

Mode d'emploi

RealStar[®]

Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0

01/2017 FR

RealStar®

Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0

Pour utilisation avec

m2000rt (Abbott Diagnostics)

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)

VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)

ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)

ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)

Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)

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

CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



163013



96



01 2017



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

Sommaire

1. Usage prévu.....	6
2. Composants du kit.....	6
3. Conservation	6
4. Matériel requis non fourni	7
5. Informations générales	8
6. Description du produit.....	9
6.1 Instruments de PCR en temps réel	10
6.2 Amorces et Sondes.....	11
7. Mises en garde et précautions.....	12
8. Mode d'emploi	13
8.1 Préparation du prélèvement.....	13
8.2 Préparation du Mastermix	14
8.3 Préparation de la réaction	16
9. Programmation des instruments de PCR en temps réel.....	17
9.1 Paramètres.....	17
9.2 Marqueurs de fluorescence (fluorophores)	17
9.3 Profil de température et acquisition du fluorophore	18
10. Analyse des données	19
10.1 Validation des tests de diagnostic	19
10.1.1 Validité des tests de diagnostic	19
10.1.2 Invalidité des tests de diagnostic	20
10.2 Interprétation des résultats.....	20
10.2.1 Analyse qualitative	20

11. Evaluation des performances	22
11.1 Sensibilité analytique	22
11.1.1 Analyse par probit	22
11.2 Spécificité analytique	23
11.2.1 Souches du et	23
11.2.2 Sensibilité clinique.....	26
12. Limites.....	27
13. Contrôle qualité.....	28
14. Assistance technique	28
15. Bibliographie	28
16. Marques déposées et responsabilité	29
17. Explications des symboles	30

1. Usage prévu

Le kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 est un test de diagnostic *in vitro*, basé sur la technologie de PCR en temps réel, pour la détection qualitative et la différenciation de l'ARN spécifique du virus de la grippe A, du virus de la grippe B et du virus de la grippe A de souche H1N1_{nv}.

2. Composants du kit

Couleur du bouchon	Composants	Nombre de tubes	Volume [µL/tube]
Bleu	Master A	8	60
Violet	Master B	8	120
Vert	Internal Control	1	1000
Rouge	Positive Control H1N1 _{nv}	1	250
Orange	Positive Control Influenza A	1	250
Jaune	Positive Control Influenza B	1	250
Blanc	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control = Contrôle interne

Positive Control = Contrôle positif

Water (PCR grade) = Eau ultra-pure pour biologie moléculaire

3. Conservation

- Le kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 est expédié sous glace carbonique. Les composants du kit doivent arriver congelés. Si un ou plusieurs composants ne sont pas congelés à réception, ou si l'un des tubes a été endommagé pendant le transport, merci de contacter Altona Diagnostics GmbH pour assistance.
- Tous les composants doivent être conservés entre -25°C et -15°C dès leur livraison.

- Il convient d'éviter des cycles répétés de congélation-décongélation (plus de deux) car cela peut affecter les performances du test. Les réactifs doivent être congelés en aliquots en cas d'utilisation occasionnelle.
- La conservation entre +2°C et +8°C ne doit pas excéder une période de deux heures.
- Le Master A et le Master B doivent être conservés à l'abri de la lumière.

4. Matériel requis non fourni

- Instrument adapté à la PCR en temps réel (Chapitre 6.1 Instruments de PCR en temps réel)
- Système ou kit approprié à l'extraction des acides nucléiques
- Centrifugeuse de paillasse avec rotor pour des tubes réactionnels de 2 mL
- Centrifugeuse avec rotor pour microplaques, si des plaques de 96 puits sont utilisées
- Vortex
- Plaques de 96 puits ou tubes réactionnels avec le matériel de fermeture correspondant (optique)
- Pipettes (réglables)
- Cônes avec filtres (jetables)
- Ecouvillons pour prélèvement d'échantillon
- Gants non talqués (jetables)

NOTE



Merci de vous assurer que les instruments ont été installés, calibrés, vérifiés et entretenus selon les instructions et les recommandations du fabricant.



Il est fortement recommandé d'utiliser le rotor de 72 puits avec les tubes réactionnels de 0,1 ml correspondants, si le Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) ou le Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN) est utilisé.

5. Informations générales

L'Influenza communément appelée la grippe est une maladie infectieuse causée par un virus à ARN de la famille des *Orthomyxoviridae* (virus de la grippe). Les virus de la grippe sont caractérisés par le changement continu de leurs principaux antigènes de surface, les hémagglutinines (H) et les neuraminidases (N) (dérive antigénique). Ils infectent les oiseaux ainsi que les mammifères par les aérosols. Les virus de la grippe humaine de type A et B causent de sérieuses infections surtout des voies respiratoires, avec de la fièvre, de la toux comme symptômes prédominants. Dans certains cas plus sérieux, la grippe peut causer des pneumonies qui peuvent être fatales, en particulier chez les enfants et les personnes âgées.

En Avril 2009, une nouvelle souche de grippe évolua en combinant des gènes de souches de grippe de l'homme, du cochon et des oiseaux. Cette souche a émergé au Mexique, aux Etats Unis et dans d'autres pays du monde entier. Elle fut dans un premier temps nommée la grippe porcine. Aujourd'hui ces souches sont nommées H1N1_{nv}.

Les kits d'amorces/sondes utilisées dans le kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 pour la détection des souches de grippe A et B sont basées sur le gène de la protéine de matrice de la souche cible.

Les kits d'amorces/sondes utilisées pour la détection de la souche de la grippe H1N1_{nv} sont basés sur un alignement multiple de souches connues de la grippe porcine combinées à des séquences connues d'isolats de la "nouvelle" souche H1N1 pandémique.

NOTE



En raison de l'évolution moléculaire relativement rapide des virus à ARN, il y a un risque inhérent, pour tous les systèmes basés sur la RT-PCR en temps réel, d'accumulation de mutations au cours du temps qui pourraient conduire à des résultats faussement négatifs.

6. Description du produit

Le kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 est un test de diagnostic *in vitro*, basé sur la technologie de PCR en temps réel, pour la détection qualitative et la différenciation de l'ARN spécifique du virus de la grippe A, du virus de la grippe B et du virus de la grippe A de souche H1N1_{nv}. Le kit comprend un système d'amplification hétérologue (contrôle interne) afin d'identifier d'éventuelles inhibitions de la RT-PCR et de confirmer l'intégrité des réactifs du kit.

Le test repose sur la technologie de RT-PCR en temps réel, utilisant une transcriptase inverse (RT) qui permet de convertir l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) et une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) pour l'amplification de séquences cibles spécifiques et de sondes cibles spécifiques pour la détection de l'ADN amplifié. Les sondes sont marquées avec un marqueur fluorescent (reporter) et un désactivateur (quencher).

Les sondes spécifiques de l'ARN de la grippe A sont marquées par un fluorophore qui montrent les mêmes caractéristiques que le Cy[®]5, tandis que les sondes spécifiques de l'ARN de la grippe B sont marquées par le fluorophore ROX[™] et les sondes spécifiques de l'ARN de la grippe A H1N1_{nv} sont marquées par le fluorophore FAM[™]. La sonde spécifique du contrôle interne est marquée par le fluorophore JOE[™].

L'utilisation de sondes associées à des fluorophores différents permet la détection en parallèle de l'ARN spécifique de la grippe A, de la grippe B, de la grippe A H1N1_{nv}, et du contrôle interne dans les canaux correspondants de l'instrument de PCR en temps réel.

Le test consiste en trois processus réalisés dans un même tube réactionnel:

- la transcription inverse de l'ARN cible en ADNc
- l'amplification par PCR de l'ADN, et du contrôle interne
- la détection simultanée des amplicons de PCR par des sondes marquées par un fluorophore

Le kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 est composé de:

- Deux Masters (Master A et Master B)
- Un contrôle interne
- Trois contrôles positifs:
 - Contrôle positif: Grippe A
 - Contrôle positif: Grippe B
 - Contrôle positif: Grippe A H1N1_{nv}
- De l'eau ultra-pure (pour biologie moléculaire)

Les réactifs du Master A et du Master B contiennent tous les composants nécessaires (tampon PCR, transcriptase inverse, ADN Polymérase, sel de magnésium, amorces et sondes) afin de réaliser la transcription inverse, l'amplification par PCR et la détection spécifique de la cible (ARN spécifique de la grippe A, ARN spécifique de la grippe B et ARN spécifique de la grippe A H1N1_{nv} ainsi que du contrôle interne) en une seule étape de réaction.

6.1 Instruments de PCR en temps réel

Le kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 a été développé et validé pour être utilisé avec les instruments de PCR en temps réel suivants:

- m2000rt (Abbott Diagnostics)
- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

6.2 Amorces et Sondes

Les amorces et sondes spécifiques de virus de la grippe A humaine saisonnière et la souche H1N1_{nv} utilisées dans le kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 ont été élaborées par le professeur Dr. Christian Drosten, Institut de Virologie, Université de Bonn, Allemagne. Les séquences de ces amorces et sondes figurent dans le tableau ci-dessous:

Tableau 1: Amorces et sondes utilisés pour l'amplification spécifique et la détection des souches des gripes humaines A et B et de H1N1_{nv}

Cible	Sequence 5'- 3'	Oligo
Matrice	AGAGACTTGAAGATGTATTTGCTGGGAAGAT	Sonde 1
Matrice	TCCTGCAAAGACACTTCCAGT	Sonde 2
Matrice	CAGGCCCCCTCAAAGC	Amorce 1
Matrice	CGTCAGGCCTCCTCAAAGC	Amorce 2
Matrice	ATTCCATGAGAGCCTCAAGATC	Amorce 3

Les amorces et sondes ciblent la même région de la matrice du gène de la grippe A et de la souche grippe H1N1_{nv}. Cependant les sondes marquées sont en compétition entre-elles. En présence d'ARN spécifique au virus grippe A, la sonde marquée par le fluorophore présentant les mêmes caractéristiques que Cy®5 s'active, alors qu'en présence d'ARN spécifique au virus de la grippe A H1N1_{nv}, la sonde marquée par le fluorophore FAM™ s'active.

Aussi, bien que la souche grippe A H1N1_{nv} appartienne également aux virus du groupe grippe A, une réponse positive à la souche H1N1_{nv} résulte dans la présence d'un signal uniquement dans le canal FAM™ (aucun signal présent en canal Cy® 5). Une réponse positive au virus grippe A saisonnière résulte dans la présence d'un signal uniquement dans le canal Cy® 5 (aucun signal présent en canal FAM™).

7. Mises en garde et précautions

Lire attentivement le manuel d'utilisation avant d'utiliser le produit.

- Avant toute utilisation, veuillez vérifier que le produit et ses composants:
 - Ne sont pas endommagés,
 - Sont complets : nombre, type et volume (voir le chapitre 2. Composants du kit)
 - Sont correctement étiquetés,
 - Sont congelés à la réception
- L'utilisation de ce produit est limitée au personnel qualifié et formé aux techniques de PCR en temps réel et aux procédures de diagnostic *in vitro*.
- Manipuler les échantillons comme s'ils étaient infectieux et/ou dangereux, en accord avec les procédures de sécurité en vigueur dans le laboratoire.
- Porter des gants jetables non talqués, une blouse de laboratoire et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons.
- Eviter les contaminations microbiennes et nucléaires (par ADNase/ARNase) de l'échantillon et des composants du kit.
- Toujours utiliser des pipettes à cônes jetables avec filtre, non contaminées par de l'ADNase et de l'ARNase.
- Toujours porter des gants de protection non talqués lors de la manipulation des composants du kit.
- Utiliser des zones de travail séparées les unes des autres pour les différentes activités de (i) préparation des échantillons, (ii) préparation de la réaction et (iii) les étapes d'amplification/détection. Le sens de travail dans le laboratoire doit être unidirectionnel. Porter des gants dans chaque zone de travail et les changer avant d'entrer dans une zone différente.
- Dédier des fournitures et du matériel pour chaque zone de travail et ne pas les déplacer d'une zone à une autre.
- Conserver le matériel positif et/ou potentiellement positif séparément des autres composants du kit.

- Ne pas ouvrir les tubes/plaques de réaction après l'amplification afin d'éviter toute contamination par les amplicons.
- Des témoins additionnels peuvent devoir être testés selon les directives des organisations locales/gouvernementales ou des organismes d'accréditation.
- Ne pas autoclaver des tubes réactionnels après une PCR, car ceci ne dégrade pas les acides nucléiques amplifiés et risque de contaminer le laboratoire.
- Ne pas utiliser les composants au-delà de leur date de péremption.
- Eliminer les échantillons et les déchets de l'essai conformément aux règles de sécurité locales.

8. Mode d'emploi

8.1 Préparation du prélèvement

L'ARN extrait constitue le matériel de départ pour le kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0.

La qualité de l'ARN extrait a un impact significatif sur la performance de l'ensemble du test. Il est important de s'assurer que le système d'extraction des acides nucléiques utilisé est compatible avec la technologie de PCR en temps réel. Les kits et systèmes suivants sont compatibles pour l'extraction des acides nucléiques:

- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

D'autres kits ou systèmes d'extraction des acides nucléiques peuvent être appropriés. L'aptitude de la procédure d'extraction des acides nucléiques à utiliser avec RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 doit être validé par l'utilisateur.

Si la préparation des échantillons s'effectue sur une colonne comportant des tampons de lavage à l'éthanol, une étape de centrifugation supplémentaire de 10 minutes à environ 17000 x g (~ 13000 tr/min), dans un nouveau tube à essai, est vivement recommandée avant l'élution des acides nucléiques.

Pour la sensibilité la plus élevée, l'ARN doit être élué en utilisant 30 µL de tampon d'élution préchauffé (~70°C).

ATTENTION

L'éthanol est un fort inhibiteur de la PCR en temps réel. Si votre système de préparation des échantillons utilise des tampons de lavage à l'éthanol, assurez-vous d'éliminer toute trace d'éthanol avant de procéder à l'élution des acides nucléiques.



L'utilisation d'ARN porteur (carrier) est crucial pour l'efficacité de l'extraction et la stabilité des acides nucléiques extraits.

Pour toute information complémentaire ou assistance technique sur le prétraitement et la préparation des échantillons, merci de contacter notre support technique (Chapitre 14. Assistance technique).

8.2 Préparation du Mastermix

Tous les réactifs doivent être complètement décongelés, homogénéisés (par pipetage ou léger vortexage) et brièvement centrifugés avant utilisation.

Le kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 contient un contrôle interne hétérologue pouvant être utilisé soit comme contrôle d'inhibition de la RT-PCR soit comme contrôle de la préparation de l'échantillon (extraction des acides nucléiques) et de l'inhibition de la RT-PCR.

- ▶ Si le contrôle interne est utilisé comme un contrôle d'inhibition de la RT-PCR, mais non comme contrôle de préparation de l'échantillon, le Mastermix doit être préparé comme décrit par le schéma de pipetage ci-dessous:

Nombre de réactions (rxns)	1	12
Master A	5 µL	60 µL
Master B	10 µL	120 µL
Internal Control (contrôle interne)	1 µL	12 µL
Volume de Mastermix	16 µL	192 µL

- ▶ Si le contrôle interne est utilisé comme contrôle de préparation de l'échantillon, et d'inhibition de la RT-PCR, le contrôle interne doit être ajouté au moment de la procédure d'extraction des acides nucléiques.
- ▶ Quelque soit la méthode ou le système utilisé pour l'extraction des acides nucléiques, le contrôle interne ne doit **jamais** être ajouté directement à l'échantillon. Le contrôle interne doit toujours être ajouté au mélange échantillon/ tampon de lyse. Le volume du contrôle interne à ajouter dépend toujours et uniquement du volume d'élution, dont il représente 10%. Par exemple si les acides nucléiques doivent être élués dans 60 µL de tampon d'élution ou d'eau, 6 µL de contrôle interne par échantillon doivent être ajoutés au mélange échantillon/tampon de lyse.
- ▶ Si le contrôle interne a été ajouté pendant la phase de préparation de l'échantillon, le Mastermix doit être préparé selon le schéma de pipetage suivant:

Nombre de réactions (rxns)	1	12
Master A	5 µL	60 µL
Master B	10 µL	120 µL
Volume de Mastermix	15 µL	180 µL

ATTENTION

Si le contrôle interne a été ajouté pendant la phase de préparation de l'échantillon, au moins le contrôle négatif doit inclure le contrôle interne.



Ne jamais ajouter le contrôle interne directement à l'échantillon.

8.3 Préparation de la réaction

- ▶ Pipeter 15 µL de Mastermix dans chacun des puits nécessaires de la plaque 96 puits ou d'un tube à essai permettant les réactions optiques.
- ▶ Ajouter 10 µL de l'échantillon (éluat issu de l'extraction des acides nucléiques) ou 10 µL des contrôles (contrôles positifs ou négatifs).

Préparation de la réaction	
Mastermix	15 µL
Echantillon ou contrôle	10 µL
Volume total	25 µL

- ▶ S'assurer que chaque contrôle positif et au moins un contrôle négatif sont utilisés par essai.
- ▶ Homogénéiser avec soin les échantillons et les contrôles avec le Mastermix par pipetage.
- ▶ Couvrir la plaque 96 puits avec un film adhésif transparent approprié et les tubes réactionnels à l'aide de bouchons appropriés.
- ▶ Centrifuger les plaques de 96 puits à l'aide d'un rotor à microplaques pendant 30 secondes à environ 1000 x g (~ 3000 tr/min).

9. Programmation des instruments de PCR en temps réel

Pour obtenir des informations générales sur la préparation et la programmation des différents instruments de PCR en temps réel, veuillez consulter les manuels d'utilisation des instruments respectifs.

Pour des instructions sur la programmation relative à l'utilisation du kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 avec un instrument de PCR en temps réel spécifique, merci de contacter notre support technique (Chapitre 14. Assistance technique).

9.1 Paramètres

- ▶ Définir les paramètres suivants:

Paramètres	
Volume de réaction	25 µL
Vitesse de la rampe	par défaut
Référence passive	Aucun

9.2 Marqueurs de fluorescence (fluorophores)

- ▶ Définir les marqueurs de fluorescence (fluorophores):

Cible	Nom du marqueur	Fluorophore (Reporter)	Désactivateur (Quencher)
ARN spécifique de la grippe A	grippe A	Cy [®] 5	(aucun)
ARN spécifique de la grippe B	grippe B	ROX™	(aucun)
ARN spécifique de la grippe A H1N1 _{nv}	grippe A H1N1 _{nv}	FAM™	(aucun)
Internal Control (contrôle interne)	IC	JOE™	(aucun)

9.3 Profil de température et acquisition du fluorophore

► Définir le profil de température et l'acquisition du fluorophore:

	Étape	Nombre Cycles	Acquisition	Température [°C]	Durée [min:sec]
Transcription inverse	Stationnaire	1	-	50	10:00
Dénaturation	Stationnaire	1	-	95	02:00
Amplification	Cyclique	45	-	95	00:15
			oui	55	00:45
			-	72	00:15

10. Analyse des données

Pour des informations de base concernant l'analyse des données sur un instrument de PCR en temps réel spécifique, merci de se référer au manuel de l'instrument concerné.

Pour des informations détaillées concernant l'analyse des données générées avec le kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 sur différents instruments de PCR en temps réel, merci de contacter notre support technique (Chapitre 14. Assistance technique).

10.1 Validation des tests de diagnostic

10.1.1 Validité des tests de diagnostic

Un test de diagnostic est **valide**, si les valeurs suivantes des contrôles sont obtenues:

Nom du Contrôle	Canal de détection			
	Cy [®] 5	ROX™	FAM™	JOE™
Contrôle positif grippe A	+	-	-	+/-*
Contrôle positif grippe B	-	+	-	+/-*
Contrôle positif grippe A H1N1 _{nv}	-	-	+	+/-*
Contrôle négatif	-	-	-	+

* La présence ou l'absence d'un signal dans le canal JOE™ n'est pas pertinente pour la validité de l'essai.

10.1.2 Invalidité des tests de diagnostic

Un test de diagnostic est **invalide**, (i) si l'essai n'est pas complet ou (ii) si l'ensemble des conditions de contrôle pour un test de diagnostics valide n'est pas obtenu.

En cas d'**invalidité** du test de diagnostic, répéter le test avec les acides nucléiques purifiés restants ou recommencer depuis l'échantillon de départ.

10.2 Interprétation des résultats

10.2.1 Analyse qualitative

Canal de détection				Interprétation des résultats
Cy [®] 5	ROX™	FAM™	JOE™	
+	-	-	+*	ARN spécifique de la grippe A détecté.
-	+	-	+*	ARN spécifique de la grippe B détecté.
-	-	+	+*	ARN spécifique de la grippe A H1N1 _{nv} détecté. ^{1,2}
-	-	-	+	ARN spécifique de la grippe A, de la grippe B ou de la grippe A H1N1 _{nv} non détecté. L'échantillon ne contient pas de quantités détectables d'ARN spécifique de la grippe A, grippe B et grippe A H1N1 _{nv} .
-	-	-	-	Inhibition de la RT-PCR ou défaillance des réactifs. Répéter le test à partir de l'échantillon d'origine ou bien prélever et tester un nouvel échantillon.

* La détection du contrôle interne dans le canal de détection JOE™ n'est pas requise pour des résultats positifs dans le canal de détection Cy[®]5, ROX™ ou FAM™. De fortes charges en ARN spécifique de la grippe A, grippe B et grippe A H1N1_{nv} dans l'échantillon peuvent conduire à des signaux absents ou très faibles pour le contrôle interne.

¹ Les souches H1N1_{nv} appartiennent au groupe de virus de la grippe A. Néanmoins, en raison du design du test, les échantillons positifs H1N1_{nv} génèrent un signal positif uniquement dans le canal FAM™ mais pas dans le canal Cy[®]5

² La souche grippe A / Parana / 720/2015 (H1N2v) sera typée grippe A H1N1_{nv}, puisqu'elle contient la même séquence cible du gène de la matrice.

NOTE

i

En dépit du fait que la souche H1N1_{nv} appartienne au groupe du virus de la grippe A, dû à la conception des essais, les échantillons positifs au H1N1_{nv} donneront un signal positif dans le canal FAM™ mais pas dans le Cy[®]5.

i

Les échantillons positifs à la grippe saisonnière A donneront un résultat positif dans le canal Cy[®]5 mais pas dans le FAM™.

Pour de plus amples détails concernant l'interprétation des résultats, merci de contacter notre support technique. (Voir chapitre 14. Assistance technique).

11. Evaluation des performances

11.1 Sensibilité analytique

Pour évaluer la sensibilité analytique, des dilutions en série ont été effectuées sur des plaques positives quantifiées à grippe A/H1N1, grippe A/H3N2 et grippe A/H1N1_{nv} et FFU-quantifié grippe B.

Tableau 2: Taux de succès des analyses pour les différentes souches

PFU/ml	Grippe A / H1N1 _{nv}	Grippe A / H3N2	Grippe A / H1N1	Grippe B*
10 ⁴	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+
10 ³	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+
10 ²	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+
10 ¹	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+
10 ⁰	+/-/-/-	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/-
10 ⁻¹	-/-/-/-	+/-/-/-	+/-/-/-	-/-/-/-
10 ⁻²	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-
10 ⁻³	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-

* "Focus-forming units" (FFU) au lieu de "plaque-forming units" (PFU).

11.1.1 Analyse par probit

- Pour la détection de la souche grippe A/HK/1/68 (H3N2): la sensibilité analytique est de 0,3 PFU/ml [Intervalle de confiance à 95% (CI) : 0,2 – 0,7 PFU/ml]
- Pour la détection de la souche grippe A/HH/09 (H1N1_{nv}): la sensibilité analytique est de 0,7 PFU/ml [Intervalle de confiance à 95% (CI) : 0,5 – 1,8 PFU/ml]
- Pour la détection de la souche grippe A/Texas/91 (H1N1): la sensibilité analytique est de 1,6 PFU/ml [Intervalle de confiance à 95% (CI) : 1,1 – 3,8 PFU/ml]

- Pour la détection de la souche grippe B/Brisbane/60/2008: la sensibilité analytique est de 1,1 PFU/ml [Intervalle de confiance à 95% (CI) : 0,5 – 1,8 PFU/ml]

11.2 Spécificité analytique

11.2.1 Souches de la grippe A et grippe B

Souche	Soustype	Grippe A	Grippe B	H1N1 _{nv}	Contrôle interne
Grippe A/Anhui/07/290	H5N1	+	-	-	+
Grippe A/Anhui/1/105	H5N1	+	-	-	+
Grippe A/Bangkok/1/79	H3N2	+	-	-	+
Grippe A/Bangkok/80/517	H3N2	+	-	-	+
Grippe A/Brazil/11/78	H1N1	+	-	-	+
Grippe A/Brazil/83/550	H1N1	+	-	-	+
Grippe A/Brisbane/08/100	H1N1	+	-	-	+
Grippe A/Brisbane/10/2007	H1N1	+	-	-	+
Grippe A/Brisbane/59/2007	H1N1	+	-	-	+
Grippe A/England/427/88	H3N3	+	-	-	+
Grippe A/England/88/654	H3N3	+	-	-	+
Grippe A/Equine/Kentucky/1/81	H3N8	+	-	-	+
Grippe A/Equine/Kentucky/85/520	H3N8	+	-	-	+
Grippe A/Equine/Miami/63	H3N8	+	-	-	+
Grippe A/Equine/Miami/87/510	H3N8	+	-	-	+
Grippe A/Equine/Newmarket/1/93	H3N8	+	-	-	+
Grippe A/Equine/ Newmarket/97/596	H3N8	+	-	-	+

Souche	Soustype	Grippe A	Grippe B	H1N1 _{nv}	Contrôle interne
Grippe A/Guizhou/54/89	H3N2	+	-	-	+
Grippe A/Guizhou/90/502	H3N2	+	-	-	+
Grippe A/Johannesburg/33/94	H1N1	+	-	-	+
Grippe A/Johannesburg/95/516	H1N1	+	-	-	+
Grippe A/Philipines/2/82	H3N2	+	-	-	+
Grippe A/Philipines/94/516	H3N2	+	-	-	+
Grippe A/Shangdong/78/516	H3N2	+	-	-	+
Grippe A/Shangdong/9/93	H3N2	+	-	-	+
Grippe A/Turkey/07/112	H5N1	+	-	-	+
Grippe A/Turkey/1/2005	H5N1	+	-	-	+
Grippe A/Uruguay/08/278	H3N3	+	-	-	+
Grippe A/Uruguay/716/2007	H3N3	+	-	-	+
Grippe A/Vietnam/05/204	H5N1	+	-	-	+
Grippe A/Vietnam/119/04	H5N1	+	-	-	+
Grippe B/Ann Arbor/86/630		-	+	-	+
Grippe B/Florida/08/140		-	+	-	+
Grippe B/Florida/8/2006		-	+	-	+
Grippe B/Harbin/7/94		-	+	-	+
Grippe B/Harbin/97/748		-	+	-	+
Grippe B/Hong Kong/79/568		-	+	-	+
Grippe B/Hong Kong/8/73		-	+	-	+
Grippe B/Malaysia/08/184		-	+	-	+
Grippe B/Malaysia/2506/2004		-	+	-	+

Souche	Soustype	Grippe A	Grippe B	H1N1 _{nv}	Contrôle interne
Grippe B/Norway/1/84		-	+	-	+
Grippe B/Norway/84/542		-	+	-	+
Grippe B/Brisbane/60/2008		-	+	-	+
Grippe A/Brisbane/10/2007	H3N2	+	-	-	+
Grippe A/Brisbane/59/2007	H3N2	+	-	-	+
Grippe A/Chicken/Germany R3294/2007	H5N1	+	-	-	+
Grippe A/Hamburg/2009	H1N1 _{nv}	-	-	+	+
Grippe A/Bayern/63/2009	H1N1 _{nv}	-	-	+	+
Grippe A/California 2009	H1N1 _{nv}	-	-	+	+

11.2.1.1 Substances interférentes

Tableau 3: Résultats des échantillons contenant différentes substances interférentes possible

Substances interférentes possible	Resultat 30 pfu/ml (H1N1 _{nv} souche HH)	Resultat 3 pfu/ml (H1N1 _{nv} souche HH)
Mucin (10%, bovine)	+	+
Sang (EDTA sang)	+	+
l'ADN génomique humain (2 µg / PCR)	+	+
Écouvillons (5 fabricants)	+	+
Milieu de transport viral (3 fabricants)	+	+
Écouvillons bactériologique (contenant de l'agar)	-	-

11.2.2 Sensibilité clinique

Aucune étude prospective pour la détermination de la sensibilité clinique n'a encore été effectuée car il n'existe aucun dosage approuvé pour comparer. En remplacement, un échantillon est déclaré comme positif si au moins un des échantillons positifs en technique RT-PCR "maison" est également disponible avec une preuve additionnelle de sa positivité (séquençage, test des antigènes ou culture virale). Ces échantillons sont nommés "échantillons pré-testés positifs" et "prétestés négatifs" respectivement. Ces échantillons ont été testés à nouveau avec le kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0.

Tableau 4: Resultats du diagnostic d'évaluation

		RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 H1N1 _{nv}	
		+	-
pré-testés	+	141	5
	-	4	89

12. Limites

- Une stricte conformité aux instructions d'utilisation est nécessaire afin d'obtenir les meilleurs résultats.
- L'utilisation de ces produits est limitée au personnel compétent et formé aux techniques de PCR en temps réel et aux procédures de diagnostic *in vitro*.
- Le respect des bonnes pratiques de laboratoire est essentiel pour garantir le bon fonctionnement de ce test. Une attention particulière doit être apportée à la préparation des échantillons afin de préserver la pureté des composants du kit. Tous les réactifs doivent faire l'objet d'une surveillance étroite afin d'éviter des impuretés et des contaminations. Tout réactif suspect doit être éliminé.
- Il est nécessaire de respecter les procédures de prélèvement, de transport, de conservation et de traitement des échantillons afin d'assurer les performances optimales du test.
- Ce test n'est pas destiné à être utilisé directement sur l'échantillon. Des méthodes appropriées d'extraction des acides nucléiques doivent être employées avant son utilisation.
- La présence d'inhibiteurs de RT-PCR (p.ex. héparine) est susceptible d'entraîner des résultats faussement négatifs ou erronés.
- De potentielles mutations dans les régions du génome de la grippe A H1N1_{nv}, de la grippe A et/ou de la grippe B couvertes par l'amorce et/ou les sondes du test peuvent empêcher la détection de pathogènes.
- Le RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 est un test de diagnostic. En conséquence, ses résultats doivent être interprétés en prenant en considération l'ensemble des symptômes cliniques et des résultats obtenus en laboratoire.
- Certaines souches rares du virus de la grippe B (par exemple la souche Lee ou réassortissant) portent une mutation spécifique et sont donc détectées avec une sensibilité légèrement inférieure par rapport aux souches du virus de la grippe B ne portant pas cette mutation.
- La souche grippe A/Parana /720/2015 (H1N2v) sera typée grippe A H1N1_{nv}, puisqu'elle contient la même séquence cible du gène de la matrice.

13. Contrôle qualité

Conformément au système de management de la qualité d'altona Diagnostics GmbH, certifié ISO EN 13485, chaque lot du RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 est testé selon des spécifications prédéfinies afin de garantir une qualité constante des produits.

14. Assistance technique

Pour obtenir une assistance sur nos produits, merci de contacter notre support technique:

e-mail: support@altona-diagnostics.com
téléphone: **+49-(0)40-5480676-0**

15. Bibliographie

Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Third Edition. Mosby, 2010.

Resende P, Born P, Matos A, Motta F, Caetano B, Debur M, et al. Whole-Genome Characterization of a Novel Human Influenza A(H1N2) Virus Variant, Brazil. Emerg Infect Dis. 2017;23(1):152-154.

16. Marques déposées et responsabilité

RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

Les noms et marques déposés cités dans ce document, même si non mentionnés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

















Le kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 est un kit de diagnostic *in vitro*, marqué CE conformément à la Directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs de diagnostic *in vitro*.

Produit non homologué pour la vente par Santé Canada et n'ayant pas fait l'objet d'une notification (510(k)) ou d'une approbation (PMA) de pré-commercialisation par la FDA.

Produit distribué dans certains pays uniquement.

© 2017 altona Diagnostics GmbH; tous droits réservés.

17. Explications des symboles

	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Numéro de lot
	Couleur du bouchon
	Référence produit
	Contenu
	Nombre
	Composant
	Code article international
	Lire les instructions d'utilisation
	Contient la quantité suffisante pour réaliser "n" tests (rxns)
	Limites de température
	À utiliser avant
	Fabricant
	Attention
	Note
	Version

Notes:

always a drop ahead.

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

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

www.altona-diagnostics.com

