

Mode d'emploi

RealStar[®]

Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0

03/2019 FR

RealStar®

Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0

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)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

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)



642013



2 x 48



03 2019



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

Sommaire

1.	Usage prévu.....	6
2.	Composants du kit.....	6
3.	Stockage	7
4.	Matériel requis non fourni	7
5.	Informations générales.....	8
6.	Description du produit.....	11
6.1	Instruments de PCR en temps réel	13
7.	Mises en garde et précautions.....	13
8.	Procédure	15
8.1	Préparation du prélèvement.....	15
8.2	Préparation du Mastermix	16
8.3	Préparation de la réaction	18
9.	Programmation des instruments de PCR en temps réel.....	19
9.1	Paramètres.....	19
9.2	Marqueurs de fluorescence (fluorophores)	19
9.3	Profil de température et acquisition du fluorophore	20
10.	Analyse des données	20
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
11.	Evaluation des performances	23

11.1	Sensibilité analytique	23
11.2	Spécificité analytique	24
11.3	Précision	26
12.	Restrictions	27
13.	Contrôle qualité	29
14.	Assistance technique	29
15.	Bibliographie	29
16.	Marques de commerce et clauses de non-responsabilité	30
17.	Explications des symboles	31

1. Usage prévu

Le kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 est un test de diagnostic *in vitro*, basé sur la technologie de PCR en temps réel, pour la détection qualitative de l'ARN spécifique du virus de Lassa (LASV) gène GPC dans le plasma humain en présence d'EDTA utilisé comme aide au diagnostic chez les individus présentant des signes et symptômes d'infection au virus de Lassa conjointement à des facteurs de risque épidémiologique.

Le kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 est conçu pour être utilisé par du personnel qualifié dans des laboratoires disposant de l'équipement approprié, conformément aux directives sur la biosécurité en laboratoire.

2. Composants du kit

Le kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 contient 2 tests RT-PCR différents permettant 48 réactions chacun. Il comprend deux Positive Controls (contrôles positifs) différents : un pour le système de détection et le système d'amplification spécifique du gène GPC et un pour la détection et l'amplification spécifique du gène L.

Couleur du bouchon	Composants	Nombre de tubes	Volume [μ L/tube]
Bleu	Master A GPC Gene	4	60
Violet	Master B GPC Gene	4	180
Bleu clair	Master A L Gene	4	60
Violet clair	Master B L Gene	4	180
Vert	Internal Control	1	1000
Rouge	Positive Control GPC Gene	1	250
Orange	Positive Control L Gene	1	250
Blanc	Water (PCR grade)	1	500

3. Stockage

- Le kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 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)
- 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

Le virus de Lassa (LASV), qui appartient à la famille des Arenaviridae est un virus enveloppé composé d'un ARN simple brin. Il est endémique en Afrique occidentale, essentiellement au Bénin, en Sierra Leone, en Guinée, au Liberia et au Nigeria (1). L'hôte naturel du LASV est le rat *Mastomys natalensi*, un petit rongeur endémique en Afrique sub-saharienne. Il vit à proximité de l'homme et entre fréquemment dans les maisons à la recherche de nourriture. La transmission du virus se fait par contact direct ou par l'intermédiaire d'un aliment contaminé (2). Une transmission interhumaine est possible au sein de la communauté, ainsi que dans les établissements de soin de santé, via les aérosols, le contact avec les fluides corporels contaminés ou la réutilisation de matériel médical contaminé (3).

Environ 80 % de toutes les infections au LASV restent imperceptibles sur le plan clinique, 1 % des infections entraîne la mort (3). Le virus LASV peut provoquer la fièvre hémorragique de Lassa (FHL) avec des taux de mortalité élevés, atteignant 15 à 20 % chez les patients hospitalisés (4). Les taux de mortalité chez la femme enceinte sont encore plus élevés, en particulier au cours du troisième trimestre de grossesse (5). La FHL est associée aux infections nosocomiales.

Aucun vaccin contre le virus LASV n'est encore disponible. Pour le traitement de la FHL, la ribavirine, un médicament antiviral est administrée par voie parentérale. Son efficacité est avérée si le traitement est entamé dans les six jours suivant

l'apparition des symptômes, mais diminue rapidement si l'administration est retardée (6). Les traitements adjuvants comprennent l'oxygénation, le traitement des infections secondaires, un équilibre hydrique et électrolytique approprié, et des transfusions si nécessaire.

Le virus LASV peut être détecté rapidement après l'infection (7) et au cours de la maladie, tandis que les tests sérologiques ne parviennent pas à détecter le virus avant l'apparition des symptômes (8). La détection de l'ARN virale au moyen du test RT-PCR conventionnel par détection par gel constitue actuellement la méthode de référence pour le diagnostic de la FHL. La culture cellulaire exige un confinement de niveau BSL-4 et ne peut par conséquent être réalisée que dans des laboratoires hautement spécialisés (8). Plusieurs dosages immuno-enzymatiques (ELISA) sont disponibles, bien que les méthodes sérologiques ne soient pas utiles pour identifier les cas graves de FHL. En outre, les patients atteints d'une FHL sévère ne développent pas systématiquement d'anticorps (8, 9). Les outils de diagnostic moléculaire qui utilisent la technique RT-PCR en temps réel conviennent parfaitement au diagnostic moléculaire des infections virales, car ils sont rapides, sensibles et peuvent être réalisés sur des échantillons inactivés (10, 11). Toutefois, aucun test RT-PCR en temps réel pour la détection du virus LASV n'est encore disponible. L'importante diversité de séquences entre les brins du LASV est problématique pour le développement d'outils de diagnostic moléculaire. Le risque de résultats faux positifs peut être réduit en utilisant plusieurs séquences génomiques comme régions cibles, p. ex. les gènes L et GPC.

- [1] O. Ogbu, E. Ajuluchukwu & C.J. Uneke (2007), Lassa fever in West African sub-region: an overview, *J Vect Borne Dis*, 44(1):1-11.
- [2] Lecompte E, Fichet-Calvet E, Daffis S, Koulémou K, Sylla O, Kourouma F, Doré A, Soropogui B, Aniskin V, Allali B, Kouassi Kan S, Lalis A, Koivogui L, Günther S, Denys C, Jan ter Meulen J. (2006), *Mastomys natalensis* and Lassa fever, West Africa, *Emerg Infect Dis*, 12(12):1971-4.
- [3] Edward H. Stephenson Dr., Edgar W. Larson, Joseph W. Dominik (1984), Effect of environmental factors on aerosol-induced infection, *J Med Virol*, 14(4):295-303.

- [4] McCormick, J. B., P. A. Webb, J. W. Krebs, K. M. Johnson, and E. S. Smith (1987), A prospective study of the epidemiology and ecology of Lassa fever. *J. Infect. Dis.* 155:437-444.
- [5] Price ME, Fisher-Hoch SP, Craven RB, McCormick JB (1988), A prospective study of maternal and fetal outcome in acute Lassa fever infection during pregnancy. *BMJ* 297:584 –587.
- [6] McCormick JB, Walker DH, King IJ, Webb PA, Elliott LH, Whitfield SG, Johnson KM (1986), Lassa virus hepatitis: a study of fatal Lassa fever in humans. *Am J Trop Med Hyg* 35:401–407.
- [7] Demby AH, Chamberlain J, Brown DW, Clegg CS (1994), Early diagnosis of Lassa fever by reverse transcription-PCR, *J Clin Microbiol*, 32(12):2898-903.
- [8] Bausch DG, Rollin PE, Demby AH, Coulibaly M, Kanu J, Conteh AS, Wagoner KD, McMullan LK, Bowen MD, Peters CJ, Ksiazek TG (2000), Diagnosis and clinical virology of Lassa fever as evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent-antibody test, and virus isolation, *J Clin Microbiol*, 38(7):2670-7.
- [9] Jahrling PB, Niklasson BS, McCormick JB. (1985), Early diagnosis of human Lassa fever by ELISA detection of antigen and antibody. *Lancet* i:250 –252.
- [10] Nikisins S, Rieger T, Patel P, Muller R, Gunther S, Niedrig M. (2015), International external quality assessment study for molecular detection of Lassa virus. *PLoS Negl Trop Dis* 9:e0003793.
- [11] Zheng Pang, Aqian Li, Jiandong Li, Jing Qu, Chengcheng He, Shuo Zhang, Chuan Li, Quanfu Zhang, Mifang Liang, and Dexin Li (2014), Comprehensive Multiplex One-Step Real-Time TaqMan qRT-PCR Assays for Detection and Quantification of Hemorrhagic Fever Viruses, *PLoS One*, 9(4): e95635.

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® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 est un test de diagnostic *in vitro*, basé sur la technologie de PCR en temps réel, pour la détection qualitative de l'ARN spécifique du virus de Lassa (LASV) gène GPC dans le plasma humain en présence d'EDTA utilisé comme aide au diagnostic chez les individus présentant des signes et symptômes d'infection au virus de Lassa conjointement à des facteurs de risque épidémiologique.

Le kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 est conçu pour être utilisé par du personnel qualifié dans des laboratoires disposant de l'équipement approprié, conformément aux directives sur la biosécurité en laboratoire.

Le kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 est composé de deux tests, l'un ciblant le gène GPC et l'autre ciblant le gène L du virus LASV. Les deux tests comprennent un système d'amplification hétérologue [Internal Control (contrôle interne)] afin d'identifier d'éventuelles inhibitions de la PCR et de confirmer l'intégrité des réactifs.

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).

Mastermix pour le gène GPC : La sonde spécifique du gène GPC du virus LASV est marquée par le fluorophore FAM™. La sonde spécifique de l'Internal Control (contrôle interne) est marquée par le fluorophore JOE™.

Mastermix pour le gène L : La sonde spécifique du gène L du virus LASV est marquée par le fluorophore FAM™. La sonde spécifique de l'Internal Control (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 du LASV (le gène GPC cible ou le gène L cible),

ainsi que la détection de l'Internal Control (contrôle interne) dans les canaux correspondants de l'instrument PCR en temps réel.

Le test pour les deux analyses 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® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 est composé de :

- Master A GPC Gene
- Master B GPC Gene
- Master A L Gene
- Master B L Gene
- Internal Control
- Positive Control GPC Gene
- Positive Control L Gene
- 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) pour réaliser la transcription inverse, l'amplification par PCR et la détection de l'ARN spécifique et de l'Internal Control (contrôle interne) en une seule étape de réaction.

Les réactifs Master A et Master B pour le gène GPC contiennent tous les composants nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR et la détection de l'ARN spécifique du gène GPC du virus de Lassa et de l'Internal Control (contrôle interne) en une seule étape de réaction.

Les réactifs Master A et Master B pour le gène L contiennent tous les composants nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR et la détection de l'ARN spécifique du gène L du virus de Lassa et de l'Internal Control (contrôle interne) en une seule étape de réaction.

6.1 Instruments de PCR en temps réel

Le kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 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)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- 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)

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.

- Échantillons cliniques Manipuler les comme s'ils étaient infectieux et/ou dangereux, en accord avec les procédures de sécurité en vigueur dans le laboratoire. Se référer à la ligne directrice des CDC "Interim Guidance for Managing Patients with Suspected Viral Haemorrhagic Fever in U.S. Hospitals" (Lignes directrices du CDC, Interim Guidance for Managing Patients with Suspected Viral Haemorrhagic Fever in U.S. Hospitals, mai 2005. https://www.cdc.gov/hai/pdfs/bbp/vhfinterimguidance05_19_05.pdf).
- 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.

- Éliminer les échantillons et les déchets de l'essai conformément aux règles de sécurité locales. Se référer également aux lignes directrices des CDC, Interim Guidance for Managing Patients with Suspected Viral Haemorrhagic Fever in U.S. Hospitals, mai 2005. https://www.cdc.gov/hai/pdfs/bbp/vhfinterimguidance05_19_05.pdf.

8. Procédure

8.1 Préparation du prélèvement

Le type d'échantillon suivant est validé pour une utilisation avec le kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 :

- Plasma humain en présence d'EDTA.

Pour connaître les lignes directrices relatives au traitement des échantillons, référez-vous aux « National Guidelines on Prevention and Control of Viral Haemorrhagic Fevers » (National Guidelines on Prevention and Control of Viral Haemorrhagic Fevers, Nigeria Centre for Disease Control (NCDC), avril 2017. https://ncdc.gov.ng/themes/common/docs/protocols/18_1501495944.pdf).

L'ARN extrait constitue le matériel de départ pour le kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0.

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)
- 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® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 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® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 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 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 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® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 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	Mastermix	Nom de marqueur	Fluorophore (Reporter)	Désactivateur (Quencher)
ARN spécifique du LASV gène GPC	Gène GPC	LASV	FAM™	(aucun)
ARN spécifique du LASV gène L	Gène L	LASV	FAM™	(aucun)
Internal Control (contrôle interne)	Gène GPC et gène L	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® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 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™	JOE™
Positive Control (contrôle positif) (gène GPC)	+	+/-*
Positive Control (contrôle positif) (gène L)	+	+/-*
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		Canal de détection		Interprétation des résultats
Test spécifique du gène GPC		Test spécifique du gène L		
FAM™	JOE™	FAM™	JOE™	
+	+*	+**	+*	ARN spécifique du LASV détecté.
+	+*	-	+/- ^{***}	ARN spécifique du LASV détecté.
-	+/- ^{***}	+**	+*	ARN spécifique du LASV détecté.
-	+	-	+	Aucun ARN spécifique du LASV détecté. L'échantillon ne contient pas de quantités détectables d'ARN spécifique du LASV.
-	+	-	-	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.
-	-	-	+	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.
-	-	-	-	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 de l'Internal Control (contrôle interne) dans le JOE™ canal de détection n'est pas requise pour les résultats positifs dans le FAM™. De fortes charges en ARN spécifique du LASV dans l'échantillon peuvent conduire à des signaux absents ou très faibles pour l'Internal Control (contrôle interne).

** Les échantillons obtenant des résultats très positifs pour le LCMV (virus de la chorioméningite lymphocytaire) peuvent être testés faux positifs pour l'ARN spécifique du gène L du LASV.

*** Si un signal est observé dans le canal de détection FAM™ pour un des deux tests (gène GPC ou gène L), l'échantillon peut être considéré comme positif à l'ARN du LASV. Un tel résultat n'est pas pertinent si le test qui ne montre aucun signal dans le canal de détection FAM™ montre ou non un signal dans le canal JOE™ (IC).

11. Evaluation des performances

Les performances du kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 ont été évaluées en utilisant un transcrit *in vitro* spécifique du gène L et du gène GPC, respectivement.

11.1 Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 est définie comme étant la concentration (copies/μl d'éluat) de molécules d'ARN spécifique du LASV gène GPC qui peuvent être détectées avec un taux supérieur à 95 %. La sensibilité analytique a été déterminée par analyse d'une série de dilutions de transcrits *in vitro* spécifiques du gène L et du gène GPC du virus de Lassa.

Tableau 1: Résultats RT-PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique concernant la détection de l'ARN spécifique du LASV gène L

Conc. d'entrée [copies/μl]	Nombre de répétitions	Nombre de positifs	Taux de réussite [%]
31,620	24	24	100
10,000	24	24	100
3,162	23	23	100
1,000	24	22	91,67
0,316	24	9	37,5
0,032	48	4	8,33
0,010	48	3	6,25
0,003	48	1	2,08

Tableau 2: Résultats RT-PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique concernant la détection de l'ARN spécifique du LASV gène GPC

Conc. d'entrée [copies/μl]	Nombre de répétitions	Nombre de positifs	Taux de réussite [%]
31,620	24	24	100
10,000	24	24	100
3,162	24	24	100
1,000	24	24	100
0,316	24	13	54,17
0,100	24	5	20,83
0,032	24	1	4,17
0,010	24	0	0
0,003	24	0	0

La sensibilité analytique du kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 a été déterminée par analyse Probit :

- Pour la détection de l'ARN spécifique du gène L, la sensibilité analytique est 3,14 copies/μl [95 % d'intervalle de confiance (CI) : 1,67 - 7,60 copies/μl]
- Pour la détection de l'ARN spécifique du gène GPC, la sensibilité analytique est 1,00 copies/μl [95 % d'intervalle de confiance (CI) : 0,64 - 2,12 copies/μl]

11.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 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 LASV gène GPC seront détectés.

La spécificité analytique du kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 a été évaluée

en testant un panel d'ARN/ADN génomique extrait de différents pathogènes liés au virus de Lassa, des pathogènes susceptibles d'être présents dans la même matrice d'échantillon ou des pathogènes susceptibles de causer des symptômes similaires à ceux d'une infection par le virus de Lassa.

Le kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 ne présente pas de réactivité croisée avec les pathogènes suivants :

- Virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo
- Virus Chikungunya
- Virus de la dengue 1
- Virus de la dengue 2
- Virus de la dengue 3
- Virus de la dengue 4
- Virus Ebola
- Virus de l'hépatite A
- Virus de l'hépatite B
- Virus de l'hépatite C
- Virus de l'immunodéficience humaine de type 1
- Virus de Marburg
- Virus de la fièvre de la Vallée du Rift
- Virus du Nil occidental
- Virus de la fièvre jaune
- Virus Zika
- *Plasmodium falciparum*

La spécificité analytique concernant la réactivité du kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 a été évaluée en testant un panel d'ARN génomique extraits de différentes lignées du virus de Lassa (brins).

Le kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 est capable de détecter l'ARN des lignées suivantes testées pour différents brins :

- Lignée II (Nig08-04 ; Nig08-A37)
- Lignée III (Nig08-A18 ; Nig-CSF ; Nig-SL-NL)
- Lignée IV (Lib05-4094 ; BA366; Josiah)
- Lignée V (AV)

11.3 Précision

Les données de précision du kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 ont été déterminées pour le test spécifique du gène GPC et du gène L comme étant la variabilité intra-essai (variabilité au sein d'une expérience), la variabilité inter-essai (variabilité entre différentes expériences) et la variabilité inter-lot (variabilité entre différents lots de production). La variabilité totale a été calculée en combinant les trois analyses.

La variabilité des données est exprimée en termes 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, l'inter-essai et la variabilité inter-lots.

Tableau 3: Données de précision pour l'ARN spécifique du LASV gène L

LASV gène L	Valeurs C_t moyennes	Ecart type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	31,51	0,16	0,51
Variabilité inter-essai	30,98	0,16	0,53
Variabilité inter-lot	31,32	0,24	0,76
Variabilité totale	31,16	0,30	0,97

Tableau 4: Données de précision pour la détection de l'ARN spécifique du LASV gène GPC

LASV gène GPC	Valeurs C_t moyennes	Ecart type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	31,65	0,22	0,70
Variabilité inter-essai	32,14	0,18	0,57
Variabilité inter-lot	31,96	0,37	1,16
Variance totale	31,98	0,31	0,96

Tableau 5: Données de précision pour la détection de l'Internal Control (contrôle interne) à l'aide du réactif Mastermix pour le gène L.

Internal Control (contrôle interne)	Valeurs C _t moyennes	Ecart type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	32,46	0,16	0,50
Variabilité inter-essai	32,24	0,27	0,83
Variabilité inter-lot	32,51	0,13	0,41
Variabilité totale	32,34	0,27	0,83

Tableau 6: Données de précision pour la détection de l'Internal Control (contrôle interne) à l'aide du réactif Mastermix pour le gène GPC.

Internal Control (contrôle interne)	Valeurs Ct moyennes	Ecart type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	30,72	0,22	0,71
Variabilité inter-essai	30,67	0,17	0,55
Variabilité inter-lot	30,65	0,17	0,54
Variance totale	30,68	0,18	0,59

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 appropriées de prélèvement, de transport, de stockage et de traitement des échantillons doivent être respectées pour un fonctionnement optimal de ce test. Se référer aux « Lignes directrices provisoires de l’OMS (Lignes directrices provisoires, Organisation mondiale de la Santé, 2014, <https://www.who.int/emergencies/diseases/lassa-fever/collection-of-blood-samples-for-lassa.pdf?ua=1>) et aux « National Guidelines on Prevention and Control of Viral Haemorrhagic Fevers » (Nigeria Centre for Disease Control [NCDC], avril 2017. https://ncdc.gov.ng/themes/common/docs/protocols/18_1501495944.pdf).
- Ce test ne doit pas être utilisé directement sur les échantillons. Les méthodes appropriées d’extraction d’acides nucléiques doivent être appliquées avant d’utiliser ce test.
- La présence d’inhibiteurs de la RT-PCR (p. ex. l’héparine) peut donner des résultats faussement négatifs ou non valides.
- Les mutations potentielles dans les régions cibles du génome du LASV gène GPC 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® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 doivent être interprétés en tenant compte des autres constatations cliniques et résultats de laboratoire.

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® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 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®, QIASymphony® (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® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 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

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

