si nécessaire, pour chaque PCR Mix, saisir le « S/N » (numéro de série), le « Lot No. » (numéro de lot), la « Exp. Date » (date de péremption) et le « T/R » (nombre de réactions).
12	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
13	Vérifier les embouts dans les « Tip Racks » (Compartiment à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer le(s) « Tip Rack(s) » si nécessaire.	Vérifier les embouts dans les « Tip Racks » (Compartiment à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer le(s) « Tip Rack(s) » si nécessaire.
14	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
15	**Charger** le « **PCR Rack** » (Portoir de PCR) avec la « **PCR Cassette** » (Cassette de PCR) dans la « Inventory Area » (Zone de Stockage).	**Charger** le « **PCR Rack** » (Portoir de PCR) avec la « **PCR Cassette** » (Cassette de PCR) dans la « Inventory Area » (Zone de Stockage).
16	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.

	C. Analyse d'étalonnage (PCR Only [PCR seulement])	D. Analyse du Contrôle positif et du Contrôle négatif (PCR Only [PCR seulement])
17	Fermer le tiroir de l'instrument.	Fermer le tiroir de l'instrument.
18	Appuyer sur « Start » (Début).	Appuyer sur « Start » (Début).

Au terme de la session d'analyse, le **ELITe BeGenius** permet aux utilisateurs de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

NOTE!

À la fin de l'analyse, l'échantillon extrait restant dans le **tube d'élution** doit être retiré de l'instrument, bouché, identifié et conservé à -20 ± 10 °C pendant un mois maximum. Éviter de renverser l'échantillon extrait.

NOTE!

À la fin de l'analyse, le **PCR Mix** peut être retiré de l'instrument, bouché et stocké à -20 °C ou à une température plus basse ou peut conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant un maximum de 7 heures (2 sessions d'analyse de 3 heures chacune et durée nécessaire au paramétrage d'une troisième session d'analyse). Mélanger délicatement et centrifuger le contenu pendant 5 secondes avant de commencer la session d'analyse suivante.

NOTE!

À la fin de l'analyse, les étalons **Q - PCR Standard** restants peuvent être retirés de l'instrument, bouchés et conservés à -20 °C ou à une température plus basse. Éviter de renverser les étalons Q - PCR Standard.

NOTE!

Les étalons **Q - PCR Standard** peuvent être utilisés pendant 4 sessions d'analyse distinctes de 2 heures chacune.

NOTE!

À la fin de l'analyse, le **Positive Control** restant peut être retiré de l'instrument, bouché et conservé à -20 °C ou à une température plus basse. Éviter tout déversement du **Positive Control**. Le **Negative Control** restant doit être jeté.

NOTE!

Le **Positive Control** peut être utilisé pendant 4 sessions d'analyse distinctes de 3 heures chacune.

NOTE!

À la fin de l'analyse, la **PCR Cassette** (Cassette de PCR) et les autres consommables doivent être éliminés conformément à toutes les réglementations gouvernementales et environnementales. Éviter de renverser les produits de la réaction.

10.3 ÉTAPE 3 - Examen et approbation des résultats

Le **ELITe BeGenius** surveille les signaux de fluorescence cibles et de contrôle interne pour chaque réaction et applique automatiquement les paramètres du Assay Protocol (Protocole de test) pour générer des courbes de PCR qui sont ensuite interprétées en résultats.

À la fin de l'analyse, l'écran « Results Display » (Affichage des résultats) s'affiche automatiquement. Cet écran présente les résultats et les informations de l'analyse. À partir de cet écran, les résultats peuvent être approuvés et les rapports imprimés ou enregistrés (« Sample Report » [Rapport échantillons] ou « Track Report » [Rapport des positions]). Se reporter au manuel de l'instrument pour plus de détails.

NOTE!

Le **ELITe BeGenius** peut être connecté au « Laboratory Information System » (Système de gestion des informations de laboratoire - LIS) qui permet de charger les résultats de la session d'analyse pour les transmettre au centre de données du laboratoire. Se reporter au manuel de l'instrument pour plus de détails.

Le **ELITe BeGenius** génère les résultats à l'aide du **BKV ELITe MGB Kit** en exécutant la procédure suivante :

1. Validation de la courbe d'étalonnage,
2. Validation des résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif,
3. validation des résultats des échantillons,
4. rapport des résultats de l'échantillon.

NOTE!

Se reporter au paragraphe correspondant relatif à la **procédure avec le ELITe InGenius** pour connaître les détails.

11 PROCÉDURE MyGenius PRO

La procédure d'utilisation du **BKV ELITe MGB Kit** avec le **MyGenius PRO** comporte trois étapes :

Tableau 9

ÉTAPE 1	Vérification de la préparation du système	
ÉTAPE 2	Paramétrage de la session d'analyse	A) Session d'analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR])
		B) Session d'analyse d'étalonnage (PCR Only [PCR seulement])
		C) Session d'analyse du Contrôle positif et du Contrôle négatif (PCR Only [PCR seulement]).
ÉTAPE 3	Examen et approbation des résultats	1) Validation de la courbe d'étalonnage
		2) Validation des résultats du Positive Control et du Negative Control
		3) Validation des résultats des échantillons
		4) Rapport des résultats de l'échantillon

ÉTAPE 1 - Vérification de la préparation du système

Avant de commencer la session d'analyse :

- allumer MyGenius PRO et se connecter ; l'unité démarre en mode VEILLE.
- dans le menu « Calibration » (Étalonnage) de l'écran Home (Accueil), vérifier que les calibrateurs (**Q - PCR Standard**) sont approuvés et valides (Status [Statut]) pour le lot de**PCR Mix**à utiliser. Si aucun calibrateur valide n'est disponible pour le lot de**PCR Mix**, effectuer un étalonnage comme décrit dans les sections suivantes,
- dans le menu « Controls » (Contrôles) de l'écran Home (Accueil), vérifier que les contrôles de PCR (**Positive Control, Negative Control**) sont approuvés et valides (Status [Statut]) pour le lot de**PCR Mix**à utiliser. Si aucun contrôle de PCR valide n'est disponible pour le lot de**PCR Mix**, analyser les contrôles de PCR comme décrit dans les sections suivantes,
- suivre les instructions de l'interface graphique (GUI) pour le paramétrage de la session d'analyse et utiliser les protocoles de test fournis par EG SpA (se reporter à la section « Échantillons et contrôles »).

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

ÉTAPE 2 – Configuration du flux de travail sur le système

Le **BKV ELITe MGB Kit** peut être utilisé sur le **MyGenius PRO** pour effectuer les opérations suivantes :

A. Session d'analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR]),

B. Session d'analyse d'étalonnage (PCR Only [PCR seulement]),

C. Session d'analyse du Contrôle positif et du Contrôle négatif (PCR Only [PCR seulement]).

Tous les paramètres requis sont inclus dans les protocoles de test disponibles sur l'instrument et sont chargés automatiquement lorsque le protocole de test est sélectionné.

Avant le paramétrage d'une session d'analyse :

Décongeler les tubes de **PCR Mix** nécessaires à température ambiante pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer **24 tests**. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré.

NOTE!
Conserver le **PCR Mix** à l'abri de la lumière lors de la décongélation, car ce réactif est photosensible.

Pour paramétrer l'un des trois types de session d'analyse, suivre les étapes ci-dessous tout en se reportant à la GUI :

	A. Session d'analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR])	**B. Session d'analyse d'étalonnage (PCR Only [PCR seulement])**	**C. Session d'analyse du Contrôle positif et du Contrôle négatif (PCR Only [PCR seulement])**
1	Identifier les échantillons et, si nécessaire, les décongeler à température ambiante, mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré. Si le tube primaire est compatible avec les portoirs MyGenius PRO, insérer le tube contenant les échantillons dans les portoirs ; si cela est impossible**transférer 260 µl d'échantillon dans un tube secondaire préalablement étiqueté (2 ml).** **Décongeler**les**tubes**d'**IC MAXI**nécessaires à température ambiante pendant 30 minutes. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes. Chaque tube permet d'effectuer 72 tests.	**Décongeler**les**tubes de Q-PCR Standard**nécessaires (Cal1 : Q-PCR Standard 102, Cal2 : Q-PCR Standard 103, Cal3 : Q-PCR Standard 104, Cal4 : Q-PCR Standard 105) à température ambiante pendant 30 minutes. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré.	**Décongeler les tubes de Contrôle positif**à température ambiante pendant 30 minutes. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré. Centrifuger les**tubesdeContrôlenégatif**pendant 5 secondes.
2	Si l'instrument est connecté au LIS, les codes-barres des échantillons sont automatiquement lus et reconnus par l'instrument MyGenius PRO lorsqu'ils sont placés dans la zone des échantillons. Si l'instrument n'est pas connecté au LIS, assigner manuellement les échantillons en utilisant la fonction**ASSIGN TEST** (Assigner test) ou**ASSIGN SAMPLE** (Assigner échantillon) dans la page « Sample List » (Liste des échantillons) de l'interface graphique, avant de les charger dans l'instrument. Ces fonctions permettent également d'attribuer le protocole de test approprié à chaque échantillon.	Charger le PCR-Mix et les tubes de Q-PCR Standard dans le carrousel à réactifs réfrigéré.	Charger le PCR-Mix et les tubes dede Contrôle positif et de Contrôle négatif dans le carrousel à réactifs réfrigéré.

	A. Session d'analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR])	B. Session d'analyse d'étalonnage (PCR Only [PCR seulement])	C. Session d'analyse du Contrôle positif et du Contrôle négatif (PCR Only [PCR seulement])
3	En mode**VEILLE**, vérifier qu'il y a suffisamment de consommables pour effectuer le test et que les niveaux de déchets solides et liquides sont adéquats pour le fonctionnement de l'instrument. Si nécessaire, charger les consommables requis dans les tiroirs appropriés et vider le bac à déchets et le réservoir de liquide. Pour connaître les procédures de chargement détaillées, consulter le manuel d'utilisation de l'instrument.	En mode**VEILLE**, vérifier qu'il y a suffisamment de consommables pour effectuer le test et que les niveaux de déchets solides et liquides sont adéquats pour le fonctionnement de l'instrument. Si nécessaire, charger les consommables requis dans les tiroirs appropriés et vider le bac à déchets et le réservoir de liquide. Pour connaître les procédures de chargement détaillées, consulter le manuel d'utilisation de l'instrument.	En mode**VEILLE**, vérifier qu'il y a suffisamment de consommables pour effectuer le test et que les niveaux de déchets solides et liquides sont adéquats pour le fonctionnement de l'instrument. Si nécessaire, charger les consommables requis dans les tiroirs appropriés et vider le bac à déchets et le réservoir de liquide. Pour connaître les procédures de chargement détaillées, consulter le manuel d'utilisation de l'instrument.
4	Appuyer sur Start (Début) dans la page Home (Accueil) et attendre que l'instrument passe à l'état « Préparation » puis « Opération ».	Appuyer sur Start (Début) dans la page Home (Accueil) et attendre que l'instrument passe à l'état « Préparation » puis « Opération ».	Appuyer sur Start (Début) dans la page Home (Accueil) et attendre que l'instrument passe à l'état « Préparation » puis « Opération ».
5	Charger le PCR Mix dans le carrousel à réactifs réfrigéré.	Sélectionner le bouton « Calibration » (Étalonnage) dans l'écran « Home » (Accueil)	Sélectionner le bouton « Controls » (Contrôles) dans l'écran « Home » (Accueil)
6	Réserver l'ouverture de la porte de la zone de l'échantillonneur automatique et charger les échantillons et les tubes IC MAXI.	Sélectionner dans la page « Calibration » (Étalonnage) le tube de Q-PCR Standard chargé à l'étape 2, puis appuyer sur « Order » (Commander).	Sélectionner dans la page « Control » (Contrôle) le Positive Control et Negative Control chargé à l'étape 2, puis appuyer sur « Order » (Commander).
7	Fermer la porte de l'échantillonneur automatique pour lancer la session d'analyse.		

À la fin de la session d'analyse, les étalons**Q - PCR Standard**restants peuvent être retirés de l'instrument, bouchés et conservés à -20 °C ou à une température plus basse. Éviter de renverser les étalons Q - PCR Standard.

NOTE!

À la fin de la session d'analyse, le**PCRMix**peut être retiré de l'instrument, bouché et stocké à -20 °C ou à une température plus basse, ou il peut être conservé à bord dans le carrousel à réactifs pendant 7 heures maximum.

Dès l'obtention d'un résultat, l'instrument**MyGenius PRO**permet aux utilisateurs de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, ainsi que d'enregistrer le rapport final.

NOTE!

Le**Q- PCRStandard**peut être utilisé pour 4 étalonnages en les laissant à bord de l'instrument pendant un maximum de 2 heures pour chaque étalonnage.

NOTE!

À la fin de la session d'analyse, le**Positive Control**restant peut être retiré de l'instrument, bouché et conservé à -20 °C ou à une température plus basse. Éviter de renverser le**Positive Control**. Le**Negative Control**restant doit être jeté.

NOTE!

Le**Positive Control**peut être utilisé pour 4 étalonnages en les laissant à bord de l'instrument pendant un maximum de 3 heures pour chaque étalonnage.

NOTE!

Si nécessaire ou lorsque l'instrument l'exige, retirer du tiroir de l'instrument la**PCR Cassette**et les autres consommables qui doivent être éliminés conformément à toutes les réglementations gouvernementales et environnementales. Éviter de renverser les produits de la réaction.

NOTE!

MyGenius PROpeut être connecté au « Laboratory Information System » (système de gestion des informations de laboratoire - LIS) qui permet de télécharger les informations relatives à la session d'analyse. Se reporter au manuel de l'instrument pour plus de détails.

ÉTAPE 3 - Examen et approbation des résultats

L'instrument **MyGenius PRO** surveille les signaux de fluorescence de la cible et du Contrôle interne pour chaque réaction et applique automatiquement les paramètres du protocole de test (Assay Protocol) pour générer des courbes de PCR qui sont ensuite interprétées en résultats.

Au terme de l'analyse de chaque échantillon, les résultats peuvent être consultés dans l'écran « Results » (Résultats), qui affiche les résultats et les informations relatives aux échantillons. À partir de cet écran, il est possible d'approuver les résultats et d'enregistrer les rapports. Voir le manuel de l'instrument pour plus de détails.

MyGenius PRO génère les résultats à l'aide du **BKV ELITe MGB Kit** en exécutant la procédure suivante :

1. Validation de la courbe d'étalonnage,
2. Validation des résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif,
3. validation des résultats des échantillons,
4. rapport des résultats de l'échantillon.

Validation de la courbe d'étalonnage

Le logiciel **MyGenius PRO software** interprète les résultats de la PCR pour la cible des réactions des calibrateurs avec les paramètres du protocole de test (Assay Protocol) **BKV ELITe_My_STD**. Les valeurs Ct versus la concentration génèrent la courbe d'étalonnage.

Les courbes d'étalonnage, spécifiques au lot de réactifs de PCR, sont enregistrées dans la base de données (Calibrations [Étalonnages]). Elles peuvent être visualisées et approuvées par l'utilisateur, en sélectionnant l'étalonnage d'intérêt et la section « View chart » (Afficher graphique).

La courbe d'étalonnage expire **au bout de 60 jours**.

NOTE!

si la courbe d'étalonnage ne répond pas aux critères d'acceptation, le message « Error » (Erreur) s'affiche dans l'écran « Calibrations » (Étalonnages). Dans ce cas, les résultats ne peuvent pas être approuvés et les réactions d'amplification des calibrateurs doivent être répétées. De plus, si des échantillons ont été inclus dans la session d'analyse, ils ne sont pas quantifiés : dans ce cas, après réitération de l'étalonnage, tous les résultats doivent être interprétés et approuvés (voir la section dédiée aux résultats des échantillons).

Validation des résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif d'amplification

Le logiciel **MyGenius PRO Software** interprète les résultats de la PCR pour la cible du Contrôle positif et le Contrôle interne (canal **IC**), et pour la cible des réactions du Contrôle négatif, avec les paramètres des protocoles de test (Assay Protocols) **BKV ELITe_My_PC** et **BKV ELITe_My_NC**. Les valeurs Ct résultantes sont converties en concentration et utilisées pour vérifier le système (lots de réactifs et instrument).

Les résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif, spécifiques au lot de réactifs de PCR, sont enregistrés dans la base de données (Controls [Contrôles]). Ils peuvent être visualisés et approuvés par l'utilisateur, en sélectionnant le contrôle d'intérêt et la section « View chart » (Afficher graphique).

Les résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif expirent **au bout de 15 jours**.

Le logiciel **MyGenius PRO Software** traite les résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif et génère des Control Charts (Graphiques de contrôle). Les résultats sont analysés par le logiciel pour s'assurer que les performances du système sont conformes aux critères d'acceptation, indiqués dans les tracés des graphiques de contrôle. Se reporter au manuel de l'instrument pour plus de détails.

NOTE!

si les résultats du Contrôle positif ou du Contrôle négatif ne satisfont pas les critères d'acceptation, le message « Error » (Erreur) s'affiche sur l'écran « Controls » (Contrôles). Dans ce cas, les résultats ne peuvent pas être approuvés et les analyses du Contrôle Positif ou du Contrôle Négatif doivent être répétées.

NOTE!

si le résultat du Contrôle positif ou du Contrôle négatif n'est pas valide et que des échantillons ont été inclus dans la même session d'analyse, les échantillons ne peuvent pas être approuvés. Dans ce cas, après réitération de l'analyse des contrôles, tous les résultats doivent être interprétés et approuvés (voir la section dédiée aux résultats des échantillons).

Validation des résultats de l'échantillon

Le logiciel **MyGenius PRO Software** interprète les résultats de la PCR pour la cible (canal **BKV**) et le Contrôle interne (canal **IC**) avec les paramètres des protocoles de test (Assay Protocols) **BKV ELITe_My_U_IU_200_100 et BKV ELITe_My_U_cmL_200_100, BKV ELITe_My_PL_IU_200_100 et BKV ELITe_My_PL_cmL_200_100**. Les valeurs Ct des cibles résultantes sont converties en concentration.

Les résultats sont présentés dans la section « Results » (Résultats).

Les résultats de l'échantillon peuvent être approuvés lorsque les trois conditions du tableau ci-dessous sont remplies.

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

Les résultats des échantillons sont automatiquement interprétés par le logiciel **MyGenius PRO Software** en utilisant des paramètres de protocole de test (Assay Protocol), si les résultats de l'étalonnage et des contrôles correspondants sont approuvés. En l'absence d'étalonnages et de contrôles valides et approuvés lors de l'obtention de résultats d'échantillons, ces dits échantillons ne peuvent pas être interprétés et approuvés : dans ce cas, les étalonnages et les contrôles doivent impérativement être approuvés, puis chaque échantillon doit être interprété dans la section « sample list » (liste des échantillons) et approuvés dans la section « Results » (Résultats) en utilisant les boutons dédiés.

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

Pour chaque échantillon, le système rapporte une combinaison des messages suivants spécifiant si les ADN de l'agent pathogène sont détectés ou non détectés.

Résultat de l'analyse de l'échantillon	**Interprétation**
BKV:DNA DETECTED, QUANTITY EQUAL TO XXX COPIES/ML OR IU/ML (BKV:ADN DÉTECTÉ, QUANTITÉ ÉGALE À XXX COPIES/ML OU UI/ML)	**L'ADN du BKV a été détecté** dans l'échantillon dans la plage de mesure de l'analyse ; sa concentration est celle affichée.
BKV:DNA DETECTED, QUANTITY BELOW "LLOQ" COPIES/ML OR IU/ML (BKV:ADN DÉTECTÉ, QUANTITÉ INFÉRIEURE À « LLOQ » COPIES/ML OU UI/ML)	**L'ADN du BKV a été détecté**dans l'échantillon ; sa concentration est inférieure à la limite inférieure de quantification de l'analyse.

Résultat de l'analyse de l'échantillon	Interprétation
BKV:DNA DETECTED, QUANTITY BEYOND "ULOQ" COPIES/ML OR IU/ML (BKV:ADN DÉTECTÉ, QUANTITÉ SUPÉRIEURE À « ULOQ » COPIES/ML OU UI/ML)	**L'ADN du BKV a été détecté**dans l'échantillon ; sa concentration est supérieure à la limite supérieure de quantification de l'analyse.
BKV:DNA NOT DETECTED OR BELOW "LOD" COPIES/ML OR IU/ML (BKV:ADN NON DÉTECTÉ OU INFÉRIEUR À « LOD » COPIES/ML OU UI/ML)	**L'ADN du BKV n'a pas été détecté**dans l'échantillon. L'échantillon est négatif pour l'ADN du BKV ou sa concentration est inférieure à la limite de détection de l'analyse.
INVALID - RETEST SAMPLE (NON VALIDE - TESTER À NOUVEAU L'ÉCHANTILLON).	**Résultat d'analyse non valide**en raison d'un échec du Contrôle Interne (en raison, par exemple, d'une extraction incorrecte ou d'un transfert d'inhibiteurs). Le test doit être répété.

Échantillons rapportés comme « INVALID - RETEST SAMPLE » (NON VALIDE - TESTER À NOUVEAU L'ÉCHANTILLON) : dans ce cas, l'ADN du Contrôle interne n'a pas été efficacement détecté, ce qui peut être dû à des problèmes lors des étapes de prélèvement de l'échantillon, d'extraction ou de PCR (par ex. prélèvement incorrect de l'échantillon, dégradation ou perte d'ADN pendant l'extraction ou inhibiteurs dans l'éluat) pouvant produire des résultats incorrects. Dans ce cas, l'échantillon doit être testé à nouveau, en commençant par l'extraction d'un nouvel échantillon.

Les échantillons rapportés comme « BKV:DNA NOT DETECTED OR BELOW "LOD" COPIES/ML OR IU/ML » (BKV:ADN NON DÉTECTÉ OU INFÉRIEUR À « LOD » COPIES/ML OU UI/ML) sont appropriés pour l'analyse mais le BKV n'a pas été détecté. Dans ce cas, l'échantillon peut être négatif pour l'ADN du BKV ou l'ADN du BKV est présent à une concentration inférieure à la limite de détection de l'analyse (se reporter à la section 12 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC ELITe InGenius, ELITe BeGenius et MyGenius PRO page 33).

Les échantillons positifs pour l'ADN du BKV à une concentration inférieure à la limite de détection (et à la limite inférieure de quantification) de l'analyse, s'ils sont détectés, sont rapportés comme « BKV: DNA DETECTED, QUANTITY BELOW "LLOQ" COPIES/ML OR IU/ML » (BKV: ADN DÉTECTÉ, QUANTITÉ INFÉRIEURE À « LLOQ » COPIES/ML OU UI/ML) (se reporter à la section 12 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC ELITe InGenius, ELITe BeGenius et MyGenius PRO page 33).

Les échantillons positifs pour l'ADN du BKV dans la plage de mesure linéaire sont détectés et rapportés comme « BKV: DNA DETECTED, QUANTITY EQUAL TO XXX COPIES/ML OR IU/ML » (BKV: ADN DÉTECTÉ, QUANTITÉ ÉGALE À « XXX » COPIES/ML OU UI/ML) (se reporter à la section 12 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC ELITe InGenius, ELITe BeGenius et MyGenius PRO page 33).

Les échantillons positifs pour l'ADN du BKV qui sont au-dessus de la limite supérieure de quantification sont rapportés comme « BKV:DNA DETECTED, QUANTITY BEYOND "ULOQ" COPIES/ML OR IU/ML » (BKV:ADN DÉTECTÉ, QUANTITÉ SUPÉRIEURE À « ULOQ » COPIES/ML OU UI/ML) (se reporter à la section 12 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC ELITe InGenius, ELITe BeGenius et MyGenius PRO page 33) et ne sont pas appropriés pour une quantification. Si nécessaire, l'échantillon peut être dilué avant l'extraction ou la PCR pour être testé à nouveau afin de générer des résultats compris dans la plage de mesure linéaire du test.

NOTE!

les résultats obtenus avec ce test doivent être interprétés en association avec l'ensemble des observations cliniques pertinentes et des résultats du laboratoire.

Les résultats de l'échantillon sont stockés dans la base de données et, s'ils sont valides, peuvent être approuvés (Result Display [Affichage des résultats]) par des utilisateurs « Administrator » (Administrateur) ou « Analyst » (Analyste) en suivant les instructions de la GUI. Dans la fenêtre « Result Display » (Affichage des résultats), il est possible d'imprimer et d'enregistrer les résultats de l'analyse des échantillons sous forme de « Sample Report » (Rapport échantillons) et « Track Report » (Rapport des positions).

Rapport des résultats des échantillons

Les résultats des échantillons sont stockés dans la base de données et les rapports peuvent être exportés sous forme de « Summary Report » (Rapport résumé) et de « Details Report » (Rapport détaillé).

Le « Details Report » (Rapport détaillé) présente les détails des résultats pour chaque échantillon sélectionné (SID).

Le « Summary Report » (Rapport résumé) présente les résultats d'interprétation pour tous les échantillons sélectionnés (SID).

Le « Details Report » (Rapport détaillé) et le « Summary Report » (Rapport résumé) peuvent être imprimés et signés par le personnel agréé.

12 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC ELITe InGenius, ELITe BeGenius et MyGenius PRO

12.1 Limite de détection (LoD)

La limite de détection (LoD) du test en association avec les matrices de plasma prélevé sur EDTA, d'urine et de sang total prélevé sur EDTA a été déterminée sur les instruments ELITe InGenius ou ELITe BeGenius en testant un panel de matrices négatives pour le BKV dopées avec un matériel de référence du BKV (1er étalon international de l'OMS pour l'ADN du virus BK, NIBSC réf. 14/212, Royaume-Uni). Une analyse de régression des probits a été réalisée sur les résultats, et la LoD a été estimée comme la concentration correspondant à une probabilité de résultat positif de 95 %.

Les résultats des deux matrices sont présentés dans les tableaux suivants.

Tableau 10 Limite de détection avec le ELITe InGenius (UI/mL)

Matrice	LoD	Intervalle de confiance à 95 %	
		limite inférieure	limite supérieure
urine	142 UI/mL	110 UI/mL	222 UI/mL
plasma	215 UI/mL	168 UI/mL	319 UI/mL
sang total	538 UI/mL	337 UI/mL	1128 UI/mL

La sensibilité analytique, exprimée en copies/mL pour chaque matrice, est calculée en appliquant le facteur de conversion spécifique indiqué au paragraphe 12.9 Facteur de conversion en unités internationales page 40

La sensibilité analytique, en copies/mL, est indiquée ci-dessous.

Tableau 11 Limite de détection avec le ELITe InGenius (copies/mL)

Matrice	LoD	Intervalle de confiance à 95 %	
		limite inférieure	limite supérieure
urine	89 copies/mL	69 copies/mL	139 copies/mL
plasma	165 copies/mL	129 copies/mL	245 copies/mL
sang total	117 copies/mL	73 copies/mL	245 copies/mL

La valeur de LoD calculée a été vérifiée pour chaque matrice en testant, sur les instruments ELITe InGenius et ELITe BeGenius, un pool de chaque matrice dopé avec un matériel de référence certifié de BKV à la concentration revendiquée.

Les résultats obtenus ont confirmé la concentration revendiquée pour la cible du BKV ELITe MGB Kit sur les ELITe InGenius et ELITe BeGenius pour chaque matrice.

Les valeurs LoD calculées sur l'instrument ELITe InGenius avec les matrices d'urine et de plasma sont également valides pour l'instrument MyGenius PRO.

12.2 Inclusivité : efficacité de détection de différentes souches ou isolats

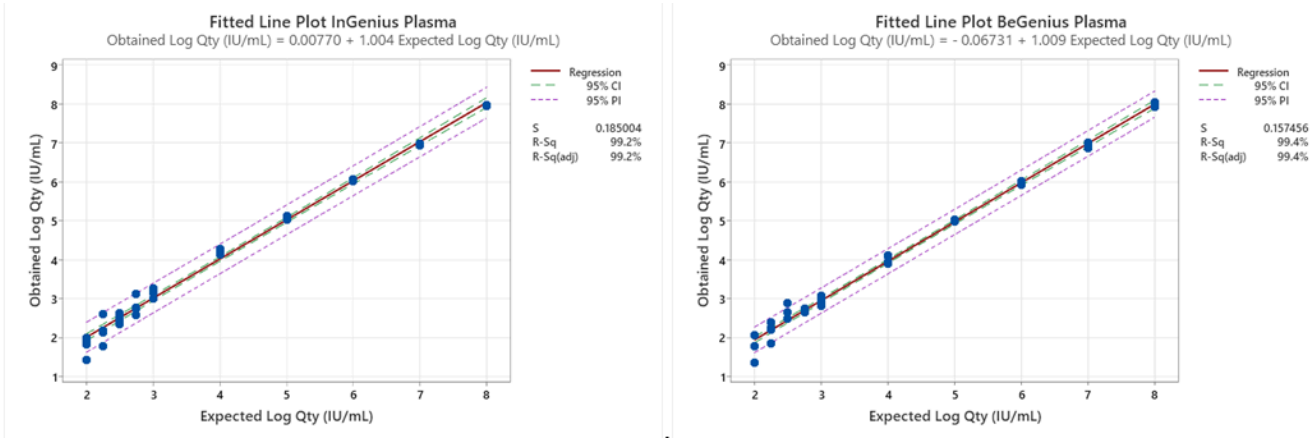
L'inclusivité du test, en tant qu'efficacité de détection de différentes souches ou isolats du polyomavirus BK, a été évaluée par une analyse *in silico*. L'analyse a montré une conservation des séquences et une absence de mutations significatives. En conséquence, on s'attend à ce que la plupart des souches ou isolats soient efficacement détectés.

12.3 Plage de mesure linéaire et limites de quantification

La plage de mesure linéaire du test a été déterminée en association avec les matrices de plasma prélevé sur EDTA, d'urine et de sang total prélevé sur EDTA sur les **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** en utilisant un panel de dilutions d'un matériel de référence du BKV (Liquide de culture du virus BKV, inactivé à la chaleur, ZeptoMetrix) dans une matrice négative pour l'ADN du BKV.

Les résultats de chaque matrice sont présentés aux paragraphes suivants.

Plasma :



La plage de mesure linéaire, exprimée en copies/mL pour le plasma prélevé sur EDTA, est calculée en appliquant le facteur de conversion spécifique indiqué au paragraphe 12.9 . page 40

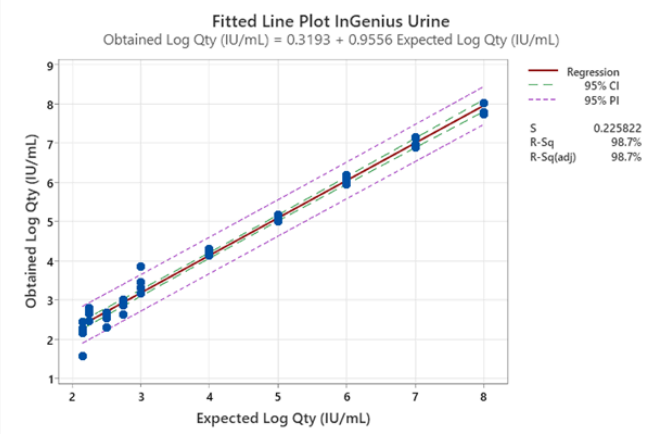
Les résultats finaux sont résumés dans le tableau suivant.

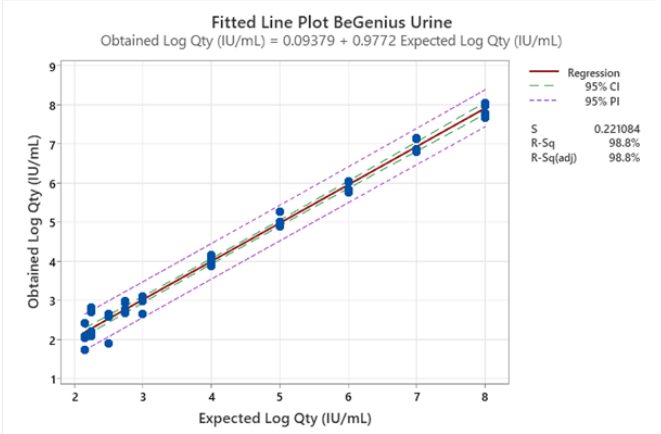
Tableau 12 Plage de mesure linéaire pour les échantillons de plasma avec les instruments ELITe InGenius et ELITe BeGenius

Unité	Limite inférieure	Limite supérieure
UI/ml	215	130 000 000
copies/ml	165	100 000 000

La plage de mesure linéaire déterminée pour les instruments ELITe InGenius et ELITe BeGenius avec la matrice de plasma est également valide pour l'instrument MyGenius PRO.

Urine :





La plage de mesure linéaire, exprimée en copies/mL pour l'urine, est calculée en appliquant le facteur de conversion spécifique indiqué au paragraphe 12.9 Facteur de conversion en unités internationales page 40

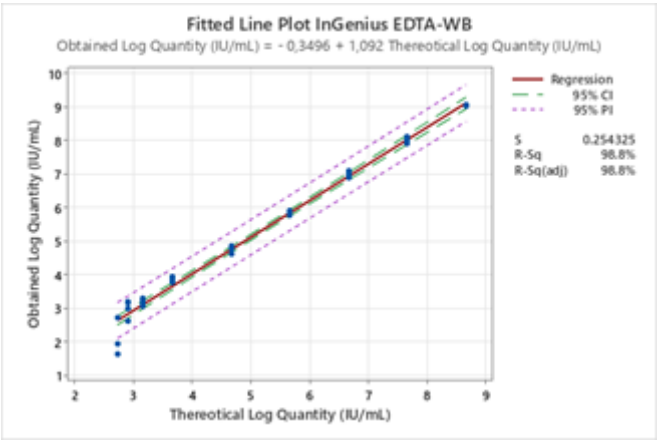
Les résultats finaux sont résumés dans le tableau suivant.

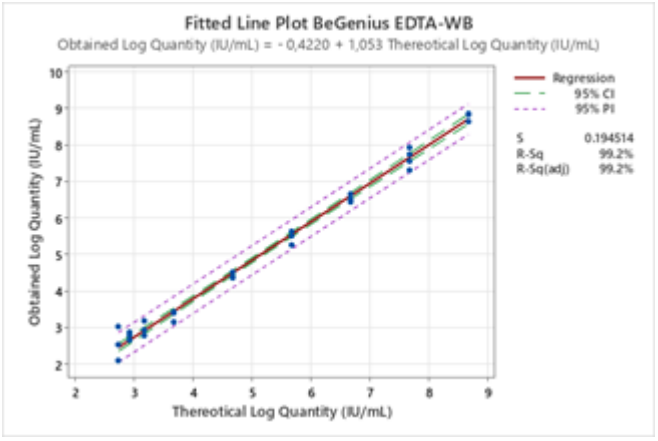
Tableau 13 Plage de mesure linéaire pour les échantillons d'urine avec les ELITe InGenius et ELITe BeGenius

Unité	Limite inférieure	Limite supérieure
UI/ml	142	160 000 000
copies/ml	89	100 000 000

La plage de mesure linéaire déterminée pour les instruments ELITe InGenius et ELITe BeGenius avec la matrice d'urine est également valide pour l'instrument MyGenius PRO.

Sang total :





La plage de mesure linéaire, exprimée en UI/mL pour le sang total-EDTA, est calculée en appliquant le facteur de conversion spécifique indiqué au paragraphe 12.9 Facteur de conversion en unités internationales page 40

Les résultats finaux sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 14 Plage de mesure linéaire pour des échantillons de sang total-EDTA avec les instruments ELITe InGenius et ELITe BeGenius

Unité	Limite inférieure	Limite supérieure
UI/mL	538	460 000 000
copies/mL	117	100 000 000

12.4 Incertitude de la courbe d'étalonnage

La valeur d'incertitude de la courbe d'étalonnage a été calculée en combinant les erreurs aléatoires (EC) de toutes les quantifications de niveau et en multipliant le résultat par le facteur de couverture k = 2 (incertitude combinée élargie). Celle-ci est de 0,2146 Log copies/réaction.

Tableau 15

Niveaux de la courbe d'étalonnage	Théorique	Mesuré	Biais	EC	Incertitude combinée élargie
	Log copies/ réaction	Log copies/ réaction			
BKV Q - PCR Standard 10^5	5,0000	4,9845	0,0155	0,0417	0,2146
BKV Q - PCR Standard 10^4	4,0000	4,0022	-0,0022	0,0349	
BKV Q - PCR Standard 10^3	3,0000	3,0051	-0,0051	0,0500	
BKV Q - PCR Standard 10^2	2,0000	2,0471	-0,0471	0,0778	

12.5 Organismes potentiellement interférents : réactivité croisée

La réactivité croisée potentielle avec d'autres organismes non souhaitables du produit BKV ELITe MGB Kit a été évaluée par une analyse *in silico* des séquences disponibles dans la base de données de nucléotides ENA de l'EBI. L'analyse a montré une absence d'homologie de séquence significative avec d'autres organismes non souhaitables (virus, bactéries et champignons). On ne s'attend donc à aucune réactivité croisée ou interférence.

12.6 Substances potentiellement interférentes : inhibition

L'inhibition potentielle du test exercée par des substances interférentes (endogènes et exogènes) qui pourraient être observées dans des échantillons cliniques a été évaluée pour le test par l'analyse d'un panel de substances à une concentration pertinente dans des échantillons positifs pour le BKV.

Les résultats de chaque matrice sont présentés dans les tableaux suivants.

Tableau 16 Plasma

Substance	Pos./Rép.	Résultat
Azithromycine	5/5	Aucune interférence
Ganciclovir	5/5	Aucune interférence
Ribavirine	5/5	Aucune interférence

Tableau 16 Plasma (continued)

Substance	Pos./Rép.	Résultat
Abacavir	5/5	Aucune interférence
Cidofovir	5/5	Aucune interférence
Cyclosporine A	5/5	Aucune interférence
Bilirubine	5/5	Aucune interférence
EDTA	5/5	Aucune interférence
Héparine	5/5	Aucune interférence

Les substances testées n'entraînent aucune interférence avec l'amplification du BKV ou du Contrôle interne.

Tableau 17 Urine

Substance	Pos./rép.	Résultat
Azithromycine	5/5	Aucune interférence
Bilirubine	5/5	Aucune interférence
Sang total	5/5	Aucune interférence
Chlorhydrate de phénazopyridine	5/5	Aucune interférence

Les substances testées n'entraînent aucune interférence avec l'amplification du BKV ou du Contrôle interne.

Tableau 18 Sang total

Substance	Pos./rép.	Résultat
Sang hémolytique, concentration élevée	5/5	Aucune interférence
Sang hémolytique, concentration moyenne	5/5	Aucune interférence
Sang hémolytique, faible concentration	5/5	Aucune interférence
Triglycérides	5/5	Aucune interférence
Bilirubine	5/5	Aucune interférence
Héparine	5/5	Aucune interférence
Ganciclovir	5/5	Aucune interférence
Cidofovir	5/5	Aucune interférence
Ribavirine	5/5	Aucune interférence
Azithromycine	5/5	Aucune interférence
Vancomycine	5/5	Aucune interférence
Amoxicilline	5/5	Aucune interférence
Fluconazole	5/5	Aucune interférence
Hydrocortisone	5/5	Aucune interférence
Cyclosporine A	5/5	Aucune interférence

Les substances testées n'entraînent aucune interférence avec l'amplification du BKV ou du Contrôle interne.

12.7 Répétabilité

La répétabilité intra-session et inter-sessions du test a été évaluée sur les ELITe InGenius et ELITe BeGenius par l'analyse d'un panel d'échantillons de plasma prélevé sur EDTA, incluant un échantillon négatif et deux échantillons dopés avec un matériel de référence certifié du BKV (1er étalon international de l'OMS pour l'ADN du virus BK, NIBSC code 14/212, Royaume-Uni).

Un exemple des résultats de la répétabilité intra-session (sur un seul jour) est présenté dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 19 Répétabilité intra-session avec le ELITe InGenius

Échantillon	BKV				
	N	Ct moyen	EC	% CV	% Concordance
Négatif	8	-	-	-	100 %
3 x la LoD	8	36,66	0,45	0,82	100 %
10 x la LoD	8	34,88	0,56	1,33	100 %

Tableau 20 Répétabilité intra-session avec le ELITe BeGenius

Échantillon	BKV				
	N	Ct moyen	EC	% CV	% Concordance
Négatif	8	-	-	-	100 %
3 x la LoD	8	37,09	0,52	1,40	100 %
10 x la LoD	8	35,45	0,31	0,88	100 %

Un exemple des résultats de la répétabilité inter-sessions est présenté dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 21 Répétabilité inter-sessions avec le ELITe InGenius

Échantillon	BKV- Jours 1-2				
	N	Ct moyen	EC Ct	% CV Ct	% Concordance
Négatif	16	-	-	-	100 %
3 x la LoD	16	36,36	0,52	1,43	100 %
10 x la LoD	16	34,40	0,68	1,96	100 %

Tableau 22 Répétabilité inter-sessions avec le ELITe BeGenius

Échantillon	BKV- Jours 1-2				
	N	Ct moyen	EC Ct	% CV Ct	% Concordance
Négatif	16	-	-	-	100 %
3 x la LoD	16	36,68	0,71	1,94	100 %
10 x la LoD	16	34,98	0,55	1,57	100 %

Dans le test de répétabilité, le BKV ELITe MGB Kit a détecté tous les échantillons comme attendu et a montré une variabilité maximale des valeurs Ct de la cible (avec le % CV) inférieure à 5 %.

12.8 Reproductibilité

La reproductibilité du test a été évaluée sur les ELITe InGenius et ELITe BeGenius par l'analyse d'un panel d'échantillons de plasma prélevé sur EDTA négatifs ou dopés avec le BKV (1er étalon international de l'OMS pour l'ADN du virus BK, NIBSC code 14/212, Royaume-Uni).

Un résumé de la reproductibilité inter-instruments (sur deux instruments) est présenté dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 23 Reproductibilité inter-instruments avec le ELITe InGenius

Échantillon	BKV				
	N	Ct moyen	EC	% CV	% Concordance
Négatif	8	-	-	-	100 %
3 x la LoD	8	36,72	0,30	0,82	100 %
10 x la LoD	8	30,89	0,41	1,33	100 %

Tableau 24 Reproductibilité inter-instruments avec le ELITe BeGenius

Échantillon	BKV				
	N	Ct moyen	EC	% CV	% Concordance
Négatif	8	-	-	-	100 %
3 x la LoD	8	36,87	0,58	1,56	100 %
10 x la LoD	8	34,86	0,25	0,72	100 %

Un résumé de la reproductibilité inter-lots (sur deux lots) est présenté dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 25 Reproductibilité inter-lots avec le ELITe InGenius

Échantillon	BKV				
	N	Ct moyen	EC	% CV	% Concordance
Négatif	8	-	-	-	100 %
3 x la LoD	8	36,94	0,36	0,82	100 %
10 x la LoD	8	35,07	0,28	1,33	100 %

Tableau 26 Reproductibilité inter-lots avec le ELITe BeGenius

Échantillon	BKV				
	N	Ct moyen	EC	% CV	% Concordance
Négatif	8	-	-	-	100 %
3 x la LoD	8	36,81	0,66	1,56	100 %
10 x la LoD	8	35,01	0,41	0,72	100 %

Dans le test de reproductibilité, le BKV ELITe MGB Kit a détecté tous les échantillons comme attendu et a montré une variabilité maximale des valeurs Ct de la cible (avec le % CV) inférieure à 5 %.

12.9 Facteur de conversion en unités internationales

Le facteur de conversion pour indiquer les résultats quantitatifs en unités internationales/mL à partir d'une valeur en copies/mL a été calculé, pour chaque matrice, en utilisant le matériel de référence certifié et étalonné « 1er étalon international de l'OMS pour l'ADN du virus BK » (NIBSC, code 14/212, Royaume-Uni).

Les résultats de chaque matrice sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 27 Facteur de conversion en unités internationales

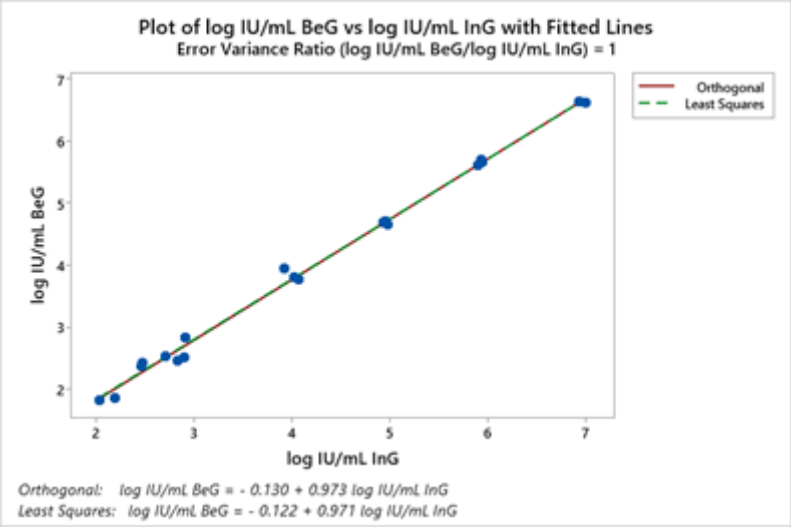
Matrice	Fc (UI/copies)
Plasma	1,3
Urine	1,6
Sang total	4,6

Les facteurs de conversion en unités internationales calculés pour l'instrument ELITe InGenius et les matrices d'urine et de plasma sont également valides pour l'instrument MyGenius PRO.

Le facteur de conversion pour indiquer les résultats quantitatifs en unités internationales/mL à partir d'une valeur en copies/mL a été vérifié pour chaque matrice sur les instruments **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** en utilisant le matériel de référence certifié et étalonné (1er étalon international de l'OMS, NIBSC). Les résultats obtenus ont été analysés par une régression orthogonale et linéaire afin de calculer la corrélation.

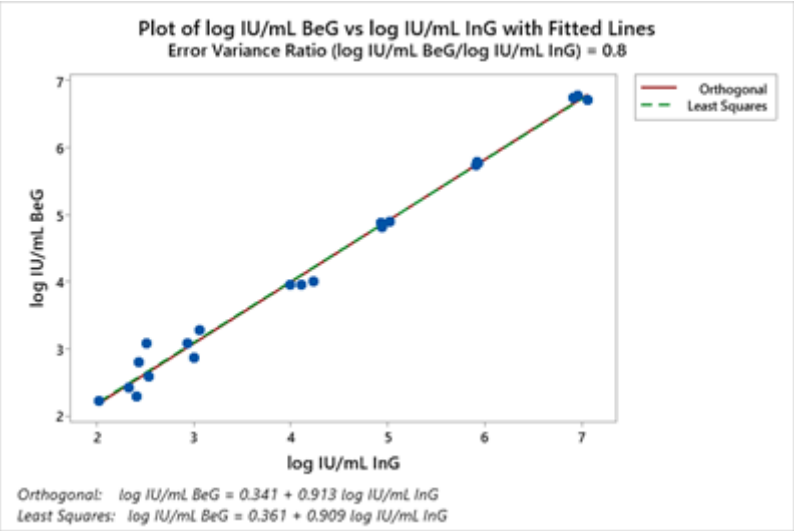
Les résultats de chaque matrice sont présentés aux paragraphes suivants.

Plasma



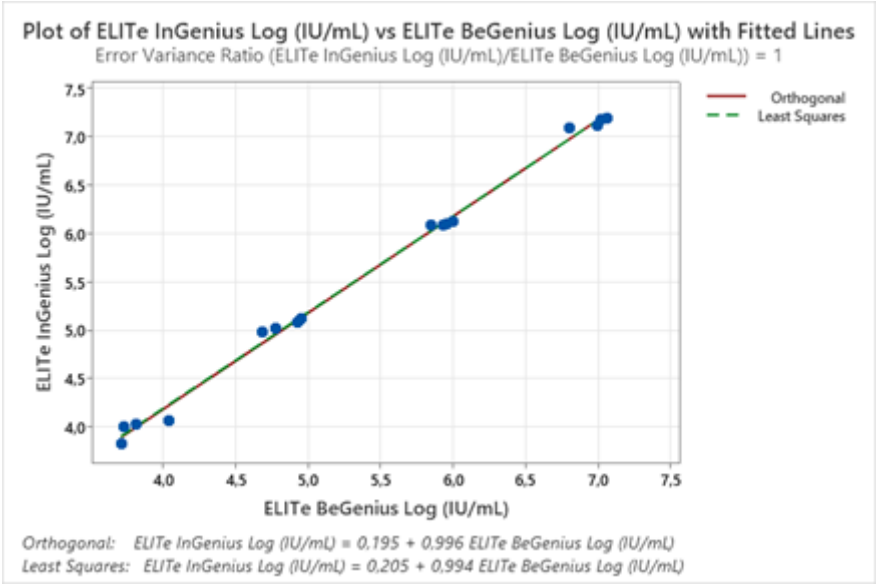
L'analyse de régression orthogonale générait une ordonnée à l'origine de -0,130 (IC à 95 % : -0,263 - 0,002) et une pente de 0,973 (IC à 95 % : 0,944 - 1,001).

Urine :



L'analyse de régression orthogonale a généré une ordonnée à l'origine de 0,341 (IC à 95 % : 0,152 - 0,529) et une pente de 0,913 (IC à 95 % : 0,872 - 0,954).

Sang total :



L'analyse de régression orthogonale a généré une ordonnée à l'origine de 0,195 (IC à 95 % : 0,0174 ; 0,3733) et une pente de 0,996 (IC à 95 % : 0,9639 ; 1,0284).

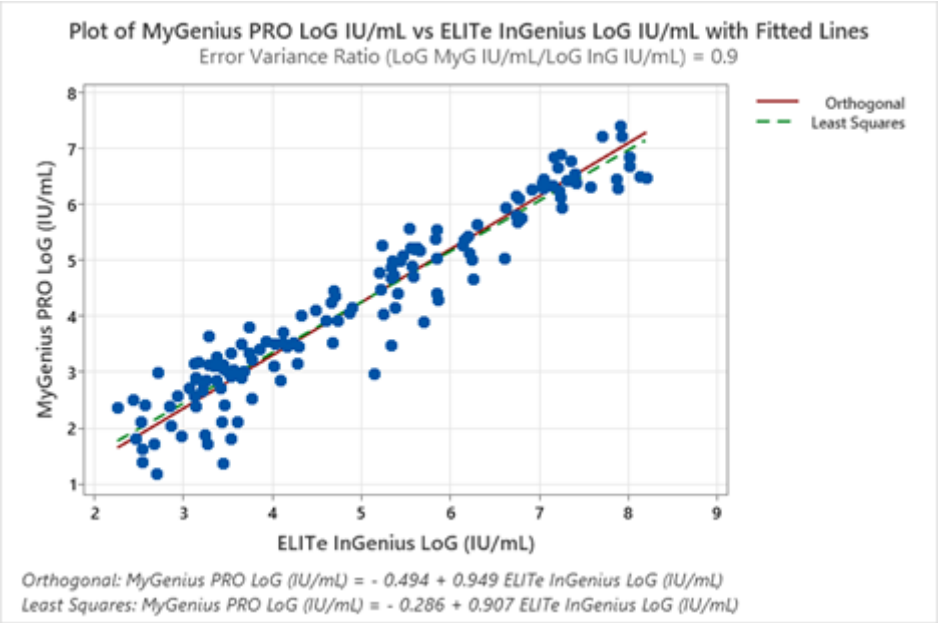
12.10 MyGenius PRO : corrélation des méthodes

L'analyse de corrélation de différentes méthodes a été évaluée sur l'instrument MyGenius PRO par l'analyse d'échantillons de patients positifs pour le BKV, dont la charge virale était comprise dans la plage de mesure de la méthode de référence (ELITe InGenius). Les résultats obtenus avec MyGenius PRO et la méthode de référence (ELITe InGenius) ont été analysés par une régression de Deming et linéaire.

Urine

L'étude de corrélation a été réalisée dans un seul site, sur 137 échantillons cliniques d'urine ayant été certifiés positifs pour l'ADN du BKV ou dopés avec un matériel de référence, en utilisant l'instrument ELITe InGenius en tant que comparateur.

Les résultats sont résumés sur la figure suivante.

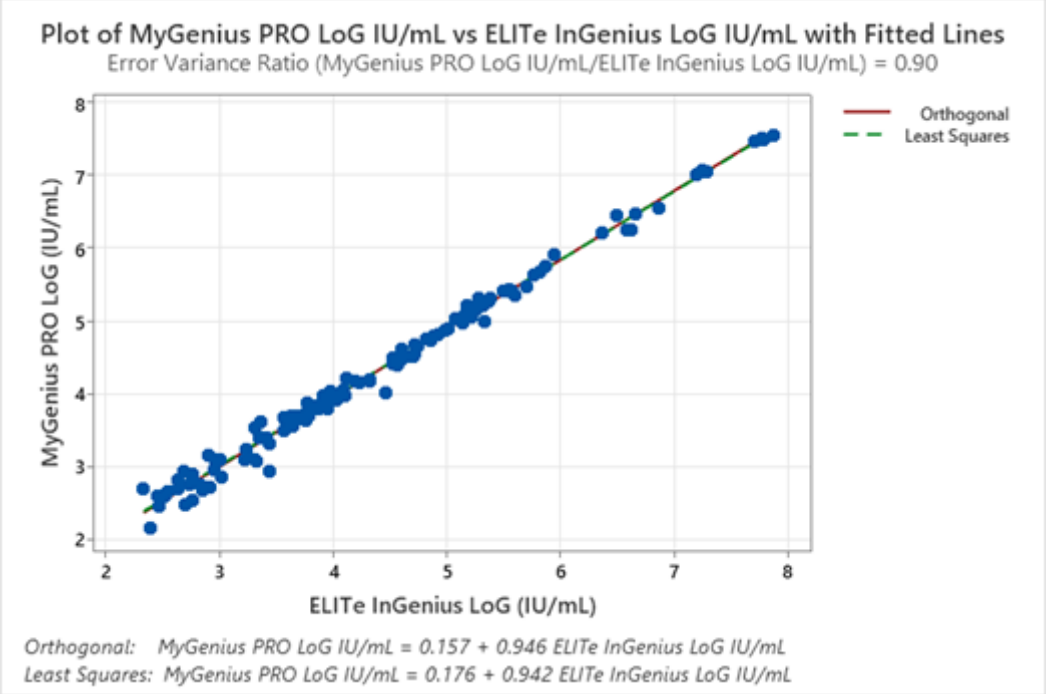


L'analyse de régression de Deming a généré une ordonnée à l'origine de -0,494 (IC à 95 % : -0,7502 ; -0,2371) et une pente de 0,949 (IC à 95 % : 0,8996 ; 0,9982). L'analyse de régression linéaire générait une valeur R2 de 0,913.

Plasma

L'étude de corrélation a été réalisée dans un seul site, sur 122 échantillons cliniques de plasma certifiés positifs pour l'ADN du BKV ou dopés avec un matériel de référence, en utilisant l'instrument ELITe InGenius en tant que comparateur.

Les résultats sont résumés sur la figure suivante.



L'analyse de régression de Deming générait une ordonnée à l'origine de 0,1573 (IC à 95 % : 0,0829 - 0,2316) et une pente de 0,9464 (IC à 95 % : 0,9304 ; 0,9624). L'analyse de régression linéaire générait une valeur R2 de 0,991.

12.11 Spécificité diagnostique : confirmation des échantillons négatifs

La spécificité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons négatifs, a été évaluée en association avec le **ELITe InGenius** ou le **ELITe BeGenius** en analysant des échantillons cliniques certifiés négatifs ou présumés négatifs pour l'ADN du BKV. Étant donné que les performances analytiques du **ELITe BeGenius** sont équivalentes à celles du **ELITe InGenius**, les performances diagnostiques du test effectué sur les deux instruments sont également considérées comme équivalentes. En conséquence, la spécificité diagnostique du test obtenue en association avec le ELITe InGenius s'applique également au ELITe BeGenius et vice versa.

Étant donné que les performances analytiques de l'instrument **MyGenius PRO** sont équivalentes à celles de l'instrument ELITe InGenius en association avec la matrice d'urine et de plasma, les performances diagnostiques du test effectué sur les deux instruments avec de l'urine et du plasma sont également considérées comme équivalentes. En conséquence, la spécificité diagnostique du test obtenue en association avec l'instrument ELITe InGenius s'applique également à l'instrument MyGenius PRO.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 28 Spécificité diagnostique

Échantillons	N	Positifs	Négatifs	Spécificité diagnostique (%)
Plasma prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du BKV	79	3	76	**96,2 %**
Urine sans conservateurs négative pour l'ADN du BKV	68	0	68	**100 %**
Sang total prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du BKV	80	0	80	100 %

La valeur seuil Ct de l'IC a été définie à 35 pour les échantillons de plasma prélevé sur EDTA et d'urine collectée sans conservateurs lorsqu'ils ont été testés sur les ELITe InGenius, ELITe BeGenius et MyGenius PRO.

La valeur seuil Ct de l'IC a été définie à 35 pour les échantillons de sang total prélevé sur EDTA lorsqu'ils ont été testés sur les instruments ELITe InGenius et ELITe BeGenius.

12.12 Sensibilité diagnostique : confirmation des échantillons positifs

La sensibilité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons cliniques positifs, a été évaluée en association avec le **ELITe InGenius** ou **ELITe BeGenius** en analysant des échantillons cliniques certifiés positifs pour l'ADN du BKV ou dopés avec un matériel de référence. Étant donné que les performances analytiques du **ELITe BeGenius** sont équivalentes à celles du **ELITe InGenius**, les performances diagnostiques du test effectué sur les deux instruments sont également considérées comme équivalentes. En conséquence, la sensibilité diagnostique du test obtenue en association avec le ELITe InGenius s'applique également au ELITe BeGenius et vice versa.

Étant donné que les performances analytiques de l'instrument **MyGenius PRO** sont équivalentes à celles de l'instrument ELITe InGenius en association avec la matrice d'urine et de plasma, les performances diagnostiques du test effectué sur les deux instruments avec de l'urine et du plasma sont également considérées comme équivalentes. En conséquence, la sensibilité diagnostique du test obtenue en association avec l'instrument ELITe InGenius s'applique également à l'instrument MyGenius PRO.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 29 Sensibilité diagnostique

Échantillons	N	Positif	Négatif	Sensibilité diagnostique (%)
Plasma prélevé sur EDTA positif pour l'ADN du BKV	34	34	0	100 %
Plasma prélevé sur EDTA dopé avec le BKV	24	24	0	
Total	58	58	0	
Urine sans conservateurs positive pour l'ADN du BKV	67	67	0	100 %
Sang total prélevé sur EDTA positif pour l'ADN du BKV	52	52	0	100 %
Sang total prélevé sur EDTA dopé avec le BKV	28	28	0	

NOTE!

Les données complètes et les résultats des tests effectués pour évaluer les caractéristiques de performance du produit avec les matrices et les instruments sont présentés dans la Fiche technique du produit « BKV ELITe MGB® Kit », FTP175PLD.

13 ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES pour l'instrument ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument

13.1 Échantillons

Les échantillons et les méthodes d'extraction des acides nucléiques ci-dessous ont été validés avec le **BKV ELITe MGB Kit** sur l'instrument ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument.

Tableau 30

Type d'échantillon	Kit/Méthode	Protocole	Volume initial (µL)	Volume d'élution (µL)	Volume minimum du tube primaire (µL)	Instructions spéciales
Plasma	ELITe GALAXY	xNA Extraction (Universal)	300	200	400-650	Ajouter 10 µL/ échantillon de CPE à la solution IC + véhicule

13.2 Substances interférentes

L'ADN extrait de l'échantillon ne doit pas contenir d'héparine, d'hémoglobine, de dextrane, de Ficoll®, d'éthanol ou de 2-propanol afin de prévenir les problèmes d'inhibition et la possibilité de génération fréquente de résultats non valides.

La présence d'une grande quantité d'ADN génomique humain dans l'ADN extrait de l'échantillon peut inhiber la réaction d'amplification.

Il n'existe actuellement aucune donnée disponible en ce qui concerne l'inhibition provoquée par des médicaments antiviraux, antibiotiques, de chimiothérapie ou immunosuppresseurs.

Ne pas utiliser d'échantillons prélevés sur héparine, qui est un inhibiteur connu de la transcription inverse et de la PCR.

13.3 Contrôles d'amplification

Il est indispensable de valider chaque session d'amplification avec une réaction de Negative Control et une réaction de Positive Control.

Pour le Negative Control, utiliser de l'eau de qualité biologie moléculaire (non incluse dans ce kit) pour l'ajouter à la réaction à la place de l'ADN extrait de l'échantillon.

Pour le Positive Control, utiliser le produit **BKV - ELITePositive Control** ou le produit **BKV - ELITe Standard**.

13.4 Contrôles de qualité

Il est recommandé de vérifier la procédure d'extraction et de PCR. Il est possible d'utiliser des échantillons archivés ou du matériel de référence certifié. Les contrôles externes doivent être utilisés conformément aux exigences des organismes d'accréditation locaux, régionaux et fédéraux, selon le cas.

14 PROCÉDURE AVEC L'INSTRUMENT ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument

14.1 Paramétrage de la session d'amplification en temps réel

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

Avec un instrument **7300 Real-Time PCR System** :

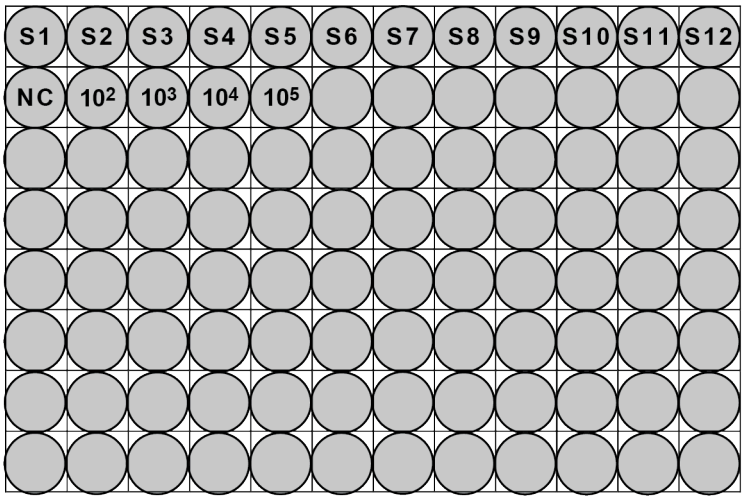
Avant de commencer la session d'analyse, en se référant à la documentation de l'instrument, il est nécessaire de :

- mettre le thermocycleur en temps réel en marche, puis l'ordinateur, lancer le logiciel dédié et ouvrir une session de « absolute quantification » (quantification absolue) ;
- paramétrer (à l'aide du « Detector Manager » [Gestionnaire de détecteur]) : le « detector » (détecteur) pour la sonde BKV avec le « reporter » (rapporteur) = « FAM » et le « quencher » (désactivateur) = « none » (aucun) (non fluorescent) et le nommer « BKV » ;
- paramétrer (à l'aide du Detector Manager [Gestionnaire de détecteur]) : le « detector » (détecteur) pour la sonde du contrôle interne, le « reporter » (rapporteur) = « VIC » (AP525 est analogue à VIC), et le « quencher » (désactivateur) = « none » (aucun) (non fluorescent) et le nommer« IC » ;
- pour chaque puits utilisé dans la microplaque, paramétrer (à l'aide du Well Inspector [Inspecteur de puits]) : le « detector » (détecteur) (type de fluorescence à mesurer), la « passive reference » (référence passive) = « ROX » (AP593 est utilisé à la place de ROX, pour la normalisation de la fluorescence mesurée) et le type de réaction (échantillon, contrôle d'amplification négatif, contrôle d'amplification positif ou étalon en quantité connue). Ajouter ces informations à la**Work Sheet** (Fiche de travail) jointe à la fin du présent manuel ou imprimer la configuration de la microplaque. La**Work Sheet**(Fiche de travail) doit être scrupuleusement suivie pendant le transfert du mélange réactionnel complet et des échantillons dans les puits.

NOTE!

Afin de déterminer le titre de l'ADN dans l'échantillon de départ, paramétrer un ensemble de réactions avec les étalons**Q - PCR Standards**(10^5 copies, 10^4 copies, 10^3 copies, 10^2 copies) pour obtenir la**courbe d'étalonnage**.

L'exemple ci-dessous montre comment paramétrer l'analyse quantitative de 12 échantillons.



Légende : S1-S12 : échantillons à analyser ;**NC** :Negative Controld'amplification ;

10^2 : étalon à 10^2copies ;**10^3** : étalon à 10^3copies ;**10^4** : étalon à 10^4copies ;**10^5** : étalon à 10^5copies.

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

- à l'étape d'amplification, ajouter l'étape (Add Step [Ajouter étape]) d'**extensionà72 °C** ;

NOTE!

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

- modifier le temps comme indiqué dans le tableau**« Cyclethermique »** ;
- paramétrer le nombre de cycles sur**45** ;
- paramétrer le volume pour l'émulation logicielle du transfert thermique à la réaction (« Sample volume » [Volume d'échantillon]) sur**30 µL** ;

Tableau 31 Cycle thermique avec l'instrument 7300

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

Avec un instrument**7500Fast DxReal-Time PCRInstrument** :

Avant de commencer la session d'analyse, en se référant à la documentation de l'instrument, il est nécessaire de :

- mettre le thermocycleur en temps réel en marche, puis l'ordinateur, lancer le logiciel dédié, ouvrir une session de « absolute quantification » (quantification absolue) et choisir le « Run mode: Fast 7500 » (Mode d'exécution : Fast 7500) ;
- paramétrer (à l'aide du « Detector Manager » [Gestionnaire de détecteur]) : le « detector » (détecteur) pour la sonde BKV avec le « reporter » (rapporteur) = « FAM » et le « quencher » (désactivateur) = « none » (aucun) (non fluorescent) et le nommer « BKV » ;
- paramétrer (à l'aide du Detector Manager [Gestionnaire de détecteur]) : le « detector » (détecteur) pour la sonde du contrôle interne, le « reporter » (rapporteur) = « VIC » (AP525 est similaire à VIC), et le « quencher » (désactivateur) = « none » (aucun) (non fluorescent) et le nommer« IC » ;
- pour chaque puits utilisé dans la microplaque, paramétrer (à l'aide du Well Inspector [Inspecteur de puits]) : le « detector » (détecteur) (type de fluorescence à mesurer), la « passive reference » (référence passive) = « Cy5 » (AP593 est utilisé à la place de Cy5, pour la normalisation de la fluorescence mesurée) et le type de réaction (échantillon, contrôle d'amplification négatif, contrôle d'amplification positif ou étalon en quantité connue). Ajouter ces informations à la**WorkSheet** (Fiche de travail) jointe à la fin du présent manuel ou imprimer la configuration de la microplaque. La**Work Sheet**(Fiche de travail) doit être scrupuleusement suivie pendant le transfert du mélange réactionnel complet et des échantillons dans les puits.

NOTE!

Afin de déterminer le titre de l'ADN dans l'échantillon de départ, paramétrer un ensemble de réactions avec les étalons Q-PCRStandards(10^5copies, 10^4copies, 10^3copies, 10^2copies) pour obtenir la**courbed'étalonnage**.

Le paramétrage de l'analyse qualitative de 12 échantillons est présenté, à titre d'exemple, au paragraphe précédent décrivant la procédure pour l'instrument**7300 Real Time PCR System**.

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

- à l'étape d'amplification, ajouter l'étape (Add Step [Ajouter étape]) d'**extensionà72 °C** ;

NOTE!

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

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

.

Tableau 32 Cycle thermique avec l'instrument 7500

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

Tableau 32 Cycle thermique avec l'instrument 7500 (continued)

Étape	Températures	Temps
Dissociation (facultatif)	95 °C	15 s
	40 °C	1 min.
	80 °C	15 s
	60 °C	15 s

14.2 Paramétrage de la session d'analyse de PCR en temps réel

(Effectuée par l'instrument **ELITe GALAXY**)

Pour procéder au paramétrage de la session d'analyse de PCR :

- décongeler les tubes de **Q-PCR Mix** requis pour la session d'analyse (le contenu de chaque tube est suffisant pour **25 réactions**).
- décongeler les tubes de **Contrôle positif** (analyse qualitative : détection de l'ADN extrait) ou de **Q - PCR Standard** (analyse quantitative : quantification de l'ADN extrait)
- mélanger délicatement les réactifs et centrifuger le contenu pendant 5 secondes
- préparer le **Contrôle négatif** (non fourni) conformément au mode d'emploi de l'instrument
- préparer une **microplaque de Q-PCR**. Manipuler la microplaque avec des gants non poudrés et veiller à ne pas endommager les puits

NOTE!

Pour préparer la PCR sur l'instrument **ELITe GALAXY**, charger la microplaque d'élution contenant les échantillons d'ADN extraits, les réactifs et la **microplaque de Q-PCR** comme indiqué dans le manuel d'utilisation de l'instrument et suivre les étapes indiquées par la GUI.

L'instrument effectue automatiquement le paramétrage de la PCR en distribuant, dans chaque puits de la **microplaque de Q-PCR** :

- **20 µL** de **Q-PCR Mix**
- **20 µL** d'**ADN extrait/Q-PCR Standard/Contrôles**

NOTE!

Si le Q-PCR Mix n'est pas utilisé en intégralité, conserver le volume restant dans l'obscurité à -20 °C pendant un mois au maximum. Congeler et décongeler le Q-PCR Mix **5 FOIS** au maximum.

Une fois le paramétrage de la PCR effectué par l'instrument :

- sceller la **microplaque de Q-PCR** avec un film adhésif optique
- transférer la **microplaque de Q-PCR** sur l'instrument **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** et lancer la PCR. Enregistrer le fichier d'analyse avec un nom unique et reconnaissable (p. ex., « année-mois-jour-CIBLE-EGSpA »)

NOTE!

À la fin de la PCR, la **microplaque de Q-PCR** doit être éliminée conformément à l'ensemble des réglementations gouvernementales et environnementales. Afin d'éviter de renverser les produits de la PCR, le **film adhésif optique ne doit pas être retiré de la microplaque de Q-PCR**.

14.3 Paramètres généraux pour l'analyse des résultats

Avant de commencer l'analyse, se reporter à la documentation de l'instrument pour :

- régler manuellement la plage de calcul pour la **Baseline** (Référence) (niveau de bruit de fond de la fluorescence) du cycle 6 au cycle 15 (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle [Résultats > Tracé d'amplification > delta Rn vs Cycle]) ;

NOTE!

La fluorescence FAM de la sonde du BKV dans un échantillon contenant une forte concentration d'ADN du BKV peut commencer à augmenter avant le cycle 15. Dans ce cas, réduire la plage de calcul de la**Baseline** (Référence) au cycle auquel la fluorescence FAM de l'échantillon commence à augmenter (Results > Composant [Résultats > Composant]).

- paramétrer manuellement les seuils pour les détecteurs :

paramétrer le**seuil**« BKV » du détecteur FAM à**0,2** ;

paramétrer le**seuil**« IC » du détecteur VIC à**0,1**.

Le cycle de PCR pendant lequel le niveau de fluorescence d'un échantillon atteint la valeur**seuil**détermine le**cycle seuil (Ct)**de cet échantillon.

Le logiciel de l'instrument analyse automatiquement les niveaux de fluorescence dans les réactions des contrôles, des étalons et des échantillons puis calcule les valeurs Ct.

14.4 Analyse qualitative des résultats

La valeur **Ct** du BKV du **Contrôle positif** est utilisée pour valider la PCR. L'analyse de PCR est valide lorsque les résultats sont ceux décrits dans le tableau suivant :

Tableau 33

Réaction du Contrôle positif Détecteur FAM « BKV »	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct ≤ 25	POSITIF	CORRECTE

Si le résultat du **Contrôle Positif** est **Ct > 25** ou**Ct Undetermined** (Ct indéterminé) pour le détecteur FAM « BKV », la session d'analyse n'est pas valide et doit être répétée en commençant par l'étape de PCR. Cela peut indiquer une contamination susceptible de produire des résultats incorrects et faux positifs.

NOTE!

Lorsque le produit est utilisé pour la quantification de l'ADN du BKV, les réactions des étalons**Q - PCR Standard**sont paramétrées à la place de la réaction du**Contrôle positif**. Dans ce cas, valider l'amplification et la détection en se reportant à la réaction d'amplification de l'étalon**Q - PCR Standard 10^5**(**Ct ≤ 25**).

La valeur Ct du BKV du**Contrôle négatif**est utilisée pour valider la PCR. L'analyse de PCR est valide lorsque les résultats sont ceux décrits dans le tableau suivant :

Tableau 34

Réaction du contrôle négatif Détecteur FAM « BKV »	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct indéterminé	**NÉGATIF**	**CORRECTE**

Si le résultat de la réaction d'amplification du**Contrôle négatif**est différent de**CtUndetermined** (Ct indéterminé) pour le détecteur FAM « BKV », la session d'analyse n'est pas valide et doit être répétée en commençant par l'étape de PCR. Cela peut indiquer que des problèmes sont survenus pendant l'étape d'amplification (contamination), ce qui peut générer des résultats incorrects et des résultats faux positifs.

La valeur**Ct**du BKV dans chaque échantillon est utilisée pour détecter l'ADN cible alors que la valeur**Ct**du contrôle interne est utilisée pour valider l'extraction, la PCR et la détection.

NOTE!

À l'aide du tracé d'amplification (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle [Résultats > Tracé d'amplification > delta Rn vs Cycle]), vérifier que la valeur**Ct**de chaque échantillon a été déterminée par une augmentation rapide et régulière de la fluorescence, et non par des pics ou une augmentation du signal du bruit de fond (bruit de fond irrégulier ou important).

Les résultats possibles des échantillons (Results > Report [Résultats > Rapport]) sont décrits dans le tableau suivant :

Tableau 35

Réaction d'échantillon		Adéquation de l'échantillon	Résultat du test de l'échantillon	ADN du BKV
Détecteur FAM « BKV »	Détecteur VIC « IC »			
Ct indéterminé	Ct > 35 ou Ct indéterminé	non adéquat	non valide	-
	Ct ≤ 35	adéquat	valide, négatif	NON DÉTECTÉ
Ct déterminé	Ct > 35 ou Ct indéterminé	adéquat	valide, positif	DÉTECTÉ
	Ct ≤ 35	adéquat	valide, positif	DÉTECTÉ

Un résultat d'échantillon qui est**Ctindéterminé**pour le BKV et**Ct > 35**ou**Ctindéterminé**pour le contrôle interne n'est pas valide et indique un problème pendant l'extraction des acides nucléiques ou la PCR (par ex. dégradation de l'ADN de l'échantillon, perte d'ADN pendant l'extraction, présence d'inhibiteurs dans l'ADN, amplification inefficace ou nulle), ce qui peut générer des résultats incorrects. L'échantillon n'est pas adéquat pour l'analyse et le test doit être répété en commençant par l'extraction des acides nucléiques d'un nouvel échantillon.

Un résultat d'échantillon qui est**Ct indéterminé**pour le BKV et**Ct ≤ 35**pour le contrôle interne est valide et indique que l'ADN du BKV n'a pas été détecté dans l'échantillon. L'échantillon peut ne pas contenir d'ADN du BKV ou il contient de l'ADN du BKV à une concentration inférieure à la limite de détection du produit (se reporter à la section15 Caractéristiques de performance page 52).Un résultat d'échantillon qui est**Ct déterminé (Ct ≤ 45)**pour le BKV et**Ct** > **35**,**Ct indéterminé**, ou**Ct ≤ 35**pour l'IC est valide et indique que l'ADN du BKV a été détecté dans l'échantillon.

NOTE!

En cas de résultat Ct déterminé pour le BKV et Ct > 35 ou Indéterminé pour l'IC, l'efficacité de la PCR de l'IC peut avoir été impactée par une compétition avec la PCR de l'ADN du BKV hautement efficace. Dans ce cas, l'échantillon est adéquat et le résultat positif est valide.

NOTE!

les résultats obtenus avec ce test doivent être interprétés en association avec l'ensemble des observations cliniques pertinentes et des résultats du laboratoire.

14.5 Analyse quantitative des résultats

Après l'analyse qualitative des résultats, il est possible d'effectuer une analyse quantitative des échantillons positifs.

Dans les réactions d'amplification des quatre **Q - PCR standards**, les valeurs **Ct** du BKV sont utilisées pour calculer la **courbe d'étalonnage** (Results > Standard Curve [Résultats > Courbe d'étalonnage]) de la session d'amplification, afin de valider l'amplification et la détection comme indiqué dans le tableau suivant :

Tableau 36

Courbe d'étalonnage Détecteur FAM « BKV »	Plage d'acceptabilité	Amplification/Détection
Coefficient de corrélation (R2)	**0,990 ≤ R2 ≤ 1,000**	**CORRECTE**

Si la valeur du**coefficientde corrélation(R2)**n'est pas comprise dans les limites, la session d'analyse n'est pas valide et doit être répétée en commençant par l'étape de PCR. Ceci peut indiquer un problème pendant la PCR ou l'étape de détection (par ex. distribution incorrecte ou dégradation du Q-PCR Mix ou des étalons, position incorrecte des étalons, paramètres incorrects du cycle thermique ou contamination croisée), ce qui peut générer des résultats incorrects.

Tableau 37

Résultat de l'échantillon pour ledétecteur FAM « BKV »	Copies du BKV par réaction
Quantité > 1 x 10^6	**PLUS DE 1 x 10^6**
1 x 10^1≤ Quantité ≤ 1 x 10^6	**= Quantité**
Quantité < 1 x 10^1	**MOINS DE 10**

Les résultats (**Quantité**) de chaque échantillon (Results > Report [Résultats > Rapport]) sont utilisés pour calculer les copies du BKV présentes dans l'échantillon utilisé dans l'extraction (**Nc**) selon la formule suivante :

Tableau 38

$$Nc = \frac{Ve \times Quantité}{Vc \times Va \times Ep}$$

dans laquelle :

Veest le volume total**en µL**de l'échantillon d'ADN extrait (volume d'élution)

Quantitéest le nombre de**copies/réaction**de l'échantillon calculé par le logiciel de l'instrument (résultat de la PCR)

Vcest le volume de l'échantillon utilisé pour l'extraction des acides nucléiques (volume initial) exprimé dans l'unité de mesure requise

Vaest le volume en**µL**de l'échantillon d'ADN extrait (éluat) utilisé dans la PCR

Epest l'efficacité de la procédure (extraction et PCR)**exprimée en valeurs décimales** ;

Pour convertir la quantité de l'échantillon, initialement en copies/mL, en UI/mL, multiplier la valeur en copies/mL par le**facteur deconversion (Fc)**. Le Fc a été calculé en utilisant un matériel de référence certifié et étalonné (« 1^{er}étalon international de l'OMS pour les techniques d'amplification des acides nucléiques de l'ADN du virus BK », NIBSC) (se reporter à la section15 Caractéristiques de performance page 52).

À des fins de commodité, le tableau suivant présente des formules simplifiées dans lesquelles Ve/(Vc x Va x Ep) et sa conversion en UI/mL ont été calculées.

Tableau 39

Matrice	Méthode d'extraction des acides nucléiques	Ve/ (Vc x Va x Ep)	Formule de quantification Nc (copies/mL)	Fc (UI/copies)	Formule de quantification Nc (UI/mL)
plasma	ELITe GALAXY	35	35 x Quantité	4,1	143,5 x Quantité

15 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC L'INSTRUMENT ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument

15.1 Sensibilité analytique : Limite de détection (LoD)

La limite de détection (LoD) du test en association avec du plasma prélevé sur EDTA a été vérifiée sur les instruments ELITe GALAXY et ABI 7500, en testant un panel de matrices négatives pour le BKV dopées avec un matériel de référence du BKV (1er étalon international de l'OMS pour l'ADN du virus BK, NIBSC code 14/212, Royaume-Uni). Une analyse de régression des probits a été réalisée sur les résultats, et la LoD a été estimée comme la concentration correspondant à une probabilité de résultat positif de 95 %.

Le résultat est présenté dans le tableau suivant.

Tableau 40 Limite de détection pour des échantillons de plasma avec le ELITe GALAXY

% positivité	LoD	Intervalle de confiance à 95 %	
		limite inférieure	limite supérieure
95 %	**189 copies/mL**	119 copies/mL	462 copies/mL
95 %	**779 UI/mL**	490 UI/mL	1 903 UI/mL

La LoD, exprimée en copies/mL pour chaque matrice, est calculée en appliquant le facteur de conversion spécifique indiqué au paragraphe 15.7 Conversion en unités internationales page 55

15.2 Plage de mesure linéaire

La plage de mesure linéaire du test a été déterminée sur l'instrument **ABI 7500 Fast Dx** en utilisant un panel de dilutions d'un ADN plasmidique contenant le produit d'amplification.

La plage de mesure linéaire, exprimée en copies/mL, est calculée en appliquant le facteur de conversion spécifique indiqué au paragraphe 15.7 Conversion en unités internationales page 55.

Les résultats finaux sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 41 Plage de mesure linéaire pour les échantillons de plasma prélevé sur EDTA avec l'instrument ABI 7500

Unité de mesure	limite inférieure	limite supérieure
UI/mL	41	41 000 000
copies/réaction	10	1 000 000

15.3 Marqueurs potentiellement interférents : réactivité croisée

La réactivité croisée potentielle d'organismes non souhaitables qui peuvent être présents dans des échantillons cliniques a été évaluée par une analyse *in silico*. L'analyse a montré une absence d'homologie significative avec d'autres organismes non souhaitables (virus, bactéries, protozoaires et champignons). On ne s'attend donc à aucune réactivité croisée.

L'absence de réactivité croisée avec des organismes potentiellement interférents a également été vérifiée par l'analyse d'un panel d'organismes non souhaitables (ATCC, NIBSC) à un titre élevé.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 42

Organisme	Pos./rép.	Résultat
HSV1	0/3	Aucune réactivité croisée
HSV2	0/3	Aucune réactivité croisée
CMV	0/3	Aucune réactivité croisée
EV	0/3	Aucune réactivité croisée
VZV	0/3	Aucune réactivité croisée
ADV	0/3	Aucune réactivité croisée
EBV	0/3	Aucune réactivité croisée
JCV	0/3	Aucune réactivité croisée
HHV6	0/3	Aucune réactivité croisée

Tous les marqueurs potentiellement interférents testés n'ont montré aucune réactivité croisée pour l'amplification de la cible BKV à l'aide du BKV ELITe MGB Kit.

15.4 Marqueurs potentiellement interférents : inhibition

L'inhibition potentielle du test exercée par des organismes non souhaitables qui peuvent être présents dans des échantillons cliniques a été évaluée par l'analyse d'un panel d'organismes non souhaitables dans des échantillons positifs pour le BKV, provenant de différents fournisseurs (ATCC, NIBSC).

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 43

Organisme	Pos./rép.	Résultat
HSV1	3/3	Aucune interférence
HSV2	3/3	Aucune interférence
CMV	3/3	Aucune interférence
EV	3/3	Aucune interférence
VZV	3/3	Aucune interférence
ADV	3/3	Aucune interférence
EBV	3/3	Aucune interférence
JCV	3/3	Aucune interférence
HHV6	3/3	Aucune interférence

Tous les organismes potentiellement interférents testés n'ont montré aucune interférence avec la détection et de la quantification de la cible BKV à l'aide du BKV ELITe MGB Kit.

15.5 Répétabilité

La répétabilité intra-analyse, inter-analyses et inter-jours du test a été évaluée sur l'instrument ABI 7500 par l'analyse d'un panel d'échantillons dopés avec un ADN plasmidique contenant le produit d'amplification du BKV et un échantillon négatif.

Un exemple des résultats de la répétabilité intra-analyse (sur une seule session d'analyse) est présenté dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 44 Répétabilité intra-analyse avec l'instrument ABI 7500

Échantillon copies/réaction	BKV			
	Pos./rép.	Ct moyen	EC	% CV
50 000 cible + 150 000 IC	12/12	23,89	0,15	0,64
5 000 cible + 150 000 IC	12/12	27,07	0,10	0,37
500 cible + 150 000 IC	12/12	30,41	0,17	0,56
10 cible + 150 000 IC	12/12	37,97	0,92	2,43
150 000 IC	0/12	-	-	-

Un exemple des résultats de la répétabilité inter-analyses (sur deux sessions d'analyse) est présenté dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 45 Répétabilité inter-analyses avec l'instrument ABI 7500

Échantillon copies/réaction	BKV			
	Pos./rép.	Ct moyen	EC	% CV
50 000 cible + 150 000 IC	24/24	23,91	0,13	0,53
5 000 cible + 150 000 IC	24/24	27,05	0,11	0,41
500 cible + 150 000 IC	24/24	30,40	0,20	0,66
10 cible + 150 000 IC	24/24	36,62	0,70	1,91
150 000 IC	0/24	-	-	-

Dans le test de répétabilité, le BKV ELITe MGB Kit a détecté tous les échantillons comme attendu et a montré une variabilité maximale des valeurs Ct de la cible (en tant que % CV) de 5 %.

15.6 Reproductibilité

La reproductibilité du test a été évaluée sur l'instrument ABI 7500 en analysant les résultats de 10 tests de CQ du produit BKV ELITe MGB Kit.

Un résumé de l'analyse des résultats de la valeur Ct de la cible BKV et du Contrôle interne amplifiés à l'aide du BKV ELITe MGB Kit est présenté dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 46 Reproductibilité avec l'instrument ABI 7500

Échantillon copies/réaction	N	Ct moyen	EC	% CV	Résultat
100 000 cible	30	22,70	0,34	1,51	Réussi
50 000 cible + 150 000 IC	30	23,54	0,33	1,39	Réussi
5 000 cible + 150 000 IC	30	26,81	0,40	1,49	Réussi
500 cible + 150 000 IC	30	30,18	0,47	1,54	Réussi
10 cible + 150 000 IC	90	36,16	0,67	1,86	Réussi
150 000 IC	30	22,76	0,25	1,09	Réussi
6 000 IC	90	28,11	0,32	1,15	Réussi

15.7 Conversion en unités internationales

Le facteur de conversion en unités internationales du BKV ELITe MGB Kit et du composant du produit « BKV ELITe Standard » en association avec les instruments ELITe GALAXY et ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument a été calculé en analysant un panel de dilutions en série (étapes de 0,5 Log) du « 1er étalon international de l'OMS pour l'ADN du virus BK » (NIBSC, Royaume-Uni, code 14/212) dans du plasma prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du BKV.

Le facteur de conversion a été calculé en tant qu'anti-log de la moyenne des différences (10^{Md}) entre la valeur Log UI/mL attribuée et la valeur Log copies/mL mesurée et a donné un résultat de 4,12 UI/copie pour le plasma prélevé sur EDTA.

15.8 Spécificité diagnostique : confirmation des échantillons négatifs

La spécificité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons cliniques négatifs, a été évaluée, en association avec les instruments ELITe GALAXY et ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, en analysant des échantillons présumés négatifs pour l'ADN du BKV.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 47 Spécificité diagnostique

Échantillon	N	positif	négatif	Spécificité diagnostique (%)
Plasma prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN du BKV	52	0	52	100 %

15.9 Sensibilité diagnostique : confirmation des échantillons positifs

La sensibilité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons cliniques positifs, a été évaluée, en association avec les instruments ELITe GALAXY et ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, en analysant des échantillons certifiés positifs pour l'ADN du BKV et des échantillons dopés.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 48 Sensibilité diagnostique

Échantillons	N	positif	négatif	Sensibilité diagnostique (%)
Plasma prélevé sur EDTA positif pour l'ADN du BKV	9	9	0	100 %
Plasma prélevé sur EDTA dopé avec le BKV	42	42	0	
Total	51	51	0	

NOTE!

Les données complètes et les résultats des tests effectués pour évaluer les caractéristiques de performance du produit avec les matrices et les instruments sont présentés dans la Fiche technique du produit « BKV ELITe MGB® Kit », FTP 175PLD.

16 BIBLIOGRAPHIE

S. W. Aberle et al. (2002) *J Clin Virology* 25: S79 - S85

C. N. Kotton et al. (2025) Transplantation 109: 1066-1110

E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

17 LIMITES DE LA PROCÉDURE

Utiliser ce produit uniquement avec les échantillons cliniques suivants :

- plasma prélevé sur EDTA (ELITe InGenius, ELITe BeGenius, MyGenius PRO et ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument uniquement)
- urine (ELITe InGenius, ELITe BeGenius et MyGenius PRO uniquement)
- sang total prélevé sur EDTA (ELITe InGenius et ELITe BeGenius uniquement)

Actuellement, aucune donnée n'est disponible en ce qui concerne les performances du produit avec d'autres échantillons cliniques tels que les suspensions de leucocytes et les suspensions de granulocytes.

Le plasma prélevé sur EDTA doit être obtenu à partir de sang total conservé à température ambiante ou à +2/+8 ° C pendant 24 heures maximum.

Ne pas utiliser d'ADN extrait d'échantillons héparinés avec ce produit : l'héparine inhibe la réaction d'amplification des acides nucléiques et génère des résultats non valides.

Ne pas utiliser d'ADN extrait contaminé par de l'hémoglobine, du dextrane, du Ficoll®, de l'éthanol ou du 2-propanol avec ce produit : ces substances inhibent la réaction d'amplification des acides nucléiques et peuvent générer des résultats non valides.

Ne pas utiliser ce produit avec de l'ADN extrait contenant une grande quantité d'ADN génomique humain, qui risque d'inhiber la réaction d'amplification des acides nucléiques.

Il n'existe aucune donnée disponible en ce qui concerne l'inhibition provoquée par des médicaments antiviraux, antibiotiques, de chimiothérapie ou immunosuppresseurs.

Les résultats obtenus avec ce produit dépendent de l'identification, de la collecte, du transport, de la conservation et du traitement appropriés des échantillons. Afin d'éviter tout résultat incorrect, il est par conséquent nécessaire de prendre des précautions particulières pendant ces étapes et de suivre scrupuleusement le mode d'emploi fourni avec le produit.

La méthode de PCR en temps réel utilisée dans ce produit présente une sensibilité analytique élevée qui la rend sensible aux contaminations par les échantillons cliniques positifs, les contrôles positifs et les produits de PCR. Une telle contamination croisée est susceptible de donner lieu à des résultats faux positifs. Le produit a un format conçu pour réduire ce phénomène, mais seuls l'application des bonnes pratiques de laboratoire et le respect scrupuleux du présent mode d'emploi peuvent le prévenir.

Ce produit doit être manipulé par du personnel qualifié et dûment formé au traitement des échantillons biologiques potentiellement infectieux et des préparations chimiques classifiées comme dangereuses, afin de prévenir les accidents pouvant avoir des conséquences potentiellement graves pour l'utilisateur et les autres personnes.

Ce produit exige de porter un équipement de protection individuelle et de disposer de zones appropriées dédiées au traitement des échantillons biologiques potentiellement infectieux et des préparations chimiques classifiées comme dangereuses, afin de prévenir les accidents pouvant avoir des conséquences potentiellement graves pour l'utilisateur et les autres personnes.

Ce produit exige de porter des équipements de protection individuelle et d'utiliser des instruments dédiés au paramétrage des sessions de travail afin d'éviter tout résultat faux positif.

Afin d'éviter des résultats incorrects, ce produit doit être manipulé par du personnel professionnel, qualifié et formé aux techniques de biologie moléculaire telles que l'extraction, la PCR et la détection des acides nucléiques.

En raison de différences intrinsèques entre les technologies, il est recommandé aux utilisateurs d'effectuer des études de corrélation des méthodes afin d'évaluer les différences de technologie avant d'envisager d'en utiliser une nouvelle.

Un résultat négatif obtenu avec ce produit indique que l'ADN cible n'est pas détecté dans l'ADN extrait de l'échantillon ; toutefois, il n'est pas possible d'exclure le fait que de l'ADN cible soit présent à un titre inférieur à la limite de détection du produit (se reporter à la section12 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC ELITe InGenius, ELITe BeGenius et MyGenius PRO page 33). Dans ce cas, le résultat pourrait être un faux négatif.

Les résultats obtenus avec ce produit peuvent parfois être non valides en raison d'un échec du Contrôle Interne. Dans ce cas, l'échantillon doit être testé à nouveau, en commençant par l'extraction, ce qui peut entraîner des retards d'obtention des résultats finaux.

D’éventuels polymorphismes, insertions ou délétions dans la région de l’ADN ciblée par les amorces et les sondes du produit peuvent affecter la détection et la quantification de l’ADN cible.

Comme avec tout autre dispositif médical de diagnostic, les résultats obtenus avec ce produit doivent être interprétés en association avec l’ensemble des observations cliniques et des résultats de laboratoire pertinents.

Comme avec tout autre dispositif médical de diagnostic, il existe un risque résiduel d’obtention de résultats non valides, ou de résultats erronés avec ce produit. Ce risque résiduel ne peut pas être éliminé ni réduit par la suite. Dans certains cas, ce risque résiduel pourrait contribuer à prendre de mauvaises décisions, avec des effets potentiellement dangereux pour le patient. Néanmoins, ce risque résiduel associé à l’utilisation prévue du produit a été évalué comme acceptable au regard des avantages potentiels pour le patient.

18 PROBLÈMES ET SOLUTIONS

ELITe InGenius et ELITe BeGenius

Tableau 49

Réaction du Q-PCR Standard, courbe d'étalonnage ou réaction du Contrôle positif non valide	
Causes possibles	**Solutions**
Erreur de paramétrage de l'instrument.	Vérifier la position du Q-PCR Mix, des étalons Q-PCR Standards et du Contrôle Positif. Vérifier les volumes du Q-PCR Mix, des étalons Q-PCR Standards et du Contrôle Positif.
Dégradation du PCR Mix.	Ne pas utiliser le Q-PCR Mix pendant plus de 5 sessions d'analyse indépendantes (de 3 heures chacune dans le bloc réfrigéré de la « Inventory Area » [Zone de Stockage]) ou dans la Cooler Unit). Ne pas utiliser le Q-PCR Mix pendant plus de 3 sessions d'analyse consécutives (7 heures dans le bloc réfrigéré de la « Inventory Area » [Zone de Stockage]) ou dans la Cooler Unit). Ne pas laisser le Q-PCR Mix à température ambiante pendant plus de 30 minutes. Utiliser un nouveau tube de Q-PCR Mix.
Dégradation des étalons Q-PCR Standards ou du Contrôle positif.	Ne pas utiliser le Q-PCR Standard pendant plus de 4 sessions d'analyse indépendantes (de 2 heures chacune dans la « Extraction Area » [Zone d'extraction] ou dans la Cooler Unit). Ne pas utiliser le Contrôle positif pendant plus de 4 sessions d'analyse indépendantes (de 3 heures chacune dans la « Extraction Area » [Zone d'extraction] ou dans la Cooler Unit). Utiliser de nouveaux tubes de Q-PCR Standards ou du Contrôle positif.
Erreur de l'instrument.	Contacter le service technique d'ELITechGroup.

Tableau 50

Réaction du Contrôle négatif non valide	
Causes possibles	**Solutions**
Erreur de paramétrage de l'instrument.	Vérifier la position du Q-PCR Mix et du Contrôle négatif. Vérifier les volumes du Q-PCR Mix et du Contrôle négatif.
Contamination du Contrôle négatif.	Ne pas utiliser le Contrôle négatif pour plus d'une (1) session d'analyse. Utiliser une nouvelle aliquote d'eau de qualité biologie moléculaire.
Contamination du PCR Mix.	Utiliser un nouveau tube de Q-PCR Mix.
Contamination de la zone d'extraction, des racks, du « Inventory Block » (Gestionnaire de stocks) ou de la Cooler Unit.	Nettoyer les surfaces avec des détergents aqueux, laver les blouses de laboratoire, remplacer les tubes et les cônes utilisés.
Erreur de l'instrument.	Contacter le service technique d'ELITechGroup.

Tableau 51

Réaction de l'échantillon non valide	
Causes possibles	**Solutions**
Erreur de paramétrage de l'instrument.	Vérifier la position du Q-PCR Mix, du Contrôle interne et de l'échantillon. Vérifier les volumes du Q-PCR Mix, du Contrôle interne et de l'échantillon.
Dégradation du PCR Mix.	Ne pas utiliser le Q-PCR Mix pendant plus de 5 sessions d'analyse indépendantes (de 3 heures chacune dans le bloc réfrigéré de la « Inventory Area » [Zone de Stockage]) ou dans la Cooler Unit). Ne pas utiliser le Q-PCR Mix pendant plus de 3 sessions d'analyse consécutives (7 heures dans le bloc réfrigéré de la « Inventory Area » [Zone de Stockage]) ou dans la Cooler Unit). Ne pas laisser le Q-PCR Mix à température ambiante pendant plus de 30 minutes. Utiliser un nouveau tube de Q-PCR Mix.
Dégradation de la matrice du Contrôle interne.	Utiliser un nouveau tube du Contrôle interne.
Inhibition due à des substances interférentes dans l'échantillon.	Répéter l'amplification de l'échantillon élué tel quel ou avec une dilution à 1:2 dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, lors d'une session d'analyse « PCR Only » (PCR seulement). Répéter l'extraction de l'échantillon avec une dilution à 1:2 dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, lors d'une session d'analyse « Extract + PCR » (Extraction + PCR). Pour les échantillons de LBA/AB, effectuer ou répéter la liquéfaction de l'échantillon primaire comme indiqué dans 8 ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES pour les ELITe InGenius, ELITe BeGenius et MyGenius PRO page 10
Erreur de l'instrument.	Contacter le service technique d'ELITechGroup.

Tableau 52

Courbe de dissociation anormale	
Causes possibles	**Solutions**
Absence de pic défini. Pic défini mais Tm différente de celles des autres échantillons et de celle des étalons ou du Contrôle positif.	Vérifier que la valeur Ct de la cible est inférieure à 30. Une grande quantité de produit d'amplification à la fin de la réaction peut interférer avec l'analyse de la courbe de fusion. Répéter l'amplification de l'échantillon pour confirmer la présence d'une cible comportant une éventuelle mutation. La cible dans l'échantillon doit être séquencée pour confirmer la mutation.

Tableau 53

Erreur de calcul de la valeur Ct	
Causes possibles	**Solutions**
Concentration trop élevée de la cible dans l'échantillon ou échantillon montrant une anomalie du signal de fluorescence.	Si une amplification significative est observée dans la courbe de PCR, sélectionner la position associée à l'échantillon et approuver manuellement le résultat comme positif. Si aucune amplification n'est observée dans la courbe de PCR, sélectionner la position associée à l'échantillon et approuver manuellement le résultat comme négatif ou le laisser non valide. Si une valeur Ct est requise : - répéter l'amplification de l'échantillon élué avec une dilution à 1:10 dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, lors d'une session d'analyse « PCR Only » (PCR seulement). - répéter l'extraction de l'échantillon avec une dilution à 1:10 dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, lors d'une session d'analyse « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

Tableau 54

Taux anormalement élevé de résultats positifs dans la même session d'analyse (réactions avec des valeurs Ct tardives similaires)	
Causes possibles	**Solutions**
Contamination inter-échantillons pendant les étapes pré-analytiques.	Nettoyer la micropipette à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 3 % (eau de Javel) fraîchement préparée ou d'un agent de nettoyage de l'ADN/ARN après le pipetage de chaque échantillon. Ne pas utiliser de pipettes Pasteur. Les pipettes doivent être de type à déplacement positif ou être utilisées avec des cônes dotés d'un filtre pour les aérosols. Introduire les échantillons dans les dernières positions des instruments, comme indiqué par la GUI. Suivre la séquence de chargement indiquée par le logiciel.
Contamination environnementale du laboratoire.	Nettoyer toutes les surfaces en contact avec l'opérateur et les échantillons (y compris les pipettes) à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium (eau de Javel) à 3 % fraîchement préparée ou d'un agent de nettoyage de l'ADN/ARN. Effectuer un cycle de décontamination U.V. Utiliser un nouveau tube de Q-PCR Mix et/ou de Contrôle interne

MyGenius PRO

Tableau 55

Réaction du Q-PCR Standard, courbe d'étalonnage ou réaction du Contrôle positif non valide	
Causes possibles	**Solutions**
Erreur de paramétrage de l'instrument.	Vérifier les volumes du Q-PCR Mix, des étalons Q-PCR Standards et du Contrôle Positif. Il est important que les tubes utilisés sur MyGenius PRO n'aient pas été utilisés auparavant par d'autres plateformes ou pour des sessions de configuration sur des plateformes ouvertes, car l'instrument lit l'étiquette et attribue automatiquement le nombre maximal de réplicats pouvant être exécutés si ce tube n'a jamais été chargé sur MyGenius PRO. Par conséquent, en cas d'utilisation d'un tube qui n'est pas nouveau, le volume peut ne pas être suffisant.
Dégradation du PCR Mix.	Ne pas utiliser le Q-PCR Mix pendant plus de 7 heures dans le carrousel ou pendant plus de 3 heures dans le carrousel plus de cinq fois. Ne pas laisser le Q-PCR Mix à température ambiante pendant plus de 30 minutes. Utiliser un nouveau tube de Q-PCR Mix.
Dégradation des étalons Q-PCR Standards ou du Contrôle positif.	Ne pas utiliser le Q-PCR Standard pendant plus de 4 sessions d'analyse indépendantes (de 2 heures chacune dans le carrousel). Ne pas utiliser le Contrôle positif pendant plus de 4 sessions d'analyse indépendantes (de 3 heures chacune dans le carrousel). Utiliser de nouveaux tubes de Q-PCR Standards ou du Contrôle positif.
Erreur de l'instrument.	Contacter le service technique d'ELITechGroup.

Tableau 56

Réaction du Contrôle négatif non valide	
Causes possibles	**Solutions**
Erreur de paramétrage de l'instrument.	Vérifier les volumes du Q-PCR Mix et du Contrôle négatif. Il est important que les tubes utilisés sur MyGenius PRO n'aient pas été utilisés auparavant par d'autres plateformes ou pour des sessions de configuration sur des plateformes ouvertes, car l'instrument lit l'étiquette et attribue automatiquement le nombre maximal de réplicats pouvant être exécutés si ce tube n'a jamais été chargé sur MyGenius PRO. Par conséquent, en cas d'utilisation d'un tube qui n'est pas nouveau, le volume peut ne pas être suffisant.
Contamination du Contrôle négatif.	Ne pas utiliser le Contrôle négatif pour plus d'une (1) session d'analyse et sur une durée de plus de 8 heures. Utiliser un nouveau tube du Contrôle négatif.
Contamination du PCR Mix.	Utiliser un nouveau tube de Q-PCR Mix.
Contamination de la zone d'extraction, des racks, du « Inventory Block » (Gestionnaire de stocks) ou de la Cooler Unit.	Nettoyer les surfaces avec des détergents aqueux, laver les blouses de laboratoire, remplacer les tubes et les cônes utilisés.
Erreur de l'instrument.	Contacter le service technique d'ELITechGroup.

Tableau 57

Réaction de l'échantillon non valide	
Causes possibles	**Solutions**
Erreur de paramétrage de l'instrument.	Vérifier les volumes du Q-PCR Mix, du Contrôle interne et des échantillons. Il est important que les tubes utilisés sur MyGenius PRO n'aient pas été utilisés auparavant par d'autres plateformes ou pour des sessions de configuration sur des plateformes ouvertes, car l'instrument lit l'étiquette et attribue automatiquement le nombre maximal de réplicats pouvant être exécutés si ce tube n'a jamais été chargé sur MyGenius PRO. Par conséquent, en cas d'utilisation d'un tube qui n'est pas nouveau, le volume peut ne pas être suffisant.
Dégradation du PCR Mix.	Ne pas utiliser le Q-PCR Mix pendant plus de 7 heures dans le carrousel ou pendant plus de 3 heures dans le carrousel plus de cinq fois. Ne pas laisser le Q-PCR Mix à température ambiante pendant plus de 30 minutes. Utiliser un nouveau tube de Q-PCR Mix.
Dégradation de la matrice du Contrôle interne.	Ne pas utiliser le Contrôle interne sur une durée de plus de 8 heures. Utiliser un nouveau tube du Contrôle interne.
Inhibition due à des substances interférentes dans l'échantillon.	Répéter l'extraction et l'amplification de l'échantillon. Répéter l'extraction et l'amplification de l'échantillon avec une dilution à 1:2 dans de l'eau de qualité biologie moléculaire.
Concentration trop élevée de la cible dans l'échantillon ou échantillon montrant une anomalie du signal de fluorescence.	Si une valeur Ct est requise, répéter l'extraction et l'amplification de l'échantillon avec une dilution à 1:10 dans de l'eau de qualité biologie moléculaire.
Erreur de l'instrument.	Contacter le service technique d'ELITechGroup.

Tableau 58

Courbe de dissociation anormale	
Causes possibles	**Solutions**
Absence de pic défini. Pic défini mais Tm différente de celles des autres échantillons et de celle des étalons ou du Contrôle positif.	Vérifier que la valeur Ct de la cible est inférieure à 30. Une grande quantité de produit d'amplification à la fin de la réaction peut interférer avec l'analyse de la courbe de fusion. Répéter l'extraction et l'amplification de l'échantillon pour confirmer la présence d'une cible comportant une éventuelle mutation. La cible dans l'échantillon doit être séquencée pour confirmer la mutation.

Tableau 59

Erreur de calcul de la valeur Ct	
Causes possibles	**Solutions**
Concentration trop élevée de la cible dans l'échantillon ou échantillon montrant une anomalie du signal de fluorescence.	En cas d'apparition d'une amplification significative sur la courbe de PCR, le résultat doit être considéré comme positif. Si aucune amplification n'apparaît sur la courbe de PCR, le résultat doit être considéré comme négatif ou non valide. Si une valeur Ct est requise, répéter l'extraction et l'amplification de l'échantillon avec une dilution à 1:10 dans de l'eau de qualité biologie moléculaire.

Tableau 60

Taux anormalement élevé de résultats positifs dans la même session d'analyse (réactions avec des valeurs Ct tardives similaires)	
Causes possibles	**Solutions**
Contamination inter-échantillons pendant les étapes pré-analytiques.	Nettoyer la micropipette à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 3 % (eau de Javel) fraîchement préparée ou d'un agent de nettoyage de l'ADN/ARN après le pipetage de chaque échantillon. Ne pas utiliser de pipettes Pasteur. Les pipettes doivent être de type à déplacement positif ou être utilisées avec des cônes dotés d'un filtre pour les aérosols. Introduire les échantillons comme les derniers de la journée.
Contamination environnementale du laboratoire.	Nettoyer toutes les surfaces en contact avec l'opérateur et les échantillons (y compris les pipettes) à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium (eau de Javel) à 3 % fraîchement préparée ou d'un agent de nettoyage de l'ADN/ARN. Effectuer un cycle de décontamination U.V. Utiliser un nouveau tube de Q-PCR Mix et/ou de Contrôle interne

Plateforme ouverte

Tableau 61

Réaction du Q-PCR Standard, courbe d'étalonnage ou réaction du Contrôle positif non valide	
Causes possibles	**Solutions**
Distribution incorrecte dans les puits de la microplaque.	Vérifier les volumes du PCR Mix, des étalons Q-PCR Standards et du Contrôle Positif distribués dans la microplaque de Q-PCR.
Dégradation du Q-PCR Mix.	Ne pas congeler et décongeler le PCR Mix plus de 5 fois. Ne pas laisser le Q-PCR Mix à température ambiante pendant plus de 30 minutes. Utiliser un nouveau tube de Q-PCR Mix.
Dégradation des étalons Q-PCR Standards ou du Contrôle positif.	Ne pas congeler et décongeler l'étalon Q-PCR Standard plus de 4 fois. Utiliser de nouveaux tubes de Q-PCR Standards ou du Contrôle positif.
Erreur de paramétrage de l'instrument.	Vérifier la position du PCR Mix, des étalons Q-PCR Standards et du Contrôle positif sur l'instrument. Vérifier le paramétrage du cycle thermique sur l'instrument.

Tableau 62

Réaction du Contrôle négatif non valide	
Causes possibles	**Solutions**
Erreur de paramétrage de l'instrument.	Vérifier la position du Q-PCR Mix et du Contrôle négatif. Vérifier les volumes du Q-PCR Mix et du Contrôle négatif.
Microplaque mal scellée.	Prendre des précautions lors du scellage de la microplaque de Q-PCR avec le film adhésif optique.
Contamination du Contrôle négatif.	Ne pas utiliser le Contrôle négatif pour plus d'une (1) session d'analyse. Utiliser une nouvelle aliquote d'eau de qualité biologie moléculaire.

Tableau 62 (continued)

Réaction du Contrôle négatif non valide	
Causes possibles	**Solutions**
Contamination du PCR Mix.	Utiliser un nouveau tube de Q-PCR Mix.
Contamination de la zone de préparation, des racks et de la micropipette.	Nettoyer les surfaces et les instruments avec des détergents aqueux, laver les blouses de laboratoire, remplacer les tubes à essai et les cônes utilisés.

Tableau 63

Réaction de l'échantillon non valide	
Causes possibles	**Solutions**
Erreur de paramétrage de l'instrument.	Vérifier la position du Q-PCR Mix, du Contrôle interne et de l'échantillon. Vérifier les volumes du Q-PCR Mix, du Contrôle interne et de l'échantillon.
Dégradation du PCR Mix.	Ne pas congeler et décongeler le PCR Mix plus de cinq fois. Ne pas laisser le Q-PCR Mix à température ambiante pendant plus de 30 minutes. Utiliser un nouveau tube de Q-PCR Mix
Dégradation de la matrice du Contrôle interne.	Utiliser un nouveau tube du Contrôle interne.
Inhibition due à des substances interférentes dans l'échantillon.	Répéter l'amplification de l'échantillon élué avec une dilution à 1:2 dans de l'eau de qualité biologie moléculaire. Répéter l'extraction de l'échantillon avec une dilution à 1:2 dans de l'eau de qualité biologie moléculaire.

Tableau 64

Fluorescence de bruit de fond irrégulière ou élevée dans les réactions	
Causes possibles	**Solutions**
Distribution incorrecte de l'échantillon.	Vérifier les volumes des réactifs et des échantillons distribués dans la microplaque de Q-PCR.
Erreur de paramétrage de la référence.	Si la plage de calcul pour la référence définie du cycle 6 au cycle 15 n'est pas appropriée pour normaliser le bruit de fond, définir la plage de calcul dans les cycles où la fluorescence de bruit de fond s'est déjà stabilisée (vérifier Results > Component [Résultats > Composant]) et la fluorescence cible n'a pas encore commencé à augmenter.

Tableau 65

Courbe de dissociation anormale	
Causes possibles	**Solutions**
Absence de pic défini. Pic défini mais différent de celui des autres échantillons et de celui des étalons ou du Contrôle positif.	Vérifier que la valeur Ct de la cible est inférieure à 30. Une grande quantité de produit d'amplification à la fin de la réaction peut interférer avec l'analyse de la courbe de fusion. Répéter l'amplification de l'échantillon pour confirmer la présence d'une cible comportant une éventuelle mutation. La cible dans l'échantillon doit être séquencée pour confirmer la mutation.

19 LÉGENDE DES SYMBOLES

REF	Numéro de référence.
	Limite supérieure de température.
LOT	Code de lot.
	Date de péremption (dernier jour du mois).
IVD	Dispositif médical de diagnostic *in vitro*.
CE 0123	Conforme aux exigences du Règlement IVDR 2017/746/CE relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*. Certification délivrée par TÜV SÜD Product Service GmbH, Allemagne.
UDI	Identifiant unique de dispositif
	Contenu suffisant pour << N >> tests.
	Consulter le mode d'emploi.
CONT	Contenu.
	Tenir à l'abri de la lumière du soleil.
	Fabricant.

20 AVIS AUX UTILISATEURS

Tout incident grave lié au dispositif doit être signalé au fabricant ainsi qu'à l'autorité compétente de l'état membre dans lequel réside l'utilisateur et/ou le patient. Pour informer le fabricant de ce dispositif, ELITechGroup S.p.A., utiliser l'adresse e-mail suivante : egspa.vigilance@elitechgroup.com.

Un « Résumé de la sécurité et des performances » sera mis à la disposition du public via la base de données européenne sur les dispositifs médicaux (Eudamed) lorsque ce système informatique sera fonctionnel. Avant la publication de l'avis de fonctionnalité complète d'Eudamed, le « Résumé de la sécurité et des performances » sera mis à la disposition du public sur demande par e-mail, à l'adresse emd.support@elitechgroup.com, dans les meilleurs délais.

21 NOTE POUR L'ACQUÉREUR : LICENCE LIMITÉE

Ce produit contient des réactifs fabriqués par Promega Corporation et fournis à ELITechGroup S.p.A. pour être utilisés exclusivement en tant que composants des kits de diagnostic de marque ELITech. Les réactifs ne doivent être utilisés que dans le cadre de ce kit. Aucun droit ni aucune licence supplémentaire, explicite ou implicite, n'est concédé(e) pour quelque utilisation, modification ou revente que ce soit des réactifs en dehors du cadre de ce kit.

Les réactifs de détection ELITe MGB® et les plateformes ELITech (ELITe InGenius®, ELITe BeGenius®, MyGenius PRO®) sont protégés par des brevets obtenus et en cours d'obtention.

Toute utilisation des réactifs ou des données afférentes en dehors du cadre de ce kit nécessite l'autorisation écrite préalable de ELITechGroup S.p.A.

Les réactifs de détection ELITe MGB® sont couverts par un ou plusieurs des brevets américains numéros 7319022, 7348146, 7541454, 7671218, 7723038, 7767834, 8163910, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529 et par les brevets EP numéros 2689031, 2714939, 2736916, 2997161, ainsi que par des demandes de brevet actuellement en instance.

Les technologies ELITe InGenius®, ELITe BeGenius®et MyGenius PRO® ont couverte par des brevets et des demandes en instance.

Cette licence limitée permet à la personne ou à l'entité à laquelle ce produit a été fourni d'utiliser le produit, ainsi que les données générées par son utilisation, uniquement à des fins de diagnostic humain. Ni ELITechGroup S.p.A. ni ses concédants n'accordent d'autres licences, explicites ou implicites, à d'autres fins.

MGB®, Eclipse Dark Quencher®, AquaPhluor®, ELITe MGB®, le logo ELITe MGB®, ELITe InGenius®, ELITe BeGenius® et MyGenius PRO® (registration name ELIVERSE®) sont des marques déposées d'ELITechGroup au sein de l'Union européenne.
QIAsymphony® est une marque déposée de QIAGEN GmbH.
Ficoll® est une marque déposée de GE Healthcare Bio-Sciences AB.

Appendix A BKV ELITe MGB Kit utilisé en association avec les plateformes Genius series ®



ATTENTION

Ce document est une version simplifiée du mode d'emploi officiel. Veuillez vous reporter au document complet avant toute utilisation : www.elitechgroup.com

Application

Le produit **BKV ELITe MGB® Kit** est un dispositif médical de diagnostic *in vitro* destiné à être utilisé par les professionnels de santé en tant que test quantitatif de PCR en temps réel des acides nucléiques pour la détection et la quantification de **l'ADN du polyomavirus BK (BKV) humain** extrait d'échantillons cliniques.

Le test est validé en association avec les instruments **ELITe InGenius®** et **ELITe BeGenius®**, des systèmes intégrés et automatisés d'extraction, de PCR en temps réel et d'interprétation des résultats, en utilisant des échantillons humains de plasma prélevé sur EDTA, d'urine collectée sans conservateurs et de sang total prélevé sur EDTA.

Le test est également validé en association avec l'instrument **MyGenius PRO®** (nom d'enregistrement ELIVERSE®), un système intégré et automatisé d'extraction, de PCR en temps réel et d'interprétation des résultats, en utilisant des échantillons humains de plasma prélevé sur EDTA et d'urine collectée sans conservateurs.

Le test est également validé en association avec l'instrument **ELITe GALAXY**, un système automatisé d'extraction et de paramétrage de PCR, et la plateforme de PCR en temps réel **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**, en utilisant des échantillons humains de plasma prélevé sur EDTA.

Le produit est destiné à être utilisé en tant qu'aide au diagnostic et à la surveillance des infections par le BKV chez les patients suspectés de présenter une infection ou surveillés pour une infection par le BKV.

Les résultats doivent être interprétés en association avec l'ensemble des observations cliniques pertinentes et des résultats du laboratoire.

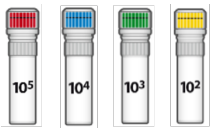
Séquence amplifiée

Séquence	Gène	Fluorophore	Canal
Cible	Gène du grand antigène T	FAM	BKV
Contrôle Interne	Bêta globine	AP525	IC

Matrice validée

- **Plasma** prélevé sur EDTA
- **Urine** sans conservateurs
- **Sang total** prélevé sur EDTA

Contenu du kit et produits associés

BKV ELITe MGB Kit	BKV ELITe Standard	BKV- ELITe Positive Control
 X 4	 X 2	 X 2
PCR Mix prêt à l'emploi 4 tubes de 540 µL 96 réactions par kit 5 cycles de congélation/ décongélation par tube, utilisé à bord de l'instrument	4 niveaux prêts à l'emploi : 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 2 jeu de 4 tubes de 200 µL 8 réactions par kit 4 cycles de congélation/décongélation par tube, utilisé à bord de l'instrument	CP prêt à l'emploi 2 tubes de 160 µL 8 réactions par kit 4 cycles de congélation/ décongélation par tube, utilisé à bord de l'instrument

Durée de conservation maximale : **24 mois**

Température de stockage : **-20 °C**

Autres produits requis non inclus dans le kit

• Instrument ELITe InGenius : INT030. • Instrument ELITe BeGenius : INT040. • ELITe InGenius SP 200 : INT032SP200.	• CPE – Internal Control : CTRCPE Consommables pour les **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** (se reporter au mode d'emploi des instruments ELITe InGenius et ELITe BeGenius)

Protocole avec les ELITe InGenius et ELITe BeGenius

› Volume d'échantillon › Volume de CPE › Volume d'élution total	200 µl (InGenius et BeGenius) 10 µl 100 µl	› Input volume (volume initial) de PCR › Volume de Q-PCR Mix › Fréquence des contrôles › Fréquence de l'étalonnage	20 µl 20 µl 15 jours 60 jours

Performances de ELITe InGenius et ELITe BeGenius

Matrice	Limite de détection		Spécificité diagnostique	Sensibilité diagnostique	Linéarité (UI/ml)		Facteur de conversion (UI/copies)
	UI/ml	copies/ml			UI/ml	copies/ml	
Plasma	215 UI/ml	165 copies/ml	96,2 %	100 %	215→ 13,0 x 10^7	165→ 10,0 x 10^7	1,3
Urine	142 UI/ml	89 copies/ml	100 %	100 %	142→ 16,0 x 10^7	89→ 10,0 x 10^7	1,6
Sang total	538 UI/mL	117 copies/mL	100 %	100 %	538→ 46,0 x 10^7	117→ 10,0 x 10^7	4,6

Préparation de l'échantillon

Ce produit est destiné à être utilisé sur les **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** avec les échantillons cliniques suivants, identifiés selon les directives de laboratoire, et prélevés, transportés et conservés dans les conditions suivantes :

Type d'échantillon	Exigences de prélèvement	Conditions de transport/conservation			
		+16/+26 °C (température ambiante)	+2/+8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Plasma	EDTA	≤ 1 j	≤ 3 j	≤ 30 j	≤ 30 j
Urine	sans conservateurs	≤ 4 heures	≤ 1 j	≤ 30 j	≤ 30 j
Sang total	EDTA	≤ 1 j	≤ 3 j	≤ 30 j	≤ 30 j

EDTA, acide éthylènediaminetétraacétique ; j, jour.

Procédures ELITe InGenius

L'interface graphique (GUI) du logiciel ELITe InGenius guide l'utilisateur, étape par étape, pour paramétrer l'analyse. Toutes les étapes, à savoir l'extraction, la PCR en temps réel et l'interprétation des résultats, sont effectuées automatiquement. Deux modes de fonctionnement sont disponibles : analyse complète « Extract + PCR » (Extraction + PCR) ou « PCR Only » (PCR seulement).

Avant l'analyse

1. Mettre le ELITe InGenius en marche. Se connecter avec le nom d'utilisateur et le mot de passe. Sélectionner le mode « Closed » (Fermé).	**2.** Vérifier les calibrateurs : **Q-PCR Standard** dans le menu « Calibration » (Étalonnage). Vérifier les contrôles : **Positive Control** et **Negative Control** dans le menu « Controls » (Contrôles). Remarque : tous les contrôles doivent avoir été analysés, approuvés et ne pas être expirés.	**3.** Décongeler les tubes de **PCR Mix** et de **CTRCPE**. Agiter délicatement au vortex. Centrifuger pendant 5 s.

Procédure 1 - Analyse complète : Extract + PCR (Extraction + PCR) (par ex. échantillons)

1. Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) sur l'écran tactile puis cliquer sur le mode d'analyse « Extract + PCR » (Extraction + PCR)	**2.** Insérer le « Sample Rack » (Compartiment des échantillons) avec les échantillons à code-barres dans la Cooler Unit. La lecture des code-barres est déjà active	**3.** Vérifier les volumes d'extraction : Initial : « 200 µL », Éluat : « 100 µL »
4. Sélectionner le « Assay Protocol » (Protocole de test) d'intérêt BKV ELITe_PL_200_100 ou BKV ELITe_U_200_100 ou BKV ELITe_WB_200_100 **Remarque :** Si une deuxième extraction est exécutée, répéter les étapes 2 à 4	**5.** Imprimer les étiquettes à code-barres pour les apposer sur les tubes d'élution vides. Charger les tubes dans le « Elution Rack » (Rack d'élution) et insérer ce dernier dans la Cooler Unit	**6.** Charger le PCR Mix et le Internal Control (Contrôle interne) dans le Reagent/Elution Rack (Rack de réactifs/d'élution), puis insérer ce dernier dans la Cooler Unit
7. Charger le « PCR Rack » (Portoir de PCR) avec la « PCR Cassette » (Cassette de PCR) et le « Extraction Rack » (Rack d'extraction) avec les cartouches d'extraction « ELITe InGenius SP 200 » et les consommables d'extraction requis	**8.** Fermer le tiroir. Démarrer le cycle	**9.** Visualiser, approuver et enregistrer les résultats

NOTE!

Si le mode « Extract Only » (Extraction seulement) est nécessaire, se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument pour prendre connaissance de la procédure.

Procédure 2 : PCR Only (PCR seulement) (par ex. éluats, étalons, contrôles)

1. Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) sur l'écran tactile	**2.** Vérifier les volumes d'extraction : Initial : « 200 µL », élution : « 100 µL »	**3.** Scanner les codes-barres des échantillons à l'aide du lecteur de codes-barres portable ou saisir l'ID de l'échantillon
4. Sélectionner le « Assay Protocol » (Protocole de test) d'intérêt : BKV ELITe_PC et BKV ELITe_NC, ou BKV ELITe_STD, ou BKV ELITe_PL_200_100, BKV ELITe_U_200_100 ou BKV ELITe_WB_200_100	**5.** Sélectionner la méthode « PCR Only » (PCR seulement) et la position de l'échantillon « Elution Tube » (Tube d'élution)	**6.** Charger le PCR Mix dans le « Inventory Block » (Gestionnaire de stocks)
7. Charger : le rack de PCR Cassette (Cassette de PCR) et le rack de tubes d'élution avec l'acide nucléique extrait	**8.** Fermer le tiroir. Démarrer le cycle	**9.** Visualiser, approuver et enregistrer les résultats

Procédures ELITe BeGenius

L'interface graphique (GUI) du logiciel ELITe BeGenius guide l'utilisateur, étape par étape, pour paramétrer l'analyse. Toutes les étapes, à savoir l'extraction, la PCR en temps réel et l'interprétation des résultats, sont effectuées automatiquement. Deux modes de fonctionnement sont disponibles : analyse complète « Extract + PCR » (Extraction + PCR) ou « PCR Only » (PCR seulement).

Avant l'analyse

1. Mettre le ELITe BeGenius en marche. Se connecter avec le nom d'utilisateur et le mot de passe. Sélectionner le mode « Closed » (Fermé).	**2.** Vérifier les calibrateurs : **Q-PCR Standard** dans le menu « Calibration » (Étalonnage). Vérifier les contrôles : **Positive Control** et **Negative Control** dans le menu « Controls » (Contrôles). Remarque : tous les contrôles doivent avoir été analysés, approuvés et ne pas être expirés.	**3.** Décongeler les tubes de **PCR Mix** et de **CTRCPE**. Agiter délicatement au vortex. Centrifuger pendant 5 s.

Procédure 1 - Analyse complète : Extract + PCR (Extraction + PCR) (par ex. échantillons)

1. Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) sur l'écran tactile puis cliquer sur le mode d'analyse « Extract + PCR » (Extraction + PCR)	**2.** Insérer le « Sample Rack » (Compartiment des échantillons) avec les échantillons à code-barres dans la Cooler Unit. La lecture des code-barres est déjà active	**3.** Vérifier les volumes d'extraction : Initial : « 200 µL », Éluat : « 100 µL »
4. Sélectionner le « Assay Protocol » (Protocole de test) d'intérêt BKV ELITe_Be_PL_200_100 ou BKV ELITe_Be_U_200_100 ou BKV ELITe_WB_200_100 **Remarque :** Si une deuxième extraction est exécutée, répéter les étapes 2 à 4	**5.** Imprimer les étiquettes à code-barres pour les apposer sur les tubes d'élution vides. Charger les tubes dans le « Elution Rack » (Rack d'élution) et insérer ce dernier dans la Cooler Unit	**6.** Charger le PCR Mix et le Internal Control (Contrôle interne) dans le Reagent/Elution Rack (Rack de réactifs/d'élution), puis insérer ce dernier dans la Cooler Unit
7. Charger le « PCR Rack » (Portoir de PCR) avec la « PCR Cassette » (Cassette de PCR) et le « Extraction Rack » (Rack d'extraction) avec les cartouches d'extraction « ELITe InGenius SP 200 » et les consommables d'extraction requis	**8.** Fermer le tiroir. Démarrer le cycle	**9.** Visualiser, approuver et enregistrer les résultats

NOTE!
Si le mode « Extract Only » (Extraction seulement) est nécessaire, se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument pour prendre connaissance de la procédure.

Procédure 2 : PCR Only (PCR seulement) (par ex. éluats, étalons, contrôles)

1. Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) sur l'écran tactile	**2.** Charger les tubes à code-barres contenant les acides nucléiques extraits ou les contrôles/calibrateurs dans le Elution Rack (Rack d'élution), puis insérer ce dernier dans la Cooler Unit.	**3.** Pour les étalons et les contrôles : pour chaque « Position », saisir le « Reagent name » (Nom du réactif) et le « S/N » (numéro de série), le « Lot No. » (numéro de lot), la « Exp.Date » (date de péremption) et le « T/R » (nombre de réactions). Pour les éluats : pour chaque « Position », saisir le « Sample ID » (ID échantillon), la « Sample Matrix » (Matrice d'échantillon), le « Extraction kit » (Kit d'extraction) et le « Extracted eluate vol. » (volume d'éluat extrait).
4. Sélectionner le « Assay Protocol » (Protocole de test) d'intérêt : BKV ELITe_PC et BKV ELITe_NC, ou BKV ELITe_STD, ou BKV ELITe_PL_200_100 ou BKV ELITe_U_200_100	**5.** Charger le PCR Mix dans le Reagent/Elution Rack (rack de réactifs/d'élution) et l'insérer dans la Cooler Unit. Charger les embouts avec filtre et le PCR Rack (rack de PCR) avec la « PCR Cassette » (cassette de PCR).	**6.** Fermer le tiroir. Démarrer le cycle.
7 Visualiser, approuver et enregistrer les résultats.		

Appendix B BKV ELITe MGB Kit utilisé en association avec MyGenius PRO



ATTENTION

Ce document est une version simplifiée du mode d'emploi officiel. Veuillez vous reporter au document complet avant toute utilisation : www.elitechgroup.com

Application

Le produit **BKV ELITe MGB® Kit** est un dispositif médical de diagnostic *in vitro* destiné à être utilisé par les professionnels de santé en tant que test quantitatif de PCR en temps réel des acides nucléiques pour la détection et la quantification de **l'ADN du polyomavirus BK (BKV) humain** extrait d'échantillons cliniques.

Le test est validé en association avec les instruments **ELITe InGenius®** et **ELITe BeGenius®**, des systèmes intégrés et automatisés d'extraction, de PCR en temps réel et d'interprétation des résultats, en utilisant des échantillons humains de plasma prélevé sur EDTA, d'urine collectée sans conservateurs et de sang total prélevé sur EDTA.

Le test est également validé en association avec l'instrument **MyGenius PRO®** (nom d'enregistrement ELIVERSE®), un système intégré et automatisé d'extraction, de PCR en temps réel et d'interprétation des résultats, en utilisant des échantillons humains de plasma prélevé sur EDTA et d'urine collectée sans conservateurs.

Le test est également validé en association avec l'instrument **ELITe GALAXY**, un système automatisé d'extraction et de paramétrage de PCR, et la plateforme de PCR en temps réel **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**, en utilisant des échantillons humains de plasma prélevé sur EDTA.

Le produit est destiné à être utilisé en tant qu'aide au diagnostic et à la surveillance des infections par le BKV chez les patients suspectés de présenter une infection ou surveillés pour une infection par le BKV.

Les résultats doivent être interprétés en association avec l'ensemble des observations cliniques pertinentes et des résultats du laboratoire.

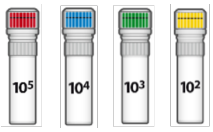
Séquence amplifiée

Séquence	Gène	Fluorophore	Canal
Cible	Gène du grand antigène T	FAM	BKV
Contrôle Interne	Bêta globine	AP525	IC

Matrice validée

- **Plasma** prélevé sur EDTA
- **Urine** sans conservateurs

Contenu du kit et produits associés

BKV ELITe MGB Kit	BKV ELITe Standard	BKV- ELITe Positive Control
 X 4	 X 2	 X 2
PCR Mix prêt à l'emploi 4 tubes de 540 µL 96 réactions par kit 5 cycles de congélation/ décongélation par tube, utilisé à bord de l'instrument	4 niveaux prêts à l'emploi : 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 2 jeu de 4 tubes de 200 µL 8 réactions par kit 4 cycles de congélation/décongélation par tube, utilisé à bord de l'instrument	CP prêt à l'emploi 2 tubes de 160 µL 8 réactions par kit 4 cycles de congélation/ décongélation par tube, utilisé à bord de l'instrument

Durée de conservation maximale : **24 mois**

Température de stockage : **-20 °C**

Autres produits requis non inclus dans le kit

- **MyGenius PRO** (EG SpA réf. : INT050)
- **MyGenius PRO Software** version BB-04 (ou versions ultérieures)
- **Extraction Cartridge** (EG SpA réf. : INT052SP)
- **Negative Control** (EG SpA, réf. CTRNEG)
- **Internal Control Maxi** (EG SpA, réf. ICMAXI)
- Consommables pour le **MyGenius PRO** (se reporter au mode d'emploi de l'instrument MyGenius PRO)

Protocole MyGenius PRO

› Volume d'échantillon › Volume de IC › Volume d'élution total	200 µL 10 µL 100 µL	› Input volume (volume initial) de PCR › Volume de Q-PCR Mix › Fréquence des contrôles › Fréquence de l'étalonnage	20 µL 20 µL 15 jours 60 jours

Performances - MyGenius PRO

Matrice	Limite de détection		Sensibilité diagnostique	Spécificité diagnostique	Linéarité (UI/ml)		Facteur de conversion (UI/copies)
	UI/ml	copies/ml			UI/ml	copies/ml	
urine	142	89	100 %	100 %	142→ 16,0 x 10^7	89→ 10,0 x 10^7	1,6
Plasma	215 UI/mL	165 copies/ mL	96,2 %	100 %	215→ 13,0 x 10^7	165→ 10,0 x 10^7	1,3

Préparation de l'échantillon

Ce produit est destiné à être utilisé sur l'instrument **MyGenius PRO** avec les échantillons cliniques suivants, identifiés selon les directives du laboratoire, et prélevés, transportés et conservés dans les conditions ci-dessous.

Type d'échantillon	Exigences de prélèvement	Conditions de transport/conservation			
		+16/+26 °C (température ambiante)	**+2/+8 °C**	**-20 ± 10 °C**	**-70 ± 15 °C**
Urine	sans conservateurs	≤ 4 heures	≤ 1 j	≤ 30 j	≤ 30 j
Plasma	EDTA	≤ 1 j	≤ 3 j	≤ 30 j	≤ 30 j

j, jour.

Procédures MyGenius PRO

L'interface graphique (GUI) du logiciel MyGenius PRO guide l'utilisateur, étape par étape, pour paramétrer l'analyse. Toutes les étapes, à savoir l'extraction, la PCR en temps réel et l'interprétation des résultats, sont effectuées automatiquement. Deux modes de fonctionnement sont disponibles : analyse complète « Extract + PCR » (Extraction + PCR) ou « PCR Only » (PCR seulement) (uniquement pour les calibrateurs et les contrôles).

1. Allumer **MyGenius PRO**. Se connecter en mode **VEILLE** avec le nom d'utilisateur et le mot de passe.	**2.** Charger tous les consommables dans les tiroirs et vider le réservoir de déchets liquides et les bacs à déchets solides si nécessaire. Appuyer sur le bouton « Start » (Début) pour effectuer la préparation : au terme de la préparation, l'instrument passera en mode Fonctionnement.	**3.** Vérifier les calibrateurs : **Q-PCR Standard** dans le menu « Calibration » (Étalonnage). Vérifier les contrôles : **Positive Control** and **Negative Control** dans le menu « Controls » (Contrôles) Remarque : tous les contrôles doivent avoir été analysés, approuvés et ne pas être expirés.

4. Décongeler les tubes de **PCR Mix** e d'**IC MAXI**. Agiter délicatement au vortex. Centrifuger pendant 5 s.	**5.** Charger les tubes de mélanges PCR dans le carrousel à réactifs en suivant les indications de l'interface graphique (GUI).	**6.**Charger le(s) tube(s) IC MAXI dans le portoir dédié bleu et le charger dans la zone de l'échantillonneur automatique.
7a. Si l'instrument est connecté au LIS, insérer les échantillons dans la zone de l'échantillonneur automatique au moyen des portoirs dédiés en fonction du diamètre des tubes utilisés. L'extraction démarre automatiquement. **7b**. Si l'instrument n'est pas connecté au LIS, dans la liste des échantillons, appuyer sur « Assign test » (Assigner test), lire le code-barres des échantillons à l'aide du lecteur de code-barres externe, sélectionner la matrice d'urine et assigner le protocole de test (Assay protocol) « BKV ELITe_My_U_IU_200_100 » ou « BKV ELITe_My_U_cmL_200_100 », insérer les échantillons dans la zone de l'échantillonneur automatique en utilisant les portoirs dédiés en fonction du diamètre des tubes utilisés. L'extraction démarre automatiquement.		

Appendix C BKV ELITe MGB Kit utilisé en association avec l'instrument ABI 7500



ATTENTION

Ce document est une version simplifiée du mode d'emploi officiel. Veuillez vous reporter au document complet avant toute utilisation : www.elitechgroup.com

Application

Le produit **BKV ELITe MGB® Kit** est un dispositif médical de diagnostic *in vitro* destiné à être utilisé par les professionnels de santé en tant que test quantitatif de PCR en temps réel des acides nucléiques pour la détection et la quantification de **l'ADN du polyomavirus BK (BKV) humain** extrait d'échantillons cliniques.

Le test est validé en association avec les instruments **ELITe InGenius®** et **ELITe BeGenius®**, des systèmes intégrés et automatisés d'extraction, de PCR en temps réel et d'interprétation des résultats, en utilisant des échantillons humains de plasma prélevé sur EDTA, d'urine collectée sans conservateurs et de sang total prélevé sur EDTA.

Le test est également validé en association avec l'instrument **MyGenius PRO®** (nom d'enregistrement ELIVERSE®), un système intégré et automatisé d'extraction, de PCR en temps réel et d'interprétation des résultats, en utilisant des échantillons humains de plasma prélevé sur EDTA et d'urine collectée sans conservateurs.

Le test est également validé en association avec l'instrument **ELITe GALAXY**, un système automatisé d'extraction et de paramétrage de PCR, et la plateforme de PCR en temps réel **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**, en utilisant des échantillons humains de plasma prélevé sur EDTA.

Le produit est destiné à être utilisé en tant qu'aide au diagnostic et à la surveillance des infections par le BKV chez les patients suspectés de présenter une infection ou surveillés pour une infection par le BKV.

Les résultats doivent être interprétés en association avec l'ensemble des observations cliniques pertinentes et des résultats du laboratoire.

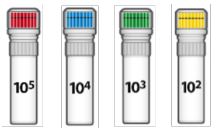
Séquence amplifiée

Séquence	Gène	Fluorophore	Canal
Cible	Gène du grand antigène T	FAM	BKV
Contrôle Interne	Bêta globine	AP525	IC

Matrices validées

- **Plasma** prélevé sur EDTA

Contenu du kit et produits associés

BKV ELITe MGB Kit	BKV ELITe Standard	BKV- ELITe Positive Control
 X 4	 X 2	 X 2
PCR Mix prêt à l'emploi 4 tubes de 540 µL 100 réactions par kit 5 cycles de congélation/ décongélation par tube	4 niveaux prêts à l'emploi : 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 2 jeu de 4 tubes de 200 µL 16 réactions par kit 8 cycles de congélation/décongélation par tube	CP prêt à l'emploi 2 tubes de 160 µL 12 réactions par kit 8 cycles de congélation/ décongélation par tube

Durée de conservation maximale : **24 mois**

Température de stockage : **-20 °C**

Autres produits requis non inclus dans le kit

- **ELITe GALAXY :** INT020
- **ELITe GALAXY 300 extraction kit :** INT021EX
- **ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**
- CPE – Internal Control : CTRCPE
- Eau de qualité biologie moléculaire

Performances avec l'instrument 7500 Real-Time PCR Instrument

Matrice	Limite de détection	Spécificité diagnostique	Sensibilité diagnostique	Linéarité (UI/mL),	Facteur de conversion UI/mL en copies/mL	Facteur de conversion copies/mL en UI/mL
Plasma	779 UI/mL	100 %	100 %	41→ 4,1*10^7	4,1	143,5 x Quantité

Procédures avec l'instrument 7500 Real-Time PCR Instrument

La procédure ci-dessous résume les principales étapes de l'analyse des échantillons avec le flux de travail de PCR conventionnel : systèmes d'extraction validés, paramètres de l'instrument de PCR, paramétrage de la PCR et interprétation des résultats.

Extraction - Systèmes validés

Extraction	Matrice validée	Volume d'échantillon traité	Volume minimum d'échantillon	Volume d'éluat total	Volume du Contrôle interne CPE
ELITe Galaxy	Plasma	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL

Amplification - Paramètres de l'instrument 7500 Fast Dx

1. Mettre le thermocycleur en marche
2. Paramétrer le détecteur « BKV » avec « FAM » et le désactivateur avec « none » (aucun)
3. Paramétrer le détecteur « Internal Control » (Contrôle interne) avec « VIC » et le désactivateur avec « none » (aucun)
4. Paramétrer la fluorescence passive en tant que « Cy5 »

5. Paramétrer le profil thermique comme indiqué. L'acquisition de la fluorescence doit être paramétrée lors de l'étape d'hybridation à 60 °C

Étape	Température	Temps
Décontamination	50 °C	2 min
Dénaturation	94 °C	2 min
Amplification	94 °C	10 s
Détection	60 °C	30 s
45 cycles	72 °C	20 s

L'analyse de la courbe de fusion est facultative ; se reporter au mode d'emploi complet

Amplification - Paramétrage de la PCR

Pour procéder au paramétrage de la session d'analyse de PCR :

1. Décongeler les tubes de Q-PCR Mix et de Contrôle positif/Q-PCR standard
2. Mélanger délicatement et centrifuger
3. Préparer le **Contrôle négatif** (non fourni)
4. préparer une **microplaque de Q-PCR**
5. L'instrument effectue automatiquement le paramétrage de la PCR en distribuant, dans chaque puits de la **microplaque de Q-PCR** : **20 µL** de **PCR Mix** et **20 µL** d'**ADN extrait**/**Q-PCR Standard**/**Contrôles**

Une fois le paramétrage de la PCR effectué par l'instrument :

1. sceller la **microplaque de Q-PCR** avec un film adhésif optique
2. transférer la **microplaque de Q-PCR** sur l'instrument **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** et lancer la PCR. Enregistrer le fichier d'analyse avec un nom unique et reconnaissable (p. ex., « année-mois-jour-CIBLE-EGSpA »)

Amplification - Seuil pour l'analyse quantitative

Instrument	FAM BKV	Contrôle interne VIC
7500 Fast Dx Real Time PCR	0,2	0,1

Interprétation

Résultats qualitatifs

Valeur Ct BKV	Valeur Ct Contrôle interne	Interprétation
Déterminé	–	Positif
Indéterminé	Ct ≤ 35	Négatif
	Ct > 35 ou Indéterminé	Non valide

Résultats quantitatifs

La valeur Ct du BKV obtenue pour chaque échantillon et la courbe d'étalonnage générée sont utilisées pour calculer la quantité d'ADN cible dans la réaction
La quantification des échantillons est comprise entre environ 10 et 10^6 copies/réaction ou entre environ 41 et 4,1 x 10^7 UI/mL

ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185, 10149 Torino ITALY
Tél. +39-011 976 191
E-mail : emd.support@elitechgroup.com
Site internet : www.elitechgroup.com