

Mode d'emploi

RealStar[®] SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

06/2020 FR

RealStar[®]

SARS-CoV-2 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)
Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



821019



4800



06 2020



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

Sommaire

1.	Usage prévu.....	6
2.	Composants du kit.....	7
3.	Stockage	8
4.	Matériel requis non fourni	9
5.	Informations générales.....	10
6.	Description du produit.....	11
6.1	Instruments de PCR en temps réel	13
6.2	Types d'échantillons	13
7.	Mises en garde et précautions.....	14
8.	Procédure	16
8.1	Préparation du prélèvement.....	16
8.2	Préparation du Master Mix.....	19
8.3	Préparation de la réaction.....	21
9.	Programmation des instruments de PCR en temps réel.....	22
9.1	Paramètres.....	22
9.2	Marqueurs de fluorescence (fluorophores)	22
9.3	Profil de température et acquisition du fluorophore	23
10.	Analyse des données	23
10.1	Validation des tests de diagnostic.....	24
10.1.1	Test de diagnostic valide	24
10.1.2	Test de diagnostic non valide	24
10.2	Interprétation des résultats.....	24
10.2.1	Analyse qualitative	25

11.	Evaluation des performances	26
11.1	Sensibilité analytique	26
11.2	Spécificité analytique	30
11.2.1	Inclusivité	30
11.2.2	Réactivité croisée.....	32
11.3	Précision	33
11.4	Évaluation diagnostique	34
12.	Restrictions	36
13.	Contrôle qualité.....	37
14.	Assistance technique	37
15.	Bibliographie	37
16.	Marques de commerce et clauses de non-responsabilité	38
17.	Explications des symboles	39

1. Usage prévu

Le kit RealStar® SARS-CoV-2 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 bêta-coronavirus de lignée B (lignée B-βCoV) et au coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère 2 (SARS-CoV-2).

Il est destiné à être utilisé comme aide au diagnostic chez les personnes présentant des signes et symptômes de la maladie à coronavirus 2019 (COVID-2019) en relation avec des facteurs de risque cliniques et épidémiologiques.

Le kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 est destiné à être utilisé par du personnel qualifié dans des laboratoires équipés de manière appropriée, conformément aux directives sur la biosécurité en laboratoire.

2. Composants du kit

Couleur du bouchon	Composants	Nombre de fioles	Volume [µL/fiole]
Bleu	Master A	100	240
Violet	Master B	100	720
Rouge	Positive Control*	25	250
Vert	Internal Control	48	1000
Blanc	Water (PCR grade)	4	500

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

Positive Control = Contrôle positif

Internal Control (IC) = Contrôle interne

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

ATTENTION



Avant la première utilisation, vérifiez que le produit et ses composants sont complets (nombre, type et remplissage). N'utilisez pas un produit défectueux ou incomplet, ses performances pourraient être compromises.

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 réception, ou si l'un des tubes a été endommagé pendant le transport, merci de contacter altona Diagnostics GmbH pour assistance.
- Tous les composants doivent être conservés entre -25 °C et -15 °C dès leur livraison.
- Il convient d'éviter des cycles répétés de congélation-décongélation des réactifs Master A et Master B, le contrôle interne et le contrôle positif (plus de deux) car cela peut affecter les performances du test. Les réactifs doivent être congelés en aliquots en cas d'utilisation occasionnelle.
- La conservation entre +2 °C et +8 °C ne doit pas excéder une période de deux heures.
- Le Master A et le Master B doivent être conservés à l'abri de la lumière.

ATTENTION



De mauvaises conditions de stockage peuvent compromettre les performances du produit.

ATTENTION



Ne dépassez pas la durée de la séquence de décongélation et de la manipulation indiquée dans le mode d'emploi.

ATTENTION



N'utilisez pas les composants du produit au-delà de la date d'expiration imprimée sur l'étiquette du composant.

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 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.

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'augmentation et de la propagation rapides du COVID-19 dans le monde entier, l'OMS a qualifié l'épidémie en pandémie le 12 mars 2020.

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

6. Description du produit

Le kit RealStar® SARS-CoV-2 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 bêta-coronavirus de lignée B (lignée B-βCoV) et au coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère 2 (SARS-CoV-2).

Le test comprend un système d'amplification hétérologue (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 au B-βCoV (gène E cible) ARN est marquée avec le fluorophore FAM™, tandis que la sonde spécifique au SARS-CoV-2 (gène S cible) ARN est marquée avec le fluorophore Cy5. La sonde spécifique à l'Internal Control (contrôle interne) est marquée avec le fluorophore JOE™.

L'utilisation de sondes reliées à des colorations identifiables permet une détection parallèle de l'ARN spécifique au 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 correspondant dans 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 Internal Control (contrôle interne) en ADNc
- Amplification par PCR de l'ADNc cible et Internal Control (contrôle interne)
- Détection simultanée des amplicons PCR par des sondes marquées avec une coloration fluorescente

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

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

Positive Control = Contrôle positif

Internal Control (IC) = Contrôle interne

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

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 B-βCoV (gène E cible), d'ARN spécifique au SARS-CoV-2 (gène S cible), et l'Internal Control (contrôle interne) au sein d'une même configuration de réaction.

6.1 Instruments de PCR en temps réel

Le kit RealStar® SARS-CoV-2 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)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

6.2 Types d'échantillons

Le kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 a été validé pour une utilisation avec le type d'échantillon suivant :

- Prélèvements respiratoires humains collectés dans un Universal Transport Medium™ (UTM®)

Le kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 a été validé pour une utilisation avec le kit AltoStar® Purification 1.5 au sein du système d'automatisation AltoStar® AM16 pour l'extraction et la purification d'acide nucléique.

7. Mises en garde et précautions

- Avant la première utilisation, vérifiez que le produit et ses composants sont complets (nombre, type et remplissage). N'utilisez pas un produit défectueux ou incomplet, ses performances pourraient être compromises.
- N'utilisez pas d'autres types d'échantillons ! L'utilisation d'autres types d'échantillons peut compromettre les performances du produit.
- La présence d'inhibiteurs de la PCR peut donner des résultats faussement négatifs ou non valides.
- Si l'échantillon contient d'autres agents pathogènes que le SARS-CoV-2, une concurrence avec la cible peut se produire par amplification ou réactivité croisée.
- De mauvaises conditions de stockage peuvent compromettre les performances du produit.
- L'absence de centrifugation des composants du produit après décongélation pourrait entraîner la contamination des composants par des résidus de réactifs dans les couvercles et, par conséquent, compromettre les performances du produit.
- Ne dépassez pas la durée de la séquence de décongélation et de la manipulation indiquée dans le mode d'emploi.
- N'utilisez pas les composants du produit au-delà de la date d'expiration imprimée sur l'étiquette du composant.
- Une manipulation incorrecte des composants et des échantillons de produits peut entraîner une contamination causant des résultats d'examen IVD incorrects.
 - Évitez d'invertir les bouchons des flacons ou des bouteilles, car une contamination croisée peut se produire.
 - Pour minimiser le risque de contamination par transfert, stockez le matériel positif et/ou potentiellement positif séparément des composants du kit.
 - Utilisez des zones de travail séparées pour les activités de préparation de l'échantillon, de configuration des réactions et d'amplification/détection.
 - Portez toujours des gants jetables.

- N'ouvrez pas les tubes ou PCR Plates (plaques PCR) après amplification afin d'éviter toute contamination par des amplicons.
- Le stockage des éluats dans de mauvaises conditions peut entraîner une dégradation des séquences cibles du SARS-CoV-2.
- Ne dépassez pas la durée de stockage du mélange PCR. Cela pourrait compromettre les performances du produit.
- Traitez toujours les échantillons comme étant infectieux et (bio-)dangereux conformément aux procédures de laboratoire sûres. En cas de déversement de matériel d'échantillonnage, utilisez rapidement un désinfectant approprié. Manipulez les matériaux contaminés comme des matières bio-dangereuses.
- Éliminez les déchets dangereux et biologiques uniquement conformément aux réglementations locales et nationales afin d'éviter toute contamination de l'environnement.
- Comme pour tout test de diagnostic, les résultats doivent être interprétés en tenant compte des autres constatations cliniques et résultats de laboratoire.
- Les mutations potentielles dans les régions cibles du génome du SARS-CoV-2 couvertes par les amorces et/ou les sondes utilisées dans le kit peuvent empêcher de détecter la présence des pathogènes.
- Si votre système de préparation de l'échantillon utilise des tampons de lavage contenant de l'éthanol, veillez à éliminer toute trace d'éthanol avant l'éluion de l'acide nucléique. L'éthanol est un puissant inhibiteur de la PCR en temps réel.
- L'utilisation d'ARN porteur est cruciale pour l'efficacité de l'extraction et la stabilité de l'acide nucléique extrait.
- Cet essai ne doit pas être utilisé directement sur l'échantillon. Des méthodes appropriées d'extraction d'acide nucléique doivent être appliquées avant d'utiliser cet essai.

8. Procédure

ATTENTION



Une manipulation incorrecte des composants et des échantillons de produits peut entraîner une contamination causant des résultats d'examen IVD incorrects.

- Évitez d'intervertir les bouchons des flacons ou des bouteilles, car une contamination croisée peut se produire.

- Pour réduire au minimum le risque de contamination par transfert, stockez le matériel positif et/ou potentiellement positif séparément des composants du kit.

- Utilisez des zones de travail séparées pour les activités de préparation de l'échantillon, de configuration des réactions et d'amplification/détection.

- Portez toujours des gants jetables.

- N'ouvrez pas les tubes ou PCR Plates (plaques PCR) après amplification afin d'éviter toute contamination par des amplicons.

8.1 Préparation du prélèvement

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

Le kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 a été validé avec des écouillons respiratoires humains à l'aide de l'AltoStar® Automation System AM16 (système d'automatisation) en association avec le kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

D'autres systèmes et kits d'extraction d'acide nucléique (voir ci-dessous) pourraient également convenir. L'utilisateur doit s'assurer qu'une procédure donnée

d'extraction d'acide nucléique est compatible avec le kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0.

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

En cas d'utilisation d'une procédure de préparation d'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 10 minutes 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.

Une fois la procédure d'extraction terminée, les éluats dans l'Eluate Plate (plaque d'éluat) non scellée sont stables à température ambiante (max. 30 °C) pendant un total de 6 heures. Les éluats dans une Eluate Plate (plaque d'éluat) scellée peuvent être stockés entre 2 °C et 8 °C jusqu'à 24 heures avant le début d'une réaction PCR.

ATTENTION



N'utilisez pas d'autres types d'échantillons ! L'utilisation d'autres types d'échantillons peut compromettre les performances du produit.

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.

ATTENTION

Traitez toujours les échantillons comme étant infectieux et (bio-)dangereux conformément aux procédures de laboratoire sûres. En cas de déversement de matériel d'échantillonnage, utilisez rapidement un désinfectant approprié. Manipulez les matériaux contaminés comme des matières bio-dangereuses.

ATTENTION

La présence d'inhibiteurs de la PCR peut donner des résultats faussement négatifs ou non valides.

ATTENTION

Cet essai ne doit pas être utilisé directement sur l'échantillon. Des méthodes appropriées d'extraction d'acide nucléique doivent être appliquées avant d'utiliser cet essai.

ATTENTION

Éliminez les déchets dangereux et biologiques uniquement conformément aux réglementations locales et nationales afin d'éviter toute contamination de l'environnement.

ATTENTION

Le stockage des éluats dans de mauvaises conditions peut entraîner une dégradation des séquences cibles du B-βCoV et du SARS-CoV-2.

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® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 contient un contrôle interne 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 le contrôle interne 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 le contrôle interne est utilisé comme contrôle de préparation de l'échantillon, et d'inhibition de la RT-PCR, le contrôle interne doit être ajouté au moment de la procédure d'extraction des acides nucléiques.
- ▶ Quelle que soit la méthode/le système utilisé pour l'extraction de l'acide nucléique, l'IC **ne doit pas** être ajouté directement à l'échantillon. L'IC doit toujours être ajouté au mélange échantillon/Lysis Buffer (tampon de lyse). Le volume de l'IC qui doit être ajouté dépend toujours et uniquement du volume d'élution. Il représente 10 % du volume d'élution. Par exemple, si l'acide nucléique doit être élué dans 60 µL d'élution Buffer (tampon d'élution), 6 µL d'IC par échantillon doivent être ajoutés au mélange échantillon/Lysis Buffer (tampon de lyse).

- Si le contrôle interne 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

L'absence de centrifugation des composants du produit après décongélation pourrait entraîner la contamination des composants par des résidus de réactifs dans les couvercles et, par conséquent, compromettre les performances du produit.

REMARQUE

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

REMARQUE

Quelle que soit la méthode/le système utilisé pour l'extraction de l'acide nucléique, n'ajoutez jamais l'IC directement à l'échantillon.

8.3 Préparation de la réaction

- ▶ Verser 20 µL du Master Mix dans chaque puits d'un plateau de réaction optique à 96 puits approprié ou d'un tube de réaction optique approprié à l'aide d'une pipette.
- ▶ Ajouter 10 µL d'échantillon (éluat issu de l'extraction des acides nucléiques) ou 10 µL des contrôles (contrôles positifs ou négatifs).

Préparation de la réaction	
Master Mix	20 µL
Echantillon ou contrôle	10 µL
Volume total	30 µL

- ▶ 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.
- ▶ Centrifuger les plaques de 96 puits à l'aide d'un rotor à microplaques pendant 30 secondes à environ 1 000 x g (~ 3 000 tr/min).

Une fois la PCR Setup (Configuration PCR) terminée, le mélange PCR est stable à température ambiante (max. 30 °C) pendant 30 minutes.

ATTENTION



Ne dépassez pas la durée de stockage du mélange PCR. Cela pourrait compromettre les performances du produit.

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® SARS-CoV-2 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

- Définir les paramètres suivants :

Paramètres	
Volume de réaction	30 µL
Vitesse de la rampe	Par défaut
Référence passive	ROX™

9.2 Marqueurs de fluorescence (fluorophores)

- Définir les marqueurs de fluorescence (fluorophores) :

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

9.3 Profil de température et acquisition du fluorophore

- Définir le profil de température et l'acquisition du fluorophore :

	Etape	Nombre de cycles	Acquisition	Température [°C]	Durée [min:sec]
Transcription inverse	Stationnaire	1	-	55	20:00
Dénaturation	Stationnaire	1	-	95	02:00
Amplification	Cyclique	45	-	95	00:15
			Oui	55	00:45
			-	72	00:15

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® SARS-CoV-2 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 Test de diagnostic valide

Un test de diagnostic est considéré comme **valide** si les conditions de contrôle suivantes sont remplies :

ID du contrôle	Canal de détection		
	FAM™	Cy5	JOE™
Positive Control (contrôle positif) [B-βCoV et SARS-CoV-2]	+	+	+/-*
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 Test de diagnostic non valide

Un test de diagnostic est considéré comme **non valide** (i) si le test ne s'est pas terminé ou (ii) si une des conditions de contrôle d'un test de diagnostic **valide** n'est pas remplie.

En cas de test de diagnostic **non valide**, recommencez le test en utilisant le reste d'acide nucléique purifié, ou recommencez depuis le début avec les échantillons originaux.

10.2 Interprétation des résultats

ATTENTION



Comme pour tout test de diagnostic, les résultats doivent être interprétés en tenant compte des autres constatations cliniques et résultats de laboratoire.

10.2.1 Analyse qualitative

Canal de détection			Interprétation des résultats
FAM™ (gène E)	Cy5 (gène S)	JOE™ [Internal Control (contrôle interne)]	
+	+	+*	ARN spécifique au B-βCoV et au SARS-CoV-2 détecté. Positif au SARS-CoV-2.
+	-	+*	ARN spécifique au seul B-βCoV détecté. Présumé positif au SARS-CoV-2. ^{1,2}
-	+	+*	ARN spécifique au SARS-CoV-2 détecté. Positif au SARS-CoV-2. ¹
-	-	+	ARN spécifique ni au B-βCoV ni au SARS-CoV-2 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 le test à partir de l'échantillon de départ ou prélevez et analysez 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 B-βCoV (gène E cible) et / ou SARS-CoV-2 (gène S cible) dans l'échantillon peut résulter en une réduction ou une absence des signaux de l'Internal Control (contrôle interne).

¹ 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 viral proche de la limite de détection ou à la mutation d'une des deux séquences cibles.

² 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.

11. Evaluation des performances

L'évaluation des performances du kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 a été réalisée en utilisant des dilutions en série du surnageant de culture cellulaire SARS-CoV-2 inactivé par la chaleur (4,6E+05 unités formatrices de plaques (*plaque forming units*) (PFU)/mL avant inactivation ; Institut de virologie, Charité Berlin, Allemagne).

11.1 Sensibilité analytique

Estimation de la limite de détection (LdD) :

Dilutions en série du surnageant de culture cellulaire SARS-CoV-2 inactivé par la chaleur (4,6E+05 unités formatrices de plaques (PFU)/mL avant inactivation ; Institut de virologie, Charité Berlin, Allemagne).

Pour l'extraction, 700 µL d'UTM® contenant une matrice nasale simulée [prélèvement contenant une matrice nasale simulée (5 % p/v de mucine, 5 % v/v de sang total, 0,8 % v/v de NaCl (95 % de solution saline) et 0,00002 % p/v d'ADN génomique humain)] ont été enrichis avec du surnageant de culture cellulaire SARS-CoV-2 dilué et chargés sur l'AltoStar® Automation System AM16 (système d'automatisation) pour l'extraction d'acide nucléique avec le kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

Chaque dilution a été extraite en cinq exemplaires et testée avec le kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 sur le CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (système de détection PCR en temps réel). La concentration la plus faible à laquelle tous les réplicats ont été testés positifs a été traitée comme LdD provisoire. Les résultats sont présentés dans les Tableaux 1 et 2.

Tableau 1: Détermination de la LdD provisoire à l'aide de l'AltoStar® Automation System AM16 (système d'automatisation) en combinaison avec le kit AltoStar® Purification Kit 1.5 pour l'extraction d'acide nucléique - Cible : Gène E

Cible	Concentration [PFU/mL]	Taux d'appel	Réplikat 1 C _t (FAM™)	Réplikat 2 C _t (FAM™)	Réplikat 3 C _t (FAM™)	Réplikat 4 C _t (FAM™)	Réplikat 5 C _t (FAM™)
Gène E	1,00E-01	5/5	32,79	33,30	33,03	33,24	33,14
	3,16E-02	4/5	-	35,23	35,25	39,43	34,22
	1,00E-02	4/5	-	35,68	38,77	36,25	36,10
	3,16E-03	2/5	-	-	-	38,30	38,70
	100E-03	0/5	-	-	-	-	-
	3,16E-04	0/5	-	-	-	-	-

Tableau 2: Détermination de la LdD provisoire à l'aide de l'AltoStar® Automation System AM16 (système d'automatisation) en combinaison avec le kit AltoStar® Purification Kit 1.5 pour l'extraction d'acide nucléique - Cible : Gène S

Cible	Concentration [PFU/mL]	Taux d'appel	Réplikat 1 C _t (Cy5)	Réplikat 2 C _t (Cy5)	Réplikat 3 C _t (Cy5)	Réplikat 4 C _t (Cy5)	Réplikat 5 C _t (Cy5)
Gène S	1,00E-01	5/5	32,75	32,82	33,07	32,95	33,14
	3,16E-02	3/5	-	35,43	34,54	-	35,44
	1,00E-02	4/5	-	37,41	36,01	38,64	39,21
	3,16E-03	1/5	-	-	-	37,80	-
	100E-03	2/5	-	-	38,98	-	39,76
	3,16E-04	0/5	-	-	-	-	-

Le kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 associé à l'AltoStar® Automation System AM16 (système d'automatisation) / AltoStar® Purification Kit 1.5 et CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (système de détection PCR en temps réel) a détecté 5/5 réplicats avec une concentration de 1,00E-01 PFU/mL pour les deux cibles, le gène S et le gène E. Par conséquent, cette concentration a été considérée comme étant la LdD provisoire.

Confirmation de la limite de détection (LdD) :

Sur la base de la LdD provisoire, le surnageant de culture cellulaire SARS-CoV-2 inactivé par la chaleur a été enrichi dans 20 échantillons UTM® contenant une matrice nasale simulée à une concentration finale de 1,00E-01 PFU/mL. Les acides nucléiques ont été extraits avec le kit AltoStar® Purification Kit 1.5 sur l'AltoStar® Automation System AM16 (système d'automatisation) comme décrit ci-dessus. Les éluats obtenus ont été testés avec le kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 sur le CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (système de détection PCR en temps réel). Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3: Confirmation de la LdD sur le CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (système de détection PCR en temps réel)

Concentration de SARS-CoV-2 = 1,00E-01 PFU/mL				
Prélèvement	Pos./Nég.	C _t (FAM™)	C _t (Cy5)	C _t (JOE™)
1	Pos.	33,02	33,04	29,57
2	Pos.	33,28	33,29	29,34
3	Nég.	-	-	29,25
4	Pos.	33,34	33,76	29,45
5	Pos.	32,82	33,88	29,42
6	Pos.	32,79	32,85	29,61
7	Pos.	32,43	33,53	29,53
8	Pos.	33,14	33,26	29,47
9	Pos.	33,01	32,68	29,45
10	Pos.	33,2	33,45	29,31
11	Pos.	33,21	33,51	29,41
12	Pos.	32,99	34,11	29,56
13	Pos.	32,69	33,13	29,41
14	Pos.	33,67	34,33	29,52
15	Pos.	32,55	32,76	29,48
16	Pos.	33,26	33,32	29,33
17	Pos.	33,2	32,53	29,36
18	Pos.	32,78	33,00	29,51
19	Pos.	33,13	33,31	29,47
20	Pos.	33,28	33,43	29,46
Statistique	C _t médian	33,04	33,32	29,45
	SD	0,30	0,47	0,09
	% du CV	0,92	1,42	0,32
	Résultat	19/20		

Le kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 associé à l'AltoStar® Automation System AM16 (système d'automatisation) / AltoStar® Purification Kit 1.5 et CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (système de détection PCR en temps réel) a détecté 19/20 réplicats avec une concentration de 1,00E-01 PFU/mL.

Par conséquent, la LoD confirmée est de 1,00E-01 PFU/mL.

11.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du kit RealStar® SARS-CoV-2 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 B-βCoV (gène E cible) et SARS-CoV-2 (gène S cible) seront détectés.

11.2.1 Inclusivité

L'inclusivité du kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 a été évaluée pour différents isolats de SARS-CoV-2 par des tests humides. Les résultats sont présentés dans le Tableau 4.

Tableau 4: Inclusivité (tests humides) RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

Souche/Isolat de SARS-CoV-2	Source/Type d'échantillon	Concentration
<i>BetaCoV/Munich/ChVir984/2020</i> [*]	Institut de virologie, Charité Berlin, Allemagne/ Surnageant de culture cellulaire inactivé par la chaleur	4,6E+05 PFU/mL
2019-nCoV/Italy-INMI1	European Virus Archive Global/ ARN	1,00E+04 copies/μL

^{*} La souche BetaCoV/Munich/ChVir984/2020 a été utilisée pour déterminer la LdD et évaluer les performances cliniques du kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

Tableau 5: Inclusivité (analyse in silico pour 1 906 séquences du génome entier du SARS-CoV-2 dont 1 809 ont été publiées via GISAID e.V. (www.gisaid.org) et 107 ont été publiées via le National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) à partir du 27 mars 2020 pour le gène E et le gène S cibles) : kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

1 916 séquences du génome entier		Homologie	Commentaire
Gène E	Amorce sens	1 915 séquences : 100 %	1 séquence 96 % (1 incohérence)
	Amorce antisens	1 915 séquences : 100 %	1 séquence 95 % (1 incohérence)
	Sonde	1 914 séquences : 100 %	2 séquences : 95 % (1 incohérence)
Gène S	Amorce sens	1 912 séquences : 100 %	4 séquences : 95 % (1 incohérence)
	Amorce antisens	1 903 séquences : 100 %	13 séquences : 95 % (1 incohérence)
	Sonde	1 881 séquences : 100 %	34 séquences : 95 % (1 incohérence) ; 1 séquence : 91 % (2 incohérences)

Dans une seule séquence oligonucléotidique, les événements de mutation conduisant à ≤ 2 incohérences n'auront pas d'impact négatif significatif sur l'amplification de la séquence cible respective. Aucune des séquences analysées ne présentait d'incohérence dans plus d'un oligonucléotide et aucune des séquences incohérente ne présentait d'incohérence avec les deux systèmes de détection spécifiques (gène E et gène S), de sorte que la réactivité des oligonucléotides spécifiques inclus dans le kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 ne devrait pas être affectée.

11.2.2 Réactivité croisée

La spécificité analytique du RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 avec d'autres agents pathogènes que le SARS-CoV-2 a été évaluée en testant les virus liés au SARS-CoV-2, les agents pathogènes provoquant des symptômes similaires à ceux d'une infection par le SARS-CoV-2 et les agents pathogènes susceptibles d'être présents chez les patients souffrant d'une infection par le SARS-CoV-2.

Le kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 ne présente pas de réactivité croisée avec les pathogènes suivants :

- Coronavirus humain de type 229E
- Coronavirus humain de type OC43
- Coronavirus humain de type NL63
- SARS-coronavirus3
- MERS-coronavirus
- Adénovirus
- Métapneumovirus humain (hMPV)
- Virus parainfluenza 1
- Virus parainfluenza 2
- Virus parainfluenza 3
- Virus parainfluenza 4
- Virus de la grippe A
- Virus de la grippe B
- Entérovirus
- Virus respiratoire syncytial A
- Virus respiratoire syncytial B
- Rhinovirus
- *Chlamydia pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Legionella pneumophila*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Bordetella pertussis*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Pneumocystis jirovecii* (PJP)
- *Candida albicans*
- *Pseudomonas aeruginosa*

ATTENTION



Si l'échantillon contient d'autres agents pathogènes que le SARS-CoV-2, une compétition avec la cible peut se produire par amplification ou réactivité croisée.

11.3 Précision

La précision du kit RealStar® SARS-CoV-2 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 en fonction du cycle seuil (C_t) - valeurs. Au moins 4 réplicats par échantillon ont été analysés pour la variabilité intra-essai, l'inter-essai et la variabilité inter-lots.

Tableau 6: Données de précision (% du CV [valeurs C_t]) pour les échantillons UTM® fortement positifs au SARS-CoV-2

	Échantillon positif à teneur élevée en SARS-CoV-2 [C_t dans le canal FAM™, gène cible E]	Échantillon positif à teneur élevée en SARS-CoV-2 [C_t dans le canal Cy5, gène cible S]
Variabilité intra-essai	0,13 - 0,75	0,39 - 1,35
Variabilité inter-essai	0,40 - 2,12	0,52 - 0,62
Variabilité inter-lot	0,22	1,53
Variabilité totale	2,74	2,02

Tous les échantillons testés avec 3x LdD (échantillons positifs à faible teneur) ont été détectés comme positifs (gène E et gène S).

Tableau 7: Données de précision (% du CV [valeurs C_i]) pour la détection de l'Internal Control (contrôle interne) dans des échantillons UTM® négatifs au SARS-CoV-2

	Internal Control (contrôle interne)
Variabilité intra-essai	0,17 - 0,37
Variabilité inter-essai	0,05 - 0,95
Variabilité inter-lot	0,42
Variabilité totale	1,19

11.4 Évaluation diagnostique

Pour prédire la performance clinique à l'intervalle de confiance (IC) de 95 %, le surnageant de culture cellulaire SARS-CoV-2 à différentes concentrations a été préparé, mis en aveugle et enrichi dans un total de 34 écouvillons nasopharyngés individuels remis en suspension dans un Universal Transport Medium™ (UTM®).

Dix échantillons ont chacun été enrichis en ARN à une concentration finale de 1x LdD (1,00E-01 PFU/mL), quatorze échantillons ont chacun été enrichis en ARN à une concentration finale de 2x LdD (2,00E-01 PFU/mL), et dix échantillons ont chacun été enrichis en ARN à une concentration finale de 20 x LdD (2,00E-00 PFU/mL). 35 autres écouvillons nasopharyngés présumés négatifs au SARS-CoV-2 remis en suspension dans un Universal Transport Medium™ (UTM®) n'ont pas été enrichis. Tous les échantillons ont été mis en aveugle et remis à un opérateur impartial. Les acides nucléiques ont été extraits à l'aide de l'AltoStar® Automation System AM16 (système d'automatisation) associé au kit AltoStar® Purification Kit 1.5 (altona Diagnostics).

Les éluats ont été testés avec le kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 sur le CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (système de détection PCR en temps réel) (Bio-Rad). La clé d'enrichissement mise en aveugle a été dévoilée après les résultats. Les résultats sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8: Résultats des tests des échantillons cliniques

Concentration de l'échantillon [PFU/mL]	Taux d'appel du gène cible S	Taux d'appel du gène cible E
1x LdD (1,00E-01)	9/10	10/10
2x LdD (2,00E-01)	14/14	14/14
20x LdD (2,00E00)	10/10	10/10
négatif	0/35	0/35

95 % (23/24) des échantillons présentant une concentration de SARS-CoV-2 égale à 1x ou 2x LdD ont été testés positifs pour le gène cible S et déclarés « Positifs pour l'ARN du SARS-CoV-2 ». Un échantillon n'était positif que pour le gène cible E et a été déclaré comme « Présumé positif pour l'ARN du SARS-CoV-2 ». Tous (100 %) ces échantillons ont été testés positifs pour le gène cible E. Parmi les échantillons ayant une concentration de 20x LdD, tous (100 %) ont été testés positifs pour le gène S ainsi que pour le gène cible E. Tous les échantillons non enrichis (100 %) ont été testés négatifs pour les deux cibles.

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.
- Le test du gène E (canal FAM™) permet de détecter l'ARN spécifique au bêtacoronavirus de la lignée B, y compris le coronavirus du SARS et plusieurs coronavirus de chauve-souris. Des signaux isolés avec le test du gène E pourraient indiquer la présence de coronavirus du SARS ou de coronavirus de chauve-souris.

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® SARS-CoV-2 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. 10e édition. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases. 3e édition. Mosby, 2010.

16. Marques de commerce et clauses de non-responsabilité

AltoStar®, RealStar® (altona Diagnostics) ; ABI Prism® (Applied Biosystems) ; CFX96™ (Bio-Rad) ; FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies) ; LightCycler® (Roche) ; Maxwell® (Promega) ; Mx 3005P™ (Stratagene) ; NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux) ; Rotor-Gene®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN) ; VERSANT® (Siemens Healthcare) ; Universal Transport Medium™, UTM® (Copan).

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 SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 RealStar® est un kit diagnostique 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.

Le kit SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 RealStar® altona Diagnostics a reçu l'autorisation provisoire de l'Autorité des sciences de la santé de Singapour.

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

© 2020 altona Diagnostics GmbH ; tous droits réservés.

17. Explications des symboles

Symbole	Explication
	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Code du lot
	Couleur du capuchon
	Numéro de catalogue
	Contenu
	Numéro
	Composant
	Code article international
	Consultez le mode d'emploi
	Contenu suffisant pour « n » tests/réactions (rxns)
	Limites de température
	Date de péremption
	Fabricant
	Attention
	Note
	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

