

## Mode d'emploi

# RealStar<sup>®</sup> SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

01/2023 FR



# RealStar<sup>®</sup>

## SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

Usage réservé à la recherche !

(RUO)



821005



384



01 2023



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

## Table des matières

<b>1.</b>	<b>Application.....</b>	<b>5</b>
<b>2.</b>	<b>Composants du kit.....</b>	<b>5</b>
<b>3.</b>	<b>Stockage .....</b>	<b>6</b>
<b>4.</b>	<b>Informations générales.....</b>	<b>6</b>
<b>5.</b>	<b>Description du produit.....</b>	<b>7</b>
5.1	Instruments PCR en temps réel .....	9
<b>6.</b>	<b>Procédure .....</b>	<b>9</b>
6.1	Préparation du prélèvement.....	9
6.2	Préparation du Master Mix.....	11
6.3	Préparation de la réaction .....	13
<b>7.</b>	<b>Programmation des instruments PCR en temps réel .....</b>	<b>14</b>
7.1	Paramètres.....	14
7.2	Marqueurs de fluorescence (fluorophores) .....	14
7.3	Profil de température et acquisition du fluorophore .....	15
<b>8.</b>	<b>Analyse des données .....</b>	<b>15</b>
8.1	Interprétation des résultats.....	16
8.1.1	Analyse qualitative .....	16
<b>9.</b>	<b>Assistance technique .....</b>	<b>17</b>
<b>10.</b>	<b>Marques de commerce et clauses de non-responsabilité .....</b>	<b>17</b>
<b>11.</b>	<b>Explications des symboles .....</b>	<b>18</b>

## 1. Application

Le kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 est un système de réactifs basé sur la technologie PCR en temps réel pour la détection qualitative de l'ARN spécifique au bêtacoronavirus de lignée B (B-βCoV) et au coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2).

**Usage réservé à la recherche (RUO) ! Ne pas utiliser dans les procédures diagnostiques.**

## 2. Composants du kit

Couleur du capuchon	Composant	Nombre de fioles	Volume [µl/fiole]
Bleu	Master A	8	240
Violet	Master B	8	720
Vert	Internal Control	4	1000
Rouge	Positive Control*	2	250
Blanc	Water (PCR grade)	2	500

\* Le Positive Control (contrôle positif) contient les deux cibles, lignée B-βCoV et SARS-CoV-2

Internal Control = contrôle interne

Positive Control = contrôle positif

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

### 3. Stockage

- Le kit RealStar® SARS-CoV-2 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. Informations générales

Le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2) est un virus à ARN monocaténaire à sens positif appartenant à la famille des Coronaviridae, genre bêtacoronavirus, sous-genre lignée B.

Le SARS-CoV-2 est apparu dans la région de Wuhan en Chine en décembre 2019 et s'est répandu dans le monde entier en deux mois. Le virus a été initialement dénommé 2019-nCoV (nouveau Coronavirus) et renommé SARS-CoV-2 par le « Comité international de taxonomie des virus », le 11 février 2020. Dans le même temps, l'OMS a attribué le nom de COVID-19 à la maladie causée par le SARS-CoV-2. Compte tenu de l'escalade et de la propagation rapides de la COVID-19 dans le monde entier, l'OMS a qualifié l'épidémie de pandémie le 12 mars 2020.

Le SARS-CoV-2 est très contagieux et se transmet par le biais d'aérosols et de gouttelettes. Il provoque des infections respiratoires aiguës dont les symptômes ressemblent à ceux de la grippe. Principalement, mais pas exclusivement, chez les personnes âgées et les personnes ayant une maladie préexistante, l'infection par le SARS-CoV-2 peut entraîner une maladie grave et potentiellement mortelle. Des cas d'infection asymptomatique, de maladie légère, de maladie grave et de décès ont été signalés.

### **5. Description du produit**

Le kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 est un système de réactifs basé sur la technologie PCR en temps réel pour la détection qualitative de l'ARN spécifique au bêtacoronavirus de lignée B (B-βCoV) et au coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2).

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).

La sonde spécifique à l'ARN du lignée B-βCoV (gène E cible) est marquée avec le fluorophore FAM™ et la sonde spécifique à l'ARN du SARS-CoV-2 (gène S cible) est marquée avec le fluorophore Cy5. La sonde spécifique à l'Internal Control [contrôle interne (IC)] est marquée avec le fluorophore JOE™.

L'utilisation de sondes reliées à des colorants distinctifs permet la détection en parallèle de l'ARN spécifique à la lignée B-βCoV et de l'ARN spécifique au SARS-CoV-2 ainsi que la détection de l'Internal Control (contrôle interne) des canaux de détecteur correspondants dans l'instrument PCR en temps réel.

Le test est constitué de trois processus dans un seul tube :

- Transcription inverse de l'ARN cible et de l'Internal Control (contrôle interne) en ADNc
- Amplification par PCR de l'ADNc cible et de l'Internal Control (contrôle interne)
- Détection simultanée d'amplicons PCR par des sondes marquées par fluorescence

Le kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 est constitué de :

- Master A
- Master B
- Internal Control
- Positive Control (B-βCoV, SARS-CoV-2)
- Water (PCR grade)

Internal Control = contrôle interne

Positive Control = contrôle positif

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

Le Master A et le Master B contiennent tous les composants (tampon PCR, transcriptase inverse, polymérase d'ADN, sel de magnésium, amorces et sondes) pour permettre la transcription inverse, l'amplification par PCR et la détection de l'ARN spécifique au lignée B-βCoV (gène E cible), de l'ARN spécifique au SARS-CoV-2 (gène S cible) et de l'Internal Control (contrôle interne) en une seule réaction.



## 5.1 Instruments PCR en temps réel

Le kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 peut être utilisé avec les instruments PCR en temps réel suivants :

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

### REMARQUE



*Assurez-vous que tous les instruments que vous utilisez ont été installés, calibrés, contrôlés, vérifiés et entretenus conformément aux instructions et recommandations du fabricant.*

## 6. Procédure

### 6.1 Préparation du prélèvement

L'ARN extrait est le matériau de départ pour le kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0.

La qualité de l'ARN extrait a un impact considérable sur l'efficacité du système de test dans son ensemble. 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 :

- AltoStar® Automation System AM16 (Altona Diagnostics)
- 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 systèmes et kits d'extraction des acides nucléiques pourraient également convenir.

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.

### 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 obtenir des informations supplémentaires et une assistance technique concernant le prétraitement et la préparation des échantillons, veuillez contacter notre assistance technique (voir le chapitre 9. Assistance technique).

## 6.2 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® SARS-CoV-2 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
<b>Volume de Master Mix</b>	<b>21 µl</b>	<b>252 µl</b>

- 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. L'IC doit toujours être ajouté au mélange échantillon de prélèvement/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 de prélèvement/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
<b>Volume de Master Mix</b>	<b>20 µl</b>	<b>240 µl</b>

**ATTENTION**

*Si l'IC (contrôle interne) a été ajouté au cours de la procédure de préparation de l'échantillon, le contrôle négatif doit notamment inclure l'IC.*

**ATTENTION**

*Quels que soient la méthode ou le système utilisés pour l'extraction de l'acide nucléique, l'IC ne doit jamais être ajouté directement à l'échantillon de prélèvement.*

### 6.3 Préparation de la réaction

- ▶ Pipeter 20 µl de Master Mix dans chacun des puits nécessaires de la plaque 96 puits ou d'un tube à essai permettant les réactions optiques.
- ▶ Ajouter 10 µl d'échantillon (éluat issu de l'extraction des acides nucléiques) ou 10 µl des contrôles (contrôle positif ou négatif).

Configuration des réactions	
Master Mix	20 µl
Échantillon ou contrôle	10 µl
<b>Volume total</b>	<b>30 µl</b>

- ▶ S'assurer qu'au moins un contrôle positif et un contrôle négatif sont utilisés par essai.
- ▶ 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 1000 x g (~ 3000 tr/min).

## 7. Programmation des instruments PCR en temps réel

Pour obtenir des informations de base concernant la configuration et la programmation des différents instruments PCR en temps réel, veuillez consulter manuel d'utilisation de l'instrument concerné.

Pour obtenir des instructions détaillées concernant l'utilisation du kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 sur des instruments PCR en temps réel, veuillez contacter notre assistance technique (voir le chapitre 9. Assistance technique).

### 7.1 Paramètres

- Définissez les paramètres suivants :

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

### 7.2 Marqueurs de fluorescence (fluorophores)

- Définir les marqueurs de fluorescence (fluorophores) :

Cible	Nom du détecteur	Rapporteur	Extincteur
ARN spécifique à la lignée B-βCoV	Gène E	FAM™	(Aucun)
ARN spécifique au SARS-CoV-2	Gène S	Cy5	(Aucun)
Internal Control (contrôle interne)	IC	JOE™	(Aucun)

### 7.3 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

## 8. Analyse des données

Pour obtenir des informations de base concernant l'analyse des données sur des instruments PCR en temps réel, veuillez consulter le manuel d'utilisation de l'instrument concerné.

Pour obtenir des instructions détaillées concernant l'analyse des données générées avec le kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 sur différents instruments PCR en temps réel, veuillez contacter notre assistance technique (voir le chapitre 9. Assistance technique).

## 8.1 Interprétation des résultats

### 8.1.1 Analyse qualitative

Canal de détection			Interprétation des résultats
FAM™ (gène E)	Cy5 (gène S)	JOE™ [Internal Control (contrôle interne)]	
+	+	+	ARN spécifique à la lignée B-βCoV et au SARS-CoV-2 détecté. Positif au SARS-CoV-2.
+	-	+	Seul l'ARN spécifique à la lignée B-βCoV a été détecté. Présumé positif au SARS-CoV-2. <sup>1,2</sup>
-	+	+	Seul l'ARN spécifique au SARS-CoV-2 a été détecté. Positif au SARS-CoV-2. <sup>1</sup>
-	-	+	Aucun ARN spécifique à la lignée B-βCoV ou au SARS-CoV-2 n'a été détecté. L'échantillon ne contient pas de quantités détectables d'ARN spécifique au SARS-CoV-2.
-	-	-	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™ ou le canal de détection Cy5. Une charge élevée d'ARN spécifique au lignée B-βCoV (gène E cible) et/ou au SARS-CoV-2 (gène S cible) dans l'échantillon peut entraîner une réduction ou une absence des signaux de l'Internal Control (contrôle interne).

<sup>1</sup> La détection dans un seul des deux canaux de détection respectifs pour le gène E et le gène S pourrait être due à une faible concentration d'ARN virale proche de la limite de détection ou à la mutation d'une des deux séquences cibles.

<sup>2</sup> L'échantillon peut être testé à nouveau en répétant l'extraction et la RT-PCR. Si le résultat répété reste présumé positif, des tests de confirmation supplémentaires peuvent être effectués.



## 9. 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**

## 10. Marques de commerce et clauses de non-responsabilité

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



Les noms déposés, marques de commerce, etc. utilisés dans ce document, même s'ils ne sont pas expressément désignés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés juridiquement.

**Usage réservé à la recherche (RUO) ! Ne pas utiliser dans les procédures diagnostiques.**

© 2023 altona Diagnostics GmbH ; tous droits réservés.

## 11. Explications des symboles

Symbole	Explication
	Usage réservé à la recherche
	Code du lot
	Couleur du capuchon
	Numéro de catalogue
	Contenu
	Numéro
	Composant
	Consultez le mode d'emploi
	Contenu suffisant pour « n » tests/réactions (rxns)
	Limites de température
	Date de péremption
	Fabricant
	<p>Attention : Attire l'attention sur des instructions ou procédures qui, si elles ne sont pas correctement respectées, peuvent entraîner des blessures corporelles ou nuire au bon fonctionnement du produit. Contactez l'assistance technique d'Altona Diagnostics pour obtenir de l'aide.</p>

Symbole	Explication
	Remarque : Les informations fournies à l'utilisateur sont utiles mais non essentielles à la tâche à accomplir.
	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](mailto:info@altona-diagnostics.com)

[www.altona-diagnostics.com](http://www.altona-diagnostics.com)

