

DeepChek® Assay

INTEGRASE

Génotypage et résistance aux médicaments



24

Guide d'utilisation

Version 2 - Révision 0

Diagnostic in-vitro qualitatif

À utiliser conjointement avec un appareil de séquençage

IVD Rx only



REF 122A24 – GTIN : 05407007960019

Historique des modifications

Date	Version du kit	Version de l'IFU	Description des changements
13/01/2023	A	2.0	- Fusion des IFU pour avoir un seul et même document adapté aux version V1.2, V1.3 et V1.4 du kit - Modifications dans la partie « Contenu du test » (couleur des bouchons pour la version 1.4)

Table des matières

Utilisation prévue	3
Indication d'utilisation.....	3
Résumé et explication	4
Principe de la procédure	5
Matériel fourni	7
Matériel requis mais non fourni.....	8
Avertissements et précautions	9
Stockage et manipulation des réactifs	12
Procédure	13
Interprétation des résultats	21
Contrôle qualité des produits	24
Limitations	24
Caractéristiques de performance.....	25
Annex I – Contenus des versions précédentes	30
Références bibliographiques.....	32
Symboles	33
Références de commande.....	33
Informations de contact.....	33
Fabricant.....	34

Utilisation prévue

Le DeepChek® INT Assay est destiné à être utilisé pour amplifier la portion pertinente des gènes de l'intégrase du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) à partir de l'ARN extrait d'échantillons de plasma, de sérum ou de sang total. Les codons couvrant les positions 20 à 280 du gène de l'intégrase (INT) dans le cadre de lecture ouvert pol sont amplifiés. Cette méthode d'amplification de l'acide nucléique peut aider à la détermination de la résistance aux antirétroviraux dans les échantillons cliniques provenant de patients infectés par le VIH. Le DeepChek® INT Assay est une variante du DeepChek® PR/RT Assay.

Ce test d'amplification nucléique est indiqué UNIQUEMENT pour les patients déjà diagnostiqués atteints du VIH. Ce test n'est PAS destiné à être utilisé comme test de dépistage ou de confirmation pour la détection, la confirmation ou la quantification de marqueurs de l'infection par le VIH (VIH 1 et 2) dans des échantillons humains.

Indication d'utilisation

L'ARN amplifié pourra être utilisé comme matrice dans les procédures de laboratoire validées pour les tests de variabilité génomique (génotypage) pouvant affecter la sensibilité du VIH-1 aux médicaments antirétroviraux actuels, y compris les inhibiteurs de l'intégrase (II). Le DeepChek® INT Assay a été validé en laboratoire pour le séquençage Sanger ou le séquençage de nouvelle génération (NGS). Les médecins peuvent alors utiliser les données génotypiques correspondantes en association avec les données cliniques des patients pour la prise de décisions en matière de traitement (pharmacothérapie).

Remarque : Le DeepChek® INT Assay doit être utilisé en suivant les instructions données dans ce manuel, en association avec des réactifs et des instruments validés. Toute utilisation hors indications et/ou modification des composants de ce produit annulera la responsabilité d'ABL.

Résumé et explication

L'extension mondiale de la thérapie antirétrovirale (ART) a permis de réduire considérablement la mortalité et l'incidence du VIH-1. Toutefois, ces médicaments doivent être choisis et contrôlés avec soin par les professionnels de santé. Cela s'explique par les obstacles qui peuvent surgir avant et pendant le traitement. L'un des aspects les plus importants est la résistance du VIH aux médicaments. La pharmacorésistance du VIH constitue une menace potentielle pour le succès à long terme de la thérapie antirétrovirale et apparaît comme une menace pour l'élimination du sida comme problème de santé publique d'ici 2030.

Une technologie comme le génotypage permet d'évaluer les virus résistants aux médicaments et aide les professionnels de santé à prendre des décisions en matière de traitement. Ces tests de résistance aux médicaments font désormais partie intégrante des soins du VIH.

Pour le VIH, la résistance aux médicaments est due à des changements (variations génomiques) de la structure génétique du virus. Ces mutations peuvent entraîner des changements dans certains produits géniques, comme les protéines, le plus souvent des enzymes, qui aident le VIH à se répliquer malgré la présence d'un traitement antirétroviral qui empêche généralement la réplication.

Des mutations peuvent survenir dans l'une de ces régions du virus et causer une résistance aux médicaments :

- Transcriptase inverse (RT) : les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) et les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) ciblent cette enzyme
- Protéase (PR) : les inhibiteurs de la protéase ciblent cette enzyme
- Intégrase (INT) : les inhibiteurs de l'intégrase ciblent cette enzyme
- gp41 : les inhibiteurs de fusion ciblent cette protéine transmembranaire
- gp120 : les inhibiteurs d'entrée ciblent cette glycoprotéine.

Pour les personnes infectées par le VIH, l'acquisition de variations génomiques spécifiques dans ces régions peut réduire ou inhiber l'efficacité des médicaments, réduisant ainsi considérablement les options de traitement.

Les mutations de résistance aux médicaments du VIH peuvent se produire pendant :

1. La transmission du VIH résistant aux médicaments
2. La résistance acquise du VIH aux ARVs (ADR)
3. La résistance du VIH aux ARVs avant le début du traitement (PDR)
4. Pendant le traitement.

Principe de la procédure

Ce produit est un test de biologie moléculaire utilisé uniquement dans un laboratoire de biologie moléculaire professionnel (niveau de biosécurité : minimum 2), que l'on ne peut ni transporter, ni tenir à la main ou porter à même le corps.

L'objectif principal du produit est d'amplifier l'intégrase du VIH-1 en utilisant une réaction en chaîne par polymérase après transcription inverse (RT-PCR) et une Nested PCR. Nous avons décidé d'une PCR en 2 étapes pour notre produit et son variant avec l'utilisation d'une Nested PCR après la RT-PCR pour augmenter la sensibilité et la spécificité de la PCR¹.

L'examen des fiches de données de sécurité (FDS) des composants du test indique qu'il n'y a pas de substance toxique, ni cancérigène, mutagène ou toxique pour la reproduction à des doses pertinentes qui rendent le produit et son variant intrinsèquement sûrs par leur conception.

L'étape de RT-PCR convertit la séquence cible d'ARN viral (INT) en ADNc en un seul cycle de PCR. Tandis que, l'étape de Nested PCR amplifie l'ADNc (INT), obtenu par la réaction de RT, à une quantité détectable.

Ce test pour INT et celui pour PR/RT, ont été conçus et validés pour le sous-type B du VIH-1. Cependant, nos produits permettent l'amplification d'autres sous-types du VIH-1 comme la forme recombinante du VIH-1 (O2_AG).

Pour augmenter la sensibilité entre les différents sous-types de VIH-1, nous avons conçu deux séries d'amorces de transcriptase inverse. Tandis que, pour les régions d'intégrase et de protéase, les séquences sont relativement conservées.

Selon les recommandations de traitement, l'indication pour la mise en œuvre d'inhibiteurs d'intégrase dans le parcours de diagnostic peut également être recommandée. Dans ce cas, les utilisateurs ont besoin, en plus, de la variante du produit capable d'amplifier l'intégrase du VIH-1.

Le produit n'est pas automatisé. Chaque étape principale du workflow est manuelle. L'utilisateur est libre de mettre en œuvre le produit sur des plateformes robotisées de manipulation de liquides, mais il doit cependant procéder aux validations correspondantes.

Le produit utilise comme matrice l'ARN extrait d'un plasma sanguin. L'instrument d'extraction peut être un appareil de laboratoire à usage général, par exemple le MagNA Pure (Roche).

Le produit est utilisé avec un thermocycleur pour l'amplification (PCR) qui est un appareil de laboratoire à usage général, par exemple le PCR ProFlex (Thermo Fisher Scientific).

Un aliquot de l'amplicon en solution est utilisé pour la confirmation de l'amplification. Cela peut être vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose (capillaire).

La majorité du volume du produit obtenu est ensuite utilisée pour le séquençage. Le workflow et le dispositif médical utilisés sont différents car les techniques de séquençage varient. Les instruments de séquençage capillaire (Sanger) ou NGS sont des appareils de laboratoire à usage général. Les réactifs de séquençage et de préparation des bibliothèques sont des produits de laboratoire à usage général.

1 Kamolvarin et collaborateurs, 1993

En cas de séquençage capillaire (technologie Sanger), un ensemble spécifique d'amorces de séquençage est nécessaire et est fourni comme accessoire.

Les données brutes de séquençage sont ensuite téléchargées dans un logiciel spécifique conçu pour l'interprétation de la résistance aux médicaments du VIH ; il s'agit d'un dispositif médical autonome. Le logiciel lui-même peut être marqué CE-IVD et doit se référer à la liste actualisée des mutations liées à la résistance aux médicaments pour le VIH et à leurs dernières interprétations.

Le produit appartient à la catégorie des dispositifs de diagnostic *in vitro* généraux, conformément à la directive 98/79/CE sur les dispositifs de diagnostic *in vitro*.

Matériel fourni

Contenu du test

Le kit **DeepChek® Assay Integrase Genotyping and Drug Resistance** est fourni en format 24 réactions (REF 122A24, GTIN: 05407007960019).

DeepChek® Assay Integrase Genotyping and Drug Resistance V1.4

Tableau 1 : Contenu Deepchek Assay INT V1.4

Etiquettes	Volume	Nb tube (Couleur bouchon)
Réactifs de RT-PCR		
RT-PCR Buffer 5X	160 µL	1 tube (vert)
dNTPs	35 µL	1 tube (marron)
RT-PCR Enzyme mix	35 µL	1 tube (blanc)
RNAsine	20 µL	1 tube (orange)
H ₂ O	1000 µL	1 tube (bleu)
INT FOR RT-PCR Primers – 10µM	40 µL	1 tube (jaune)
INT REV RT-PCR Primers – 10µM	40 µL	1 tube (noir)
Réactifs de Nested PCR		
Nested Buffer 5X	160 µL	1 tube (vert)
Nested PCR dNTPs	35 µL	1 tube (marron)
Nested PCR Enzyme	35 µL	1 tube (blanc)
Nested H ₂ O	1000 µL	1 tube (bleu)
INT FOR Nested PCR Primers – 10µM	40 µL	1 tube (jaune)
INT REV Nested PCR Primers – 10µM	40 µL	1 tube (noir)

RT-PCR Buffer 5X	dNTPs	RT-PCR Enzyme mix		Nested PCR Buffer 5X	Nested PCR dNTPs	Nested PCR Enzyme
RNAsine	H ₂ O				Nested H ₂ O	
	INT FOR RT-PCR Primers	INT REV RT-PCR Primers			INT FOR Nested PCR Primers	INT REV Nested PCR Primers

Figure 1: Mapping des composants par couleur de bouchon V1.4

Matériel requis mais non fourni

Réactifs

- Eau de qualité biologie moléculaire (l'eau purifiée est déjà fournie dans le kit ; 2 tubes sont étiquetés « H₂O » (bouchon bleu))
- Réactifs pour le gel d'agarose à 0,8-2 % dans du tampon d'électrophorèse TBE 0,5X ou un réactif d'électrophorèse capillaire équivalent, par exemple le ScreenTape D1000 d'Agilent et les réactifs D1000 pour la TapeStation 4150 d'Agilent

Consommables

- Embouts de pipettes PCR stériles, résistants aux aérosols et exempts de nucléases, avec filtres hydrophobes
- Tubes PCR de 0,5 mL ou 1,5 mL exempts de RNase et de DNase
- Glace
- Plaques PCR de 96 puits
- Film de scellage à chaud pour plaques
- Centrifugeuse de plaques
- Tubes PCR 0,2 mL en barrette de 8 à paroi fine et bouchon bombé
- Refroidisseur de plaque 96 puits (facultatif)

Équipement

- Micropipettes* dédiées à la PCR (0,1-2,5 µL ; 1-10 ou 1-20 µL ; 20-200 µL ; 1 000 µL)
- Centrifugeuse de paillasse* avec rotor pour tubes de 0,5 mL / 1,5 mL (pouvant atteindre 10 000 RPM)
- Vortex de paillasse*
- Instrument de PCR* par exemple le système PCR ProFlex de ThermoFisher Scientific et le matériel spécifique associé ou tout thermocycleur avec une vitesse de rampe suffisante de $\geq 1^{\circ}\text{C/s}$
- Instrument d'électrophorèse sur gel ou capillaire*, par exemple Agilent TapeStation 4150
- Robot pipeteur (facultatif)

(*) : Assurez-vous que les instruments ont été vérifiés et calibrés conformément aux recommandations du fabricant.

Remarque : référez-vous au mode d'emploi du fabricant concerné pour procéder à l'utilisation de l'instrument.

Avertissements et précautions

Précautions générales / de sécurité

Les tests PCR exigent de bonnes pratiques de laboratoire, y compris la maintenance des équipements, qui sont dédiés à la biologie moléculaire et conformes aux réglementations et normes applicables.

Les réactifs et les instructions fournis dans ce test ont été validés pour une performance optimale. Une dilution supplémentaire des réactifs ou une modification des temps et des températures d'incubation peut entraîner des données erronées ou discordantes. Tous les réactifs sont formulés spécifiquement pour être utilisés avec ce test. Pour un fonctionnement optimal du test, aucune substitution ne doit être faite.



- Pour usage diagnostic *in vitro* seulement.
- Ne pas mélanger les composants provenant de tests ayant des numéros de série différents.
- N'utiliser pas d'échantillon contenant de l'héparine.
- Utiliser des embouts de pipettes stériles avec filtres.
- Lors des étapes manuelles, veillez à ce que les tubes soient fermés lorsque cela est possible pour éviter toute contamination.
- Tous les réactifs sont conçus pour un usage unique. N'utilisez pas les réactifs restants des réactions précédentes.
- Certains produits peuvent contenir des substances à des concentrations qui nécessitent un étiquetage conformément à la directive 1272/2008/CE. Nous recommandons de manipuler tous les produits chimiques avec précaution.
- Porter des équipements de protection individuelle (blouse de laboratoire appropriée, gants jetables et lunettes de protection).
- Jeter les échantillons et les déchets conformément aux réglementations de sécurité locales.
- Tous les documents pertinents doivent être lus attentivement avant d'effectuer l'analyse.
- Pour des informations sur la sécurité des instruments, veuillez-vous référer au manuel d'utilisation de l'instrument concerné.

Précautions de laboratoire

Le laboratoire utilisant le DeepChek® Assay doit être accrédité ISO 15189 ou qualifié par l'OMS pour les tests de résistance aux médicaments du VIH ou accrédité selon des réglementations nationales équivalentes.



- Remplacer l'équivalent des échantillons par le nombre de contrôles conformément aux bonnes pratiques de laboratoire, aux exigences d'accréditation ou aux réglementations locales, pour surveiller tout problème de workflow, comme la contamination des réactifs et/ou de l'environnement par les acides nucléiques du VIH-1.
- Assurez-vous que votre laboratoire a été préparé pour le travail avec le VIH et qu'il est conforme à toutes les réglementations en vigueur.
- Veiller à ce que tout le personnel du laboratoire connaisse comment travailler en toute sécurité avec le VIH et les produits sanguins.

Faites preuve d'une extrême prudence pour prévenir :



- Une contamination par DNase qui pourrait entraîner la dégradation de la matrice d'ADN.
- Une contamination par report d'ADN ou de produit de PCR entraînant un faux signal positif.

Nous recommandons donc ce qui suit :

Préparer le master mix pré-PCR avec du matériel dédié (pipettes, embouts, etc.) dans une zone dédiée où aucune matrice d'ADN (ADN, produit de PCR) n'est introduite. Ajoutez la matrice dans une zone séparée (de préférence dans une pièce séparée) avec du matériel spécifique (pipettes, embouts, etc.).



- Tous les échantillons et les déchets doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Nettoyer et désinfecter soigneusement toutes les surfaces de travail avec les désinfectants recommandés par les autorités locales.
- Ne pas manger, boire ou fumer dans la zone de travail du laboratoire.
- Ne pas pipeter avec la bouche.
- Porter des gants de protection jetables, des blouses de laboratoire et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons et des produits chimiques ; réactifs du test.
- Nettoyer et décontaminer la zone de travail et les instruments, y compris les pipettes, avec des produits de décontamination disponibles dans le commerce.
- Utiliser les bonnes pratiques de laboratoire pour minimiser la contamination croisée². Un désinfectant de laboratoire peut être utilisé pour la procédure de désinfection régulière afin d'éviter la contamination.
- Minimiser les mouvements du bras sur les tubes ouverts durant le pipetage.
- Éviter la contamination des réactifs par les microbes et les nucléases lors du retrait des aliquots des flacons de réactifs.
- Utiliser du matériel de laboratoire exempt de nucléase (par exemple, des pipettes, des embouts de pipette, des flacons de réaction) et porter des gants lorsque vous effectuez le test.
- Utiliser des embouts de pipette neufs et résistants aux aérosols pour toutes les étapes de pipetage afin d'éviter la contamination croisée des échantillons et des réactifs.
- Manipuler le matériel infectieux conformément à la réglementation locale.
- Des embouts avec filtre anti-aérosols sont nécessaires pour toutes les étapes de pipetage. Changer de gants fréquemment.
- Pour éviter la contamination de l'environnement par les amplicons de PCR, ne pas retirer le film de scellement de la plaque de PCR après l'amplification.
- Ne garder ouvert que le tube de réactif de travail. Tous les autres tubes de réactifs doivent être bouchés afin de limiter les confusions.
- Ne garder ouvert que le tube d'échantillon de travail. Tous les autres tubes d'échantillons doivent être bouchés pour limiter la contamination croisée des échantillons.
- Laver vous soigneusement les mains après avoir manipulé les échantillons et les réactifs du kit.

² Si possible, effectuez une préparation ultérieure de la bibliothèque d'ADN pour le séquençage et la préparation de la matrice PCR dans des zones séparées.

Stockage et manipulation des réactifs

Les kits sont expédiés sous carboglace et doivent être stockés à une température comprise entre -25°C et -15°C dès leur réception.

- **Tous les réactifs doivent être complètement décongelés avant d'être utilisés.**
- Vortexer doucement et centrifuger les tubes avant de les ouvrir.
- Conserver tous les éléments du kit dans les tubes d'origine.
- Utiliser des congélateurs à température contrôlée.

Ces conditions de stockage s'appliquent à la fois aux composants ouverts et non ouverts. Les composants stockés dans des conditions autres que celles indiquées sur les étiquettes peuvent ne pas fonctionner correctement et peuvent affecter les résultats du test.

Les dates de péremption de chaque réactif sont indiquées sur les étiquettes individuelles des composants. Dans des conditions de stockage correctes, le produit conservera ses performances jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette.

Il n'y a pas de signe évident d'instabilité des produits. Cependant, les contrôles internes positifs et négatifs doivent être effectués simultanément avec les échantillons inconnus.

L'opérateur doit retirer les tests non conformes pour un usage médical.

L'opérateur doit disposer d'une zone de stockage dédiée aux tests conformes.

Procédure

Vue d'ensemble

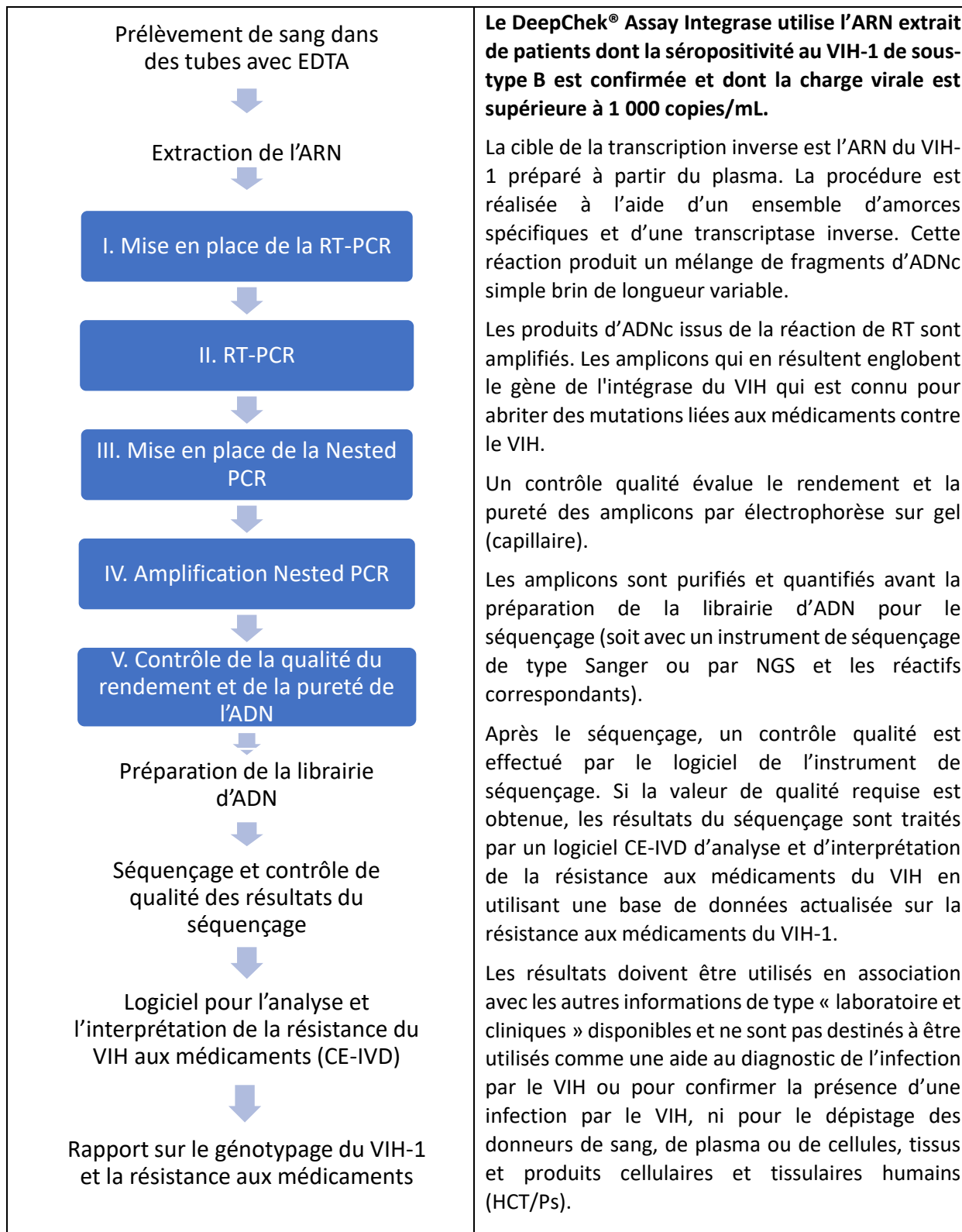


Figure 2 : Diagramme général du processus - les étapes numérotées et au fond coloré sont couvertes par le protocole du DeepChek Assay

Stockage des acides nucléiques

Pour un stockage de courte durée (jusqu'à 24 heures), nous recommandons de stocker les acides nucléiques à 2-8 °C. Pour un stockage à long terme (de plus de 24 heures), nous recommandons un stockage à -20 °C.

Extraction de l'ARN du VIH

Pour obtenir une analyse optimale et sensible de l'ARN du VIH, la meilleure représentation de la quasi-totalité de l'espèce virale, il est recommandé d'extraire 1 mL de plasma pour la génération ultérieure d'ADNc et d'amplicon et d'éluer dans le volume minimum requis pour votre méthode d'extraction (par exemple : Roche MagNa Pure Compact 8 et les réactifs associés).

Remarque : référez-vous aux manuels d'utilisation respectifs fournis avec les instruments pour les instructions d'utilisation.

Le DeepChek® Assay INT nécessite au moins une extraction de 400 µL de plasma ou de sérum, idéalement à partir d'échantillons de sang total frais prélevés dans des tubes EDTA, pour être élués dans 100 µL.

Remarque :

- Si le ou les échantillons de plasma doivent être conservés pour des tests en laboratoire, conservez-les entre 2 et 8 °C pendant une semaine au maximum. Le ou les échantillons de plasma peuvent être aliquotés dans des tubes de 1,5 mL et conservés à -20 °C pendant un mois au maximum.
- Un recueil, un stockage ou un transport d'échantillons inadéquats ou inappropriés sont susceptibles de donner de faux résultats négatifs.
- Éviter les cycles de congélation-décongélation répétés.

Points importants avant de commencer

- L'opérateur doit être familiarisé avec l'utilisation du DeepChek® Assay INT. Une formation est proposée par ABL.
- Une formation est nécessaire pour les opérateurs qui ne sont pas familiarisés avec les techniques de PCR et la biologie moléculaire. Elle est également requise pour les laboratoires qui ne sont pas accrédités ISO 15189, ni par l'OMS pour les tests de résistance aux médicaments du VIH, ni par un programme d'accréditation local équivalent.
- Une formation est recommandée pour les laboratoires commençant avec le séquençage Sanger ou le NGS. Référez-vous aux manuels d'utilisation respectifs fournis avec les instruments pour les instructions d'utilisation.
- Assurez-vous que le programme de thermoscellage spécifié est créé sur l'instrument « PCR Plate Sealer » et que le programme de PCR spécifique est créé sur le thermocycleur. Référez-vous aux manuels d'utilisation respectifs pour les instructions d'utilisation et la procédure détaillée pour le réglage des paramètres.
- Assurez-vous que les échantillons sont complètement décongelés et brièvement centrifugés avant leur utilisation. Les échantillons doivent être sortis du congélateur environ 10 minutes avant de commencer la procédure.
- Tous les réactifs sont conçus pour un usage unique. N'utilisez pas les réactifs restants des réactions PCR précédentes.

- Ne jetez pas la boîte de réactifs du DeepChek® INT Assay. Le numéro de série indiqué sur la boîte permet de télécharger la dernière version du mode d'emploi directement sur le site web d'ABL. Pour l'obtenir, l'opérateur doit se connecter sur le site web d'ABL en utilisant le lien web spécifié (www.ablsa.com/ifu) et entrer certaines informations comme le numéro de série indiqué sur l'étiquette de l'emballage extérieur. Le numéro de série est également indiqué sur chaque tube de réactif.
- Référez-vous à vos procédures opérationnelles standards pour enregistrer et mettre à jour le cahier de laboratoire avec le nombre de tests effectués sur les 24 tests disponibles.
- Pour les réactions multiples, l'utilisateur prépare un volume suffisant pour une ou deux réactions supplémentaires, car une partie du mélange sera perdue lors du pipetage.
- Des volumes supplémentaires sont inclus pour le traitement ultérieur, en parallèle ou séquentiel, de 24 tests (échantillons et contrôles) afin de compenser les erreurs de pipetage raisonnables.

Démarrer

- Identifier le produit.
- Vérifier la date d'expiration.
- Vérifier les dernières instructions d'utilisation disponibles pour le numéro de série du produit.
- Vérifier si le produit a déjà été utilisé. Si oui, vérifier les tests restants disponibles.

Contrôles

- L'opérateur doit remplacer les échantillons de patients par des contrôles internes conformément aux procédures de laboratoire pour le contrôle qualité pour :
 - Détecter la contamination croisée (contrôle négatif)
 - Faire la différence entre les erreurs de manipulation et l'absence de VIH (contrôle positif)



Le DeepChek® Assay contient suffisamment d'eau purifiée pour effectuer un contrôle sans matrice (NTC pour « No Template Control »).



L'opérateur doit utiliser un NTC pour chaque run.



S'il y a peu d'échantillons par réaction (1-3), un contrôle positif est recommandé pour pouvoir différencier les erreurs de l'opérateur et l'insuffisance de matrice virale dans l'échantillon.

I. Mise en place du protocole de RT-PCR

Remarque :

- L'opérateur doit disposer de suffisamment de temps pour préparer le Master Mix de RT-PCR (30 minutes pour 24 échantillons).
- Le Master Mix contient tous les composants nécessaires à la RT-PCR, à l'exception de l'échantillon.
- Les composants doivent être sortis du congélateur environ 10 minutes avant de commencer la procédure.

1. Sélection des réactifs du Master Mix de RT-PCR

- 1.1. Identifier et prélever les réactifs du module « RT-PCR » (côté gauche dans le kit).
- 1.2. Décongeler tous les réactifs et placez-les immédiatement sur de la glace.
- 1.3. Charger tous les tubes dans la centrifugeuse et centrifuger à 10 000 rpm pendant 10 secondes.
- 1.4. Mélanger brièvement à l'aide d'un vortex (2-4 secondes).
- 1.5. Placez-les sur de la glace.

2. Préparation du Master Mix de RT-PCR pour la cible intégrase

- 2.1 Préparer sur de la glace le Master Mix pour la RT-PCR de l'intégrase cible dans un microtube de 1,5 mL sans RNase conformément au Tableau 2 des volumes pour la RT-PCR de l'intégrase.
- 2.2 Mélanger bien la solution en tapotant le tube du bout du doigt.
- 2.3 Centrifuger brièvement (« pulse-spin ») le Master Mix de la RT-PCR de l'intégrase à basse vitesse pendant 5 à 10 secondes pour recueillir le contenu au fond du tube.
- 2.4 Le Tableau 2 décrit le schéma de pipetage pour la préparation du mélange de réactifs d'une RT-PCR pour l'intégrase, calculé pour obtenir un volume réactionnel final de 12,5 µL. **Ne pas vortexer le mix.**

Tableau 2 : Volume pour la RT-PCR de l'intégrase

Réactif de RT-PCR	Volume
RT-PCR Buffer 5X	5,0 µL
dNTPs 10 mM	1,0 µL
RT-PCR Enzyme Mix	1,0 µL
RNAsine	0,5 µL
H ₂ O	3,0 µL
INT FOR RT-PCR Primers 10 µM	1.0 µL
INT REV RT-PCR Primers 10 µM	1.0 µL
Volume total par réaction	12,5 µL

3. Préparation des échantillons à traiter

- 3.1 Les échantillons à traiter doivent être vérifiés pour l'identification du patient, la confirmation de son statut VIH, la dernière charge virale d'ARN du VIH-1 et sa quantité correspondante de matrice d'ARN extraite.
- 3.2 Décongeler les matrices d'ARN extraites des échantillons.

- 3.3 L'utilisateur doit placer le nombre souhaité de tubes PCR correspondant au nombre d'échantillons et de contrôles pour lesquels un test ciblé de génotypage et de résistance aux médicaments est nécessaire : 1 tube PCR par test (échantillon et contrôles) et par cible (ici l'intégrase).
- 3.4 Par exemple, prenons les échantillons de 3 patients qui seront testés avec le DeepChek® Assay INT. L'opérateur préparera 5 tubes de PCR au total : 3 échantillons + 2 contrôles (1 pour NTC ; 1 pour contrôle positif) pour l'intégrase.

Remarque :

- Chaque charge virale du VIH-1 de l'échantillon doit être détectable et supérieure à 1 000 copies/mL.
- Chaque matrice d'ARN d'échantillon doit être supérieure à 25 µL.
- Pour une charge virale du VIH-1 inférieure à 1 000 copies, l'opérateur peut vouloir effectuer une ultracentrifugation qui doit être réalisée selon des procédures standard de laboratoire.

II. Protocole de la Réaction de RT-PCR



Pour éviter les erreurs de manipulation, identifier correctement les tubes de l'intégrase ainsi que les potentiels autres tubes de Master Mix.

4. Préparation de la réaction RT-PCR pour la cible intégrase

Préparez les tubes de RT-PCR pour la cible intégrase comme suit.

- 4.1 Mélanger par pipetage répété le **Master Mix pour la RT-PCR de la cible intégrase**.
- 4.2 Distribuer 12,5 µL du **Master Mix pour la RT-PCR cible de l'intégrase** dans chaque tube PCR.
- 4.3 Distribuer 12,5 µL de chaque matrice d'ARN d'échantillon dans les tubes de PCR.
- 4.4 Mélanger par pipetage répété chaque réaction plusieurs fois.
- 4.5 **Fermer le bouchon du tube après chaque ajout.**
- 4.6 **Le volume final de chaque mélange réactionnel doit être de 25 µL.**
- 4.7 Ces tubes de RT-PCR pour l'intégrase doivent être placés sur de la glace jusqu'au début des réactions de RT-PCR.

5. Réalisation de la réaction de RT-PCR

Suivre les étapes ci-dessous pour amplifier l'ADN de l'intégrase.

- 5.1 Garder les tubes de RT-PCR pour l'intégrase sur de la glace.
- 5.2 Entrer le protocole de RT-PCR dans le thermocycleur ou sélectionner le protocole déjà programmé. Le protocole de RT-PCR est décrit comme suit.

Tableau 3 : Protocole de RT-PCR

	Temps	Température
Etape de RT	30 min	50°C
Activation de l'enzyme	15 min	95°C
x 45 cycles	30 sec	94°C
	30 sec	55°C
	1 min	72°C
Extension finale	10 min	72°C
	∞	10°C

- 5.3 Vérifier l'exactitude du programme du thermocycleur.
- 5.4 Transférer dans le thermocycleur les tubes de RT-PCR (présent sur la glace).
- 5.5 Démarrer le thermocycleur.
- 5.6 Lorsque le programme est terminé, vous pouvez soit conserver les échantillons à 10 °C jusqu'à ce que vous soyez prêt à effectuer la Nested PCR (dans les 12 prochaines heures), soit les stocker entre -15 et -25 °C.

Remarque :

- L'opérateur doit utiliser un thermocycleur calibré pour l'étape d'incubation.
- L'opérateur doit choisir les blocs et dispositifs appropriés pour les tubes et le thermocycleur.
- L'opérateur ne doit pas s'écarter de la procédure décrite concernant le programme de cycles de la RT-PCR.

III. Mise en place du protocole de Nested PCR

Remarque :

- L'opérateur doit disposer de suffisamment de temps pour préparer le Master Mix de Nested PCR (30 minutes pour 24 échantillons).
- Le Master Mix contient tous les composants nécessaires à la Nested PCR, à l'exception de l'échantillon.

6. Sélection des réactifs du Master Mix de Nested PCR

- 6.1 Identifier et prélever les réactifs du module "Nested PCR" (à droite dans le kit).
- 6.2 Décongeler tous les réactifs et placez-les immédiatement sur de la glace.
- 6.3 Charger tous les tubes dans la centrifugeuse (10 000 rpm pendant 10 secondes).
- 6.4 Mélanger brièvement avec l'utilisation du vortex (2-4 secondes).
- 6.5 Placez-les sur de la glace.

7. Préparation du Master Mix de la Nested PCR pour la cible intégrase

- 7.1 Préparer sur de la glace le **Master Mix pour la Nested PCR de la cible intégrase** dans un microtube de 1,5 ml sans RNase selon le Tableau 5 des volumes pour la Nested PCR de l'intégrase
- 7.2 Mélanger bien la solution en tapotant le tube du bout du doigt.

- 7.3 Centrifuger brièvement (« short-spin ») le **Master Mix pour la Nested PCR** de l'intégrase à basse vitesse pendant 5 à 10 secondes pour recueillir le contenu au fond du tube.
- 7.4 Le Tableau 4 décrit le schéma de pipetage pour la préparation du Master Mix pour la Nested PCR de l'intégrase, calculé pour obtenir un volume réactionnel final de 22 µL.

Tableau 4: Volume pour la Nested PCR pour l'intégrase

Réactif Nested PCR	Volume
Nested Buffer 5X	5.0 µL
dNTPs	1.0 µL
Nested PCR Enzyme	1.0 µL
H ₂ O	13.0 µL
NT FOR Nested PCR primers	1.0 µL
INT REV Nested PCR primers	1.0 µL
Volume total par réaction	22.0 µL

8. Préparation des échantillons à traiter
 - 8.1 Prendre les produits de RT-PCR qui ont été conservés à 10 °C durant les 12 dernières heures ou stockés entre -25 et -15 °C.
 - 8.2 Vérifier les produits de RT-PCR à traiter comme suit :
 - Identification des patients
 - Chaque produit de RT-PCR doit avoir un volume > 12,5 µL
 - Un total de 12,5 µL est nécessaire pour l'intégrase.

IV. Protocole de la réaction de Nested PCR



Pour éviter les erreurs de manipulation, identifier correctement les tubes de l'intégrase ainsi que les potentiels autres tubes de Master Mix.



1 programme de PCR distinct doit être entré dans le thermocycleur de PCR pour l'intégrase

9. Préparation de la réaction de Nested PCR pour la cible intégrase

Préparer les Nested PCR de l'intégrase comme suit.

- 9.1 Mélanger par pipetage répété le **Master Mix pour la Nested PCR** de la cible intégrase.
- 9.2 Distribuer 22 µL du **Master Mix de la Nested PCR cible de l'intégrase** dans chaque tube de PCR.
- 9.3 Distribuer 3 µL de chaque produit RT-PCR de l'intégrase dans les tubes de PCR.
- 9.4 Mélanger par pipetage répété chaque réaction plusieurs fois
- 9.5 **Fermer le bouchon du tube après chaque ajout**
- 9.6 **Le volume final de chaque mélange réactionnel doit être de 25 µL**
- 9.7 Les tubes de Nested PCR de l'intégrase doivent être placés sur de la glace jusqu'au démarrage des réactions de Nested PCR.

10. Réalisation de la réaction de Nested PCR pour les produits de RT-PCR de l'intégrase

Suivre les étapes ci-dessous pour amplifier l'ADNc de l'intégrase :

- 10.1 Garder les tubes de Nested PCR de l'intégrase sur de la glace.
- 10.2 Entrez le protocole de Nested PCR pour l'intégrase dans le thermocycleur ou sélectionner le protocole déjà programmé. Le protocole de Nested PCR de l'intégrase est décrit comme suit.

Tableau 5: Protocole de Nested PCR pour l'intégrase

	Time	Température
Activation de l'enzyme	15 min	95°C
x 35 cycles	30 sec	94°C
	30 sec	55°C
	30 sec	72°C
Extension finale	10 min	72°C
	∞	10°C

- 10.3 Vérifier l'exactitude du programme du thermocycleur.
- 10.4 Transférer les tubes de Nested PCR de l'intégrase présent sur la glace dans le thermocycleur.
- 10.5 Démarrer le thermocycleur.
- 10.6 Lorsque le programme est terminé, maintenez les échantillons à 10 °C ou stockez-les entre -25 °C et -15 °C avant de procéder au contrôle qualité des échantillons.

À ce stade, les tubes d'échantillons contiennent de l'ADN double brin (produits de la PCR) avec le gène de l'intégrase.

Remarque :

- L'opérateur doit utiliser un thermocycleur calibré pour l'étape d'incubation.
- L'opérateur doit choisir les blocs et dispositifs appropriés pour les tubes et le thermocycleur.
- L'opérateur ne doit pas s'écarter de la procédure décrite concernant les programmes de Nested PCR pour l'intégrase.

V. Contrôle qualité des échantillons

L'étape de Nested PCR doit permettre d'obtenir des quantités détectables visibles durant le contrôle qualité par électrophorèse sur gel ou capillaire afin d'éviter une charge de travail successive inutile et des coûts de réactifs supplémentaires pour le séquençage en aval.

Pour maximiser la qualité des réactions de séquençage, analyser chaque produit de Nested PCR au moins par sa taille (en paires de base (bp)) en utilisant l'une des options suivantes :

- Tester les produits de la Nested PCR sur un gel d'agarose et comparez-les à un « DNA Mass Ladder » contenant des fragments d'ADN connus en taille et en quantité, ou
- Effectuer une électrophorèse capillaire.

Remarque :

- Vous pourriez constater une variabilité dans le rendement et la pureté des produits de Nested PCR. Cela reflète la variabilité de la charge virale des échantillons de plasma d'origine.
- L'utilisateur doit utiliser une électrophorèse sur gel calibrée (capillaire) pour le contrôle qualité de l'échantillon.
- L'utilisateur doit choisir les bons réactifs et consommables et opérer comme indiqué dans le mode d'emploi du fabricant.

Interprétation des résultats

Échantillons de patients

L'inspection visuelle du résultat du contrôle qualité par électrophorèse sur gel (capillaire) est généralement une bande visuelle qui signifie que l'amplification des séquences cibles du VIH (amplicons) a réussi.

Dans certains cas, la bande visuelle peut ne pas être visible. Cela signifie que l'amplification de l'étape de Nested PCR n'a pas réussi.

Voir le « Guide de dépannage », ci-dessous, pour l'interprétation des résultats inappropriés.

Remarque : Les poids moléculaires attendus des amplicons sont

- Après le Nested PCR : 937 pb pour la transcriptase inverse, 520 pb pour la protéase et 670 pb pour l'intégrase ;
- Après la RT-PCR : 1045 pb pour la transcriptase inverse, 645 pb pour la protéase et 720 pb pour l'intégrase.

Contrôles

Le contrôle avec l'eau (NTC) ne doit pas produire de bande visuelle. Une bande pour un contrôle avec l'eau peut indiquer une contamination croisée.

Voir le « Guide de dépannage », ci-dessous.



En cas de contamination croisée du contrôle avec l'eau, il est probable que tous les échantillons au sein de la même série soient affectés par cette contamination croisée. Ainsi, l'interprétation des résultats des tests de résistance aux médicaments du VIH ou de la caractérisation des sous-types en aval peut conduire à des résultats erronés et, par conséquent, à des décisions de traitement inadéquates.

Guide de dépannage

Utiliser le tableau de dépannage suivant pour diagnostiquer et résoudre les problèmes. Les recommandations de dépannage supposent que tous les réactifs du kit DeepChek® soient stockés conformément aux spécifications et que les instructions de ce guide ont été suivies correctement.

Commentaires et suggestions

Les contrôles positifs sont négatifs pour la cible de dosage DeepChek® Assay (intégrase)

- | | |
|---|--|
| a) Erreur de pipetage ou oubli de réactifs | <p>Vérifier le schéma de pipetage et la configuration de la réaction de la cible affectée.</p> <p>Répéter la Nested PCR (cf. chapitre III) de la cible affectée (intégrase)</p> |
| b) Stockage inapproprié des composants du kit | <p>Conserver le DeepChek® Assay entre -25 et -15 °C. Voir « Stockage et manipulation des réactifs ».</p> <p>Éviter les cycles de congélations et décongélations répétés.</p> |
| c) Programme PCR inapproprié | <p>Vérifier l'exactitude de la configuration du protocole Nested PCR.</p> <p>Vérifier l'étalonnage du thermocycleur.</p> <p>Assurez-vous que les réactions de Nested PCR ont été préparées sur de la glace ou sur un bloc froid.</p> <p>Consulter le mode d'emploi du thermocycleur.</p> |

Les contrôles négatifs sont positifs

- | | |
|-----------------------|--|
| Contamination croisée | <p>Remplacer tous les réactifs critiques.</p> <p>Répéter la PCR avec ces nouveaux réactifs.</p> <p>Manipuler toujours les échantillons, les composants d'analyse et les consommables conformément aux pratiques communément admises pour éviter toute contamination par transfert.</p> |
|-----------------------|--|

Absence ou faible signal dans les échantillons mais les contrôles positifs sont corrects

- | | |
|--|--|
| a) Qualité médiocre de l'ADN ou concentration insuffisante | <p>Vérifier la préparation de votre électrophorèse sur gel (capillaire).</p> <p>Vous pouvez diluer votre produit ADN selon votre procédure d'électrophorèse capillaire sur gel.</p> <p>Suivre le mode d'emploi si vous utilisez un instrument d'électrophorèse capillaire.</p> <p>Refaire votre électrophorèse sur gel (capillaire).</p> |
|--|--|

Commentaires et suggestions

- | | |
|--|---|
| b) Échantillon préparé trop longtemps avant l'analyse conduisant à l'évaporation de l'ADN | Assurez-vous que votre électrophorèse sur gel (capillaire) est lancée immédiatement après la préparation de l'échantillon.

Répéter la Nested PCR (au chapitre III) de l'échantillon cible affecté. |
| Les conditions du gel d'agarose sont mauvaises ou les réactifs utilisés pour l'électrophorèse capillaire sont incorrects ou inappropriés | Utiliser de nouveaux réactifs d'électrophorèse sur gel (capillaire).

Refaire l'électrophorèse sur gel (capillaire). |

Pas de bande pour un ou plusieurs échantillons

- | | |
|---|--|
| a) Le Nested PCR n'a pas fonctionné | Prendre le produit RT-PCR correspondant.

Faire une électrophorèse sur gel (capillaire).

S'il n'y a toujours pas de signal, recommencer tout le protocole à partir de l'étape I. |
| b) Extraction incorrecte de l'ARN à partir du plasma ou charge virale du VIH-1 inférieure à 1 000 copies/mL | Vérifier à nouveau la charge virale du VIH-1.
Si > 1 000 cp/mL :
Faire une nouvelle extraction d'ARN issue du plasma.
Si > 500 mais < 1 000 cp/mL :
Envisager de faire une ultracentrifugation en suivant les instructions et les procédures de votre laboratoire.

Recommencer tout le protocole à partir de l'étape I. |
| c) Variante de limitation | Si vous obtenez un résultat négatif de manière répétée, et que vous excluez les erreurs d'utilisation, il pourrait s'agir d'une variante liant les sites de transcription inverse.

Évaluer le sous-type de VIH-1 à partir du séquençage précédent.

Contacter notre support technique. |

Remarque :

Lors de l'utilisation des DeepChek® protéase/transcriptase inverse et intégrase ensemble, si une amplification Nested PCR pour les trois cibles est négative ou avec artefact (électrophorèse sur gel (capillaire)), nous recommandons de faire la même vérification avec le produit RT-PCR correspondant.

Si ce dernier est positif, vous pouvez alors utiliser le produit RT-PCR pour l'étape de séquençage en aval. Si le produit de la RT-PCR est négatif ou avec artefact, nous considérons le résultat comme suit.

- Au moins une cible (RT ou PR ou INT) est positive avec la Nested PCR : refaites l'échantillon à partir de l'étape d'extraction jusqu'à ce que vous obteniez un résultat complet.
- Aucun résultat n'est obtenu avec la Nested PCR ni la RT-PCR : refaites l'échantillon de l'étape d'extraction.

Traité dans un workflow de laboratoire normal, un échantillon montrant deux Nested PCR négatives complètes consécutives (pas d'amplification de la transcriptase inverse, ni de la protéase ni de l'intégrase) est alors considéré comme « aucun résultat obtenu ». Vous devez évaluer la charge virale du VIH-1 et la caractérisation préalable du sous-type. Vous pouvez contacter le support technique de l'ABL pour obtenir une aide supplémentaire.

Contrôle qualité des produits

Conformément au système de gestion de la qualité d'ABL, chaque lot de DeepChek® Assay est testé par rapport à des spécifications prédéterminées afin de garantir une qualité constante du produit. Des certificats d'analyse sont disponibles sur demande.

Limitations

Généralités

- Tous les réactifs peuvent être utilisés exclusivement pour le diagnostic *in vitro*.
- Le produit doit être utilisé uniquement par du personnel spécialement qualifié et formé aux procédures de diagnostic *in vitro*.
- Le strict respect du guide de l'utilisateur est nécessaire pour obtenir des résultats optimaux pour les 2 PCR.
- Il convient de prêter attention aux dates d'expiration imprimées sur la boîte et les étiquettes de tous les composants. N'utilisez pas de composants périmés.
- Tout résultat de diagnostic généré doit être interprété en association avec d'autres résultats cliniques ou de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur de valider les performances du système pour toutes les procédures de son laboratoire qui ne sont pas couvertes par les études de performance d'ABL.
- La détection du VIH-1 dépend du nombre de particules virales recueillies. La performance optimale de ce test nécessite un recueil, un stockage et un transport appropriés des échantillons sur le site du test (voir les sections sur les conditions de stockage des réactifs et des échantillons dans le présent guide de l'utilisateur).
- Ce test est destiné à être utilisé avec des échantillons de plasma prélevés sur des échantillons de sang total stockés dans des tubes à bouchon couleur lavande (contenant de l'EDTA). Les caractéristiques de performance des autres types d'échantillon n'ont pas été établies.
- Le test est conçu pour détecter le sous-type B du VIH-1, mais peut également détecter d'autres sous-types du groupe M du VIH-1 et des séquences virales recombinantes. Cependant, comme le génome du VIH-1 est très mutable, il existera toujours une petite possibilité que certaines

souches de VIH-1 réagissent mal au test, surtout si des mutations aléatoires se produisent dans les sites de liaison des amorces.

- La détection d'une mutation génomique de résistance aux médicaments peut ne pas être en corrélation avec l'expression phénotypique des gènes.
- Ce test ne détecte pas les mutations du VIH-1 du groupe O ou du VIH-2, car les performances avec ces derniers n'ont pas été établies.
- L'absence de détection d'une mutation de résistance aux médicaments n'exclut pas la possibilité d'une mutation génétique. Le médecin traitant doit utiliser d'autres tests de laboratoire et des informations cliniques pour prendre en charge les patients.
- Ce test ne détectera pas les mutations génétiques en dehors de son champ d'application.
- L'identification de la résistance aux médicaments par mutation est effectuée en comparant les séquences générées à la base de données sur la résistance aux médicaments du VIH de l'Université de Stanford ou aux dernières versions du Groupe AC11 de l'ANRS français sur la résistance aux médicaments contre le VIH.

Caractéristiques de performance

Études non cliniques

Des études non cliniques ont été menées pour établir la performance analytique du DeepChek® Assay.

Protocole des études

Procédure de mesure

Le test doit amplifier les régions ciblées du sous-type B du VIH-1 connues pour conférer une résistance aux médicaments anti-VIH approuvés. Les régions d'intérêt du DeepChek® Assay sont la transcriptase inverse (RT) et la protéase (PR), et pour son variant, l'intégrase (INT).

Si les amplicons de Nested PCR étaient jugés de qualité, alors ils étaient préparés pour le séquençage et étaient séquencés. Sinon, nous avons utilisé les amplicons de RT-PCR pour le traitement en aval.

Nous avons utilisé notre kit NGS Library Preparation (références 116A96 et 124A96) avec un instrument de séquençage NGS (iSeq100, Illumina, USA ; One-Channel SBS Chemistry, iSeq100 Flow Cell).

Pour le séquençage de nouvelle génération (NGS), il est nécessaire d'attribuer une mutation comme étant présente ou non dans un échantillon. Pour les valeurs seuil du test, nous avons utilisé les critères suivants : couverture médiane minimale de 1 000 lectures pour les amplicons (PR/RT et INT) et un score de qualité Phred Q30 > 80 % pour le NGS exécuté comme indiqué par l'Illumina Sequencing Analysis Viewer (logiciel de l'instrument version 2.4.5).

Le nombre de lectures par amplicon a été mesuré par le logiciel DeepChek® d'ABL logiciel marqué CE-IVD (version 3.30.18 ; Système expert DeepChek® (v2.3) ; Drug Resistance Rulers algorithm for HIV (v.11.9)).

Recueil et traitement des échantillons

Notre approche en matière de performance analytique était différente de la procédure de routine en termes de stockage, car nous avons utilisé le restant des échantillons cliniques congelés (avec consentement du patient pour une utilisation à des fins de recherche) provenant d'un laboratoire de

pathologie privé (accrédité ISO 15189) effectuant le génotypage du VIH et des tests de résistance aux médicaments.

Nous avons utilisé des matériaux de contrôle de référence provenant de l'industrie (production certifiée ISO 13485) et des panels d'évaluation de qualité externe (accrédités ISO 17043 :2010).

Nous avons également effectué une analyse *in-silico* pour simuler les interférences potentielles d'autres modèles d'ADN (virus, microbes ou humains).

Préparation et analyse des échantillons

Un total de 69 échantillons (contrôles, réactions croisées et cliniques (sous-types B et non B)) et 5 contrôles négatifs pour l'amplification ont été préparés, extraits (Roche MagNa Pure Compact 8 ; MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I) et amplifiés (ProFlex PCR System 3x32-Well et 96-Well ; Life Technologies) pour les trois cibles génomiques du VIH-1 à l'aide des tests DeepChek® (PR/RT et INT).

Nous avons utilisé 3 lots différents avec 3 opérateurs distincts à différents moments de la journée sur 5 jours. Au total, 444 amplifications ont été réalisées (étapes RT-PCR et Nested PCR) et un contrôle qualité a été effectué pour tous les produits de la Nested PCR (TapeStation 4150 ; Agilent ; ScreenTape D1000 ; Réactifs D1000).

Nous avons ensuite effectué les étapes de préparation de la librairie NGS et du séquençage NGS.

74 échantillons sortis du NGS ont été analysés en lot par le logiciel DeepChek® HIV à l'aide d'un fichier de configuration.

Paramètres de performance analytique

Limite de détection analytique

La limite analytique de détection (LOD) est définie comme la concentration la plus faible à laquelle ≥ 95 % des réplicats testés ont montré une présomption positive pour la détection des cibles PR, RT et INT du VIH-1.

Notre LOD est de 1 000 copies/mL pour le VIH-1 sous-type B comme indiqué dans le tableau ci-dessous.

Concentration (cp/mL)	Nombre d'échantillons testés	Nombre d'échantillons correctement identifiés	Pourcentage d'échantillons correctement identifiés
2 000	13	13	100 %
1 000	10	10	100 %
500	10	10	100 %

Nous obtenons également 100 % du séquençage réalisé avec des échantillons ayant une charge virale de 10^6 cp/mL.

Remarque : Même si nous avons pu amplifier correctement des échantillons de VIH-1 de sous-type B à une concentration de 500 cp/mL, le laboratoire doit procéder à sa propre évaluation des performances du DeepChek® Assay pour les concentrations inférieures à la LOD.

Seuil analytique

Le produit étant destiné à un usage clinique, nous rapportons les performances du test dans un contexte de séquençage en aval de bonne qualité.

Nous avons de nouveau utilisé les trois niveaux de concentration d'ARN du VIH-1 (2 000, 1 000 et 500 copies/mL) ensemble avec une couverture optimale déterminée comme étant supérieur ou égale à 1 000 lectures par amplicon disponible après le NGS. Nous rapportons également le nombre d'échantillons avec une couverture sous-optimale par amplicon pour chaque précédente concentration d'ARN du VIH-1, déterminée comme étant au-dessus de 50 et au-dessous de 1 000 lectures.

Nous avons atteint 100 % des échantillons avec une couverture médiane optimale à une concentration de 1 000 cp/mL (seuil d'analyse).

Concentration (cp/mL)	Nombre d'échantillons testés	Échantillons avec une couverture médiane optimale (≥ 1 000)		Échantillons avec une couverture médiane sous- optimale (> 50x - < 1 000)	
		Numéro	%	Numéro	%
2 000	13	13	100 %	0	0 %
1 000	10	10	100 %	0	0 %
500	10	10	100 %	0	0 %

La couverture médiane par échantillon pour les trois amplicons (PR/RT et INT) était de 13 237 lectures.

Remarque : Même si nous avons pu amplifier correctement des échantillons de VIH-1 de sous-type B avec une couverture optimale à une concentration de 500 cp/mL, le laboratoire doit procéder à sa propre évaluation des performances du DeepChek® Assay pour les concentrations inférieures à la LOD.

Réactivité/spécificité analytique

Nous avons utilisé 24 échantillons cliniques (charge virale médiane = 30 600 cp/mL ; 17 de sous-type B ; 7 de non-B) et 12 autres échantillons (3 négatifs pour le VIH ; 3 à réaction croisée (VHB positif et VHC positif) ; tous en double).

Nous obtenons 100 % des échantillons spécifiquement évalués :

- Les échantillons positifs au VIH-1 ont été amplifiés et séquencés selon des critères de qualité atteints malgré 10 échantillons qui n'étaient pas destinés à l'usage prévu (charge virale inférieure à 1 000 cp/mL et/ou sous-type non-B).
- Aucun amplicon pour les échantillons négatifs pour le VIH-1.

Aucune substance d'interférence n'a été signalée car aucune réactivité croisée n'a été observée avec les échantillons cliniques inoculés au VHC et au VHB. Ainsi, l'étude analytique *in-silico* n'a montré aucune amplification d'autres organismes à ADN que le VIH-1 (virus, microbes ou humains).

Reproductibilité et répétabilité analytiques

La reproductibilité et la répétabilité analytiques du DeepChek® Assay ont été testées à l'aide d'un panel de 45 échantillons répartis sur 3 analyses NGS distinctes effectuées par 3 opérateurs sur 30 jours, à différentes heures de la journée, en utilisant 3 lots de DeepChek® différents, où chaque opérateur a utilisé 2 kits d'un lot. Les instruments utilisés étaient les mêmes.

Une reproductibilité et une répétabilité analytiques élevées ont été mises en évidence par un pourcentage de correspondance de 100 %.

Études cliniques

Reproductibilité clinique

Nous avons utilisé le panel d'assurance QCMD External Quality Assurance HIV Drug Resistance 2019 (EQA) pour évaluer la reproductibilité clinique du DeepChek® Assay.

Nous avons obtenu une reproductibilité clinique de 100 %.

Sensibilité clinique

Nous avons réalisé des évaluations cliniques externes des DeepChek® Assay (PR/RT et INT) sur 27 sites dans le monde, dont certains utilisaient uniquement le DeepChek® Assay (PR/RT) et d'autres les deux tests. Nous avons mesuré leur capacité à obtenir des amplicons des cibles génomiques du VIH-1 du DeepChek® Assay et une séquence après séquençage en aval.

Sont présentés ci-dessous les statistiques détaillées de ces évaluations cliniques externes.

Nb. d'échantillons	301
Nb. de sites (nombre médian d'échantillons par étude)	27 (8)
Nb. de contrôles / échantillons EQA (positifs/négatifs/EQA)	33 (15/06/2 012)
Nb. des charges virales disponibles	215
Nb. de charges virales $\geq 1\ 000$ cp/mL	186
Charge virale médiane (cp/mL)	26 915
Nb. de sous-types disponibles	252
% des sous-types B / non-B	63 % / 37 %
Nb. de DeepChek® Assay PR/RT ou PR/RT/INT effectués	91 / 210
Nb. d'échantillons avec une charge virale $\geq 1\ 000$ cp/mL et sous-type B	149

Nous avons calculé la sensibilité clinique (Se) des 3 utilisations possibles du DeepChek® Assay :

- DeepChek® Assay (PR/RT) seul = 99 %
- DeepChek® Assay (INT) seul = 94 %
- DeepChek® Assay (PR/RT + INT) = 99 %

Pour ces 301 échantillons traités sur 27 sites, chacun ayant reçu une formation, nous avons eu une sensibilité clinique de 99 % ou 94 % pour l'amplification et avons obtenu une séquence de bonne qualité pour le test de résistance aux médicaments du VIH et l'interprétation en utilisant respectivement la protéase et la transcriptase inverse ou l'intégrase seule.

Lorsque les deux tests ont été combinés et que l'opérateur a suivi les instructions, la sensibilité clinique était de 99 %.

Les 1 à 6 % restants pourraient être des erreurs d'utilisation ou des limites du test, ou une combinaison des deux.

Nous n'avons pas calculé ici la spécificité ni les valeurs prédictives positives ou négatives, car elles n'ont de sens que si elles sont utilisées en association avec les mutants viraux reportés, les seuils de détection des variantes virales mineures (20 %, 5 %) et les niveaux d'interprétation de la résistance du VIH aux médicaments (sensible/intermédiaire/résistant) pour chaque médicament anti-VIH.

Nous avons détaillé, dans les deux tableaux ci-dessous, les amplifications réussies en utilisant les trois cibles des DeepChek® Assay en fonction de la charge virale du VIH-1 et du sous-type du virus.

Amplification réussie *	Charge virale	Charge virale interquartile (cp/mL)	Charge virale
----------------------------	------------------	---	------------------

		médiane (cp/mL)	minimale (cp/mL)
PR/RT + INT	159	26 915	6 998 - 100 000
			104

** (à l'exclusion des contrôles et des charges virales non spécifiées)*

	Amplification réussie**	Sous-type B (%)	Sous-type non-B # (%)
PR/RT + INT	196	58 %	42 %

*** (à l'exclusion des contrôles négatifs et des sous-types non spécifiés)*

Les principaux sous-types non-B sont C, O2_AG, A1, D (44 % des non-B)

Il est intéressant de noter qu'une grande partie des amplifications et des séquençages en aval réussis ont été réalisés avec des sous-types non B. Toutefois, même si nous étions en mesure d'amplifier, de manière appropriée, les échantillons de VIH-1 non-B avec une bonne qualité de séquençage, un laboratoire doit procéder à sa propre évaluation des performances du DeepChek® Assay pour la diversité des sous-types de VIH-1 et les concentrations inférieures à la LOD.

Dans le tableau suivant, nous avons indiqué le pourcentage de concordance entre le DeepChek® Assay et les tests similaires disponibles sur le marché.

Les trois comparaisons en face à face ont été effectuées en utilisant le DeepChek® Assay ainsi que l'appareil MiSeq d'Illumina pour le traitement en aval.

Le seul test similaire en aval de la NGS était le Sentosa® SQ HIV-1 Genotyping (Vela Diagnostics). Les deux autres étaient basés sur le séquençage Sanger.

DeepChek® Assay	Instrument de séquençage aval utilisé avec le test DeepChek®	Dispositif 2 utilisé pour la concordance	Nb. d'échantillons testés	Concordance (%)
PR/RT + INT	Illumina MiSeq	Abbott® Dx - ViroSeq® HIV-1 Genotyping PR/RT + INT (Sanger)	23	100 %
PR/RT	Illumina MiSeq	LDT (laboratoire allemand) PR/RT (Sanger)	12	92 %*
PR/RT + INT	Illumina MiSeq	Vela Dx - Sentosa® HIV-1 PR/RT/INT (NGS)	18	100 %

**Un seul échantillon n'a pas été amplifié par le test DeepChek, mais il n'a pas été retesté une deuxième fois. Le petit nombre d'échantillons a un impact sur les chiffres communiqués.*

Nous avons obtenu ici les indications que le DeepChek Assay a réussi, aussi bien que les prédicats disponibles sur le marché avec une concordance élevée (>90%) pour amplifier la transcriptase inverse, la protéase et l'intégrase du VIH-1, à obtenir une séquence de qualité qui a pu ensuite être utilisée pour le génotypage du VIH et l'interprétation de la résistance aux médicaments.

Annexe I – Contenus des versions précédentes

DeepChek® Assay Integrase Genotyping and Drug Resistance V1.2

Tableau 6: Contenu du Deepchek Assay INT V1.2

Etiquettes	Volume	NB tube (couleur bouchon)
Réactifs de RT-PCR		
RT-PCR Buffer 5X	160 µL	1 tube (vert)
dNTPs	35 µL	1 tube (marron)
RT-PCR Enzyme mix	35 µL	1 tube (blanc)
RNAsine	20 µL	1 tube (orange)
H ₂ O	1000 µL	1 tube (bleu)
INT FOR RT-PCR Primers – 10 µM	35 µL	1 tube (jaune)
INT REV RT-PCR Primers – 10 µM	35 µL	1 tube (jaune)
Réactifs de Nested PCR		
Nested Buffer 5X	160 µL	1 tube (vert)
Nested PCR dNTPs	35 µL	1 tube (marron)
Nested PCR Enzyme	35 µL	1 tube (blanc)
Nested H ₂ O	1000 µL	1 tube (bleu)
INT FOR Nested PCR Primers – 10 µM	35 µL	1 tube (jaune)
INT REV Nested PCR Primers – 10 µM	35 µL	1 tube (jaune)

RT-PCR (24 SAMPLES)			Nested PCR (24 SAMPLES)		
RT-PCR Buffer 5X	dNTPs	RT-PCR Enzyme mix		Nested PCR Buffer 5X	Nested PCR dNTPs
					Nested PCR Enzyme
RNAsine	H ₂ O				Nested H ₂ O
	INT FOR RT-PCR Primers	INT REV RT-PCR Primers			INT FOR Nested PCR Primers
					INT REV Nested PCR Primers

Figure 3: Mapping des composants du kit par couleur de bouchon V1.2

DeepChek® Assay Integrase Genotyping and Drug Resistance V1.3

Tableau 7 : Contenu du DeepChek Assay INT V1.3

Etiquettes	Volume	NB tube (couleur bouchon)
Réactifs de RT-PCR		
RT-PCR Buffer 5X	160 µL	1 tube (vert)
dNTPs	35 µL	1 tube (marron)
RT-PCR Enzyme mix	35 µL	1 tube (blanc)
RNAsine	20 µL	1 tube (orange)
H ₂ O	1000 µL	1 tube (bleu)
INT FOR RT-PCR Primers – 10 µM	35 µL	1 tube (jaune)
INT REV RT-PCR Primers – 10 µM	35 µL	1 tube (jaune)
Réactifs de Nested PCR		
Nested Buffer 5X	160 µL	1 tube (vert)
Nested PCR dNTPs	35 µL	1 tube (marron)
Nested PCR Enzyme	35 µL	1 tube (blanc)
Nested H ₂ O	1000 µL	1 tube (bleu)
INT FOR Nested PCR Primers – 10 µM	35 µL	1 tube (jaune)
INT REV Nested PCR Primers – 10 µM	35 µL	1 tube (jaune)

RT-PCR (24 SAMPLES)				Nested PCR (24 SAMPLES)		
RT-PCR Buffer 5X	dNTPs	RT-PCR Enzyme mix		Nested PCR Buffer 5X	Nested PCR dNTPs	Nested PCR Enzyme
RNAsine	H ₂ O				Nested H ₂ O	
	INT FOR RT-PCR Primers	INT REV RT-PCR Primers			INT FOR Nested PCR Primers	INT REV Nested PCR Primers

Figure 4 : Mapping des composants du kit par couleur de bouchon V1.3

Références bibliographiques

1. Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial. Durant J et al. Lancet. 1999 Jun 26 ;353(9171):2195-9.
2. A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. Baxter JD et al. AIDS. 2000 Jun 16 ;14(9): F83-93.
3. Performance characteristics of the TRUGENE HIV-1 Genotyping Kit and the Opengene DNA Sequencing System. Kuritzkes DR et al. J Clin Microbiol. 2003 Apr ;41(4):1594-9.
4. Performance of the Celera Diagnostics ViroSeq HIV-1 Genotyping System for sequence-based analysis of diverse human immunodeficiency virus type 1 strains. Eshleman SH et al. J Clin Microbiol. 2004 Jun ;42(6):2711-7.
5. Comparison of ultra-deep versus Sanger sequencing detection of minority mutations on the HIV-1 drug resistance interpretations after virological failure. Mohamed S et al. AIDS. 2014 Jun 1;28(9):1315-24.
6. Evaluation of GS Junior and MiSeq next-generation sequencing technologies as an alternative to Trugene population sequencing in the clinical HIV laboratory. Ram D et al. J Virol Methods. 2015 Feb;212:12-6.
7. Performance of Celera RUO integrase resistance assay across multiple HIV-1 subtypes. Wallis CL et al. J Virol Methods. 2017 Mar;241:41-45.
8. Comparison of an In Vitro Diagnostic Next-Generation Sequencing Assay with Sanger Sequencing for HIV-1 Genotypic Resistance Testing. Tzou PL et al. J Clin Microbiol. 2018 May 25;56(6).
9. Impact of storage conditions on the quality of nucleic acids in paraffin embedded tissues. Groelz D et al. PLoS ONE 13(9): e0203608.
10. European AIDS Clinical Society (EACS) Guidelines v9.1 October 2018. https://www.eacsociety.org/files/2018_guidelines-9.1-english.pdf
11. 2019 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. Wensing AM et al. Top Antivir Med. 2019;27(3) - <https://www.iasusa.org/wp-content/uploads/2019/07/2019-drug-resistance-mutations-figures.pdf>

Symboles

Les symboles suivants peuvent figurer sur l’emballage et l’étiquetage :

 <N>	Contient suffisamment de réactifs pour <N> réactions		Consulter les instructions d'utilisation
	Attention		Contrôle négatif
	Référence du produit		Contrôle positif
	À utiliser avant		Limites de température
	Fabricant		Numéro de série
	Pays de fabrication avec date de production		Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Distributeur	Rn	R est pour la révision des instructions d'utilisation et <i>n</i> est pour le numéro de la révision

Références de commande

Produit	Contenu	Cat. no.
DeepChek® Assay INTEGRASE GENOTYPING AND DRUG RESISTANCE V1.x	Pour 24 réactions : amorces spécifiques RT-PCR et Nested PCR (forward et reverse) pour l'intégrase, enzyme pour la RT-PCR et la Nested PCR, tampon, dNTPs, RNase, H ₂ O (utilisée également pour le NTC)	122A24

Pour obtenir des informations actualisées ou des avertissements spécifiques à un produit, consultez le guide d'utilisation du test ABL correspondant.

Les guides d'utilisation d'ABL sont disponibles sur le site www.ablsa.com/ifu ou peuvent être demandés à l'assistance technique d'ABL ou à votre distributeur local.

Informations de contact

- Pour une assistance technique et de plus amples informations, veuillez consulter notre Centre d'assistance technique
 - Sur <https://support-diag.ablsa.com>
 - Envoyez un courriel à support-diag@ablsa.com ou
 - Contactez votre Field-Application Specialist.

Fabricant



Advanced Biological Laboratories (ABL) S.A.

52-54 Avenue du X Septembre, L-2550 Luxembourg, Luxembourg

Le client est responsable du respect des exigences réglementaires relatives à ses procédures et à l'utilisation de l'instrument.

Les informations contenues dans ce guide sont susceptibles d'être modifiées sans préavis.

AVERTISSEMENT : DANS LES LIMITES AUTORISÉES PAR LA LOI, ABL (S.A) ET/OU SES AFFILIÉS NE SERONT PAS TENUS POUR RESPONSABLES DES DOMMAGES SPÉCIAUX, ACCIDENTELS, PUNITIFS, MULTIPLES OU CONSECUTIFS LIES OU RESULTANT DE CE DOCUMENT, Y COMPRIS VOTRE UTILISATION DE CELUI-CI.

Cette page a été volontairement laissée vide pour vos propres notes

Ce produit est destiné à un usage de diagnostic *in vitro*.

Les produits *DeepChek*® Assay ne peuvent être revendus, modifiés pour la revente ou utilisés pour fabriquer des produits commerciaux sans l'approbation écrite d'ABL. Les informations contenues dans ce document sont susceptibles d'être modifiées sans préavis. ABL n'assume aucune responsabilité pour les erreurs qui pourraient apparaître dans ce document. Ce document est considéré comme complet et exact au moment de sa publication. En aucun cas, ABL ne pourra être tenue responsable des dommages accidentels, spéciaux, multiples ou indirects liés ou résultant de l'utilisation de ce document.

Les produits *DeepChek*® Assay sont garantis conformes à leurs spécifications déclarées. La seule obligation d'ABL et le seul recours du client se limitent au remplacement gratuit des produits dans le cas où les produits ne fonctionneraient pas comme prévu.

Marques commerciales utilisées dans ce guide de l'utilisateur : ABL, *DeepChek* ; *MagNA* (Roche) ; *ProFlex*, *Life Technologies* (Thermo Fisher Scientific) ; *TapeStation*, *ScreenTape*, Réactifs D1000 (Agilent) ; *iSeq100*, *MiSeq* (Illumina) ; *QCMD* ; *ViroSeq* (Abbott Molecular), *Sentosa* (Vela Diagnostics).

Accord de licence limité

L'utilisation de ce produit signifie que tout acheteur ou utilisateur du *DeepChek*® Assay *Integrase Genotyping and Drug Resistance* accepte les conditions suivantes :

Le « *DeepChek*® Assay *Integrase - Genotyping and Drug Resistance* » peut être utilisé uniquement en conformité avec le guide d'utilisation du « *DeepChek*® Assay *Integrase - Genotyping and Drug Resistance* » et pour une utilisation avec les composants contenus dans le test uniquement.

ABL n'accorde aucune licence au titre de sa propriété intellectuelle pour utiliser ou incorporer les composants de ce test avec tout composant non inclus dans ce test, sauf comme décrit dans le guide de l'utilisateur du « *DeepChek*® *Integrase - Genotyping and Drug Resistance* » et les protocoles additionnels disponibles sur www.ablsa.com.

En dehors des licences expressément indiquées, ABL ne garantit pas que ce test et/ou son (ses) utilisation(s) ne portent pas atteinte aux droits de tiers.

Ce test et ses composants sont autorisés pour un usage unique et ne peuvent être réutilisés, remis à neuf ou revendus.

ABL décline expressément toute autre licence, expresse ou implicite, autre que celles expressément mentionnées.

L'acheteur et l'utilisateur du test s'engagent à ne pas prendre ou permettre à quiconque de prendre des mesures qui pourraient conduire ou faciliter les actes interdits ci-dessus. ABL peut faire appliquer les interdictions du présent accord de licence limitée devant tout tribunal et recouvrera tous ses frais d'enquête et de justice, y compris les frais d'avocat, dans toute action visant à faire appliquer le présent accord de licence limitée ou l'un de ses droits de propriété intellectuelle relatifs au test et/ou à ses composants.

Pour les conditions de licence mises à jour, voir www.ablsa.com.

IFU_122A24_FR_CE © 2023 ABL S.A., tous droits réservés.

Version 2.0

Date d'entrée en vigueur : 13 janvier 2023