

Mode d'emploi

RealStar[®]

Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0

04/2019 FR

RealStar®

Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0

Pour utilisation avec

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)

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

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



164013



96



04 2019



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

Sommaire

1.	Usage prévu.....	6
2.	Composants du kit.....	6
3.	Stockage	6
4.	Matériel requis non fourni	7
5.	Informations générales.....	8
6.	Description du produit.....	8
6.1	Instruments de PCR en temps réel	10
7.	Mises en garde et précautions.....	10
8.	Procédure	12
8.1	Préparation du prélèvement.....	12
8.2	Préparation du Mastermix.....	13
8.3	Préparation de la réaction.....	15
9.	Programmation des instruments de PCR en temps réel.....	16
9.1	Paramètres.....	16
9.2	Marqueurs de fluorescence (fluorophores)	16
9.3	Profil de température et acquisition du fluorophore	17
10.	Analyse des données	17
10.1	Validation des tests de diagnostic.....	18
10.1.1	Validité des tests de diagnostic (qualitatif)	18
10.1.2	Invalidité des tests de diagnostic (qualitatif).....	18
10.2	Interprétation des résultats.....	19
10.2.1	Analyse qualitative	19
11.	Evaluation des performances	20

11.1	Sensibilité analytique	20
11.2	Spécificité analytique	22
11.3	Précision	23
12.	Restrictions	24
13.	Contrôle qualité	26
14.	Assistance technique	26
15.	Bibliographie	26
16.	Marques de commerce et clauses de non-responsabilité	27
17.	Explications des symboles	28

1. Usage prévu

Le kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 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 de virus de la grippe A, virus de la grippe B et virus de la grippe A (H1N1)pdm09.

2. Composants du kit

Couleur du bouchon	Composants	Nombre de tubes	Volume [µL/tube]
Bleu	Master A	8	60
Violet	Master B	8	180
Vert	Internal Control	1	1000
Rouge	Positive Control	1	250
Blanc	Water (PCR grade)	1	500

3. Stockage

- Le kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 est livré sur de la neige 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 (voir chapitre 8.1 Préparation du prélèvement)
- 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)
- Écouvillons adaptés au prélèvement des échantillons
- Gants non poudrés (jetables)

REMARQUE



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

NOTE



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

La grippe est une maladie infectieuse provoquée par des virus à ARN de la famille des *Orthomyxoviridae* (virus de la grippe). Les virus de la grippe se caractérisent par des modifications continues de leurs principaux antigènes de surface, l'hémagglutinine (H) et la neuraminidase (N) (dérive antigénique). Ils infectent les oiseaux et les mammifères par l'intermédiaire des particules en suspension dans l'air. Les virus de la grippe A et de la grippe B provoquent des infections sévères qui touchent essentiellement les voies respiratoires et dont les symptômes les plus fréquents sont la fièvre et la toux. Dans les cas plus graves, la grippe entraîne une pneumonie, qui peut s'avérer fatale, en particulier chez les enfants et les personnes âgées.

REMARQUE



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 Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 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 de virus de la grippe A, virus de la grippe B et virus de la grippe A (H1N1)pdm09 (anciennement désigné comme virus de la grippe A H1N1_{nv}).

Le test 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 grippe A sont marquées par le fluorophore FAM™, les sondes spécifiques de l'ARN de grippe B sont marquées par le fluorophore Cy®5 et les sondes spécifiques de l'ARN de grippe A (H1N1)pdm09 sont marquées par le fluorophore ROX™. 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 grippe A, grippe B et grippe A (H1N1)pdm09, ainsi que la détection du contrôle interne dans les canaux correspondants de l'instrument 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'ADNc cible et contrôle interne
- La détection simultanée des amplicons de PCR par des sondes marquées par un fluorophore

Le kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 est composé de :

- Master A
- Master B
- Internal Control
- Positive Control
- Water (PCR grade)

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 de la cible ARN spécifique de grippe A, de la cible ARN spécifique de

grippe B, de la cible ARN spécifique de grippe A (H1N1)pdm09 ainsi que du contrôle interne en une seule étape de réaction.

6.1 Instruments de PCR en temps réel

Le kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 a été développé et validé pour être utilisé avec les instruments de PCR en temps réel suivants :

- 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)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

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. Portez toujours des gants jetables dans chacune des zones de travail et changez-en avant de pénétrer 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. Procédure

8.1 Préparation du prélèvement

L'ARN extrait constitue le matériel de départ pour le kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 .

La qualité de l'ARN extrait a un impact significatif sur la performance de l'ensemble du test. Il est recommandé 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)
- QIAasymphony® (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 le kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 doit être validée 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 17 000 x g (~ 13 000 tr/min), dans un nouveau tube à essai, est vivement recommandée avant l'élution des acides nucléiques.

ATTENTION

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'éthanol est un fort inhibiteur de la PCR en temps réel.

ATTENTION

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 (voir 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 Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 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	15 µl	180 µl
Internal Control (contrôle interne)	1 µl	12 µl
Volume Mastermix	21 µl	252 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.
- ▶ Quelle que 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	15 µl	180 µl
Volume Mastermix	20 µl	240 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.

ATTENTION



Quelle que soit la méthode ou le système utilisé pour l'extraction des acides nucléiques, ne jamais ajouter le contrôle interne directement à l'échantillon.

8.3 Préparation de la réaction

- ▶ Pipeter 20 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 d'échantillon (éluat issu de l'extraction des acides nucléiques) ou 10 µL des contrôles (contrôles positifs ou négatifs).

Préparation de la réaction	
Mastermix	20 µl
Echantillon ou contrôle	10 µl
Volume total	30 µl

- ▶ S'assurer qu'au moins un contrôle positif et au moins un contrôle négatif sont utilisés par Mastermix et 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 1 000 x g (~ 3 000 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 Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 avec un instrument de PCR en temps réel spécifique, merci de contacter notre support technique (voir chapitre 14. Assistance technique).

9.1 Paramètres

- Définir les paramètres suivants :

Paramètres	
Volume de réaction	30 µl
Vitesse de la rampe	Par défaut
Référence passive	Aucun

9.2 Marqueurs de fluorescence (fluorophores)

- Définir les marqueurs de fluorescence (fluorophores) :

Cible	Nom de marqueur	Fluorophore (Reporter)	Désactivateur (Quencher)
grippe A spécifique ARN	grippe A	FAM™	(aucun)
grippe B spécifique ARN	grippe B	Cy®5	(aucun)
grippe A (H1N1)pdm09 spécifique ARN	grippe A (H1N1) pdm09	ROX™	(aucun)
Internal Control (contrôle interne, IC)	IC	JOE™	(aucun)

9.3 Profil de température et acquisition du fluorophore

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

	Etape	Nombre de cycles	Acquisition	Température [°C]	Durée [min:sec]
Transcription inverse	Stationnaire	1	-	55	20:00
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 Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 sur différents instruments

de PCR en temps réel, merci de contacter notre support technique (voir chapitre 14. Assistance technique).

10.1 Validation des tests de diagnostic

10.1.1 Validité des tests de diagnostic (qualitatif)

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

Nom du Contrôle	Canal de détection			
	FAM™	Cy®5	ROX™	JOE™
Positive Control (contrôle positif) [grippe A, grippe B et grippe A (H1N1)pdm09]	+	+	+	+/-*
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 (qualitatif)

Un test de diagnostic **qualitatif** est **invalide**, (i) si l'essai n'est pas complet ou (ii) si l'ensemble des conditions de contrôle pour un test de diagnostic **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
FAM™	Cy®5	ROX™	JOE™	
+	+	+	+*	grippe A, ARN spécifique de grippe B et grippe A (H1N1)pdm09 détecté.
+	-	-	+*	grippe A ARN spécifique détecté.
-	+	-	+*	grippe B ARN spécifique détecté.
-	-	+	+	grippe A (H1N1)pdm09 ARN spécifique détecté. ¹
+	-	+	+*	grippe A (H1N1)pdm09 ARN spécifique détecté. ^{1,2}
-	-	-	+	ARN spécifique de grippe A, grippe B et grippe A (H1N1)pdm09 non détecté. L'échantillon ne contient pas de quantités détectables d'ARN du grippe A, grippe B et grippe A (H1N1)pdm09.
-	-	-	-	RT-PCR Inhibition de la 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 FAM™, Cy®5 ou ROX™. De fortes charges en ARN dans l'échantillon peuvent conduire à des signaux absents ou très faibles pour le contrôle interne.

¹ En raison de la différence de sensibilité des systèmes de détection pour les cibles grippe A (FAM) et grippe A H1N1pdm09 (ROX), les échantillons faiblement positifs peuvent dans de rares cas générer un signal dans le canal ROX, mais pas dans le canal FAM.

² Les souches (H1N1)pdm09 appartiennent au groupe du virus de la grippe A. Par conséquent, les échantillons positifs pour (H1N1)pdm09 génèrent un signal positif dans les canaux FAM™ et ROX™.

11. Evaluation des performances

L'évaluation des performances du kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 a été réalisée au moyen d'un ARN de virus de la grippe A H1N1 pdm09 (souche A/NY/02/2009), d'un ARN de virus de la grippe A H3N2 (souche Wisconsin/67/05) et d'un ARN de virus de la grippe B (souche Florida/04/06) quantifiés.

11.1 Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 est définie comme étant la concentration (copies/μL d'éluat) de molécules d'ARN spécifiques de grippe A (H1N1)pdm09, grippe A ou grippe B qui peuvent être détectées avec un taux supérieur à 95 %. La sensibilité analytique a été déterminée en analysant des dilutions en série d'une concentration quantifiée en ARN du grippe A (H1N1)pdm09, en ARN du grippe A et en ARN du grippe B.

Tableau 1: RT-PCR résultats utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique concernant la détection d'ARN spécifique de grippe A

Conc. d'entrée [copies/μL]	Nombre de répétitions	Nombre de Positifs	Taux de réussite [%]
31,622	24	24	100
10,000	24	24	100
3,162	24	23	96
1,000	24	18	75
0,316	24	12	50
0,100	24	2	8
0,032	24	1	4
0,010	24	0	0
0,003	24	0	0

Tableau 2: RT-PCR résultats utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique concernant la détection d'ARN spécifique de grippe B

Conc. d'entrée [copies/μL]	Nombre de répétitions	Nombre de Positifs	Taux de réussite [%]
31,622	24	24	100
10,000	24	24	100
3,162	24	24	100
1,000	24	24	100
0,316	24	21	88
0,100	24	13	54
0,032	24	1	4
0,010	24	0	0
0,003	24	0	0

Tableau 3: RT-PCR résultats utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique concernant la détection d'ARN spécifique de grippe A (H1N1)pdm09

Conc. d'entrée [copies/μL]	Nombre de répétitions	Nombre de Positifs	Taux de réussite [%]
31,622	24	24	100
10,000	24	24	100
3,162	24	24	100
1,000	24	24	100
0,316	24	19	79
0,100	24	8	33
0,032	24	2	8
0,010	24	2	8
0,003	24	0	0

La sensibilité analytique du kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 a été déterminée par analyse Probit :

- Pour la détection de l'ARN spécifique de grippe A, la sensibilité analytique est de 2,88 copies/μL [intervalle de confiance (CI) à 95 % : 1,70-6,55 copies/μL]
- Pour la détection de l'ARN spécifique de grippe B, la sensibilité analytique est de 0,39 copies/μL [intervalle de confiance (CI) à 95 % : 0,26-0,81 copies/μL]
- Pour la détection de l'ARN spécifique de grippe A (H1N1)pdm09, la sensibilité analytique est de 0,87 copies/μL [intervalle de confiance (CI) à 95 % : 0,51-1,97 copies/μL]

11.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 est garantie par la sélection minutieuse des oligonucléotides (amorces et sondes). Ceux-ci ont été contrôlés par analyse comparative des séquences par rapport à des séquences publiquement accessibles afin de garantir que tous les génotypes pertinents de grippe A, grippe B et grippe A (H1N1)pdm09 seront détectés.

La spécificité analytique du kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 a été évaluée en testant un panel d'ADN/ARN génomique extrait de différents pathogènes susceptibles d'être présents dans la même matrice d'échantillon ou de causer des symptômes similaires à ceux du virus de la grippe.

Le kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 ne présente pas de réactivité croisée avec les pathogènes suivants :

- Entérovirus (coxsackie)
- Adénovirus humain
- Métapneumovirus humain
- Virus parainfluenza humain
- Virus respiratoire syncytial humain de type A
- Rhinovirus
- *Bordetella parapertussis*
- *Bordetella pertussis*
- *Chlamydomphila pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Legionella pneumophila*
- *Moraxella catarrhalis*
- *Streptococcus pneumoniae*

11.3 Précision

Les données de précision du kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 ont été déterminées comme étant la variabilité intra-essai (variabilité au sein d'une expérience), la variabilité inter-essai (variabilité entre différentes expériences) et la variabilité interlot (variabilité entre différents lots de production). La variabilité totale a été calculée en combinant les trois analyses.

La variabilité des données est exprimée en terme d'écart type et de coefficient de variation basé sur les valeurs du cycle de seuil (C_t). Au moins **six** réplicats par échantillon ont été analysés pour la variabilité intra-essai, inter-essai et inter-lots.

Tableau 4: Données de précision pour la détection d'ARN spécifique de grippe A, grippe B et grippe A (H1N1)pdm09

grippe A, grippe B et grippe A (H1N1)pdm09		Valeurs C_t moyennes	Ecart type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	grippe A	30,44	0,18	0,60
	grippe B	33,59	0,19	0,57
	grippe A (H1N1) pdm09	32,30	0,07	0,22
Variabilité inter-essai	grippe A	30,45	0,13	0,42
	grippe B	33,82	0,28	0,83
	grippe A (H1N1) pdm09	32,14	0,10	0,31
Variabilité inter-lot	grippe A	30,31	0,17	0,57
	grippe B	34,61	0,60	1,74
	grippe A (H1N1) pdm09	32,09	0,08	0,24
Variabilité totale	grippe A	30,35	0,18	0,59
	grippe B	34,27	0,70	2,04
	grippe A (H1N1) pdm09	32,13	0,09	0,28

Tableau 5: Données de précision pour la détection de l'Internal Control (contrôle interne)

Internal Control (contrôle interne)	Valeurs C _t moyennes	Ecart type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	29,15	0,06	0,19
Variabilité inter-essai	29,09	0,08	0,28
Variabilité inter-lot	29,09	0,08	0,28
Variabilité totale	29,11	0,08	0,27

12. Restrictions

- Un respect strict du mode d'emploi est nécessaire pour obtenir des résultats optimaux.
- 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*.
- Le respect des bonnes pratiques de laboratoire est essentiel au bon fonctionnement de ce test. Il convient de faire preuve de la plus grande vigilance pour préserver la pureté des composants du kit et des configurations de réaction. Tous les réactifs doivent faire l'objet d'une surveillance étroite pour détecter la présence d'impuretés et toute contamination éventuelle. Tout réactif suspect doit être jeté.
- Les procédures de prélèvement des échantillons, de transport, de stockage et de traitement appropriées doivent être respectées pour un fonctionnement optimal de ce test.
- Ce test ne doit pas être utilisé directement sur les échantillons. Les méthodes appropriées d'extraction d'acides nucléiques doivent être effectuées avant d'utiliser ce test.
- La présence d'inhibiteurs de la RT-PCR (p. ex. l'héparine) peut entraîner une ou donner des résultats faussement négatifs ou non valides.
- Les mutations potentielles dans les régions cibles du génome du grippe A, grippe B et/ou grippe A (H1N1)pdm09 couvertes par les amorces et/ou les

sondes utilisées dans le kit peuvent entraîner une empêcher de détecter la présence des pathogènes.

- Comme pour tout test de diagnostic, les résultats obtenus avec le kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 doivent être interprétés en tenant compte des autres constatations cliniques et résultats de laboratoire.
- Certaines souches rares du virus de la grippe B (p. ex. la souche Lee ou l'une de ses souches réassorties) sont porteuses d'une mutation spécifique, raison pour laquelle elles sont détectées avec une sensibilité légèrement inférieure à celle des souches du virus de la grippe B non porteuses de cette mutation.
- Le typage de la souche de la grippe A/Parana/720/2015 (H1N2v) correspondra à celui de la grippe A H1N1_{nv}, dans la mesure où ces souches contiennent la même séquence génétique cible de la matrice.

13. Contrôle qualité

Conformément au système de gestion de la qualité de Altona Diagnostics GmbH certifié NF EN ISO 13485, chaque lot du kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 est testé sur la base de spécifications prédéterminées afin d'assurer une qualité constante du produit.

14. Assistance technique

Pour bénéficier d'un service après-vente, veuillez contacter notre service d'assistance technique aux coordonnées suivantes :

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.

16. Marques de commerce et clauses de non-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) ; SmartCycler® (Cepheid) ; Maxwell® (Promega) ; Mx 3005P™ (Stratagene) ; NucliSENS® , easyMag® (bioMérieux) ; Rotor-Gene®, QIAamp®, MinElute®, QIA Symphony® (QIAGEN) ; VERSANT® (Siemens Healthcare).

Les noms déposés, les marques, etc. mentionnés dans ce document, même s'ils ne sont pas expressément désignés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés juridiquement.

Le kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 est un kit de diagnostic au marquage CE conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*.

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

Produit distribué dans certains pays uniquement.

© 2019 altona Diagnostics GmbH; tous droits réservés.

17. Explications des symboles

Symbole	Explication
	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Code du lot
	Couleur du capuchon
	Numéro de catalogue
	Contenu
	Numéro
	Composant
	Code article international
	Consultez le mode d'emploi
	Contenu suffisant pour « n » tests/réactions (rxns)
	Limites de température
	Date de péremption
	Fabricant
	Attention
	Note
	Version

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

