

cobas[®] **BKV**

Test quantitatif des acides nucléiques à utiliser avec les cobas[®] 5800/6800/8800 Systems

Pour une utilisation en diagnostic *in vitro*

cobas[®] **BKV**

P/N: 09040960190

À utiliser avec le système cobas[®] 5800

cobas[®] **EBV/BKV Control Kit**

P/N: 09040951190

cobas[®] **Buffer Negative Control Kit**

P/N: 09051953190

À utiliser avec les systèmes cobas[®] 6800/8800

cobas[®] **EBV/BKV Control Kit**

P/N: 08688214190 ou
P/N: 09040951190

cobas[®] **Buffer Negative Control Kit**

P/N: 07002238190 ou
P/N: 09051953190

Table des matières

Usage prévu	5
Résumé et explication du test.....	5
Réactifs et matériel	8
Réactifs et contrôles cobas® BKV	8
Réactifs cobas omni pour préparation des échantillons.....	11
Conditions de manipulation et de stockage des réactifs	12
Conditions de manipulation des réactifs pour le cobas® 5800 System.....	12
Conditions de manipulation des réactifs pour les cobas® 6800/8800 Systems.....	13
Matériel supplémentaire nécessaire pour le cobas® 5800 System	14
Matériel supplémentaire nécessaire pour les cobas® 6800/8800 Systems	15
Instruments et logiciels nécessaires	16
Précautions et conditions de manipulation	17
Avertissements et précautions.....	17
Manipulation des réactifs.....	18
Bonnes pratiques de laboratoire.....	18
Prélèvement, transport et conservation des échantillons	19
Échantillons de plasma EDTA.....	19
Échantillons urinaires	20
Instructions d'utilisation	22
Notes de procédure	22
Exécution du test cobas® BKV sur le cobas® 5800 System	22
Exécution du test cobas® BKV sur les cobas® 6800/8800 Systems.....	24

Résultats	25
Contrôle qualité et validité des résultats sur le cobas ® 5800 System.....	25
Résultats des contrôles sur le cobas ® 5800 System	25
Contrôle qualité et validité des résultats sur les cobas ® 6800/8800 Systems.....	26
Interprétation des résultats	27
Interprétation des résultats du cobas ® 5800 System	27
Interprétation des résultats sur les cobas ® 6800/8800 Systems	28
Limites du test.....	28
 Évaluation des performances non cliniques	 29
Principales caractéristiques de performance pour le type d'échantillon Plasma EDTA sur les cobas ® 6800/8800 Systems.....	29
Limite de détection (LoD) pour le standard international de l'OMS.....	29
Domaine de linéarité.....	30
Précision intra-laboratoire	31
Vérification de sous-type.....	32
Spécificité.....	32
Spécificité analytique.....	32
Spécificité analytique - substances interférentes	34
Corrélation de la méthode.....	34
Échec complet du système.....	35
Contamination croisée.....	35
Principales caractéristiques de performance pour le type d'échantillon urine sur les cobas ® 6800/8800 Systems.....	36
Limite de détection (LoD) pour le standard international de l'OMS.....	36
Domaine de linéarité.....	37
Précision intra-laboratoire	38
Vérification de sous-type.....	39

Spécificité.....	39
Spécificité analytique.....	39
Spécificité analytique - substances interférentes	40
Corrélation de la méthode.....	42
Contamination croisée.....	42

Évaluation des performances cliniques réalisée sur les cobas® 6800/8800

Systems..... 43

Reproductibilité du test cobas® BKV pour les échantillons de plasma EDTA	43
Performance du test cobas® BKV pour les échantillons de plasma EDTA	44
Reproductibilité du test cobas® BKV pour les échantillons d'urine stabilisée	46
Performance du test cobas® BKV pour les échantillons d'urine stabilisée.....	47
Équivalence des systèmes/comparaison des systèmes.....	50

Informations supplémentaires 51

Caractéristiques clés du test	51
Symboles.....	52
Assistance technique.....	53
Fabricant et importateur	53
Marques commerciales et brevets	53
Copyright.....	53
Références.....	54
Révision du document.....	55

Usage prévu

Le test **cobas**® BKV est un test *in vitro* d'amplification des acides nucléiques pour le dosage quantitatif de l'ADN du virus BK (BKV) dans le plasma EDTA humain et dans l'urine stabilisée dans le **cobas**® PCR Media.

Dans le plasma EDTA, le test **cobas**® BKV est destiné à contribuer au diagnostic et au traitement du BKV chez les patients receveurs de greffe. Pour les patients sous surveillance du BKV dans le plasma EDTA, des mesures d'ADN en série peuvent être effectuées pour indiquer le besoin d'éventuels changements de traitement et pour évaluer la réponse virale au traitement.

Dans l'urine stabilisée dans le **cobas**® PCR Media, le test **cobas**® BKV est destiné à contribuer au diagnostic et au traitement du BKV chez les patients receveurs de greffe.

Les résultats du test **cobas**® BKV doivent être interprétés en tenant compte de tous les résultats cliniques et de laboratoire pertinents.

Le test **cobas**® BKV n'est pas destiné au dépistage dans le sang ou les produits sanguins.

Résumé et explication du test

Contexte

Les receveurs de greffe encourent un risque accru de nombreuses infections virales et bactériennes qui sont plus susceptibles de provoquer de graves effets néfastes sur la santé de la population des receveurs de greffe que sur celle de la population générale en bonne santé. Ce risque accru est en partie dû aux fonctions diminuées du système immunitaire en raison des médicaments immunosuppresseurs que prennent les patients receveurs de greffe pour réduire la probabilité de rejet du greffon.^{1,2}

Le virus BK (BKV) est un petit virus (~5 kb) à acide désoxyribonucléique (ADN) non enveloppé appartenant à la famille des polyomavirus. Il existe quatre grands sous-types de BKV, dont le sous-type I est le plus souvent détecté (80 %), suivi du sous-type IV (15 %).³ La séroprévalence du BKV est > 80 % dans la population générale adulte en bonne santé.⁴ Chez les personnes immunocompétentes, le BKV n'est pas associé à une pathologie significative. Cependant, les infections par le BKV peuvent provoquer de graves maladies cliniques chez les personnes immunodéprimées, y compris les receveurs de greffe.⁵

Les infections par le BKV se manifestent le plus fréquemment au niveau des reins et du tractus urinaire. Après l'infection primaire, le virus reste latent dans l'épithélium des tubules rénaux et l'épithélium urétéral et peut être réactivé chez les individus immunodéprimés. Les patients receveurs de transplantation rénale présentent un risque plus élevé de complications associées au BKV que les receveurs d'autres types de greffe, y compris la néphropathie à polyomavirus (NPV) et la sténose urétérale. La NPV touche jusqu'à 10 % des receveurs de transplantation rénale et la transplantation du greffon échouera chez environ 50 % des patients affectés par la NPV. De plus, environ 3 % des receveurs de transplantation rénale développent une sténose urétérale associée au BKV.⁵ Les receveurs de greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) présentent également des complications associées au BKV plus fréquemment, le plus souvent sous forme de cystites hémorragiques (CH). Entre 5 et 15 % des patients receveurs de greffe de CSH présentent une CH.¹

Les directives recommandent une surveillance régulière du BKV chez les patients receveurs de transplantation rénale jusqu'à 5 ans après la transplantation.⁶ Cette approche de surveillance permet d'identifier 80 à 90 % des patients présentant

un risque de NPV. L'analyse du plasma pour la virémie BKV est recommandée dans la stratégie d'identification des patients présentant un risque accru de NPV, soit comme test de confirmation pour les patients chez lesquels la virurie BKV a été détectée, soit comme modalité de test primaire pour le dépistage de routine.⁶ Il n'existe actuellement aucune recommandation pour la surveillance de routine du BKV chez les patients receveurs de greffe de CSH et le test est recommandé en premier lieu pour l'évaluation des patients présentant une hématurie et les symptômes cliniques d'une cystite. Cependant, un niveau d'ADN du BKV supérieur à 10 000 copies/mL est associé à un risque accru de CH chez les patients receveurs de greffe.⁷

Pour les patients receveurs de transplantation rénale présentant une élévation persistante des niveaux d'ADN du BKV plasmatique, souvent définie comme une mesure supérieure à 10 000 copies/mL, l'analyse du BKV dans le plasma est recommandée toutes les 1 à 2 semaines jusqu'à ce que le niveau d'ADN soit indétectable pour deux mesures consécutives.

De nombreux tests de laboratoire pour le dosage quantitatif du BKV ne sont pas standardisés, ce qui entraîne une variabilité inter-laboratoire et inter-analyse élevée.^{6,7} En outre, les constituants de l'urine peuvent provoquer une agrégation de BKV, ce qui peut également avoir un impact sur la variabilité quantitative.^{8,9} Une évaluation formelle de la reproductibilité et de la validité des niveaux d'ADN du BKV est essentielle pour assurer des résultats cohérents (quel que soit le laboratoire dans lequel l'analyse a été réalisée) pour le traitement clinique des patients présentant des maladies liées au BKV.

Bien que le seuil viral exact médicalement pertinent soit toujours sujet à débat en raison de la variabilité inter-analyse, le concept de seuil critique semble valide et a été rapporté dans des études de l'histoire naturelle démontrant que les niveaux élevés d'ADN du BKV sont associées à un risque accru de développement de NPV et de CH.^{6,7}

Pourquoi employer les tests d'amplification génétique ?

La sérologie du polyomavirus n'est pas utilisée habituellement dans les environnements médicaux ; elle n'a de valeur que pour déterminer si un patient a déjà été infecté par le BKV et s'il présente un risque de réactivation. Les méthodes de culture du virus demandent un délai d'exécution long et, comme elles sont semi-quantitatives, leur utilisation est limitée chez les patients immunodéprimés pour lesquels de faibles niveaux de virus sont fréquents. La détection directe de l'ADN du BKV par les méthodes de PCR en temps réel peut offrir un large domaine de linéarité, une précision élevée ainsi qu'une sensibilité et une spécificité optimales lors de l'utilisation chez les patients receveurs de greffe.

Explication du test

Le test **cobas**® BKV est un test quantitatif exécuté sur les **cobas**® 5800/6800/8800 Systems. Le test **cobas**® BKV permet la détection et la quantification de l'ADN du BKV dans le plasma EDTA et dans l'urine stabilisée dans le **cobas**® PCR Media de patients infectés. Le niveau d'ADN du BKV est quantifié par rapport à un standard de quantification d'ADN non-BKV (DNA-QS), qui est introduit dans chaque échantillon lors du traitement des échantillons. Le DNA-QS permet également de surveiller l'ensemble du processus de préparation des échantillons et d'amplification par PCR. En outre, le test utilise trois contrôles : un contrôle positif de titre élevé, un contrôle positif de titre faible et un contrôle négatif. Les contrôles externes positif haut et positif bas sont obtenus par dilution à partir du matériel de stock avec un titre conforme au standard international de l'OMS pour le BKV. Chaque lot de kits d'amplification/de détection est calibré conformément au standard international de l'OMS pour le BKV.

Principes de la procédure

Le test **cobas**® BKV repose sur la préparation entièrement automatisée des échantillons (extraction et purification des acides nucléiques) suivie de l'amplification par PCR et de la détection. Le **cobas**® 5800 System est conçu sous la forme d'un instrument intégré. Les **cobas**® 6800/8800 Systems sont composés du module de chargement des échantillons, du module de transfert, du module de traitement et du module analytique. La gestion automatisée des données est réalisée par le logiciel **cobas**® 5800 System ou le **cobas**® 6800/8800 System, lequel attribue à chaque test l'un des résultats suivants : cible non détectée, ADN du BKV détecté < LLoQ (limite de quantification inférieure), ADN du BKV détecté > ULoQ (limite de quantification supérieure) ou valeur dans le domaine de linéarité LLoQ < x < ULoQ. Les résultats peuvent être consultés directement sur l'écran du système, exportés ou imprimés sous forme de rapports.

Les acides nucléiques des échantillons de patient et des molécules de DNA-QS lambda ajoutées sont extraits simultanément. L'acide nucléique viral est libéré par l'ajout de protéinase et de réactif de lyse à l'échantillon. L'acide nucléique libéré se lie à la surface des particules magnétiques de verre (silice) ajoutées. Les substances non liées et les impuretés, telles que les protéines dénaturées, les débris cellulaires et les inhibiteurs potentiels de PCR, sont éliminées lors d'étapes suivantes utilisant des réactifs de lavage, et l'acide nucléique purifié est séparé des particules de verre à l'aide d'un tampon d'élution à température élevée.

L'amplification sélective de l'acide nucléique cible dans l'échantillon est effectuée à l'aide d'une approche double-cible spécifique au virus dans des régions hautement conservées du BKV, situées dans la région de l'antigène petit t du BKV et dans la région VP2 du BKV. L'amplification sélective du DNA-QS est effectuée à l'aide d'amorces sens et antisens spécifiques à la séquence, sélectionnées de manière à ne présenter aucune homologie avec le génome du BKV. Une enzyme ADN polymérase thermostable est utilisée pour l'amplification. Les séquences cibles et DNA-QS sont amplifiées simultanément à l'aide d'un profil d'amplification par PCR universel composé de paliers de température et d'un nombre de cycles prédéfinis. Le master mix comprend de la désoxyuridine triphosphate (dUTP) à la place de la désoxythymidine triphosphate (dTTP), incorporée dans l'ADN nouvellement synthétisé (amplicon).¹⁰⁻¹² Tout amplicon contaminant provenant de runs de PCR précédents est éliminé par l'enzyme AmpErase, laquelle est incluse dans le mélange PCR, lorsqu'il est chauffé au cours de la première étape de thermocyclage. Toutefois, les amplicons nouvellement formés ne sont pas éliminés, car l'enzyme AmpErase est désactivée une fois exposée à une température supérieure à 55 °C.

Le master mix de **cobas**® BKV contient deux sondes de détection spécifiques aux séquences cibles de BKV et une sonde spécifique au DNA-QS. Les sondes sont marquées au moyen de fluorophores rapporteurs spécifiques des cibles permettant la détection simultanée de cible de BKV et de DNA-QS dans deux canaux cibles différents.^{13, 14} Le signal fluorescent des sondes intactes est supprimé par un fluorophore quencher. Lors de l'étape d'amplification par PCR, l'hybridation de la sonde aux matrices d'ADN monocaténaire spécifiques entraîne un clivage par l'activité nucléase 5' à 3' de l'ADN polymérase, ce qui conduit à une séparation du fluorophore rapporteur et du fluorophore quencher et à la génération d'un signal fluorescent. À chaque cycle PCR, des quantités croissantes de sondes clivées sont générées et le signal cumulatif du fluorophore rapporteur est intensifié simultanément. La détection et la discrimination en temps réel des produits PCR sont effectuées en mesurant la fluorescence des fluorophores rapporteurs libérés pour les cibles virales et le DNA-QS.

Réactifs et matériel

Réactifs et contrôles cobas® BKV

Le matériel fourni pour le test cobas® BKV est décrit dans le Tableau 1. Le matériel nécessaire mais non fourni est décrit du Tableau 2 au Tableau 4 et du Tableau 8 au Tableau 10.

Consulter les sections **Réactifs et matériel** et **Précautions et conditions de manipulation** pour obtenir des informations sur les dangers en lien avec le produit.

Tableau 1 cobas® BKV

cobas® BKV

Conserver à 2-8 °C

Cassette de 192 tests (P/N 09040960190)

Composants du kit	Ingrédients du réactif	Quantité par kit 192 tests
Solution de protéinase (PASE)	Tampon Tris, < 0,05 % EDTA, chlorure de calcium, acétate de calcium, 8 % de protéinase, glycérol EUH210 : Fiche de données de sécurité disponible sur demande. EUH208 : Contient de la subtilisine de <i>Bacillus subtilis</i> . Peut produire une réaction allergique.	22,3 mL
Standard de quantification d'ADN (DNA QS)	Tampon Tris, < 0,05 % d'EDTA, < 0,001 % de construction d'ADN non-BKV contenant un site de liaison aux amorces non-BKV et un site unique de liaison à la sonde (ADN non infectieux), < 0,002 % d'ARN Poly rA (synthétique), < 0,1 % d'azoture de sodium	21,2 mL
Tampon d'éluion (EB)	Tampon Tris, 0,2 % de 4-hydroxybenzoate de méthyle	21,2 mL
Réactif 1 de master mix (MMX-R1)	Acétate de manganèse, hydroxyde de potassium, < 0,1 % d'azoture de sodium	7,5 mL
Réactif 2 du master mix BKV (BKV MMX-R2)	Tampon de tricine, acétate de potassium, < 18 % de sulfoxyde de diméthyle, glycérol, < 0,1 % de Tween 20, EDTA, < 0,12 % de dATP, dCTP, dGTP, dUTP, < 0,01 % d'amorces d'amont et d'aval de BKV, < 0,01 % d'amorces sens et antisens de standard de quantification, < 0,01 % de sondes oligonucléotidiques marquées par fluorescence spécifiques au BKV et au standard de quantification du BKV, < 0,01 % d'aptamère d'oligonucléotide, < 0,01 % d'ADN polymérase Z05D, < 0,10 % d'enzyme (microbienne) AmpErase (uracil-N-glycosylase), < 0,1 % d'azoture de sodium	9,7 mL

Tableau 2 cobas® EBV/BKV Control Kit**cobas® EBV/BKV Control Kit**

Conserver à 2-8 °C

À utiliser avec le système cobas® 5800 (P/N 09040951190)

À utiliser avec les systèmes cobas® 6800/8800 (P/N 08688214190 et P/N 09040951190)

Composants du kit	Ingrédients du réactif	Quantité par kit	Symboles de sécurité et avertissements*
Contrôle positif bas de EBV/BKV (EBV/BKV L(+))C)	< 0,001 % d'ADN (plasmidique) synthétique de BKV encapsulé dans la protéine d'enveloppe bactériophage lambda, plasma humain normal, ADN du BKV non détectable par les méthodes de PCR 0,1 % de conservateur ProClin® 300**	4 mL (8 × 0,5 mL)	 <p>AVERTISSEMENT</p> <p>H317 : Peut provoquer une allergie cutanée. H412 : Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme. P261 : Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. P273 : Éviter le rejet dans l'environnement. P280 : Porter des gants de protection. P333 + P313 : En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : consulter un médecin. P362 + P364 : Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. P501 : Éliminer le contenu/récipient dans une installation d'élimination des déchets agréée. 55965-84-9 Masse réactionnelle de : 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one et 2-méthyl-2H -isothiazol-3-one (3:1).</p>
Contrôle positif haut de EBV/BKV (EBV/BKV H(+))C)	< 0,001 % d'ADN (plasmidique) synthétique de BKV encapsulé dans la protéine d'enveloppe bactériophage lambda, plasma humain normal, ADN du BKV non détectable par les méthodes de PCR 0,1 % de conservateur ProClin® 300**	4 mL (8 × 0,5 mL)	 <p>AVERTISSEMENT</p> <p>H317 : Peut provoquer une allergie cutanée. H412 : Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme. P261 : Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. P273 : Éviter le rejet dans l'environnement. P280 : Porter des gants de protection. P333 + P313 : En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : consulter un médecin. P362 + P364 : Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. P501 : Éliminer le contenu/récipient dans une installation d'élimination des déchets agréée. 55965-84-9 Masse réactionnelle de : 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one et 2-méthyl-2H -isothiazol-3-one (3:1).</p>

* Les mentions de sécurité du produit sont conformes en premier lieu au SGH de l'UE.

** Substance dangereuse.

Tableau 3 cobas® Buffer Negative Control Kit**cobas® Buffer Negative Control Kit**

Conserver à 2-8 °C

À utiliser avec le système cobas® 5800 (P/N 09051953190)

À utiliser avec les systèmes cobas® 6800/8800 (P/N 07002238190 et P/N 09051953190)

Composants du kit	Ingrédients du réactif	Quantité par kit
cobas® Buffer Negative Control (BUF (-) C)	Tampon Tris, < 0,1 % d'azoture de sodium, EDTA, 0,002 % d'ARN Poly rA (synthétique)	16 mL (16 × 1 mL)

Réactifs cobas omni pour préparation des échantillons

Tableau 4 Réactifs **cobas omni** pour préparation des échantillons

Réactifs	Ingrédients du réactif	Quantité par kit	Symboles de sécurité et avertissements*
cobas omni MGP Reagent (MGP) Conserver à 2-8 °C (P/N 06997546190)	Particules magnétiques de verre, tampon Tris, 0,1 % de 4-hydroxybenzoate de méthyle, < 0,1 % d'azoture de sodium	480 tests	Non applicable
cobas omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Conserver à 2-8 °C (P/N 06997511190)	Tampon Tris, 0,1 % de 4-hydroxybenzoate de méthyle, < 0,1 % d'azoture de sodium	4 × 875 mL	Non applicable
cobas omni Lysis Reagent (LYS) Conserver à 2-8 °C (P/N 06997538190)	43 % (m/m) de thiocyanate de guanidinium**, 5 % (m/v) de polidocanol**, 2 % (m/v) de dithiothréitol**, citrate de sodium dihydraté EUH032 : Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique.	4 × 875 mL	 <p>DANGER</p> <p>H303 + H332 : Nocif en cas d'ingestion ou par inhalation. H314 : Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. H411 : Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme. P273 : Éviter le rejet dans l'environnement. P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. P303 + P361 + P353 : EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau. P304 + P340 + P310 : EN CAS D'INHALATION : transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON/un médecin. P305 + P351 + P338 + P310 : EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON/un médecin. P391 : Recueillir le produit déversé. 593-84-0 Thiocyanate de guanidinium 9002-92-0 Polidocanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercaptobutane-2,3-diol</p>
cobas omni Wash Reagent (WASH) Conserver à 15-30 °C (P/N 06997503190)	Citrate de sodium dihydraté, 0,1 % de 4-hydroxybenzoate de méthyle	4,2 L	Non applicable

* Les mentions de sécurité du produit sont conformes en premier lieu au SGH de l'UE.

** Substances ou mélanges dangereux.

Conditions de manipulation et de stockage des réactifs

Les réactifs doivent être stockés et manipulés comme spécifié dans le Tableau 5, le Tableau 6 et le Tableau 7.

Lorsque les réactifs ne sont pas chargés sur le **cobas**® 5800 System ou les **cobas**® 6800/8800 Systems, ils doivent être stockés à la température spécifiée dans le Tableau 5.

Tableau 5 Stockage des réactifs (lorsque le réactif n'est pas sur le système)

Réactif	Température de stockage
cobas ® BKV	2-8 °C
cobas ® EBV/BKV Control Kit	2-8 °C
cobas ® Buffer Negative Control Kit	2-8 °C
cobas omni Lysis Reagent	2-8 °C
cobas omni MGP Reagent	2-8 °C
cobas omni Specimen Diluent	2-8 °C
cobas omni Wash Reagent	15-30 °C

Conditions de manipulation des réactifs pour le **cobas**® 5800 System

Les réactifs chargés sur le **cobas**® 5800 System sont stockés à des températures appropriées et leur date de péremption est surveillée par le système. Le système ne permet l'utilisation des réactifs que si toutes les conditions indiquées dans le Tableau 6 sont remplies. Le système empêche automatiquement l'utilisation de réactifs périmés. Le Tableau 6 permet à l'utilisateur de comprendre les conditions de manipulation des réactifs appliquées par le **cobas**® 5800 System.

Tableau 6 Conditions de péremption des réactifs appliquées par le **cobas**® 5800 System

Réactif	Date de péremption du kit	Stabilité de kit ouvert	Nombre de runs possibles avec ce kit	Stabilité à bord
cobas ® BKV	Date non passée	90 jours à partir de la première utilisation	40 runs max.	36 jours max.**
cobas ® EBV/BKV Control Kit	Date non passée	Non applicable*	Non applicable	36 jours max.**
cobas ® Buffer Negative Control Kit	Date non passée	Non applicable*	Non applicable	36 jours max.**
cobas omni Lysis Reagent	Date non passée	30 jours à partir du chargement**	Non applicable	Non applicable
cobas omni MGP Reagent	Date non passée	30 jours à partir du chargement**	Non applicable	Non applicable
cobas omni Specimen Diluent	Date non passée	30 jours à partir du chargement**	Non applicable	Non applicable
cobas omni Wash Reagent	Date non passée	30 jours à partir du chargement**	Non applicable	Non applicable

* Réactifs à usage unique.

** Durée mesurée à partir du premier chargement du réactif sur le **cobas**® 5800 System.

Conditions de manipulation des réactifs pour les cobas® 6800/8800 Systems

Les réactifs chargés sur les cobas® 6800/8800 Systems sont stockés à des températures appropriées et leur date de péremption est surveillée par le système. Les cobas® 6800/8800 Systems ne permettent l'utilisation des réactifs que si toutes les conditions indiquées dans le Tableau 7 sont remplies. Le système empêche automatiquement l'utilisation de réactifs périmés. Le Tableau 7 permet à l'utilisateur de comprendre les conditions de manipulation des réactifs appliquées par les cobas® 6800/8800 Systems.

Tableau 7 Conditions de péremption des réactifs appliquées par les cobas® 6800/8800 Systems

Réactif	Date de péremption du kit	Stabilité de kit ouvert	Nombre de runs possibles avec ce kit	Stabilité à bord (cumul du temps à bord, en dehors du réfrigérateur)
cobas® BKV	Date non passée	90 jours à partir de la première utilisation	40 runs max.	40 heures max.
cobas® EBV/BKV Control Kit	Date non passée	Non applicable ^a	Non applicable	8 heures max.
cobas® Buffer Negative Control Kit	Date non passée	Non applicable ^a	Non applicable	10 heures max.
cobas omni Lysis Reagent	Date non passée	30 jours à partir du chargement*	Non applicable	Non applicable
cobas omni MGP Reagent	Date non passée	30 jours à partir du chargement*	Non applicable	Non applicable
cobas omni Specimen Diluent	Date non passée	30 jours à partir du chargement*	Non applicable	Non applicable
cobas omni Wash Reagent	Date non passée	30 jours à partir du chargement*	Non applicable	Non applicable

^a Réactifs à usage unique.

* Durée mesurée à partir du premier chargement du réactif sur les cobas® 6800/8800 Systems.

Matériel supplémentaire nécessaire pour le cobas® 5800 System

Tableau 8 Matériel et consommables à utiliser sur le **cobas® 5800 System**

Matériel	P/N
cobas omni Processing Plate 24	08413975001
cobas omni Amplification Plate 24	08499853001
cobas omni Liquid Waste Plate 24	08413983001
Embout CORE TIPS avec filtre, 1 mL	04639642001
Embout CORE TIPS avec filtre, 300 µL	07345607001
cobas omni Liquid Waste Container	07094388001
cobas omni Lysis Reagent	06997538190
cobas omni MGP Reagent	06997546190
cobas omni Specimen Diluent	06997511190
cobas omni Wash Reagent	06997503190
Sac à déchets solides ou Sac à déchets solides avec insert	07435967001 ou 08030073001
Tubes secondaires cobas omni 13 × 75 (en option)	06438776001
cobas® PCR Media Secondary Tube Kit*	07958048190
cobas® PCR Media Tube Replacement Cap Kit	07958056190
cobas® PCR Media Disposable Tube Stand (en option)	07958064190
MPA RACK 16 MM LIGHT GREEN 7001-7050*,**	03143449001
RD5 RACK - Rack standard RD 0001-0050 LR*,**	11902997001
Portoir de tubes à 16 positions*	09224319001
Portoir de racks à 5 positions*	09224475001

* Contactez votre représentant Roche local pour obtenir une liste de commande détaillée des racks d'échantillons.

** Il est préférable d'utiliser des racks 16 mm MPA ou des portoirs de tubes à 16 positions pour les échantillons prélevés dans des tubes de **cobas®** PCR Media.

Matériel supplémentaire nécessaire pour les cobas® 6800/8800 Systems

Tableau 9 Matériel et consommables à utiliser sur les cobas® 6800/8800 Systems

Matériel	P/N
cobas omni Processing Plate	05534917001
cobas omni Amplification Plate	05534941001
cobas omni Pipette Tips	05534925001
cobas omni Liquid Waste Container	07094388001
cobas omni Lysis Reagent	06997538190
cobas omni MGP Reagent	06997546190
cobas omni Specimen Diluent	06997511190
cobas omni Wash Reagent	06997503190
Sac à déchets solides et réservoir à déchets solides ou Sac à déchets solides avec insert et kit tiroir	07435967001 et 07094361001 ou 08030073001 et 08387281001
Tubes secondaires cobas omni 13 × 75 (en option)	06438776001
cobas ® PCR Media Secondary Tube Kit*	07958048190
cobas ® PCR Media Tube Replacement Cap Kit	07958056190
cobas ® PCR Media Disposable Tube Stand (en option)	07958064190
MPA RACK 16 MM LIGHT GREEN 7001-7050*,**	03143449001

* Contacter le représentant Roche local pour obtenir une liste détaillée de références de racks échantillons, racks pour embouts à filtre et plateaux de racks acceptés sur les instruments.

** Il est préférable d'utiliser des racks 16 mm MPA pour les échantillons prélevés dans des tubes de **cobas**® PCR Media.

Tableau 10 Kits de prélèvement des échantillons urinaires utilisés avec **cobas**® BKV

Kit de prélèvement	P/N
cobas ® PCR Urine Sample Kit	05170486190
cobas ® PCR Media Kit	06466281190

Remarque : le kit d'échantillonnage urinaire **cobas**® PCR Urine Sample Kit est utilisé pour collecter et transporter des échantillons d'urine. Chaque kit d'échantillonnage urinaire **cobas**® PCR Urine Sample Kit contient 100 boîtes d'échantillonnage urinaire pour PCR **cobas**®. Chaque boîte contient 1 pipette jetable et 1 tube **cobas**® PCR Media, contenant 4,3 mL de **cobas**® PCR Media. Le **cobas**® PCR Media permet de transporter et de conserver les échantillons urinaires tout en stabilisant les acides nucléiques.

Pour les échantillons urinaires envoyés directement au laboratoire sans l'utilisation du **cobas**® PCR Urine Sample Kit lors du prélèvement, le kit **cobas**® PCR Media contenant 100 tubes **cobas**® PCR Media (sans pipettes jetables) peut être utilisé comme alternative, étant donné que l'urine doit être transférée dans les 24 heures suivant le prélèvement.

Instruments et logiciels nécessaires

Le logiciel **cobas**® 5800 System et les fichiers d'analyse **cobas**® BKV pour le **cobas**® 5800 System doivent être installés sur le **cobas**® 5800 Instrument. Le logiciel Data Manager et le PC pour le **cobas**® 5800 System seront fournis avec le système.

Le logiciel **cobas**® 6800/8800 et les fichiers d'analyse **cobas**® BKV doivent être installés sur le ou les instrument(s). Le serveur IG (Instrument Gateway) est livré avec le système.

Tableau 11 Instrumentation

Équipement	P/N
cobas ® 5800 System	08707464001
cobas ® 6800 System (version mobile)	05524245001 et 06379672001
cobas ® 6800 System (fixe)	05524245001 et 06379664001
cobas ® 8800 System	05412722001
Module de chargement des échantillons	06301037001

Se reporter à l'Assistance Utilisateur et/ou au guide de l'utilisateur du **cobas**® 5800 System ou des **cobas**® 6800/8800 Systems pour obtenir plus d'informations.

Remarque : contacter le représentant Roche local pour obtenir une liste détaillée de références des tubes primaires et secondaires, racks échantillons, racks pour embouts à filtre et plateaux de racks acceptés sur les instruments.

cobas® BKV accepte le tube primaire utilisé pour les types d'échantillons urinaires prélevés dans le **cobas**® PCR Media.

Précautions et conditions de manipulation

Avertissements et précautions

Comme pour le déroulement de tout test, de bonnes pratiques de laboratoire sont indispensables pour assurer la qualité de cette analyse. Du fait de la sensibilité élevée de ce test, il est indispensable d'éviter toute contamination des réactifs et des mélanges d'amplification.

- Destiné uniquement au diagnostic *in vitro*.
- L'utilisation du test **cobas® BKV** en tant que test de dépistage du BKV dans le sang ou les produits sanguins n'a pas été évaluée.
- Tous les échantillons de patient doivent être manipulés comme s'ils étaient infectieux, conformément aux bonnes pratiques de laboratoire, telles que celles mentionnées dans Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories ainsi que dans le document M29-A4 du CLSI.^{15, 16} Seul le personnel expert dans la manipulation du matériel présentant un risque biologique et l'utilisation du test **cobas® BKV** et des **cobas® 5800/6800/8800 Systems** doit effectuer cette procédure.
- Tout produit d'origine humaine doit être considéré comme potentiellement infectieux et doit être manipulé selon les précautions universelles. En cas d'éclaboussures, désinfecter immédiatement avec une solution fraîchement préparée contenant 0,6 % d'hypochlorite de sodium ou de potassium dans de l'eau distillée ou déionisée (eau de Javel ménagère diluée à 1:10) ou suivre les procédures locales appropriées.
- Le **cobas® EBV/BKV Control Kit** contient du plasma dérivé de sang humain. Le matériel source a été testé par les méthodes de PCR et a montré des traces acceptables de faibles niveaux d'ADN du BKV. Toutefois, aucune méthode de test connue ne peut garantir avec une certitude absolue que des produits dérivés de sang humain sont exempts de tout risque de transmission d'agents infectieux.
- **Ne pas congeler le sang total ni les échantillons urinaires stockés dans des tubes primaires.**
- Utiliser uniquement les consommables nécessaires fournis ou indiqués afin d'assurer des performances de test optimales.
- Les fiches de sécurité (ou SDS pour Safety Data Sheets) sont disponibles sur demande auprès de votre représentant Roche local.
- Suivre rigoureusement les procédures et les directives fournies pour assurer le bon déroulement du test. Toute déviation des procédures et directives peut affecter les performances du test.
- Il existe un risque de faux positifs si la contamination croisée des échantillons n'est pas correctement contrôlée lors de la manipulation et du traitement des échantillons.
- Le **cobas® PCR Media** (de tube d'échantillon primaire) contient du chlorhydrate de guanidine. **Éviter les contacts directs entre le chlorhydrate de guanidine et l'hypochlorite de sodium (eau de javel) ou d'autres produits hautement réactifs tels que les acides ou les basiques. Ces mélanges peuvent libérer un gaz nocif.** En cas de déversement de liquide contenant du chlorhydrate de guanidine, nettoyer avec du détergent de laboratoire adéquat et de l'eau. Si le liquide déversé contient des agents potentiellement infectieux, nettoyer la zone affectée **D'ABORD** avec du détergent de laboratoire et de l'eau, puis avec de l'hypochlorite de sodium ou de potassium à 0,6 %.
- Informez votre autorité locale compétente au sujet de tout incident grave pouvant survenir lors de l'utilisation de ce test.

Manipulation des réactifs

- Manipuler tous les réactifs, contrôles et échantillons selon les bonnes pratiques de laboratoire afin d'éviter une contamination croisée des échantillons ou des contrôles.
- Avant utilisation, inspecter visuellement chaque cassette de réactifs, diluant, réactif de lyse et réactif de lavage pour détecter tout signe de fuite. En présence de fuite, ne pas utiliser ce matériel pour le test.
- Le **cobas omni** Lysis Reagent contient du thiocyanate de guanidine, un produit chimique dangereux. Éviter tout contact des réactifs avec la peau, les yeux ou les muqueuses. En cas de contact, rincer immédiatement et abondamment à l'eau. Il existe sinon un risque de brûlure.
- Les kits de test **cobas**® BKV, le **cobas omni** MGP Reagent et le **cobas omni** Specimen Diluent contiennent de l'azote de sodium en tant que conservateur. Éviter tout contact des réactifs avec la peau, les yeux ou les muqueuses. En cas de contact, rincer immédiatement et abondamment à l'eau. Il existe sinon un risque de brûlure. Si ces réactifs sont renversés, diluer avec de l'eau avant d'essuyer.
- Éviter tout contact entre le **cobas omni** Lysis Reagent, qui contient du thiocyanate de guanidine, et la solution d'hypochlorite de sodium (eau de javel). Le mélange peut produire un gaz extrêmement toxique.
- Jeter tout le matériel qui a été en contact avec les échantillons et réactifs conformément à la réglementation nationale, fédérale, régionale et locale.

Bonnes pratiques de laboratoire

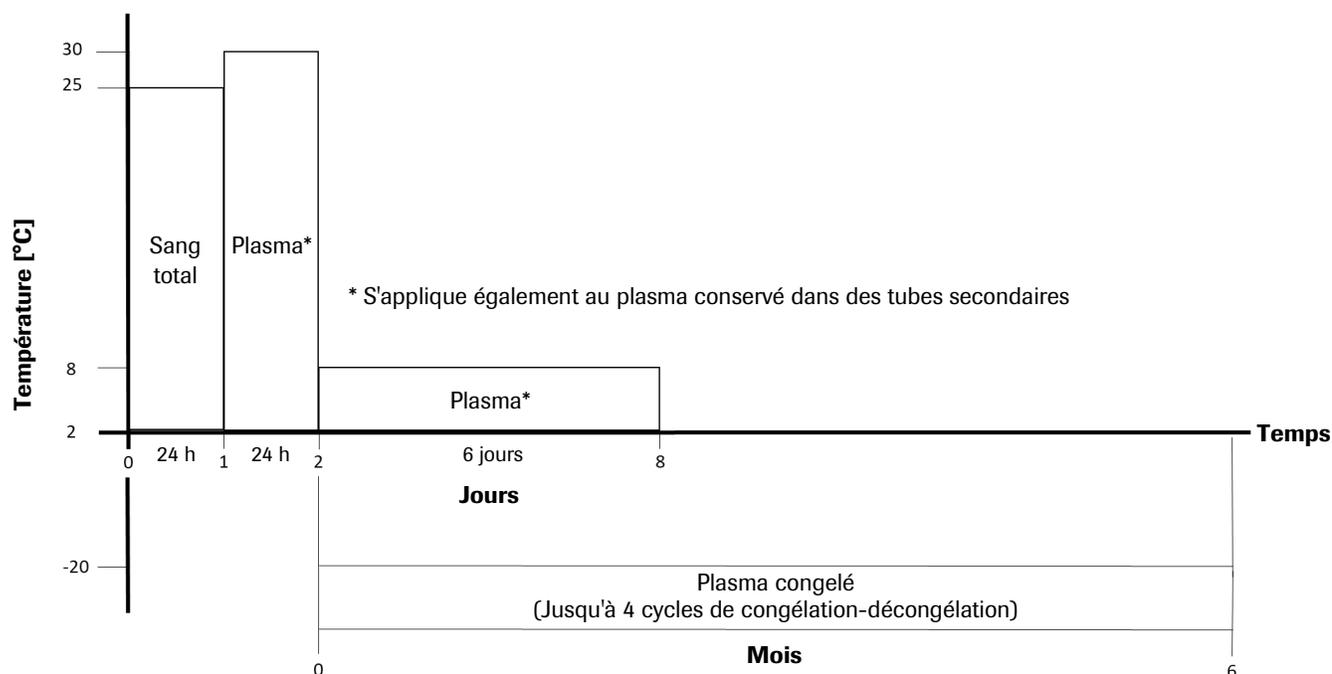
- Ne pas pipeter à la bouche.
- Ne pas manger, boire ou fumer dans les zones de travail désignées.
- Porter des gants de laboratoire, une blouse de laboratoire et des lunettes de protection lors de la manipulation d'échantillons et de réactifs. Afin d'éviter toute contamination, les gants doivent être changés entre la manipulation d'échantillons et la manipulation de réactifs des kits de test **cobas**® BKV, de contrôle positif bas de EBV/BKV (EBV/BKV L(+))C), de contrôle positif haut de EBV/BKV (EBV/BKV H(+))C), des **cobas**® Buffer Negative Control Kits et **cobas omni**. Éviter la contamination des gants lors de la manipulation des échantillons et des contrôles.
- Bien se laver les mains après la manipulation d'échantillons et de réactifs de test, et après le retrait des gants.
- Nettoyer et désinfecter soigneusement tous les plans de travail du laboratoire avec une solution fraîchement préparée d'hypochlorite de sodium ou de potassium à 0,6 % dans de l'eau distillée ou déionisée (eau de Javel ménagère diluée à 1:10). puis essuyer les surfaces avec de l'éthanol à 70 %.
- En cas d'éclaboussures sur le **cobas**® 5800 ou le **cobas**® 6800/8800 Instrument, suivre les instructions de l'Assistance Utilisateur et/ou du guide de l'utilisateur de **cobas**® 5800 System ou de **cobas**® 6800/8800 Systems afin de nettoyer et de décontaminer correctement les surfaces du ou des instruments.

Prélèvement, transport et conservation des échantillons

Remarque : manipuler tous les échantillons et contrôles comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des agents infectieux.

Échantillons de plasma EDTA

- Conserver tous les échantillons aux températures indiquées. La stabilité des échantillons est affectée par les températures élevées.
- En cas d'utilisation d'échantillons congelés dans des tubes secondaires, mettre les échantillons à température ambiante (15 à 30 °C) jusqu'à ce qu'ils soient complètement décongelés, puis les mélanger brièvement (par exemple agiter au vortex pendant 3 à 5 secondes) et les centrifuger pour regrouper le volume échantillon complet au fond du tube.
- Le sang total doit être prélevé dans des tubes de préparation du plasma BD Vacutainer® PPT™ pour les méthodes de tests de diagnostic moléculaire ou dans des tubes stériles avec de l'EDTA comme anticoagulant. Suivre les instructions du fabricant des tubes de prélèvement d'échantillons. Consultez la Figure 1.
- Le sang total prélevé dans des tubes de préparation du plasma BD Vacutainer® PPT™ pour les méthodes de tests de diagnostic moléculaire ou dans des tubes stériles avec de l'EDTA comme anticoagulant peut être conservé et/ou transporté à une température comprise entre 2 et 25 °C pendant 24 heures au maximum avant la préparation du plasma. La centrifugation doit être effectuée conformément aux instructions du fabricant.
- Après la séparation, les échantillons de plasma peuvent être conservés dans des tubes primaires ou secondaires pendant 24 heures à une température comprise entre 2 et 30 °C, puis :
 - Conservation dans des tubes primaires ou secondaires pendant une durée maximale de 6 jours à une température comprise entre 2 et 8 °C.
 - Conservation dans des tubes secondaires pendant une durée maximale de 6 mois à une température ≤ -20 °C.
- Les échantillons de plasma sont stables pendant un maximum de quatre cycles de congélation/décongélation lorsqu'ils sont conservés à une température ≤ -20 °C.
- Si les échantillons sont expédiés, ils doivent être emballés et étiquetés conformément aux réglementations nationales et internationales sur le transport d'échantillons et d'agents étiologiques.

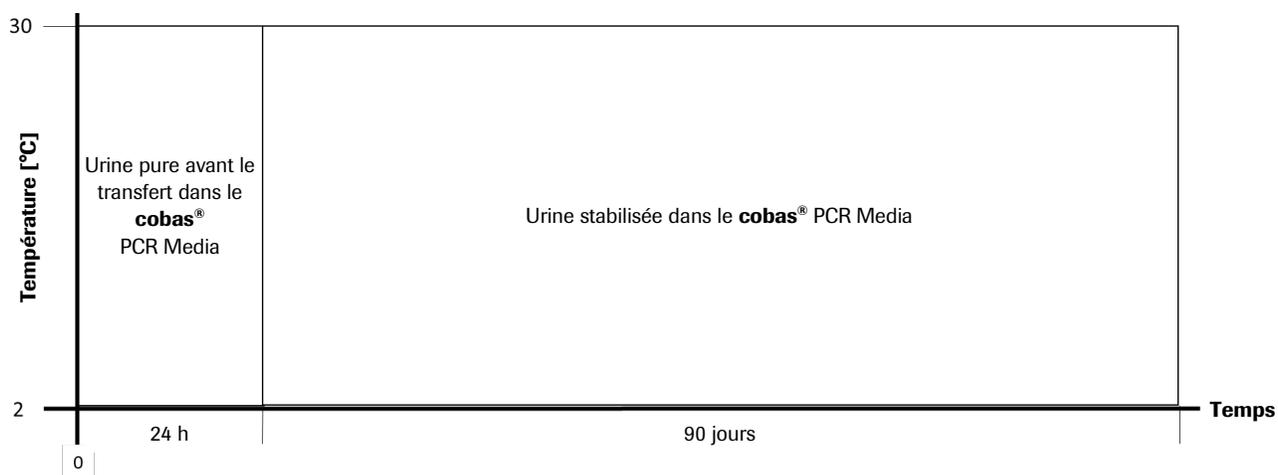
Figure 1 Conditions de stockage des échantillons de plasma EDTA

Échantillons urinaires

- Utiliser le **cobas**® PCR Urine Sample Kit uniquement pour le prélèvement et la stabilisation d'échantillons urinaires pour le test **cobas**® BKV. Le **cobas**® BKV n'a pas été validé pour une utilisation avec d'autres dispositifs de prélèvement d'urine ou d'autres types de milieu. L'utilisation du **cobas**® BKV avec d'autres dispositifs de prélèvement d'urine et d'autres types de milieu peut entraîner des faux négatifs, des faux positifs et/ou des résultats invalides.
- Les échantillons d'urine doivent être immédiatement transférés dans le tube de **cobas**® PCR Media (stabilisé). Si les échantillons ne peuvent pas être transférés immédiatement, ils peuvent être conservés entre 2 et 30 °C pendant 24 heures au maximum.
Une fois les échantillons urinaires stabilisés dans le **cobas**® PCR Media, les échantillons peuvent être stockés pendant 90 jours maximum à une température comprise entre 2 et 30 °C. Consultez la Figure 2.
- Le niveau de liquide des échantillons urinaires non testés doit être situé entre les deux lignes noires de la fenêtre de l'étiquette du tube de **cobas**® PCR Media. Si le niveau du liquide est au-dessus ou en-dessous de ces lignes, l'échantillon n'a pas été prélevé correctement et ne peut pas être utilisé pour un test.
- Si le volume d'urine disponible est insuffisant (4,3 mL) pour être dilué dans le tube **cobas**® PCR Urine Sample, l'urine peut être diluée manuellement avec le **cobas**® PCR Media. Avant d'effectuer un test avec le **cobas**® BKV, au moins 0,5 mL d'urine pure doit être diluée manuellement dans le **cobas**® PCR Media (ratio de 1:1).
- Afin d'éviter toute contamination croisée des échantillons traités, des bouchons supplémentaires pour les tubes de **cobas**® PCR Media d'une autre couleur (neutre ; voir la section **Matériel supplémentaire nécessaire**) doivent être utilisés pour refermer les échantillons une fois le test effectué.
- Si des tests supplémentaires sont requis, s'assurer qu'il reste au moins 1,2 mL d'échantillon dans le tube de **cobas**® PCR Media.

- Si les échantillons sont expédiés, ils doivent être emballés et étiquetés conformément aux réglementations nationales et internationales sur le transport d'échantillons et d'agents étiologiques.

Figure 2 Conditions de stockage de l'urine



Instructions d'utilisation

Notes de procédure

- Ne pas utiliser les réactifs du test **cobas**® BKV, le **cobas**® EBV/BKV Control Kit, du **cobas**® Buffer Negative Control Kit, ni les réactifs **cobas** **omni** après leur date de péremption.
- Ne pas réutiliser les consommables. Ils sont destinés à un usage unique.
- S'assurer que les étiquettes à codes-barres des échantillons figurant sur les tubes échantillon sont visibles à travers les ouvertures latérales des racks d'échantillons RD5 ou MPA. Se reporter au guide de l'utilisateur du **cobas**® 5800 System ou des **cobas**® 6800/8800 Systems pour consulter les spécifications relatives aux codes-barres appropriés et obtenir des informations supplémentaires sur le chargement des tubes échantillon.
- Se reporter à l'Assistance Utilisateur et/ou au guide de l'utilisateur du **cobas**® 5800 System ou des **cobas**® 6800/8800 Systems pour obtenir des informations sur la bonne maintenance des instruments.

Exécution du test **cobas**® BKV sur le **cobas**® 5800 System

Le test **cobas**® BKV peut être exécuté avec un volume d'échantillon minimum requis de 375 µL pour les échantillons de plasma EDTA (pour la procédure de travail avec échantillons de 200 µL) et de 575 µL pour les échantillons d'urine stabilisée (pour la procédure de travail avec échantillons de 400 µL). La procédure de test est décrite en détail dans l'Assistance Utilisateur et/ou le guide de l'utilisateur du **cobas**® 5800 System. La Figure 3 ci-dessous résume la procédure.

- Les échantillons doivent être débouchés et chargés directement sur les racks pour être traités sur le **cobas**® 5800 System.
- Un run unique peut être composé d'une combinaison d'échantillons (plasma, urine stabilisée).

Les échantillons de plasma EDTA et d'urine stabilisée doivent être traités à l'aide de la sélection du type d'échantillon dans l'interface utilisateur (IU) du **cobas**® BKV, tel que décrit dans l'étape 2 du Figure 3.

Figure 3 cobas® BKV : procédure de test sur le cobas® 5800 System

1	Se connecter au système Appuyer sur « Démarrer » pour préparer le système
2	Charger les échantillons sur le système : <ul style="list-style-type: none"> • Charger les racks d'échantillons sur le système • Le système se prépare automatiquement • Demander des tests <ul style="list-style-type: none"> ○ Pour les demandes d'échantillons de plasma EDTA, choisir « Plasma » ○ Pour les demandes d'échantillons urinaires prélevés dans le cobas® PCR Media, choisir « Urine » <ul style="list-style-type: none"> ▪ Déboucher le tube ▪ Transférer le tube directement dans un rack
3	Charger les réactifs et les consommables comme indiqué par le système : <ul style="list-style-type: none"> • Charger la ou les cassettes de réactifs spécifique(s) au test • Charger les mini-racks de contrôle • Charger les embouts de traitement • Charger les embouts d'élution • Charger les plaques de traitement • Charger les plaques à déchets liquides • Charger les plaques d'amplification • Charger la cassette MGP • Recharger le diluant d'échantillons • Recharger le réactif de lyse • Recharger le réactif de lavage
4	Démarrer le run en sélectionnant le bouton de démarrage du traitement sur l'interface utilisateur ; tous les runs suivants démarreront automatiquement s'ils ne sont pas reportés manuellement
5	Consulter et exporter les résultats
6	Retirer et boucher tous les tubes d'échantillon présentant le volume minimum requis s'ils doivent être réutilisés ultérieurement Nettoyer l'instrument : <ul style="list-style-type: none"> • Décharger les mini-racks de contrôle vides • Décharger la ou les cassettes de réactifs spécifique(s) au test vide(s) • Vider le tiroir de plaques d'amplification • Vider les déchets liquides • Vider les déchets solides

Exécution du test cobas® BKV sur les cobas® 6800/8800 Systems

Le test cobas® BKV peut être exécuté avec un volume d'échantillon minimum requis de 375 µL pour les échantillons de plasma EDTA (pour la procédure de travail avec échantillons de 200 µL) et de 575 µL pour les échantillons d'urine stabilisée (pour la procédure de travail avec échantillons de 400 µL). La procédure de test de l'instrument est décrite en détail dans l'Assistance Utilisateur et/ou le guide de l'utilisateur des cobas® 6800/8800 Systems. La Figure 4 ci-dessous résume la procédure.

- Les échantillons doivent être débouchés et chargés directement sur les racks pour être traités sur les cobas® 6800/8800 Systems.
- Un run unique peut être composé d'une combinaison d'échantillons (plasma, urine stabilisée).
- Les échantillons de plasma EDTA et d'urine stabilisée doivent être traités à l'aide de la sélection du type d'échantillon dans l'interface utilisateur (IU) du cobas® BKV, tel que décrit dans l'étape 1 du Figure 4.

Figure 4 cobas® BKV : procédure de test sur les cobas® 6800/8800 Systems

1	<p>Se connecter au système Appuyer sur « Démarrer » pour préparer le système Demander des tests :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pour les demandes d'échantillons de plasma EDTA, choisir « Plasma » • Pour les demandes d'échantillons urinaires prélevés dans le cobas® PCR Media, choisir « Urine »
2	<p>Charger les réactifs et les consommables comme indiqué par le système :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Charger la cassette de réactifs spécifique au test • Charger les cassettes de contrôles • Charger les embouts de pipette • Charger les plaques de traitement • Charger le réactif MGP • Charger les plaques d'amplification • Recharger le diluant d'échantillons • Recharger le réactif de lyse • Recharger le réactif de lavage
3	<p>Chargement des échantillons sur le système :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pour les échantillons urinaires primaires prélevés dans le cobas® PCR Media <ul style="list-style-type: none"> ◦ Déboucher le tube ◦ Transférer le tube directement dans un rack • Charger le rack d'échantillons et les racks pour embouts bouchés dans le module de chargement des échantillons • Confirmer que les échantillons ont été acceptés dans le module de transfert
4	<p>Démarrer le run en sélectionnant le bouton « Démarrer manuellement » sur l'interface utilisateur ou le faire démarrer automatiquement après 120 minutes ou si la série est pleine</p>
5	<p>Consulter et exporter les résultats</p>
6	<p>Retirer et boucher tous les tubes d'échantillon présentant le volume minimum requis s'ils doivent être réutilisés ultérieurement Nettoyer l'instrument :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Décharger les cassettes de contrôles vides • Vider le tiroir de plaques d'amplification • Vider les déchets liquides • Vider les déchets solides

Résultats

Les **cobas**® 5800/6800/8800 Systems déterminent automatiquement la concentration de l'ADN du BKV dans les échantillons et les contrôles. La concentration d'ADN du BKV est exprimée en Unités Internationales par millilitre (UI/mL).

Contrôle qualité et validité des résultats sur le **cobas**® 5800 System

- Un contrôle négatif [(-) Ctrl] et deux contrôles positifs, un contrôle positif bas [EBV/BKV L(+)]C] et un contrôle positif haut [EBV/BKV H(+)]C], sont traités au moins toutes les 72 heures et avec chaque nouveau lot de kits. Des contrôles positifs et/ou négatifs plus fréquents peuvent être prévus en fonction des procédures de laboratoire et/ou de la réglementation locale.
- Dans le logiciel **cobas**® 5800 System et/ou dans le rapport, consulter les alertes et les résultats associés pour s'assurer de la validité du résultat.

L'invalidation des résultats est effectuée automatiquement par le logiciel **cobas**® 5800 en fonction des échecs des contrôles négatifs ou positifs.

REMARQUE : à la livraison, le **cobas**® 5800 System est paramétré pour effectuer un ensemble de contrôles (positifs et négatifs) à chaque run, mais il est possible de configurer une fréquence inférieure allant jusqu'à toutes les 72 heures, en fonction des procédures de laboratoire et/ou de la réglementation locale. Merci de contacter votre ingénieur de service Roche et/ou l'assistance technique Roche pour plus d'informations.

Résultats des contrôles sur le **cobas**® 5800 System

Les résultats des contrôles sont indiqués dans le logiciel **cobas**® 5800, dans l'application « Contrôles ».

- Les contrôles sont marqués par « Valide » dans la colonne « Résultat du contrôle » si toutes les cibles du contrôle sont signalées valides. Les contrôles sont marqués par « Invalide » dans la colonne « Résultat de contrôle » si toutes les cibles ou une cible du contrôle sont signalées invalides.
- Les contrôles marqués par « Invalide » sont accompagnés d'un symbole d'alerte dans la colonne « Alertes ». L'affichage détaillé offre plus d'informations sur les raisons du signalement invalide du contrôle, notamment des informations sur les alertes.
- Si l'un des contrôles est invalide, une répétition du test est requise pour tous les contrôles et tous les échantillons associés.

Contrôle qualité et validité des résultats sur les cobas® 6800/8800 Systems

- Un contrôle négatif [(-) Ctrl] et deux contrôles positifs, un contrôle positif bas [EBV/BKV L(+)C] et un contrôle positif haut [EBV/BKV H(+)C], sont traités avec chaque série.
- Dans le logiciel **cobas**® 6800/8800 et/ou dans le rapport, consulter les alertes et les résultats associés pour s'assurer de la validité de la série.
- La série est valide si aucune alerte n'apparaît pour les trois contrôles, constitués d'un contrôle négatif et de deux contrôles positifs : EBV/BKV L(+)C, EBV/BKV H(+)C. Dans les résultats, le contrôle négatif s'affiche sous la forme (-) Ctrl et les contrôles positifs bas et haut s'affichent sous la forme EBV/BKV L(+)C et EBV/BKV H(+)C.

L'invalidation des résultats est effectuée automatiquement par le logiciel **cobas**® 6800/8800 en fonction des échecs des contrôles négatifs et positifs.

Alertes de contrôle sur les cobas® 6800/8800 Systems

Tableau 12 Alertes de contrôle pour les contrôles négatifs et positifs

Contrôle négatif	Alerte	Résultat	Interprétation
(-) Ctrl	Q02 (Échec de la série de contrôle)	Invalide	Résultat invalide ou le résultat de titre calculé pour le contrôle négatif n'est pas négatif.
Contrôle positif	Alerte	Résultat	Interprétation
EBV/BKV L(+)C	Q02 (Échec de la série de contrôle)	Invalide	Résultat invalide ou le résultat d'un titre calculé pour le contrôle positif bas se situe en dehors du domaine théorique.
EBV/BKV H(+)C	Q02 (Échec de la série de contrôle)	Invalide	Résultat invalide ou le résultat d'un titre calculé pour le contrôle positif haut se situe en dehors du domaine théorique.

Si la série de contrôle est invalide, répéter le test pour tous les échantillons de la série affectée.

Interprétation des résultats

Pour une série valide, vérifier l'absence d'alerte pour chaque échantillon individuel dans les logiciels **cobas® 5800 System** et **cobas® 6800/8800 Systems** et/ou dans les rapports. Les résultats doivent être interprétés comme suit :

- une série valide peut comporter des résultats d'échantillon valides et invalides.

Tableau 13 Résultats cibles pour l'interprétation des résultats cibles individuels

Résultats	Interprétation
Target Not Detected	ADN du BKV non détecté. Enregistrer les résultats comme suit : « BKV non détecté ».
< Titer Min ^a	Le titre calculé se situe sous la limite de quantification inférieure (LLOQ) du test. Enregistrer les résultats comme suit : « BKV détecté, inférieur à (titre min) ». Titre min plasma EDTA = 21,5 UI/mL Titre min urine = 200 UI/mL
Titer	Le titre calculé se situe dans le domaine de linéarité du test : supérieur ou égal au titre min. et inférieur ou égal au titre max. Enregistrer les résultats comme suit : « (Titre) de BKV détecté ».
> Titer Max ^b	Le titre calculé se situe au-dessus de la limite de quantification supérieure (ULOQ) du test. Enregistrer les résultats comme suit : « BKV détecté, supérieur à (titre max) ». Titre max plasma EDTA et urine = 1,0E+08 UI/mL

^a Des résultats d'échantillons « < Titer Min » (cible détectée < LLOQ) doivent être interprétés en tenant compte des autres données cliniques et ne doivent pas constituer le seul critère sur lequel fonder une décision de traitement.

^b Un résultat d'échantillon « > Titer Max » correspond à des échantillons positifs pour l'BKV dont les titres sont supérieurs à la limite supérieure de quantification (ULOQ). Si l'on désire obtenir un résultat quantitatif pour les échantillons de plasma EDTA, l'échantillon d'origine doit être dilué dans du plasma humain prélevé sur EDTA négatif pour le BKV et l'analyse doit être répétée. Multiplier le résultat enregistré par le coefficient de dilution.

Interprétation des résultats du cobas® 5800 System

Les résultats des échantillons sont indiqués dans le logiciel **cobas® 5800**, dans l'application « Résultats ».

Pour une série de contrôles valide, vérifier l'absence d'alerte pour chaque échantillon individuel dans le logiciel **cobas® 5800** et/ou dans le rapport. Les résultats doivent être interprétés comme suit :

- Les échantillons associés à une série de contrôles valide sont marqués par « Valide » dans la colonne « Résultat du contrôle » si tous les résultats de cibles de contrôle sont signalés valides. Les échantillons associés à l'échec d'une série de contrôles sont marqués par « Invalide » dans la colonne « Résultat du contrôle » si tous les résultats de cibles de contrôle sont signalés invalides.
- Si les contrôles associés à un résultat d'échantillon sont invalides, une alerte spécifique est ajoutée au résultat d'échantillon comme suit :
 - Q05D : échec de validation de résultat en raison d'un contrôle positif invalide
 - Q06D : échec de validation de résultat en raison d'un contrôle négatif invalide
- Les valeurs de la colonne « Résultats » pour un résultat de cible d'échantillon individuel doivent être interprétées comme indiqué dans le Tableau 13 ci-dessus.

Si une ou plusieurs cibles d'échantillon sont marquées par « Invalide », le logiciel **cobas**® 5800 indique une alerte dans la colonne « Alertes ». L'affichage détaillé offre plus d'informations sur les raisons du signalement invalide de la ou des cibles d'échantillon, notamment des informations sur les alertes.

Interprétation des résultats sur les **cobas**® 6800/8800 Systems

Pour une série valide, vérifier l'absence d'alerte pour chaque échantillon individuel dans le logiciel **cobas**® 6800/8800 Systems et/ou dans le rapport. Les résultats doivent être interprétés comme suit :

- Les échantillons sont marqués d'un « Yes » dans la colonne « Valide » si tous les résultats demandés pour la cible ont donné des résultats valides. Les échantillons marqués d'un « No » dans la colonne « Valide » peuvent nécessiter une interprétation et une action supplémentaires.
- Les valeurs de résultat de cible d'échantillon individuel doivent être interprétées comme indiqué dans le Tableau 13 ci-dessus.

Limites du test

- Le test **cobas**® BKV a été évalué uniquement pour être utilisé conjointement au **cobas**® EBV/BKV Control Kit, au **cobas**® Buffer Negative Control Kit, au **cobas** **omni** MGP Reagent, au **cobas** **omni** Lysis Reagent, au **cobas** **omni** Specimen Diluent et au **cobas** **omni** Wash Reagent sur les **cobas**® 5800/6800/8800 Systems.
- La fiabilité des résultats dépend du suivi correct des procédures de prélèvement, stockage et manipulation des échantillons.
- Ce test a été validé pour être utilisé exclusivement avec du plasma EDTA et de l'urine stabilisée. L'analyse d'autres types d'échantillons avec le test **cobas**® BKV peut aboutir à des résultats inexacts. Les mesures de niveau d'ADN effectuées sur du plasma et de l'urine stabilisée ne sont pas comparables directement entre elles ni aux mesures effectuées sur d'autres types d'échantillon.
- La quantification de l'ADN du BKV peut être affectée par les méthodes de collecte d'échantillons, les facteurs relatifs aux patients (c'est-à-dire l'âge, la présence de symptômes) et/ou le stade de l'infection.
- La dégradation de l'ADN du BKV dans l'urine pure peut affecter sa quantification.¹⁷ Pour que l'échantillon soit stable, l'urine doit être transférée dans du **cobas**® PCR Media.
- La variabilité quantitative de l'ADN de BKV inhérente à l'urine a été observée lors d'expériences sur la stabilité des échantillons à différents moments de l'échantillonnage (urine pure) ou dans différentes aliquotes du même échantillon (urine pure et urine stabilisée sans le **cobas**® PCR Media).
- Compte tenu de ces limites, les résultats de l'ADN du BKV dans l'urine doivent être interprétés avec prudence dans le contexte des résultats cliniques et autres résultats de laboratoire et ne doivent pas constituer le seul critère sur lequel fonder une décision de traitement.
- L'urine peut contenir des niveaux élevés d'ADN de BKV, avec le risque de contamination croisée.¹⁸
- Comme pour tout test moléculaire, des mutations aux niveaux des régions cibles du test **cobas**® BKV peuvent affecter la liaison des amorces et/ou des sondes et entraîner une sous-quantification du virus ou l'échec de la détection du virus.
- En raison des différences inhérentes à chaque technologie, il est recommandé aux utilisateurs, avant de passer d'une technologie à l'autre, de mener des études de corrélation de méthodes au sein de leur laboratoire afin de caractériser les différences entre les diverses technologies. Les utilisateurs doivent suivre leurs propres politiques/procédures.
- Le test **cobas**® BKV n'est pas destiné au dépistage du BKV dans le sang ou les produits sanguins.

Évaluation des performances non cliniques

Principales caractéristiques de performance pour le type d'échantillon Plasma EDTA sur les cobas® 6800/8800 Systems

Limite de détection (LoD) pour le standard international de l'OMS

La limite de détection du test cobas® BKV pour le standard international de l'OMS a été déterminée par l'analyse de dilutions en série du 1^{er} standard international BKV de l'OMS, obtenu auprès du NIBSC (NIBSC 14/212), dans du plasma humain prélevé sur EDTA négatif pour le BKV. Des panels de six niveaux de concentration plus un échantillon blanc ont été testés sur trois lots de réactifs du test cobas® BKV, lors de plusieurs runs, pendant plusieurs jours, par plusieurs opérateurs et sur plusieurs instruments.

Les résultats obtenus pour le plasma EDTA sont indiqués du Tableau 14 au Tableau 16. Cette étude démontre qu'avec le lot le moins sensible, la concentration pour laquelle un taux de succès de 95 % est attendu avec PROBIT est de 21,5 UI/mL avec un intervalle de confiance à 95 % de 16,3 à 32,4 UI/mL dans du plasma EDTA. La concentration la plus faible avec un taux de succès ≥ 95 % est 19,0 UI/mL dans du plasma EDTA.

Tableau 14 Limite de détection dans le plasma EDTA, lot 1

Concentration de titre d'entrée (ADN du BKV, UI/mL)	Nb de répliquats valides	Nb de positifs	Taux de succès en %
80,0	63	63	100,0
38,0	63	63	100,0
19,0	63	60	95,2
9,5	63	46	73,0
4,75	63	36	57,1
2,38	63	23	36,5
0	62	0	0,0
Limite de détection à un taux de succès de 95 % par PROBIT	21,5 UI/mL Intervalle de confiance à 95 % : 16,3-32,4 UI/mL		

Tableau 15 Limite de détection dans le plasma EDTA, lot 2

Concentration de titre d'entrée (ADN du BKV, UI/mL)	Nb de réplicats valides	Nb de positifs	Taux de succès en %
80,0	62	62	100,0
38,0	63	63	100,0
19,0	63	61	96,8
9,5	63	48	76,2
4,75	63	34	54,0
2,38	62	23	37,1
0	62	0	0,0
Limite de détection à un taux de succès de 95 % par PROBIT	19,7 UI/mL Intervalle de confiance à 95 % : 15,0-29,2 UI/mL		

Tableau 16 Limite de détection dans le plasma EDTA, lot 3

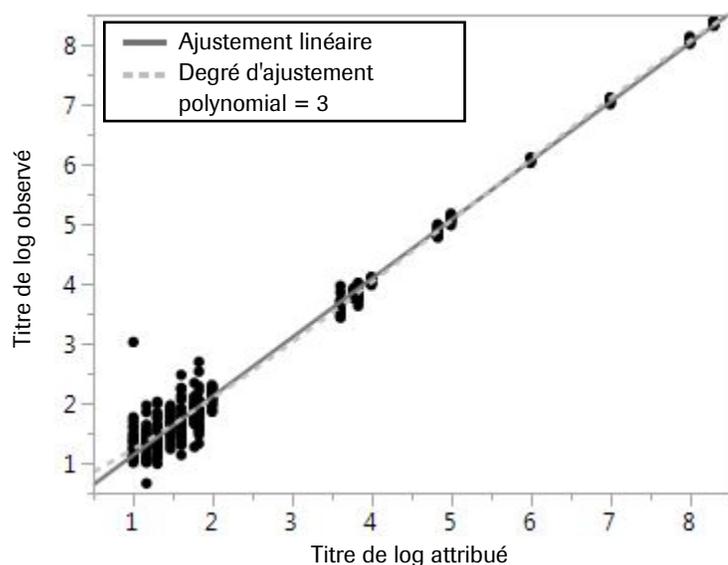
Concentration de titre d'entrée (ADN du BKV, UI/mL)	Nb de réplicats valides	Nb de positifs	Taux de succès en %
80,0	63	63	100,0
38,0	63	63	100,0
19,0	63	60	95,2
9,5	63	50	79,4
4,75	63	35	55,6
2,38	63	22	35,0
0	63	0	0,0
Limite de détection à un taux de succès de 95 % par PROBIT	19,3 UI/mL Intervalle de confiance à 95 % : 14,8-28,5 UI/mL		

Domaine de linéarité

La linéarité du test **cobas**® BKV a été évaluée à l'aide de dilutions en séries constituée de 18 membres de panel avec l'ADN du sous-groupe Ib du BKV couvrant le domaine de linéarité du test. Un stock d'ADN lambda de titre élevé a été utilisé pour préparer 11 membres de panel couvrant l'ensemble du domaine de linéarité. Un échantillon clinique a été utilisé pour préparer sept membres de panel couvrant les niveaux intermédiaire et inférieur du domaine de linéarité.

Chaque membre du panel a été testé en 36 réplicats sur trois lots de réactifs du test **cobas**® BKV et les résultats de l'étude sont présentés dans la Figure 5.

Il a été démontré que le test **cobas**® BKV est linéaire de 1,01E+01 UI/mL à 1,97E+08 UI/mL et présente une déviation absolue par rapport à la régression non linéaire de meilleur ajustement inférieure ou égale à $\pm 0,1 \log_{10}$ dans le plasma EDTA humain (voir Figure 5). Dans le domaine de linéarité, l'exactitude du test se situait à $\pm 0,2 \log_{10}$.

Figure 5 Détermination du domaine de linéarité dans le plasma EDTA

Précision intra-laboratoire

La précision du test **cobas**® BKV a été déterminée en analysant des dilutions en série d'ADN du BKV de titre élevé (sous-groupe Ib) dans du plasma EDTA négatif pour le BKV. Cinq niveaux de dilution ont été testés en 72 réplicats pour chaque niveau sur trois lots de réactifs du test **cobas**® BKV par deux opérateurs, sur quatre instruments, pendant 12 jours. Chaque échantillon a subi la procédure entière du test **cobas**® BKV sur des **cobas**® 6800/8800 Systems entièrement automatisés. La précision indiquée plus bas prend donc en compte tous les aspects de la procédure de test. Les résultats sont présentés dans le Tableau 17.

Le test **cobas**® BKV a présenté une précision élevée pour trois lots de réactifs testés sur une plage de concentration de 9,83E+01 UI/mL à 9,83E+05 UI/mL.

Tableau 17 Précision intra-laboratoire du test **cobas**® BKV*

Concentration nominale [UI/mL]	Concentration attribuée [UI/mL]	Plasma EDTA			
		Lot n° 1	Lot n° 2	Lot n° 3	Tous les lots
		DS	DS	DS	DS globale
1,00E+06	9,83E+05	0,02	0,02	0,04	0,03
1,00E+05	9,83E+04	0,03	0,04	0,04	0,04
1,00E+04	9,83E+03	0,04	0,05	0,03	0,04
6,00E+03	5,90E+03	0,03	0,05	0,03	0,04
1,00E+02	9,83E+01	0,09	0,11	0,11	0,11

* Les données de titre sont considérées comme normalement réparties par log et sont analysées selon une transformation de \log_{10} . Les colonnes d'écart-type (ET) présentent le total du titre après transformation de log pour chacun des trois lots de réactifs.

Vérification de sous-type

Les performances du test **cobas**® BKV sur les sous-types I (avec les sous-groupes Ia et Ic), II, III et IV de BKV ont été évaluées par :

- Vérification de la limite de détection
- Vérification du domaine de linéarité

Vérification de la limite de détection pour les sous-types I (avec les sous-groupes Ia et Ic), II, III et IV

L'ADN du BKV pour les cinq différents sous-types/sous-groupes (Ia, Ic, II, III et IV) a été dilué à trois niveaux de concentration différents dans du plasma EDTA négatif pour le BKV. Le taux de succès a été déterminé avec 63 réplicats pour chaque niveau. Les tests ont été effectués avec trois lots de réactifs du test **cobas**® BKV, lors de plusieurs runs, pendant plusieurs jours, par plusieurs opérateurs et sur plusieurs instruments. Ces résultats démontrent que le test **cobas**® BKV a détecté l'ADN du BKV pour cinq différents sous-types/sous-groupes à des concentrations de 21,5 UI/mL avec un taux de succès ≥ 95 %.

Vérification du domaine de linéarité pour les sous-types I (avec les sous-groupes Ia et Ic), II, III et IV

La série de dilutions utilisée dans la vérification de l'étude de linéarité des sous-types/sous-groupes du test **cobas**® BKV comprenait huit membres de panel couvrant le domaine de linéarité du test. Les tests ont été effectués avec trois lots de réactifs du test **cobas**® BKV ; 12 réplicats par niveau ont été testés dans du plasma EDTA.

Le domaine de linéarité du test **cobas**® BKV a été vérifié pour les cinq sous-types/sous-groupes (Ia, Ic, II, III et IV).

Spécificité

La spécificité du test **cobas**® BKV a été déterminée en analysant des échantillons de plasma EDTA négatifs pour le BKV issus de donneurs individuels. 104 échantillons de plasma EDTA individuels ont été testés avec trois lots de réactifs du test **cobas**® BKV. Tous les échantillons se sont révélés négatifs pour l'ADN du BKV. Dans le panel de test, la spécificité du test **cobas**® BKV était de 100 % (intervalle de confiance unilatéral à 95 % inférieur : 97,16 %).

Spécificité analytique

La spécificité analytique du test **cobas**® BKV a été évaluée en testant un panel de microorganismes à une concentration de 1,00E+06 unités/mL (UFC/mL, cellules/mL, UCC/mL, IFU/mL) pour les bactéries et les levures et entre 1,00E+05 unités/mL et 1,00E+06 unités/mL (copies/mL, DICT₅₀/mL, UI/mL, cellules/mL) pour les virus. Les microorganismes ont été dilués dans du plasma EDTA humain négatif pour l'ADN du BKV ainsi que dans du plasma EDTA humain contenant de l'ADN de BKV (100 UI/mL). Les organismes spécifiques testés sont répertoriés dans le Tableau 18. Chaque échantillon a été testé en réplicats de trois. Aucun des agents pathogènes non-BKV n'a provoqué d'interférence avec les performances du test aux concentrations testées. Des résultats négatifs ont été obtenus avec le test **cobas**® BKV pour tous les échantillons de microorganismes sans cible BKV et des résultats positifs ont été obtenus pour tous les échantillons de microorganismes avec cible BKV. En outre, le titre moyen log₁₀ de chacun des échantillons positifs pour BKV contenant des organismes pouvant provoquer une réaction croisée était compris dans un intervalle de $\pm 0,5$ log₁₀ du titre moyen log₁₀ du contrôle dopé positif respectif.

Tableau 18 Micro-organismes dont la réactivité croisée a été testée

Virus	Bactéries	Levure
Adénovirus type 5	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Cytomégalovirus	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Virus d'Epstein-Barr	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Virus de l'hépatite B	<i>Clostridium perfringens</i>	-
Virus de l'hépatite C	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
Virus de l'herpès simplex de type 1	<i>Escherichia coli</i>	-
Virus de l'herpès simplex de type 2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
Virus de l'herpès humain de type 6	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
Virus de l'herpès humain de type 7	<i>Mycobacterium avium</i>	-
Virus de l'herpès humain de type 8	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-
Virus de l'immunodéficience humaine 1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Virus de l'immunodéficience humaine 2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Papillomavirus humain	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
Virus JC	<i>Salmonella enterica</i>	-
Parvovirus B19	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Virus simien 40	-	-
Virus varicelle-zona	-	-

Spécificité analytique - substances interférentes

Des niveaux élevés de triglycérides (33 g/L), de bilirubine conjuguée (0,2 g/L), de bilirubine non conjuguée (0,2 g/L), d'albumine (60 g/L), d'hémoglobine (2 g/L) et d'ADN humain (2 mg/L) dans les échantillons ont été testés en présence (100 UI/mL) et en l'absence d'ADN du BKV. Il a été démontré que les interférences endogènes testées n'ont pas d'effet sur les performances du test **cobas**® BKV.

De plus, les composés médicamenteux répertoriés au Tableau 19 ont été testés à trois fois la C_{max} en présence et en l'absence d'ADN du BKV.

Il a été démontré qu'aucune substance potentiellement interférente n'affecte les performances du test. Des résultats négatifs ont été obtenus avec le test **cobas**® BKV pour tous les échantillons sans cible BKV et des résultats positifs ont été obtenus pour tous les échantillons avec cible BKV. En outre, le titre moyen \log_{10} de chacun des échantillons positifs pour BKV contenant des substances potentiellement interférentes était compris dans un intervalle de $\pm 0,5 \log_{10}$ du titre moyen \log_{10} du contrôle dopé positif respectif.

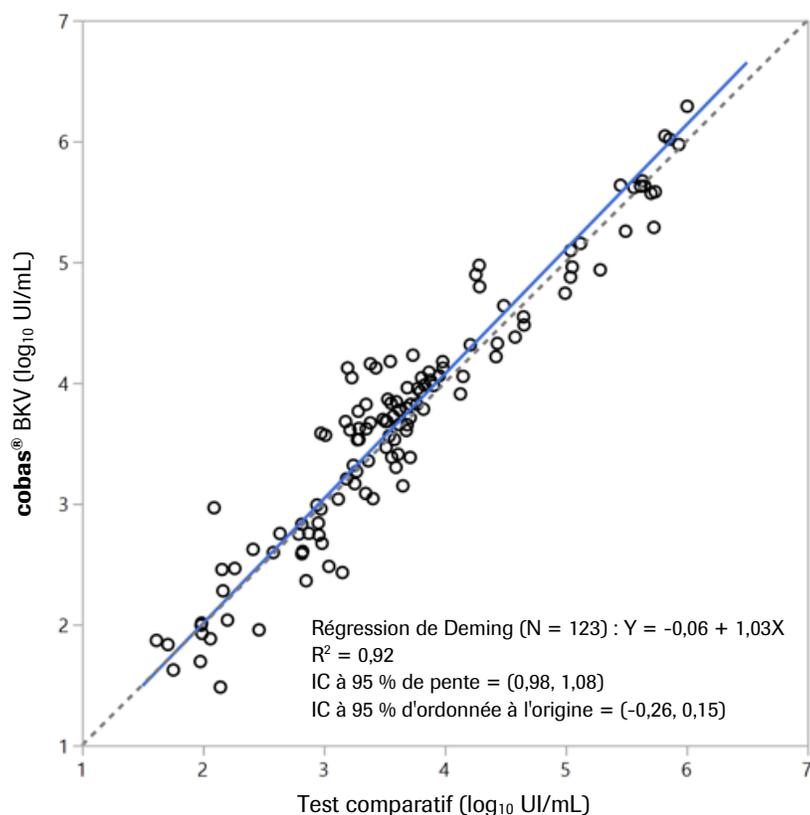
Tableau 19 Composés médicamenteux dont l'interférence avec la quantification de l'ADN du BKV par le test **cobas**® BKV a été testée

Catégorie de médicament	Nom du médicament générique	
Antimicrobien	Céfotétan	Sulfaméthoxazole
	Clavulanate de potassium	Ticarcline disodique
	Fluconazole	Triméthoprim
	Pipéracilline	Vancomycine
	Tazobactam de sodium	Micafungine
Composés pour le traitement de virus de l'herpès	Ganciclovir	Cidofovir
	Valganciclovir	Foscarnet
	Aciclovir	Letermovir
Immunosuppresseur	Azathioprine	Prednisone
	Cyclosporine	Sirolimus
	Évérolimus	Tacrolimus
	Mofétilmycophénolate	Acide mycophénolique

Corrélation de la méthode

Les performances du test **cobas**® BKV ont été évaluées par rapport à un test comparatif en analysant des échantillons de plasma EDTA issus de patients infectés par le BKV. Des échantillons de plasma EDTA, compris dans le domaine de quantification des deux tests, ont été testés en tant que répliqués uniques. L'analyse de la régression de Deming a été réalisée.

Les résultats de la régression de Deming sont indiqués dans la Figure 6.

Figure 6 Analyse de régression comparative du test **cobas®** BKV et d'un test comparatif

Échec complet du système

Le taux d'échec complet du système pour le test **cobas®** BKV a été déterminé en testant 100 répliqués de plasma EDTA dopés avec un échantillon clinique positif pour le BKV. Ces échantillons ont été testés à une concentration égale à $3 \times$ la LoD.

D'après les résultats de cette étude, tous les répliqués étaient valides et positifs pour la cible BKV. Le taux d'échec complet du système est donc de 0 % (intervalle de confiance unilatéral à 95 % supérieur : 2,95 %).

Contamination croisée

Le taux de contamination croisée pour le test **cobas®** BKV a été déterminé en testant 240 répliqués d'un échantillon de matrice négatif pour le BKV et 225 répliqués d'un échantillon d'ADN du BKV de titre élevé à environ $2,00E+07$ UI/mL. Au total, cinq runs ont été exécutés avec des échantillons positifs et négatifs en configuration de damier.

Les 240 répliqués de l'échantillon négatif étaient tous négatifs, soit un taux de contamination croisée de 0 % (intervalle de confiance unilatéral à 95 % supérieur : 1,24 %).

Principales caractéristiques de performance pour le type d'échantillon urine sur les cobas® 6800/8800 Systems

Limite de détection (LoD) pour le standard international de l'OMS

La limite de détection du test cobas® BKV pour le standard international de l'OMS a été déterminée par l'analyse de dilutions en série du 1^{er} standard international BKV de l'OMS, obtenu auprès du NIBSC (NIBSC 14/212), dans de l'urine poolée stabilisée dans le cobas® PCR Media négative pour le BKV. Des panels de six niveaux de concentration plus un échantillon blanc ont été testés sur trois lots de réactifs du test cobas® BKV, lors de plusieurs runs, pendant plusieurs jours, par plusieurs opérateurs et sur plusieurs instruments.

Les résultats pour l'urine poolée stabilisée dans le cobas® PCR Media sont indiqués du Tableau 20 au Tableau 22. Cette étude démontre qu'avec le lot le moins sensible, la concentration pour laquelle un taux de succès de 95 % est attendu avec PROBIT est de 12,2 UI/mL avec un intervalle de confiance à 95 % de 9,2 à 18,3 UI/mL dans l'urine pure. La concentration la plus faible avec un taux de succès ≥ 95 % est 10,0 UI/mL dans l'urine pure.

Tableau 20 Limite de détection dans l'urine, lot 1

Concentration de titre d'entrée (ADN du BKV, UI/mL)	Nb de réplicats valides	Nb de positifs	Taux de succès en %
40,0	63	63	100,0
20,0	63	63	100,0
10,0	63	60	95,2
5,0	63	47	74,6
2,5	63	25	39,7
1,25	63	26	41,3
0	63	0	0,0
Limite de détection à un taux de succès de 95 % par PROBIT	12,2 UI/mL Intervalle de confiance à 95 % : 9,2-18,3 UI/mL		

Tableau 21 Limite de détection dans l'urine, lot 2

Concentration de titre d'entrée (ADN du BKV, UI/mL)	Nb de réplicats valides	Nb de positifs	Taux de succès en %
40,0	63	63	100,0
20,0	63	63	100,0
10,0	63	60	95,2
5,0	63	42	66,7
2,5	63	32	50,8
1,25	63	17	27,0
0	63	0	0,0
Limite de détection à un taux de succès de 95 % par PROBIT	11,9 UI/mL Intervalle de confiance à 95 % : 9,2-17,3 UI/mL		

* Échantillons testés d'urine stabilisée dans le **cobas**® PCR Media. Concentration de titre d'entrée utilisée pour le calcul sur la base de l'urine pure.

Tableau 22 Limite de détection dans l'urine, lot 3

Concentration de titre d'entrée (ADN du BKV, UI/mL)	Nb de réplicats valides	Nb de positifs	Taux de succès en %
40,0	63	63	100,0
20,0	63	63	100,0
10,0	63	61	96,8
5,0	63	46	73,0
2,5	63	39	61,9
1,25	63	19	30,2
0	63	0	0,0
Limite de détection à un taux de succès de 95 % par PROBIT	10,1 UI/mL Intervalle de confiance à 95 % : 7,8-14,7 UI/mL		

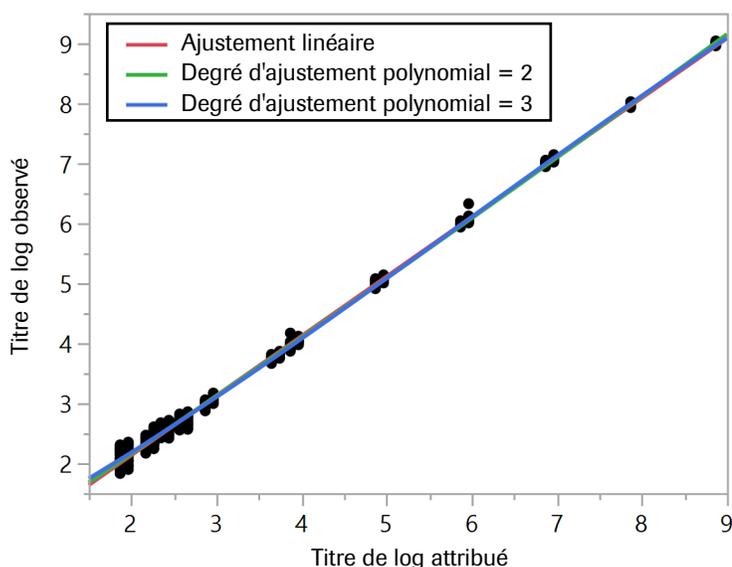
* Échantillons testés d'urine stabilisée dans le **cobas**® PCR Media. Concentration de titre d'entrée utilisée pour le calcul sur la base de l'urine pure.

Domaine de linéarité

La linéarité du test **cobas**® BKV a été évaluée à l'aide de dilutions en séries constituées de 10 membres de panel utilisant un échantillon clinique (sous-groupe Ib du BKV) couvrant le domaine de linéarité du test. Un stock d'ADN lambda de titre élevé a été utilisé pour préparer 12 membres de panel couvrant l'ensemble du domaine de linéarité.

Chaque membre du panel a été testé en 36 réplicats sur trois lots de réactifs du test **cobas**® BKV et les résultats de l'étude sont présentés dans la Figure 7.

Il a été démontré que le test **cobas**® BKV est linéaire de 7,41E+01 UI/mL à 7,41E+08 UI/mL et présente une déviation absolue par rapport à la régression non linéaire de meilleur ajustement inférieure ou égale à $\pm 0,1 \log_{10}$ dans l'urine poolée stabilisée dans le **cobas**® PCR Media (voir Figure 7). Dans le domaine de linéarité, l'exactitude du test se situait à $\pm 0,2 \log_{10}$.

Figure 7 Détermination du domaine de linéarité dans l'urine

Précision intra-laboratoire

La précision du test **cobas**® BKV a été déterminée en analysant des dilutions en série d'ADN du BKV de titre élevé (sous-groupe lb) dans de l'urine poolée stabilisée dans le **cobas**® PCR Media négative pour le BKV. Cinq niveaux de dilution ont été testés en 72 répliquats pour chaque niveau sur trois lots de réactifs du test **cobas**® BKV par deux opérateurs, sur deux instruments, pendant 12 jours. Chaque échantillon a subi la procédure entière du test **cobas**® BKV sur des **cobas**® 6800/8800 Systems entièrement automatisés. La précision indiquée plus bas prend donc en compte tous les aspects de la procédure de test. Les résultats sont présentés dans le Tableau 23.

Le test **cobas**® BKV a présenté une précision élevée pour trois lots de réactifs testés sur une plage de concentration de 7,41E+02 UI/mL à 7,41E+05 UI/mL.

Tableau 23 Précision intra-laboratoire du test **cobas**® BKV*

Concentration nominale [UI/mL]	Concentration attribuée [UI/mL]	Urine stabilisée dans le cobas ® PCR Media			
		Lot n° 1	Lot n° 2	Lot n° 3	Tous les lots
		DS	DS	DS	DS globale
1,00E+06	7,41E+05	0,02	0,02	0,02	0,02
1,00E+05	7,41E+04	0,02	0,03	0,02	0,03
1,00E+04	7,41E+03	0,03	0,03	0,03	0,03
6,00E+03	4,44E+03	0,04	0,03	0,04	0,03
1,00E+03	7,41E+02	0,05	0,05	0,04	0,05

* Les données de titre sont considérées comme normalement réparties par log et sont analysées selon une transformation de log₁₀. Les colonnes d'écart-type (ET) présentent le total du titre après transformation de log pour chacun des trois lots de réactifs.

Vérification de sous-type

Les performances du test **cobas**® BKV sur les sous-types I (avec les sous-groupes Ia et Ic), II, III et IV de BKV ont été évaluées par :

- Vérification de la limite de détection
- Vérification du domaine de linéarité

Vérification de la limite de détection pour les sous-types I (avec les sous-groupes Ia et Ic), II, III et IV

L'ADN du BKV pour les cinq différents sous-types/sous-groupes (Ia, Ic, II, III et IV) a été dilué à trois niveaux de concentration différents dans de l'urine poolée stabilisée dans le **cobas**® PCR Media négative pour le BKV. Le taux de succès a été déterminé avec 63 réplicats pour chaque niveau. Les tests ont été effectués avec trois lots de réactifs du test **cobas**® BKV, lors de plusieurs runs, pendant plusieurs jours, par plusieurs opérateurs et sur plusieurs instruments. Ces résultats démontrent que le test **cobas**® BKV a détecté l'ADN du BKV pour cinq différents sous-types/sous-groupes à des concentrations de 12,2 UI/mL avec un taux de succès ≥ 95 %.

Vérification du domaine de linéarité pour les sous-types I (avec les sous-groupes Ia et Ic), II, III et IV

La série de dilutions utilisée dans la vérification de l'étude de linéarité des sous-types/sous-groupes du test **cobas**® BKV comprenait huit membres de panel couvrant le domaine de linéarité du test. Les tests ont été effectués avec trois lots de réactifs du test **cobas**® BKV ; 12 réplicats par niveau ont été testés dans de l'urine stabilisée dans le **cobas**® PCR Media.

Le domaine de linéarité du test **cobas**® BKV a été vérifié pour les cinq sous-types/sous-groupes (Ia, Ic, II, III et IV).

Spécificité

La spécificité du test **cobas**® BKV a été déterminée en analysant des échantillons urinaires stabilisés dans le **cobas**® PCR Media négatifs pour le BKV issus de donneurs individuels. Cent échantillons urinaires individuels ont été testés avec trois lots de réactifs du test **cobas**® BKV. Tous les échantillons se sont révélés négatifs pour l'ADN du BKV. Dans le panel de test, la spécificité du test **cobas**® BKV était de 100 % (intervalle de confiance unilatéral à 95 % inférieur : 97,05 %).

Spécificité analytique

La spécificité analytique du test **cobas**® BKV a été évaluée en testant un panel de microorganismes à une concentration entre 1,00E+06 unités/mL et 2,00E+06 unités/mL (UFC/mL, cellules/mL, UCC/mL, IFU/mL) pour les bactéries et les levures et de 1,00E+05 unités/mL (copies/mL, DICT₅₀/mL, UI/mL, cellules/mL) pour les virus. Les microorganismes ont été dilués dans de l'urine négative pour l'ADN du BKV ainsi que dans de l'urine contenant de l'ADN de BKV (600 UI/mL). Les organismes spécifiques testés sont répertoriés dans le Tableau 24. Chaque échantillon a été testé en réplicats de trois. Aucun des agents pathogènes non-BKV n'a provoqué d'interférence avec les performances du test aux concentrations testées. Des résultats négatifs ont été obtenus avec le test **cobas**® BKV pour tous les échantillons de microorganismes sans cible BKV et des résultats positifs ont été obtenus pour tous les échantillons de microorganismes avec cible BKV. En outre, le titre moyen log₁₀ de chacun des échantillons positifs pour BKV contenant des organismes pouvant provoquer une réaction croisée était compris dans un intervalle de $\pm 0,5$ log₁₀ du titre moyen log₁₀ du contrôle dopé positif respectif.

Tableau 24 Micro-organismes dont la réactivité croisée a été testée

Virus	Bactéries	Bactéries	Levure
Virus de l'herpès simplex-2	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>
Papillomavirus humain 16	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida glabrata</i>
-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
-	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Candida tropicalis</i>
-	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus bovis</i>	-
-	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
-	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus oralis/viridans</i>	-
-	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	-
-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
-	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-
-	<i>Treponema pallidum</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>	-
-	<i>Lactobacillus crispatus</i>	-	-
-	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-	-
-	<i>Chlamydia trachomatis</i>	-	-
-	<i>Lactobacillus jensenii</i>	-	-
-	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	-	-
-	<i>Morganella morganii</i>	-	-

Spécificité analytique - substances interférentes

Des niveaux élevés d'albumine (0,5 % m/v), de bilirubine conjuguée (1 % m/v), de glucose (1 % m/v), de cellules mononucléées de sang périphérique (1,00E+06 cellules/mL), de mucus (en présence d'un écouvillon de mucus pour 4,3 mL d'échantillon), de pH acide (pH 4), de pH alcalin (pH 9), de sperme (1 écouvillon plongé dans le sperme pour 4,3 mL d'échantillon), de sodium (300 mEq/L) et de sang total (10 % v/v) dans les échantillons ont été testés en présence (600 UI/mL) et en l'absence d'ADN du BKV. Il a été démontré que les interférences endogènes testées n'ont pas d'effet sur les performances du test **cobas**® BKV.

De plus, les composés médicamenteux répertoriés au Tableau 25 ont été testés en présence et en l'absence d'ADN du BKV.

Il a été démontré qu'aucune substance potentiellement interférente, à l'exception du talc, n'affecte les performances du test. Le talc à raison de $\leq 0,05$ % n'a présenté aucune interférence avec le **cobas**® BKV. Des résultats négatifs ont été obtenus avec le test **cobas**® BKV pour tous les échantillons sans cible BKV et des résultats positifs ont été obtenus pour tous les échantillons avec cible BKV. En outre, le titre moyen \log_{10} de chacun des échantillons positifs pour BKV contenant des substances potentiellement interférentes était compris dans un intervalle de $\pm 0,5 \log_{10}$ du titre moyen \log_{10} du contrôle dopé positif respectif.

Tableau 25 Composés médicamenteux dont l'interférence avec la quantification de l'ADN du BKV par le test **cobas®** BKV a été testée

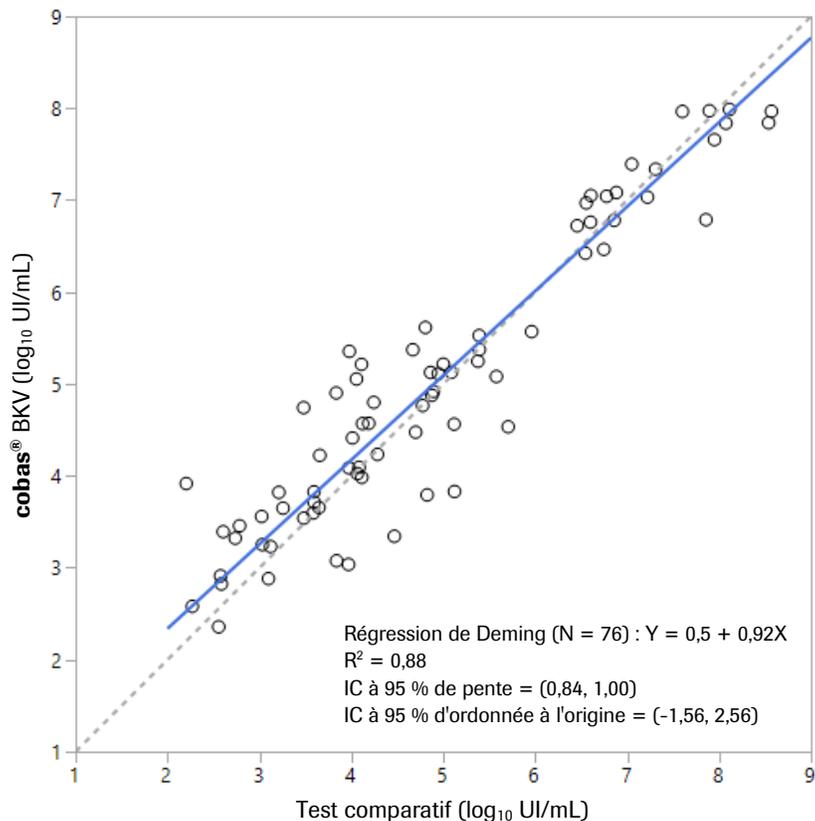
Catégorie de médicament	Principe actif	Concentration	Nom du médicament générique
Antimicrobien	Clotrimazole	100 µg/mL	Gyne-Lotrimin 7
	métronidazole	701 µmol/L	Arilin Ovules vaginaux Crème Vagi-Metro Gel Nidazea
Hormone stéroïde œstrogène	Œstradiol	4,41 nmol/L	Estrace
Analgésiques	Chlorhydrate de phénazopyridine	200 µg/mL	Azo Standard
	Acétaminophène	1324 µmol/L	Acétaminophène
Lubrifiant	Propylène glycol	1000 µg/mL	K-Y UltraGel
Anti-inflammatoire non stéroïdien	Acide acétylsalicylique	3,62 mmol/L	Acide acétylsalicylique
	Naproxène	2170 µmol/L	Naproxène
	Ibuprofène	2425 µmol/L	Ibuprofène
Non applicable	Talc	0,05 % (m/v)	Talc

Corrélation de la méthode

Les performances du test **cobas**® BKV ont été évaluées par rapport à un test comparatif en analysant des échantillons urinaires issus de patients infectés par le BKV. Des échantillons urinaires, compris dans le domaine de quantification des deux tests, ont été testés en tant que répliquats uniques. L'analyse de la régression de Deming a été réalisée.

Les résultats de la régression de Deming sont indiqués dans la Figure 8.

Figure 8 Analyse de régression comparative du test **cobas**® BKV et d'un test comparatif



Contamination croisée

Le taux de contamination croisée pour le test **cobas**® BKV a été déterminé en testant 240 répliquats d'un échantillon de matrice négatif pour le BKV et 225 répliquats d'un échantillon d'ADN du BKV de titre élevé à environ $1,00E+09$ UI/mL. Au total, cinq runs ont été exécutés avec des échantillons positifs et négatifs en configuration de damier.

Les 240 répliquats de l'échantillon négatif étaient tous négatifs, soit un taux de contamination croisée de 0,0 % (intervalle de confiance unilatéral à 95 % supérieur : 1,24 %).

Évaluation des performances cliniques réalisée sur les cobas® 6800/8800 Systems

Reproductibilité du test cobas® BKV pour les échantillons de plasma EDTA

La reproductibilité du test cobas® BKV a été évaluée pour différents facteurs (lot de réactifs, site d'analyse, série et jours de test) qui pourraient affecter les résultats rapportés pour les tests cliniques de routine. L'évaluation a été menée sur 3 sites d'analyse à l'aide de 3 lots de réactifs, avec un panel d'échantillons négatifs et positifs pour un nombre total de 270 tests par concentration (sans inclure les contrôles). Les panels étaient composés d'échantillons de plasma EDTA négatifs pour les IgG dirigés contre le VCA du BKV et ont été testés pour détecter la présence de BKV à l'aide d'un protocole de libération des acides nucléiques du plasma, et dopés par de l'ADN du standard international de l'OMS pour le BKV ou de l'ADN viral du génotype Ib de BKV (génotype le plus fréquent) en culture. Deux opérateurs sur chaque site ont testé chaque lot de réactifs pendant 5 jours. Deux runs (1 run = 1 série ; 1 série = 1 panel + 3 contrôles) ont été réalisés chaque jour et 3 réplicats de chaque membre de panel ont été réalisés pour chaque run. Les résultats de l'évaluation sont présentés dans le Tableau 26.

Tableau 26 Pourcentage attribuable de la variance totale (%VT), écart-type (ET) de précision totale et CV log-normal (%) de concentration d'ADN du BKV (\log_{10} UI/mL) par membre de panel positif

Concentration attendue de l'ADN de BKV (\log_{10} UI/mL)	Concentration moyenne observée ^a de l'ADN de BKV (\log_{10} UI/mL)	Nombre de tests ^b	Lot %VT ^c (CV%) ^d	Site %VT ^c (CV%) ^d	Jour/opérateur %VT ^c (CV%) ^d	Série %VT ^c (CV%) ^d	Intra-série %VT ^c (CV%) ^d	Précision totale DS ^e	Précision totale CV log-normal (%) ^d
1,81	1,74	270	9 % (20,63)	6 % (17,69)	0 % (0,00)	7 % (19,15)	78 % (68,05)	0,304	79,43
3,70	3,52	270	10 % (9,79)	10 % (9,57)	14 % (11,44)	25 % (15,16)	40 % (19,38)	0,131	30,91
4,70	4,51	270	3 % (4,42)	24 % (13,46)	0 % (0,00)	56 % (20,58)	17 % (11,27)	0,118	27,71
5,70	5,54	270	7 % (5,66)	28 % (11,50)	0 % (0,00)	40 % (13,85)	25 % (10,84)	0,094	21,94
7,70	7,62	269	4 % (3,27)	49 % (11,00)	0 % (0,00)	13 % (5,60)	34 % (9,10)	0,068	15,74

^a Calculée à l'aide de la procédure SAS MIXED.

^b Nombre de tests valides avec niveau d'ADN détectable.

^c %VT = Pourcentage de contribution à la variance totale.

^d CV% = Coefficient de variation en pourcentage log-normal = $\frac{\text{rac}(10^{[\text{ET}^2 \times \ln(10)]} - 1)}{\text{moyenne}} \times 100$.

^e Calculé à l'aide de la variabilité totale à partir de la procédure SAS MIXED.

Remarque : le tableau inclut uniquement les résultats présentant un niveau d'ADN détectable. ET = écart-type. CV = coefficient de variation ; BKV = virus BK.

Le test cobas® BKV a montré une reproductibilité clinique acceptable pour différentes concentrations sur l'ensemble du domaine de linéarité. En outre, le système a détecté 100 % des échantillons $3 \times \text{LLoQ}$. Les cobas® 6800 et cobas® 8800 Systems ont en commun une conception modulaire et ont obtenu des performances équivalentes lors de l'utilisation du test cobas® BKV. Toutes les limites de confiance (LC) à 95 % estimées pour la différence entre deux mesures d'échantillons

issus du même sujet étaient comprises dans un intervalle de $\pm 0,84 \log_{10}$ UI/mL, ce qui indique que le test permet d'évaluer des variations des niveaux d'ADN de BKV considérées comme cliniquement significatives.

Sur les 270 tests valides pour les membres du panel négatifs réalisés sur les cobas® 6800/8800 Systems, tous les échantillons ont obtenu un résultat « Target Not Detected ». Le pourcentage de corrélation négative (PCN) était donc de 100 % avec un IC exact à 95 % allant de 98,6 % à 100 %.

Performance du test cobas® BKV pour les échantillons de plasma EDTA

La performance clinique du test cobas® BKV a été évaluée plus avant sur trois sites d'analyse en mesurant les niveaux d'ADN du BKV dans des échantillons cliniques (purs et dilués) de patients infectés et non infectés par le BKV et des échantillons de plasma EDTA artificiels dopés avec du BKV en culture, comparativement à un test sur acides nucléiques développé en laboratoire (TDL) bien établi (TDL BKV comparatif). Sur l'ensemble des échantillons analysés avec le test cobas® BKV et le test comparatif BKV, 550 échantillons au total (217 échantillons cliniques purs et 303 échantillons cliniques dilués issus de 129 sujets transplantés et 30 échantillons artificiels) étaient valides pour les deux tests et évaluables pour l'analyse de concordance clinique (Tableau 27).

Tableau 27 Analyse de concordance entre les résultats des niveaux d'ADN de BKV obtenus avec le test cobas® BKV et le TDL comparatif pour l'ensemble des échantillons

cobas® BKV (log ₁₀ UI/mL)	TDL BKV comparatif (log ₁₀ UI/mL) Target Not Detected	TDL BKV comparatif (log ₁₀ UI/mL) < LLoQ (< 2,3)	TDL BKV comparatif (log ₁₀ UI/mL) 2,3 à < 3,0	TDL BKV comparatif (log ₁₀ UI/mL) 3,0 à < 3,7	TDL BKV comparatif (log ₁₀ UI/mL) 3,7 à 4,4	TDL BKV comparatif (log ₁₀ UI/mL) > 4,4	Total
Target Not Detected	107	7	5	0	0	0	119
< LLoQ (< 2,3)	23	51	39	0	0	0	113
2,3 à < 3,0	0	3	40	62	1	0	106
3,0 à < 3,7	0	0	1	71	42	0	114
3,7 à 4,4	0	0	0	0	26	26	52
> 4,4	0	0	0	0	1	45	46
Total	130	61	85	133	70	71	550
Corrélation de colonne (%)	(130/130) 100,0 %	(61/61) 100,0 %	(80/85) 94,1 %	(133/133) 100,0 %	(69/70) 98,6 %	(71/71) 100,0 %	-
(Résultat IC à 95 %) ^a	(97,1 %, 100 %)	(94,1 %, 100,0 %)	(87,0 %, 97,5 %)	(97,2 %, 100,0 %)	(92,3 %, 99,7 %)	(94,9 %, 100,0 %)	-

Remarque : IC = intervalle de confiance ; LLoQ = limite de quantification inférieure du TDL BKV comparatif (200 UI/mL = 2,3 log₁₀ UI/mL). Écart-type du TDL BKV comparatif estimé à 0,37 log₁₀ UI/mL (d'après l'étude de précision analytique du TDL BKV de l'université de l'Indiana). Une concentration d'analyte de 3,0 log₁₀ UI/mL représentait une LLoQ + 2σ, 3,7 log₁₀ UI/mL représentait une LLoQ + 4σ et 4,4 log₁₀ UI/mL représentait une LLoQ + 6σ avec une plage d'intervalle de 2σ. Les échantillons appariés évaluables pour l'analyse de concordance clinique ont été inclus dans ce tableau.

^a Indépendance supposée entre tous les échantillons.

Les résultats discordants ont été définis comme ceux situés à plus d'une case de la diagonale (ombrés). Pour les résultats « Target Not Detected » (TND) par corrélation de colonne du TDL, les cellules « Target Not Detected » et < LLoQ (< 2,3) pour le test cobas® BKV ont été combinées. La raison justifiant l'ajout des cellules adjacentes < LLoQ et TND pour la colonne TND réside dans le fait que la différence entre un résultat TND et < LLoQ n'est pas cliniquement significative

et qu'ils se trouvent analytiquement à la limite inférieure de la plage de mesures, pouvant être impactée par une erreur aléatoire.

Sur les 43 échantillons négatifs pour l'ADN du BKV prélevés pour l'estimation du PCN avec le test **cobas**® BKV, tous ont obtenu un résultat négatif au test **cobas**® BKV. Le PCN était donc de 100 % avec un IC exact à 95 % allant de 91,8 % à 100 %.

La concordance entre le test **cobas**® BKV et le TDL BKV comparatif a également été évaluée en utilisant différents seuils cliniques (Tableau 28).

Tableau 28 Récapitulatif de la concordance du test **cobas**® BKV et du TDL BKV comparatif en utilisant différents seuils pour l'ensemble des échantillons

Seuils*	Pourcentage de corrélation < seuil IC à 95 % (n/N)	Pourcentage de corrélation ≥ seuil IC à 95 % (n/N)
Target Not Detected	82,3 % (107/130) (74,8 %, 87,9 %)	97,1 % (408/420) (95,1 %, 98,4 %)
LLoQ (2,3 log ₁₀ UI/mL)	98,4 % (188/191) (95,5 %, 99,5 %)	87,7 % (315/359) (83,9 %, 90,7 %)
3,0 log ₁₀ UI/mL	99,6 % (275/276) (98,0 %, 99,9 %)	77,0 % (211/274) (71,7 %, 81,6 %)
4,0 log ₁₀ UI/mL	100,0 % (447/447) (99,1 %, 100,0 %)	67,0 % (69/103) (57,4 %, 75,3 %)

Remarque : Les échantillons présentant des résultats « Target Not Detected » ont été catégorisés comme « < à la valeur seuil en UI/mL ».

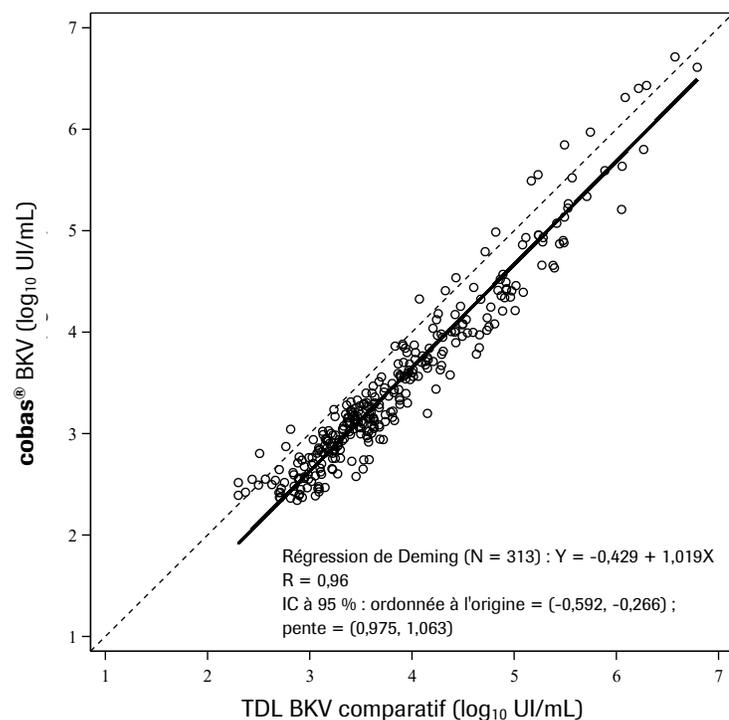
LLoQ = limite de quantification inférieure du TDL BKV comparatif (200 UI/mL = 2,3 log₁₀ UI/mL).

L'intervalle de confiance (IC) à 95 % a été calculé à l'aide de la méthode de Score en supposant une indépendance entre tous les échantillons.

* Seuils de 1 000 UI/mL = 3,0 log₁₀ UI/mL et 10 000 UI/mL = 4,0 log₁₀ UI/mL.

Sur l'ensemble des échantillons analysés avec le test **cobas**® BKV qui étaient positifs au BKV avec le test comparatif BKV, 313 échantillons au total (133 échantillons cliniques purs et 159 échantillons cliniques dilués issus de 68 sujets transplantés et 21 échantillons artificiels) étaient évaluables pour l'analyse de corrélation sur les trois sites d'analyse (Figure 9).

Figure 9 Corrélation entre le test **cobas**® BKV et le TDL BKV comparatif pour l'ensemble des échantillons : graphique de régression linéaire de Deming des niveaux d'ADN (\log_{10} UI/mL)



Une analyse supplémentaire du graphique de biais concernant les différences des niveaux d'ADN a indiqué une différence systématique entre les deux tests, constante sur l'ensemble du domaine de linéarité de chevauchement. L'IC à 95 % de l'ordonnée à l'origine de la droite ajustée des graphiques de biais allait de -0,404 à -0,168, ce qui est compris dans l'intervalle de $\pm 0,74 \log_{10}$ UI/mL (± 2 fois l'écart-type de précision analytique du TDL BKV comparatif). En outre, le biais moyen a été estimé à $-0,357 \log_{10}$ UI/mL et, d'après l'équation de la droite ajustée des graphiques de biais, la différence systématique entre les deux tests était de $-0,343 \log_{10}$ UI/mL et de $-0,362 \log_{10}$ UI/mL pour les échantillons contenant des niveaux d'ADN à 3 et 4 \log_{10} UI/mL, respectivement.

Reproductibilité du test **cobas**® BKV pour les échantillons d'urine stabilisée

La reproductibilité du test **cobas**® BKV a été évaluée pour différents facteurs (lot de réactifs, site d'analyse, série et jours de test) qui pourraient affecter les résultats rapportés pour les tests cliniques de routine. L'évaluation a été menée sur 3 sites d'analyse à l'aide de 3 lots de réactifs, avec un panel d'échantillons négatifs et positifs pour un nombre total de 270 tests par concentration (sans inclure les contrôles). Les panels étaient composés d'échantillons d'urine stabilisée avec le **cobas**® PCR Media ayant été confirmés négatifs pour la présence d'ADN de BKV au moyen d'un protocole de libération des acides nucléiques de l'urine et dopés par de l'ADN du standard international de l'OMS pour le BKV ou de l'ADN viral du génotype Ia de BKV en culture. Deux opérateurs sur chaque site ont testé chaque lot de réactifs pendant 5 jours. Deux runs (1 run = 1 série ; 1 série = 1 panel + 3 contrôles) ont été réalisés chaque jour et 3 réplicats de chaque membre de panel ont été réalisés pour chaque run. Les résultats de l'évaluation sont présentés dans le Tableau 29.

Tableau 29 Pourcentage attribuable de la variance totale (%VT), écart-type (ET) de précision totale et CV log-normal (%) de concentration d'ADN du BKV (\log_{10} UI/mL) par membre de panel positif (urine stabilisée)

Concentration d'ADN de BKV attendue	Concentration moyenne observée ^a de l'ADN de BKV	Nombre de tests ^b	Lot %VT ^c (CV%) ^d	Site %VT ^c (CV%) ^d	Jour/opérateur %VT ^c (CV%) ^d	Série %VT ^c (CV%) ^d	Intra-série %VT ^c (CV%) ^d	Précision totale DS ^e	Précision totale CV(%) ^d
2,78	2,92	270	59 % (12,64)	0 % (1,15)	0 % (0,00)	0 % (0,00)	40 % (10,41)	0,071	16,47
3,70	3,78	270	47 % (8,14)	2 % (1,62)	8 % (3,31)	0 % (0,00)	43 % (7,72)	0,051	11,83
4,70	4,80	270	38 % (5,02)	2 % (1,28)	6 % (2,07)	0 % (0,00)	53 % (5,96)	0,035	8,17
5,70	5,70	270	21 % (3,12)	0 % (0,00)	0 % (0,00)	0 % (0,00)	79 % (6,12)	0,030	6,87
7,70	7,69	270	2 % (1,51)	19 % (4,84)	6 % (2,79)	0 % (0,00)	73 % (9,53)	0,048	11,17

Remarque : le tableau inclut uniquement les résultats présentant un niveau d'ADN détectable. ET = écart-type ; CV = coefficient de variation, en pourcentage ; BKV = virus BK.

^a Calculée à l'aide de la procédure SAS MIXED.

^b Nombre de tests valides avec niveau d'ADN détectable.

^c %VT = Pourcentage de contribution à la variance totale.

^d CV% = Coefficient de variation en pourcentage log-normal = $\frac{\text{ET}^2 \times \ln(10)}{\text{moyenne}^2} \times 100$.

^e Calculé à l'aide de la variabilité totale à partir de la procédure SAS MIXED.

Le test **cobas**® BKV a montré une reproductibilité clinique acceptable pour différentes concentrations sur l'ensemble du domaine de linéarité. En outre, le système a détecté 100 % des échantillons $3 \times \text{LLOQ}$. Les **cobas**® 6800 et **cobas**® 8800 Systems ont en commun une conception modulaire et ont obtenu des performances équivalentes lors de l'utilisation du test **cobas**® BKV. Toutes les limites de confiance (LC) à 95 % estimées pour la différence entre deux mesures d'échantillons issus du même sujet étaient comprises dans un intervalle de $\pm 0,20 \log_{10}$ UI/mL, ce qui indique que le test permet d'évaluer des variations des niveaux d'ADN de BKV considérées comme cliniquement significatives. Le système a montré un pourcentage de corrélation négative de 99,26 % avec un IC de 97,3 % à 99,9 %. Sur les 270 tests valides pour les membres du panel négatifs, 2 échantillons (0,74 %) ont présenté un niveau d'ADN indiquant une positivité $< \text{LLOQ}$. Des recherches plus approfondies sur ces résultats ont montré qu'ils n'étaient pas associés à un instrument, un site ou un lot de réactifs en particulier. Un séquençage supplémentaire de l'ADN a confirmé la présence de BKV. Les séquences de BKV identifiées étaient différentes de celles du contrôle positif et de la souche de BKV utilisée pour la préparation du panel, excluant ainsi une contamination pendant la préparation du panel et suggérant une virurie à l'état de trace dans l'un des 25 échantillons d'urine du pool d'échantillons d'urine utilisé pour la préparation du panel négatif.

Performance du test **cobas**® BKV pour les échantillons d'urine stabilisée

La performance clinique du test **cobas**® BKV a été évaluée plus avant sur trois sites d'analyse en mesurant les niveaux d'ADN du BKV dans des échantillons cliniques d'urine de patients infectés et non infectés par le BKV stabilisés dans du **cobas**® PCR Media, comparativement à un TDL bien établi (TDL BKV comparatif).

Sur l'ensemble des échantillons analysés avec le test **cobas**® BKV et le test comparatif BKV, un total de 308 échantillons d'urine purs stabilisés dans du **cobas**® PCR Media issus de 84 sujets transplantés étaient valides pour les deux tests et évaluables pour l'analyse de concordance clinique (Tableau 30).

Tableau 30 Analyse de concordance entre les résultats des niveaux d'ADN de BKV (\log_{10} UI/mL) obtenus avec le **cobas®** BKV et le TDL comparatif pour l'ensemble des échantillons (d'urine stabilisée)

cobas® BKV (\log_{10} UI/mL)	TDL BKV comparatif Target Not Detected	TDL BKV comparatif < LLoQ (< 3,0)	TDL BKV comparatif 3,0 à < 3,3	TDL BKV comparatif 3,3 à < 3,6	TDL BKV comparatif 3,6 à 3,9	TDL BKV comparatif > 3,9	Total
Target Not Detected	62	6	0	0	0	0	68
< LLoQ (< 3,0)	4	22	0	0	0	1	27
3,0 à < 3,3	0	2	0	0	0	0	2
3,3 à < 3,6	0	0	6	3	0	0	9
3,6 à 3,9	0	0	2	11	10	0	23
> 3,9	0	0	0	2	8	169	179
Total	66	30	8	16	18	170	308
Corrélation de colonne (%)	(66/66) 100,0 %	(30/30) 100,0 %	(6/8) 75,0 %	(14/16) 87,5 %	(18/18) 100,0 %	(169/170) 99,4 %	-
(Résultat IC à 95 %)a	(94,5 %, 100,0 %)	(88,6 %, 100,0 %)	(40,9 %, 92,9 %)	(64,0 %, 96,5 %)	(82,4 %, 100,0 %)	(96,7 %, 99,9 %)	-

Remarque : IC = intervalle de confiance ; LLoQ = limite de quantification inférieure du TDL BKV comparatif (1 000 UI/mL = 3,0 \log_{10} UI/mL) ; TDL = test développé en laboratoire ; BKV = virus BK.

Écart-type du TDL BKV comparatif estimé à 0,15 \log_{10} UI/mL (d'après l'étude de validation du TDL BKV comparatif).

Une concentration d'analyte de 3,3 \log_{10} UI/mL représentait une LLoQ + 2 σ , 3,6 \log_{10} UI/mL représentait une LLoQ + 4 σ et 3,9 \log_{10} UI/mL représentait une LLoQ + 6 σ avec une plage d'intervalle de 2 σ .

Les échantillons appariés évaluables pour l'analyse de concordance clinique ont été inclus dans ce tableau.

^a Indépendance supposée entre tous les échantillons.

Le séquençage de l'ADN effectué sur des échantillons représentatifs des sujets dont les résultats présentaient systématiquement un décalage de plus d'1 \log_{10} UI/mL n'a révélé aucun mésappariement des séquences pour les cibles d'amorce ou de sonde pour le test **cobas®** BKV. Les résultats discordants ont été définis comme ceux situés à plus d'une case de la diagonale (ombrés). Pour les résultats « Target Not Detected » (TND) par corrélation de colonne du TDL, les cellules « Target Not Detected » et < LLoQ (< 3,0) pour le test **cobas®** BKV ont été combinées. La raison justifiant l'ajout des cellules adjacentes < LLoQ et TND pour la colonne TND réside dans le fait que la différence entre un résultat TND et < LLoQ n'est pas cliniquement significative et qu'ils se trouvent analytiquement à la limite inférieure de la plage de mesures, pouvant être impactée par une erreur aléatoire. Sur les 66 échantillons négatifs pour l'ADN du BKV prélevés pour l'estimation du PCN avec le test **cobas®** BKV, 61 ont produit des résultats valides. Ces 61 échantillons ont tous obtenu un résultat négatif au test **cobas®** BKV. Le PCN était donc de 100 % avec un IC exact à 95 % allant de 94,1 % à 100 %.

La concordance entre le test **cobas®** BKV et le TDL BKV comparatif a également été évaluée en utilisant différents seuils cliniques (Tableau 31).

Tableau 31 Récapitulatif de la concordance du test **cobas®** BKV et du TDL BKV comparatif en utilisant différents seuils pour l'ensemble des échantillons (urine stabilisée)

Seuil*	Pourcentage de corrélation < seuil IC à 95 % (n/N)	Pourcentage de corrélation ≥ seuil IC à 95 % (n/N)
Target Not Detected	93,9 % (62/66) (85,4 %, 97,6 %)	97,5 % (236/242) (94,7 %, 98,9 %)
LLoQ (3,0 log ₁₀ UI/mL)	97,9 % (94/96) (92,7 %, 99,4 %)	99,5 % (211/212) (97,4 %, 99,9 %)
4,0 log ₁₀ UI/mL	90,9 % (130/143) (85,1 %, 94,6 %)	99,4 % (164/165) (96,6 %, 99,9 %)
7,0 log ₁₀ UI/mL	97,2 % (242/249) (94,3 %, 98,6 %)	94,9 % (56/59) (86,1 %, 98,3 %)

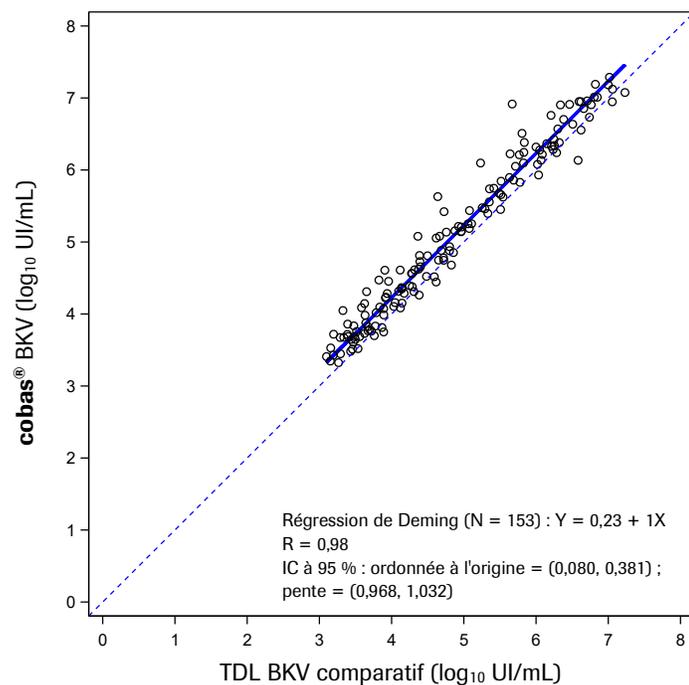
Remarque : Les échantillons présentant des résultats « Target Not Detected » ont été catégorisés comme « < à la valeur seuil en UI/mL ».

LLoQ = limite de quantification inférieure du TDL BKV comparatif (1000 UI/mL = 3,0 log₁₀ UI/mL).

L'intervalle de confiance (IC) à 95 % a été calculé à l'aide de la méthode de Score en supposant une indépendance entre tous les échantillons.

* Seuils de 10 000 UI/mL = 4,0 log₁₀ UI/mL et 10 000 000 UI/mL = 7,0 log₁₀ UI/mL.

Sur l'ensemble des échantillons analysés avec le test **cobas®** BKV qui étaient positifs au BKV avec le test comparatif BKV, un total de 153 échantillons d'urine purs stabilisés dans du **cobas®** PCR Media issus de 55 sujets transplantés étaient évaluables pour l'analyse de corrélation sur les trois sites d'analyse (Figure 10).

Figure 10 Corrélation entre le test **cobas®** BKV et le TDL BKV comparatif pour l'ensemble des échantillons : graphique de régression linéaire de Deming des niveaux d'ADN (log₁₀ UI/mL) (urine stabilisée)

Une analyse supplémentaire du graphique de biais concernant les différences des niveaux d'ADN a indiqué une différence systématique entre les deux tests, constante sur l'ensemble du domaine de linéarité de chevauchement. L'IC à 95 % de l'ordonnée à l'origine de la droite ajustée des graphiques de biais allait de 0,168 à 0,488, ce qui est compris dans l'intervalle de $\pm 0,5 \log_{10}$ UI/mL. En outre, le biais moyen a été estimé à $0,231 \log_{10}$ UI/mL et, d'après l'équation de la droite ajustée des graphiques de biais, la différence systématique entre les deux tests était de $0,248 \log_{10}$ UI/mL et de $0,188 \log_{10}$ UI/mL pour les échantillons contenant des niveaux d'ADN à $4 \log_{10}$ UI/mL et $7 \log_{10}$ UI/mL, respectivement.

Équivalence des systèmes/comparaison des systèmes

L'équivalence des cobas® 5800, cobas® 6800 et cobas® 8800 Systems a été démontrée au moyen d'études de performances. Les résultats présentés dans les instructions d'utilisation indiquent des performances équivalentes pour tous les systèmes.

Informations supplémentaires

Caractéristiques clés du test

Type d'échantillon	Plasma EDTA	Urine stabilisée dans le cobas ® PCR Media
Quantité d'échantillon minimale requise	375 µL*	575 µL*
Volume de prise d'essai d'échantillon	200 µL	400 µL
Sensibilité analytique	21,5 UI/mL (intervalle de confiance bilatéral à 95 % : 16,3 UI/mL - 32,4 UI/mL)	12,2 UI/mL (intervalle de confiance bilatéral à 95 % : 9,2 UI/mL - 18,3 UI/mL)
Domaine de linéarité	21,5 UI/mL à 1E+08 UI/mL	200 UI/mL à 1E+08 UI/mL
Spécificité	100 %	100 %
Sous-types détectés	Sous-types I (avec les sous-groupes Ia, Ib et Ic), II, III et IV de BKV	

* Volume mort de 175 µL identifié pour les tubes secondaires **cobas omni**. Les autres tubes utilisés pour le test peuvent contenir un volume mort différent et nécessiter un volume minimum plus ou moins élevé. Contactez votre représentant Roche local pour obtenir plus d'informations.

Symboles

Les symboles suivants sont utilisés dans toute la documentation accompagnant les produits de diagnostic par PCR de Roche.

Tableau 32 Symboles utilisés dans l'étiquetage des produits de diagnostic par PCR de Roche

 Age/DOB Âge ou date de naissance	 Dispositif non adapté aux tests à proximité du patient	 QS IU/PCR UI QS par réaction de PCR, utiliser les unités internationales (UI) QS par réaction de PCR pour le calcul des résultats.
 SW Logiciel auxiliaire	 Dispositif non adapté à l'auto-test	 SN Numéro de série
 Assigned Range [copies/mL] Plage assignée (copies/mL)	 Distributeur <i>(Remarque : le pays/la région applicable peut être indiqué(e) sous le symbole.)</i>	 Site Site
 Assigned Range [IU/mL] Plage assignée (UI/mL)	 Ne pas réutiliser	 Procédure Standard Procédure standard
 EC REP Mandataire dans la Communauté européenne	 Femme	 STERILE EO Stérilisé à l'aide d'oxyde d'éthylène
 BARCODE Fiche technique à code-barres	 Pour évaluation des performances DIV uniquement	  Conserver dans un endroit sombre Limites de température
 LOT Code du lot	 GTIN Code article international	 TDF Fichier de définition de tests
 Risques biologiques	 Importateur	 ↑↑ Orienté vers le haut
 REF Référence du catalogue	 IVD Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>	 Procédure UltraSensitive Procédure ultrasensible
 CE Marquage CE de conformité ; ce dispositif est conforme aux exigences en vigueur concernant le marquage CE d'un dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>	 LLR Limite inférieure de la plage assignée	 UDI Identification de dispositif unique
 Collect Date Date de collecte	 Homme	 ULR Limite supérieure de la plage assignée
 Consultez les instructions d'utilisation	 Fabricant	 Urine Fill Line Ligne de remplissage d'urine
 Suffisant pour <n> tests	 CONTROL - Contrôle négatif	 Rx Only États-Unis uniquement : la législation fédérale américaine limite la vente de ce dispositif aux professionnels de santé autorisés à exercer.
 CONTENT Contenu du kit	 NON STERILE Non stérile	 Hourglass Date limite d'utilisation
 CONTROL Contrôle	 ? Nom du patient	
 Date de fabrication	 # Numéro patient	
 Dispositif pour tests à proximité du patient	 Retirer ici	
 Dispositif pour auto-test	 CONTROL + Contrôle positif	
	 QS copies / PCR Copies QS par réaction de PCR, utiliser les copies QS par réaction de PCR pour le calcul des résultats.	

Assistance technique

Pour bénéficier d'une assistance technique, merci de vous adresser à votre filiale locale :
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Fabricant et importateur

Tableau 33 Fabricant et importateur



Roche Molecular Systems, Inc.
1080 US Highway 202 South
Branchburg, NJ 08876 USA
www.roche.com

Fabriqué aux États-Unis



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Marques commerciales et brevets

Voir <https://diagnostics.roche.com/us/en/about-us/patents>

Copyright

©2022 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Références

1. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplant recipients: a global perspective. Preface. *Bone Marrow Transplant*. 2009;44:453-5. PMID: 19861977.
2. Green M. Introduction: Infections in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13 Suppl 4:3-8. PMID: 23464993.
3. Morel V, Martin E, Francois C, et al. A Simple and Reliable Strategy for BK Virus Subtyping and Subgrouping. *J Clin Microbiol*. 2017;55:1177-85. PMID: 28151406.
4. Egli A, Infanti L, Dumoulin A, et al. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis*. 2009;199:837-46. PMID: 19434930.
5. Pinto M, Dobson S. BK and JC virus: a review. *J Infect*. 2014;68 Suppl 1:S2-8. PMID: 24119828.
6. Hirsch HH, Randhawa PS, AST Infectious Diseases Community of Practice. BK polyomavirus in solid organ transplantation-Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant*. 2019;33:e13528. PMID: 30859620.
7. Ambalathingal GR, Francis RS, Smyth MJ, Smith C, Khanna R. BK Polyomavirus: Clinical Aspects, Immune Regulation, and Emerging Therapies. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30:503-28. PMID: 28298471.
8. Yamada Y, Tsuchiya T, Inagaki I, Seishima M, Deguchi T. Prediction of Early BK Virus Infection in Kidney Transplant Recipients by the Number of Cells With Intranuclear Inclusion Bodies (Decoy Cells). *Transplant Direct*. 2018;4:e340. PMID: 29464201.
9. Nিকেleit V, Singh HK. Polyomaviruses and disease: is there more to know than viremia and viruria? *Curr Opin Organ Transplant*. 2015;20:348-58. PMID: 25933251.
10. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93:125-8. PMID: 2227421.
11. Savva R, McAuley-Hecht K, Brown T, Pearl L. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. *Nature*. 1995;373:487-93. PMID: 7845459.
12. Mol CD, Arvai AS, Slupphaug G, et al. Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis. *Cell*. 1995;80:869-78. PMID: 7697717.
13. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. 1992;10:413-7. PMID: 1368485.
14. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-94. PMID: 8908518.
15. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services, Centers for Disease Control and Preventions, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4:Wayne, PA;CLSI, 2014.
17. Goetsch HE, Zhao L, Gnegy M, et al. Fate of the Urinary Tract Virus BK Human Polyomavirus in Source-Separated Urine. *Appl Environ Microbiol*. 2018;84. PMID: 29374036.
18. Boan P, Hewison C, Swaminathan R, et al. Optimal use of plasma and urine BK viral loads for screening and predicting BK nephropathy. *BMC Infect Dis*. 2016;16:342. PMID: 27448566.

Révision du document

Informations sur la révision du document	
Doc Rev. 1.0 03/2022	Première publication.
Doc Rev. 2.0 09/2022	Mise à jour de la page de couverture et des tableaux 2 et 3 avec un P/N supplémentaire pour les kits de contrôle. Mise à jour de la section Marques commerciales et brevets , y compris du lien. Veuillez contacter votre représentant local Roche si vous avez des questions.

Le résumé du rapport sur la sécurité et les performances peut être consulté en utilisant le lien suivant :

<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>