

IVD

Notice d'utilisation (français)

1 Utilisation prévue

L'ampliCube Respiratory Viral Panel 1 est un test *in vitro* qualitatif pour la détection spécifique de l'ARN de l'influenzavirus A, de l'influenzavirus B et de l'influenzavirus A H1N1 dans des expectorations, frottis, liquides de LBA (lavage bronchoalvéolaire) ou sécrétions trachéales d'origine humaine.

2 Domaine d'application

L'influenzavirus A, l'influenzavirus B et l'influenzavirus A H1N1 sont des agents pathogènes de la grippe saisonnière (influenza) et font partie des Orthomyxoviridae. L'influenzavirus A H1N1 (connu comme l'agent de la «grippe porcine») est un sous-type de l'influenza A. De nombreux autres agents viraux respiratoires tels que les rhinovirus, les VRS, les métagroupevirus humains peuvent provoquer des tableaux cliniques très similaires. En ce qui concerne la sensibilité et la spécificité, le test de biologie moléculaire est considéré comme le gold standard pour identifier l'influenza. L'ampliCube Respiratory Viral Panel 1 permet un diagnostic différentiel fiable.

3 Principe du test

Ce test est un système de RT-PCR Real Time (en temps réel) (RT = transcriptase inverse). Il utilise des amorces spécifiques et des sondes marquées pour la transcription de l'ARN en ADNc, l'amplification et la détection de l'ARN de l'influenzavirus A, de l'influenzavirus B et de l'influenzavirus A H1N1.

Afin de s'assurer que les acides nucléiques isolés de l'échantillon du patient ne contiennent pas de substances inhibant la RT-PCR, un contrôle interne (CI) est ajouté à l'échantillon pendant l'isolement des acides nucléiques. Ce CI est transcrit en ADNc, amplifié et détecté dans la même préparation de RT-PCR. Ceci permet d'exclure les faux négatifs dus à une inhibition de la réaction RT-PCR. Le CI sert en même temps à prouver que les acides nucléiques ont été extraits de l'échantillon du patient.

Les sondes pour la détection spécifique des acides nucléiques spécifiques de l'agent pathogène sont marquées avec les fluorochromes émetteurs (reporter) FAM (influenzavirus A), HEX (influenzavirus B) et ATTO Rho12 (influenzavirus A H1N1), et les sondes pour la détection du contrôle interne le sont avec ATTO 647N. Ceci permet une détection simultanée de toutes les séquences cibles dans un mélange réactionnel.

La valeur Ct (*cycle threshold*) décrit la partie de la courbe où la fluorescence augmente pour la première fois de manière exponentielle au-dessus du bruit de fond.

4 Réactifs

4.1 Contenu de l'emballage

Les réactifs fournis suffisent à effectuer 50 analyses.

Chaque lot de réactifs contient :

P&P MIX	150 µl de mélange amorce-échantillon pour Respiratory Viral Panel 1 et de contrôle interne (couvercle vert)
ENZYME	600 µl de mélange d'enzymes (couvercle blanc) Contient de la transcriptase inverse et de l'ADN-polymérase. (Le composant est coloré en bleu.)
CONTROL INT	250 µl de contrôle interne (couvercle incolore)
CONTROL +	170 µl de contrôle positif (couvercle rouge)
CONTROL -	2 x 1800 µl de contrôle négatif (couvercle bleu)
INSTRU	1 notice d'utilisation

4.2 Réactifs, matériel et appareils supplémentaires requis

- MIKROGEN ampliCube Color Compensation pour Light Cycler® 480 II (Roche)
- Kit d'isolement des acides nucléiques du commerce. Le système d'extraction des acides nucléiques suivant est recommandé: MagNAPure® Compact, Total Nucleic Acid Kit I (Roche)
- Thermocycleur en temps réel. Le thermocycleur suivant est recommandé: Light Cycler® 480 II (Roche)
- Plaques PCR à 96 puits et films ou tubes (PCR-clean), en fonction du thermocycleur
- Micropipettes avec embouts jetables à filtre 10 µl, 20 µl, 100 µl et 1000 µl

- Agitateur Vortex
- Minicentrifugeuse
- Éventuellement centrifugeuse pour plaques
- Gants à usage unique, sans poudre
- Bloc réfrigérant

5 Durée de conservation et manipulation

- Avant et après utilisation, conserver les réactifs entre -25°C et -18°C.
- Une décongélation et une congélation répétée des composants (plus de dix fois) doivent être évitées. Un aliquotage des composants du test est recommandé après la première décongélation.
- Toujours réfrigérer correctement les réactifs pendant les étapes de travail (+2°C – +8°C).
- Protéger tous les composants du kit de la lumière directe du soleil tout au long de la réalisation du test.
- Avant le début du test, décongeler complètement, mélanger (vortexer brièvement) et centrifuger tous les réactifs.
- Une date de péremption est indiquée sur les emballages. Au-delà de cette date, la qualité du produit n'est plus garantie.
- Le test ne doit être réalisé que par des professionnels spécialement formés et agréés.
- En cas de modification substantielle du produit ou de non-respect des consignes par l'utilisateur, l'application peut sortir du cadre d'utilisation prévue de MIKROGEN.
- Une contamination croisée peut fausser les résultats des tests. Ajouter avec précaution les échantillons du patient et les contrôles. Veiller à ce que les mélanges réactionnels ne se répandent pas dans d'autres puits.

6 Avertissements et consignes de sécurité

- À utiliser uniquement pour le diagnostic *in vitro*.
- Tous les échantillons des patients sont potentiellement infectieux et doivent être manipulés comme tels.
- Porter des gants à usage unique appropriés durant toute la procédure de test.
- Tous les réactifs et matériels entrant en contact avec des échantillons potentiellement infectieux doivent être traités avec des désinfectants appropriés ou éliminés conformément aux règles d'hygiène en vigueur. Les indications de concentration et les durées d'incubation du fabricant doivent être respectées.
- Ne jamais remplacer les réactifs ni les mélanger avec des réactifs d'autres lots, d'autres kits de PCR MIKROGEN ou avec des réactifs d'autres fabricants.
- Avant de réaliser le test, lire l'intégralité de la notice d'utilisation et suivre scrupuleusement les instructions. Les écarts au protocole de test décrit dans la notice d'utilisation peuvent fausser les résultats.

7 Prélèvement d'échantillons et préparation des réactifs

7.1 Échantillons

Le produit de départ pour l'ampliCube Respiratory Viral Panel 1 est l'ARN extrait d'expectorations, de frottis, de liquide de LBA ou de sécrétions trachéales d'origine humaine. La qualité de la préparation d'acides nucléiques influence le résultat du test. Il faut s'assurer que la méthode d'extraction choisie est compatible avec la technologie PCR en temps réel.

7.2 Extraction des acides nucléiques

Procédez à l'extraction des acides nucléiques de l'échantillon du patient et du contrôle négatif (CN). Nous recommandons un volume d'extraction initial de 200 µl et un volume d'élution de 50 µl. Des extractions de 400 µl de produit de départ élué dans 100 µl ont montré des résultats comparables. Suivez les instructions du fabricant du kit d'extraction.

- Décongeler le contrôle interne (CI) (couvercle incolore) et le contrôle négatif (CN) (couvercle bleu).
Assurez-vous que le CI et le CN sont complètement décongelés. Avant l'emploi, mélangez brièvement le CI et le CN au vortex et par centrifugation!

- Lors de l'extraction, ajouter 5 µl de CI (rapportés à 50 µl d'éluat) à chaque échantillon du patient et au CN. Le CI doit être ajouté au mélange tampon de lyse de l'échantillon et non directement aux échantillons. (Remarque: le CI ne peut pas être utilisé sans extraction dans la PCR!)
- Procédez à l'extraction des échantillons du patient et du CN. (Remarque: le CN ne peut pas être utilisé sans extraction dans la PCR!)
- Le contrôle positif n'est pas extrait.

Le système d'extraction des acides nucléiques suivant est recommandé et a été utilisé pour l'évaluation de la performance:

Système d'extraction	Volume d'échantillon	Volume d'éluat
MagNAPure Compact (Roche) Total Nucleic Acid Kit I	200 µl	50 µl

Si vous désirez utiliser d'autres méthodes d'extraction, veuillez contacter le fabricant afin de vous assurer de la compatibilité.

7.3 Préparation du mastermix

- Décongeler le mélange amorce-échantillon (couvercle vert) et le mélange d'enzymes (couvercle blanc), en protégeant les réactifs de la lumière.

Assurez-vous que les réactifs sont complètement décongelés. Avant l'emploi, mélangez les réactifs au vortex et centrifugez brièvement!

- Préparez le mastermix selon le schéma de pipetage suivant:

Composants	Mastermix pour 1 réaction
Mélange amorce-échantillon	3 µl
Mélange d'enzymes	12 µl
Volume total	15 µl

- Mélangez le mastermix complet au vortex et centrifugez brièvement.
- Utilisez 15 µl de mastermix pour chaque réaction de PCR.

7.4 Préparation de la réaction de PCR

- Décongelez le contrôle positif (CP) (couvercle rouge).
Assurez-vous que les réactifs sont complètement décongelés. Avant l'emploi, mélangez au vortex les réactifs et centrifugez brièvement!

Composants	1 réaction
Mastermix de 7.3	15 µl
Éluat d'échantillon ou éluat de CN ou de CP	10 µl

- Pipetez 10 µl de chaque éluat d'échantillon dans le mastermix.
- Pipetez 10 µl de contrôle positif (non préparé) dans le mastermix.
- Pipetez 10 µl d'éluat du contrôle négatif dans le mastermix.

Chaque test doit contenir un contrôle positif et un contrôle négatif! Fermez la plaque PCR avec un film adhésif optique ou fermez le tube avec le couvercle prévu.



Les plaques PCR ou les tubes doivent être passés au vortex pendant au moins 10 secondes à vitesse maximale, puis centrifugés brièvement.

8 Programmation du thermocycleur en temps réel

L'ampliCube Respiratory Viral Panel 1 a été évalué avec LightCycler® 480 Instrument II (Roche).

8.1 Réglage des canaux de détection

	Influenzavirus A	Influenzavirus B	Influenzavirus A H1N1	Contrôle interne (CI)
Fluorochrome émetteur	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Couleur	vert	jaune	orange	rouge
Émission	510 nm	580 nm	610 nm	660 nm
Fluorochrome suppresseur	[aucun]	[aucun]	[aucun]	[aucun]

Les indications concernant les longueurs d'ondes des canaux de détection se rapportent au LightCycler® 480 II. Avec le LightCycler® 480 II, il est nécessaire d'exécuter auparavant une compensation de couleur avec le kit mis à disposition par Mikrogen.

8.2 Programme PCR

Transcription inverse	50°C	8 min.
Dénaturation	95°C	3 min.
Amplification	45 cycles	
• Dénaturation	95°C	10 sec.
• Hybridation/Élongation	60°C	45 sec.

Vous trouverez les informations de base sur la programmation des différents thermocycleurs en temps réel dans le mode d'emploi du thermocycleur utilisé. Pour les informations spéciales sur la programmation du thermocycleur PCR en temps réel lors de l'utilisation de l'ampliCube Respiratory Viral Panel 1, veuillez contacter le fabricant.

9 Résultats

L'évaluation des données sur le LightCycler® 480 II se fait avec la méthode *Abs Quant/2nd Derivative Max*.

9.1 Validation

- Le contrôle négatif doit se situer en dessous du *Threshold*. Le test n'est pas évaluable en cas de contamination de ce contrôle (courbe positive).
- Le contrôle négatif doit présenter une courbe positive. La valeur Ct du contrôle positif doit être < 33. Un contrôle positif en dehors de cette zone indique l'existence d'un problème d'amplification.
- Le contrôle interne doit présenter une courbe positive pour les échantillons négatifs et dans le contrôle négatif. Un écart à la courbe du CI dans un échantillon négatif par rapport au contrôle négatif indique l'existence d'un problème d'extraction ou d'inhibition de la RT-PCR.

9.2 Évaluation

Les signaux supérieurs au *Threshold* sont évalués comme des résultats positifs. Les champs vides dans le tableau sont des résultats négatifs.

	Influenzavirus A	Influenzavirus B	Influenzavirus A H1N1	Contrôle interne (CI)
Couleur				
vert	positif		positif**	
jaune		positif		
orange			positif**	
rouge				positif*

*En cas de signaux positifs dans les canaux de détection de l'agent pathogène, le signal du contrôle interne n'est pas nécessaire pour l'interprétation du test. Une charge élevée d'agents pathogènes dans l'échantillon du patient peut entraîner un signal réduit ou manquant pour le contrôle interne.

** La sonde marquée avec le fluorochrome FAM (spécifique de l'influenzavirus A) détecte aussi bien l'influenzavirus A que l'influenzavirus A H1N1. La distinction entre ces deux agents pathogènes se fait par la sonde marquée avec le fluorochrome ATTO Rho12 dans le canal orange, laquelle n'est spécifique que de l'influenzavirus A H1N1.

10 Limites de la méthode et restrictions

- Les résultats du test doivent toujours être interprétés en tenant compte du tableau clinique. Le résultat doit être mis en balance avec les données cliniques pour décider du traitement approprié.
- Un résultat négatif pour l'influenzavirus A, l'influenzavirus B et l'influenzavirus A H1N1 ne permet pas d'exclure une infection par l'agent pathogène respectif.

11 Caractéristiques

11.1 Sensibilité et spécificité diagnostiques

La sensibilité et la spécificité ont été déterminées à l'aide d'échantillons définis positifs et négatifs.

Tableau 1: Échantillons définis positifs

ampliCube Respiratory Viral Panel 1	Influenzavirus A (n=20)	Influenzavirus B (n=20)	Influenzavirus A H1N1 (n=18)
Négatif	0	0	0
Positif	20	20	18
Sensibilité	100%	100%	100%

Tableau 2: Échantillons définis négatifs

ampliCube Respiratory Viral Panel 1	Influenzavirus A (n=20)	Influenzavirus B (n=38)	Influenzavirus A H1N1 (n=40)
Négatif	20	38	40
Positif	0	0	0
Spécificité	100%	100%	100%

11.2 Sensibilité analytique

Le seuil de détection (LoD) de l'ampliCube Respiratory Viral Panel 1 a été déterminé avec des séries de dilution d'ADN plasmidique de concentration connue sur un système LightCycler® 480 II (Roche). Le seuil de détection à 95% a été déterminé au moyen de l'analyse probit avec le logiciel CombiStats™ version 5.0 (Council of Europe).

Tableau 3: Seuil de détection (LoD)

	Influenzavirus A	Influenzavirus B	Influenzavirus A H1N1
LoD			
Seuil de détection à 95% du génome/PCR	6,04 (3,14 – 17,98)	7,32 (4,11 – 19,83)	8,89 (5,61 – 17,76)

11.3 Spécificité analytique

La recherche BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) montre que les amorces et sondes sélectionnées de l'ampliCube Respiratory Viral Panel 1 détectent spécifiquement les agents pathogènes sélectionnés. De plus, la spécificité a été déterminée en analysant l'ADN/ARN génomique d'autres bactéries et virus pathogènes chez l'homme.

Tableau 4: Bactéries et virus testés pour démontrer la spécificité analytique de l'ampliCube Respiratory Viral Panel 1.

Bactéries	Virus
<i>Bordetella holmesii</i>	Adénovirus A
<i>Bordetella parapertussis</i>	Adénovirus de sérotype 1 (C)
<i>Bordetella pertussis</i>	Adénovirus de sérotype 3 (B)
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Bocavirus
<i>Escherichia coli</i>	Coronavirus 229E
<i>Haemophilus influenzae</i>	Coronavirus HKU1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Coronavirus MERS
<i>Legionella pneumoniae</i>	Coronavirus NL63
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Coronavirus OC43
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Virus Coxsackie
<i>Neisseria meningitidis</i>	Cytomégalovirus
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Entérovirus 68
<i>Staphylococcus aureus</i>	Virus d'Epstein-Barr
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Métagenomevirus humain A
	Virus de la rougeole
	Virus des oreillons
	Parainfluenza 1
	Parainfluenza 2
	Parainfluenza 3
	Parainfluenza 4
	Parechovirus
	Virus respiratoire syncytial A
	Virus respiratoire syncytial B

Aucun de ces échantillons n'a présenté un signal positif. Les amorces et sondes utilisées dans l'ampliCube Respiratory Viral Panel 1 n'ont pas présenté de réactions croisées avec les agents pathogènes énumérés dans le tableau 4. Le contrôle interne (IC) était valide dans tous les tests.

11.4 Équivalence de différents échantillons

Le coefficient de variation (CV) de la valeur Ct entre l'eau et l'extrait de l'échantillon respectif a été déterminé après ajout d'ADN plasmidique de concentration connue.

Tableau 5: Équivalence de différents échantillons

	Influenzavirus A	Influenzavirus B	Influenzavirus A H1N1
CV [%] (LBA, H ₂ O)	1,06	1,44	1,42
CV [%] (expectorations, H ₂ O)	2,16	1,44	1,88
CV [%] (frottis, H ₂ O)	1,16	0,75	0,91

Le coefficient de variation (CV), basé sur la valeur Ct (*cycle threshold*) entre l'eau et les extraits d'acides nucléiques (obtenus à partir de différents échantillons), était ≤ 2,16% pour tous les gènes cibles.

12 Bibliographie

- Matthew J. Binnicker et al. (2015): Direct Detection of Influenza A and B Viruses in Less Than 20 Minutes Using a Commercially Available Rapid PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, July 2015, Volume 53, Number 7, doi:10.1128/JCM.00791-15
- Daniela Huzly et al. (2016): Influenza A virus drift variants reduced the detection sensitivity of a commercial multiplex nucleic acid amplification assay in the season 2014/15. *Arch Virol*, June 2016, DOI 10.1007/s00705-016-2930-8
- Jin Li et al. (2013): A Two-Tube Multiplex Reverse Transcription PCR Assay for Simultaneous Detection of Sixteen Human Respiratory Virus

Types/Subtypes. *BioMed Research International*, June 2013, Volume 2013, Article ID 327620, 8 pages,

- Xuezheng Ma et al. (2015): A multiplex PCR assay for the detection of five influenza viruses using a dual priming oligonucleotide system. *BMC Infectious Diseases*, 15:93, 2015, DOI 10.1186/s12879-015-0818-y
- Ozeas Galeno da rocha Neto et al. (2013): Update on viral community-acquired pneumonia. *Revista da Associação Médica Brasileira*, Sept. 2012, 59(1):78-84
- Jayne Parker et al. (2015): Analytical Sensitivity Comparison between Singleplex Real-Time PCR and a Multiplex PCR Platform for Detecting Respiratory Viruses. *PLoS ONE*, Nov. 2015, 10(11): e0143164. doi:10.1371/journal.pone.0143164
- Andrew T. Pavia (2011): Viral Infections of the Lower Respiratory Tract: Old Viruses, New Viruses, and the Role of Diagnosis. *Clinical Infectious Diseases*, 2011;52(S4):S284–S289
- Leo L.M. Poon et al. (2009): Molecular Detection of a Novel Human Influenza (H1N1) of Pandemic Potential by Conventional and Real-Time Quantitative RT-PCR Assays. *Clinical Chemistry*, 55:8, 1555-1558, 2009, Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2009.130229
- Fanny Renois et al. (2010): Rapid Detection of Respiratory Tract Viral Infections and Coinfections in Patients with Influenza-Like Illnesses by Use of Reverse Transcription-PCR DNA Microarray Systems. *Journal of Clinical Microbiology*, Nov. 2010, Volume 48, No. 11, p. 3836-3842, doi:10.1128/JCM.00733-10
- Aimee K. Zaas et al. (2009): Gene Expression Signatures Diagnose Influenza and Other Symptomatic Respiratory Viral Infection in Humans. *Cell Host Microbe*, Sept. 2009; 6(3): 207–217, doi:10.1016/j.chom.2009.07.006

Nous vous enverrons volontiers une bibliographie plus complète sur simple demande.

13 Description des symboles

	Contient suffisamment de réactifs pour <n> tests Nombre de tests
	Mélange amorce-échantillon
	Mélange d'enzymes
	Contrôle interne
	Contrôle positif
	Contrôle négatif
	Notice d'utilisation
	Consulter la notice d'utilisation
	Contenu
	Diagnostic in vitro
	Numéro de lot/version
	Numéro de commande
	Utiliser jusqu'au Date de péremption
	Conserver entre x °C et y °C
	Fabricant

14 Données sur le fabricant et la version

ampliCube Respiratory Viral Panel 1		Référence 50102
Notice d'utilisation valide à partir de		GAACRV1002FR 2023-04
	MIKROGEN GmbH Anna-Sigmund-Str. 10 82061 Neuried Allemagne Tél. +49 89 54801-0 Fax +49 89 54801-100 E-mail mikrogen@mikrogen.de Internet www.mikrogen.de	



GAACRV1002