

SPEED-OLIGO NOVEL INFLUENZA A H1N1

SP015: Test oligo-chromatographique pour le dépistage qualitatif du nouveau virus influenza A H1N1 dans des échantillons cliniques. 40 tests.

INTRODUCTION:

Le virus Influenza, agent causal de la grippe, est un virus à RNA à simple brin et à la polarité négative de la famille des Orthomyxoviridae. Les symptômes chez les adultes sont caractérisés par l'apparition d'une forte fièvre, de céphalées, de photophobie, d'une toux sèche, de malaises et de douleurs musculaires. La fièvre persiste généralement pendant trois jours, la toux dure plus longtemps. Chez les patients âgés souffrant de broncopathie chronique, les cas de trachéobronchite et de bronchiolite sont fréquents. Chez les très jeunes enfants, il se produit parfois des cas d'infection respiratoire grave avec convulsions fébriles et encéphalite. Des cas sporadiques peuvent se présenter en dehors des époques d'épidémies et ils sont difficiles à diagnostiquer cliniquement. En temps d'épidémie, le diagnostic clinique est également difficile, car d'autres maladies respiratoires peuvent être confondues avec la grippe.

Il existe trois types de virus Influenza: A, B et C, les deux premiers provoquent des épidémies de la maladie chaque hiver, alors qu'on pense que le type C ne provoque pas d'épidémies. Les virus grippaux A se divisent en sous-types basés sur les protéines de surface: l'hémagglutinine (H) et la neuraminidase (N). Il y a 16 sous-types d'hémagglutinines et 9 sous-types de neuraminidases. Les sous-types actuels du virus influenza A trouvés chez les humains sont les suivants: A (H1N1) y A (H3N2). Le virus influenza B ne se divise pas en sous-types. On trouve également le virus influenza A chez différents animaux (oiseaux, porcs, chevaux, mammifères marins), alors que le virus influenza B ne circule qu'entre humains.

On croit généralement que le virus de la grippe se transmet d'une personne à l'autre par la toux ou les éternuements. Mais le virus peut aussi être transmis au contact d'objets contaminés par le virus de la grippe. Dans le cas de la grippe saisonnière, il existe un risque de contagion depuis le jour précédent les symptômes jusqu'à 7 jours après l'apparition de la maladie.

Le virus de la grippe a une capacité unique de variation génétique, basée sur la haute variabilité de ses protéines de surface et la segmentation de son génome viral (ces segments peuvent se recombinaison pendant les infections mixtes). Il semble que les cochons fassent office de creuset pour la recombinaison de virus Influenza de différentes origines. Des cas isolés ou groupés d'infections humaines avec le virus de la grippe porcine ont été reportés sporadiquement depuis 1970. Des virus grippaux provenant d'une triple recombinaison (avec des gènes de virus humains, porcins et aviaires) ont été identifiés chez des cochons aux États-Unis depuis 1998. En avril 2009, un nouveau virus H1N1 (nH1N1) recombinant, provoquant des infections humaines au Mexique et aux États-Unis, a été identifié par le CDC. La découverte permanente de nouveaux cas suggère la transmission entre humains du nouveau virus influenza A. La plupart des cas confirmés ont consisté en des maladies respiratoires fébriles sans complications et autolimitées, avec des symptômes similaires à ceux d'une grippe saisonnière; par contre, les vomissements ou les diarrhées ont aussi été fréquents. Quelques patients présentant des symptômes plus graves ont dû être hospitalisés.

Le nouveau virus H1N1 (nH1N1) pourrait être détecté par un test rapide d'antigène ou un test de fluorescence directe dirigé vers les épitopes communs des virus grippaux de type A, et isolé en culture cellulaire. Malgré tout, l'identification définitive ne peut être menée à bien que par le biais d'un séquençage (seulement disponible dans les centres de référence) ou d'une RT-PCR spécifique.

La majorité des tests de PCR ont utilisé des systèmes de détection peu sensibles ou très laborieux. Le kit de détection SPEED-OLIGO NOVEL INFLUENZA A H1N1 est une méthode basée sur la PCR qui, adaptée à une jauge, permet une détection rapide et extrêmement sensible et spécifique du virus influenza A nH1N1 sur échantillons cliniques. Les mélanges pour PCR inclus dans le kit contiennent une paire d'oligonucléotides spécifiques, nécessaires à l'amplification d'un fragment

du gène H (les oligonucléotides ont été mis au point, après analyse des séquences disponibles à la Genbank, de façon à ce que seul le virus de la grippe A nH1N1 soit amplifié) et une autre paire d'oligonucléotides (capables de reconnaître une séquence commune de la protéine matrice) permettant l'amplification de n'importe quel virus de la grippe A présent dans le prélèvement; indépendamment du sous type H auquel il appartient. Chacun de ces produits de PCR réagira par rapport à une ligne spécifique de la bande, permettant ainsi de détecter non seulement la présence dans le prélèvement de n'importe quel virus de la grippe A; mais également de bien les différencier du sous-type nH1N1. Le kit a été conçu pour un emploi facile. Selon le thermocycleur employé, la phase d'amplification durera 15 à 25 minutes, alors que pour la détection par jauge, il ne faut que 5 à 10 minutes. La présentation du PCR mix lyophilisé minimise les procédures de manipulation et de pipetage pour empêcher les contaminations.

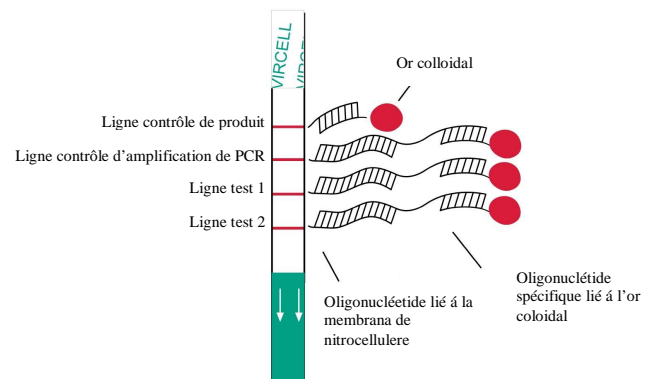
PRINCIPE DU TEST:

Méthode basée sur l'amplification d'un fragment spécifique d'un gène de virus influenza A nH1N1, permettant un diagnostic rapide des infections provoquées par virus influenza A nH1N1.

Le test dispose de son propre contrôle d'amplification afin de vérifier la conformité du processus d'extraction de l'ARN, de la rétrotranscription et de l'amplification; ainsi que l'absence d'inhibiteurs de l'amplification dans le prélèvement. C'est pourquoi on a incorporé des amorces spécifiques, capables de reconnaître le gène de la β -globine humaine. Elles sont adjacentes à la ligne correspondante sur la bande, d'où une détection spécifique. Dans le cadre de ce contrôle les échantillons cliniques d'origine humaine, donc contenant ce gène, doivent provoquer une réaction positive sur la bande pour autant que les étapes préalables se soient déroulées correctement.

La technique se divise en 4 étapes: extraction d'ARN, rétrotranscription, amplification à l'aide d'une paire d'oligonucléotides spécifiques et détection du produit amplifié. Une bandelette réactive est employée pour la détection. Une fois la amplification réalisée, le contrôle d'amplification et l'amplon spécifique au test sont dénaturés, ce qui facilite leur déplacement le long de la membrane. Ces fragments de PCR réagissent avec des oligonucléotides spécifiques liés à une suspension colloïdale de particules d'or. Par la suite, le complexe formé par les produits de PCR et l'or colloïdal migre sur la membrane jusqu'au niveau des sondes spécifiques (deux lignes test: une pour la grippe A et une spécifique au virus nH1N1 ainsi qu'une ligne de contrôle de l'amplification par PCR), où une seconde hybridation se produit. La ligne de contrôle du produit apparaît lorsque l'hybridation de l'excédent de la sonde liée à l'or se produit avec un oligonucléotide complémentaire absorbé sur la membrane. Des lignes rouges apparaissent dans les positions où l'or réagit.

Cette technique est plus sensible et spécifique que la PCR classique. La double hybridation permet de distinguer des fragments amplifiés spécifiques et non spécifiques.



USAGE IN VITRO UNIQUÈMENT

Fabricant: VIRCELL, S.L. Pza. Domínguez Ortiz 1. Polígono Industrial Dos de Octubre. 18320 Santa Fe *GRANADA* ESPAGNE* Tel.+34.958.441264* Fax+34.958.510712
<http://www.vircell.com>

CARACTÉRISTIQUES DE LA TROUSSE:

Cette trousse est basée sur l'amplification d'ADN et sur les principes d'hybridation.

Compte tenu du risque de contamination, il est conseillé de lire attentivement le chapitre «Recommandations et précautions».

La solution PCR et le contrôle positif sont lyophilisés. Il est nécessaire de les reconstituer avant l'utilisation (voir "Préparation des réactifs"). Les autres réactifs sont prêts à l'usage.

COMPOSITION DU COFFRET:

1 VIRCELL nH1N1 PCR MIX: 5 flacons de mélange réactionnel comprenant: tampon pour PCR, Cl_2Mg , dNTP, taq polymérase, oligonucléotides spécifiques du virus de la grippe A nH1N1, oligonucléotides spécifiques du gène de la protéine matrice commune à tous les virus de la grippe A et oligonucléotides pour l'amplification du gène de la β -globine humaine. Lyophilisés.

2 VIRCELL nH1N1 POSITIVE CONTROL: 1 flacon d'ADN non infectieux lyophilisé, pour le contrôle positif.

3 VIRCELL NEGATIVE CONTROL: 1 ampoule de 200 μ l d'eau déionisée, à utiliser comme contrôle négatif.

4 VIRCELL nH1N1 STRIPS: 40 bandelettes pour la détection d'ADN spécifique.

5 VIRCELL PCR MIX RECONSTITUTION SOLUTION: 2 ampoules de 1 ml de solution aqueuse pour reconstituer le mélange de PCR. Contient du Triton X-100.

6 VIRCELL POSITIVE CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION: 1 ampoule de 500 μ l de solution aqueuse pour reconstituer le contrôle positif. Contient du Triton X-100.

7 VIRCELL nH1N1 RUNNING SOLUTION: 2 ampoules de 1 ml de solution d'hybridation, avec du Proclin.

Conservé entre 2 et 8°C et vérifier la date de péremption.

Matériel nécessaire non fourni :

-Kits d'extraction d'ARN (voir recommandations dans "Procédure").

-Kit de rétrotranscription (voir recommandations dans "Procédure").

-Thermocycleur.

-Huile minérale (pour thermocycleurs sans couvercle chauffant).

-Micropipettes de précision (10-200 μ l).

-Pointes stériles à filtre.

-Gants jetables.

-Thermobloc 55°C \pm 2°C.

-Tubes de microcentrifugeuse de 1,5 ml.

-Microcentrifugeuse.

-Cabine PCR (recommandée).

-Vortex.

CONSERVATION:

Conservé entre 2 et 8°C. Ne pas utiliser les éléments de la trousse après la date de péremption. La date de péremption indiquée est valable à condition que les éléments soient conservés fermés, entre 2 et 8°C. Après la reconstitution de VIRCELL PCR MIX et VIRCELL POSITIVE CONTROL, conservé à une température inférieure à -20°C et éviter les congélations et décongélations inutiles.

STABILITÉ DES RÉACTIFS APRÈS OUVERTURE:

| RÉACTIF | STABILITÉ |
|--|---|
| VIRCELL PCR MIX et VIRCELL POSITIVE CONTROL reconstitués | Conservé à une température inférieure à -20°C et utiliser jusqu'à la date de péremption |
| Autres éléments | Conservé à 2-8°C et utiliser jusqu'à la date de péremption |

STABILITE ET MANIPULATION DES REACTIFS:

La trousse est stable jusqu'à la date de péremption à 2-8°C. Une fois reconstitués, le VIRCELL PCR MIX et le VIRCELL POSITIVE CONTROL restent stables jusqu'à la date de péremption à une température inférieure à -20°C.

Employer tous les réactifs dans des conditions aseptiques pour éviter toute contamination microbienne.

Utiliser uniquement les quantités de réactif nécessaires pour la réalisation du test. Ne pas remettre dans l'ampoule l'excédent de produit non utilisé.

VIRCELL, S.L. dégage toute responsabilité en cas d'utilisation inappropriée des réactifs inclus dans la trousse.

RECOMMANDATIONS ET PRECAUTIONS:

- Usage *in vitro* uniquement. Usage professionnel uniquement.
- Utiliser uniquement les réactifs du coffret. VIRCELL PCR MIX RECONSTITUTION SOLUTION, VIRCELL POSITIVE CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION et VIRCELL NEGATIVE CONTROL sont compatibles avec différents coffrets SPEED OLIGO de VIRCELL. Ne pas intervenir VIRCELL PCR MIX, VIRCELL POSITIVE CONTROL, VIRCELL STRIPS et VIRCELL RUNNING SOLUTION entre les lots et les coffrets.
- L'utilisation de pointes de pipette à filtre est essentielle pour éviter les contaminations durant l'extraction d'ARN et la réalisation de la PCR.
- Traiter les échantillons comme s'ils étaient infectieux, selon des procédures de sécurité du laboratoire. Maintenir toutes les surfaces de travail propres et désinfectées à l'aide d'une solution récemment préparée d'hypochlorite de soude à 0,5% dans de l'eau déionisée ou distillée.
- Pour obtenir des résultats plus fiables, il est conseillé de tester les échantillons dès que possible après leur prélèvement. La variation des temps de stockage durant l'envoi des échantillons n'a pas été évaluée.
- Utiliser des gants de protection jetables, des blouses de laboratoire et une protection oculaire lors de la manipulation des échantillons. Se laver soigneusement les mains après la manipulation des échantillons.
- Eviter les contaminations microbiennes en retirant les aliquotes des réactifs.
- Il est essentiel de disposer de trois espaces de travail indépendants pour la réalisation du test: zone de pré-amplification, zone d'amplification et zone de post-amplification ou de détection. Le flux de travail doit être unidirectionnel dans le laboratoire, depuis la zone de pré-amplification jusqu'à la zone de post-amplification. Il est nécessaire de porter des gants dans chaque zone et de les retirer et de les jeter avant de quitter chaque zone. A) Zone de pré-amplification: pour le prélèvement d'échantillons et l'extraction d'ARN. Du matériel spécifique doit être utilisé pour les opérations de pré-amplification (gants, tubes stériles, pointes de pipette à filtre, micropipettes, microcentrifugeuse et autres équipements nécessaires) et ne doit pas être employé pour d'autres procédés ni transporté dans d'autres zones. B) Zones d'amplification: Dans ce kit, on réalise les réactions de transcriptase inverse et de PCR, et les réactifs de ces procédures doivent être manipulés uniquement dans ce kit. Du matériel spécifique doit être utilisé pour les opérations d'amplification (gants, tubes stériles, pointes de pipette à filtre, micropipettes, microcentrifugeuse, thermocycleur, cabine à flux laminaire et autres équipements nécessaires) et ne doit pas être employé pour d'autres procédés ni transporté dans d'autres zones. Une fois l'amplification terminée, les tubes de PCR ne doivent jamais être ouverts dans cette zone. C) Zone de post-amplification ou de détection: cette zone est réservée à la détection. Cette opération exige un thermobloc, des tubes de centrifugeuse de 1,5 ml et une micropipette. Le matériel et l'équipement de cette zone ne doivent pas en sortir.
- En raison de la haute sensibilité du test, il convient de prendre toutes les précautions pour maintenir la pureté des réactifs de la trousse et des mélanges d'amplification. Tous les réactifs employés doivent avoir un niveau de pureté maximal. Eliminer tout réactif susceptible d'être contaminé.
- Ce produit est exclusivement conçu pour être utilisé par des personnes formées aux techniques d'essai PCR.
- Ne pas utiliser la trousse au-delà de la date de péremption.
- L'ensemble du matériel doit être jeté conformément à la législation en vigueur.
- Les éléments de ce coffret peuvent contenir du matériel génétique ou des substances d'origine animale et/ou humaine. Bien que non infectieux, ce matériel doit être manipulé comme étant potentiellement infectieux. Tout le matériel doit être manipulé et jeté

USAGE IN VITRO UNIQUEMENT

Fabricant: VIRCELL, S.L. Pza. Domínguez Ortiz 1. Polígono Industrial Dos de Octubre.18320 Santa Fe *GRANADA* ESPAGNE* Tel.+34.958.441264* Fax+34.958.510712
<http://www.vircell.com>

comme potentiellement infectieux. Respecter la législation locale en matière de déchets médicaux.

14. Les bandelettes développées doivent être stockées à un endroit séparé de la zone de pré-amplification afin d'éviter le risque de contamination de la PCR. Il est conseillé de couper les extrémités des bandelettes révélées pour mieux les conserver.

PRELEVEMENT ET TRAITEMENT DE L'ECHANTILLON:

Les échantillons suivants devraient être prélevés aussitôt que possible après la déclaration de la maladie: par écouvillons rhinopharyngés, aspirateurs nasaux ou une combinaison entre un écouvillon rhinopharyngé et un écouvillon oropharyngé. Si ces échantillons ne peuvent pas être prélevés, un écouvillon nasal ou oropharyngé est acceptable. Pour les patients intubés, un aspirateur endotrachéen est valable. Les échantillons de lavages bronchoalvéolaires (BAL) et des expectorations sont également acceptables. Les échantillons devraient être transportés dans un milieu de transport viral (MTV) stérile et immédiatement mis dans de la glace ou dans des blocs réfrigérants ou placé entre 2-8°C (frigorifique) pour être transportés jusqu'au laboratoire. Les échantillons prélevés à l'aide d'écouvillons à base d'alginat de calcium ne sont pas acceptables.

Lorsqu'ils seront reçus, les échantillons devront être conservés à 2-8°C jusqu'à ce qu'il soient analysés. Ils doivent être congelés à des températures inférieures à -70°C s'ils vont être stockés pendant plus de 72 heures.

PREPARATION DES REACTIFS:

Tous les réactifs fournis sont prêts à l'usage, à l'exception du VIRCELL PCR MIX et du VIRCELL POSITIVE CONTROL.

1 VIRCELL PCR MIX. Chaque solution de PCR contient une quantité suffisante pour réaliser 8 réactions de PCR. Pour sa reconstitution, suivre les instructions ci-dessous:

- Ajouter 200 µl de VIRCELL PCR MIX RECONSTITUTION SOLUTION **5** dans chaque tube.
- Mélanger à l'aide du vortex pendant 10 secondes.



Il convient de s'assurer que la solution PCR est complètement homogénéisée

- Incuber à température ambiante pendant 3 minutes pour une reconstitution complète.

2 VIRCELL POSITIVE CONTROL. Pour sa reconstitution, suivre les instructions ci-dessous:

- Centrifuger le tube correspondant pendant 5 secondes à 5000 g.
- Ajouter 200 µl de VIRCELL POSITIVE CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION **6** au flacon.
- Mélanger à l'aide du vortex pendant 10 secondes.
- Centrifuger le tube pendant 5 secondes à 5000 g.
- Incuber à température ambiante pendant 3 minutes pour une reconstitution complète.

Une fois reconstitués, le VIRCELL PCR MIX **1** et le VIRCELL POSITIVE CONTROL **2** peuvent être congelés à une température inférieure à -20°C pour être utilisés dans des réactions ultérieures.

PROCEDURE:

Le nombre d'échantillons traités par trousse dépendra de la stratégie adoptée pour l'analyse des échantillons.

| 40 BANDELETTES | TESTS | NOMBRE DE CONTRÔLES POSITIFS | NOMBRE DE CONTRÔLES NEGATIFS | NOMBRE D'ECHANTILLONS | TOTAL |
|----------------|-------|------------------------------|------------------------------|-----------------------|-------|
| | 1 | 1 | 1 | 38 | 40 |
| | 2 | 2 | 2 | 36 | 40 |
| | 4 | 4 | 4 | 32 | 40 |
| | 8 | 8 | 8 | 24 | 40 |

TEST PROCEDURE:

1.-Extraction d'ARN: (réalisée dans la zone de pré-amplification).

Pour l'extraction d'ARN, il est conseillé d'utiliser des kits d'extraction commerciaux en respectant les instructions du fabricant. Cette trousse a été testée avec les kits d'extraction d'ARN suivant: QIAamp viral RNA mini kit (QIAGEN). D'autres kits commerciaux peuvent être employés. Consulter le service technique.

2.-Transcriptase inverse (réalisée dans la zone d'amplification):

Deux kits de transcription inverse ont été testés et ont obtenu de bons résultats:

- iScript cDNA Synthesis kit (de Biorad), en suivant les instructions du fabricant. Ce kit comprend un mélange prêt à l'emploi qui contient tout ce qu'il faut pour mener à terme la réaction, y compris les dNTP et les hexanucléotides.

- AffinityScript Multiple temperature Reverse Transcriptase (de Stratagene) en utilisant Random Hexamer Primers (de Fermentas) avec une concentration finale dans la réaction de 5 µM.

3.-PCR (réalisée dans la zone d'amplification):

La solution de PCR **1** est lyophilisée. Chaque ampoule contient les composants nécessaires à la réalisation de 8 réactions. Reconstituer les tubes de solution de PCR nécessaires (voir « Préparation des réactifs ») en fonction du nombre d'échantillons à analyser et du nombre de contrôles à inclure. Placer sur un porte-tube le nombre de tubes nécessaires: un tube pour chaque échantillon plus un tube pour le contrôle positif, et un autre pour le contrôle négatif. L'excédent de solution de PCR peut être congelé à une température inférieure à -20°C pour être utilisé dans des réactions ultérieures.

Pour chaque test, le contrôle négatif doit être le dernier réactif à préparer.

- Pipeter 20 µl de solution de PCR reconstituée par tube.
- Ajouter 5 µl du produit de chaque RT ou de contrôle dans chaque tube. Le contrôle négatif inclus dans la trousse est de l'eau.
- Introduire le tube de PCR dans le thermocycleur et lancer le programme suivant*:

| | | |
|-----------|------|-------------|
| 1 cycle | 92°C | 1 minute |
| 40 cycles | 92°C | 20 secondes |
| | 55°C | 20 secondes |
| | 72°C | 20 secondes |
| 1 cycle | 72°C | 1 minute |
| 1 cycle | 95°C | 1 minute |

*(suivre les instructions fournies par le fabricant du thermocycleur).

La détection des produits de PCR s'effectuera au moyen d'une bandelette réactive. Si l'hybridation n'est pas réalisée immédiatement, les tubes de PCR peuvent être congelés à une température inférieure à -20°C. Pour pouvoir réaliser l'hybridation ultérieurement, il faudra recommencer l'étape de dénaturation finale de la PCR.


| | | |
|---------|------|----------|
| Etape 1 | 95°C | 1 minute |
|---------|------|----------|

4.-Detection sur bandelette: (réalisée dans la zone de post-amplification).

Avant d'effectuer cette opération, le thermobloc doit être chauffé à 55°C.

USAGE IN VITRO UNIQUEMENT

Fabricant: VIRCELL, S.L. Pza. Domínguez Ortiz 1. Polígono Industrial Dos de Octubre.18320 Santa Fe *GRANADA* ESPAGNE* Tel.+34.958.441264* Fax+34.958.510712
<http://www.vircell.com>

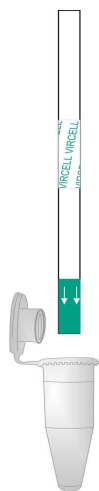
- Ajouter 35 µl de VIRCELL RUNNING SOLUTION  dans un tube* de 1,5 ml et incubé à 55°C pendant 2 minutes.
- Dénaturer l'échantillon à 95°C pendant 1 minute et le placer rapidement dans de la glace ou sur un portoir isofreeze à 4°C. Les échantillons ne doivent être en aucun cas placés sur un portoir à température ambiante après la dénaturation à 95°C. Si l'on ne dispose pas de portoir isofreeze ou de glace, il est possible de pipeter l'échantillon sans l'avoir refroidi juste après la dénaturation à 95°C, puis d'introduire immédiatement la bandelette.
- Ajouter 5 µl de produit de PCR dénaturé, refroidi à 4°C. Les échantillons ne doivent pas rester plus de 1 minute à 4°C sans être ajoutés dans le tube de 1,5 ml.



Si le produit de PCR n'est pas ajouté dans le tube de 1,5 ml immédiatement après la phase de dénaturation finale du programme PCR, il conviendra de recommencer cette étape (95°C pendant 1 minute), puis de le refroidir à 4°C dans de la glace ou sur un portoir isofreeze.

En cas d'analyse simultanée de nombreux échantillons et pour éviter de laisser passer plus d'une minute entre la dénaturation et la détection sur la bandelette, il est recommandé de dénaturer et de détecter les échantillons par groupes de 3 à 5. Cela évite l'apparition de faux négatifs.

- Introduire immédiatement la bandelette dans le bon sens (les flèches dirigées vers l'échantillon: voir schéma) et incubé à 55°C pendant 5 minutes.



- Retirer la bandelette et lire le résultat.

*Le tube de 1,5 ml doit entrer dans le thermobloc.



L'interprétation des résultats doit être effectuée dès que la bandelette est retirée. Si la bandelette sèche, des variations peuvent se produire dans l'intensité du signal et les fonds des échantillons négatifs. Les bandelettes développées doivent être stockées à un endroit séparé de la zone de pré-amplification afin d'éviter le risque de contamination de la PCR.

CONTRÔLE DE QUALITÉ INTERNE:

Chaque lot est soumis à un contrôle de qualité interne avant d'être commercialisé, afin d'assurer le respect des spécifications les plus strictes. Les résultats du contrôle final de chaque lot sont disponibles.

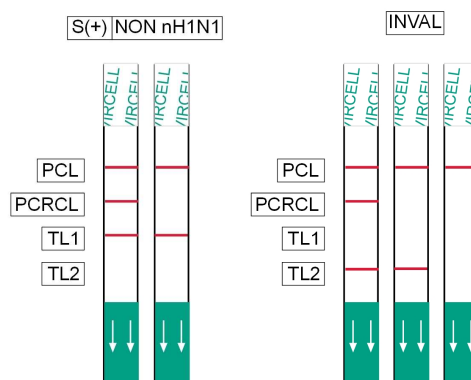
Un contrôle négatif doit être employé dans chaque essai à partir de l'étape d'isolement de l'acide nucléique afin de vérifier l'absence de contamination du produit artificiel.

INTERPRETATION DES RÉSULTATS ET PROCEDURE DE VALIDATION NOTICE D'UTILISATION:

Un contrôle négatif doit être inclus dans chaque essai. Un contrôle positif devrait être inclus dans chaque essai. Chaque fois qu'une nouvelle trousse est ouverte, un contrôle positif doit être inclus au moins dans le premier essai. Le contrôle positif permet de détecter des défauts des réactifs et de vérifier le bon fonctionnement du procédé de base. Le contrôle négatif permet de détecter des contaminations environnementales des réactifs. Pour lire le résultat, placer la bandelette dans la position indiquée par un S sur la carte de lecture.

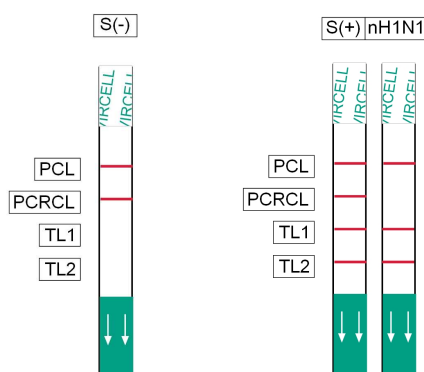
Le test comprend 3 zones de lecture:

- Ligne de contrôle de produit: elle doit toujours être positive et lisible si le test a été correctement effectué. Cette ligne indique que l'or colloïdal a bien fonctionné, que la viabilité de la sone est adéquate et que la solution d'hybridation s'écoule correctement.
- Ligne de contrôle de l'amplification par PCR: L'absence de bande rouge à cet endroit indique que des inhibiteurs susceptibles d'interférer avec le processus d'amplification sont présents dans le prélèvement ou que l'ARN n'a pas été extrait correctement du prélèvement ou encore que la rétrotranscription de l'ARN extrait n'est pas conforme. Dans ce cas, l'essai doit être répété avec une seconde aliquote de l'échantillon ou avec un nouvel échantillon. Dans les échantillons fortement positifs, la ligne peut être faible ou négative en raison d'une teneur élevée en cible spécifique dans l'échantillon, mais cela n'invalide pas le résultat final.
- Ligne test: Deux bandes différentes sont incluses. L'une correspond à une région du gène qui intervient dans la codification de la protéine matrice commune à tous les virus de la Grippe A (Ligne test 1 ou TL1), tandis que l'autre correspond à une séquence spécifique du gène qui intervient dans la codification de l'hémagglutinine issue du virus nH1N1 (Ligne test 2 ou TL2). Une bande rouge sur TL1 uniquement indique que le prélèvement contient du matériel génétique issu d'un virus de la grippe A autre que nH1N1. Des bandes rouges sur TL1 et TL2 indiquent que le prélèvement contient du matériel génétique issu du virus de la grippe A nH1N1. L'apparition d'une bande rouge uniquement sur TL2 signifie que le test est invalide; il devra être refait sur une seconde aliquote du même prélèvement ou à partir d'un nouveau prélèvement.



USAGE IN VITRO UNIQUEMENT

Fabricant: VIRCELL, S.L. Pza. Domínguez Ortiz 1. Polígono Industrial Dos de Octubre.18320 Santa Fe *GRANADA* ESPAGNE* Tel.+34.958.441264* Fax+34.958.510712
<http://www.vircell.com>



LIMITES DU TEST:

- 1.-Cette trousse est destinée à une utilisation sur échantillons cliniques humains.
- 2.-Lire la notice soigneusement et appliquer strictement la procédure pour obtenir des résultats fiables. En particulier pour de bon résultats, vérifier que les volumes pipetés sont conformes aux recommandations et les temps et les températures d'incubation. Il est particulièrement important de réaliser chaque étape de l'essai dans les zones décrites dans la procédure d'essai.
- 3.-Ce test n'est pas indicatif du site d'infection et n'est pas destiné à remplacer le test d'isolement.
- 4.-La détection du microorganisme dépend du nombre d'organismes présents dans l'échantillon et pourrait être altérée par les méthodes de prélèvement d'échantillons, les facteurs du patient, l'état de l'infection et/ou la souche.
- 5.-Comme tout autre test diagnostique, les résultats doivent être évalués sur la base de toutes les données cliniques et de laboratoire. Les résultats doivent être interprétés avec les données cliniques et d'autres tests diagnostiques.
- 6.-Ce produit est exclusivement conçu pour être utilisé par des personnes formées aux techniques de PCR.
- 7.-Les résultats du test sont qualitatifs. Il n'existe pas de corrélation entre l'ordre de grandeur du résultat positif et le nombre de microorganismes dans l'échantillon.
- 8.-Ce test a été vérifié pour être utilisé avec des échantillons cliniques humains. Il n'a pas été vérifié avec d'autres types d'échantillon.
- 9.-La fiabilité des résultats dépendra de la réalisation correcte du prélèvement d'échantillons, du transport, du stockage et des procédures de traitement.
- 10.-Les performances n'ont pas été déterminées pour tous les génotypes.
- 11.-Le test fonctionne uniquement dans les limites des régions génomiques dans lesquelles les sondes ont été choisies. Du fait de la haute variabilité du génome de Influenza A il est possible que certains groupes ne soient pas détectés. Des modifications des séquences des oligonucléotides de PCR ou des sondes peuvent produire de faux négatifs.
- 12.-Un résultat négatif n'exclut pas la présence du microorganisme à des niveaux inférieurs à la limite de détection de l'essai.
- 13.-Un test positif n'exclut pas la possibilité de présence d'autres agents pathogènes.
- 14.-Le contrôle interne inclus dans l'essai n'élimine pas tous les faux négatifs.
- 15.-La détection de virus influenza dans l'échantillon n'indique pas forcément l'implication de l'agent pathogène dans l'épisode de la maladie. Par contre l'ensemble des données cliniques avec un résultat positif de PCR suggère une pathologie provoquée par le microorganisme détecté.

PERFORMANCES

SENSIBILITÉ ET SPECIFICITÉ:

150 échantillons prélevés avant l'apparition du virus influenza A nH1N1 et 153 prélevés après l'apparition du virus ont été testés avec du matériel de quantification de qRT-PCR.

Les résultats ont été les suivants:

| | Sensibilité | Spécificité |
|-------------------|-------------|-------------|
| Influenza A | 99% | 100% |
| Influenza A nH1N1 | 97.8% | 100% |

Sensibilité analytique:

Toute une série de dilutions d'ADN plasmidique, contenant une séquence du gène H1 du virus influenza A nH1N1, ont été traitées et testées. La trousse a pu détecter jusqu'à 1 copie d'ADN par réaction.

PRECISION INTRA-ASSAY:

2 échantillons (l'un positif proche de la limite de détection et l'autre négatif) ont été amplifiés 5 fois dans un seul essai réalisé par le même opérateur dans des conditions de travail identiques.

Des résultats similaires ont été observés dans tous les essais.

PRECISION INTER-ASSAY:

2 échantillons (l'un positif proche de la limite de détection et l'autre négatif) ont été amplifiés individuellement pendant 3 jours de suite par 2 opérateurs différents.

Des résultats similaires ont été observés dans tous les essais.

REACTIONS CROISEES ET INTERFERENCES:





Des échantillons artificiels contenant différents virus respiratoires ont aussi été testés (adenovirus, influenza A (H5N1), saisonnier influenza A (H1N1), influenza A (H3N2), influenza B, parainfluenza 1, parainfluenza 2, parainfluenza 3, respiratory syncytial virus). Tous les virus de la grippe A testés ont réagi avec la bande TL1 mais pas avec la bande TL2. Les autres virus n'ont provoqué aucun résultat positif sur les bandes TL.

| Virus | Souche | Source |
|-------------------------------|------------------------------|--------------|
| Adenovirus | Adenoid 71 | ATCC VR-1 |
| Influenza A (H5N1) | A/Vietnam/1194/2004 NIBRG-14 | NIBSC 07/252 |
| Saisonnier Influenza A (H1N1) | A/PR/8/34 | ATCC VR-95 |
| Influenza A (H3N2) | A/VICTORIA/3/75 | ATCC VR-822 |
| Influenza B | B/HONG KONG/5/72 | ATCC VR-823 |
| Parainfluenza 1 | Sendai/52 | ATCC VR-105 |
| Parainfluenza 2 | Greer | ATCC VR-92 |
| Parainfluenza 3 | C 243 | ATCC VR-93 |
| Respiratory Syncytial Virus | Long | ATCC VR-26 |

USAGE IN VITRO UNIQUÉMENT

Fabricant: VIRCELL, S.L. Pza. Domínguez Ortiz 1. Polígono Industrial Dos de Octubre.18320 Santa Fe *GRANADA* ESPAGNE* Tel.+34.958.441264* Fax+34.958.510712
<http://www.vircell.com>

SYMBOLES UTILISES SUR LES ETIQUETTES:

| | |
|---|---|
| IVD | Usage <i>in vitro</i> |
|  | Utiliser avant le: (date de péremption) |
|  2°C - 8°C | Conserver à 2-8°C |
|  | Contient la quantité suffisante pour <X> tests |
| LOT | Numéro de lot |
| REF | Code produit |
|  | Consulter la notice d'utilisation |
| RCNS X µl | Reconstituer en <X> µl |
| RCARD-2 | Carte de lecture de test de deux ligneés |
| ICARD | Carte d'interprétation |
| PCL | Ligne de contrôle de produit |
| PCRCL | Ligne contrôle d'amplification de la PCR |
| TL | Ligne test |
| TL1 | Ligne test 1 |
| TL2 | Ligne test 2 |
| S | Échantillon |
| S (+) | Échantillon positif |
| S(+) nH1N1 | Prélèvement positif au virus nH1N1 |
| S(+) NON nH1N1 | Prélèvement positif à un virus de la grippe A autre que nH1N1 |
| S (-) | Échantillon négatif |
| INVAL | Essai non valable |
| DATE | Date |

BIBLIOGRAPHIE :

1. Belshe., R. B. 2009 Implications of the emergence of a novel H1 Influenza virus. N Engl J Med Editorial:1-2.
2. CDC. H1N1 Flu. Infectious Disease Information by the Centers for Disease Control and Prevention. (<http://www.cdc.gov/h1n1flu/>).
3. Choi, Y.K., Goyal, S.M., Kang, S.W., Farnham, M.W. and Joo, H.S. 2002 Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays. J Virol. Methods 102:53-59.
4. Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team 2009 Emergence of a novel swine-origin Influenza A (H1N1) virus in humans. N Engl J Med. 361:1-10.
5. Stone, B., Burrows, J., Schepetiuk, S., Higgins, G., Hampson, A., Shaw, R and Kok, T.W. 2004 Rapid detection and simultaneous subtype differentiation of influenza A viruses by real time PCR. J Vir Methods 117:103-112.
6. Taubenberger, J.K., Layne, S.P. 2001 Diagnosis of Influenza virus: Coming to grips with the molecular era. Mol Diag 6(4):291-305.

Pour toute information complémentaire contacter:

customerservice@vircell.com

REVISION: Novembre 2009

USAGE IN VITRO UNIQUEMENT

Fabricant: VIRCELL, S.L. Pza. Domínguez Ortiz 1. Polígono Industrial Dos de Octubre.18320 Santa Fe *GRANADA* ESPAGNE* Tel.+34.958.441264* Fax+34.958.510712
<http://www.vircell.com>