

Mode d'emploi

RealStar[®] PIV RT-PCR Kit 2.0

11/2019 FR

RealStar[®]

PIV 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)
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)



262013



96



11 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.....	9
6.	Description du produit.....	10
6.1	Instruments de PCR en temps réel	12
6.2	Types d'échantillons	12
7.	Mises en garde et précautions.....	13
8.	Procédure	14
8.1	Préparation du prélèvement.....	14
8.2	Préparation du Mastermix.....	16
8.3	Préparation de la réaction.....	17
9.	Programmation des instruments de PCR en temps réel.....	18
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	Test de diagnostic valide	21
10.1.2	Test de diagnostic non valide	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	26
11.3	Précision	28
11.4	Évaluation du diagnostic	31
12.	Restrictions	32
13.	Contrôle qualité	34
14.	Assistance technique	34
15.	Bibliographie	34
16.	Marques de commerce et clauses de non-responsabilité	35
17.	Explications des symboles	36

1. Usage prévu

Le kit RealStar® PIV 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 au virus Parainfluenza des espèces 1, 2, 3 et 4 (PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4). En outre, le test permet de différencier l'ARN spécifique entre le genre *Respirovirus* (PIV-1 et PIV-3) et le genre *Rubulavirus* (PIV-2 et PIV-4).

2. Composants du kit

Couleur du bouchon	Composants	Nombre de tubes	Volume [μ L/tube]
Bleu	Master A	8	60
Violet	Master B	8	180
Vert	Internal Control	1	1000
Rouge	Positive Control PIV-1 + PIV-2	1	250
Orange	Positive Control PIV-3 + PIV-4	1	250
Blanc	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control = Contrôle interne

Positive Control = Contrôle positif

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

3. Stockage

- Le kit RealStar® PIV 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 (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)
- 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

Les virus parainfluenza (PIV) humains sont des virus à ARN monocaténaire à polarité négative de la famille des *Paramyxoviridae*. Les HPIV sont divisés en quatre espèces appartenant à deux genres différents : Le PIV-1 et le PIV-3 sont affectés au genre *Respirovirus*, tandis que le PIV-2 et le PIV-4 sont affectés au genre *Rubulavirus*. Deux sous-espèces ont été décrites pour le PIV-4 (PIV-4a et PIV-4b) peu après l'identification du virus en 1959. Aujourd'hui, l'existence de génotypes variés a été reportée pour toutes les espèces de PIV.

Les infections au PIV sont la deuxième cause la plus courante des infections aiguës des voies respiratoires inférieures (IVRI) chez les jeunes enfants, juste derrière le *virus respiratoire syncytial humain* (VRS). Des études sérologiques ont révélé que 90 % à 100 % des enfants âgés de 5 ans et plus possédaient des anticorps contre le PIV-3, et qu'environ 75 % possédaient des anticorps contre le PIV-1 et le PIV-2. Les infections aux virus parainfluenza sont également un problème majeur chez les seniors, les personnes souffrant de maladies cardiopulmonaires et les personnes immunovulnérables. Des réinfections répétées surviennent tout au long de la vie mais se manifestent généralement par une infection bénigne des voies respiratoires supérieures (IVRS) chez l'adulte.

En général, les HPIV sont associés à toutes les sortes d'IVRS et d'IVRI. Les relations suivantes entre les espèces et les syndromes cliniques spécifiques, l'âge des patients et la saison épidémique sont souvent observées :

- Le PIV-1 est la principale cause du croup chez les nourrissons et les jeunes enfants, mais il provoque également des infections bénignes des voies respiratoires supérieures, des pharyngites et des trachéobronchites dans toutes les tranches d'âge. Dans les climats tempérés, le PIV-1 provoque des épidémies de croup biennales durant les mois d'automne.
- Le PIV-2 est généralement associé à des taux d'infection inférieurs à ceux du PIV-1 ou du PIV-3 et provoque une IVRS bénigne ainsi que le croup chez les enfants, et occasionnellement une IVRI. Comme avec le PIV-1, les épidémies

ont tendance à survenir principalement pendant les mois d'automne, avec une fréquence annuelle ou biennale.

- Le PIV-3 est une cause majeure d'IVRI aiguë chez les nourrissons et les jeunes enfants, entraînant souvent le croup, une bronchite et une pneumonie chez les enfants de moins de 12 mois. Il peut provoquer des IVRS ou des trachéobronchites chez les enfants plus âgés et les adultes. Les infections du PIV-3 peuvent survenir à n'importe quelle saison, avec un pic d'activité notable au cours des mois de printemps et du début de l'été chaque année.
- Le PIV-4 est le type le moins fréquent et est généralement associé à une IVRS bénigne.

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® PIV 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 au virus Parainfluenza des espèces 1, 2, 3 et 4 (PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4). En outre, le test permet de différencier l'ARN spécifique entre le genre *Respirovirus* (PIV-1 et PIV-3) et le genre *Rubulavirus* (PIV-2 et PIV-4).

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 au PIV-1 et au PIV-3 sont marquées à l'aide de la teinture au fluorophore FAM™, tandis que les sondes spécifiques au PIV-2 et au PIV-4 sont marquées à l'aide de la teinture au fluorophore Cy®5. La sonde spécifique à l'Internal Control (contrôle interne) est marquée à l'aide de la teinture au fluorophore JOE™.

L'utilisation de sondes liées à des teintures différenciables permet la détection en parallèle du PIV-1/3 (genre *Respirovirus*), du PIV-2/4 (genre *Rubulavirus*) et de l'Internal Control (contrôle interne) dans les canaux de détection correspondants de l'instrument de PCR en temps réel.

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

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

Le kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 est constitué de :

- Master A
- Master B
- Internal Control
- Positive Control PIV-1 + PIV-2
- Positive Control PIV-3 + PIV-4
- Water (PCR grade)

Internal Control = 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 PIV-1 -4 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® PIV RT-PCR Kit 2.0 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)

6.2 Types d'échantillons

Le Kit RealStar® PIV RT-PCR 2.0 a été validé pour une utilisation avec le type d'échantillon suivant :

- Prélèvements respiratoires humains collectés dans un MTU (milieu de transport universel).

Le Kit RealStar® PIV RT-PCR 2.0 a été validé pour une utilisation avec le kit AltoStar® Purification 1.5 au sein du système d'automatisation AltoStar® AM16 pour l'extraction et la purification des acides nucléiques.

Si une procédure appropriée d'extraction des acides nucléiques est appliquée, des types d'échantillons supplémentaires peuvent être utilisés avec le kit RealStar® PIV RT-PCR 2.0. L'utilisateur doit s'assurer qu'une procédure d'extraction des acides nucléiques et qu'une utilisation de types d'échantillons supplémentaires sont compatibles avec ce kit.

7. Mises en garde et précautions

Lisez attentivement le mode d'emploi avant d'utiliser ce produit.

- Avant la première utilisation, inspectez le produit et ses composants afin de s'assurer :
 - qu'ils sont en bon état
 - qu'ils sont complets, en considérant le nombre, le type et le remplissage (voir chapitre 2 Composants du kit)
 - qu'ils sont correctement étiquetés
 - qu'ils sont bien congelés à réception
- 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*.
- Les échantillons cliniques doivent toujours être traités comme étant infectieux et / ou présentant un danger biologique conformément aux procédures de sécurité de votre laboratoire.
- Portez des gants de protection jetables et sans poudre, une blouse de laboratoire et une protection oculaire lorsque vous manipulez des échantillons.
- Évitez la contamination microbienne et par nucléase (ADNase / ARNase) des échantillons et des composants du kit.
- Utilisez toujours des pointes de pipettes jetables sans ADNase / ARNase et dotées de barrières d'aérosols.
- Portez toujours des gants de protection jetables et sans poudre lorsque vous manipulez les composants du kit.

- Utilisez des zones de travail séparées et distinctes pour les activités (i) de préparation d'échantillon, (ii) de configuration des réactions et (iii) d'amplification / de détection. Le flux de travail dans le laboratoire doit se dérouler de manière unidirectionnelle. Portez toujours des gants jetables dans chacune des zones de travail et changez-en avant de pénétrer dans une zone différente.
- Réservez des fournitures et de l'équipement distincts pour chaque zone de travail et ne les déplacez pas d'une zone à une autre.
- Conservez le matériel positif et / ou potentiellement positif séparément de tous les autres composants du kit.
- N'ouvrez pas les tubes / plateaux de réaction après amplification afin d'éviter toute contamination par des amplicons.
- Des contrôles supplémentaires peuvent être testés selon les directives ou exigences des réglementations locales, fédérales, d'État et / ou des organismes d'agrément.
- Ne placez pas les tubes de réaction en autoclave après la PCR, car ceci dégraderait l'acide nucléique amplifié, et la zone du laboratoire pourrait être contaminée.
- N'utilisez pas un composant du kit si sa date de péremption est dépassée.
- Jetez les déchets d'échantillon et d'essai conformément aux réglementations de sécurité locales.

8. Procédure

8.1 Préparation du prélèvement

L'ARN extrait est la substance initiale pour le kit RealStar® PIV RT-PCR 2.0.

La qualité de l'ARN extrait a un impact considérable sur l'efficacité du système de test dans son ensemble. Il est impératif 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 généralement adaptés à l'extraction des acides nucléiques :

- Kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- Système d'automatisation AltoStar® AM16
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- Système MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Instrument Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

Le Kit RealStar® PIV RT-PCR 2.0 a été validé pour une utilisation avec le kit AltoStar® Purification 1.5 au sein du système d'automatisation AltoStar® AM16 pour l'extraction et la purification des acides nucléiques.

D'autres systèmes et kits d'extraction des acides nucléiques pourraient également convenir. Toutefois, leur compatibilité avec le kit RealStar® PIV RT-PCR 2.0 doit être validée par l'utilisateur.

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 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® PIV 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 de Master Mix	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 de Master Mix	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

- ▶ 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	
Mastermix	20 µL
Echantillon ou contrôle	10 µL
Volume total	30 µL

- ▶ Assurez-vous que chaque Positive Control (contrôle positif) et au moins un Negative Control (contrôle négatif) sont utilisés par Master Mix et par run.
- ▶ 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® PIV 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	ROX™

9.2 Marqueurs de fluorescence (fluorophores)

- Définir les marqueurs de fluorescence (fluorophores) :

Cible	Nom du détecteur	Rapporteur	Extincteur
ARN spécifique au PIV-1 et au PIV-3	PIV-1/3	FAM™	(Aucun)
ARN spécifique au PIV-2 et au PIV 4a/b	PIV-2/4	Cy®5	(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® PIV 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 Test de diagnostic valide

Un test de diagnostic est considéré comme **valide** si les conditions de contrôle suivantes sont remplies :

ID du contrôle	Canal de détection		
	FAM™	Cy [®] 5	JOE™
Positive Control (contrôle positif) PIV-1 + PIV-2	+	+	+/-*
Positive Control (contrôle positif) PIV-3 + PIV-4	+	+	+/-*
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 Test de diagnostic non valide

Un test de diagnostic est considéré comme **non valide** (i) si le test ne s'est pas terminé ou (ii) si une des conditions de contrôle d'un test de diagnostic **valide** n'est pas remplie.

En cas de test de diagnostic **non valide**, recommencez le test en utilisant le reste des acides nucléiques purifiés, ou recommencez depuis le début avec les échantillons originaux.

10.2 Interprétation des résultats

10.2.1 Analyse qualitative

Canal de détection			Interprétation des résultats
FAM™	Cy®5	JOE™	
+	-	+*	ARN spécifique au PIV-1 et / ou au PIV-3 détecté.
-	+	+*	ARN spécifique au PIV-2 et / ou au PIV-4a/b détecté.
+	+	+*	ARN spécifique au PIV-1 et / ou au PIV-3 <u>et</u> au PIV-2 et / ou au PIV-4a/b détecté.
-	-	+	Aucun ARN spécifique au PIV-1, ni au PIV-2, ni au PIV-3, ni au PIV-4a, ni au PIV-4b détecté. L'échantillon ne contient pas de quantités détectables de ces ARN spécifiques.
-	-	-	Inhibition de la RT-PCR ou défaillance des réactifs. Répétez le test à partir de l'échantillon de départ ou prélevez et analysez un nouvel échantillon.

* La détection de l'Internal Control (contrôle interne) dans le canal de détection JOE™ n'est pas obligatoire pour les résultats positifs dans le canal de détection FAM™ ou le canal de détection Cy®5. Une charge élevée d'ARN PIV dans l'échantillon peut résulter en une réduction ou une absence des signaux de l'Internal Control (contrôle interne).

11. Evaluation des performances

L'évaluation des performances du PIV RT-PCR Kit 2.0 RealStar® a été réalisée à l'aide de matière virale provenant des souches de PIV suivantes : PIV-1 : ATCC® VR-94™ ; PIV-2 : ATCC® VR-92™ ; PIV-3 : ATCC® VR-93™ ; PIV-4a : ATCC® VR-1378™ ; PIV-4b : ATCC® VR-1377™.

11.1 Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 est définie comme la concentration (copies/ml) des molécules d'ARN spécifiques au PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4a ou PIV-4b pouvant être détectée avec un taux de positivité de 95 %. La sensibilité analytique a été déterminée par l'analyse d'une série de dilutions d'espèces du PIV dans un UTM. Les matériaux viraux du PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4a et PIV-4b ont été fournis par l'American Type Culture Collection (ATCC).

Chaque dilution a été testée en 8 réplicats lors de 3 jours différents (n total = 24 par dilution) à l'aide de combinaisons de 3 lots de kits RealStar® PIV RT-PCR 2.0, 3 lots de kits AltoStar® Purification 1.5 et 3 lots d'AltoStar® Internal Control. Les tests ont été effectués à l'aide de 3 systèmes d'automatisation AltoStar® AM16 différents et des instruments du système de détection CFX96™ Deep Well Real-Time PCR.

Les données de l'ensemble des tests ont été combinées et une analyse par la méthode des probits a été réalisée afin de déterminer la valeur de LOD score de 95 %.

Tableau 1: Résultats de RT-PCR utilisés pour calculer la sensibilité analytique concernant la détection de l'ARN spécifique au PIV-1

Conc. entrée [copies/ml]	Nombre de répliquats	Nombre de positifs	Taux de réussite [%]
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	24	100
1,00E+02	24	22	92
3,16E+01	24	12	50
1,00E+01	24	7	29
3,16E+00	24	3	13
1,00E+00	24	1	4

Tableau 2: Résultats de RT-PCR utilisés pour calculer la sensibilité analytique concernant la détection de l'ARN spécifique au PIV-2

Conc. entrée [copies/ml]	Nombre de répliquats	Nombre de positifs	Taux de réussite [%]
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	24	100
1,00E+02	24	23	96
3,16E+01	24	17	71
1,00E+01	24	9	38
3,16E+00	24	5	21
1,00E+00	24	3	13

Tableau 3: Résultats de RT-PCR utilisés pour calculer la sensibilité analytique concernant la détection de l'ARN spécifique au PIV-3

Conc. entrée [copies/ml]	Nombre de répliquats	Nombre de positifs	Taux de réussite [%]
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	24	100
1,00E+02	24	17	71
3,16E+01	24	5	21
1,00E+01	24	1	4
3,16E+00	24	1	4
1,00E+00	24	0	0

Tableau 4: Résultats de RT-PCR utilisés pour calculer la sensibilité analytique concernant la détection de l'ARN spécifique au PIV-4a

Conc. entrée [copies/ml]	Nombre de répliquats	Nombre de positifs	Taux de réussite [%]
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	23	96
1,00E+02	24	14	58
3,16E+01	24	9	38
1,00E+01	24	7	29
3,16E+00	24	0	0
1,00E+00	24	0	0

Tableau 5: Résultats de RT-PCR utilisés pour calculer la sensibilité analytique concernant la détection de l'ARN spécifique au PIV-4b

Conc. entrée [copies/ml]	Nombre de répliquats	Nombre de positifs	Taux de réussite [%]
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	22	92
1,00E+02	24	9	38
3,16E+01	24	3	13
1,00E+01	24	2	8
3,16E+00	24	1	4
1,00E+00	24	0	0

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

- Pour la détection de l'ARN spécifique au PIV-1, la sensibilité analytique est de 203 copies/ml [intervalle de confiance à 95 % (IC) : 114 - 493 copies/ml]
- Pour la détection de l'ARN spécifique au PIV-2, la sensibilité analytique est de 146 copies/ml [intervalle de confiance à 95 % (IC) : 78 - 383 copies/ml]
- Pour la détection de l'ARN spécifique au PIV-3, la sensibilité analytique est de 301 copies/ml [intervalle de confiance à 95 % (IC) : 186 - 656 copies/ml]
- Pour la détection de l'ARN spécifique au PIV-4a, la sensibilité analytique est de 456 copies/ml [intervalle de confiance à 95 % (IC) : 256 - 1 096 copies/ml]
- Pour la détection de l'ARN spécifique au PIV-4b, la sensibilité analytique est de 754 copies/ml [intervalle de confiance à 95 % (IC) : 436 - 1 754 copies/ml]

11.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du kit RealStar® PIV RT-PCR 2.0 est assurée via une sélection rigoureuse des oligonucléotides (amorces et sondes). Les oligonucléotides ont été vérifiés avec une analyse de comparaison de séquence par rapport aux séquences disponibles publiquement afin de veiller à ce que toutes les espèces de PIV pertinentes soient détectées.

La spécificité analytique du PIV RT-PCR Kit 2.0 RealStar® a été évaluée en testant des pathogènes liés au PIV et / ou pouvant provoquer des symptômes similaires à ceux du PIV.

Le PIV RT-PCR Kit 2.0 RealStar® n'a pas montré de réactivité croisée avec les pathogènes suivants :

- Adénovirus humain de type 1
- Adénovirus humain de type 2
- Adénovirus humain de type 3
- Adénovirus humain de type 4
- Virus respiratoire syncytial humain de type A
- Virus respiratoire syncytial humain de type B
- Métapneumovirus humain de type A2
- Métapneumovirus humain de type B2
- Virus de la grippe A
- Virus de la grippe B
- Entérovirus (virus Coxsackie A3)
- Rhinovirus
- Coronavirus humain
- *Bordetella pertussis*
- *Bordetella parapertussis*
- *Chlamydomphila pneumoniae*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Legionella pneumophila*
- *Moraxella catarrhalis*
- *Streptococcus pneumoniae*

Des espèces supplémentaires du PIV 1 à 4 ont été testées. Le kit RealStar® PIV RT-PCR 2.0 n'a généré aucun signal faux positif dans le canal de détection spécifique au PIV-1 et au PIV-3 lors des tests de PIV-2, PIV-4a et / ou PIV-4b. En outre, aucun signal faux positif dans le canal de détection spécifique au PIV-2 et au PIV-4 n'a été observé lors des tests de PIV-1 et / ou de PIV-3.

11.3 Précision

La précision du kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 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 le coefficient de variation en fonction du cycle seuil (C_t) - valeurs. Au moins 6 réplicats par échantillon ont été analysés pour la variabilité intra-essai, l'inter-essai et la variabilité inter-lots.

Tableau 6: Données de précision (% du CV [valeurs C_t]) pour les échantillons de MTU positifs à teneur élevée en PIV-1

	Échantillon positif à teneur élevée en PIV-1 [% du CV basé sur la valeur C_t]
Variabilité intra-essai	0,41 - 2,90
Variabilité inter-essai	1,11 - 1,99
Variabilité inter-lot	1,79
Variabilité totale	1,56

Tous les échantillons testés avec 3x LOD score (échantillons positifs à faible teneur) ont été détectés comme positifs.

Tableau 7: Données de précision (% du CV [valeurs C_i]) pour les échantillons d'UTM positifs à teneur élevée en PIV-2

	Échantillon positif à teneur élevée en PIV-2 [% du CV basé sur la valeur C_i]
Variabilité intra-essai	0,21 - 1,91
Variabilité inter-essai	1,38 - 2,19
Variabilité inter-lot	1,35
Variabilité totale	1,95

Tous les échantillons testés avec 3x LOD score (échantillons positifs à faible teneur) ont été détectés comme positifs.

Tableau 8: Données de précision (% du CV [valeurs C_i]) pour les échantillons de MTU positifs à teneur élevée en PIV-3

	Échantillon positif à teneur élevée en PIV-3 [% du CV basé sur la valeur C_i]
Variabilité intra-essai	0,45 - 4,04
Variabilité inter-essai	1,55 - 2,41
Variabilité inter-lot	2,80
Variabilité totale	2,42

Tous les échantillons testés avec 3x LOD score (échantillons positifs à faible teneur) ont été détectés comme positifs.

Tableau 9: Données de précision (% du CV [valeurs C_t]) pour les échantillons de MTU positifs à teneur élevée en PIV-4a

	Échantillon positif à teneur élevée en PIV-4a [% du CV basé sur la valeur C_t]
Variabilité intra-essai	0,35 - 0,77
Variabilité inter-essai	1,40 - 1,88
Variabilité inter-lot	1,07
Variabilité totale	1,96

Tous les échantillons testés avec 3x LOD score (échantillons positifs à faible teneur) ont été détectés comme positifs.

Tableau 10: Données de précision (% du CV [valeurs C_t]) pour les échantillons de MTU positifs à teneur élevée en PIV-4b

	Échantillon positif à teneur élevée en PIV-4b [% du CV basé sur la valeur C_t]
Variabilité intra-essai	0,63 - 1,50
Variabilité inter-essai	2,09 - 3,07
Variabilité inter-lot	1,35
Variabilité totale	2,42

Tous les échantillons testés avec 3x LOD score (échantillons positifs à faible teneur) ont été détectés comme positifs.

Tableau 11: Données de précision (% du CV [valeurs C_t]) pour la détection de l'Internal Control (contrôle interne) dans des échantillons d'UTM négatifs au PIV

	Internal Control (contrôle interne)
Variabilité intra-essai	0,33 - 0,94
Variabilité inter-essai	0,82 - 2,07
Variabilité inter-lot	0,47
Variabilité totale	1,64

11.4 Évaluation du diagnostic

Le RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 a été évalué lors d'une étude comparative avec le kit RIDA® GENE Parainfluenza (r-biopharm), doté du marquage CE.

Rétrospectivement, 80 écouillons d'échantillons respiratoires ont été testés en parallèle à l'aide du kit RIDA® GENE Parainfluenza (r-biopharm), en combinaison avec le kit MagNA PURE 96 DNA and Viral NA Small Volume (Roche) et le kit MagNA Pure 96 System (Roche), ainsi que le RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 en combinaison avec le kit AltoStar® Purification 1.5 et l'AltoStar® Internal Control 1.5 au sein du système d'automatisation AltoStar® AM16 et du système de détection CFX96™ Deep Well Real-Time PCR. Pour l'analyse qualitative de tous les échantillons, tous les échantillons avec un résultat non valide pour un ou plusieurs essais ont été exclus. Les résultats des 72 échantillons restants sont indiqués dans le Tableau 12.

Tableau 12: Résultats de l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité diagnostiques du PIV RT-PCR Kit 2.0 RealStar® dans les écouvillons respiratoires

		RIDA® GENE Parainfluenza (r-biopharm)	
		POSITIF	NÉGATIF
RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0	POSITIF	32	1
	NÉGATIF	0	39

La sensibilité et la spécificité diagnostiques du RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 par rapport au kit RIDA® GENE Parainfluenza (r-biopharm) étaient respectivement de 100 % et 97,5 %.

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 PIV 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® PIV 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® PIV 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) ; AltoStar® (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).

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 PIV RT-PCR Kit 2.0 RealStar® 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.

© 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

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

www.altona-diagnostics.com

