

IVD

Mode d'emploi (français)

1 Utilisation prévue

Le panel respiratoire viral ampliCube Respiratory Viral Panel 5 est un test qualitatif *in-vitro* destiné à la détection spécifique de l'ARN du virus de l'influenza A, du virus de l'influenza B et des virus respiratoires syncytiaux A et B (RSV A/B) dans des échantillons humains d'expectoration, de prélèvements sur écouvillon, de lavage broncho-alvéolaire (BAL) ou de sécrétions trachéales.

2 Domaine d'application

Le virus de l'influenza A et le virus de l'influenza B sont des agents pathogènes responsables de la grippe saisonnière qui font partie de la famille des Orthomyxoviridae. Les virus respiratoires syncytiaux humains A et B appartiennent à la famille des Pneumoviridae. Les virus peuvent provoquer des symptômes, notamment dans les voies respiratoires supérieures. Chez les jeunes enfants, et en particulier les nourrissons, les infections à RSV provoquent souvent de graves maladies pouvant nécessiter l'hospitalisation afin d'administrer un traitement. D'autres agents pathogènes respiratoires viraux importants, comme les rhinovirus et les métapneumovirus humains peuvent entraîner des symptômes cliniques très similaires. En termes de sensibilité et de spécificité, la caractérisation génétique des virus de l'influenza est considérée comme l'approche de référence.

3 Principe du test

Le test est un système de RT (reverse transcriptase ou transcriptase inverse) PCR en temps réel. Il utilise des amorces spécifiques et des sondes marquées pour transcrire l'ARN en ADNc, puis amplifier et détecter l'ARN du virus de l'influenza A, du virus de l'influenza B et des RSV (A/B).

Pour garantir que les acides nucléiques isolés à partir d'un échantillon de patient ne contiennent pas la moindre substance capable d'inhiber la RT-PCR, un contrôle interne (IC) est ajouté à l'échantillon pendant la phase d'isolement de l'acide nucléique. Cet IC est transcrit en ADNc, amplifié puis détecté dans le même lot de RT-PCR. Cela permet d'éliminer les résultats de test faussement négatifs résultant de l'inhibition de la réaction de RT-PCR. L'IC sert simultanément de preuve d'extraction de l'acide nucléique à partir de l'échantillon du patient.

Des sondes conçues spécialement pour détecter les acides nucléiques spécifiques à l'agent pathogène sont marquées avec le colorant rapporteur FAM (virus de l'influenza A), HEX (virus de l'influenza B) et ATTO Rho12 (RSV A/B), et les sondes dédiées à la détection du contrôle interne sont marquées avec le colorant négatifs résultant de l'inhibition de la réaction de RT-PCR. L'IC sert simultanément de preuve d'extraction de l'acide nucléique à partir de l'échantillon du patient.

La valeur de Ct (*seuil de cycle*) décrit la partie de la courbe dans laquelle la fluorescence augmente de manière exponentielle au-dessus de la valeur de fond pour la première fois.

4 Réactifs

4.1 Contenu de l'emballage

Les réactifs contenus dans un kit suffisent pour 50 tests.

Chaque jeu de réactifs contient :

P&P MIX	150 µl de mélange d'amorces & de sondes pour le panel respiratoire viral 5 et pour le contrôle interne (bouchon vert)
ENZYME	600 µl de mélange enzymatique (bouchon blanc) ; contenant la transcriptase inverse et l'ADN polymérase (composant marqué en bleu)
CONTROL INT	250 µl de contrôle interne (bouchon transparent) ; dans tous les kits et lots de tous les ampliCube Respiratory Viral Panels et du Coronavirus Panel
CONTROL +	170 µl de contrôle positif (bouchon rouge)
CONTROL -	2 x 1800 µl de contrôle négatif (bouchon bleu) ; dans tous les kits et lots de l'ensemble des ampliCube Respiratory Bacterial Panels, des Respiratory Viral Panels et du Coronavirus Panel
INSTRU	1 mode d'emploi

4.2 Réactifs, matériel et appareils supplémentaires requis

- Kit de compensation de couleur MIKROGEN ampliCube Color Compensation pour le cycleur LightCycler® 480 II (Roche)
- Kit commercial d'isolement des acides nucléiques. Le système d'extraction d'acides nucléiques suivant est recommandé : MagNAPure® Compact, Total Nucleic Acid Kit I (Roche)
- Cycleur en temps réel. Le cycleur suivant est recommandé : LightCycler® 480 II (Roche)
- Plaques de 96 puits pour PCR avec films ou tubes réactionnels (propreté de qualité PCR), selon le cycleur
- Micropipettes et embouts avec filtre à usage unique de 10 µl, 20 µl, 100 µl et 1000 µl
- Agitateur de type vortex
- Minicentrifugeuse
- Si nécessaire, centrifugeuse de paillasse
- Gants jetables, non poudrés
- Bloc réfrigérant

5 Durée de conservation et manipulation

- Conserver les réactifs à une température comprise entre -25 °C et -18 °C avant et après utilisation.
- Les cycles répétés de congélation-décongélation (plus de 10 fois) des composants doivent être évités. Il est recommandé de répartir les composants de test en fractions aliquotes à la première décongélation.
- Toujours refroidir les réactifs de manière appropriée pendant les étapes de procédures (+2 °C à +8 °C).
- Tenir les composants du kit à l'abri de la lumière directe du soleil pendant toute la durée de la procédure de test.
- Avant d'initier le test, tous les réactifs doivent être entièrement décongelés, homogénéisés (brève agitation au vortex) et centrifugés.
- Les kits présentent une date d'expiration après laquelle la qualité ne peut plus être garantie.
- Le test doit exclusivement être réalisé par un personnel formé, autorisé et qualifié.
- Des modifications substantielles du produit ou des instructions d'utilisation par l'utilisateur peuvent compromettre la destination prévue du test spécifiée par MIKROGEN.
- Une contamination croisée peut entraîner des résultats de test erronés. Ajouter délicatement les échantillons de patients et les contrôles. S'assurer que les mélanges réactionnels n'entrent pas en contact avec d'autres puits.
- Le contrôle interne (IC) inclus dans ce kit peut être utilisé avec tous les kits et lots de tous les ampliCube Respiratory Viral Panels et avec le ampliCube Coronavirus Panel. Consigner la durée de vie le cas échéant.
- Le contrôle négatif (NC) peut être utilisé dans les kits et lots de l'ensemble des ampliCube Respiratory Bacterial Panels, des ampliCube Respiratory Viral Panels et du ampliCube Coronavirus Panel. Consigner la durée de vie le cas échéant.

6 Avertissements et consignes de sécurité

- Usage exclusivement réservé aux diagnostics *in-vitro*.
- Tous les échantillons de patients doivent être traités comme potentiellement infectieux.
- Il convient de porter des gants jetables appropriés pendant toute la procédure de test.
- Tous les réactifs et matériels qui entrent en contact avec des échantillons potentiellement infectieux doivent être traités avec des désinfectants appropriés ou éliminés conformément aux directives du laboratoire. Les spécifications du fabricant en matière de concentration et de durée d'incubation doivent être respectées.
- Ne pas remplacer ni mélanger les réactifs avec des réactifs d'autres lots de kit ou d'autres kits de PCR MIKROGEN ampliCube, s'ils n'ont pas été spécifiquement conçus pour ce kit. Ne pas remplacer ni mélanger avec des réactifs provenant d'autres fabricants.
- Lire soigneusement l'intégralité du mode d'emploi avant de procéder au test. Des écarts par rapport au protocole de test décrit dans le mode d'emploi peuvent engendrer des résultats erronés.

7 Prélèvement d'échantillons et préparation des réactifs

7.1 Échantillons

Le matériel de départ pour le panel respiratoire viral ampliCube Respiratory Viral Panel 5 est de l'ARN extrait d'expectorations, de prélèvements sur écouvillons, de BAL (lavage broncho-alvéolaire) ou de sécrétions trachéales d'origine humaine. La qualité des préparations d'acides nucléiques a un effet sur le résultat du test. Il convient de s'assurer que la méthode d'extraction choisie est compatible avec la technologie de PCR en temps réel.

7.2 Extraction des acides nucléiques

Extraire les acides nucléiques à partir de l'échantillon du patient et du contrôle négatif (NC). Nous recommandons un volume d'extraction de départ de 200 µl et un volume d'éluat de 50 µl. Des extractions utilisant 400 µl de matériel de départ élués dans un volume de 100 µl montrent des résultats comparables. Respecter les instructions du fabricant du kit d'extraction.

Si vous souhaitez analyser l'éluat de l'extraction parallèlement aux kits de ampliCube Respiratory Viral Panel à l'aide de kits de ampliCube Respiratory Bacterial Panel, veuillez noter l'utilisation différente du contrôle interne. Des suggestions appropriées sont indiquées dans le mode d'emploi des kits de ampliCube Respiratory Bacterial Panel.

- Décongeler le contrôle interne (IC) (bouchon transparent) et le contrôle négatif (NC) (bouchon bleu).
S'assurer que les échantillons IC et NC sont totalement décongelés. Mélanger les échantillons IC et NC avant utilisation en les agitant brièvement au vortex, puis centrifuger brièvement.
- Pour l'extraction, ajouter 5 µl (pour 50 µl d'éluat) d'IC à chaque échantillon de patient et à l'échantillon de NC. L'IC doit être ajouté au mélange échantillon/tampon de lyse et non directement au matériel d'échantillon.
- Extraire l'échantillon du patient et de NC. (Remarque : l'échantillon de NC ne doit pas être utilisé en PCR sans extraction.)
- Le contrôle positif n'est pas extrait.

Le système d'extraction d'acides nucléiques suivant est recommandé, et a été utilisé pour évaluer 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 préférez utiliser d'autres méthodes d'extraction, veuillez contacter le fabricant afin de définir la compatibilité.

7.3 Préparation du mélange principal

- Décongeler le mélange d'amorces & de sondes (bouchon vert) et le mélange enzymatique (bouchon blanc). Conserver les réactifs à l'abri de la lumière lors de cette étape.

S'assurer que les réactifs sont complètement décongelés. Mélanger les réactifs avant utilisation en les agitant brièvement au vortex, puis centrifuger brièvement.

- Préparer le mélange principal conformément au schéma de pipetage suivant :

Composants	Mélange principal pour 1 réaction
Mélange d'amorces & de sondes	3 µl
Mélange enzymatique	12 µl
Volume total	15 µl

- Homogénéiser la totalité du mélange principal au vortex, puis centrifuger brièvement.
- Produire 15 µl de mélange principal pour chaque réaction de PCR.

7.4 Préparation de la réaction de PCR

- Décongeler le contrôle positif (PC) (bouchon rouge).
S'assurer que les réactifs sont complètement décongelés. Mélanger les réactifs avant utilisation en les agitant brièvement au vortex, puis centrifuger brièvement.

Composants	1 réaction
Mélange principal du chapitre 7.3	15 µl
Éluat d'échantillon, ou éluat du NC ou du PC	10 µl

- Distribuer à la pipette 10 µl d'éluat de l'échantillon dans 15 µl de mélange principal.

- Distribuer à la pipette 10 µl de contrôle positif (non préparé) dans 15 µl de mélange principal.
- Distribuer à la pipette 10 µl d'éluat de contrôle négatif dans 15 µl de mélange principal.

Chaque cycle doit comprendre un contrôle positif et un contrôle négatif.

Sceller la plaque de PCR au moyen d'un film adhésif optiquement transparent ou fermer le tube réactionnel avec le bouchon fourni.



Les plaques et les tubes de PCR doivent être agités au vortex pendant au moins 10 s à vitesse maximale, puis être brièvement centrifugés.

8 Programmation du thermocycleur en temps réel

Le panel respiratoire viral ampliCube Respiratory Viral Panel 5 a été évalué sur l'appareil LightCycler® 480 Instrument II (Roche).

8.1 Réglage des canaux de détection

	Virus de l'influenza A	Virus de l'influenza B	RSV (A/B)	Contrôle interne (IC)
Canal	FAM	HEX	ROX	Cy5
Colorant rapporteur	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Couleur	Vert	Jaune	Orange	Rouge
Émission	510 nm	580 nm	610 nm	660 nm
Désactivateur	[aucun]	[aucun]	[aucun]	[aucun]

Les informations sur les longueurs d'onde pour les canaux de détection se rapportent à l'appareil LightCycler® 480 II.

Pour l'appareil LightCycler® 480 II, il est nécessaire d'utiliser d'abord une compensation de couleur, qui est fournie par MIKROGEN.

8.2 Programme de PCR

Transcription inverse	50 °C	8 minutes
Dénaturation	95 °C	3 minutes
Amplification	45 cycles	
• Dénaturation	95 °C	10 secondes
• Hybridation/élongation	60 °C	45 secondes

Des informations importantes concernant la programmation de divers cycleurs real time (en temps réel) sont disponibles dans le mode d'emploi du cycleur utilisé. Pour des informations spécifiques concernant le cycleur de PCR real time (en temps réel) en combinaison avec le panel respiratoire viral ampliCube Respiratory Viral Panel 5, veuillez contacter le fabricant.

9 Résultats

9.1 Validation

- Le contrôle négatif doit se situer en dessous de la valeur de seuil. Le contrôle interne (IC) doit présenter une courbe positive pour le contrôle négatif. Si le contrôle négatif présente une courbe positive (contamination) ou que l'IC n'est pas valide dans le contrôle négatif, le cycle de test ne peut pas être analysé.
- Le contrôle positif doit présenter une courbe positive. La valeur de Ct pour le contrôle positif doit être < 33. Un contrôle positif en dehors de cette plage indique un problème avec la phase d'amplification.
- Le contrôle interne (IC) doit présenter une courbe positive pour les échantillons négatifs.
Le signal de l'IC pour un échantillon de patient doit être comparé au signal de l'IC du contrôle négatif extrait. Une différence > 3 Ct pour l'IC entre l'échantillon et le contrôle négatif, ou l'absence d'un signal d'IC pour l'échantillon peut indiquer une importante inhibition de la réaction de RT-PCR. Dans ce cas, un résultat de test négatif est un résultat non valide.

9.2 Évaluation

Les données peuvent être analysées à l'aide du logiciel du cycleur de PCR correspondant ou à l'aide d'une solution logicielle dédiée à l'analyse automatique des PCR et à leur interprétation, ce qui est particulièrement pris en charge par MIKROGEN. Avec un appareil LightCycler® 480 II, il est possible d'effectuer l'analyse selon la méthode *Abs Quant/2nd Derivative Max* (maximum de la dérivée seconde, recommandée) ou selon la méthode *Abs Quant/Fit Points* (ajustement des points). Des informations supplémentaires et des instructions correspondantes sont disponibles auprès de MIKROGEN sur demande.

Les signaux situés au-dessus de la valeur de *seuil* sont évalués comme des résultats positifs. Des champs vides dans le tableau sont considérés comme des résultats négatifs.

	Virus de l'influenza A	Virus de l'influenza B	RSV (A/B)	Contrôle interne (IC)
Couleur				
Vert	Positif			
Jaune		Positif		
Orange			Positif	
Rouge				Positif*

*Si des signaux positifs sont observés dans les canaux de détection spécifiques aux agents pathogènes, le signal du contrôle interne n'est pas requis pour interpréter le test. Une charge élevée en agent pathogène dans l'échantillon du patient peut entraîner une diminution voire la disparition du signal du contrôle interne.

10 Limites de la méthode et restrictions

- Les résultats de test doivent toujours être considérés dans le contexte de la situation clinique. Les conséquences thérapeutiques des résultats doivent être associées aux données cliniques.
- Un résultat de test négatif pour le virus de l'influenza A, le virus de l'influenza B et le virus RSV (A/B) ne permet pas d'exclure une infection par les agents pathogènes particuliers.

11 Caractéristiques de performance

11.1 Sensibilité et spécificité diagnostiques

La sensibilité et la spécificité ont été déterminées en utilisant des échantillons positifs et négatifs définis.

Tableau 1 : Échantillons positifs définis

ampliCube Respiratory Viral Panel 5	Virus de l'influenza A (n=20)	Virus de l'influenza B (n=20)	RSV (A/B) (n=20)
Négatif	0	0	0
Positif	20	20	20
Sensibilité	100%	100%	100%

Tableau 2 : Échantillons négatifs définis

ampliCube Respiratory Viral Panel 5	Virus de l'influenza A (n=20)	Virus de l'influenza B (n=20)	RSV (A/B) (n=20)
Négatif	20	20	20
Positif	0	0	0
Spécificité	100%	100%	100%

11.2 Sensibilité analytique

La limite de détection (LoD) du panel respiratoire viral ampliCube Respiratory Viral Panel 5 a été déterminée avec une série de dilutions d'ADN plasmidique de concentration connue sur l'appareil LightCycler® 480 II System (Roche). La limite de détection à 95 % a été déterminée par une analyse probit avec le logiciel CombiStats™ Version 5.0 (Conseil européen).

Tableau 3 : Limite de détection (LoD)

	Virus de l'influenza A	Virus de l'influenza B	RSV (A/B)
LoD			
Limite de détection à 95 % Génomes/PCR	5,34 (3,03 – 14,85)	3,10 (1,63 – 8,90)	1,98 (1,33 – 3,90)

11.3 Spécificité analytique

L'étude BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) montre que les amorces et sondes sélectionnées du panel respiratoire viral ampliCube Respiratory Viral Panel 5 permettent de détecter spécifiquement les agents pathogènes sélectionnés. De plus, la spécificité a été déterminée en étudiant l'ADN/l'ARN génomique d'autres bactéries et virus pathogènes humains.

Tableau 4 : Bactéries et virus testés pour démontrer la spécificité analytique du panel respiratoire viral ampliCube Respiratory Viral Panel 5.

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 229 E
<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>	Coxsackievirus
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cytomégalo virus
<i>Staphylococcus aureus</i>	Entérovirus 68

Streptococcus pneumoniae

Virus Epstein-Barr
Virus de la rougeole
Virus des oreillons
Parainfluenza 1
Parainfluenza 2
Parainfluenza 3
Parainfluenza 4

Aucun de ces échantillons n'a généré de signal positif. Les amorces et les sondes utilisées dans le panel respiratoire viral ampliCube Respiratory Viral Panel 5 n'a révélé aucune réaction croisée avec les agents pathogènes répertoriés 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) a été déterminé pour les valeurs de Ct entre l'eau et l'extrait du matériel d'échantillon particulier après avoir ajouté de l'ADN plasmidique de concentration connue.

Tableau 5 : Équivalence de différents échantillons

	Virus de l'influenza A	Virus de l'influenza B	RSV (A/B)
CV [%] (BAL [lavage broncho-alvéolaire], H ₂ O)	1,06	1,44	1,14
CV [%] (expectoration, H ₂ O)	2,16	1,44	2,77
CV [%] (prélèvement sur écouvillon, H ₂ O)	1,16	0,75	0,89


Le coefficient de variation (CV), sur la base de la valeur Ct (*seuil de cycle*) entre l'eau et les extraits d'ADN (provenant des divers matériels d'échantillon), était ≤ 2,77 % 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
- E. Benites et al. (2014): Acute respiratory viral infections in pediatric cancer patients undergoing chemotherapy. *J Pediatr (Rio J)*. 2014;90(4):370-376
- 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
- R. Martins Júnior et al. (2014): Detection of respiratory viruses by real-time polymerase chain reaction in outpatients with acute respiratory infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 109(6): 716-721, September 2014
- 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
- O. Primo et al. (2014): Detection of Respiratory Viruses in Nasopharyngeal Swab and Adenoid Tissue from Children Submitted to Adenoidectomy: Pre- and Postoperative Analysis. *Int Arch Otorhinolaryngol* 2014;18:150-154
- John S. Tregoning et al. (2010): Respiratory Viral Infections in Infants: Causes, Clinical Symptoms, Virology, and Immunology. *Clinical Microbiology Reviews*, Jan. 2010, Vol. 23, No. 1, p. 74-98, doi:10.1128/CMR.00032-09


Nous vous enverrons volontiers toute documentation supplémentaire sur demande.

13 Description des symboles

	Le contenu est suffisant pour <n> formulations Nombre de formulations
P&P MIX	Mélange d'amorces & de sondes
ENZYME	Mélange enzymatique
CONTROL INT	Contrôle interne

CONTROL +	Contrôle positif
CONTROL -	Contrôle négatif
INSTRU	Mode d'emploi
	Respecter le mode d'emploi
CONT	Contenu, contient
IVD	Agent diagnostique <i>in-vitro</i>
LOT	Numéro de lot/version
REF	Référence du catalogue
	Utiliser jusqu'au Date d'expiration
	Conserver entre x °C et y °C
	Fabricant

14 Informations sur le fabricant et la version

ampliCube Respiratory Viral Panel 5		Article n° 50152
Mode d'emploi En vigueur depuis le		GAACRV5002FR 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	
		