

Kit RT-PCR RESPI+

Kit de diagnostic pour la détection de l'ARN du virus de la grippe A (FluA), du virus de la grippe B (FluB), du SARS-CoV-2 et du virus respiratoire syncytial (RSV) par RT-PCR en temps réel en une étape.

REF

Réf. MAD-003917M-W



100 déterminations

Réf. MAD-003917M-50W

50 déterminations

Pour le diagnostic in vitro uniquement

Directive 98/79/CE



Vitro S.A.

Calle Luis Fuentes Bejarano nº 60. Ed. Nudo Norte Local 3. 41020 Seville
(Espagne). Téléphone : +34 954 933 200. vitro@vitro.bio ; www.vitro.bio



Rev. : 10/11/2022

TABLE DES MATIÈRES

1	UTILISATION PRÉVUE.....	3
2	PRINCIPE DE LA MÉTHODE.....	3
3	COMPOSANTS.....	4
4	MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE NÉCESSAIRE NON FOURNI.....	5
4.1	Réactifs et matériaux.....	5
4.2	Équipement.....	5
5	CONDITIONS DE STOCKAGE ET DE STABILITÉ.....	5
6	DANGERS ET PRECAUTIONS.....	6
7	PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON CLINIQUE POUR L'ANALYSE.....	8
7.1	Collecte des échantillons.....	8
7.2	Extraction d'acides nucléiques à partir de lavages broncho-alvéolaires et d'exsudats nasopharyngés et oropharyngés.....	9
8	PROTOCOLE DE PCR.....	10
8.1	Préparation du mélange réactionnel.....	10
8.2	Configuration de l'instrument pour la PCR en temps réel.....	10
9	INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.....	11
10	CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE.....	14
10.1	Sensibilité analytique.....	14
10.2	Spécificité analytique.....	15
10.3	Sensibilité et spécificité cliniques.....	16
11	LIMITES DU TEST.....	16
12	BIBLIOGRAPHIE.....	17
13	SYMBOLES UTILISÉS.....	18
14	HISTORIQUE DE REVISION.....	18



1 UTILISATION PRÉVUE

Le **RESPI+ RT-PCR** est un kit de diagnostic in vitro pour la détection qualitative et la différenciation simultanées de l'ARN du virus de la grippe A¹ (FluA), du virus de la grippe B¹ (FluB), du SARS-CoV-2 et/ou du virus respiratoire syncytial² (RSV) à partir de l'ARN extrait d'échantillons cliniques humains de différentes origines tels que les exsudats nasopharyngés et oropharyngés et les lavages bronchoalvéolaires (LBA). Elle est basée sur la technique de RT-PCR multiplex en temps réel en une étape, utilisant des amorces et des sondes fluorescentes pour les gènes cibles : le gène de la protéine de matrice FluA (Mp), le gène de la protéine de matrice FluB (Mp), le gène de la nucléocapside (N) du SARS-CoV-2 et le gène de la protéine de matrice (Mp) du RSV, selon la méthodologie recommandée par l'OMS (11).

¹Types de virus de la grippe identifiés :

- Influenza A
 - Générique
 - Pandémie H1N1 2009
 - Générique H3
- Influenza B : lignées Victoria et Yamagata.

²Types de virus respiratoires syncytiaux détectés : A y B.

Des amorces spécifiques et une sonde fluorescente sont incluses pour la détection simultanée du gène RNaseP humain comme contrôle de qualité interne du matériel de départ et d'amplification. Les canaux de détection des différentes cibles sont :

Cible	Fluorophore
SARS-CoV-2	FAM
Grippe A	ROX
Grippe B	JOE
RSV A/B	Cy5.5
RNaseP	Cy5

Tableau 1. Canaux de détection pour les différentes cibles du kit RT-PCR RESPI+.

Statut microbiologique : Produit non stérile.

2 PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le kit **RESPI+ RT-PCR** est un test de PCR multiplexe en temps réel avec réverse transcription. Le mélange réactionnel contient trois séries d'amorces et de sondes pour la détection de l'ARN du virus de la grippe A, du virus de la grippe B, du SARS-CoV-2 et du virus respiratoire syncytial (RSVA/B). Il comprend également des amorces et des sondes pour la détection du gène humain de la RNaseP dans des échantillons cliniques ou de contrôle. Les oligonucléotides utilisés comme amorces et sondes ont été sélectionnés dans des régions conservées au cours de l'évolution. Avec un seul test, il permet de différencier le virus de la grippe A, le virus de la grippe B, le SARS-CoV-2 et le virus respiratoire syncytial.

Rev. : 10/11/2022



Dans une première étape de la réverse transcription, les régions d'ARN complémentaires aux amorces sont transformées en ADNc, qui est ensuite amplifié par réaction en chaîne par polymérase (PCR). La détection des amplicons obtenus est basée sur la technologie des sondes TaqMan.

Si les acides nucléiques cibles sont présents, ils sont amplifiés et, pendant le processus de PCR, les sondes se lient spécifiquement dans les régions complémentaires situées entre les amorces « forward » et « reverse ». Pendant la phase d'extension de la PCR, l'activité 5' nucléasique de l'ADN polymérase dégrade les sondes liées spécifiquement à leurs cibles, provoquant la séparation entre le rapporteur et le quencher ce qui génère l'émission d'un signal fluorescent. Les sondes spécifiques de chaque virus vont générer un signal fluorescent à différentes longueurs d'ondes, ce qui permet à l'instrument de PCR en temps réel de différencier les signaux. À chaque cycle de dénaturation-extension, une scission de nouvelles molécules de rapporteur se produit entraînant une augmentation de l'intensité du signal fluorescent. L'intensité de la fluorescence est détectée sur les instruments de PCR en temps réel à chaque cycle et les données sont analysées avec un logiciel d'analyse spécifique à chaque plateforme.

La détection de l'ARN viral, outre qu'elle aide au diagnostic de la maladie, fournit des informations précieuses en termes d'épidémiologie et de surveillance.

3 COMPOSANTS

Le kit **RESPI+RT-PCR** est commercialisé sous la forme d'un Master Mix prêt à l'emploi qui comprend tous les réactifs nécessaires à la réalisation de la RT-PCR en temps réel.

De plus, afin d'éviter toute contamination avec les produits PCR précédents, le Mix contient l'enzyme Uracil-DNA Glycosylase (Cod-UNG), qui dégrade les produits PCR contenant du dUTP.

Un contrôle positif (PC) et de l'eau DEPC exempte de DNase/RNase à inclure dans les contrôles négatifs (NTC) sont fournis avec le mélange de RT-PCR.

Composants du kit pour 100 tests (MAD-003917M-W) :

RÉFÉRENCE (DESCRIPTION)		CONTENU	AMOUNT
MAD-003917M-100-W (RESPI+ MMIX)	MAD-003948-MIX-W (RESPI+ MMix)	Transcriptase inverse, Hot Start DNA Polymerase, ADN glycosylase Uracil, amorces, sondes fluorescentes, tampon, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP)	2 flacons avec 50 tests/flacon
	MAD-DDW-DEPC (eau exempte de RNase/DNase)	---	1 flacon (200 µl)
MAD-RESPI+ (Respi+ PC)		ADN/ARN synthétique non infectieux contenant une partie du génome de FluA, FluB, SARS-CoV-2, RSV et ADN humain	1 flacon (100 µl)

Tableau 2. Réactifs fournis dans le kit RESPI+RT-PCR pour 100 tests.

Composants du kit pour 50 tests (MAD-003917M-50W) :

RÉFÉRENCE (DESCRIPTION)		CONTENU	AMOUNT
MAD-003917M-50-W (RESPI+ MMIX)	MAD-003948-MIX-W (RESPI+ MMix)	Transcriptase inverse, Hot Start DNA Polymerase, ADN glycosylase Uracil, amorces, sondes fluorescentes, tampon, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP)	1 flacon de 50 tests/flacon
	MAD-DDW-DEPC (eau exempte de RNase/DNase)	---	1 flacon (200 µl)
MAD-RESPI+ (Respi+ PC)		ADN/ARN synthétique non infectieux contenant une partie du génome de FluA, FluB, SARS-CoV-2, RSV et ADN humain	---

Tableau 3. Réactifs fournis dans le kit RESPI+RT-PCR pour 50 tests.

4 MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE NÉCESSAIRE NON FOURNI

4.1 Réactifs et matériaux

- Gants jetables.
- Embouts de pipette filtrants sans DNase/RNase.
- Kit d'extraction d'ARN.
- Barrettes de tubes/plaques/films adhésifs optiques spécifiques pour chaque équipement de PCR en temps réel

4.2 Équipement

- Hotte à flux laminaire
- Microcentrifugeuse pour tubes de 1.5ml.
- Microcentrifugeuses de barrettes de tubes PCR ou de plaques à 96 puits.
- Vortex.
- Micropipettes automatiques : P1000, P200, P20 et P2.
- Instrument de PCR en temps réel.

5 CONDITIONS DE STOCKAGE ET DE STABILITÉ

Le kit **RESPI+RT-PCR** doit être transporté et conservé à une température comprise entre -10 °C et -30 °C *. Néanmoins, malgré les recommandations de transport entre -10 °C et -30 °C, il est également possible de le transporter à une température de réfrigération (2 °C - 8 °C), à condition que la période de transit ne dépasse pas un maximum de dix jours. Dans tous les cas, le kit doit être conservé à une température comprise entre -10 °C et -30 °C dès sa réception.

Le mélange réactionnel **RESPI+ MMix** est sensible aux changements d'état physique et il a été prouvé qu'il supporte jusqu'à cinq cycles de congélation-décongélation. Si une série est effectuée avec un faible nombre d'échantillons, il est recommandé d'aliquoter le mélange réactionnel à l'avance. Le mélange contient des molécules fluorescentes et doit être conservé à l'abri de la lumière directe.

Le contrôle positif est sensible aux changements d'état physique et il ne doit pas subir plus de huit cycles de congélation-décongélation. Il est conseillé de manipuler le flacon de contrôle positif séparément des échantillons cliniques afin d'éviter toute contamination potentielle qui pourrait donner de faux positifs.

S'ils sont conservés à la température recommandée, les réactifs PCR sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée. Les réactifs PCR doivent être stockés dans des endroits exempts de contamination par de l'ADN ou par des produits PCR.

*Un indicateur de température est inclus dans l'emballage pour contrôler les conditions pendant l'expédition. En cas d'interruption de la chaîne du froid, il est recommandé de contacter le fabricant avant d'utiliser les réactifs.

6 DANGERS ET PRECAUTIONS

- Lisez le mode d'emploi avant d'utiliser ce produit.
- Le kit doit être manipulé par des techniciens qualifiés dans les techniques de biologie moléculaire appliquées au diagnostic.
- N'utilisez aucun des composants du kit après la date d'expiration.
- Le RESPI+ MMix doit être décongelé avant utilisation et manipulé sur de la glace ou une plaque froide, à l'abri de la lumière. Mélanger les solutions en retournant plusieurs fois les tubes sans les agiter au vortex, et centrifuger brièvement.
- Le contrôle positif doit être décongelé à température ambiante, bien mélangé et brièvement centrifugé avant utilisation.
- Les précautions de sécurité et d'élimination sont décrites dans la fiche de données de sécurité de ce produit. Ce produit est uniquement destiné à un usage professionnel en laboratoire, et n'est pas destiné à un usage pharmacologique, domestique ou tout autre type d'usage. La version actuelle de la fiche de données de sécurité de ce produit peut être téléchargée sur la page Web www.vitro.bio ou demandée à l'adresse suivante regulatory@vitro.bio.
- Le kit RESPI+ RT-PCR utilise des acides nucléiques préalablement extraits et purifiés comme matériel de départ. Il est de la responsabilité du client d'inclure les contrôles nécessaires pour vérifier que le système d'extraction du matériel génétique utilisé fonctionne correctement.
- Considérations générales pour éviter la dégradation de l'ARN par les ribonucléases (RNases)
Les RNases sont des enzymes très stables, difficiles à inactiver, qui agissent rapidement en dégradant l'ARN. L'introduction de RNases dans l'échantillon à tester et dans les réactifs utilisés pour la RT-PCR doit être évitée en prenant les précautions suivantes :
 - Travaillez dans une zone propre et exempte de RNase. La principale source de contamination par la RNase provient des particules de peau et de poussière, qui sont des vecteurs bactériens et fongiques.

- Utilisez toujours des gants jetables pour éviter la contamination de la RNase par la peau.
- Changez fréquemment de gants et gardez les tubes fermés.
- Utilisez des tubes et des embouts de pipette exempts de RNase.
- Travaillez rapidement pour éviter la dégradation de l'ARN par les RNases résiduelles et endogènes pendant tout le processus de préparation de l'échantillon à amplifier.

- **Considérations générales pour éviter la contamination par le produit PCR**

La source de contamination la plus importante est généralement le même produit PCR amplifié. Par conséquent, il est recommandé de réaliser l'amplification et la manipulation des produits amplifiés dans une zone différente de celle où l'extraction de l'ARN et la préparation de la PCR sont effectuées. Il est recommandé de travailler dans des zones pré et post-PCR différentes : manipulation de l'ARN à tester et préparation des tubes PCR en zone pré-PCR, amplification et la manipulation des produits amplifiés en zone post-PCR. Ces zones doivent être physiquement séparées et du matériel de laboratoire différent doit être utilisé (blouses de laboratoire, pipettes, embouts, etc.) pour éviter la contamination des échantillons par l'ADN amplifié, ce qui pourrait entraîner des diagnostics faussement positifs. Le flux de travail doit toujours aller dans une seule direction, de la zone pré-PCR à la zone post-PCR et jamais dans le sens inverse. Le flux de matériel et de personnel de la zone post-PCR vers la zone pré-PCR doit être évité. En outre, afin d'éviter la contamination avec les produits PCR précédents, l'enzyme *Uracil-DNA Glycosylase* (Cod-UNG), qui dégrade les produits PCR contenant du dUTP, est incluse dans le kit.

Il est recommandé d'inclure des contrôles d'amplification négatifs remplaçant l'échantillon d'ARN par de l'eau exempte de RNase/DNase, afin de détecter et de contrôler toute contamination éventuelle des réactifs par des échantillons de test ou des produits amplifiés.

- **Elimination des déchets**

La manipulation des déchets générés par l'utilisation des produits commercialisés par Vitro S.A. doit être effectuée conformément à la loi applicable dans le pays dans lequel ces produits sont utilisés. À titre de référence, le tableau suivant indique la classification des déchets générés par ce kit selon la loi européenne, plus précisément selon la décision de la Commission européenne du 18 décembre 2014 modifiant la décision 2000/532/CE relative à la liste des déchets conformément à la directive 2008/98/CE du Parlement européen et du Conseil :

LES DÉCHETS POTENTIELS GÉNÉRÉS APRÈS L'UTILISATION DE CE PRODUIT	CODE ELW*	TYPE DE DÉCHETS SELON L'ELW*
1. Élimination des déchets liquides	161001	"Déchets liquides aqueux contenant des substances dangereuses" après ajout de 10% du volume total d'un agent désinfectant. Si la désinfection n'est pas effectuée, ces déchets doivent être considérés comme des "déchets dont le stockage et l'élimination font l'objet de prescriptions particulières afin de prévenir les infections".
2. Matériel périssable (tubes, embouts, etc.) 3. Tout élément qui a été en contact avec le matériel génétique de départ.	180103	"Déchets dont la collecte et l'élimination sont soumises à des exigences particulières afin de prévenir les infections".
4. Récipient pour les réactifs utilisés classés comme dangereux (selon la fiche de données de sécurité)	150110	"Récipients contenant des déchets ou contaminés par des substances dangereuses".

Tableau 4. Classification des déchets générés par ce kit selon la législation européenne. *LEED : *Législation européenne sur les déchets*.

*Note : Cette classification est incluse comme une directive générale d'action sous la responsabilité finale de l'utilisateur en respectant toutes les réglementations locales, régionales et nationales sur l'élimination de ce type de matériaux.

7 PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON CLINIQUE POUR L'ANALYSE

7.1 Collecte des échantillons

Le kit **RT-PCR RESPI+ a** été validé pour son utilisation à partir de matériel génétique purifié provenant du lavage broncho-alvéolaire et des exsudats nasopharyngés et oropharyngés.

Les échantillons du lavage broncho-alvéolaire sont prélevés sur des patients hospitalisés à l'aide d'un bronchoscope par aspiration du liquide d'un ou deux segments ou sous-segments pulmonaires.

Dans le cas des exsudats nasopharyngés et oropharyngés, ces prélèvements sont effectués à l'aide d'écouvillons. L'écouvillon est introduit avec précaution dans la partie postérieure de la cavité nasale ou du pharynx. L'extrémité de l'écouvillon doit être en polyester, en rayonne ou en nylon, avec un manche en plastique souple et flexible (les écouvillons avec une extrémité en alginate de calcium ou en coton ne doivent pas être utilisés). Une fois inséré, l'écouvillon est maintenu au même endroit pendant environ 10 secondes et est ensuite placé dans un tube stérile sec, ou de préférence dans un tube avec un milieu de transport (par exemple, le milieu de transport universel UTM) pour préserver l'intégrité de l'échantillon.

Les échantillons sont collectés dans un récipient stérile et conservés à 2-8 °C pendant un maximum de 5 jours. Une fois les échantillons testés ou pour des périodes de stockage plus longues, ils sont conservés à -80 °C afin de préserver la viabilité virale. Les acides nucléiques extraits doivent être conservés à -80 °C.

7.2 Extraction d'acides nucléiques à partir de lavages broncho-alvéolaires et d'exsudats nasopharyngés et oropharyngés

Le kit **RT-PCR RESPI+** a été testé avec du matériel génétique purifié provenant de lavages broncho-alvéolaires humains et d'exsudats nasopharyngés et oropharyngés. Cette trousse a été validée avec du matériel génétique de départ provenant des kits de purification d'ADN/ARN et des équipements d'extraction suivants* à partir de 200 µl d'échantillon clinique et en éluant dans 100 µl de tampon d'éluion :

KITS D'EXTRACTION	ÉQUIPEMENT D'EXTRACTION
MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Diagnostics)	MagNA Pure Compact Instrument. Version 1.1.2 (Roche Diagnostics)
QIASymphony Certal Kits (Qiagen)	QIASymphony SP (Qiagen)
RNeasy Mini QIAcube Kit (Qiagen)	QIAcube (Qiagen)
PureLink Viral RNA/DNA extraction mini kit (Invitrogen)	Manual system
Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega)	Maxwell® 16 (Promega)
STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C (Seegene)	STARlet (Seegene)
VIRAL EXTRACTION VN143 (Genolution)	Nextractor® NX-48 (Genolution)
RNA/DNA viral extraction kit (Robot Opentrons) (Vitro, ref. MAD-003955M)	Opentrons OT-2

Tableau 5. Kits d'extraction et instruments utilisés pour la purification de l'ADN/ARN à partir d'échantillons cliniques.

*Note : Le système n'a pas été validé avec d'autres systèmes d'extraction d'ADN/ARN. Par conséquent, si un autre système de purification est utilisé, cela doit être vérifié au préalable.

8 PROTOCOLE DE PCR

8.1 Préparation du mélange réactionnel

La réaction RT-PCR est réalisée dans un volume final de 20 μ l. Préparer le Master Mix comme indiqué ci-dessous :

1. Décongeler et homogénéiser le RESPI+ MMix (ne pas utiliser de vortex). Une fois qu'il est décongelé, centrifuger brièvement.
2. Mélangez dans chaque tube PCR les volumes suivants pour chaque échantillon :

Réactif	V/test
RESPI+ MMix	12 μ l
Echantillon	8 μ l

3. Inclure un contrôle négatif en ajoutant 8 μ l d'eau incluse dans le kit.
4. Inclure un contrôle positif en ajoutant 8 μ l du contrôle positif d'ADN RESPI+ PC inclus dans le kit.
5. Centrifuger brièvement pour s'assurer qu'il n'y a pas de bulles d'air dans les puits.

Il est recommandé de conserver le MMix sur une plaque froide pendant la préparation des échantillons et de ne pas décongeler le flacon plus de sept fois.

8.2 Configuration de l'instrument pour la PCR en temps réel

Entrez les différentes cibles et les canaux de détection pour chacune d'entre elles dans le logiciel de l'instrument. Créez les échantillons, le contrôle positif (PC), les cibles PCR (NTC) et attribuez les positions des échantillons dans la plaque PCR.

Réglez l'instrument de PCR en temps réel en suivant les étapes ci-dessous :

PROGRAMME PCR		
25°C	5 min	1 cycle
50°C	15 min	1 cycle
95°C	5 min	1 cycle
95°C	15 secondes	45 cycles
56°C*	40 secondes	

Tableau 6. Programme PCR du kit RT-PCR RESPI+.

Les données de fluorescence doivent être recueillies pendant la phase d'extension () au moyen des canaux FAM (SARS-CoV-2)/ ROX (FluA)/ HEX, JOE ou VIC (FluB)/ Cy5.5 (RSV) et Cy5 (contrôle interne).

Ce kit a été validé avec les plateformes :

- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- VitroCycler Fluorescent Quantitative Detec. Sys. (Vitro S.A)

Pour son utilisation avec d'autres plateformes, il est recommandé de vérifier la compatibilité des fluorochromes avec les canaux de détection de chaque instrument. Les fluorochromes inclus dans le kit sont compatibles avec la majorité des instruments en temps réel les plus utilisés sur le marché.

Dans le système PCR en temps réel Applied Biosystems QuantStudio™ 5 et le système VitroCycler Fluorescent Quantitative Detec. Sys., l'option de contrôle passif ROX doit être désactivée.

Dans le thermocycleur Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System, sélectionnez Ramp Speed Standard dans le menu "Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties".

9 INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Avant d'interpréter les résultats des échantillons cliniques, il est nécessaire de suivre le guide d'interprétation des contrôles positifs et négatifs comme indiqué dans le tableau ci-dessous :

	RÉSULTAT	INTERPRÉTATION
Contrôle positif RESPI+	Signal pour les canaux FAM, ROX, JOE, Cy5.5 et Cy5*.	Le contrôle/la réaction est correct(e)
	Aucun signal pour FAM et/ou ROX et/ou JOE et/ou Cy5.5 et/ou Cy5	Problème d'amplification : refaire l'analyse
Contrôle négatif :	Signal pour les canaux FAM et/ou ROX et/ou JOE et/ou Cy5.5 et/ou Cy5	Contamination, refaire l'analyse
	Pas de signal	Le contrôle/la réaction est correct(e)

*Le signal d'amplification doit être déterminé par une augmentation rapide et régulière des valeurs de fluorescence et non par des phénomènes de pic ou une augmentation progressive du signal de fond (fond irrégulier ou augmentation du bruit de fond) (Fig 1).

La série est considérée comme valide lorsque des résultats adéquats ont été obtenus pour tous les contrôles de réaction.

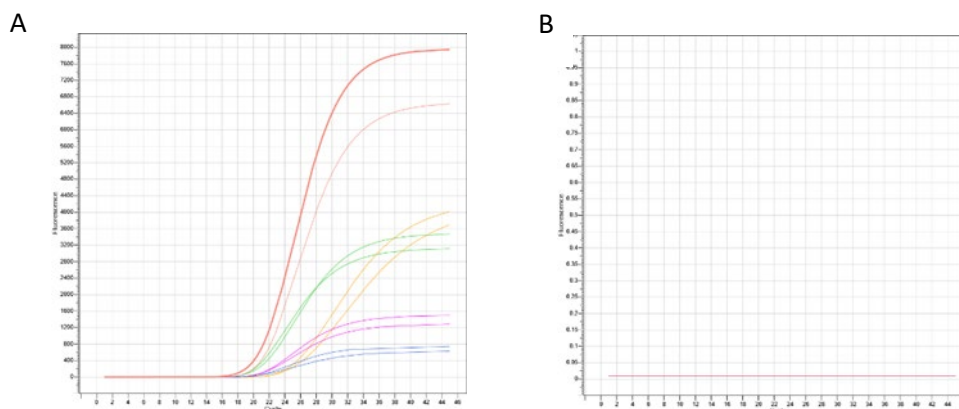


Figure 1 : Exemple de graphiques d'amplification d'un contrôle positif (A) et d'un contrôle négatif (B). Expérience réalisée sur VitroCycler Fluorescent Quantitative Detec. Sys.

Le résultat est considéré comme non valide si l'on observe un graphique d'amplification dans le contrôle négatif, ou s'il y a absence d'amplification dans le puits du contrôle positif. Dans ce cas, il est recommandé de répéter le test.

Si la série a été validée, interprétez les résultats des échantillons cliniques selon le tableau suivant :

RESPI+ RT-PCR					INTERPRÉTATION
SARS-CoV-2 (FAM)	FluA (ROX)	FluB (JOE)	RSV (Cy5.5)	RNaseP (Cy5)	
Signal	Pas de signal	Pas de signal	Pas de signal	Signal	Échantillon positif pour le SARS-CoV-2
				Pas de signal	
Pas de signal	Signal	Pas de signal	Pas de signal	Signal	Échantillon positif pour la grippe A
				Pas de signal	
Pas de signal	Pas de signal	Signal	Pas de signal	Signal	Échantillon positif pour la grippe B
				Pas de signal	
Pas de signal	Pas de signal	Pas de signal	Signal	Signal	Échantillon positif pour le virus respiratoire syncytial
				Pas de signal	
Pas de signal	Signal	Signal	Pas de signal	Signal	Échantillon positif pour la grippe A et la grippe B
				Pas de signal	
Signal	Signal	Pas de signal	Pas de signal	Signal	Échantillon positif pour le SARS-CoV-2 et la grippe A
				Pas de signal	
Signal	Pas de signal	Signal	Pas de signal	Signal	Échantillon positif pour le SARS-CoV-2 et la grippe B
				Pas de signal	

Signal	Pas de signal	Pas de signal	Signal	Signal	Échantillon positif pour le SARS-CoV-2 et le virus respiratoire syncytial
				Pas de signal	
Pas de signal	Signal	Pas de signal	Signal	Signal	Échantillon positif pour la grippe A et le virus respiratoire syncytial
				Pas de signal	
Pas de signal	Pas de signal	Signal	Signal	Signal	Échantillon positif pour la grippe B et le virus respiratoire syncytial
				Pas de signal	
Pas de signal	Signal	Signal	Signal	Signal	Échantillon positif pour la grippe A, la grippe B et le virus respiratoire syncytial
				Pas de signal	
Signal	Pas de signal	Signal	Signal	Signal	Échantillon positif pour le SARS-CoV-2, la grippe B et le virus respiratoire syncytial
				Pas de signal	
Signal	Signal	Pas de signal	Signal	Signal	Échantillon positif pour le SARS-CoV-2, la grippe A et le virus respiratoire syncytial.
				Pas de signal	
Signal	Signal	Signal	Pas de signal	Signal	Échantillon positif pour le SARS-CoV-2, la grippe A et la grippe B
				Pas de signal	
Pas de signal	Pas de signal	Pas de signal	Pas de signal	Signal	Résultat négatif ⁽¹⁾
				Pas de signal	Invalide ⁽²⁾ : Problème d'extraction ou d'amplification

⁽¹⁾ Négatif ou inférieur à la limite de détection du kit.

⁽²⁾ Il est recommandé de répéter l'extraction de l'ARN et/ou de répéter la RT-PCR ou de faire un nouveau prélèvement.

Pour chaque instrument, il est recommandé d'utiliser le réglage automatique du seuil effectué par le logiciel par défaut. Si nécessaire, le seuil peut être réglé manuellement en veillant à ce qu'il se situe dans la phase exponentielle de la courbe de fluorescence et que le bruit de fond soit inférieur à la ligne de seuil.

Un échantillon est positif si la valeur Ct obtenue est ≤ 38 , bien que le contrôle interne ne présente pas de graphique d'amplification. Parfois, il peut arriver que le contrôle interne ne soit pas amplifié correctement en raison de la présence d'un nombre initial élevé de copies de l'acide nucléique viral cible, ce qui peut entraîner une amplification préférentielle de ce dernier.

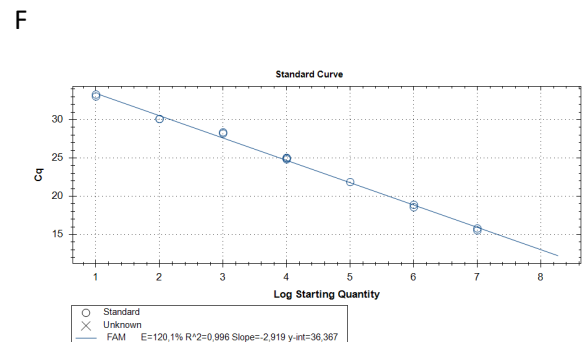
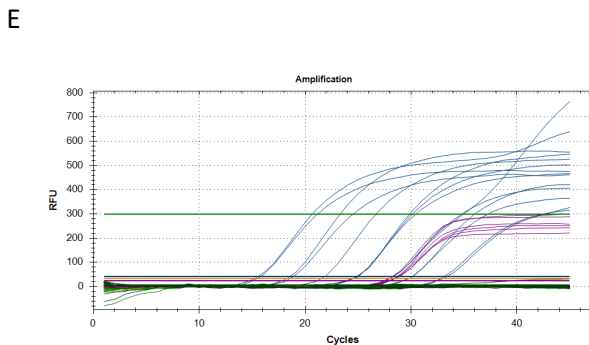
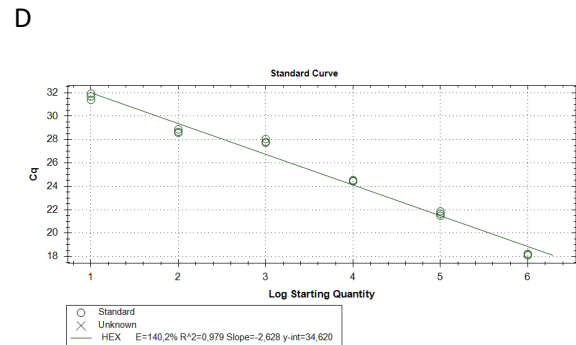
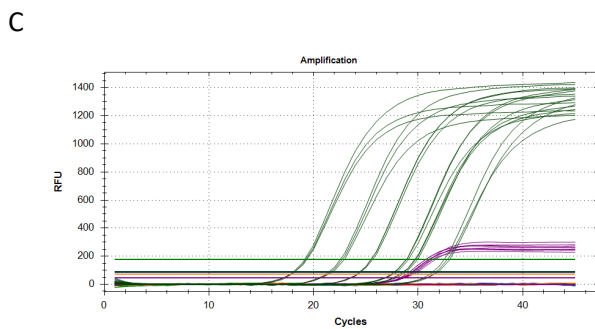
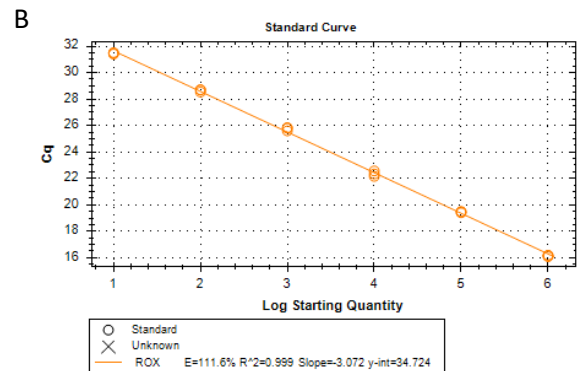
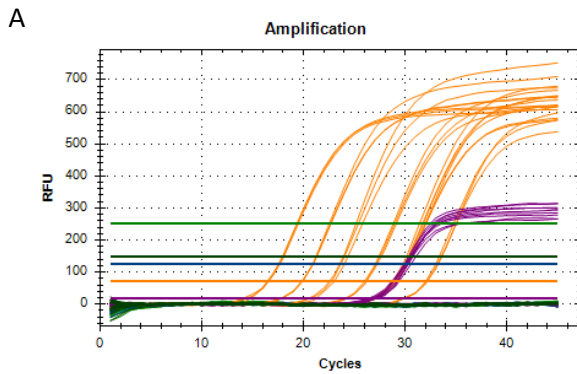
Un échantillon est négatif si une courbe d'amplification n'est pas détectée au-delà de la valeur seuil, et si le contrôle interne présente une courbe d'amplification. L'amplification du contrôle interne permet d'exclure une inhibition de la réaction PCR.

10 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

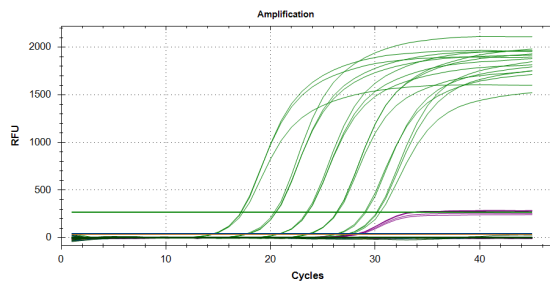
10.1 Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du kit RT-PCR RESPI+ a été déterminée en effectuant six réplicats de dilutions sérielles de fragments synthétiques de chacune des cibles de 10^7 copies/rxn à 10^1 copies/rxn.

Il a été établi que le kit RT-PCR RESPI+ a une limite de détection de 10 copies/réaction pour la grippe A, la grippe B, le SARS-CoV-2 et le RSV (Figure 2).



G



H

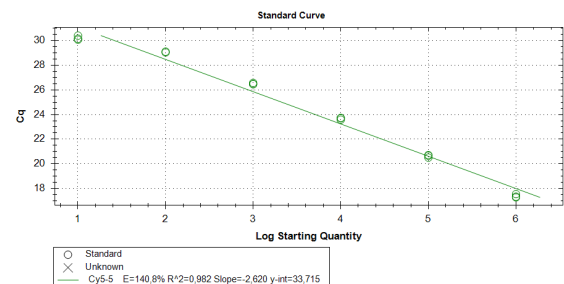


Figure 2 : Dilutions en série de 10^6 copies/rxn à 10 copies/rxn de fragments synthétiques de FluA dans le canal ROX (A), FluB dans le canal JOE (C), SARS-CoV-2 dans le canal FAM (E), et RSV dans le canal Cy5.5 (G). Droites de régression linéaire obtenues pour chacune des quatre cibles, respectivement (B, D, F et H).

L'efficacité de l'amplification pour chacune des cibles a été évaluée avec six dilutions en série d'un standard de SARS-CoV-2, FLUA, FLUB et RSV de 10^6 copies/rxn à 10^1 copies/rxn. En ajustant les données Ct à une droite de régression linéaire, l'efficacité de l'amplification (R^2) et la pente ont été déterminées pour chacune des cibles.

Les résultats sont les suivants :

- Le FluA a montré une efficacité de 111,6 %, un R^2 de 0,999 et une pente de -3,072. (Figure 2 A et B)
- Le FluB a montré une efficacité de 140,2%, un R^2 de 0,979 et une pente de -2,628 (Figure 2 C et D)
- Le gène N(Sars-CoV2) a montré une efficacité de 120,1%, un R^2 de 0,996 et une pente de -2,919 (Figure 2 E et F)
- Le RSV a montré une efficacité de 140,8 %, un R^2 de 0,982 et une pente de -2,620. (Figure 2 G et H)

10.2 Spécificité analytique

La spécificité du test de la RT-PCR RESPI+ a été confirmée en testant des échantillons cliniques positifs pour différents micro-organismes représentant les pathogènes respiratoires les plus courants. Aucune réaction croisée n'a été détectée avec l'un des pathogènes suivants testés :

Test de réactivité croisée			
Adenovirus	-	Human coronavirus NL63	-
Human parainfluenza virus type 1	-	Human coronavirus HKU1	-
Human parainfluenza virus type 2	-	Human coronavirus 229E	-
Human parainfluenza virus type 3	-	Human bocavirus	-
Human parainfluenza virus type 4	-	Enterovirus	-
Human rhinovirus	-	<i>Bordetella pertussis</i>	-
Human metapneumovirus	-	<i>Bordetella parapertussis</i>	-
Human coronavirus OC43	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-

10.3 Sensibilité et spécificité cliniques

La capacité de diagnostic du kit RESPI +RT-PCR a été évaluée en étudiant sa sensibilité et sa spécificité diagnostique. Ces deux paramètres sont définis et calculés comme suit :

- La **spécificité diagnostique** est exprimée en pourcentage (fraction numérique multipliée par 100), calculée comme suit : $100 \times \frac{\text{nombre de valeurs négatives vraies (TN)}}{\text{nombre de valeurs négatives vraies (TN)} + \text{nombre de valeurs faussement positives (FP)}}$, ou $100 \times \text{TN} / (\text{TN} + \text{FP})$.
- La **sensibilité diagnostique** est exprimée en pourcentage (fraction numérique multipliée par 100), calculée comme suit : $100 \times \frac{\text{nombre de valeurs positives vraies (TP)}}{\text{nombre de valeurs positives vraies (TP)} + \text{nombre de valeurs négatives fausses (FN)}}$, ou $100 \times \text{TP} / (\text{TP} + \text{FN})$.

Dans une étude rétrospective, un total de 150 échantillons cliniques d'exsudats nasopharyngés provenant de l'hôpital Virgen de las Nieves (Grenade) et de l'hôpital Virgen del Rocío (Séville) ont été analysés. En cas de discordance, l'étude comparative a été réalisée en utilisant comme méthode de référence le kit « Respiratory Flow Chip Kit (Vitro. S.A.) » marqué CE-IVD.

Organisme	TN	FP	TP	FN	Spécificité du diagnostic	IC À 95	Sensibilité du diagnostic	IC À 95
SARS-CoV2	138	0	13	0	100.00%	96.62-100%	100.00%	71.65-100%
Grippe A	32	1	109	9	96.96%	82.48-99.84%	92.37%	85.61-96.23%
Grippe B	147	0	4	0	100.00%	96.82-100%	100.00%	39.57-100%
Virus respiratoire syncytial	135	0	15	1	100.00%	96.55-100%	93.75%	67.71-99.67%

Tableau 7. Spécificité et sensibilité cliniques du kit RT-PCR RESPI+.

11 LIMITES DU TEST

1. Les résultats du test doivent être évalués par un professionnel de santé dans le contexte des antécédents médicaux, des symptômes cliniques et des autres tests de diagnostic.
2. Ce test peut être utilisé avec différents types d'échantillons, bien qu'il n'ait été validé qu'avec de l'ARN extrait d'échantillons respiratoires (prélèvements nasopharyngés et oropharyngés).
3. Le bon fonctionnement du test dépend de la qualité de l'échantillon ; l'acide nucléique doit être correctement extrait des échantillons cliniques. Un prélèvement, un stockage et/ou un transport inappropriés des échantillons peuvent entraîner des faux négatifs.
4. Un faible nombre de copies de la cible, inférieur à la limite de détection, peut être détecté, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.











5. Un test positif pour FluA, FluB, RSV et/ou SARS-CoV-2 n'exclut pas la possibilité que d'autres agents pathogènes soient présents dans l'échantillon clinique.
6. Le test fonctionne dans les régions génomiques dans lesquelles les sondes ont été conçues. En raison de la grande variabilité de l'ARN, certains sous-types peuvent ne pas être détectés. Cependant, au moment de la conception, aucune mutation n'a été observée dans les régions cibles.
7. Un résultat négatif du test n'exclut pas la présence d'une infection par le FluA, le FluB, le RSV et/ou le SARS-CoV-2, et il ne doit pas être utilisé comme seule méthode de diagnostic pour établir un traitement ou une procédure de prise en charge du patient.
8. Un résultat négatif du test doit être analysé dans le contexte de l'histoire médicale du patient et de l'épidémiologie.

12 BIBLIOGRAPHIE

1. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/index.html>
2. Chan, J.F. et al. (2020). Amélioration du diagnostic moléculaire du 1. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/index.html>
2. Chan, J.F. et al. (2020). Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-N/He real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay validated in vitro and with clinical specimens. J Clin Microbiol. Mar 4.
3. Corman, V.M. et al. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time PCR. Eurosurveill.; 25(3):2000045.
4. Galanti M., et al. Longitudinal active sampling for respiratory viral infections across age groups. Influenza Other Respir Viruses. 2019;13(3):226-32.
5. Kampf G., et al. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. J Hosp Infect. 2020;104(3):246–51.
6. Killerby M.E., et al. Human coronavirus circulation in the United States 2014-2017. J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol. 2018;101:52- 6.
7. Lai, C.C., et al. (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and corona virus disease-2019 (COVID-19): the epidemic and the challenges. International journal of antimicrobial agents, p.105924.

8. Pan, Y. et al. (2020). Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. The Lancet Infectious Diseases.
9. Paules C.I., et al. Coronavirus Infections-More Than Just the Common Cold. JAMA. 2020-01-23
10. Wang, W. et al. (2020). Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. JAMA. Published online March 11.
11. World Health Organization. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases Interim guidance 19 March 2020. <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>.
12. World Health Organization. Novel Coronavirus (2019-nCoV). Situation Report –14. Data as reported by 3 February 2020. Available from https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200203-sitrep-14-ncov.pdf?sfvrsn=f7347413_2 Accessed February 2020.
13. Zhu N. et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. New England Journal of Medicine., 2020.

13 SYMBOLES UTILISES

	Dispositif médical de diagnostic in vitro		Date d'expiration
	Référence catalogue		Intervalle de température de conservation
	Numéro de lot		Fabricant
	Se référer au mode d'emploi		Contenu suffisant pour <n>tests
	Fiche de données de sécurité		Tenir à l'abri de la lumière

14 HISTORIQUE DE REVISION

Date	Description
2022-11-10	Date de création