

Mode d'emploi

RealStar[®]

Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0

09/2021 FR

RealStar[®]

Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0

Pour utilisation avec

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
VERSANT[®] kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare Diagnostics)
ABI Prism[®] 7500 SDS (Applied Biosystems)
ABI Prism[®] 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
LightCycler[®] 480 Instrument II (Roche)
Rotor-Gene[®] 6000 (Corbett Research)
Rotor-Gene[®] Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)



671013



96



09 2021



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

Sommaire

1.	Usage prévu.....	6
2.	Composants du kit.....	6
3.	Stockage	6
4.	Matériel requis non fourni	7
5.	Informations générales.....	8
6.	Description du produit.....	10
6.1	Instruments de PCR en temps réel	12
7.	Mises en garde et précautions.....	12
8.	Procédure	14
8.1	Préparation du prélèvement.....	14
8.2	Préparation du Master Mix.....	15
8.3	Préparation de la réaction.....	17
9.	Programmation des instruments de PCR en temps réel.....	18
9.1	Paramètres.....	18
9.2	Marqueurs de fluorescence (fluorophores)	19
9.3	Profil de température et acquisition du fluorophore	19
9.4	Démarrage de la PCR en temps réel.....	19
10.	Analyse des données	20
10.1	Validation des tests de diagnostic.....	20
10.1.1	Validité des tests de diagnostic (qualitatif)	20
10.1.2	Invalidité des tests de diagnostic (qualitatif).....	20
10.2	Interprétation des résultats.....	21
10.2.1	Analyse qualitative	21

11. Evaluation des performances	21
11.1 Sensibilité analytique	21
11.2 Spécificité analytique	22
11.2.1 Réactivité croisée	23
11.2.2 Inclusivité	24
11.3 Précision	25
11.4 Évaluation du diagnostic	26
12. Restrictions	28
13. Contrôle qualité	29
14. Assistance technique	29
15. Bibliographie	29
16. Marques de commerce et clauses de non-responsabilité	30
17. Explications des symboles	31

1. Usage prévu

Le kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 est un test de diagnostic *in vitro*, basé sur la technologie de PCR en temps réel, pour la détection qualitative de l'ARN spécifique au virus de la fièvre jaune.

2. Composants du kit

Tableau 1: Composants du kit

Couleur du capuchon	Composant	Nombre de fioles	Volume [µL/fiole]
Bleu	Master A	8	60
Violet	Master B	8	180
Vert	Internal Control	1	1000
Rouge	Positive Control	1	250
Blanc	Water (PCR grade)*	1	500

* À utiliser comme contrôle négatif

Internal Control = Contrôle interne

Positive Control = Contrôle positif

Water (PCR grade) = Eau ultra-pure pour biologie moléculaire

3. Stockage

- Le kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 est livré sur de la neige carbonique. Les composants du kit doivent arriver congelés. Si un ou plusieurs composants ne sont pas congelés à leur réception ou si des tubes ont été endommagés durant le transport, contactez altona Diagnostics GmbH pour obtenir de l'aide.
- Tous les composants doivent être stockés entre -25 °C et -15 °C après réception.

- Les décongelations et congélations répétées des réactifs Master (plus de deux fois) doivent être évitées, car cela pourrait affecter les performances de l'essai. Les réactifs doivent être congelés en aliquotes, s'ils doivent être utilisés de façon intermittente.
- Le stockage entre +2 °C et +8 °C ne doit pas excéder une période de deux heures.
- Protégez le Master A et le Master B de la lumière.

4. Matériel requis non fourni

- Instrument adapté à la PCR en temps réel (voir chapitre 6.1 Instruments de PCR en temps réel)
- Système ou kit approprié à l'extraction des acides nucléiques (voir chapitre 8.1 Préparation du prélèvement)
- Centrifugeuse de paillasse avec rotor pour des tubes réactionnels de 2 mL
- Centrifugeuse avec rotor pour microplaques, si des plaques de 96 puits sont utilisées
- Vortex
- Plaques de 96 puits ou tubes réactionnels avec le matériel de fermeture correspondant (optique)
- Pipettes (réglables)
- Cônes avec filtres (jetables)
- Gants non poudrés (jetables)

REMARQUE



Merci de vous assurer que les instruments ont été installés, calibrés, vérifiés et entretenus selon les instructions et les recommandations du fabricant.

NOTE

Il est fortement recommandé d'utiliser le rotor de 72 puits avec les tubes réactionnels de 0,1 ml correspondants, si le Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) ou le Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN) est utilisé.

5. Informations générales

Le virus de la fièvre jaune (YFV) est le prototype du genre *Flavivirus*, qui comprend environ 70 virus différents transmis par les arthropodes [1]. Le génome du YFV est un génome à ARN simple brin à polarité positive de 11 kb codant pour une polyprotéine, qui est transformée de manière post-traductionnelle et co-traductionnelle en trois protéines structurales et sept protéines non structurales [2,3]. La fièvre jaune est endémique dans les régions tropicales d'Afrique et d'Amérique du Sud [1].

Trois formes de fièvre jaune sont identifiées : 1) la fièvre jaune urbaine, dans laquelle le virus est transmis d'une personne à l'autre par des moustiques *Aedes aegypti* péridomestiques ; 2) la fièvre jaune intermédiaire causée par le YFV, qui est transmise aux singes et aux humains par des moustiques semi-domestiques ; et 3) la fièvre jaune de la jungle (selvatique), dans laquelle le YFV est transmis aux primates non humains et parfois aux humains par des moustiques qui se reproduisent dans les arbres [1,2].

La majorité des patients infectés par le YFV ne sont pas ou peu malades. Chez les personnes qui développent des symptômes, l'incubation est généralement de 3 à 6 jours. Les premiers symptômes sont l'apparition brutale de fièvre, frissons, maux de tête violents, douleurs dorsales, douleurs corporelles générales, nausées et vomissements, fatigue et faiblesse. Après une brève rémission des symptômes qui dure de quelques heures à un jour, environ 15 % des personnes infectées évoluent vers une forme plus grave de la maladie. Cette forme grave se caractérise par une forte fièvre, une jaunisse, des hémorragies et, finalement, un état de choc et une défaillance de plusieurs organes [4,5].

Aucun traitement spécifique ne s'est avéré efficace chez les patients atteints de fièvre jaune, à l'exception de soins de soutien pour traiter la déshydratation, l'insuffisance respiratoire et la fièvre [1,4,6].

Tous les vaccins contre la fièvre jaune actuellement disponibles dans le commerce sont des vaccins vivants atténués à charge virale de la lignée 17D, qui suscitent une réponse immunitaire adaptative rapide, exceptionnellement forte et nettement durable [4,5].

Le diagnostic clinique de la fièvre jaune est difficile en raison des similitudes des symptômes avec un grand nombre de maladies, notamment la dengue, d'autres maladies hémorragiques virales, la leptospirose, l'hépatite virale et le paludisme ; la confirmation en laboratoire est donc essentielle [2].

- [1] Monath, Thomas P., and Pedro F.c. Vasconcelos. « Yellow fever » *Journal of Clinical Virology*, vol. 64, 2015, pp. 160–173., doi:10.1016/j.jcv.2014.08.030.
- [2] Domingo, C., et al. « Advanced Yellow Fever Virus Genome Detection in Point-of-Care Facilities and Reference Laboratories » *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 50, no. 12, Oct. 2012, pp. 4054–4060., doi:10.1128/jcm.01799-12.
- [3] Volk, D.e., et al. « Yellow Fever Envelope Protein Domain III NMR Structure (S288-K398) » Oct. 2008, doi:10.2210/pdb2jqm/pdb.
- [4] Monath, Thomas P, and Alan D.t Barrett. « Pathogenesis and Pathophysiology of Yellow Fever » *Advances in Virus Research*, 2003, pp. 343–395., doi:10.1016/s0065-3527(03)60009-6
- [5] Deubel, Vincent, et al. « Molecular detection and characterization of yellow fever virus in blood and liver specimens of a non-Vaccinated fatal human case » *Journal of Medical Virology*, vol. 53, no. 3, 1997, pp. 212–217., doi:10.1002/(sici)1096-9071(199711)53:3 212::aid-jmv5] 3.0.co;2-b.
- [6] Pan American Health Organization (PAHO)/ World Health Organization (WHO) « Laboratory Diagnosis of Yellow Fever Virus infection », février 2018

REMARQUE



En raison de l'évolution moléculaire relativement rapide des virus à ARN, il y a un risque inhérent, pour tous les systèmes basés sur la RT-PCR en temps réel, d'accumulation de mutations au cours du temps qui pourraient conduire à des résultats faussement négatifs.

6. Description du produit

Le kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 est un test de diagnostic *in vitro*, basé sur la technologie de PCR en temps réel, pour la détection qualitative de l'ARN spécifique au virus de la fièvre jaune.

Ce kit a été développé pour la détection de toutes les souches décrites du virus de la fièvre jaune, notamment la souche vaccinale 17D.

Le test comprend un système d'amplification hétérologue [Internal Control (contrôle interne)] afin d'identifier d'éventuelles inhibitions de la RT-PCR et de confirmer l'intégrité des réactifs du kit.

Le test repose sur la technologie de RT-PCR en temps réel, utilisant une transcriptase inverse (RT) qui permet de convertir l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) et une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) pour l'amplification de séquences cibles spécifiques et de sondes cibles spécifiques pour la détection de l'ADN amplifié. Les sondes sont marquées avec un marqueur fluorescent (reporter) et un désactivateur (quencher).

Les sondes spécifiques à l'ARN du YFV sont marquées avec le fluorophore FAM™. La sonde spécifique à l'Internal Control (contrôle interne) est marquée avec le fluorophore JOE™.

L'utilisation de sondes associées à des fluorophores différents permet la détection en parallèle de l'ARN spécifique du YFV et du contrôle interne dans les canaux correspondants de l'instrument PCR en temps réel.

Le test consiste en trois processus dans un seul tube d'essai :

- Transcriptase inverse de l'ARN cible et contrôle interne en ADNc
- Amplification par PCR de l'ADNc cible et contrôle interne
- Détection simultanée des amplicons PCR par des sondes marquées avec une coloration fluorescente

Le kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 est constitué de :

- Master A
- Master B
- Internal Control
- Positive Control
- Water (PCR grade)*

Internal Control (IC) = Contrôle interne

Positive Control = Contrôle positif

Water (PCR grade) = Eau ultra-pure pour biologie moléculaire

* À utiliser comme contrôle négatif

Master A et Master B contiennent tous les composants (tampon de PCR, transcriptase inverse, polymérase d'ADN, sel de magnésium, amorces et sondes) pour permettre la transcription inverse, l'amplification assistée de la PCR et la détection d'ARN spécifique au YFV, et le contrôle interne au sein d'une même configuration de réaction.

6.1 Instruments de PCR en temps réel

Le kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 a été développé et validé afin d'être utilisé avec les instruments PCR en temps réel suivants :

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare Diagnostics)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

7. Mises en garde et précautions

Lisez attentivement le mode d'emploi avant d'utiliser ce produit.

- Avant la première utilisation, inspectez le produit et ses composants afin de s'assurer :
 - qu'ils sont en bon état
 - qu'ils sont complets, en considérant le nombre, le type et le remplissage (voir chapitre 2 Composants du kit)
 - qu'ils sont correctement étiquetés
 - qu'ils sont bien congelés à réception
- L'utilisation de ce produit est réservée au personnel ayant reçu des instructions et une formation spécifiques en techniques de PCR en temps réel et en procédures de diagnostic *in vitro*.

- Les échantillons cliniques doivent toujours être traités comme étant infectieux et/ou biologiquement dangereux conformément aux procédures de sécurité de votre laboratoire.
- Portez des gants de protection jetables et sans poudre, une blouse de laboratoire et une protection oculaire lorsque vous manipulez des échantillons.
- Évitez la contamination microbienne et par nucléase (ADNase/ARNase) des échantillons et des composants du kit.
- Utilisez toujours des pointes de pipettes jetables sans ADNase / ARNase et dotées de barrières d'aérosols.
- Portez toujours des gants de protection jetables et sans poudre lorsque vous manipulez les composants du kit.
- Utilisez des zones de travail séparées et distinctes pour les activités (i) de préparation d'échantillon, (ii) de configuration des réactions et (iii) d'amplification / de détection. Le flux de travail dans le laboratoire doit se dérouler de manière unidirectionnelle. Portez toujours des gants jetables dans chacune des zones de travail et changez-en avant de pénétrer dans une zone différente.
- Réservez des fournitures et de l'équipement distincts pour chaque zone de travail et ne les déplacez pas d'une zone à une autre.
- Conservez le matériel positif et/ou potentiellement positif à l'écart de tous les autres composants du kit.
- N'ouvrez pas les tubes/plaques de réaction après amplification afin d'éviter toute contamination par des amplicons.
- Des contrôles supplémentaires peuvent être testés selon les directives ou exigences des réglementations locales, fédérales, d'État et / ou des organismes d'agrément.
- Ne placez pas les tubes de réaction en autoclave après la PCR, car cela ne dégraderait pas l'acide nucléique amplifié, et la zone du laboratoire pourrait être contaminée.
- N'utilisez pas un composant du kit si sa date d'expiration est dépassée.
- Jetez les déchets d'échantillon et d'essai conformément aux réglementations de sécurité locales.

8. Procédure

8.1 Préparation du prélèvement

L'ARN extrait est le matériau de départ pour le kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0.

La qualité de l'ARN extrait a un impact considérable sur les performances du système de test tout entier. Il est recommandé de vérifier que le système utilisé pour l'extraction des acides nucléiques est compatible avec la technologie de PCR en temps réel. Les kits et systèmes suivants sont adaptés à l'extraction des acides nucléiques :

- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

D'autres kits ou systèmes d'extraction des acides nucléiques peuvent être appropriés. L'aptitude de la procédure d'extraction des acides nucléiques à utiliser avec RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 doit être validée par l'utilisateur.

En cas d'utilisation d'une procédure de préparation de l'échantillon dans une colonne d'élution comprenant des tampons de lavage contenant de l'éthanol, il est fortement recommandé d'effectuer une étape de centrifugation supplémentaire pendant 1 minute à environ 17 000 x g (~ 13 000 tr/min) à l'aide d'un nouveau tube de collecte avant l'élution des acides nucléiques,

Évitez autant que possible les cycles de décongélation et de congélation.

ATTENTION



Si votre système de préparation des échantillons utilise des tampons de lavage à l'éthanol, assurez-vous d'éliminer toute trace d'éthanol avant de procéder à l'élution des acides nucléiques. L'éthanol est un fort inhibiteur de la PCR en temps réel.

ATTENTION



L'utilisation d'ARN porteur (carrier) est crucial pour l'efficacité de l'extraction et la stabilité des acides nucléiques extraits.

Pour toute information complémentaire ou assistance technique sur le prétraitement et la préparation des échantillons, merci de contacter notre support technique (voir chapitre 14. Assistance technique).

8.2 Préparation du Master Mix

Tous les réactifs doivent être complètement décongelés, homogénéisés (par pipetage ou léger vortexage) et brièvement centrifugés avant utilisation.

Le kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 contient un Internal Control (contrôle interne, IC) hétérologue pouvant être utilisé soit comme contrôle d'inhibition de la RT-PCR soit comme contrôle de la préparation de l'échantillon (extraction des acides nucléiques) et de l'inhibition de la RT-PCR.

- ▶ Si l'IC est utilisé comme un contrôle d'inhibition de la RT-PCR, mais non comme contrôle de préparation de l'échantillon, le Master Mix doit être préparé comme décrit par le schéma de pipetage ci-dessous :

Nombre de réactions (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Internal Control (contrôle interne)	1 µl	12 µl
Volume de Master Mix	21 µl	252 µl

- ▶ Si l'IC est utilisé comme contrôle de préparation de l'échantillon, et d'inhibition de la RT-PCR, l'IC doit être ajouté au moment de la procédure d'extraction des acides nucléiques.
- ▶ Quelque soit la méthode ou le système utilisé pour l'extraction des acides nucléiques, l'IC ne doit **jamais** être ajouté directement à l'échantillon de prélèvement. L'IC doit toujours être ajouté au mélange échantillon/Lysis Buffer (tampon de lyse). Le volume de l'IC à ajouter dépend toujours et uniquement du volume d'élution, dont il représente 10 %. Par exemple, si les acides nucléiques doivent être élués dans 60 µl de tampon d'élution ou d'eau, 6 µl de l'IC par échantillon doivent être ajoutés au mélange échantillon/Lysis Buffer (tampon de lyse).
- ▶ Si l'IC a été ajouté pendant la phase de préparation de l'échantillon, le Master Mix doit être préparé selon le schéma de pipetage suivant :

Nombre de réactions (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Volume de Master Mix	20 µl	240 µl

ATTENTION

Si le contrôle interne a été ajouté pendant la phase de préparation de l'échantillon, au moins le contrôle négatif doit inclure le contrôle interne.

ATTENTION

Quelle que soit la méthode ou le système utilisé pour l'extraction des acides nucléiques, ne jamais ajouter le contrôle interne directement à l'échantillon.

8.3 Préparation de la réaction

- ▶ Pipette 20 µl of the Master Mix into each required well of an appropriate optical 96-well reaction plate or an appropriate optical reaction tube.
- ▶ Ajouter 10 µL d'échantillon (éluat issu de l'extraction des acides nucléiques) ou 10 µL des contrôles (contrôles positifs ou négatifs).

Configuration des réactions	
Master Mix	20 µl
Échantillon ou contrôle	10 µl
Volume total	30 µl

- ▶ Assurez-vous que chaque Positive Control (contrôle positif) et au moins un Negative Control (contrôle négatif) [Eau (qualité PCR) incluse dans le kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0] sont utilisés par run.
- ▶ Homogénéiser avec soin les échantillons et les contrôles avec le Master Mix par pipetage.
- ▶ Couvrir la plaque 96 puits avec un film adhésif transparent approprié et les tubes réactionnels à l'aide de bouchons appropriés.
- ▶ Centrifugez le plateau de réaction à 96 puits dans une centrifugeuse équipée d'un rotor pour microplaques pendant 30 secondes à environ 1 000 x g (~ 3 000 tr/min).

Après la fin de la configuration PCR, le mélange PCR dans la plaque de réaction à 96 puits scellée/tube de réaction optique fermé est stable entre +20 °C et +25 °C pendant 30 minutes.

9. Programmation des instruments de PCR en temps réel

Pour obtenir des informations générales sur la préparation et la programmation des différents instruments de PCR en temps réel, veuillez consulter les manuels d'utilisation des instruments respectifs.

Pour des instructions sur la programmation relative à l'utilisation du kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 avec un instrument de PCR en temps réel spécifique, merci de contacter notre support technique (voir chapitre 14. Assistance technique).

9.1 Paramètres

- Programmez l'instrument avec les paramètres suivants :

Paramètres	
Volume de réaction	30 µl
Taux de rampe	Par défaut
Référence passive	Aucun

9.2 Marqueurs de fluorescence (fluorophores)

- Définir les marqueurs de fluorescence (fluorophores) :

Cible	Nom du détecteur	Rapporteur	Extincteur
ARN spécifique au YFV	YFV	FAM™	(Aucun)
Internal Control (contrôle interne, IC)	IC	JOE™	(Aucun)

9.3 Profil de température et acquisition du fluorophore

- Définissez le profil de température et l'acquisition de la coloration :

	Étape	Répétitions de cycles	Acquisition	Température [°C]	Durée [min:s]
Transcription inverse	Attente	1	-	55	20:00
Dénaturation	Attente	1	-	95	02:00
Amplification	Cyclage	45	-	95	00:15
			oui	55	00:45
			-	72	00:15

9.4 Démarrage de la PCR en temps réel

Placez la plaque de réaction à 96 puits/les tubes de réaction optiques dans l'instrument PCR en temps réel et lancez le PCR Run en temps réel conformément au manuel d'utilisation de l'instrument concerné.

10. Analyse des données

Pour des informations de base concernant l'analyse des données sur un instrument de PCR en temps réel spécifique, merci de se référer au manuel de l'instrument concerné.

Pour des informations détaillées concernant l'analyse des données générées avec le kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 sur différents instruments de PCR en temps réel, merci de contacter notre support technique (voir chapitre 14. Assistance technique).

10.1 Validation des tests de diagnostic

10.1.1 Validité des tests de diagnostic (qualitatif)

Un test de diagnostic **qualitatif** est **valide**, si les valeurs suivantes des contrôles sont obtenues :

ID du contrôle	Canal de détection	
	FAM™	JOE™
Positive Control (contrôle positif)	+	+/-*
Negative Control (contrôle négatif)	-	+

* La présence ou l'absence d'un signal dans le canal JOE™ n'est pas pertinente pour la validité de l'essai.

10.1.2 Invalidité des tests de diagnostic (qualitatif)

Un test de diagnostic **qualitatif** est **invalide**, (i) si l'essai n'est pas complet ou (ii) si l'ensemble des conditions de contrôle pour un test de diagnostic **valide** n'est pas obtenu.

En cas d'**invalidité** du test de diagnostic, répéter le test avec les acides nucléiques purifiés restants ou recommencer depuis l'échantillon de départ.

10.2 Interprétation des résultats

10.2.1 Analyse qualitative

Canal de détection		Interprétation des résultats
FAM™	JOE™	
+	+*	ARN spécifique au YFV détecté.
-	+	Aucun ARN spécifique au YFV détecté. L'échantillon ne contient pas de quantités détectables d'ARN spécifique au YFV.
-	-	Inhibition de la RT-PCR ou défaillance des réactifs. Répétez les tests à partir de l'échantillon de départ ou prélevez et testez un nouvel échantillon.

* La détection de l'Internal Control (contrôle interne) dans le canal de détection JOE™ n'est pas obligatoire pour les résultats positifs dans le canal de détection FAM™. Une charge élevée d'ARN spécifique au YFV dans l'échantillon peut entraîner une réduction ou une absence du signal de l'Internal Control (contrôle interne).

11. Evaluation des performances

Les performances du kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 ont été évaluées à l'aide d'une transcription *in vitro* spécifique au virus de la fièvre jaune.

11.1 Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 est définie comme la concentration (copies/μl d'éluat) des molécules d'ARN spécifiques au YFV pouvant être détectée avec un taux de positivité de 95 %. La sensibilité analytique a été déterminée par l'analyse d'une série de dilutions d'ARN spécifique au YFV.

Tableau 2: Résultats de RT-PCR utilisés pour calculer la sensibilité analytique concernant la détection de l'ARN spécifique au YFV

Conc. d'entrée [copies/μl]	Nombre de réplicats	Nombre de positifs	Taux de réussite [%]
31,600	24	24	100
10,000	24	24	100
3,160	24	24	100
1,000	24	24	100
0,316	24	21	87,5
0,100	24	9	37,5
0,032	24	4	16,7
0,010	24	2	8,3
0,003	24	0	0

La sensibilité analytique du kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 a été déterminée à l'aide d'une analyse probit :

- Pour la détection de l'ARN spécifique au YFV, la sensibilité analytique est de 0,69 copies/μl d'éluat [intervalle de confiance (IC) à 95 % : 0,41 - 1,56 copies/μl]

11.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 est garantie par la sélection minutieuse des oligonucléotides (amorces et sondes). Ceux-ci ont été contrôlés par analyse comparative des séquences par rapport à des séquences publiquement accessibles afin de garantir que tous les génotypes pertinents de YFV seront détectés.

11.2.1 Réactivité croisée

La spécificité analytique du kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 concernant la réactivité croisée avec d'autres pathogènes que le YFV a été évaluée en testant un panel d'ARN/ADN génomiques extraits de virus liés au YFV et d'autres pathogènes provoquant des symptômes similaires. Le Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 RealStar® n'a pas montré de réactivité croisée avec les pathogènes suivants :

- Virus du Chikungunya
- Virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo
- Virus de la dengue sérotype 1
- Virus de la dengue sérotype 4
- Virus Ebola
- Virus de l'hépatite C
- Virus de l'encéphalite japonaise
- Virus Lassa
- Virus Marburg
- Virus de l'encéphalite de Murray Valley
- *Plasmodium falciparum*
- Virus du Nil occidental
- Virus Zika

De plus, la spécificité analytique du kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 a été évaluée pour l'OMS par le CDC (Center of Disease Control and Prevention, Centre pour le contrôle et la prévention des maladies) américain, Division des maladies à transmission vectorielle (Fort Collins, Colorado, États-Unis). Le CDC américain est un centre collaborateur de l'OMS pour la référence et la recherche sur les virus transmis par les arthropodes. L'évaluation a été réalisée conformément au « WHO Protocol for the Laboratory Evaluation of Yellow Fever Nucleic Acid Assays » (Protocole de l'OMS pour l'évaluation en laboratoire des essais d'acide nucléique de la fièvre jaune). Le Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 RealStar® n'a pas montré de réactivité croisée avec les pathogènes suivants :

- Virus du Chikungunya
- Virus de la dengue sérotype 1 à 4
- Virus Ebola
- HIV
- Influenza A (H1N1)
- Virus de l'encéphalite japonaise
- Virus Lassa
- Virus Marburg
- Virus de la rougeole
- Virus Powassan
- Virus du Nil occidental
- Virus Zika

11.2.2 Inclusivité

L'inclusivité du kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 a été évaluée pour l'OMS par le CDC (Center of Disease Control and Prevention, Centre pour le contrôle et la prévention des maladies) américain, Division des maladies à transmission vectorielle (Fort Collins, Colorado, États-Unis). Le CDC américain est un centre collaborateur de l'OMS pour la référence et la recherche sur les virus transmis par les arthropodes. L'évaluation en laboratoire a été réalisée conformément au « WHO Protocol for the Laboratory Evaluation of Yellow Fever Nucleic Acid Assays » (Protocole de l'OMS pour l'évaluation en laboratoire des essais d'acide nucléique de la fièvre jaune). Toutes les souches de YFV testées (pour plus de détails, voir le Tableau 3) ont été détectées par le kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0.

Tableau 3: Souches testées par le CDC/l'OMS pour l'inclusivité

Souche de YFV	Emplacement	Année
Vaccin 17D-204	S.O.	S.O.
Asibi	Ghana	1927
14FA	Angola	1971
614819	Panama	1974
BA-55	Nigeria	1986
BC-7914	Kenya	1993
FMD-1240	Pérou	2007
CAREC M2-09	Trinité	2009
InHRR 10a-10	Vénézuela	2010

11.3 Précision

La précision du kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 a été déterminée selon sa variabilité intra-essai (variabilité au sein d'une même expérience), sa variabilité inter-essai (variabilité entre différentes expériences) et sa variabilité inter-lot (variabilité entre différents lots de production). La variabilité totale a été déterminée en combinant ces 3 analyses.

Les données de variabilité sont exprimées par l'écart-type et le coefficient de variation sur la base des valeurs de cycle seuil (C_t). Au moins six réplicats par échantillon ont été analysés pour la variabilité intra-essai, l'inter-essai et la variabilité inter-lot.

Tableau 4: Données de précision pour la détection de l'ARN spécifique au YFV (conc. approx. 50 x LoD)

YFV	Cycle seuil moyen (C_t)	Écart-type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	32,72	0,14	0,41
Variabilité inter-essai	32,39	0,22	0,68
Variabilité inter-lot	32,46	0,29	0,91
Variabilité totale	32,50	0,25	0,77

Tableau 5: Données de précision pour la détection de l'ARN spécifique au YFV (conc. approx. 3 x LoD)

YFV	Cycle seuil moyen (C_t)	Écart-type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	36,25	0,58	1,60
Variabilité inter-essai	36,19	0,33	0,91
Variabilité inter-lot	36,16	0,42	1,16
Variabilité totale	36,21	0,41	1,14

Tableau 6: Données de précision pour la détection de l'Internal Control (contrôle interne)

Internal Control (contrôle interne)	Cycle seuil moyen (C _t)	Écart-type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	29,44	0,07	0,23
Variabilité inter-essai	29,66	0,30	1,02
Variabilité inter-lot	29,40	0,07	0,23
Variabilité totale	29,58	0,27	0,91

11.4 Évaluation du diagnostic

Les acides nucléiques extraits d'échantillons de sérum provenant de 30 patients dont l'infection par le YFV a été confirmée ont été testés en parallèle avec le kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 et l'essai RT-PCR en temps réel du YFV en interne (selon Domingo et al., 2012) par l'Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz, Brésil. En outre, 15 échantillons individuels de sérum provenant de personnes non infectées par le YFV ont été testés.

Sur les 30 échantillons confirmés positifs au YFV, tous les 30 ont été testés positifs à l'ARN du YFV avec la référence (c'est-à-dire l'essai RT-PCR en temps réel du YFV en interne selon Domingo et al., 2012) et le kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0.

Sur les 15 échantillons négatifs au YFV, tous les 15 échantillons ont été testés négatifs à l'ARN du YFV avec la référence. À l'aide du kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0, 14 échantillons ont été testés négatifs à l'ARN du YFV et un échantillon a été testé positif.

Tableau 7: Résultats de l'évaluation de la sensibilité et la spécificité du diagnostic pour le YFV dans des échantillons de sérum

		Essai RT-PCR en temps réel du YFV (selon Domingo et al., 2012)	
		+	-
RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0	+	30	1
	-	0	14

En conclusion, la sensibilité et la spécificité du diagnostic obtenues à l'aide du kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 par rapport aux résultats obtenus avec l'essai RT-PCR en temps réel du YFV en interne (selon Domingo et al., 2012) pour la détection du YFV sont de 100 % et 93,3 %, respectivement.

12. Restrictions

- Un respect strict du mode d'emploi est nécessaire pour obtenir des résultats optimaux.
- L'utilisation de ce produit est réservée au personnel ayant reçu des instructions et une formation spécifiques en techniques de PCR en temps réel et en procédures de diagnostic *in vitro*.
- Le respect des bonnes pratiques de laboratoire est essentiel au bon fonctionnement de cet essai. Il convient de faire preuve de la plus grande vigilance pour préserver la pureté des composants du kit et des configurations de réaction. Tous les réactifs doivent faire l'objet d'une surveillance étroite pour détecter la présence d'impuretés et toute contamination éventuelle. Tout réactif suspect doit être jeté.
- Les procédures de prélèvement des échantillons, de transport, de stockage et de traitement appropriées doivent être respectées pour un fonctionnement optimal de ce test.
- Cet essai ne doit pas être utilisé directement sur l'échantillon. Des méthodes appropriées d'extraction des acides nucléiques doivent être appliquées avant d'utiliser cet essai.
- La présence d'inhibiteurs de la RT-PCR (p. ex. l'héparine) peut donner une des résultats faussement négatifs ou non valides.
- Les mutations potentielles dans les régions cibles du génome du YFV couvertes par les amorces et/ou les sondes utilisées dans le kit peuvent empêcher de détecter la présence des pathogènes.
- Comme pour tout test de diagnostic, les résultats obtenus avec le kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 doivent être interprétés en tenant compte des autres constatations cliniques et résultats de laboratoire.

13. Contrôle qualité

Conformément au système de gestion de la qualité de Altona Diagnostics GmbH certifié NF EN ISO 13485, chaque lot du kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 est testé sur la base de spécifications prédéterminées afin d'assurer une qualité constante du produit.

14. Assistance technique

Pour bénéficier d'un service après-vente, veuillez contacter notre service d'assistance technique aux coordonnées suivantes :

e-mail: **support@altona-diagnostics.com**

téléphone: **+49-(0)40-5480676-0**

15. Bibliographie

Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Third Edition. Mosby, 2010.

16. Marques de commerce et clauses de non-responsabilité

RealStar® (altona Diagnostics) ; ABI Prism® (Applied Biosystems) ; NucliSENS®, easyMAG® (bioMérieux) ; CFX96™ (Bio-Rad) ; JOE™ (Life Technologies) ; Maxwell® (Promega) ; Rotor-Gene®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN) ; LightCycler® (Roche) ; VERSANT® (Siemens Healthcare) ; Mx 3005P™ (Stratagene) ; FAM™ (Thermo Fisher Scientific).

Tous les noms, marques commerciales, etc. utilisés dans le présent document ne doivent pas être considérés comme n'étant pas protégés par la loi, même s'ils ne sont pas indiqués spécifiquement en tant que tels.
















Le Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 RealStar® est un kit diagnostic doté du marquage CE conforme à la Directive européenne 98/79/CE relative aux diagnostics *in vitro*.

Ce produit n'est pas homologué par Santé Canada et n'a pas été approuvé par la FDA.

Ce produit n'est pas disponible dans tous les pays.

© 2021 altona Diagnostics GmbH ; tous droits réservés.

17. Explications des symboles

Symbole	Explication
	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Numéro de lot
	Couleur du bouchon
	Numéro de catalogue
	Contenu
	Numéro
	Composant
	Numéro d'article pour le commerce international
	Consulter le mode d'emploi
	Contenu suffisant pour « n » tests/réactions (rxns)
	Limite de température
	Date de péremption
	Fabricant
	Attention
	Remarque
	Version

Remarques :

Remarques :

Remarques :

always a drop ahead.

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0
fax +49 40 548 0676 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com

