

## **Mode d'emploi**

# **RealStar<sup>®</sup> Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0**

02/2021 FR



# RealStar<sup>®</sup>

## 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



02 2021



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

## Sommaire

<b>1.</b>	<b>Usage prévu</b> .....	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>Composants du kit</b> .....	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>Stockage</b> .....	<b>7</b>
<b>4.</b>	<b>Matériel requis non fourni</b> .....	<b>8</b>
<b>5.</b>	<b>Informations générales</b> .....	<b>9</b>
<b>6.</b>	<b>Description du produit</b> .....	<b>9</b>
6.1	Instruments de PCR en temps réel .....	11
<b>7.</b>	<b>Mises en garde et précautions</b> .....	<b>12</b>
<b>8.</b>	<b>Procédure</b> .....	<b>14</b>
8.1	Préparation du prélèvement.....	14
8.2	Préparation du Master Mix.....	15
8.3	Préparation de la réaction.....	17
<b>9.</b>	<b>Programmation des instruments de PCR en temps réel</b> .....	<b>18</b>
9.1	Paramètres.....	18
9.2	Marqueurs de fluorescence (fluorophores) .....	19
9.3	Profil de température et acquisition du fluorophore .....	19
<b>10.</b>	<b>Analyse des données</b> .....	<b>20</b>
10.1	Validation des tests de diagnostic.....	21
10.1.1	Validité des tests de diagnostic (qualitatif) .....	21
10.1.2	Invalidité des tests de diagnostic (qualitatif).....	21
10.2	Interprétation des résultats.....	22
10.2.1	Analyse qualitative .....	22
<b>11.</b>	<b>Evaluation des performances</b> .....	<b>23</b>

11.1	Sensibilité analytique .....	23
11.2	Spécificité analytique .....	25
11.3	Précision .....	26
<b>12.</b>	<b>Restrictions .....</b>	<b>28</b>
<b>13.</b>	<b>Contrôle qualité .....</b>	<b>29</b>
<b>14.</b>	<b>Assistance technique .....</b>	<b>29</b>
<b>15.</b>	<b>Bibliographie .....</b>	<b>29</b>
<b>16.</b>	<b>Marques de commerce et clauses de non-responsabilité .....</b>	<b>30</b>
<b>17.</b>	<b>Explications des symboles .....</b>	<b>31</b>

## 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	Composant	Nombre de fioles	Volume [µL/fiole]
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

Internal Control (IC) = Contrôle interne

Positive Control = Contrôle positif

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

### 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 (voir 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.*

### REMARQUE



*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<sub>nv</sub>).

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 Cy5 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 dans un seul tube d'essai :

- Transcription inverse de l'ARN cible et Internal Control (contrôle interne) en ADNc
- Amplification par PCR de l'ADNc cible et Internal Control (contrôle interne)
- Détection simultanée des amplicons PCR par des sondes marquées par un fluorophore

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

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

Internal Control (IC) = Contrôle interne

Positive Control = Contrôle positif

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

Master A et Master B contiennent tous les composants (tampon de PCR, transcriptase inverse, polymérase d'ADN, sel de magnésium, amorces et sondes) pour permettre la transcription inverse, l'amplification assistée de la PCR et la détection d'ARN spécifique au grippe A, d'ARN spécifique au grippe B, d'ARN spécifique au grippe A (H1N1)pdm09, et l'Internal Control (contrôle interne) au sein d'une même configuration 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 afin d'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 mode d'emploi avant d'utiliser le produit.*

- Avant la première 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*.
- Les échantillons doivent toujours être traités comme étant infectieux et / ou présentant un danger biologique conformément aux procédures de sécurité de votre 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 est le matériau de départ pour le kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0.

La qualité de l'ARN extrait a un impact considérable sur les performances du système de test dans son intégralité. Il est recommandé de vérifier que le système utilisé pour l'extraction des acides nucléiques est compatible avec la technologie de PCR en temps réel. Les kits et systèmes suivants sont adaptés à 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 systèmes et kits d'extraction des acides nucléiques pourraient également convenir. L'utilisateur doit s'assurer qu'une procédure donnée d'extraction des acides nucléiques est compatible avec le kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0.

En cas d'utilisation d'une procédure de préparation d'échantillon dans une colonne d'élution comprenant des tampons de lavage contenant de l'éthanol, il est fortement recommandé d'effectuer une étape de centrifugation supplémentaire pendant 10 minutes à environ 17 000 x g (~ 13 000 tr/min) à l'aide d'un nouveau tube de collecte avant l'élution des acides nucléiques.

**ATTENTION**



*Si votre système de préparation de l'échantillon utilise des tampons de lavage contenant de l'éthanol, veillez à éliminer toute trace d'éthanol avant l'éluion de l'acide nucléique. L'éthanol est un puissant inhibiteur de la PCR en temps réel.*

**ATTENTION**



*L'utilisation d'ARN porteur (carrier) est cruciale pour l'efficacité de l'extraction et la stabilité de l'acide nucléique extrait.*

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 Master Mix

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 Master Mix 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
<b>Volume de Master Mix</b>	<b>21 µL</b>	<b>252 µL</b>

- ▶ 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 / le système utilisé pour l'extraction de l'acide nucléique, l'IC **ne doit pas** être ajouté directement à l'échantillon. L'IC doit toujours être ajouté au mélange échantillon / Lysis Buffer (tampon de lyse). Le volume de l'IC qui doit être ajouté dépend toujours et uniquement du volume d'élution. Il représente 10 % du volume d'élution. Par exemple, si l'acide nucléique doit être élué dans 60 µL d'élution Buffer (tampon d'élution), 6 µL d'IC par échantillon doivent être ajoutés au mélange échantillon / Lysis Buffer (tampon de lyse).
- ▶ Si le contrôle interne a été ajouté pendant la phase de préparation de l'échantillon, le Master Mix 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
<b>Volume de Master Mix</b>	<b>20 µL</b>	<b>240 µL</b>

**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**

- ▶ Verser 20 µL du Master Mix dans chaque puits d'un plateau de réaction optique à 96 puits approprié ou d'un tube de réaction optique approprié à l'aide d'une pipette.
- ▶ 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	
Master Mix	20 µL
Echantillon ou contrôle	10 µL
<b>Volume total</b>	<b>30 µL</b>

- ▶ S'assurer qu'au moins un contrôle positif et au moins un contrôle négatif sont utilisés par Master Mix et par essai.
- ▶ Homogénéiser avec soin les échantillons et les contrôles avec le Master Mix 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)
ARN spécifique au grippe A	grippe A	FAM™	(Aucun)
ARN spécifique au grippe B	grippe B	Cy5	(Aucun)
ARN spécifique au grippe A (H1N1)pdm09	grippe A (H1N1)pdm09	ROX™	(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 :

	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 :

ID du contrôle	Canal de détection			
	FAM™	Cy5	ROX™	JOE™
Positive Control (contrôle positif) [grippe A, grippe B et grippe A (H1N1)pdm09]	+	+	+	+/-*
Negative Control (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™	Cy5	ROX™	JOE™	
+	+	+	+*	ARN spécifique au grippe A, au grippe B et au grippe A (H1N1)pdm09 détecté.
+	-	-	+*	ARN spécifique au grippe A détecté.
-	+	-	+*	ARN spécifique au grippe B détecté.
-	-	+	+	ARN spécifique au grippe A (H1N1)pdm09 détecté. <sup>1</sup>
+	-	+	+*	ARN spécifique au grippe A (H1N1)pdm09 détecté. <sup>1,2</sup>
-	-	-	+	ARN spécifique au grippe A, au grippe B ou au grippe A (H1N1)pdm09 non détecté. L'échantillon ne contient pas de quantités détectables d'ARN spécifique au grippe A, grippe B et grippe A (H1N1)pdm09.
-	-	-	-	Inhibition de la RT-PCR ou défaillance des réactifs. Répétez le test à partir de l'échantillon de départ ou prélevez et testez 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™, Cy5 ou ROX™. Une charge cible élevée d'ARN dans l'échantillon peut entraîner une réduction ou une absence du signal du contrôle interne.

<sup>1</sup> En raison de la sensibilité différente des systèmes de détection pour la cible grippe A (FAM™) et la cible grippe A (H1N1)pdm09 (ROX™), dans de rares cas, des échantillons positifs faibles peuvent présenter un signal dans le canal ROX™ mais pas dans le canal FAM™.

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

## 11. Evaluation des performances

L'évaluation des performances du kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 ont été évaluées à l'aide de l'ARN quantifiée du virus de la grippe A (H1N1)pdm09 (souche A/NY/02/2009), de l'ARN du virus de la grippe A H3N2 (souche Wisconsin/67/05) et de l'ARN du virus de la grippe B (souche Florida/04/06).

### 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:** Résultats de RT-PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique concernant la détection de l'ARN spécifique au grippe A

Conc. d'entrée [copies/μL]	Nombre de répliquats	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:** Résultats de RT-PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique concernant la détection de l'ARN spécifique au grippe B

Conc. d'entrée [copies/μL]	Nombre de répliquats	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:** Résultats de RT-PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique concernant la détection de l'ARN spécifique au grippe A (H1N1)pdm09

Conc. d'entrée [copies/μL]	Nombre de répliquats	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 une analyse probit :

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

### 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'ARN / ADN génomiques extraits de pathogènes susceptibles d'être présents dans la même matrice d'échantillon ou de provoquer 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

La précision du kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 a été déterminée selon sa variabilité intra-essai (variabilité au sein d'une même expérience), sa variabilité inter-essai (variabilité entre différentes expériences) et sa variabilité inter-lot (variabilité entre différents lots de production). La variabilité totale a été déterminée en combinant ces 3 analyses.

Les données de variabilité sont exprimées par l'écart-type et le coefficient de variation en fonction du cycle seuil ( $C_t$ ) - valeurs. Au moins **six** répliqués par échantillon ont été analysés pour la variabilité intra-essai, l'inter-essai et la variabilité inter-lots.

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

grippe A, grippe B et grippe A (H1N1)pdm09		Cycle seuil moyen (C <sub>t</sub> )	Écart-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)	Cycle seuil moyen (C <sub>t</sub> )	Écart-type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	29,15	0,06	0,19
Variabilité inter-essai	29,09	0,08	0,28
Variabilité intra-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 réservée au personnel ayant reçu des instructions et une formation spécifiques en techniques de PCR en temps réel et en procédures de diagnostic *in vitro*.
- Le respect des bonnes pratiques de laboratoire est essentiel au bon fonctionnement de cet essai. 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.
- Cet essai ne doit pas être utilisé directement sur l'échantillon. Des méthodes appropriées d'extraction des acides nucléiques doivent être appliquées avant d'utiliser cet essai.
- La présence d'inhibiteurs de la RT-PCR (p. ex. l'héparine) peut donner une des résultats faussement négatifs ou non valides.
- Les mutations potentielles dans les régions cibles du génome du grippe A, du grippe B et / ou du grippe A (H1N1)pdm09 couvertes par les amorces et / ou les sondes utilisées dans le kit peuvent 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 porcine, comme l'influenza A/Parana/720/2015 (H1N2v) et l'influenza A G4 EA H1N1, qui contiennent la même séquence cible sur la matrice que l'influenza A (H1N1)pdm09, seront caractérisées comme influenza A (H1N1)pdm09.

### 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. 10e édition. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases. 3e édition. Mosby, 2010.

## 16. Marques de commerce et clauses de non-responsabilité

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

Tous les noms, marques commerciales, etc. utilisés dans le présent document ne doivent pas être considérés comme n'étant pas protégés par la loi, même s'ils ne sont pas indiqués spécifiquement en tant que tels.

Le RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 est un kit diagnostic doté du marquage CE conforme à la directive européenne 98/79/CE relative aux diagnostics *in vitro*.

Ce produit n'est pas homologué par Santé Canada et n'a pas été approuvé par la FDA.

Ce produit n'est pas disponible dans tous les pays.

© 2021 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 bouchon
	Numéro de catalogue
	Contenu
	Numéro
	Composant
	Code article international
	Consulter le mode d'emploi
	Contenu suffisant pour « n » tests/réactions (rxns)
	Limite de température
	Date de péremption
	Fabricant
	Attention
	Remarque
	Version

**Remarques :**

**Remarques :**

**Remarques :**



**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](mailto:info@altona-diagnostics.com)

[www.altona-diagnostics.com](http://www.altona-diagnostics.com)

