RIDA®GENE Parainfluenza

REF PG5805

R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Allemagne
+49 (0) 61 51 81 02-0 / +49 (0) 61 51 81 02-20 / www.r-biopharm.com

1. Application

Pour usage diagnostique *in vitro*. Le test RIDA®GENE Parainfluenza, exécuté sur le Roche LightCycler® 480 II, est un test RT-PCR multiplexe en temps réel pour la détection qualitative directe et la différenciation de l'ARN des virus parainfluenza 1, parainfluenza 3 et parainfluenza 2/4 dans des frottis nasopharyngés humains non-traités provenant de personnes présentant des signes et des symptômes d'infection respiratoire aiguë.

Le test RIDA®GENE Parainfluenza est conçu pour étayer le diagnostic d'infections par le virus parainfluenza (parainfluenza 1, parainfluenza 3 et parainfluenza 2/4) chez des patients présentant des symptômes d'infection respiratoire conjointement à d'autres résultats cliniques et de laboratoire.
Des résultats négatifs n'excluent pas une infection par un virus parainfluenza (parainfluenza 1, parainfluenza 3 et parainfluenza 2/4) et ne doivent pas être utilisés comme seule base de diagnostic.

Ce produit est destiné à un usage professionnel.

2. Résumé et explication du test

Les virus parainfluenza humains (HPIV) sont des virus à ARN monocaténaires enveloppés de la famille des *Paramyxoviridae*[1-3]. Ils peuvent être à l'origine d'un certain nombre de maladies respiratoires, en infectant initialement l'épithélium mucociliaire pseudostratifié du nez et de l'oropharynx avant de se propager aux grandes et petites voies respiratoires[1]. Les HPIV sont la deuxième cause d'hospitalisation chez les enfants de moins de 5 ans[2] et sont responsables d'au maximum 17 % des hospitalisations[3].
Les HPIV peuvent être divisés génétiquement et antigéniquement en quatre sérotypes qui peuvent infecter l'homme : HPIV-1, HPIV-2, HPIV-3 et HPIV-4[1, 2]. Les HPIV-1 et -3 appartiennent au genre *Respirovirus*, tandis que les HPIV-2 et -4 sont classés dans le genre *Rubulavirus*[1, 3]. La présentation clinique varie d'un type à l'autre : Les HPIV-1 et -2 provoquent souvent le croup et des symptômes de type grippal, tandis que le HPIV-3 est souvent associé à la pneumonie et à la bronchiolite. Jusqu'à présent, le HPIV-4 n'est pas aussi bien caractérisé, mais on soupçonne qu'il a une présentation clinique similaire à celle du HPIV-3[2]. Même le schéma saisonnier est différent entre les quatre sérotypes : Le HPIV-1 survient généralement à l'automne des années impaires, tandis que le HPIV-2 survient à l'automne des années paires. Les infections à HPIV-3 se déclarent chaque année d'avril à juin[2] et sont, par conséquent, la principale cause d'infections cliniquement significatives parmi les virus parainfluenza[1]. Par exemple, 60 % des enfants âgés de 2 ans sont infectés par le HPIV-3, tandis que ce chiffre passe à 80 % chez les enfants de moins de 4 ans[3]. En général, les nourrissons, les jeunes enfants, les personnes âgées et les personnes immunodéprimées présentent un risque plus élevé d'infection grave par le HPIV, tandis que l'infection par le HPIV chez les adultes en bonne santé se limite habituellement à des symptômes légers des voies aériennes supérieures[2, 3].

Le HPIV est normalement transmis d'homme à homme par l'air lors de la toux et des éternuements, par un contact humain étroit ou par le contact de mains ou d'objets contenant le HPIV suivi d'un contact avec la bouche, les yeux ou le nez[4].

3. Principe du test

Le test RIDA®GENE Parainfluenza est une RT-PCR multiplexe en temps réel pour la détection qualitative directe et la différenciation du parainfluenza 1, parainfluenza 3 et parainfluenza 2/4 dans les frottis nasopharyngés humains.
Après l'isolement de l'ARN, les fragments génétiques spécifiques (s'ils sont présents) du parainfluenza 1, parainfluenza 3 et parainfluenza 2/4 (gène HN) sont amplifiés. Les séquences cibles amplifiées sont détectées à l'aide de sondes d'hydrolyse qui sont marquées avec un extincteur à une extrémité et avec un colorant fluorescent indicateur (fluorophore) à l'autre extrémité. Les sondes s'hybrident avec l'amplicon en présence d'une séquence cible. Pendant l'extension, la Taq-Polymerase sépare l'indicateur de l'extincteur. L'indicateur émet un signal fluorescent qui est détecté par l'unité optique d'un dispositif de PCR en temps réel. Le signal fluorescent augmente avec la quantité d'amplicons formés. Le test RIDA®GENE Parainfluenza contient un Internal Control RNA (ICR) pour contrôler la préparation de l'échantillon et/ou toute éventuelle inhibition de la PCR.

4. Contenu du paquet

Les réactifs fournis dans le kit permettent de faire 100 déterminations.

Tableau 1 : Contenu du paquet

RÉF.	Code du kit	Réactif	Quantité		Couleur du couvercle
PGZ5805RM	**1**	Reaction Mix	2 ×	1050 µL	jaune, prêt à l'emploi
PGZ5805EM	**2**	Enzyme Mix	1 ×	80 µL	rouge, prêt à l'emploi
PGZ5805IC	**R**	Internal Control RNA	2 ×	1700 µL	brun, prêt à l'emploi
PGZ5805NC	**N**	No Template Control	1 ×	450 µL	blanc, prêt à l'emploi
PGZ5805PC	**P**	Positive Control	1 ×	200 µL	bleu, prêt à l'emploi

5. Instructions de conservation

- Respecter les consignes de manipulation figurant dans le tableau 2 et stocker le kit directement après utilisation conformément aux instructions.
- Tous les réactifs doivent être conservés à l'abri de la lumière, à -20 °C et, s'ils ne sont pas ouverts, peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Tous les réactifs doivent être soigneusement décongelés avant leur utilisation (par ex., dans un réfrigérateur entre 2 °C - 8 C).
- Il est possible de congeler/décongeler les produits jusqu'à 20 fois sans altérer la propriété du test (au besoin, créer des aliquotes après la première décongélation et recongeler immédiatement les réactifs).
- Refroidir correctement tous les réactifs pendant la préparation de la PCR (2 C - 8 C).

Tableau 2 : Conditions de stockage et informations

	Température de conservation	**Durée maximale de stockage**
non ouvert	-20 °C	Utilisable jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette
ouvert	-20 °C	20 cycles de congélation-décongélation

6. Réactifs requis, mais non fournis

6.1 Contenu du paquet

Les réactifs suivants sont nécessaires pour réaliser le test RIDA®GENE Parainfluenza:

Réactifs
Eau de PCR (sans nucléase)

6.2 Matériel nécessaire

L'équipement suivant est nécessaire pour réaliser les tests RIDA®GENE Parainfluenza:

Matériel
Plateforme d'extraction : Instrument MagNA Pure 96 (Roche)
Instrument de PCR en temps réel : LightCycler® 480 II (Roche)
Le kit RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm) est nécessaire.
Consommables de PCR en temps réel (plaques (profil bas, puits blancs, support transparent), flacons de réaction, feuilles)
Centrifugeuse avec rotor pour plaques
Agitateur-mélangeur vortex
Pipettes (0,5 à 20 µL, 20 à 200 µL, 100 à 1 000 µL)
Pointes pour pipette dotées de filtres
Gants jetables non poudrés

Pour toute question concernant l'utilisation d'équipements pour le traitement automatisé, veuillez contacter R-Biopharm AG à l'adresse pcr@r-biopharm.de.

7. Mesures de précaution

Exclusivement réservé au diagnostic *in vitro*.
Ce test doit uniquement être réalisé par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux.
Le mode d'emploi du test doit être respecté à la lettre.
Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec les plaies et les membranes muqueuses.
Lors de la manipulation des réactifs et des échantillons, porter un équipement de protection individuelle (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue du test.
Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons sont manipulés.
Des pièces séparées, des vêtements spéciaux et des instruments pour l'extraction, la préparation de la PCR et la PCR doivent être utilisés pour éviter la contamination croisée et les résultats faux positifs.
Évitez de contaminer les échantillons et les composants du kit avec des microbes et des nucléases (DNase/RNase).
Les échantillons cliniques doivent être considérés comme du matériel potentiellement infectieux, de même que tous les réactifs et le matériel exposés à des échantillons potentiellement infectieux, et doivent être éliminés comme il se doit.
Ne pas échanger ou combiner les composants (mélange réactionnel, mélange enzymatique, ARN de contrôle interne, contrôle positif, contrôle sans modèle) d'un lot d'un kit avec les composants d'un autre lot.
Ne pas utiliser le kit après sa date de péremption. Après utilisation, les utilisateurs sont responsables de la mise au rebut appropriée de tous les réactifs et matériaux. Pour la mise au rebut, respecter les règlements nationaux.

Les matières dangereuses sont signalées conformément aux dispositions d'étiquetage obligatoires. Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS).

Pour les utilisateurs de l'Union européenne : signalez tout événement indésirable grave associé au produit à R-Biopharm AG et aux autorités nationales compétentes.

Le résumé de la sécurité et des performances (SSP) de ce produit sera disponible à l'adresse https://ec.europa.eu/tools/eudamed dès que la base de données européenne sur les dispositifs médicaux (EUDAMED) sera mise en place. Dans la base de données, recherchez le dispositif en utilisant l'UDI-DI figurant sur l'emballage extérieur du dispositif.

8. Prélèvement et conservation des échantillons

8.1 Préparation de l'ARN à partir de frottis nasopharyngés

Pour la préparation de l'ARN à partir de frottis nasopharyngés, il est recommandé d'utiliser le kit MagNA Pure 96 DNA/Viral NA SV sur l'instrument MagNA Pure 96 (Roche). Pour ce faire, utiliser le protocole Pathogen Universal 200 et éluer dans 50 µL. Il convient de respecter les instructions du fabricant.

Le test RIDA®GENE Parainfluenza comprend un Internal Control RNA qui indique une éventuelle inhibition de la PCR, vérifie l'intégrité des réactifs et confirme la réussite de l'extraction d'acides nucléiques. Le Internal Control RNA peut être utilisé uniquement comme un contrôle de l'inhibition ou comme un contrôle du processus (contrôle de l'inhibition et de l'extraction).

Si le Internal Control RNA est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition pour l'amplification, il convient d'en ajouter 1 µL au mélange maître (voir Tableau 4).

Si le Internal Control RNA est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la préparation de l'échantillon **et** comme contrôle de l'inhibition pour l'amplification, il convient d'en utiliser 20 µL pendant l'extraction. Si possible, il est recommandé de charger l'ARN de contrôle interne dans la cartouche d'échantillon avant d'ajouter l'échantillon. Il est recommandé de pipeter 1 µL de Internal Control RNA par réaction dans le mélange de PCR du contrôle négatif et du contrôle positif.

9. Réalisation du test

9.1 Préparation du mélange maître

Calculer le nombre total de réactions (échantillons et réactions de contrôle) nécessaires à la PCR. Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus à chaque exécution du test.

Il est recommandé d'ajouter 10 % de volume de mélange maître de plus afin de compenser la perte au pipetage (voir Tableaux 3 et 4). Avant utilisation, décongeler le Reaction Mix, le Enzyme Mix, le Positive Control, le No Template Control et le Internal Control RNA, les mélanger soigneusement (à l'exception du mélange enzymatique) et les centrifuger brièvement. Les réactifs doivent toujours être refroidis de manière appropriée pendant les étapes de travail (2 - 8 °C).

Tableau 3 : Exemple de calcul et de préparation du mélange maître pour 10 réactions (ICR pour extraction et contrôle de l'inhibition)

Code du kit	Composants du mélange maître	Quantité par réaction	10 réactions (plus 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µL	212,3 µL
2	Enzyme Mix	0,7 µL	7,7 µL
	Total	**20 µL**	**220 µL**

Mélanger le mélange maître, puis centrifuger brièvement.

Tableau 4 : Exemple de calcul et de préparation du mélange maître pour 10 réactions (ICR uniquement comme contrôle de l'inhibition)

Code du kit	Composants du mélange maître	Quantité par réaction	10 réactions (plus 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µL	212,3 µL
2	Enzyme Mix	0,7 µL	7,7 µL
R	Internal Control RNA	1,0 µL	11 µL
	Total	**21,0 µL**	**231,0 µL**

Mélanger le mélange maître, puis centrifuger brièvement.

9.2 Préparation du mélange pour la PCR

Pipeter 20 µL du mélange maître dans chaque flacon de réaction (plaques).

Contrôle négatif : Pipeter 5 µL de No Template Control dans le mélange maître pré-pipeté.

Remarque : Si le Internal Control RNA est utilisé comme un contrôle de l'extraction pour la préparation de l'échantillon et comme un contrôle de l'inhibition, il convient d'en ajouter 1 µL à chaque mélange de contrôle négatif pour la PCR.

Échantillons : Ajouter 5 µL d'éluat à chaque mélange maître pré-pipeté.

Contrôle positif : Ajouter 5 µL de Positive Control au mélange maître pré-pipeté correspondant.

Remarque : Si le Internal Control RNA est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition, il convient d'en ajouter 1 µL à chaque mélange de contrôle positif pour la PCR.

Fermer hermétiquement les plaques, les centrifuger brièvement à faible vitesse et les transférer vers un dispositif de PCR en temps réel. Démarrer la PCR selon la configuration de l'instrument de PCR (voir Tableaux 5 et 6).

9.3 Configuration de l'instrument de PCR

9.3.1 Profil universel de PCR en temps réel

Pour harmoniser les tests RIDA®GENE, le test RIDA®GENE Parainfluenza a été vérifié par rapport au profil universel. Il est ainsi possible de combiner les tests ADN et ARN entre eux. La transcription inverse arrive donc en premier dans le profil universel.

Tableau 5 : Profil universel de PCR en temps réel pour LightCycler® 480 II

Transcription inverse	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
PCR Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition/ vitesse de montée de température	Durée de conservation

Remarque : L'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

9.4 Réglage du canal de détection

Tableau 6 : Sélection des canaux de détection adéquats

Instrument de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Commentaire
Roche LightCycler® 480 II	Virus parainfluenza 1	465/510	**Le kit RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire.**
	ICR	533/580	
	Virus parainfluenza 3	533/610	
	Virus parainfluenza 2/4	618/660	

10. Contrôle qualité – signes d'instabilité ou de péremption des réactifs

Les échantillons sont évalués à l'aide du logiciel d'analyse du dispositif de PCR en temps réel, conformément aux instructions du fabricant. Le contrôle négatif et le contrôle positif doivent afficher les résultats corrects (voir tableau 7).

Le contrôle positif Positive Control est disponible à une concentration de 10^3 copies/µL. Chaque analyse par PCR utilise une quantité totale de 5 x 10^3 copies.

Tableau 7 : Pour être valide, une exécution de PCR doit remplir les conditions suivantes :

Échantillon	Résultat	Ct ICR	Gène Ct cible
Contrôle positif	+	SO *[1]	Voir le Certificate of Analysis
Contrôle négatif	-	Ct > 20	0

[1] Aucune valeur de Ct n'est requise pour obtenir un résultat positif de l'ICR pour le contrôle positif.

Si le contrôle positif n'est pas dans la plage de Ct spécifiée, mais que le contrôle négatif est valide, toutes les réactions doivent être de nouveau analysées, y compris les contrôles.

Si le contrôle négatif n'est pas négatif, mais que le contrôle positif est valide, toutes les réactions doivent être de nouveau analysées, y compris les contrôles.

Si les valeurs spécifiées ne sont pas obtenues, vérifier les points suivants avant de renouveler le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Capacité de fonctionnement de l'équipement utilisé
- Réalisation correcte du test

Si les conditions ne sont toujours pas satisfaites après avoir recommencé le test, consulter le fabricant ou un distributeur R-Biopharm local.

11. Interprétation des résultats

À l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode de référence ou de matériau de référence reconnu au niveau international pour la normalisation. La traçabilité métrologique des matériaux de contrôle par rapport aux normes internes de R-Biopharm AG repose sur des amplificateurs d'ARN spécifiques.

Pour de plus amples informations sur la traçabilité métrologique, veuillez contacter R-Biopharm AG.

Les valeurs corrigées, fluctuations et autres précisions figurent sur le certificat d'analyse (CoA) ci-joint.

Les données sont évaluées à l'aide du LightCycler® 480 II en utilisant la méthode du point d'ajustement. Les signaux supérieurs au seuil sont considérés comme un résultat positif.

Pour déterminer la limite de détection (LoD 95 %) (section 13.2.1), le seuil a été fixé comme suit :

Détection	Seuil élevé (% de fluorescence totale)
Virus parainfluenza 1	2,39 %
Virus parainfluenza 2	20,21 %
Virus parainfluenza 3	9,09 %
Virus parainfluenza 4A	6,62 %

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 8.

Tableau 8 : Interprétation des résultats*

Détection				
Virus parainfluenza 1	**Virus parainfluenza 3**	**Virus parainfluenza 2/4**	**ICD**	**Résultat**
+	-	-	**+/-**	**Virus parainfluenza 1 détectable**
-	**+**	-	**+/-**	**Virus parainfluenza 3 détectable**
-	-	**+**	**+/-**	**Virus parainfluenza 2/4 détectable**
+	**+**	-	**+/-**	**Virus parainfluenza 1 et Virus parainfluenza 3 détectables**
+	-	**+**	**+/-**	**Virus parainfluenza 1 et Virus parainfluenza 2/4 détectables**
-	**+**	**+**	**+/-**	**Virus parainfluenza 3 et Virus parainfluenza 2/4 détectables**
+	**+**	**+**	**+/-**	**Virus parainfluenza 1, parainfluenza 3, et Virus parainfluenza 2/4 détectables**
-	-	-	**+**	**Gènes cibles non détectables**
-	-	-	**-**	**Non valide**

* + = positif
- = négatif

Un échantillon est positif si l'ARN de l'échantillon et le Internal Control RNA présentent une amplification dans le système de détection.

Un échantillon est également considéré positif si l'ARN de l'échantillon présente une amplification, mais que le Internal Control RNA ne présente pas d'amplification dans le système de détection. La détection du Internal Control RNA n'est pas indispensable dans ce cas, car des concentrations élevées d'amplicons peuvent provoquer un signal faible ou absent du Internal Control RNA.

Un échantillon est estimé négatif si l'ARN de l'échantillon ne présente aucune amplification, mais en présente une pour le Internal Control RNA dans le système de détection. La détection du Internal Control RNA permet d'exclure toute inhibition de la réaction PCR.

Un échantillon est non valide si l'ARN de l'échantillon et le Internal Control RNA ne présentent aucune amplification dans le système de détection. Des inhibiteurs de la

PCR sont présents dans l'échantillon ou une erreur est survenue pendant le processus d'extraction.

12. Limites de la méthode

1. Le test RIDA®GENE Parainfluenza détecte l'ARN du parainfluenza 1, du parainfluenza 3 et du parainfluenza 2/4 dans les frottis nasopharyngés humains non traités. Ce test ne permet pas d'établir de rapport entre la valeur de Ct mesurée et la gravité des symptômes cliniques. Les résultats obtenus doivent toujours être interprétés au regard des symptômes cliniques dans leur ensemble.
2. Le diagnostic ne doit pas reposer uniquement sur le résultat du test de biologie moléculaire. Il doit toujours tenir compte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
3. Ce test est uniquement validé pour les frottis nasopharyngés.
4. Un échantillonnage, transport, stockage et traitement incorrects ou une charge pathogène inférieure à la sensibilité analytique du test peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
5. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut donner lieu à des résultats faux négatifs ou non valides.
6. À l'instar de tous les tests de diagnostic *in vitro* basés sur la PCR, des concentrations extrêmement faibles des séquences cibles sous la limite de détection (LoD 95 %) peuvent être détectées, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
7. Des mutations ou polymorphismes au niveau des sites de liaison des amorces ou des sondes peuvent empêcher la détection de nouveaux variants ou de variants inconnus et entraîner des résultats faux négatifs avec le test RIDA®GENE Parainfluenza.
8. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Un résultat positif indique que les gènes cibles (parainfluenza 1, parainfluenza 3, et parainfluenza 2/4 (gène HN)) sont présents.
9. Même en petites quantités, le sang humain et la paracodine (dihydrocodéine) peuvent avoir des propriétés interférentes. Le sang humain interfère à partir d'une concentration de 2,4 % [v/v]. La paracodine (dihydrocodéine) interfère à partir d'une concentration de 3 % [v/v].
10. Ce test doit être réalisé conformément aux Bonnes pratiques de laboratoire (BPL). L'utilisateur doit suivre avec précision les instructions du fabricant lors de l'exécution du test.

13. Performances

13.1 Performances cliniques d'analyse

13.1.1 Limite de détection (LoD 95 %)

La LoD a été déterminée en mesurant un échantillon de contrôle positif (frottis nasopharyngés négatifs, dopés) en cinq étapes de dilution (par incrément de 0,25 log) pour chaque cible et matrice, avec 20 répétitions par étape dans un lot. Cette analyse a été suivie d'une analyse probit. La LoD calculée a ensuite été confirmée à l'aide de 20 réplicats par cible et par matrice pour l'étape de dilution/concentration calculée.
Les souches suivantes ont été utilisées pour les tests :

Virus parainfluenza 1 : ZeptoMetrix (#0810014CF)
Virus parainfluenza 2 : ZeptoMetrix (#0810015CF)
Virus parainfluenza 3 : ZeptoMetrix (#0810014CF)
Virus parainfluenza 4a : ZeptoMetrix (#0810060CF)

Pour la détection de l'ARN du Virus parainfluenza 1, Virus parainfluenza 3 et Virus parainfluenza 2/4 en utilisant le test RIDA®GENE Parainfluenza, l'instrument MagNA Pure 96 et le LightCycler® 480 II, les limites de détection (LoD) suivantes ont été déterminées.
Les résultats de ces mesures sont indiqués dans le tableau 9.

Tableau 9 : Résultats de la limite de détection du test RIDA®GENE Parainfluenza pour les paramètres Parainfluenza 1, Parainfluenza 3, et Parainfluenza 2/4

	Virus parainfluenza 1	Virus parainfluenza 2	Virus parainfluenza 3	Virus parainfluenza 4
LoD	0,05 [$TCID_{50}$/mL]	354,00 [$TCID_{50}$/mL]	3,69 [$TCID_{50}$/mL]	67,61 [$TCID_{50}$/mL]

Pour le paramètre Parainfluenza 1 des frottis nasopharyngés, la LoD a été déterminée à 0,05 |$TCID_{50}$/mL].

Pour le paramètre Parainfluenza 2 des frottis nasopharyngés, la LoD a été déterminée à 354,00 |$TCID_{50}$/mL].

Pour le paramètre Parainfluenza 3 des frottis nasopharyngés, la LoD a été déterminée à 3,69 |$TCID_{50}$/mL].

Pour le paramètre Parainfluenza 4 du frottis nasopharyngé, la LoD a été déterminée à 67,61 $TCID_{50}$/mL].

13.1.2 Limite de détection du dispositif

Pour déterminer la limite de détection du dispositif, 20 réplicats d'un échantillon de contrôle (50 copies/réaction) ont été mesurés avec le LightCycler® 480 II. Tous les réplicats ont été positifs.

La limite de détection du dispositif est donc de 50 copies/réaction.

13.1.3 Spécificité analytique

Substances interférentes

La présence d'inhibiteurs de la PCR en temps réel et de substances interférentes peut donner lieu à des résultats faux négatifs ou non valides. De ce fait, les effets de diverses substances ont été étudiés, compte tenu de leur utilisation répandue en cas d'infections respiratoires ou de leur présence répandue dans les échantillons correspondants.
Les substances susceptibles de modifier sensiblement les résultats du test ont d'abord été examinées au moyen d'un test d'interférence. Plusieurs substances susceptibles d'être présentes soit en tant que résidus de l'extraction, soit en raison de leur utilisation largement répandue pour traiter les infections respiratoires (différents traitements pharmaceutiques ou médicaments sur ordonnance), soit en raison de leur présence répandue dans les échantillons de contrôle correspondants (par exemple, les mucines à la surface des muqueuses ou le sang), ont été initialement examinées à des concentrations élevées (trois fois la dose quotidienne ou simulation du cas le plus défavorable). Si une interférence potentielle était trouvée lors de ce test d'interférence pour une substance examinée, une relation dose-effet était établie entre la concentration de la substance en question et l'interférence. Aucune interférence n'a été identifiée pour les autres substances figurant dans le tableau 10.

Tableau 10 : Substances potentiellement interférentes

Substance potentiellement interférente	Concentration
Amoxicilline	1 mg/mL
Éthanol*	5 % [v/v]
Chlorhydrate de guanidine*	5 % (p/v)
Mucine	60 µg/mL
Mucosolvan	10 % [v/v]
Nasivine/oxymétazoline	10 % [v/v]
Chlorure de sodium	10 % [v/v]
Oséltamivir	25 mg/mL
Paracétamol	10 mg/mL

* en fonction du volume de l'éluat

Des effets inhibiteurs ont été observés pour le sang humain (2,4 %) et la paracodine (dihydrocodéine) (3 %) (voir les limites de la méthode).

Réactivité croisée

Divers organismes communément trouvés dans les frottis nasopharyngés (bactéries, parasites, champignons et virus) ont été examinés. Les micro-organismes étudiés dans le cadre de ce test ont été sélectionnés soit en raison de leur présence naturelle dans les frottis nasopharyngés, soit en raison des symptômes qu'ils provoquent en tant que pathogènes respiratoires. Des cultures bactériennes, fongiques ou virales, des surnageants de cultures bactériennes, fongiques ou virales et des normes LGC et NIBSC des organismes respectifs ont été utilisés pour les analyses.

La PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Parainfluenza est spécifique pour le Virus parainfluenza 1, le Virus parainfluenza 3 et le Virus parainfluenza 2/4. Aucune réactivité croisée avec les espèces suivantes n'a été décelée (voir tableau 11) :

Tableau 11 : Organismes présentant une possibilité de réaction croisée

Organisme	Résultats du test*		
	Virus parainfluenza 1	**Virus parainfluenza 3**	**Virus parainfluenza 2/4**
Adénovirus 7, humain, souche Gomen	-	-	-
Adénovirus 1, humain, souche Adénoïde 71	-	-	-
Bordetella pertussis Tohama 1	-	-	-
Candida albicans	-	-	-
Chlamydia pneumoniae	-	-	-
Entérovirus, type 71	-	-	-
Virus d'Epstein-Barr souche B95-8	-	-	-
Haemophilus influenzae	-	-	-
Coronavirus humain 229E	-	-	-
Coronavirus humain OC43	-	-	-
Coronavirus humain NL63	-	-	-
Metapneumovirus humain	-	-	-
Grippe A H1N1 Brisbane/59/07	-	-	-
Grippe A H3N2 Texas/50/12	-	-	-
Virus de la grippe B/Washington/02/2019	-	-	-
Virus de la grippe B/Colorado/6/2017	-	-	-
Lactobacillus acidophilus	-	-	-
Lactobacillus crispatus souche VPI3199	-	-	-
Legionella pneumophila	-	-	-
MERS-CoV	-	-	-
Moraxella catarrhalis	-	-	-
Mycoplasma pneumoniae souche FH d'Eaton Agent	-	-	-
Pneumocystis jirovecii (contrôle d'analyse externe de recombinant NATtrol)	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa	-	-	-
Rhinovirus 1A souche MRC-5	-	-	-
VRS A souche Long	-	-	-

VRS (souche 9320)	-	-	-
SARS	-	-	-
Staphylococcus aureus	-	-	-
Staphylococcus epidermidis	-	-	-
Streptococcus salivarius	-	-	-
Streptococcus pneumoniae (NCTC 7465)	-	-	-
Streptococcus pyogenes	-	-	-

* - = négatif

13.1.4 Précision

La précision du test de PCR en temps réel RIDA®GENE Parainfluenza a été déterminée pour les niveaux de considération suivants.

Précision *intra*-essai : déterminée sur 5 échantillons de contrôle, à raison de 20 réplicats par échantillon, sur le LightCycler® 480 II dans des conditions identiques.

Précision *inter*-essais : déterminée sur 5 échantillons de contrôle testés en double au cours de 20 analyses réalisées sur 10 jours (2 analyses par jour) par différents opérateurs dans des conditions reproductibles.

Précision *inter*-lots : les tests de précision intra et inter-essais ont été réalisés à l'aide de trois lots différents.

Les données relatives à la précision ont été obtenues en utilisant cinq échantillons de contrôle, ainsi que le PTC et le NTC du test.

Les coefficients de variation obtenus pour chaque mesure à l'aide du test de PCR en temps réel RIDA®GENE Parainfluenza sur le LightCycler® 480 II étaient inférieurs à 3,06 %.

Tableau 12 : Résultats de précision pour le test RIDA®GENE Parainfluenza pour le parainfluenza 1.

Ct Valeur moyenne / CV		*Intra*-test			*Inter*-test			*Inter*-lots
		Lot de la trousse 1	Lot de la trousse 2	Lot de la trousse 3	Lot de la trousse 1	Lot de la trousse 2	Lot de la trousse 3	Lots des trousses 1 à 3
1	Ct	-	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o
2	Ct	30,9	30,7	30,8	30,8	30,6	30,5	30,6
	CV (%)	0,68 %	0,78 %	0,82 %	1,06 %	1,07 %	1,01 %	1,11 %
3	Ct	31,1	30,7	30,9	30,6	30,5	30,5	30,6
	CV (%)	0,91 %	1,06 %	1,13 %	1,19 %	0,91 %	0,90 %	0,99 %
4	Ct	27,3	27,0	27,1	26,9	26,9	27,0	26,9
	CV (%)	0,57 %	1,09 %	0,70 %	1,28 %	1,39 %	1,30 %	1,32 %
5	Ct	23,4	23,7	23,8	23,7	23,6	23,7	23,6
	CV (%)	0,87 %	1,19 %	0,65 %	1,39 %	1,51 %	1,25 %	1,39 %

Tableau 13 : Résultats de précision pour le test RIDA®GENE Parainfluenza pour le parainfluenza 3.

Ct Valeur moyenne/ CV		*Intra*-test			*Inter*-test			*Inter*-lots
		Lot de la trousse 1	Lot de la trousse 2	Lot de la trousse 3	Lot de la trousse 1	Lot de la trousse 2	Lot de la trousse 3	Lot des trousses 1 à 3
1	Ct	-	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o
2	Ct	31,3	31,1	30,8	30,8	30,8	30,5	30,7
	CV (%)	0,74 %	1,03 %	1,30 %	1,55 %	1,37 %	1,16 %	1,45 %
3	Ct	32,2	31,9	31,7	31,3	31,6	31,5	31,5
	CV (%)	0,92 %	1,33 %	1,03 %	2,04 %	1,39 %	1,44 %	1,69 %
4	Ct	26,0	25,7	25,5	25,0	25,4	25,2	25,2
	CV (%)	1,06 %	1,57 %	1,17 %	2,78 %	2,61 %	1,85 %	2,51 %
5	Ct	22,5	22,7	21,9	21,8	22,0	21,9	21,9
	CV (%)	1,12 %	1,48 %	1,39 %	2,63 %	2,32 %	1,98 %	2,35 %

Tableau 14 : Résultats de précision pour le test RIDA®GENE Parainfluenza pour le parainfluenza 2/4.

Ct Valeur moyenne/ CV		*Intra*-test			*Inter*-test			*Inter*-lots
		Lot de la trousse 1	Lot de la trousse 2	Lot de la trousse 3	Lot de la trousse 1	Lot de la trousse 2	Lot de la trousse 3	Lot des trousses 1 à 3
1	Ct	-	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o
2	Ct	31,6	32,0	31,6	32,1	31,5	31,6	31,7
	CV (%)	1,29 %	1,44 %	2,46 %	1,55 %	2,02 %	1,90 %	2,05 %
3	Ct	31,9	32,2	32,2	31,8	31,9	31,8	31,8
	CV (%)	1,88 %	3,06 %	2,60 %	2,11 %	2,12 %	2,30 %	2,14 %
4	Ct	27,0	26,9	26,8	26,5	26,6	26,9	26,7
	CV (%)	1,48 %	2,66 %	2,42 %	2,46 %	2,92 %	2,13 %	2,56 %
5	Ct	22,7	23,6	23,3	23,2	23,1	23,1	23,1
	CV (%)	1,30 %	2,05 %	2,03 %	1,90 %	2,86 %	2,28 %	2,38 %

13.1.5 Réactivité analytique

La réactivité du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Parainfluenza a été examinée en utilisant différentes souches de parainfluenza (voir tableau 15).

Tableau 15 : Test de la réactivité analytique

Souche	Concentration	Résultat*		
		Virus parainfluenza 1	Virus parainfluenza 3	Virus parainfluenza 2/4
Virus parainfluenza 1 C35	0,417 ng	**+**	-	-
Virus parainfluenza 2 Greer	0,01005 ng	-	-	**+**
Virus parainfluenza 3 C243	0,0201 ng	-	**+**	-
Virus parainfluenza 4a M-25	$10^{3.25}$ $TCID_{50}$/0,2 mL	-	-	**+**
Virus parainfluenza 4b CH 19503	1,524 ng	-	-	**+**

* + = positif
- = négatif

14. Historique des versions

Numéro de version	Section et désignation
2021-10-27	Version précédente
2022-01-20	Révision générale : 4. Contenu du paquet

15. Signification des symboles

Symboles généraux

IVD	Pour usage diagnostique in vitro
	Respecter le manuel d'utilisation
LOT	Numéro de lot
	Date de péremption
	Température de conservation
REF	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

Symboles spécifiques au test

Reaction Mix	Mélange réactif
Enzyme Mix	Mélange d'enzymes
Internal Control RNA	Contrôle de l'extraction/inhibition
No Template Control	Contrôle négatif
Positive Control	Contrôle positif

16. Bibliographie

1. Russell E, Ison MG. Parainfluenza Virus in the Hospitalized Adult. Clin Infect Dis. 2017;65(9):1570-6.

2. DeGroote NP, Haynes AK, Taylor C, Killerby ME, Dahl RM, Mustaquim D, et al. Human parainfluenza virus circulation, United States, 2011-2019. J Clin Virol. 2020;124:104261.

3. Pawełczyk M, Kowalski ML. The Role of Human Parainfluenza Virus Infections in the Immunopathology of the Respiratory Tract. Curr Allergy Asthma Rep. 2017;17(3):16.

4. Centers for Disease Control and Prevention. Human Parainfluenza Viruses (HPIVs) - Transmission 2019 [Available from: https://www.cdc.gov/parainfluenza/about/transmission.html.] 15.10.2021