

RIDA® GENE RSV & hMPV

REF PG5905



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 RSV & hMPV, exécuté sur le Roche LightCycler® 480II, est un test PCR multiplex en temps réel pour la détection qualitative directe et la différenciation de l'ARN du virus respiratoire syncytial (VRS A/B) et du métapneumovirus humain (MPVh A/B) dans des frottis nasopharyngés et des LBA humains non traités provenant de personnes présentant des signes et des symptômes d'infection respiratoire aiguë.

Le test RIDA®GENE RSV & hMPV est conçu pour étayer le diagnostic d'infections virales (VRS et MPVh) 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 le VRS ou le MPVh 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

Le virus respiratoire syncytial (VRS) humain est considéré comme l'un des plus puissants agents pathogènes des infections aiguës des voies respiratoires inférieures telles que l'inflammation pulmonaire et la bronchiolite^(1,2,3). Une incidence élevée d'infections par le VRS a été constatée, notamment chez les enfants de moins de 6 mois^(4,5). Le VRS est associé à une morbidité et une mortalité élevées non seulement chez les enfants mais aussi chez les personnes âgées, les patients atteints de comorbidités et les adultes immunodéprimés^(2,6). Le VRS est un virus à ARN non segmenté et enveloppé qui appartient à la famille des Pneumoviridae^(2,3). Le génome viral, une molécule d'ARN simple brin (ARNsb), détermine le code de 11 protéines⁽⁶⁾. Compte tenu de l'antigénicité de sa protéine G, la souche est divisée en deux groupes d'antigènes : VRS A et B. On connaît actuellement 14 génotypes du VRS A et 25 génotypes du VRS B^(2,6). Plusieurs études ont conclu à l'unanimité que le VRS est le virus respiratoire le plus fréquemment détecté^(2,6,7). Les épidémies de VRS se produisent notamment en hiver, de novembre à mars. Le pic des infections se situe principalement en janvier^(1,3,8). Le VRS se manifeste généralement en même temps que d'autres virus respiratoires^(2,3).

Le métapneumovirus humain (MPVh) a été isolé pour la première fois en 2001 à partir d'échantillons prélevés dans les voies respiratoires d'enfants de moins de 5 ans⁽⁹⁾. Le métapneumovirus humain est une particule enveloppée de type viral qui, comme le VRS, appartient à la famille des Pneumoviridae. Le génome viral est un ARN simple brin (ARNsb) qui se compose de 8 gènes. La souche MPVh a été divisée en deux génotypes différents, A et B. Chaque groupe est également divisé en deux sous-génotypes 1 et 2 (A1, A2, B1, B2) selon les particularités génétiques des protéines de surface F et G. Même si le groupe A est généralement le génotype dominant, les deux génotypes peuvent coexister et circuler simultanément pendant la même période. La distribution dépend néanmoins de la saisonnalité et de la zone

géographique^(3,5,9,10). Les infections par le MPVh peuvent survenir tout au long de l'année, mais l'infection atteint généralement un pic à la fin de la saison hivernale. Le caractère saisonnier est clairement établi, notamment en janvier où les taux d'infection sont particulièrement élevés^(9,11). Des coïnfections avec d'autres agents pathogènes des voies respiratoires, tels que le virus respiratoire syncytial (VRS), ont été décrites à plusieurs reprises⁽⁹⁾.

Selon plusieurs études, en plus du virus de la grippe, le VRS et le MPVh sont les agents pathogènes viraux les plus fréquents pendant la saison hivernale, ce qui prouve leur caractère fortement saisonnier⁽¹²⁾. Les symptômes les plus courants des infections aiguës des voies respiratoires sont la fièvre, la toux, le mal de gorge, les maux de tête, la tachypnée, les râles, le stridor, la respiration sifflante ou les symptômes des voies respiratoires supérieures (rhinorrhée et éternuements) et la fatigue^(9,11).

3. Principe du test

Le test RIDA®GENE RSV & hMPV est un test PCR multiplex en temps réel pour la détection qualitative directe et la différenciation de l'ARN du virus respiratoire syncytial (VRS A/B) et du métapneumovirus humain (MPVh A/B) à partir de frottis nasopharyngés et de LBA humains.

Une fois l'ADN isolé, les fragments génétiques propres au VRS (gène F) et au MPVh (glycoprotéine F) (si présents) sont ensuite 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 polymérase** 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 RSV & hMPV 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
PGZ5905RM	1	Reaction Mix	2 ×	1050 µl	jaune, prêt à l'emploi
PGZ5905EM	2	Enzyme Mix	1 ×	80 µl	rouge, prêt à l'emploi
PGZ5905IC	R	Internal Control RNA	2 ×	1700 µl	brun, prêt à l'emploi
PGZ5905NC	N	No Template Control	1 ×	450 µl	blanc, prêt à l'emploi
PGZ5905PC	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 -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 °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 RSV & hMPV :

Réactifs
Eau de PCR (sans nucléase)

6.2 Matériel nécessaire

L'équipement suivant est nécessaire pour réaliser les tests RIDA®GENE RSV & hMPV :

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 et de LBA

Pour la préparation de l'ARN à partir de frottis nasopharyngés et de LBA, 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 RSV & hMPV 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 RSV & hMPV 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

<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	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	VRS	465/510	Le kit RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire.
	ICR	533/580	
	MPVh	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/ μ l. Chaque analyse par PCR utilise une quantité totale de 5×10^3 copies.

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

Échantillon	Résultat	Ct ICR	Gène Ct cible
Contrôle positif	Positif	SO *1	Voir Certificat d’assurance qualité
Contrôle négatif	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 (LD 95 %) (section 13.1.1), le seuil a été fixé comme suit :

Détection	Matrice	Seuil élevé (% de fluorescence totale)
VRS A	LBA	4,9 %
	Frottis nasopharyngé	6,5 %
VRS B	LBA	3,5 %
	Frottis nasopharyngé	6,0 %
MPVh A1	LBA	7,9 %
	Frottis nasopharyngé	7,0 %
MPVh A2	LBA	9,9 %
	Frottis nasopharyngé	10,9 %

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 8.

Tableau 8 : Interprétation des résultats

Détection			
VRS	MPVh	ICR	Résultat
positif	négatif	positif/ négatif	VRS détectable
négatif	positif	positif/ négatif	MPVh détectable
positif	positif	positif/ négatif	VRS et MPVh détectables
négatif	négatif	positif	Gène cible non détectable
négatif	négatif	négatif	Non valide

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 RSV & hMPV détecte l'ARN du virus respiratoire syncytial (VRS A/B) et du métapneumovirus humain (MPVh A/B) à partir de frottis nasopharyngés et de LBA 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 et les LBA.
4. Un 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.
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 (LD 95 %) peuvent être détectées, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
7. 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 RSV & hMPV.
8. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Un résultat positif indique que les gènes cibles (VRS (gène F) et MPVh (glycoprotéine F)) sont présents.
9. Même en petites quantités, la dihydrocodéine et l'azithromycine peuvent avoir des propriétés interférentes. La paracodine interfère à partir d'une concentration de 3,0 % [v/v] ; l'azithromycine interfère à partir d'une concentration de 25,2 mg/ml.
10. Ce test doit être réalisé conformément aux BPL (Bonnes pratiques de laboratoire). Les utilisateurs doivent suivre scrupuleusement les instructions du fabricant lors de la réalisation du test.

13. Performances

13.1 Performances cliniques d'analyse

13.1.1 Limite de détection (LD 95 %)

Un échantillon de contrôle positif (LBA ou frottis nasopharyngé négatif, enrichi) a été mesuré en cinq étapes de dilution (par étapes de 0,25 log) pour chaque cible et matrice, avec 20 réplicats par étape dans un lot, afin de déterminer la LD. Cette analyse a été suivie d'une analyse probit. La LD 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 :

Isolat de VRS A 2006, ZeptoMetrix, #0810040ACF

VRS B (souche : CH93(18)-18, ZeptoMetrix, #0810040CF

MPVh -16, type A1, souche : IA10-2003, ZeptoMetrix, #0810161CF

MPVh -8, type B2, souche : Pérou6-2003, ZeptoMetrix, #0810159CF

Pour la détection de l'ARN du VRS et du MPVh à l'aide du test

RIDA®GENE RSV & hMPV, de l'instrument MagNA Pure 96 et du LightCycler® 480 II, les limites de détection (LD) indiquées dans le tableau 9 ont été déterminées.

Tableau 9 : Résultats relatifs aux limites de détection du test

RIDA®GENE RSV & hMPV pour les paramètres VRS et MPVh.

	VRS A	VRS B	MPVh A1	MPVh B2
LD LBA	190,11 TCID ₅₀ */ml	4,15 TCID ₅₀ */ml	1,01 TCID ₅₀ */ml	0,63 TCID ₅₀ */ml
LD frottis nasopharyngé	193,20 TCID ₅₀ */ml	6,89 TCID ₅₀ */ml	5,70 TCID ₅₀ */ml	5,22 TCID ₅₀ */ml

*TCID : Dose infectieuse en culture tissulaire

Pour le paramètre VRS A du LBA, la LD a été déterminée à 190,11 TCID₅₀*/ml.

Pour le paramètre VRS A du frottis nasopharyngé, la LD a été déterminée à 193,20 TCID₅₀*/ml.

Pour le paramètre VRS B du LBA, la LD a été déterminée à 4,15 TCID₅₀*/ml.

Pour le paramètre VRS B du frottis nasopharyngé, la LD a été déterminée à 6,89 TCID₅₀*/ml.

Pour le paramètre MPVh A1 du LBA, la LD a été déterminée à 1,01 TCID₅₀*/ml.

Pour le paramètre MPVh A1 du frottis nasopharyngé, la LD a été déterminée à 5,70 TCID₅₀*/ml.

Pour le paramètre MPVh B2 du LBA, la LD a été déterminée à 0,63 TCID₅₀*/ml.

Pour le paramètre MPVh A1 du frottis nasopharyngé, la LD a été déterminée à 5,22 TCID₅₀*/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® 480II. 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
Mucosolvan (chlorhydrate d'ambroxol)*	10 % [v/v]
Amoxicilline	1 mg/ml
Sang humain	2 % [v/v]
Mucine	60 µg/ml
Nasivin 0,05 % (oxymétazoline)**	10 % [v/v]
Chlorure de sodium	10 % [v/v]
Phosphate d'oseltamivir	25 mg/ml
RatioAllerg 50 µg (dipropionate de béclo méthasone)**	10 % [v/v]
Tobramycine	4 µg/ml

*Substance uniquement testée pour la matrice du LBA

**Substances testées uniquement pour la matrice du frottis nasopharyngé

Des effets inhibiteurs ont été observés pour la Paracodine (3 %) et l'Azithromycine-ratiopharm (25,2 mg/ml) (voir les limites de la méthode).

Réactivité croisée

Ont également été étudiés divers organismes (bactéries, virus, champignons) que l'on trouve couramment dans la matrice du LBA ou des frottis nasopharyngés. Les micro-organismes étudiés dans le cadre de ce test ont été sélectionnés soit en raison de leur présence naturelle dans les deux matrices, soit en raison des symptômes qu'ils provoquent en tant que pathogènes respiratoires. Ont été utilisés aux fins de ces analyses des cultures bactériennes (entre 10^6 et 10^9 UFC*/ml), fongiques ou virales ; des surnageants de culture cellulaire infectieuse de virus, de bactéries ou de champignons ; des isolats ; ou des standards LGC ou NIBSC des organismes concernés.

La PCR multiplex en temps réel RIDA®GENE RSV & hMPV est spécifique au VRS et au MPVh. Aucune réactivité croisée avec les espèces suivantes n'a été détectée (voir tableau 11) :

Tableau 11 : Organismes présentant une possibilité de réaction croisée

Organisme	Résultats du test	
	VRS	MPVh
<i>Acinetobacter baumannii</i> souche 5377	négatif	négatif
Adénovirus 1, humain, souche Adénoïde 71	négatif	négatif
Adénovirus 4	négatif	négatif
Adénovirus 7, humain, souche Gomen	négatif	négatif
Adénovirus 31	négatif	négatif
Adénovirus 34	négatif	négatif
Adénovirus 37	négatif	négatif
<i>Aspergillus terreus</i>	négatif	négatif
<i>Bordetella parapertussis</i> souche 12822	négatif	négatif
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1	négatif	négatif
<i>Candida albicans</i>	négatif	négatif
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	négatif	négatif
<i>Chlamydia psittaci</i>	négatif	négatif
<i>Clostridium perfringens</i>	négatif	négatif
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	négatif	négatif
Échovirus 11	négatif	négatif
Virus d'Epstein-Barr souche B95-8	négatif	négatif
<i>Escherichia coli</i> (O26:H-)	négatif	négatif
<i>Escherichia coli</i> (O6)	négatif	négatif
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	négatif	négatif
<i>Enterobacter cloacae</i>	négatif	négatif
Entérovirus type 71 souche 2003 isolat	négatif	négatif
<i>Haemophilus influenzae</i>	négatif	négatif
Virus Herpes simplex 1 souche McIntyre	négatif	négatif
Virus Herpes simplex 2 souche MS	négatif	négatif
Coronavirus humain 229E	négatif	négatif
Coronavirus humain OC43	négatif	négatif
Coxsackievirus humain A2, souche Fleetwood	négatif	négatif
Coxsackievirus humain B4	négatif	négatif
Cytomégalovirus humain	négatif	négatif
Virus parainfluenza humain 1 souche C35	négatif	négatif
Virus parainfluenza humain 2 souche Greer	négatif	négatif
Virus parainfluenza sérotype 3	négatif	négatif
Virus parainfluenza humain 4a souche M-25	négatif	négatif

Rhinovirus humain génogroupe A	négatif	négatif
Grippe A H1N1 Brisbane/59/07	négatif	négatif
Grippe A H3N2 Texas/50/12	négatif	négatif
Virus de la grippe B/Washington/02/2019	négatif	négatif
Virus de la grippe B/Colorado/6/2017	négatif	négatif
<i>Klebsiella pneumoniae</i> souche MGH 78578	négatif	négatif
<i>Lactobacillus plantarum</i>	négatif	négatif
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>Pneumophila</i>	négatif	négatif
<i>Moraxella catarrhalis</i>	négatif	négatif
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> souche FH d'Eaton Agent	négatif	négatif
<i>Neisseria meningitidis</i> souche FAM18	négatif	négatif
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	négatif	négatif
<i>Proteus vulgaris</i>	négatif	négatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	négatif	négatif
<i>Serratia marcescens</i>	négatif	négatif
<i>Streptococcus pneumoniae</i> souche NCTC 7465	négatif	négatif
<i>Streptococcus pyogenes</i>	négatif	négatif
<i>Streptococcus salivarius</i>	négatif	négatif
<i>Staphylococcus aureus</i>	négatif	négatif
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	négatif	négatif

*CFU : Unités formant des colonies

13.1.4 Précision

La précision du test de PCR en temps réel RIDA®GENE RSV & hMPV 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 deux 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.

Le coefficient de variation maximal obtenu pour chaque mesure à l'aide du test PCR en temps réel RIDA®GENE RSV & hMPV sur LightCycler® 480 II était de 1,93 %.

Tableau 12 : Résultats relatifs à la précision du test RIDA®GENE RSV & hMPV pour le VRS.

Valeur Ct/CV moyenne	Intra-test			Inter-test			Inter-lots
	Lot de la trouss e 1	Lot de la trouss e 2	Lot de la trouss e 3	Lot de la trouss e 1	Lot de la trouss e 2	Lot de la trouss e 3	Lots des trousses 1 à 3
1	Ct	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.
	CV (%)	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o
2	Ct	34,3	34,6	34,6	33,6	33,6	33,7
	CV (%)	1,72 %	1,31 %	1,27 %	1,47 %	1,63 %	1,88 %
3	Ct	32,1	32,6	32,6	31,2	31,1	31,6
	CV (%)	0,94 %	1,06 %	0,93 %	1,72 %	1,62 %	1,86 %
4	Ct	25,9	25,9	26,1	24,6	24,5	25,0
	CV (%)	0,87 %	0,67 %	0,68 %	1,35 %	1,50 %	1,84 %
5	Ct	22,4	22,7	22,8	21,3	21,3	21,7
	CV (%)	0,84 %	0,73 %	0,66 %	1,25 %	1,84 %	1,62 %

Tableau 13 : Résultats relatifs à la précision du test RIDA®GENE RSV & hMPV pour le MPVh.

Valeur Ct/CV moyenne	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	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	
	CV (%)	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	
2	Ct	33,6	33,5	33,7	32,9	33,0	32,8	32,9
	CV (%)	0,80 %	1,17 %	0,83 %	1,44 %	1,43 %	1,64 %	1,54 %
3	Ct	31,6	31,8	31,7	30,6	30,6	30,8	30,7
	CV (%)	0,80 %	0,50 %	0,80 %	1,40 %	1,11 %	1,27 %	1,29 %
4	Ct	25,1	25,4	25,4	24,1	24,1	24,4	24,2
	CV (%)	0,97 %	0,72 %	0,69 %	1,92 %	1,80 %	1,80 %	1,91 %
5	Ct	21,8	21,9	21,8	20,9	20,8	20,9	20,9
	CV (%)	0,83 %	0,94 %	0,79 %	1,27 %	1,65 %	1,63 %	1,53 %

13.1.5 Réactivité analytique

La réactivité du test PCR en temps réel RIDA®GENE RSV & hMPV a été étudiée en utilisant des souches de VRS et des sous-types de MPVh (Tableau 14). Les souches de VRS et les sous-types de MPVh testés ont été détectés à l'aide du test PCR en temps réel RIDA®GENE RSV & hMPV.

Tableau 14 : Test de la réactivité analytique

Souche	Concentration	Résultat*	
		VRS	MPVh
MPVh 5, type B1	10 ^{-1,70} U/ml	-	+
MPVh 8, type B2	10 ^{2,10} U/ml	-	+
MPVh 16, type A1	10 ^{0,82} U/ml	-	+
MPVh 20, type A2	10 ^{0,34} U/ml	-	+
VRS A (isolat : isolat 2006)	10 ^{2,53} U/ml	+	-
VRS A souche Long	3,74 x 10 ¹ PFU**/ml	+	-
VRS B (souche :CH93(18)-18)	10 ^{0,82} U/ml	+	-
VRS B souche 9320	8,9 x 10 ⁰ TCID ₅₀ /ml	+	-

*+ = positif (au moins 2 répliquats positifs sur 3)
- = négatif

**Unités formant des plaques

14. Historique des versions

Numéro de version	Section et désignation
2021-08-24	Version de la publication
2022-01-20	Révision générale : 4. Contenu du paquet

15. Signification des symboles

Symboles généraux

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

Symboles spécifiques au test

	Mélange réactif
	Mélange d'enzymes
	Contrôle de l'extraction/inhibition
	Contrôle négatif
	Contrôle positif

16. Bibliographie

1. Harun A, Beyza E. Viral and Atypical Bacterial Respiratory Infections in a University Teaching Hospital: Japanese Journal of Infectious Diseases. 2019; 72(5): 318–322.
2. Luo H-J, Huang X-B, Zhong H-L, Ye C-X, Tan X, Zhou K, Yuan L, Zhang S-F, Zhu X, Lin C-J, Wang W-J, Xu L, Cao K-Y. Epidemiological characteristics and phylogenetic analysis of human respiratory syncytial virus in patients with respiratory infections during 2011-2016 in southern China. International Journal of Infectious Diseases : IJID : Official Publication of the International Society for Infectious Diseases. 2020; 90: 5–17.
3. Park E, Park PH, Huh JW, Yun HJ, Lee HK, Yoon M., Lee S, Ko G. Molecular and clinical characterization of human respiratory syncytial virus in South Korea between 2009 and 2014. Epidemiology and Infection, 2017; 145(15): 3226–3242.
4. Fillatre A, François C, Segard C, Duverlie G, Hecquet D, Pannier C, Roussel C, Zawadzki P, Brochot E, Castelain S. Epidemiology and seasonality of acute

- respiratory infections in hospitalized children over four consecutive years (2012-2016). *Journal of Clinical Virology : The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2018; 102: 27–31.
5. Owor BE, Masankwa GN, Mwangi LC, Njeru RW, Agoti CN, Nokes DJ. Human metapneumovirus epidemiological and evolutionary patterns in Coastal Kenya, 2007-11. *BMC Infectious Diseases*. 2016; 16: 301.
 6. Vieira SE, Thomazelli LM, de Paulis M, Ferronato AE, Oliveira DB, Martinez MB, Durigon EL. Infections Caused by HRSV A ON1 Are Predominant among Hospitalized Infants with Bronchiolitis in São Paulo City. *BioMed Research International*. 2017; 3459785.
 7. Nguyen VH, Dubot-Pérès A, Russell FM, Dance DAB, Vilivong K, Phommachan S, Syladeth C, Lai J, Lim R, Morpeth M, Mayxay M, Newton PN, Richet H, De Lamballerie X. Acute respiratory infections in hospitalized children in Vientiane, Lao PDR - the importance of Respiratory Syncytial Virus. *Scientific Reports*. 2017; 7(1): 9318.
 8. Soudani N, Caniza MA, Assaf-Casals A, Shaker R, Lteif M, Su Y, Tang L, Akel I, Muwakkat S, Chmairie A, Homsy M, Dbaibo G, Zaraket H. Prevalence and characteristics of acute respiratory virus infections in pediatric cancer patients. *Journal of Medical Virology*. 2019; 91(7): 1191–1201.
 9. Rodriguez PE, Frutos MC, Adamo MP, Cuffini C, Cámara JA, Paglini MG, Moreno L, Cámara A. Human Metapneumovirus: Epidemiology and genotype diversity in children and adult patients with respiratory infection in Córdoba, Argentina. *PloS One*. 2020; 15(12): e0244093.
 10. Evelyn O, Jaime FS, David M, Lorena A, Jenifer A, Oscar G. Prevalence, clinical outcomes and rainfall association of acute respiratory infection by human metapneumovirus in children in Bogotá, Colombia. *BMC Pediatrics*. 2019; 19(1): 345.
 11. Halaji M, Hashempour T, Moayedi J, Pouladfar GR, Khansarinejad B, Khashei R, Moattari A, Musavi Z, Ghassabi F, Pirbonyeh N. Viral etiology of acute respiratory infections in children in Southern Iran. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2019; 52: e20180249.
 12. Al-Romaihi HE, Smatti MK, Ganesan N, Nadeem S, Farag E, Coyle PV, Nader, JD, Al-Khatib HA, Elmagboul EB, Al Dhahry S, Al-Marri SA, Al Thani AA, Al Khal A, Al Maslamani MA, Yassine HM. Epidemiology of respiratory infections among adults in Qatar (2012-2017). *PloS One*. 2019; 14(6): e0218097.