

RIDA® GENE Flu & RSV

REF PG0545



1. Application

Pour le diagnostic in vitro. Le test RIDA®GENE Flu & RSV, exécuté sur le Roche LightCycler® 480II, est un test de RT-PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe et la différenciation de l'ARN du virus de la grippe (grippe A et grippe B) et de l'ARN du virus respiratoire syncytial (VRS A et B) dans des frottis nasaux/de gorge humains et de LBA provenant de personnes présentant des signes et des symptômes d'infection respiratoire aiguë.

Le test RIDA®GENE Flu & RSV est conçu pour étayer le diagnostic différentiel d'infections causées par les virus grippaux (grippe A et grippe B) et les virus respiratoires syncytiaux (VRS A et B) chez les 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 des virus grippaux (grippe A, grippe B) ou des virus respiratoires syncytiaux (VRS A et B) et ne doivent pas être utilisés comme seule base de diagnostic. L'utilisation de ce produit est réservée aux professionnels travaillant dans des laboratoires hospitaliers, des laboratoires de référence, des laboratoires privés ou des laboratoires publics.

2. Résumé et explication du test

Causée par des virus grippaux, la grippe est l'une des maladies respiratoires infectieuses les plus importantes.

Trois à cinq millions de personnes dans le monde contractent la grippe chaque année et environ 290 000 à 650 000 personnes en meurent. Les épidémies de grippe annuelles peuvent avoir des répercussions majeures sur le système de santé et l'économie¹.

En Allemagne, on estime à environ 3,8 millions le nombre de consultations médicales liées à la grippe pendant la saison 2018/2019. Le nombre d'hospitalisations liées à la grippe en provenance de cabinets de médecine générale a été estimé à 18 000 cas². Le Groupe de travail sur la grippe (AGI) de l'Institut Robert Koch estime que le nombre de consultations médicales liées à la grippe est compris entre un et sept millions par an. Lors des vagues sévères de grippe, telles que celle de la saisons 2012/2013, les estimations s'élevaient à 30 000 hospitalisations et à 20-25 000 décès liés à la grippe. En revanche, lors des saisons plus clémentes (comme en 2013/2014), seules 3 000 hospitalisations ont été constatées, et aucune surmortalité associée à la grippe n'a été détectée³.

Les virus grippaux sont des virus à ARN appartenant à la famille des orthomyxovirus et sont divisés en sous-types A, B et C. Les virus grippaux se caractérisent par la grande variabilité de leurs antigènes de surface, l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA), due à des mutations (dérive antigénique). Les types de grippe A et B provoquent les épidémies annuelles de grippe, tandis que les infections par les virus grippaux C ne provoquent qu'une maladie bénigne.

Sur le plan épidémiologique, les virus de la grippe A sont les plus importants en raison de leur diversité: ils sont responsables de trois pandémies survenues au XXe

siècle, ainsi que de la plupart des épidémies de grippe. Chez les humains, la plupart des infections grippales de type A sont causées par les sous-types H1N1 et H3N2. À la dérive antigénique résultant des mutations s'ajoute le fait que la fusion de souches de grippe A humaines et non humaines peut entraîner la formation de nouveaux sous-types de grippe A (dérive antigénique), ce qui peut déclencher une pandémie. Le sous-type H1N1 de la grippe A est associé à des pandémies de grippe antérieures et potentiellement nouvelles (par exemple, la grippe espagnole en 1918/1919 et la grippe porcine en 2009). Aujourd'hui, ce sous-type de la grippe A est appelé H1N1v. Les virus grippaux sont transmis par gouttelettes et aérosols. La période d'incubation peut être d'environ un à quatre jours. Touchant principalement les voies respiratoires, les symptômes cliniques sont graves et généralement accompagnés de toux et d'une forte fièvre. Ces virus se caractérisent par une apparition soudaine des symptômes. En cas d'évolution vers une maladie grave, des pneumonies et des surinfections bactériennes peuvent survenir et s'avérer mortelles, en particulier pour les personnes âgées et les enfants⁴.

Les virus respiratoires syncytiaux (VRS) appartiennent à la famille des *Pneumoviridae* et sont des virus enveloppés à ARN simple brin (ARNsb). Deux groupes de VRS circulent: A et B, alors que le VRS A est prédominant la plupart du temps⁵.

Le VRS est un pathogène mondial répandu et peut provoquer des maladies des voies respiratoires supérieures et inférieures à tout âge de la vie. Chez les nourrissons, en particulier les bébés prématurés et les tout-petits, le VRS est l'un des agents pathogènes les plus importants des infections des voies respiratoires⁵. Le VRS est transmis via une infection par contact ou par gouttelettes et se manifeste par des symptômes tels que rhinite, rhume, toux, bronchite aiguë, voire infection de l'oreille moyenne. Une évolution vers une forme aiguë de la maladie peut survenir en cas de surinfection bactérienne⁶. Les tout-petits et les nourrissons présentent souvent des formes graves qui nécessitent une hospitalisation. Les symptômes comprennent fièvre, congestion nasale et tachypnée. Selon les estimations, l'incidence des infections par le VRS dans le monde est de 48,5 cas et 5,6 cas graves pour 1 000 enfants au cours de la première année de vie. Si 50 à 70 % des nourrissons et des tout-petits présentent une infection par le VRS au cours de leur première année de vie, près de 100 % sont touchés par cette infection après leur deuxième année de vie⁵.

3. Principe du test

Le test RIDA®GENE Flu & RSV est un test de RT-PCR en temps réel multiplex pour la détection qualitative directe et la différenciation de l'ARN du virus de la grippe (grippe A et grippe B) et de l'ARN du virus respiratoire syncytial (VRS A et B) dans des frottis nasaux et de gorge humains et de LBA (voir Section 9.4). La détection se fait dans un format de RT-PCR en temps réel en une seule étape: la transcription inverse (RT) et la PCR ultérieure se produisent dans le même flacon de réaction. Pendant le processus, l'ARN isolé est transcrit en ADNc à l'aide d'une transcriptase

inverse. Les fragments de gènes spécifiques de la grippe A, la grippe B et le VRS (grippe A/B: gène M et gène NP1 ; VRS: gène F) sont alors amplifiés par PCR en temps réel. 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 Flu & RSV 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

Tableau 1: Contenu du paquet (les réactifs fournis dans le kit permettent de réaliser 100 déterminations.)

Code du kit	Réactif	Quantité		Couleur du couvercle
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	Jaune
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	Rouge
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	Brun
N	No Template Control	1x	450 µl	Blanc
P	Positive Control	1x	200 µl	Bleu

5. Instructions de conservation

- Tous les réactifs doivent être conservés à -20 °C et à l'abri de la lumière 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 et 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 à 8 °C).

6. Réactifs requis, mais non fournis

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Flu & RSV a été testé à l'aide de la combinaison suivante de plateforme d'extraction et d'instrument de PCR en temps réel:

Tableau 2a: Matériel nécessaire (vérifié)

Tampon d'extraction	
Promega	Maxwell® RSC
Dispositifs de PCR en temps réel	
Roche	LightCycler® 480II

De plus, le test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Flu & RSV est compatible avec la plateforme d'extraction et les instruments de PCR en temps réel suivants:

Tableau 2: Matériel nécessaire (compatible)

Tampon d'extraction	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Dispositifs de PCR en temps réel	
R-Biopharm	RIDA®CYCLER
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500 Fast Dx
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Remarque: en cas d'utilisation du Rotor-Gene Q (QIAGEN), utiliser uniquement des flacons de réaction de 0,1 ml.

Si vous devez utiliser d'autres procédures d'extraction ou dispositifs de PCR en temps réel, contactez R-Biopharm à l'adresse mdx@r-biopharm.de pour en vérifier la compatibilité.

- Système de prélèvement sur écouvillons stériles (p. ex., milieu eSwab® Amies, Copan Diagnostic Inc.)
- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) lors de l'utilisation avec l'appareil LightCycler® 480II
- Consommables de PCR en temps réel (plaques, flacons de réaction, films)
- Centrifugeuse avec rotor pour les flacons ou les plaques de réaction
- 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
- Eau de PCR (sans nucléase)

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.
- Les instructions d'exécution du test doivent être respectées 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.
- L'extraction, la préparation de la PCR et l'exécution de la PCR doivent être effectuées dans des salles différentes afin d'éviter toute contamination croisée.
- 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.
- Éliminer le kit de test à l'échéance de la 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.

Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur www.r-biopharm.com.

8. Prélèvement et conservation des échantillons

8.1 Préparation de l'ARN à partir de frottis nasaux et de gorge

Un kit d'extraction d'acides nucléiques disponible dans le commerce (par ex., RIDA® Xtract [R-Biopharm]) ou un système d'extraction d'acides nucléiques (par ex., Maxwell® RSC [Promega]) est recommandé pour la préparation de l'ARN à partir de frottis nasaux et de gorge. Il convient de respecter les instructions du fabricant.

Il est recommandé d'utiliser la quantité de milieu spécifiée par le fabricant dans le kit d'extraction d'acide nucléique ou le système d'extraction d'acide nucléique, et de suivre les instructions du fabricant. Le test RIDA®GENE Flu & RSV 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 de l'extraction pour la préparation des échantillons en plus d'un contrôle de l'inhibition.

Si le **Internal Control RNA** est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange maître pour chaque réaction (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, il convient d'en utiliser 20 µl pour chaque échantillon pendant l'extraction. Le **Internal Control RNA** doit toujours être ajouté au mélange spécimen-tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon. Il est recommandé de pipeter 1 µl de **Internal Control RNA** par réaction dans le mélange pour la PCR pour le contrôle négatif et le contrôle positif.

8.2 Préparation de l'ARN à partir de LBA

Un kit d'extraction d'acides nucléiques disponible dans le commerce (par ex., RIDA® Xtract [R-Biopharm]) ou un système d'extraction d'acides nucléiques (par ex., Maxwell® RSC [Promega]) est recommandé pour la préparation de l'ARN à partir de LBA. Il convient de respecter les instructions du fabricant.

Il est recommandé d'utiliser la quantité de milieu spécifiée par le fabricant dans le kit d'extraction d'acide nucléique ou le système d'extraction d'acide nucléique, et de suivre les instructions du fabricant. Le test RIDA®GENE Flu & RSV 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 de l'extraction pour la préparation des échantillons en plus d'un contrôle de l'inhibition.

Si le **Internal Control RNA** est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange maître pour chaque réaction (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, il convient d'en utiliser 20 µl pour chaque échantillon pendant l'extraction. Le **Internal Control RNA** doit toujours être ajouté au mélange spécimen-tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon. Il est recommandé de pipeter 1 µl de **Internal Control RNA** par réaction dans le mélange pour la PCR pour le contrôle négatif et le 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. Toujours refroidir les réactifs correctement pendant les étapes de travail (2 à 8 °C).

Tableau 3: Exemple de calcul et de préparation du mélange maître pour dix (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 production du mélange maître pour dix (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 (flacon/plaque).

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 au mélange de contrôle négatif pour la RT-PCR.

Échantillons: Ajouter 5 µl d'éluat au mélange maître pipeté au préalable.

Contrôle positif: Ajouter 5 µl de **Positive Control** au mélange maître pipeté au préalable.

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 au mélange de contrôle positif pour la RT-PCR.

Fermer hermétiquement les flacons ou les plaques de réaction, 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, 6, 7 et 8).

9.3 Configuration de l'instrument de PCR

9.3.1 Profil universel de RT-PCR en temps réel

Tableau 5: Profil universel de la RT-PCR en temps réel pour la série LightCycler® et RIDA®CYCLER

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

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

Tableau 6: Profil universel de RT-PCR en temps réel pour Mx3005P, ABI 7500 Fast Dx, Rotor-Gene Q et CFX96™

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition/ vitesse de montée de température	Maximale

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

Remarque: Le profil universel de PCR en temps réel peut aussi être utilisé pour les tests d'ADN si les tests de PCR en temps réel RIDA®GENE DNA et RIDA®GENE RNA sont combinés dans un même test.

9.4 Réglage du canal de détection

Tableau 7: Sélection des canaux de détection adéquats

Dispositif de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Commentaire
R-Biopharm RIDA®CYCLER	VRS A/B	Vert	-
	ICR	Jaune	
	Grippe B	Orange	
	Grippe A	Rouge	
Roche LightCycler® 48 0II	VRS A/B	465/510	Le kit RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire.
	ICR	533/580	
	Grippe B	533/610	
	Grippe A	618/660	
Agilent Technologies Mx3005P	VRS A/B	FAM	Régler le colorant de référence sur aucun.
	ICR	HEX	
	Grippe B	ROX	
	Grippe A	Cy5	
ABI 7500 Fast Dx	VRS A/B	FAM	Régler le colorant de référence passif ROX sur aucun.
	ICR	VIC	
	Grippe B	ROX	
	Grippe A	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	VRS A/B	FAM	-
	ICR	VIC	
	Grippe B	ROX	
	Grippe A	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	VRS A/B	Vert	Les réglages de gain doivent être définis sur 5 (valeur par défaut d'usine) pour tous les canaux.
	ICR	Jaune	
	Grippe B	Orange	
	Grippe A	Rouge	

10. Contrôle qualité

Les échantillons sont évalués à l'aide du logiciel d'analyse du dispositif de PCR en temps réel correspondant conformément aux instructions du fabricant. Les contrôles négatif et positif doivent afficher des résultats corrects (voir Tableau 8, Figures 1, 2 et 3).

Le contrôle positif **Positive Control** a une concentration de 10^3 copies/ μ l. Chaque analyse par PCR utilise une quantité totale de 5×10^3 copies.

Tableau 8: Pour être valide, une exécution de PCR doit remplir les conditions suivantes:

Échantillon	Résultat	Ct ICR	Gène Ct cible
Contrôle positif	Positif	SO *1	Voir Certificat d'assurance qualité
Contrôle négatif	Négatif	Ct > 20	Non détectable

**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

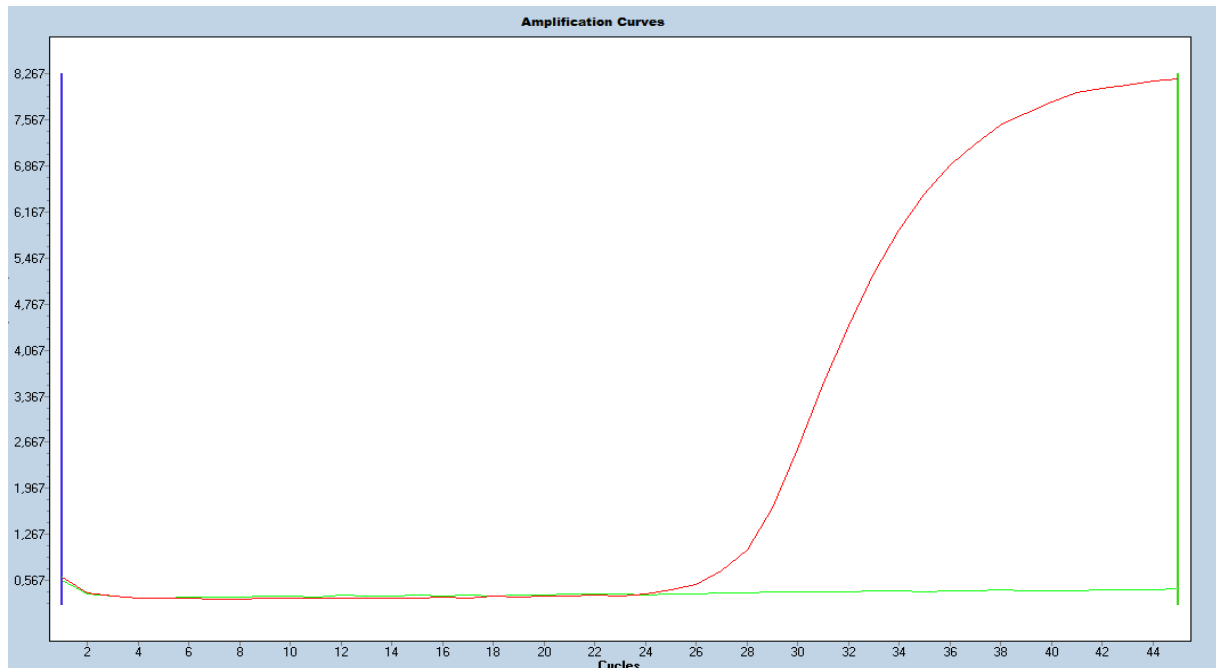


Figure 1: Exécution correcte des contrôles (VRS) positif (rouge) et négatif (vert) sur le LightCycler® 480II

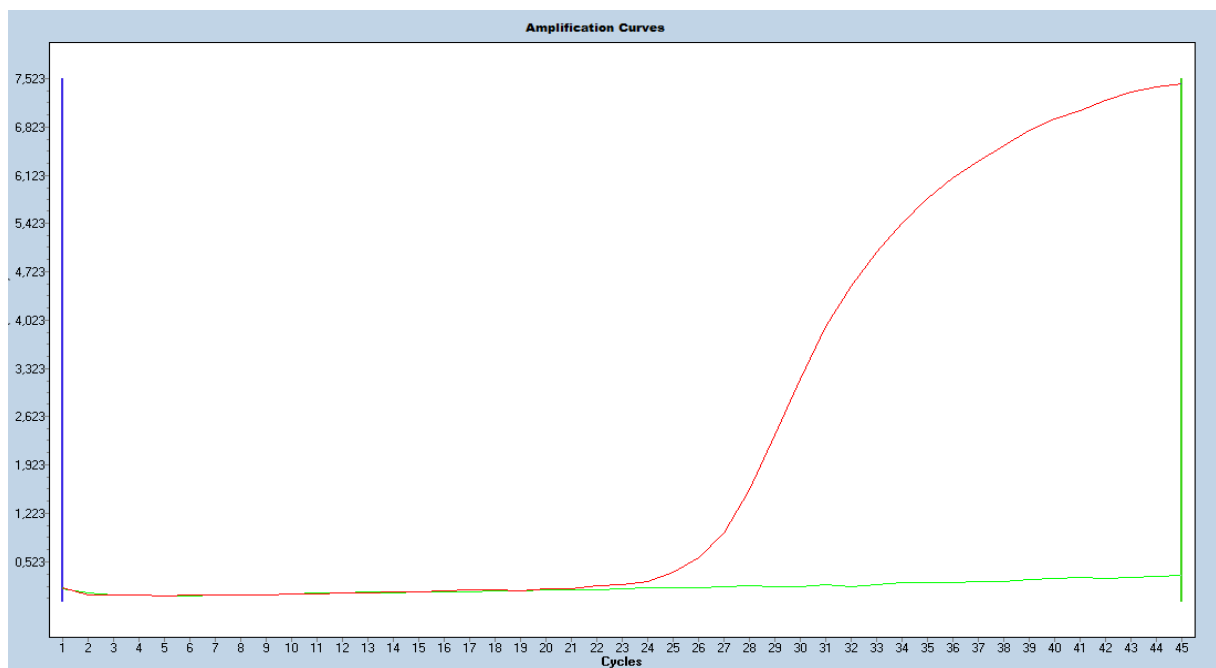


Figure 2: Exécution correcte des contrôles (grippe B) positif (rouge) et négatif (vert) sur le LightCycler® 480II

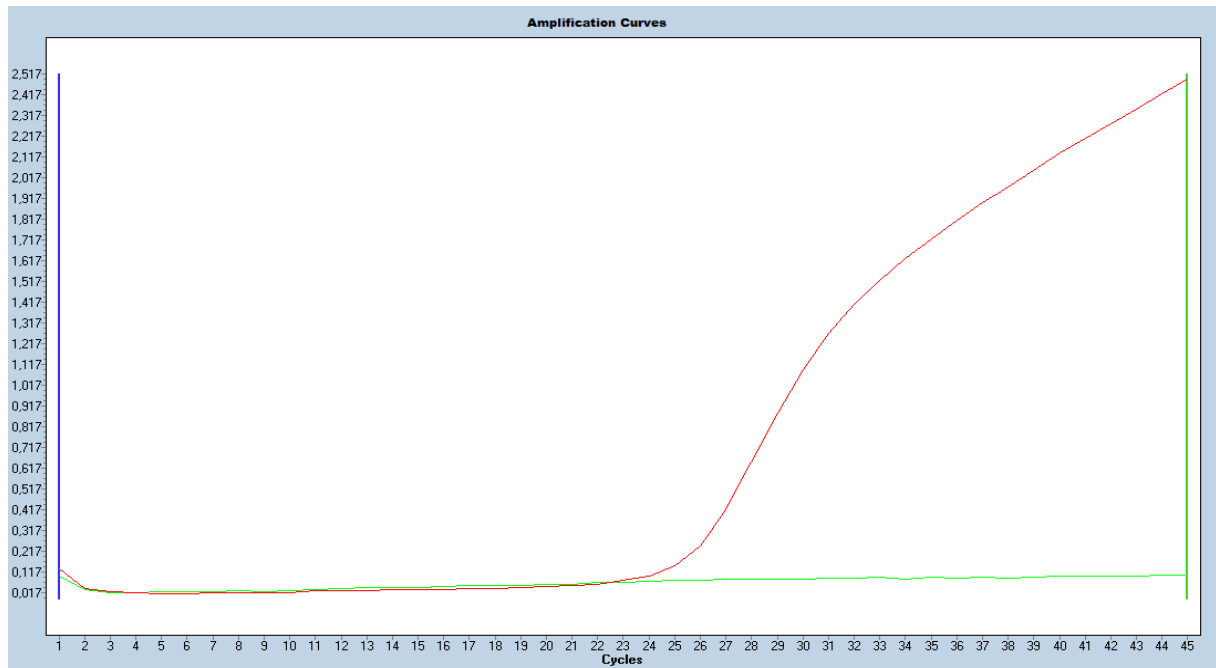


Figure 3: Exécution correcte des contrôles (grippe A) positif (rouge) et négatif (vert) sur le LightCycler® 480II

11. Interprétation des échantillons

Les résultats sont interprétés conformément au Tableau 9.

Tableau 9: Interprétation des échantillons

Détection			ICR	Résultat
Gène F (VRS A/B)	Gène NP1 (grippe B)	Gène M (grippe A)		
positif	négatif	négatif	positif/négatif	VRS détectable
négatif	positif	négatif	positif/négatif	Grippe B détectable
négatif	négatif	positif	positif/négatif	Grippe A détectable
positif	positif	négatif	positif/négatif	VRS et grippe B détectables
positif	négatif	positif	positif/négatif	VRS et grippe A détectables
négatif	positif	positif	positif/négatif	Grippe B et grippe A détectables
positif	positif	positif	positif	Grippe A, grippe B et VRS détectables
négatif	négatif	négatif	positif	Gène cible non détectable
négatif	négatif	négatif	négatif	Non valide

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

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

Un échantillon est négatif si l'ARN de l'échantillon ne présente pas de signal d'amplification dans le système de détection, mais en présente un visible pour le Internal Control RNA. Une inhibition de la réaction de PCR peut être exclue par la détection du Internal Control RNA.

Un échantillon est non valide si l'ARN de l'échantillon et le Internal Control RNA ne présentent aucun signal d'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. L'échantillon extrait doit être dilué à 1/10 avec de l'eau de PCR et de nouveau amplifié, ou il convient d'améliorer l'isolation et la purification de l'échantillon.

12. Limites de la méthode

1. Ce test est destiné uniquement aux frottis nasaux/de gorge et de LBA.
2. Un prélèvement, échantillonnage, transport, stockage et traitement incorrects du spécimen ou une charge en agents pathogènes inférieure à la sensibilité analytique du test peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
3. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut empêcher l'évaluation des résultats.
4. Des mutations ou polymorphismes au niveau des sites de liaison de l'amorce ou de la sonde peuvent empêcher la détection de nouveaux variants ou de variants inconnus et entraîner des résultats faux négatifs avec le test RIDA®GENE Flu & RSV.
5. 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 (LDD) peuvent être détectées, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
6. Ce test ne peut pas être utilisé pour détecter les virus de la grippe C.
7. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes capables de se reproduire sont présents. Un résultat positif indique que les gènes cibles (grippe A/B): gène M et gène NP1 ; VRS: gène F) sont présents.
8. À une concentration testée de 3,0 % et plus, la paracodéine présente un effet inhibiteur.
9. À une concentration testée de 17,5 mg/ml et plus, la ciprofloxacine présente un effet inhibiteur.

13. Performances

13.1 Sensibilité analytique

La limite de détection du test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Flu & RSV est de ≥ 50 copies d'ARN/réaction pour le VRS, la grippe B et la grippe A.

Les Figures 4, 5 et 6 ci-dessous illustrent une série de dilutions de VRS, grippe B et grippe A (chacun avec 5×10^5 à 5×10^1 copies d'ARN/réaction) sur le LightCycler® 480II.

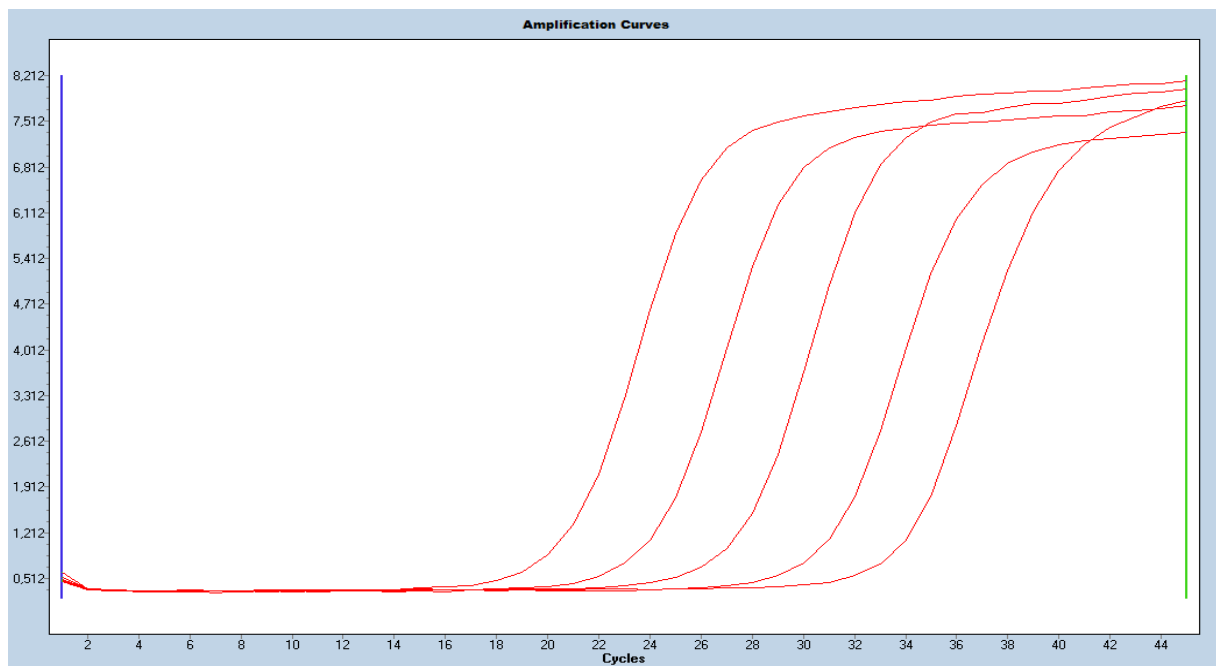


Figure 4: Série de dilutions de VRS (5×10^5 à 5×10^1 copies d'ARN/réaction) sur le LightCycler® 480II

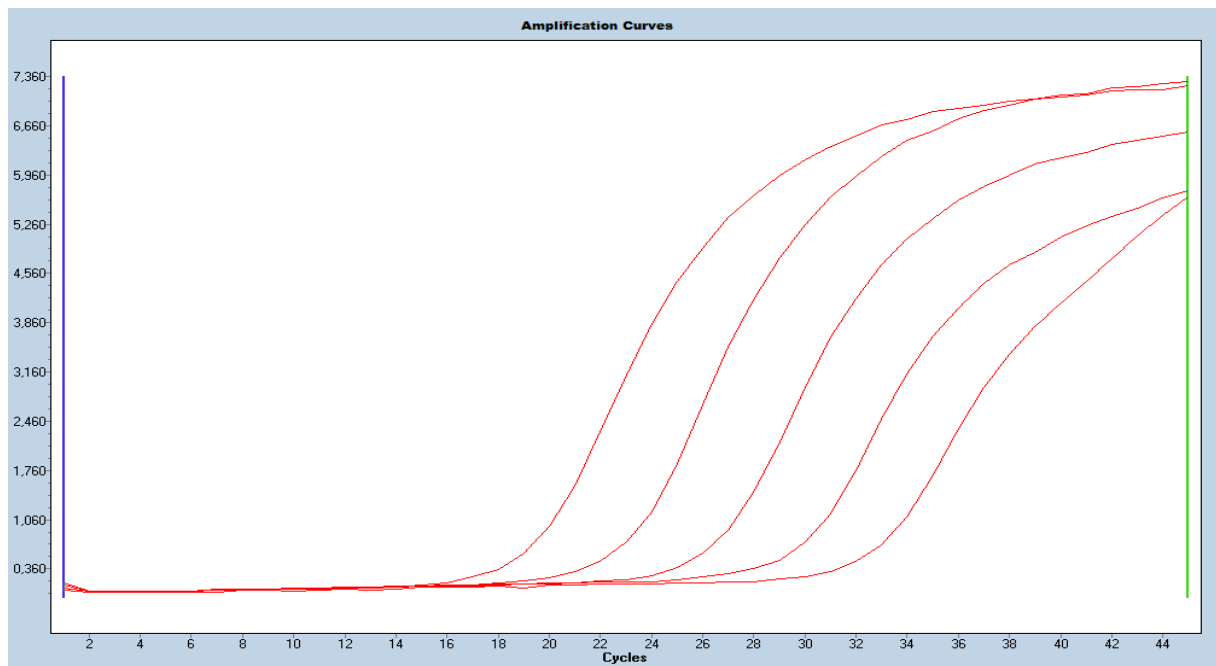


Figure 5: Série de dilutions de grippe B (5×10^5 à 5×10^1 copies d'ARN/réaction) sur le LightCycler® 480II

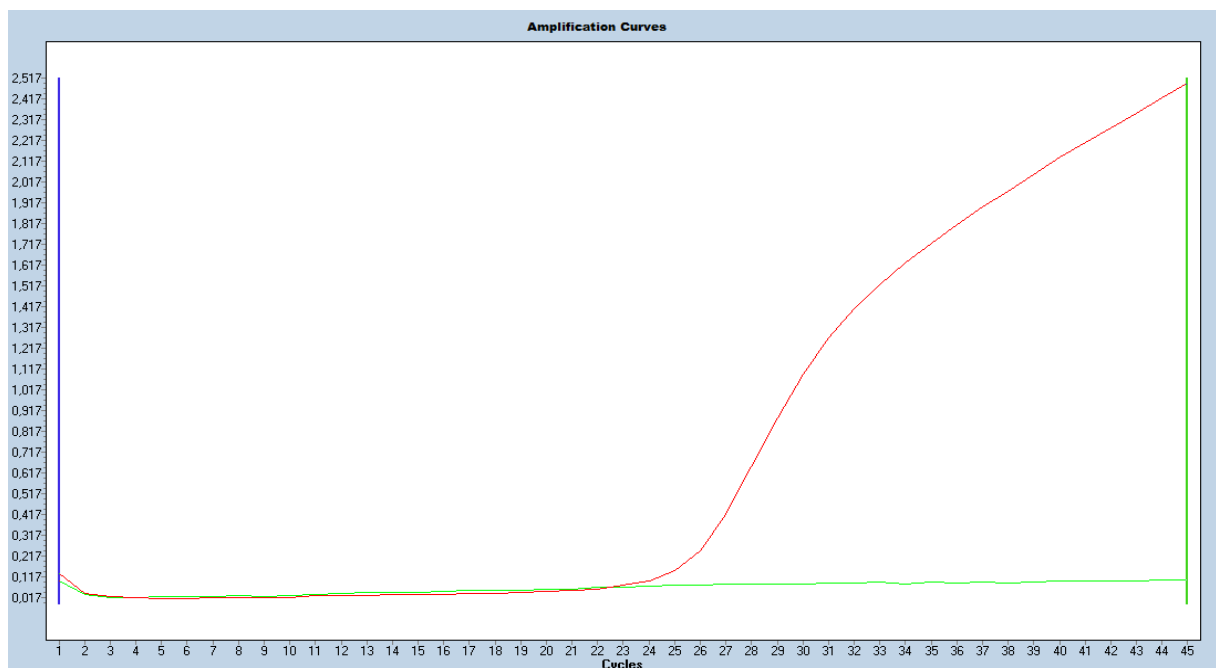


Figure 6: Série de dilutions de grippe A (5×10^5 à 5×10^1 copies d'ARN/réaction) sur le LightCycler® 480II

La limite de détection de l'ensemble du processus dépend de la matrice de l'échantillon, de l'extraction de l'ARN et de la concentration en ARN.

13.2 Spécificité analytique

Le test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Flu & RSV est spécifique au VRS A/B, à la grippe A et à la grippe B. Aucune réactivité croisée avec les espèces suivantes n'a été détectée (voir Tableau 10).

Tableau 10: Test de la réactivité croisée

<i>Acinetobacter baumannii</i> souche 5377	-	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-	Coxsackievirus humain B4	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> (contrôle d'analyse externe de recombinant NATtrol)	-
Adénovirus 1, humain, souche Adénoïde 71	-	Échovirus 11	-	Cytomégalovirus humain	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adénovirus 4	-	Virus d'Epstein-Barr souche B95-8	-	Metapneumovirus humain	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adénovirus 7, humain, souche Gomen	-	<i>Escherichia coli</i> (O26:H-)	-	Virus parainfluenza humain 1 souche C35	-	<i>Serratia marcescens</i>	-
Adénovirus 31	-	<i>Escherichia coli</i> (O6)	-	Virus parainfluenza humain 2 souche Greer	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> souche NCTC 7465	-
Adénovirus 34	-	<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	-	Virus parainfluenza sérotype 3	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Adénovirus 37	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Virus parainfluenza humain 4a souche M-25	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Aspergillus terreus</i>		Entérovirus type 71 souche 2003 isolat		Rhinovirus humain génogroupe A		<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Bordetella parapertussis</i> souche 12822	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> souche MGH 78578	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-

<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1	-	Virus Herpes simplex 1 souche McIntyre	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-		
<i>Candida albicans</i>	-	Virus Herpes simplex 2 souche MS	-	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. Pneumophila	-		
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Coronavirus humain OC43	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-		
<i>Chlamydia psittaci</i>	-	Coronavirus humain 229E	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> souche FH d'Eaton Agent	-		
<i>Clostridium perfringens</i>	-	Coxsackievirus humain A2, souche Fleetwood	-	<i>Neisseria meningitidis</i> souche FAM18	-		

13.4 Réactivité analytique

La réactivité du test RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Flu & RSV a été examinée en utilisant différentes souches du virus de la grippe A/grippe B et du VRS (voir Tableau 11).

Tableau 11: Test de la réactivité analytique

Sous-type	Souche	VRS	Grippe B	Grippe A
H1N1v	Grippe A/Brisbane/02/2018	négatif	négatif	positif
H1N1v	Grippe A/Michigan/45/2015	négatif	négatif	positif
H1N1v	Grippe A/Californie/7/2009	négatif	négatif	positif
H1N1	Grippe A/Brisbane/59/2007	négatif	négatif	positif
H3N2	Grippe A/Kansas/14/2017	négatif	négatif	positif
H3N2	Grippe A/Singapour/INFIMH-16-0019/2016	négatif	négatif	positif
H3N2	A/Hong Kong/4801/2014	négatif	négatif	positif










H3N2	Grippe A/ Suisse/9715293/2013	négatif	négatif	positif
H3N2	Grippe A/Texas/50/2012	négatif	négatif	positif
H3N2	Grippe A/Victoria/361/2011	négatif	négatif	positif
H3N2	Grippe A/Perth/16/2009	négatif	négatif	positif
H3N2	Grippe A/Brisbane/10/2007	négatif	négatif	positif
H3N2	Grippe A/Australie-Méridionale/34/2019	négatif	négatif	positif
H7N9	Grippe A/Anhui/1/2013	négatif	négatif	positif
	Grippe B/Colorado/06/2017/ lignée Victoria	négatif	positif	négatif
	Grippe B/Brisbane/60/2008/ lignée Victoria	négatif	positif	négatif
	Grippe B/Washington/02/2019/ lignée Victoria	négatif	positif	négatif
	Grippe B/ Massachusetts/2/2012/ lignée Yamagata	négatif	positif	négatif
	Grippe B/Phuket/3073/2013/ lignée Yamagata	négatif	positif	négatif
	Grippe B/Wisconsin/1/2010/ lignée Yamagata	négatif	positif	négatif
	VRS A (isolat: isolat 2006)	positif	négatif	négatif
	VRS A souche Long	positif	négatif	négatif
	VRS B (souche: CH93(18)-18)	positif	négatif	négatif
	VRS B souche 9320	positif	négatif	négatif

14. Historique des versions

Numéro de version	Section et désignation
2014-07-01	Version précédente
2020-10-13	Révision générale: 1. Application 2. Résumé et explication du test 4. Contenu du paquet 5. Instructions de conservation 6. Réactifs requis, mais non fournis 8. Prélèvement et conservation des échantillons 9. Réalisation du test 10. Contrôle qualité 11. Interprétation des échantillons 12. Limites de la méthode 13. Performances 14. Historique des versions 15. Signification des symboles 16. Bibliographie

15. Signification des symboles

Symboles généraux

	Pour usage diagnostique <i>in vitro</i>
	Consulter le mode d'emploi
	Numéro de lot
	Date de péremption
	Température de stockage
	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

Symboles spécifiques des tests

Reaction Mix

Enzyme Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

16. Bibliographie

1. World Health Organisation 2009, Fact Sheet N°211, Influenza (Saisonal)
www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html. Last accessed: 09.10.2020.
2. Robert Koch Institut
RKI_Influenzabericht_2018-19
https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/6253/RKI_Influenzabericht_2018-19.pdf. Last accessed: 30.10.2020
3. Robert Koch Institut
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Influenza_saisonal.html. Last accessed: 09.10.2020.
4. World Health Organisation 2011, Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza.
5. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_RSV.html
Last accessed: 15.10.2020