



# ***RT-qPCR RespiVir Kit***

*Qualitative detection of Influenza A,  
Influenza B and SARS-CoV-2 RNA*

Détection qualitative de l'ARN des virus  
Influenza A, B et SARS-CoV-2

## **NOTICE D'UTILISATION**

**REF** KSC2FluAB

Notice d'utilisation : KSC2FluAB.NU

Révision : 001 du 2022-05-24



UTILISATION PRÉVUE : **DIAGNOSTIC IN VITRO**



205 rue des frères Lumière  
69970 CHAPONNAY  
FRANCE  
+33 (0)4 37 57 00 54  
contact@appolonbiotech.com  
[www.appolonbiotech.fr](http://www.appolonbiotech.fr)

## Avertissements

Ce dispositif est destiné à un usage diagnostique *in vitro* uniquement, nécessitant un personnel de laboratoire qualifié, formé à la biologie moléculaire et évoluant dans des infrastructures dédiées à ces technologies. Il est exclusivement réservé aux laboratoires de biologie médicale dotés d'une structure conforme aux recommandations de l'Agence Régionale de Santé.

*RT-qPCR RespiVir Kit* (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB) est marqué CE-IVD selon la Directive Européenne 98/79/CE.

## Abréviations

ADN : Acide desoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

CE : Conformité européenne

Ct : *Cycle threshold* (cycle seuil)

cp : Copies

DIV : Diagnostic *in vitro*

IC : Intervalle de confiance

IVD : *In vitro diagnostic*

PCR : *Polymerase chain reaction* (réaction d'amplification en chaîne)

qPCR : *Quantitative PCR*

RT : *Reverse transcription* (transcription inverse)

rx : Réaction

VPN : Valeur prédictive négative

VPP : Valeur prédictive positive

VRS : Virus respiratoire syncytial

## Mentions légales

La reproduction ou la transmission du présent document, en totalité ou en partie, est interdite sans l'autorisation écrite d'APPOLON BIOTECK.

APPOLON BIOTECK se réserve le droit de modifier ses produits et ses services à tout moment. Cette notice d'utilisation est susceptible de modification sans préavis. APPOLON BIOTECK décline toute responsabilité en cas d'erreurs ou d'omissions ou de tout dommage découlant de l'application ou de l'utilisation des présentes informations.

## SOMMAIRE

Avertissements .....	2
Abréviations .....	2
Mentions légales.....	2
SOMMAIRE .....	3
I. Nom du produit .....	4
II. Utilisation prévue .....	4
III. Description du produit.....	5
IV. Matériel requis non fourni dans le kit.....	6
IV.1. Matériel de prélèvement nasopharyngé et de transport viral .....	6
IV.2. Systèmes d'extraction d'ARN .....	6
IV.3. Equipements de laboratoire et réactifs .....	6
IV.4. Systèmes de PCR en temps réel .....	7
V. Réalisation du test .....	7
V.1. Principe du test .....	7
V.2. Types d'échantillons et modalités de prélèvements .....	8
V.3. Précautions d'emploi .....	9
VI. Protocole.....	10
VI.1. Protocole général : Flux d'analyse .....	10
VI.2. Extraction nucléaire par billes magnétiques .....	10
VI.3. Protocole d'amplification en temps réel.....	11
VII. Analyse des résultats .....	12
VII.1. Canaux de lecture de fluorescence .....	13
VII.2. Validation des contrôles .....	13
VII.3. Interprétation des résultats .....	14
VIII. Limites .....	17
IX. Performances analytiques .....	17
IX.1. Spécificité analytique .....	17
IX.2. Sensibilité analytique .....	18
X. Performances cliniques .....	19
XI. Résolution des problèmes .....	20
XI.1. Problèmes d'amplification.....	20
XI.2. Problèmes de contamination .....	21
XI.3. Echantillons inhibés .....	21
Références bibliographiques.....	21
Symboles et logos utilisés .....	22

## I. Nom du produit

### **RT-qPCR RespiVir KIT** (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB)

*Qualitative detection of Influenza A, Influenza B and SARS-CoV-2 RNA*

Traduction française : Détection qualitative de l'ARN des virus Influenza A, B et SARS-CoV-2

## II. Utilisation prévue

Un nouveau coronavirus (SARS-CoV-2) a été identifié à Wuhan (Chine) en décembre 2019. Il s'est rapidement propagé, responsable de la pandémie mondiale de COVID-19. Les virus de la grippe A et de la grippe B peuvent induire des symptômes similaires à ceux de la COVID-19, avec un tableau clinique peu spécifique d'une infection ou d'une autre. En phase aiguë d'infection, les agents viraux responsables et l'ARN de leurs génomes peuvent être détectables au niveau des voies respiratoires supérieures, et mis en évidence à partir d'écouvillonnage nasopharyngé de patients pour lesquels une telle infection est suspectée.

*RT-qPCR RespiVir Kit* (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB) est destiné à la détection qualitative de l'ARN des virus Influenza A, B et SARS-CoV-2 par des personnels de laboratoire qualifiés et formés aux bonnes pratiques de diagnostic de laboratoire et aux techniques de biologie moléculaire, en particulier la PCR en temps réel. Il est exclusivement réservé aux laboratoires de biologie médicale dotés d'une structure conforme aux recommandations de l'Agence Régionale de Santé.

*RT-qPCR RespiVir Kit* (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB) est certifié et optimisé pour les prélèvements nasopharyngés de patients, recueillis en milieu de transport MTL (APPOLON BIOTECK, MTL02-AB69) ou UTM® (COBAN) après extraction d'acides nucléiques par billes magnétiques (Genolution, NX-48S). Il permet la mise en évidence et la différenciation des agents viraux de la grippe A, de la grippe B et de la COVID-19. Il repose sur la détection simultanée du gène M des virus Influenza A, du gène NS des virus Influenza B et des gènes ORF-1ab et N des différents variants connus du SARS-CoV-2.

La recherche de ces différents virus a pour but « (i) de diminuer le taux d'admission en hospitalisation pour les patients aux urgences, (ii) d'organiser des mesures d'isolement séparé pour les patients hospitalisés ou hébergés au sein d'établissements médico-sociaux et porteurs des virus de la grippe et/ou du SARS-CoV-2 (afin d'éviter la transmission d'infection et les co-infections) et (iii) de mettre en place une prise en charge optimale diagnostique » [1]. Il s'adresse en particulier aux « patients symptomatiques adultes en établissements hospitaliers avec symptômes d'infection respiratoire susceptible d'être virale, ou résidant en établissements d'hébergement pour personnes âgées dépendantes, ou autres établissements médico-sociaux », « aux patients enfants présentant des symptômes d'une infection respiratoire, susceptibles d'avoir une origine grippale et/ou de COVID-19 » [1]. La Haute Autorité de Santé précise que les recherches directes des virus grippaux ne doivent avoir lieu qu'au cours de la période épidémique de grippe saisonnière, telle que définie par Santé Publique France [1].

La prise en charge médicale du patient doit être associée aux observations cliniques et aux données biologiques, aux antécédents du patient et aux informations épidémiologiques disponibles par ailleurs. Des résultats positifs ne peuvent en aucun cas exclure une co-infection bactérienne ou une co-infection par des virus autres qu'Influenza A, Influenza B et SARS-CoV-2. Inversement, des résultats négatifs n'excluent pas une infection par les virus Influenza A, B et SARS-CoV-2. Ils ne doivent pas être utilisés comme seule base de décision dans la prise en charge des patients. Le test *RT-qPCR RespiVir Kit* (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB) n'est pas destiné à la détection des virus grippaux de type C.

### III. Description du produit

RT-qPCR RespiVir Kit (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB) contient 3 tubes, décrits dans le **tableau 1**.

- Une solution enzymatique permettant, en 1 heure et 10 minutes, la réalisation de la réaction de transcription inverse (ou *reverse transcription* / RT) et d'amplification PCR en temps réel. Le tube est identifié par un **bouchon translucide** et une étiquette **RT-qPCR MIX**.
- Un **contrôle positif** constitué de virus inactivés de la grippe A, de la grippe B et de la COVID-19 ainsi que de cellules humaines qualifiées sans présence d'agents pathogènes. Il est utilisé pour valider les étapes d'extraction, de RT et de PCR sur chacune des cibles recherchées. Il est identifié par un **bouchon de couleur rouge**.
- Un **contrôle négatif** constitué uniquement de cellules humaines qualifiées sans présence de virus de la grippe A, de la grippe B et de la COVID-19, ou autres agents pathogènes connus. Il est utilisé pour valider les étapes d'extraction, de RT et de PCR. Il est identifié par un **bouchon de couleur bleue**.

**Tableau 1 : Composition de RT-qPCR RespiVir Kit (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB).**

Nom du composant	Composition	Quantité, Identification, Volume par tube	Cibles: gène Fluorescence	Stockage	Conservation
RT-qPCR MIX	<p><b>Mélange réactionnel de RT-qPCR :</b></p> <p>Amorces et sondes spécifiques :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- du gène M du virus Influenza A,</li> <li>- du gène NS du virus Influenza B,</li> <li>- des gènes N et ORF1ab du virus SARS-CoV-2</li> </ul> <p>Amorces et sonde spécifiques pour l'ARNm du gène RNase P humaine</p> <p>Tris-HCl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, UDG...</p> <p>Enzymes (reverse transcriptase et ADN polymérase thermo-résistante).</p>	<p>1 tube (96 tests)</p> <p>bouchon translucide</p> <p>750 µL</p>	<p>Virus Influenza A: gène M FAM</p> <p>Virus Influenza B: gène NS ROX</p>	-25 °C / -15 °C	12 mois
Contrôle Positif +	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Virus de la grippe A (H3N2, Switzerland/9715293/13), virus de la grippe B (Yamagata/16/88), virus SARS-Cov-2 (hCoV-19/France/GE1973/2020), inactivés et quantifiés</li> <li>- cellules humaines qualifiées sans présence des virus Grippe A, Grippe B et SARS-CoV-2 ou autres agents pathogènes, dans une solution d'inactivation virale et de préservation.</li> </ul>	<p>1 tube</p> <p>bouchon rouge</p> <p>420 µL</p>	<p>Virus SARS-CoV-2: gènes ORF1ab/N HEX</p>		
Contrôle Négatif -	<p>Cellules humaines qualifiées sans présence des virus Grippe A, Grippe B et SARS-CoV-2 ou autres agents pathogènes, dans une solution d'inactivation virale et de préservation.</p>	<p>1 tube</p> <p>bouchon bleu</p> <p>420 µL</p>	<p>ARN humain: ARNm RNase P Cy5</p>		

## IV. Matériel requis non fourni dans le kit

### IV.1. Matériel de prélèvement nasopharyngé et de transport viral

- Ecouillons secs stériles (*flocked swabs* Proteigene, CM-FS913-U-1000 ou équivalent)
- Milieu de recueil et de transport viral type MTL (APPOLON BIOTECK, MTL02-AB69) ou équivalent



*RT-qPCR RespiVir Kit* (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB) a été validé avec **écouvillons secs** (*flocked swabs* Proteigene, CM-FS913-U-1000) et recueil dans le **milieu de transport viral MTL** (Appolon Bioteck, MTL02-AB69) et le milieu UTM® (COPAN), **compatibles avec une extraction nucléique**. Pour tout autre milieu de transport, se référer aux recommandations du fournisseur et s'assurer de sa compatibilité. Dans tous les cas, prendre les mesures de protections individuelles, collectives et environnementales adéquates face à ces produits biologiques humains potentiellement infectieux.

### IV.2. Systèmes d'extraction d'ARN

*RT-qPCR RespiVir Kit* (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB) est utilisé à partir de prélèvements collectés et transportés en milieu de transport viral compatible avec une extraction de l'ARN viral. **Cette extraction nucléique / purification est nécessaire** à l'analyse par biologie moléculaire des échantillons (RT et qPCR). Nous recommandons l'utilisation d'une extraction par billes magnétiques (Genolution, NX-48S). En cas d'utilisation de tout autre système d'extraction d'acides nucléiques, il est nécessaire de s'assurer de la compatibilité avec la technologie RT-qPCR en temps réel en se référant aux recommandations d'utilisation du fournisseur retenu.

### IV.3. Equipements de laboratoire et réactifs

Tout matériel classique de laboratoire de biologie moléculaire, comprenant de manière non exhaustive :

- Congélateur -20°C.
- Réfrigérateur +4°C.
- Gants jetables non poudrés.
- Blouse de laboratoire.
- Centrifugeuse de paillasse à plaque et/ou pour microtubes de 1,5 mL et 2,0 mL.
- Vortex de paillasse.
- Micropipettes ajustables P10, P20, P200, P1000.
- Embouts stériles à filtre pour 10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL.
- Microtubes Eppendorf 1,5 mL ou équivalent.
- Barrettes ou plaques PCR temps réel 96 positions 0,2 mL.
- Films optiques spécifiques pour la PCR (ou bouchons optiques s'il s'agit de barrettes).
- Poste de Sécurité Microbiologique (PSM) pour manipulation des pathogènes de classe I ou II.
- Hotte biologique.
- Portoir froid ou glace pilée.
- Eau de qualité biologie moléculaire (dépourvue d'activités nucléasiques).
- Produits de décontamination ADN-ARN.
- En cas d'utilisation du système d'extraction d'ARN par billes magnétiques Genolution NX-48S (préconisé) : kit d'extraction Genolution, VN143.

## IV.4. Systèmes de PCR en temps réel



*RT-qPCR RespiVir Kit* (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB) est validé pour une utilisation avec les systèmes de PCR en temps réel CFX96 Touch™ real time PCR, Bio-Rad.

Pour tout autre système, suivre les recommandations d'utilisation du fournisseur retenu et effectuer une validation technique préalable.

## V. Réalisation du test

### V.1. Principe du test

*RT-qPCR RespiVir Kit* (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB) est basé sur l'amplification et la détection par fluorescence de régions spécifiques des virus de la grippe A, de la grippe B et de la Covid-19 (à longueurs d'onde différentes). Ces gènes spécifiques correspondent respectivement aux gènes M et NS pour les virus de la grippe A (fluorescence FAM) et de la grippe B (fluorescence ROX). Le gène N et le gène ORF1ab du virus SARS-CoV-2 sont amplifiés et détectés indépendamment sur le même canal de fluorescence (fluorescence HEX). L'apparition de ces fluorescences spécifiques est obtenue par la propriété 5' exonucléasique de la *Taq* polymérase et sa capacité à dégrader les sondes incluses dans le mélange réactionnel : le fluorochrome, et en conséquence la fluorescence, est ainsi libérée par hydrolyse de la sonde, appariée à un fragment complémentaire, lui-même spécifiquement amplifié si la cible est initialement présente dans l'échantillon. Cette fluorescence, spécifique à chaque cible virale, peut être lue par des capteurs optiques du thermocycleur permettant un suivi en temps réel de l'amplification de la (ou des) cible(s) recherchée(s).

Les composants nécessaires à la mise en évidence des virus Influenza A, Influenza B et SARS-CoV-2 et à la validation technique des étapes sont inclus dans la trousse diagnostique *RT-qPCR RespiVir Kit* (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB).

Ils comprennent :

- **Mix RT-qPCR**

La solution réactionnelle est constituée, outre les enzymes et tampon réactionnel requis, de 5 couples d'amorces et de 5 sondes TaqMan™, chacun correspondant à une région génomique spécifique des virus Influenza A, Influenza B et SARS-CoV-2 (**Tableau 1**). Pour ce dernier, 2 couples d'amorces correspondant à 2 régions génomiques différentes et 2 sondes couplées au même fluorochrome sont employées, diminuant tout risque de non-mise en évidence du SARS-CoV-2 même en cas de recombinaison / apparition de nouveaux variants non encore identifiés (gènes cibles ORF1ab et N). Les différentes sondes d'hydrolyse (TaqMan™) sont marquées à leurs extrémités 5' par les fluorochromes FAM pour le virus de la grippe A, ROX pour la grippe B, et HEX pour le virus SARS-CoV-2. Un cinquième couple d'amorces et une sonde d'hydrolyse (TaqMan™), marquée à son extrémité 5' avec le fluorochrome CY5, sont utilisés dans le kit comme contrôle interne de RT-qPCR permettant la détection de l'ARNm du gène de la RNase P humaine (**Figure 1**). Ce contrôle endogène est amplifié dans chaque échantillon y compris dans le contrôle positif et le contrôle négatif (fournis dans le kit) afin de valider le processus d'extraction des acides nucléiques ou de lyse, d'évaluer le statut d'inhibition de l'échantillon et de valider les étapes de transcription inverse / PCR (RT-PCR).

- **Contrôle positif**

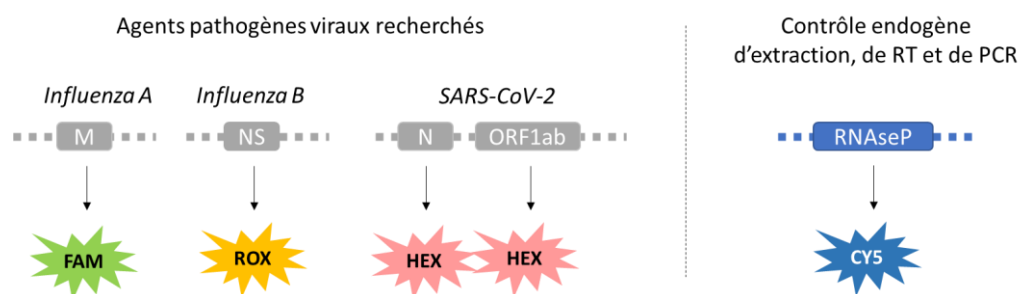
Le contrôle positif permet la validation de la RT-qPCR par la détection conjointe de l'ensemble des cibles, y compris l'ARNm du gène de la RNase P (contrôle endogène RT-PCR). Il est constitué de 3 virus différents inactivés (Influenza A, Influenza B, SARS-CoV-2) et de cellules humaines :

- Influenza A lignée H3N2 (Switzerland/9715293/13) présentant le gène M détecté sur le canal FAM.
- Influenza B, souche Yamagata/16/88, présentant le gène NS détecté sur le canal ROX.
- SARS-CoV-2, souche hCoV-19/France/GE1973/2020, présentant les gènes ORF1ab et N, détectés indépendamment, tous deux sur le canal HEX.
- Cellules humaines qualifiées sans présence de virus Influenza A, Influenza B et SARS-CoV-2, ou autres agents pathogènes, dans une solution d'inactivation virale et de préservation, présentant l'ARNm du gène de ménage RNase P, détecté sur le canal CY5.

- **Contrôle négatif**

Le contrôle négatif est constitué de cellules humaines, exprimant le gène de la RNase P humaine, qualifiées sans présence de virus Influenza A, Influenza B et SARS-CoV-2, ou autres agents pathogènes, et placées dans une solution d'inactivation virale et de préservation des acides nucléiques.

NB : Les contrôles positif et négatif permettent l'évaluation de l'efficacité de la préparation de l'échantillon (extraction des acides nucléiques), le bon déroulement du processus technique et l'absence d'inhibiteurs dans la réaction de RT-qPCR.



**FIGURE 1** : PRINCIPE GENERAL DE FONCTIONNEMENT DE LA TROUSSE DIAGNOSTIQUE *RT-qPCR RESPIVIR KIT* (APPOLON BIOTECK, KSC2FLUAB).

## V.2. Types d'échantillons et modalités de prélèvements

Les types d'échantillons pouvant être analysés sont des prélèvements nasopharyngés.



Il convient de se reporter aux recommandations des autorités de santé compétentes ainsi que celles du fournisseur du dispositif de prélèvement retenu. Nous conseillons l'utilisation du milieu de transport viral MTL (APPOLON BIOTECK, MTL02-AB69), dont la mise en œuvre est décrite ci-dessous. Il peut également être fait appel au milieu UTM® (COPAN) ou tout autre milieu et dispositifs adaptés en se référant aux recommandations des fabricants.

**Prélèvement nasopharyngé mettant en œuvre le milieu de transport viral MTL** (APPOLON BIOTECK, MTL02-AB69)

- 1- Etiqueter l'identité du patient sur le tube (code barre...).
- 2- Immerger l'écouvillon dans le milieu de transport viral MTL (APPOLON BIOTECK, MTL02-AB69) immédiatement après réalisation du prélèvement nasopharyngé.



- 3- Tourner l'écouvillon afin de relarguer le matériel biologique dans le tube de prélèvement MTL.
- 4- Retirer l'écouvillon du tube.
- 5- Jeter l'écouvillon dans une poubelle spécifique pour les matières biologiques dangereuses (procédures d'élimination des déchets d'activités de soins à risques infectieux (DASRI)).
- 6- Fermer soigneusement le tube avec le bouchon dédié.

### V.3. Précautions d'emploi

#### V.3.1. Précautions générales

- Eviter tout contact entre les réactifs de *RT-qPCR RespiVir Kit* (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB) et la peau. En cas de contact avec la peau, laver immédiatement et abondamment à l'eau.
- Préparer les échantillons sous un poste de sécurité microbiologique (PSM de type 2).
- Les réactifs non utilisés de *RT-qPCR RespiVir Kit* (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB) peuvent être considérés comme non dangereux et éliminés selon les procédures usuelles du laboratoire.
- Tout produit contaminé ou échantillon infectieux doit être éliminé selon les réglementations en vigueur (procédures d'élimination des DASRI).
- Ne pas utiliser les réactifs de *RT-qPCR RespiVir Kit* (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB) après la date de péremption indiquée.

#### V.3.2. Précautions particulières pour la biologie moléculaire

Les procédures d'amplification nécessitent des aménagements particuliers et un personnel qualifié pour éviter les contaminations croisées et la propagation de matériel génétique amplifié.

Les différentes étapes de la procédure doivent se faire dans des pièces séparées pour éviter tout risque de contamination. Le passage d'une zone à l'autre doit se faire de manière unidirectionnelle depuis la zone de prélèvement vers la zone de préparation des réactifs, puis vers la zone d'amplification PCR.



#### Important :

- Les blouses, pipettes et autres petits matériels de laboratoire doivent être dédiés pour chaque zone de travail.
- Ne jamais échanger le matériel d'une zone vers une autre au risque de contaminer le laboratoire.
- Ne jamais introduire un produit amplifié dans les pièces de préparation des réactifs ou des échantillons.
- Ne pas substituer de réactifs entre lots différents.
- Ne pas substituer de réactifs avec ceux d'autres fabricants.
- Ne pas utiliser les réactifs si ceux-ci sont réceptionnés décongelés ou dans un emballage altéré.
- Les réactifs doivent être entièrement décongelés en utilisant un bloc froid (+4°C) avant leur utilisation.
- La décongélation est totale en 15 min. Garder les réactifs sur le bloc froid pendant toute la manipulation.
- Porter des gants jetables.

#### V.3.3. Préparation et transport des échantillons



#### Important :

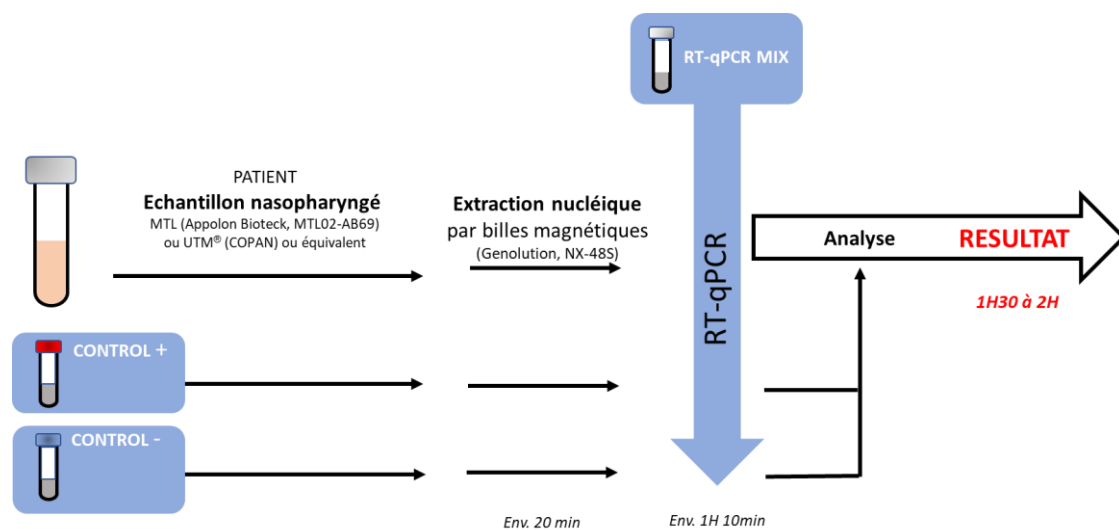
- Des conditions d'échantillonnage, de traitement de l'échantillon et de transport inappropriées peuvent conduire à des résultats erronés. Il convient de suivre les recommandations du fournisseur en respectant les consignes indiquées pour les applications de biologie moléculaire.

- Les prélèvements doivent être réalisés selon les instructions du laboratoire.
- Le transport des prélèvements doit être effectué dans le respect des réglementations en vigueur.
- Les performances de la trousse diagnostique *RT-qPCR RespiVir Kit* (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB) ont été prouvées sur prélèvements nasopharyngés (écouvillon nasopharyngé *flocked swabs* Proteigene, CM-FS913-U-1000) collectés sur le milieu de transport MTL (APPOLON BIOTECK, MTL02-AB69) et UTM® (COPAN) suivi d'une extraction par billes magnétiques (Genolution, NX-48S avec kit VN143).

## VI. Protocole

### VI.1. Protocole général : Flux d'analyse

*RT-qPCR RespiVir Kit* (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB) s'inscrit dans le flux d'analyse décrit figure 2 :



**FIGURE 2 : FLUX D'ANALYSE JUSQU'AU RESULTAT, DEPUIS UN ECHANTILLON NASOPHARYNGE DE PATIENTS EN MILIEU MTL (APPOLON BIOTECK, MTL-02-AB69), UTM® (COPAN) OU EQUIVALENT.**

Les échantillons doivent être manipulés en conditions de sécurité nécessaire par un opérateur dûment formé aux techniques de biologie moléculaire, afin d'éviter toute possibilité de contamination, entre échantillons et avec l'environnement. En fond bleu sont indiqués les éléments fournis dans le kit. Les contrôles négatif et positif, tout comme les échantillons patients nécessitent une extraction préalable des acides nucléiques par billes magnétiques (Genolution, NX-48S) ou tout autre système équivalent, selon les recommandations du fabricant adaptées à cette application. Les quantités de contrôles fournis permettent la réalisation de 2 extractions, soit 10 points tests contrôle positif et autant de tests contrôle négatif avec extraction nucléaire par billes magnétiques (Genolution, NX-48S). La réalisation globale du test, depuis un échantillon nasopharyngé jusqu'à l'analyse et l'obtention du résultat est effectuée en moins de 2 heures.

### VI.2. Extraction nucléaire par billes magnétiques



L'extraction des ARN à partir des échantillons nasopharyngés peut être réalisée par un système automatisé à billes magnétiques ou équivalent. Ce kit a été validé pour usage avec extraction par billes magnétiques avec l'automate NX-48S (Genolution). Pour tout autre automate, il est recommandé de suivre les préconisations mentionnées dans les notices d'utilisation des dispositifs et systèmes d'extraction retenus.

Les contrôles positif et négatif fournis dans *RT-qPCR RespiVir Kit* (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB) doivent être extraits conjointement aux ARN des échantillons, afin de garantir leur rôle de contrôles d'extraction nucléique, de transcription inverse et de PCR.

### VI.3. Protocole d'amplification en temps réel



#### Important :

- Pour éviter toute contamination, préparez les réactifs dans un poste de travail dédié à la RT-PCR.
- N'utilisez pas la même pipette pour les contrôles et les échantillons biologiques / ARN extraits.
- Utilisez toujours des pointes de pipette stériles anti-aérosols à filtre.
- Maintenez un environnement sans nucléases (RNases et DNases).
- Protégez les tests de la lumière.
- Une fois la plaque RT-PCR scellée par un film adhésif, placez celle-ci immédiatement dans le système de PCR en temps réel.

Pour chaque plaque RT-qPCR, inclure les contrôles suivants dans les séries de tests :

- Contrôle positif d'extraction, de RT et de PCR : 7,5 µL (par réaction) de l'extrait nucléique réalisé à partir du contrôle positif (tube à bouchon rouge) inclus dans *RT-qPCR RespiVir Kit* (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB)
- Contrôle négatif d'extraction, de RT et de PCR : 7,5 µL (par réaction) de l'extrait nucléique réalisé à partir du contrôle négatif (tube à bouchon bleu) inclus dans *RT-qPCR RespiVir Kit* (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB)
- Un contrôle d'absence de contamination sans aucune matrice nucléique ou No Template Control (NTC) : 7,5 µL d'eau de qualité biologie moléculaire qualifiée exempte d'ADN, d'ARN, de DNases et RNases.

1. Etablir une feuille de route technique (plan de plaque) spécifiant l'identité des patients.
2. Décongeler les réactifs et prévoir le nombre de réactions comme suit :
  - 1 réaction pour chaque échantillon (patient) à tester.  
*Ex : prévoir 93 réactions pour 93 échantillons à tester*
  - 1 réaction pour le contrôle positif.
  - 1 réaction pour le contrôle négatif.
  - 1 réaction pour le contrôle négatif d'amplification PCR NTC (eau)
3. Réaliser les mélanges réactionnels suivant, indiqués également **Tableau 2** :
  - a. Distribuer 7,5 µL du mix d'amplification dans chaque puits de PCR suivant le nombre de patients et de contrôles.
  - b. Ajouter 7,5 µL de chaque ARN extrait, suivant le plan de plaque.
  - c. Déposer 7,5 µL des ARN préalablement extraits du contrôle positif (bouchon Rouge) dans le puits contrôle positif.
  - d. Déposer 7,5 µL des ARN préalablement extraits du contrôle négatif (bouchon Bleu) dans le puits contrôle négatif.
  - e. Déposer 7,5 µL d'eau de qualité biologie moléculaire qualifiée exempte d'ADN, d'ARN, de DNases et RNases (contrôle négatif de PCR : NTC).
  - f. Sceller la plaque avec un film adhésif optique.
  - g. Centrifuger légèrement la plaque.
  - h. Lancer le profil thermique d'amplification (**Tableau 3**) avec lecture des canaux de fluorescence CY5, FAM, HEX et ROX (**Tableau 4**).

**Tableau 2** : Volumes à distribuer par puits de RT-qPCR.

Produit	Volume/puits échantillon (patient)	Volume/puits Contrôle +	Volume/puits Contrôle -	Volume/puits Contrôle - de PCR (NTC)
Mix RT-qPCR – <i>bouchon translucide</i>	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
ARN extrait de l'échantillon à tester	7,5 µL	-	-	-
ARN extraits du Contrôle positif <i>bouchon rouge</i>	-	7,5 µL	-	-
Contrôle négatif <i>bouchon bleu</i>	-	-	7,5 µL	-
Eau de qualité biologie moléculaire	-	-	-	7,5 µL
<b>Volume total de réaction</b>	<b>15 µL</b>	<b>15 µL</b>	<b>15 µL</b>	<b>15 µL</b>

**Tableau 3** : Programme de RT-qPCR.

Etapes	Temps	Température	Cycles	Acquisition de fluorescence
Transcription inverse (RT)	5 min	50°C	1	Non applicable
Activation de la <i>Taq</i> polymérase	2 min	95°C	1	Non applicable
Amplification	10 sec 30 sec 10 sec	95°C 63°C 72°C	40	CY5 FAM HEX ROX

**Tableau 4** : Canaux de lecture de fluorescence et cibles associées.

Canal de lecture	Cible associée	
CY5	RNase P	humain
FAM	Gène M	virus Grippe A
HEX	Gènes ORF1ab / N	SARS-CoV-2
ROX	Gène NS	virus Grippe B

## VII. Analyse des résultats

Pour tout test analysé par *RT-qPCR RespiVir Kit* (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB), les courbes d'amplification doivent être examinées soigneusement. Les analyses de résultats sont établies automatiquement par le logiciel du thermocycleur. Le calcul de Ct doit être sélectionné parmi les options d'analyse. Si le seuil de détection automatique semble mal réglé car impacté par le bruit de fond du signal des premiers cycles, il peut être nécessaire d'appliquer un seuil de détection manuel. Pour un réglage des seuils (*threshold*), il est nécessaire de se référer aux indications fournies par le fournisseur de thermocycleur.



Un signal est considéré positif (indiqué « + » dans les tableaux suivants) s'il présente une allure d'amplification sigmoïdale et

- un Ct  $\leq$  36 pour le canal de lecture CY5 (contrôle endogène RNaseP)
- un Ct  $\leq$  37 pour le canal de lecture FAM (virus grippe A), pour le canal de lecture ROX (virus grippe B) ou pour le canal de lecture HEX (virus SARS-CoV-2)

*A contrario*, un signal est considéré négatif (indiqué « - » dans les tableaux suivants) si ces 2 conditions ne sont pas remplies.

## VII.1. Canaux de lecture de fluorescence

Les sondes utilisées dans *RT-qPCR RespiVir Kit* (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB) permettent (**Tableau 4**) :

- la détection du gène M du virus Influenza A par le canal de lecture FAM,
- la détection du gène N du virus Influenza B par le canal de lecture ROX
- la détection des gènes ORF1ab et N du SARS-CoV-2 par le canal de lecture HEX,
- la détection de l'ARNm du gène RNase P humaine (contrôle endogène) par le canal CY5.

La **figure 3** montre un exemple de profil d'amplification de chacun des gènes cibles testés.

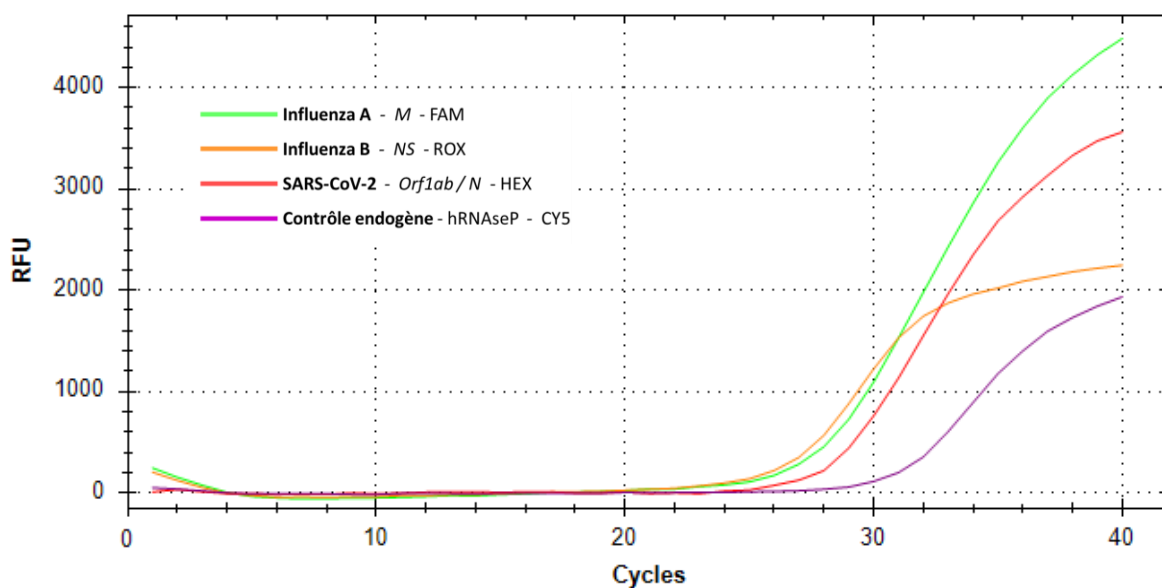


FIGURE 3 : DETECTION SIMULTANEE DES CIBLES DES VIRUS INFLUENZA A, INFLUENZA B, SARS-CoV-2 ET DE L'ARNM DE LA RNASE P TELLE QU'OBTENUE A PARTIR DU CONTROLE POSITIF FOURNI, APRES EXTRACTION.

## VII.2. Validation des contrôles

Pour tous les patients analysés par *RT-qPCR RespiVir Kit* (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB), les courbes d'amplification des contrôles positifs et négatifs inclus dans le kit doivent être impérativement intégrées dans le flux des analyses et examinées soigneusement avant le rendu des résultats patients. Un signal est considéré positif s'il implique :

- Une allure sigmoïdale et un Ct  $\leq 36$  pour le canal de lecture CY5 (contrôle RNaseP)
- Une allure sigmoïdale et un Ct  $\leq 37$  pour les canaux de lecture FAM (virus grippe A), ROX (virus grippe B) et HEX (virus SARS-CoV-2)

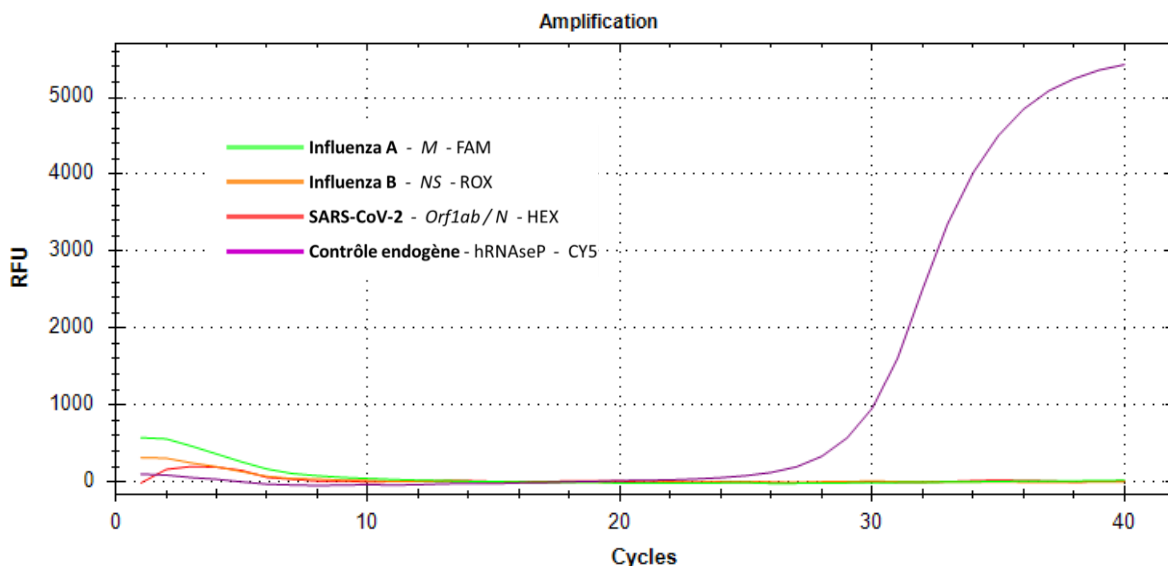
La réaction de PCR est ainsi considérée validée lorsque les critères reportés dans le **Tableau 5** sont respectés.

**Tableau 5 : Critères de validation d'une série RT-qPCR.**

	FAM <i>Influenza A</i>	ROX <i>Influenza B</i>	HEX <i>SARS-CoV-2</i>	CY5 <i>RNaseP</i>	Statut de l'analyse
Contrôle positif	+	+	+	+	Extraction et RT-qPCR validée
Contrôle négatif	-	-	-	+	
Contrôle négatif de PCR (NTC)	-	-	-	-	Aucune contamination détectée

### VII.3. Interprétation des résultats

Chaque échantillon doit être analysé individuellement. L'absence d'inhibition pour chaque échantillon est vérifiée par la présence d'une courbe d'amplification dans le canal CY5 correspondant au contrôle endogène (gène de la RNase P humaine). Le résultat type est résumé sur la **figure 4**.



**FIGURE 4 : PROFIL D'AMPLIFICATION DANS LE CANAL 650 NM (CY5) CORRESPONDANT AU CONTRÔLE ENDOGÈNE (ARNM DE LA RNASE P HUMAINE), POUR LE CAS D'UN ÉCHANTILLON CLINIQUE NÉGATIF OU TEL QU'OBTENU AVEC LE CONTRÔLE NÉGATIF DU RT-qPCR RESPIVIR KIT (APPOLON BIOTECK, KSC2FLUAB) APRES EXTRACTION.**

Le biologiste doit analyser les courbes d'amplification pour chaque cible testée avant de rendre les résultats. Le **tableau 6** résume les cas de figure des résultats du kit.

**Tableau 6 : Interprétation des résultats de la RT-qPCR pour l'échantillon analysé avec RT-qPCR RespiVir Kit (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB).**

FAM	ROX	HEX	CY5	Résultat	Conclusion
+	-	+	+	Présence de l'ARN <i>M</i> du virus Influenza A	<b>POSITIF virus de la grippe A</b>
-	+	-	+	Présence de l'ARN <i>NS</i> du virus Influenza B	<b>POSITIF virus de la grippe B</b>
-	-	+	+	Présence des ARN <i>ORF1ab</i> et <i>N</i> du virus SARS-CoV-2	<b>POSITIF virus SARS-CoV-2</b>
+	+	-	+	*Présence de l'ARN <i>M</i> du virus Influenza A et de l'ARN <i>NS</i> du virus Influenza B	<b>POSITIF virus de la grippe A <u>et</u> B → Co-infection*</b>
+	-	+	+	**Présence conjointe de l'ARN <i>M</i> du virus Influenza A et des ARN <i>ORF1ab</i> et <i>N</i> du virus SARS-CoV-2	<b>POSITIF SARS-Cov-2 <u>et</u> virus de la grippe A → Co-infection**</b>
-	+	+	+	**Présence conjointe de l'ARN <i>NS</i> du virus Influenza B et des ARN <i>ORF1ab</i> et <i>N</i> du virus SARS-CoV-2	<b>POSITIF SARS-Cov-2 <u>et</u> virus de la grippe B → Co-infection**</b>
+	+	+	+	***Présence conjointe de l'ARN <i>M</i> du virus Influenza A, de l'ARN <i>NS</i> du virus Influenza B et des ARN <i>ORF1ab</i> et <i>N</i> du virus SARS-CoV-2	<b>POSITIF SARS-Cov-2 <u>et</u> virus de la grippe A <u>et</u> virus de la grippe B → Co-infection***</b>
-	-	-	+	Aucun gène recherché n'est détecté	<b>NEGATIF SARS-CoV-2 et virus des grippes A et B</b>

\*Les co-infections à virus Influenza A et Influenza B, bien que rares, sont possibles [2,3].

\*\*Les co-infections à virus Influenza (A ou B) et SARS-CoV-2 sont possibles [4,5].

\*\*\*A notre connaissance, il n'est pas rapporté pour l'heure de co-infections simultanées aux virus Influenza A, B et SARS-CoV-2. Un tel résultat nécessite en conséquence d'être confirmé par un nouveau test (cf VII.3.3.).

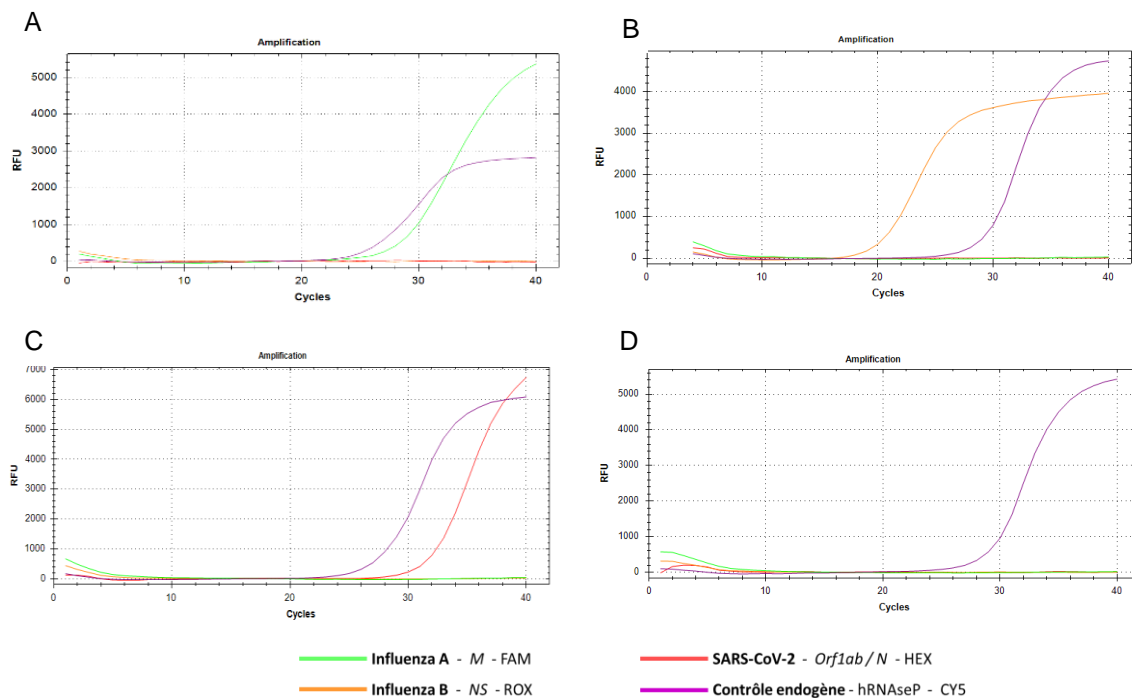
### VII.3.1. Résultat positif

Un patient est considéré positif lorsqu'un des profils de RT-qPCR suivant est observé (**Figure 5**) :

1. Grippe A : présence des courbes d'amplification FAM (ORF1ab / N) et Cy5 (RNase P) avec Ct≤37 :  
**patient Virus Influenza A POSITIF (figure 5A)**
2. Grippe B : présence des courbes d'amplification FAM (ORF1ab / N) et Cy5 (RNase P) avec Ct≤37 :  
**patient Virus Influenza B POSITIF (figure 5B)**
3. Covid-19 : présence des courbes d'amplification FAM (ORF1ab / N) et Cy5 (RNase P) avec Ct≤37 :  
**patient SARS-CoV-2 POSITIF (figure 5C)**

*NB<sub>1</sub>* : Dans certains cas, la fluorescence dans le canal Cy5 peut être absente alors qu'une (ou plusieurs) courbe(s) d'amplification dans un des autres canaux est présente : le résultat doit être rendu positif.

*NB<sub>2</sub>* : des co-infections virales sont possibles (cf Tableau 6 pour leur interprétation)



**FIGURE 5 : PROFILS TYPE D'AMPLIFICATION OBTENUS AVEC DES ECHANTILLONS NASOPHARYNGES DE PATIENTS (A) POSITIF AU VIRUS INFLUENZA A, (B) POSITIF AU VIRUS INFLUENZA B, (C) POSITIF AU VIRUS SARS-CoV-2 ET (D) NEGATIF AUX VIRUS INFLUENZA A, INFLUENZA B ET SARS-CoV-2.**

### VII.3.2. Résultat négatif

Un patient est considéré négatif lorsque seule la courbe d'amplification dans le canal CY5 (RNase P) est détectée avec une valeur de  $Ct \leq 36$  (Figure 5-D)

### VII.3.3. Résultats douteux

En présence de courbes d'amplification dans les canaux FAM, HEX et ROX, avec détection ou non d'un signal dans le canal CY5, le résultat est considéré comme douteux car indiquant une co-infection à un virus Influenza A, un virus Influenza B et un virus SARS-CoV-2. Il est alors recommandé de refaire l'analyse. Si les résultats restent identiques, le patient doit être considéré comme positif aux virus Influenza A, Influenza B SARS-CoV-2.

### VII.3.4. Résultat invalide

Aucune courbe d'amplification dans l'ensemble des canaux n'est détectée.



## VIII. Limites

- L'utilisation de *RT-qPCR RespiVir Kit* (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB) est réservée au personnel dûment formé aux procédures et techniques de biologie moléculaire.
- Le non-respect des instructions mentionnées dans ce manuel d'utilisation peut conduire à des résultats erronés.
- Les performances de *RT-qPCR RespiVir Kit* (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB) ont été établies sur prélèvements nasopharyngés dans un milieu de transport et de lyse MTL (APPOLON BIOTECK, MTL02-AB69) et UTM® (COBAN). Les échantillons doivent être collectés, transportés et conservés selon les procédures et conditions appropriées. A défaut, la capacité du kit à détecter les séquences cibles d'intérêt peut être affectée.
- L'extraction et l'amplification des acides nucléiques doivent être réalisées en utilisant le matériel et les méthodes listées dans ce manuel d'utilisation. Pour tout autre matériel non cité dans ce manuel, nous recommandons d'évaluer son efficacité par une procédure de validation interne du laboratoire.

Des résultats faux négatifs peuvent provenir de :

- Non-respect des procédures de recueil des prélèvements,
- Non-respect des conditions de transport ou de conservation des échantillons,
- Présence d'inhibiteurs de PCR,
- Utilisation de réactifs non autorisés ou périmés,
- Utilisation de réactifs non conservés dans les conditions spécifiées dans le manuel d'utilisation,
- Non-respect des instructions d'utilisation du kit.

Des résultats faux positifs peuvent provenir de :

- Contaminations croisées entre échantillons durant la manipulation des échantillons,
- Erreurs d'étiquetage,
- Contamination avec le contrôle positif lors de sa manipulation.

Un résultat négatif n'empêche pas une infection subséquente par le virus SARS-CoV-2 et/ou les virus Influenza A ou B. Il ne doit pas constituer la base unique de décision de prise en charge du patient. Un résultat négatif doit être combiné avec les observations cliniques, l'historique du patient et le contexte épidémiologique.

## IX. Performances analytiques

### IX.1. Spécificité analytique

#### IX.1.1. Inclusivité

Afin de vérifier la spécificité des amorces et des sondes, une analyse *in silico* de recherche d'homologie de séquences (*Blast N*) a été effectuée à l'aide du logiciel *Geneious Prime 2022* pour les oligonucléotides utilisés dans *RT-qPCR RespiVir Kit* (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB) en comparaison aux génomes originaux déposés sur la base de données GISAID (SARS-CoV-2) et GenBank (Virus Influenza A et B). Les 105 génomes analysés sont également répartis selon les cibles (35 génomes viraux de grippe A, de grippe B et de SARS-CoV2). Pour la grippe A, 17 sont de sous-type H1N1 et 18 de sous-type H3N2. Les génomes de la grippe B représentent les 2 lignées « Yamagata » et « Victoria ». Ils sont également représentatifs de différentes zones géographiques. Les 35 génomes des souches SARS-CoV-2 correspondent au type référence (Wuhan) et à différents variants (alpha, bêta, gamma, delta, kappa, omicron BA.1, omicron BA.2, omicron BA.4, omicron BA.5 et autres).

Les résultats montrent vis-à-vis des génomes du virus SARS-CoV-2 une homologie de séquence de 100% quelle que soit la souche du SARS-CoV-2 considérée, pour l'ensemble amorces / sonde d'au moins un des deux marqueurs conservés (gènes ORF1ab et N). Inversement, toute homologie inférieure à 100% ne concerne qu'un des 2 marqueurs conservés, et pour lequel le(s) mésappariement(s) n'impacte pas la détection d'un patient positif SARS-CoV-2.

Vis-à-vis des virus de la grippe A, l'homologie est de 100% pour une des amorces et pour la sonde, quelle que soient les souches analysées. Une homologie de 94% peut être observée pour l'autre amorce (résultant d'un seul mésappariement), qui n'impacte pas l'amplification PCR (localisation du mésappariement, conditions réactionnelles utilisées).

Vis-à-vis des virus de la grippe B, l'homologie est de 100% pour une des amorces et pour la sonde, quelle que soient les souches analysées. Une homologie de 96% peut être observée pour l'autre amorce (résultant d'un seul mésappariement), qui n'impacte pas l'amplification PCR (localisation du mésappariement, conditions réactionnelles utilisées).

### **IX.1.2. Exclusivité – Réactions croisées *in silico***

La spécificité des amorces et sondes de *RT-qPCR RespiVir Kit* (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB) est testée sur un panel de séquences génomiques de 60 souches (en particulier virales et bactériennes). Ces séquences génomiques ont été obtenues depuis la base de données Genbank du NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) et analysées à l'aide du logiciel *Geneious Prime 2022*. Ces souches représentent 24 autres coronavirus humains apparentés (229E, HKU1, OC43, NL63, MERS...) et pour lesquels aucune réaction croisée n'est possible dans les conditions réactionnelles (au moins un oligonucléotide par cible présentant une identité  $\leq 75\%$ ). Il en est de même vis-à-vis d'autres virus (total de 45 génomes), en particulier le virus de la grippe C et le virus respiratoire syncytial VRS pour lesquels au moins un des oligonucléotides par cible présente une identité  $\leq 65\%$ . Ces valeurs d'identité sont encore plus faibles vis-à-vis du génome de 14 bactéries pathogènes et de *Candida albicans* et *Pneumocystis jirovicii*.

En conséquence, sur la base de ces analyses bioinformatiques, il n'existe pas de risques de réactions croisées de *RT-qPCR RespiVir Kit* (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB) vis-à-vis de virus apparentés (SARS-CoV, Grippe C, VRS) et d'autres pathogènes respiratoires viraux ou autres.

## **IX.2. Sensibilité analytique**

La concentration la plus faible détectée à un intervalle de confiance de 95% est considérée comme la limite de détection (LoD) du *RT-qPCR RespiVir Kit* (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB).

La limite de détection est estimée sur 3 répliques issues de dilutions de virus inactivés et quantifiés. Ceux-ci sont dilués dans des matrices issues de prélèvements nasopharyngés de patients réputés négatifs à ces virus, suivis d'une extraction nucléaire par billes magnétiques (Genolution, NX-48S). Les dilutions vont de  $10^6$  à  $10^2$  copies du SARS-CoV-2 (variant Delta) par réaction et de  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/mL à 0,5 TCID<sub>50</sub>/mL pour les virus de la grippe A (H1N1 et H3N2) et les virus de la grippe B (lignées Victoria et Yamagata).

Pour chacune de ces estimations primaires, la LoD de chacune des cibles est vérifiée sur 24 répliques. Les résultats de ces LoD pour chacun des virus sont résumés dans le **tableau 7**, avec un intervalle de confiance de 95% et un coefficient de variation compris entre 0,74% et 2,68% selon la cible. Ces LoD sont de 100 cp/rx pour le virus SARS-CoV-2 et de 1 TCID<sub>50</sub>/mL pour les virus de la grippe pour les 4 lignées testées.

**Tableau 7 : Limite de Détection (LoD) de RT-qPCR RespiVir Kit (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB) établie sur 24 répliques, après extraction des acides nucléiques par billes magnétiques (Genolution, NX-48S).**

Virus	Lignée	Limite de détection LoD
SARS-CoV-2	Delta 0163-0065	100 cp / rx
Virus de la Grippe A	H1N1 (PR/8134)	1 TCID <sub>50</sub> /mL
	H3N2 (Switzerland/9715293/13)	1 TCID <sub>50</sub> /mL
Virus de la Grippe B	Victoria / 504 / 001	1 TCID <sub>50</sub> /mL
	Yamagata / 16 / 88	1 TCID <sub>50</sub> /mL

## X. Performances cliniques

Les performances cliniques du RT-qPCR RespiVir Kit (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB) sont établies sur des échantillons cliniques nasopharyngés, recueillis en milieu MTL (APPOLON BIOTECK, MTL02-AB69) ou UTM® (COBAN), suivi d'une extraction d'acides nucléiques par billes magnétiques (Genolution, NX-48S) (n=72 positifs pour une des cibles, pour un total de n=123 échantillons testés). Les résultats sont consignés dans le **tableau 8**.

**Tableau 8 : Synthèse des résultats des performances cliniques de RT-qPCR RespiVir Kit (APPOLON BIOTECK, KSC2FluAB) réalisées sur des échantillons cliniques.**

	Statistique	Valeur	IC 95%
SARS-CoV-2	Sensibilité	100%	94% à 100%
	Spécificité	100%	88% à 100%
	Valeur prédictive positive (VPP)	100%	
	Valeur prédictive négative (VPN)	100%	
	Précision	100%	96% à 100%
Grippes A et B	Sensibilité	100%	86% à 100%
	Spécificité	100%	86% à 100%
	Valeur prédictive positive (VPP)	100%	
	Valeur prédictive négative (VPN)	100%	
	Précision	100%	93% à 100%

## XI. Résolution des problèmes

### XI.1. Problèmes d'amplification

Causes possibles	Solutions
Altération du mix d'amplification	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eviter les cycles de congélation / décongélation.</li> <li>• Vérifier que le mix d'amplification a été recongelé à -20°C immédiatement après usage.</li> <li>• Utiliser un bloc froid (+4°C) lors de la distribution du master mix PCR et des échantillons.</li> <li>• Les enzymes RT et Taq polymérase sont sensibles aux variations de température. Ne pas laisser à température ambiante.</li> <li>• Vérifier les dates de péremption du lot utilisé.</li> </ul>
Non-respect des conditions de prélèvement, transport et conservation de l'échantillon	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suivre les instructions concernant la préparation, le transport et la conservation des échantillons.</li> <li>• Vérifier le délai entre le recueil de l'échantillon et son analyse par RT-PCR.</li> </ul>
Problème pendant l'extraction des acides nucléiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vérifier que les échantillons sont homogénéisés avant prélèvement pour l'étape d'extraction.</li> <li>• Vérifier le protocole et le matériel utilisé pour réaliser l'extraction des échantillons.</li> <li>• Toujours réaliser une maintenance préventive des automates d'extraction suivant les recommandations du constructeur.</li> </ul>
Erreur de distribution des réactifs ou de l'échantillon	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Réaliser un plan de plaque pour sécuriser les transferts.</li> <li>• Vérifier la calibration des pipettes, qui doivent faire l'objet d'un contrôle métrologique régulier.</li> <li>• S'assurer que la solution d'amplification, les témoins et les échantillons sont bien homogénéisés avant leur distribution dans les puits de plaque de PCR.</li> </ul>
Erreur de programmation du thermocycleur	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vérifier tous les paramètres de programmation du thermocycleur (canal et mode de détection, nombre de cycles, température, temps, volume réactionnel, ...).</li> </ul>
Problème d'amplification	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vérifier les performances du bloc Peltier suivant les recommandations du fabricant.</li> <li>• Effectuer une maintenance préventive sur les appareils de PCR en temps réel suivant les recommandations du fabricant.</li> <li>• Vérifier que la plaque PCR est bien scellée avec le film optique.</li> <li>• Vérifier que le consommable plastique utilisé est bien celui recommandé pour l'instrument utilisé (plaque demi-jupe, tubes/ plaque low profile, ...).</li> </ul>
Erreur d'analyse des résultats	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vérifier l'ajustement de la ligne de seuil (threshold).</li> <li>• Analyser les courbes d'amplification pour chaque cible et pour chaque patient.</li> <li>• Vérifier l'intensité de fluorescence des courbes d'amplification.</li> </ul>
Erreur d'interprétation des résultats	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vérifier que les critères de validation du run sont atteints comme indiqué dans le manuel.</li> <li>• Vérifier que le thermocycleur utilisé est compatible et fait partie des thermocycleurs validés avec le kit.</li> <li>• Comparer les résultats du contrôle d'extraction de l'échantillon avec ceux du témoin négatif d'extraction. Diluer l'échantillon si nécessaire.</li> </ul>

## XI.2. Problèmes de contamination

Causes possibles	Solutions
Contamination durant l'expérimentation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Décontaminer tout le petit matériel de laboratoire à l'aide de produits adaptés à l'élimination d'acides nucléiques.</li> <li>• Changer les produits utilisés (eau, réactif de PCR...)</li> </ul>
Erreur de distribution des réactifs ou de l'échantillon	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Réaliser un plan de plaque pour sécuriser les transferts.</li> <li>• Vérifier la calibration des pipettes, qui doivent faire l'objet d'un contrôle métrologique régulier.</li> <li>• S'assurer que les mix d'amplification, les témoins et les échantillons sont bien homogénéisés avant le dispatch dans les micro-tubes d'amplification.</li> </ul>
Erreur d'analyse des résultats	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vérifier l'ajustement de la ligne de seuil (threshold).</li> </ul>
















## XI.3. Echantillons inhibés

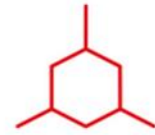
Causes possibles	Solutions
Problème durant l'extraction	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vérifier que les échantillons sont bien homogénéisés avant le prélèvement pour l'extraction des acides nucléiques.</li> <li>• Contrôler le matériel et les solutions utilisées pour l'extraction.</li> <li>• Refaire l'extraction.</li> <li>• Toujours effectuer une maintenance préventive sur les automates d'extraction conformément aux recommandations du fabricant.</li> </ul>

## Références bibliographiques

- [1] HAS- Haute Autorité à la Santé (2020). Tests diagnostiques pour différencier la COVID-19 des infections respiratoires hivernales • octobre 2020
- [2] Pérez-García, F., Vásquez, V., de Egea, V., Catalán, P., Rodríguez-Sánchez, B., & Bouza, E. (2016). Influenza A and B co-infection: a case-control study and review of the literature. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35(6), 941-946.
- [3] Gregianini, T. S., Varella, I. R. S., Fisch, P., Martins, L. G., & Veiga, A. B. (2019). Dual and triple infections with influenza A and B viruses: a case-control study in Southern Brazil. *The Journal of infectious diseases*, 220(6), 961-968.
- [4] Konala, V. M., Adapa, S., Gayam, V., Naramala, S., Daggubati, S. R., Kammari, C. B., & Chenna, A. (2020). Co-infection with Influenza A and COVID-19. *European journal of case reports in internal medicine*, 7(5).
- [5] Dadashi, M., Khaleghnejad, S., Abedi Elkhichi, P., Goudarzi, M., Goudarzi, H., Taghavi, A., ... & Hajikhani, B. (2021). COVID-19 and influenza co-infection: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in medicine*, 8, 971.

## Symboles et logos utilisés

	Utilisation <i>in vitro</i> seulement		Ne pas réutiliser
	Date d'expiration		Lire la notice avant utilisation
	Danger		Craint l'humidité
	Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé		A conserver à l'abri de la lumière
	Date de fabrication		Numéro de lot
	Référence du produit		Quantité par unité (ici nombre de réaction contenue dans un tube de Mix réactionnel)
	Intervalle de température de conservation		Marquage CE
	Fabricant		



APPOLON  
BIOTECK



205 rue des frères Lumière  
69970 CHAPONNAY  
FRANCE  
+33 (0)4 37 57 00 54  
contact@appolonbiotech.com  
[www.appolonbiotech.fr](http://www.appolonbiotech.fr)