

Instructions d'utilisation

virellaSARS-CoV-2 seqc

Kit RT-PCR en temps réel

Pour la détection simultanée in vitro d'ARN de nouveaux coronavirus (SARS-CoV-2) et d'autres béta coronavirus, à partir d'échantillons biologiques.

REF

G01128-32

G01128-96



32

96



gerbion GmbH & Co. KG
Remsstr. 1
70806 Kornwestheim
Germany
Tél. : +49 7154 806 20 0
Fax : +49 7154 806 20 29
e-mail : info@gerbion.com
www.gerbion.com

IVD



Distribué en France par : AAZ-LMB

43 rue de Bellevue - 92100 Boulogne-Billancourt - FRANCE

Tél : +33(0)1 46 00 40 40 - fax : +33(0)1 46 00 40 41

Contact : contact@aazlab.fr

Table des matières

.....	Erreur ! Signet non défini.
1. Indication.....	3
2. Information sur l'agent pathogène	3
3. Principe du test.....	3
4. Contenu du kit	4
5. Matériel et réactifs à fournir par l'utilisateur	4
6. Transport, stockage et stabilité.....	4
7. Avertissements et précautions.....	4
8. Matériel	5
9. Préparation de l'échantillon	5
10. ARN de control	6
11. RT-PCR en temps réel	6
a. Points importants avant de commencer :	6
b. Procédure :	6
c. Réglages des instruments	7
12. Analyse des résultats.....	9
13. Validation du test	11
14. Limites de la méthode	11
15. Recherche de cause d'erreurs	12
16. Performances	13
a. Sensibilité analytique	13
b. Spécificité analytique	13
c. Echantillons cliniques	14
d. Linéarité	14
e. Précision	15
f. Sensibilité diagnostique	16
17. Symboles et abréviations	17
18. Bibliographie.....	17

1. Indication

Le kit de RT-PCR en temps réel « virellaSARS-CoV-2 seqc » est un test de dépistage pour la détection simultanée de l'ARN du nouveau coronavirus (SARS-CoV-2) et du sous-genre Sarbecovirus (Betacoronavirus lié au SARS: SARS-CoV-1 et SARS-CoV-2) extrait d'échantillons biologiques.

2. Information sur l'agent pathogène

Les coronavirus (CoV) constituent une grande famille de virus qui provoquent des maladies allant du simple rhume à des maladies plus graves telles que le syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV) et le syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV). Le nouveau Coronavirus (SARS-CoV-2) est une nouvelle souche qui a été précédemment identifiée chez l'homme et qui provoque la maladie pulmonaire COVID-19. Les coronavirus sont des zoonoses, c'est-à-dire qu'ils se transmettent entre les animaux et l'homme. Des enquêtes détaillées ont montré que le SARS-CoV était transmis des chats civettes aux humains et le MERS-CoV des chameaux dromadaires aux humains. Plusieurs coronavirus connus circulent chez les animaux qui n'ont pas encore infecté l'homme.

Les signes courants d'infection sont les symptômes respiratoires, la fièvre, la toux, l'essoufflement et les difficultés respiratoires. Dans les cas plus graves, l'infection peut provoquer une pneumonie, un syndrome respiratoire aigu sévère, une insuffisance rénale et même la mort. Les recommandations standards pour prévenir la propagation de l'infection comprennent le lavage régulier des mains, le fait de se couvrir la bouche et le nez lorsqu'on tousse ou éternue, la cuisson complète de la viande et des œufs. Évitez les contacts étroits avec toute personne présentant des symptômes de maladie respiratoire tels que la toux et les éternuements.

3. Principe du test

Le kit virellaSARS-CoV-2 seqc RT-PCR en temps réel contient des amorces spécifiques et des sondes à double marquage pour l'amplification de l'ARN de SARS-CoV-2 (gène RdRP) et de l'ARN des sous-genres Sarbecovirus (SARS-CoV-1 et SARS-CoV-2, gène E) extrait d'échantillons biologiques. Le gène E et le gène RdRP sont tous deux des séquences cibles du génome viral recommandées par l'OMS.

La présence d'acides nucléiques est détectée par une augmentation de la fluorescence due à l'hydrolyse des sondes lors de l'amplification. Le signal de fluorescence pour l'amplification des sondes spécifiques du gène RdRP est mesuré dans le canal FAM. Le signal de fluorescence pour l'amplification des sondes spécifiques du gène E est mesuré dans le canal Cy5.

En outre, le kit de RT-PCR en temps réel virellaSARS-CoV-2 seqc contient un ARN de contrôle (contrôle de processus interne, IPC), qui est ajouté pendant l'extraction de l'ARN et détecté dans la même réaction par une sonde marquée HEX.

L'IPC permet de s'assurer que l'ARN a pu être isolé de l'échantillon biologique et que l'amplification par RT-PCR n'a pas été inhibée.

De plus, le kit de RT-PCR en temps réel virellaSARS-CoV-2 seqc contient un contrôle de système interne (ISC). L'ISC se compose d'amorces et de sondes pour la détection dans l'échantillon biologique d'un gène conservé (Bêta-actine, multi-espèces).

L'ISC permet d'éviter les résultats faussement négatifs dus à un prélèvement d'échantillon insuffisant ou au transport. L'amplification de la séquence cible de la bêta-actine est mesurée dans le canal ROX.

4. Contenu du kit

Les réactifs fournis sont suffisants pour 32 ou 96 réactions respectivement.

Tableau 1 Composants du kit real time RT-PCR virellaSARS-CoV-2 seqc.

Etiquette	Couleur	Contenu	
		32	96
Mix réactionnel	Jaune	1 x 442 µl	1 x 1325 µl
Enzyme	Bleu	1 x 6.4 µL	1 x 19,2 µl
Contrôle positif	Rouge	1 x 65 µl	1 x 150 µl
Contrôle négatif	Vert	1 x 65 µl	1 x 150 µl
ARN contrôle	Incolore	1 x 160 µl	1 x 480 µl

5. Matériel et réactifs à fournir par l'utilisateur

- Kit d'isolement de l'ARN (par exemple, ARN/ADN pur NukEx, Gerbion Cat. G05004 ou NukEx Mag ARN/ADN, Gerbion Cat. G05012).
- Eau Qualité Biologie Moléculaire
- Microtubes stériles
- Pipettes (volume réglable)
- Embouts de pipette stériles avec filtre
- Centrifugeuse de table
- Vortex
- Appareil de PCR temps en réel
- Tubes de réaction PCR optique avec couvercle ou plaque de réaction PCR optique avec feuille optique
- Facultatif : Système d'automatisation de l'extraction

6. Transport, stockage et stabilité

Le kit de RT-PCR en temps réel virellaSARS-CoV-2 seqc est expédié en carboglace ou packs réfrigérants. Tous les composants doivent être stockés immédiatement après réception dans l'obscurité et à une température maximale de -18°C. Ne pas utiliser de réactifs après la date de péremption imprimée sur la boîte. Jusqu'à 20 cycles de congélation et de décongélation sont possibles. Pour plus de commodité, les réactifs ouverts peuvent être conservés entre +2 et +8°C pendant 6 mois au maximum. Protéger les composants du kit de la lumière directe du soleil pendant toute la durée du test.

7. Avertissements et précautions

Lire attentivement le mode d'emploi avant d'utiliser le produit. Avant la première utilisation, vérifier, pour le produit et ses composants, les points suivants :

- L'utilisation de ce produit est limitée au personnel qualifié et formé aux techniques et procédures de RT-PCR en temps réel.
- Les échantillons doivent toujours être traités comme infectieux et/ou présentant un danger biologique conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.
- Eviter la contamination microbienne et enzymatique (DNase/RNase) des échantillons préparés et des composants du kit.
- Utiliser toujours des embouts de pipette jetables sans DNase/RNase avec des barrières anti-aérosols.

- Porter toujours des gants de protection jetables sans poudre pour manipuler les composants du kit.
- Utiliser des zones de travail séparées et isolées pour :
 - o La préparation des échantillons
 - o La mise en place de la réaction
 - o Les activités d'amplification/détection.
- Le flux de travail dans le laboratoire doit se dérouler de manière unidirectionnelle. Porter toujours des gants jetables dans chaque zone et les changer avant d'entrer dans une autre zone.
- Consacrer les fournitures et les équipements aux différentes zones de travail et ne pas les déplacer d'une zone à l'autre.
- Stocker le matériel positif et/ou potentiellement positif séparément de tous les autres éléments de la trousse.
- Ne pas ouvrir les tubes/plaques de réaction après l'amplification pour éviter la contamination par les amplicons.
- Des contrôles supplémentaires peuvent être testés conformément aux directives ou aux exigences des réglementations locales, régionales et/ou fédérales ou des organismes d'accréditation.
- Ne pas autoclaver les tubes de réaction après la PCR, car cela ne dégradera pas l'acide nucléique amplifié et risquera de contaminer la zone du laboratoire.
- Jetez les déchets d'échantillons et d'analyses conformément aux réglementations locales en matière de sécurité.

8. Matériel

Le matériel de départ du kit de RT-PCR en temps réel virellaSARS-CoV-2 seqc est de l'ARN isolé à partir d'échantillons biologiques (par exemple : écouvillons, crachats, selles).

9. Préparation de l'échantillon

Il est recommandé d'utiliser des kits commerciaux pour l'isolement de l'ARN, tels que ceux qui suivent :

- NukEx ARN/ADN pur, Gerbion, Réf. G05004
- NukEx Mag ARN/ADN, Gerbion, Réf. G05012

Il est recommandé de suivre les instructions d'utilisation du kit d'extraction correspondant.

Important :

En plus des échantillons, toujours effectuer un « contrôle de l'eau » lors de l'extraction. Ce contrôle de l'eau doit être traité de la même manière qu'un échantillon.

La comparaison de l'amplification de l'ARN de contrôle dans les échantillons avec l'amplification du contrôle interne dans le contrôle de l'eau donnera des indications sur les inhibitions possibles de la RT-PCR en temps réel. De plus, les contaminations possibles pendant l'extraction de l'ARN seront détectables.

Dans le chapitre suivant « ARN de control ». Si la RT-PCR en temps réel n'est pas effectuée immédiatement, l'ARN extrait doit être stocké selon les instructions données par le fabricant.

10. ARN de control

Un ARN de control est fourni et peut être utilisé comme control d'extraction ou seulement comme control d'inhibition. Cela permet à l'utilisateur de contrôler la procédure d'isolement de l'ARN et de vérifier une éventuelle inhibition de la RT-PCR en temps réel.

a) ARN de contrôle utilisé comme contrôle d'extraction :

Ajouter 5 µl d'ARN de contrôle par extraction (5 µl x (N+1)). Bien mélanger. Effectuer l'isolement de l'ARN selon les instructions du fabricant, suivre le protocole A.

L'ARN de contrôle doit être ajouté au tampon de lyse du kit d'extraction.

b) ARN de contrôle utilisé comme contrôle interne de la RT-PCR en temps réel :

Si seule l'inhibition doit être vérifiée, veuillez suivre le protocole B.

11. RT-PCR en temps réel

a. Points importants avant de commencer :

- Prêter attention au chapitre 7 « Avertissements et précautions ».
- Avant de déployer la technique, se familiariser avec l'appareil de RT-PCR en temps réel et lire le manuel d'utilisation fourni avec.
- S'assurer de la bonne programmation des cycles dans l'appareil de RT-PCR en temps réel (cf. section 11.c).
- Chaque RT-PCR doit comporter un contrôle positif et un contrôle négatif.
- Avant chaque utilisation, tous les réactifs (sauf l'enzyme) doivent être complètement décongelés et revenus à température ambiante, bien mélangés et centrifugés très brièvement.
- En raison de la viscosité élevée de l'enzyme (couvercle bleu), un préchauffage à température ambiante pendant 15 min est recommandé.

b. Procédure :

Si l'ARN de contrôle est utilisé pour contrôler à la fois la RT-PCR en temps réel et la procédure d'isolement de l'ARN, le protocole A doit être suivi.

Si l'ARN de contrôle est uniquement utilisé pour détecter une éventuelle inhibition de la RT-PCR en temps réel, le protocole B doit être suivi.

Protocole A

L'ARN de contrôle (IPC) a été ajouté lors de l'extraction de l'ARN (Chapitre 10 « Contrôle ARN »). Dans ce cas, préparer le Master Mix selon le tableau 2.

Le Master Mix contient tous les composants nécessaires pour la RT-PCR en temps réel à l'exception de l'échantillon. Préparer un volume de Master Mix pour au moins un échantillon de plus que nécessaire, afin de compenser l'imprécision du pipetage.

Tableau 2 Préparation du Master Mix (l'ARN de contrôle a été ajouté lors de l'extraction de l'ARN).

Volume par réaction	Volume Master Mix
15,8 µl Réaction Mix	13,8 µl x (N+1)
0,2 µl Enzyme	0,2 µl x (N+1)

Protocole B

L'ARN de contrôle (IPC) est utilisé pour le contrôle de la RT-PCR en temps réel uniquement (voir chapitre 10 ARN de contrôle). Dans ce cas, préparer le Master Mix selon le tableau 3.

Le Master Mix contient tous les composants nécessaires pour la RT-PCR en temps réel, à l'exception de l'échantillon. Préparer un volume de Master Mix pour au moins un échantillon de plus que nécessaire, afin de compenser l'imprécision du pipetage.

Tableau 3 Préparation du Master Mix (l'ARN de contrôle est ajouté directement au Master Mix).

Volume par réaction	Volume Master Mix
15,8 µl Réaction Mix	13,8 µl x (N+1)
0.2 µl Enzyme	0.2 µl x (N+1)
0,2 µl ARN de contrôle	0.2 µl x (N+1) *

*L'augmentation de volume causée par l'ajout de l'ARN de contrôle n'est pas prise en compte lors de la préparation du test RT-PCR.

Protocole A et B : configuration de la real time RT-PCR :

- Placer le nombre nécessaire de tube PCR optique dans l'appareil de PCR en temps réel /utiliser une plaque optique pour PCR.
- Pipeter **14 µl** du Master Mix dans chaque tube PCR / dans chaque puit de la plaque PCR.
- Ajoutez **6 µl** d'ARN isolé à partir des échantillons biologiques (y compris celui obtenu avec l'échantillon contrôle d'eau), ou de contrôle positif ou de contrôle négatif dans les tubes PCR / par puits de la plaque PCR (tableau 4).
- Fermer immédiatement les tubes PCR / la plaque PCR afin de réduire le risque de contamination.

Tableau 4 Préparation de la real time RT-PCR

Composant	Volume
Master Mix	14 µl
Echantillon	6 µl
Volume total	20 µl

c. Réglages des instruments

Pour la RT-PCR en temps réel, utiliser le profil thermique indiqué dans le tableau 5.

Tableau 5 Profil thermique de la real time RT-PCR

Description	Temps	Température	Nombre de cycles
Transcription inverse	10 minutes	45°C	1
Dénaturation initiale	5 minutes	95°C	1
Amplification de l'ADNc			
Dénaturation	10 secondes	95°C	45
Extension	40 secondes	60°C	
Acquisition à la fin de cette étape			

En fonction de l'appareil PCR en temps réel utilisé, d'autres paramètres doivent être ajustés conformément au tableau 6.

Tableau 6 : Aperçu des réglages des appareils de PCR en temps réel pour la RT-PCR en temps réel virellaSARS-CoV-2 seqc

Instrument PCR en temps réel	Paramètre Réaction Mix 1	Canal de détection	Remarque		
LightCycler 480II			Kit de compensation des couleurs SARS-CoV-2 seqc (G070MP2-CC) requis		
			Facteur de fusion	Facteur Quant	Temps d'intégration maximum (seconde)
	SARS-CoV-2	465-510	1	10	1
	Control RNA (IPC)	533-580	1	10	2
	ISC	533-610	1	10	2
B-coronavirus	618-660	1	10	3	
Stratagene Mx3000P / Mx 3005P	SARS-CoV-2	FAM	Gain 8		Colorant de référence : Aucun
	ARN de contrôle (IPC)	HEX	Gain 1		
	ISC	ROX	Gain 1		
	B-coronavirus	Cy5	Gain 5		
AriaMx Bio-Rad CFX96	SARS-CoV-2	FAM			Colorant de référence : Aucun
	ARN de contrôle (IPC)	HEX			
	ISC	ROX			
	B-coronavirus	Cy5			
ABI 7500	SARS-CoV-2	FAM			Option Référence colorant ROX : Non
	ARN de contrôle (IPC)	JOE			
	ISC	ROX			
	B-coronavirus	Cy5			
Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000	SARS-CoV-2	Vert	Gain 5		
	ARN de contrôle (IPC)	Jaune	Gain 5		
	ISC	Orange	Gain 5		
	B-coronavirus	Rouge	Gain 5		
Mic qPCR Cycler	SARS-CoV-2	Vert	Gain 8		
	ARN de contrôle (IPC)	Jaune	Gain 10		
	ISC	Orange	Gain 10		
	B-coronavirus	Rouge	Gain 10		

12. Analyse des résultats

Les résultats suivants peuvent se produire :

FAM Canal SARS- CoV- 2	Signal/Ct Values			Interprétation
	Cy5 Canal Beta- CoV	ROX Canal ISC	HEX Canal Control RNA	
Positif	Négatif	Positif ou Négatif	Positif ou Négatif*	Résultat positif, l'échantillon contient de l'ARN SARS-CoV-2.
Positif	Positif	Positif ou Négatif	Positif ou Négatif	Résultat positif, l'échantillon contient de l'ARN SARS-CoV-2.
Négatif	Positif	Positif ou Négatif	Positif ou Négatif	Résultat positif, l'échantillon contient de l'ARN du SARS-CoV-2 ou de l'ARN du SARS-CoV-1.
Négatif	Négatif	Positif	≤ 34	Résultat négatif, l'échantillon ne contient ni SARS-CoV-2-ARN ni SARS-CoV-1-ARN.
Négatif	Négatif	Négatif	≤ 34	Résultat invalide. La quantité et/ou la qualité de l'échantillon étaient insuffisantes.
Négatif	Négatif	Positif	Négatif ou > 34	Résultat invalide. La PCR en temps réel est, soit inhibée ou, soit, des erreurs ont eu lieu pendant l'extraction d'ARN/ADN.
Négatif	Négatif	Négatif	Négatif ou > 34	Résultat invalide. La PCR en temps réel est, soit inhibée ou, soit, des erreurs ont eu lieu pendant l'extraction d'ARN/ADN. La quantité et/ou la qualité de l'échantillon étaient insuffisantes.

Figure 1, Figure 2 et Figure 3 montrent des exemples de résultats RT-PCR positifs et négatifs

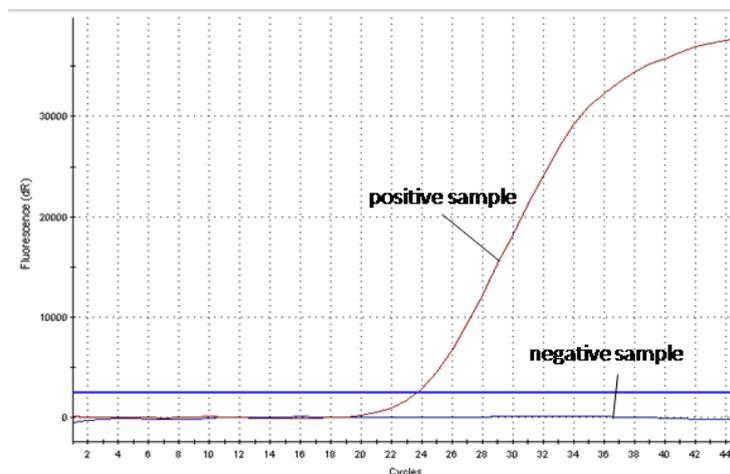


Figure 1 L'échantillon positif montre une amplification spécifique du pathogène dans le canal FAM, alors qu'aucun signal de fluorescence n'est détecté dans l'échantillon négatif (appareil de PCR en temps réel LC480 II).

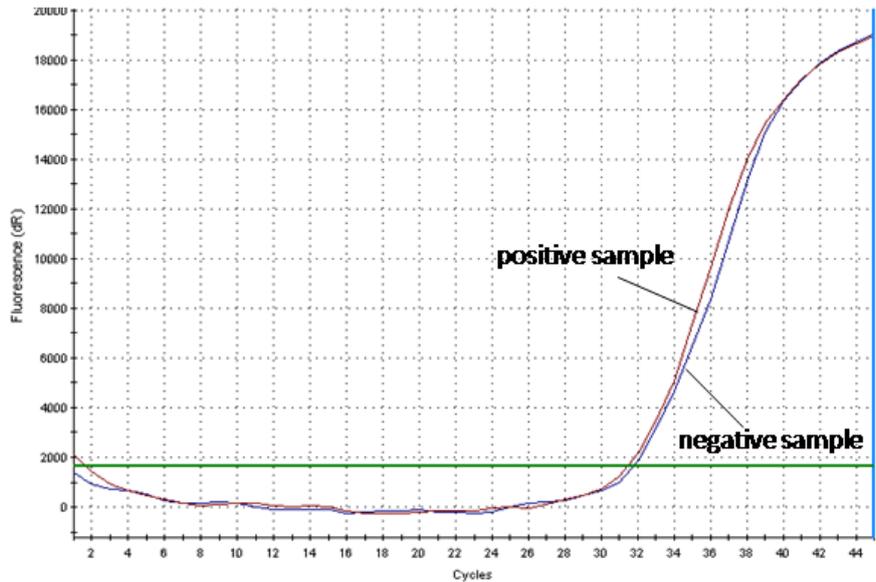


Figure 2 L'échantillon positif ainsi que l'échantillon négatif montre un signal dans le canal HEX spécifique de l'ARN de contrôle (IPC). Le signal d'amplification de l'ARN témoin dans l'échantillon négatif montre que le signal manquant dans le canal FAM, spécifique du pathogène, n'est pas dû à l'inhibition de la RT-PCR ou à un échec de l'extraction de l'ARN, mais que l'échantillon est un véritable échantillon négatif (appareil de PCR en temps réel LC480 II).

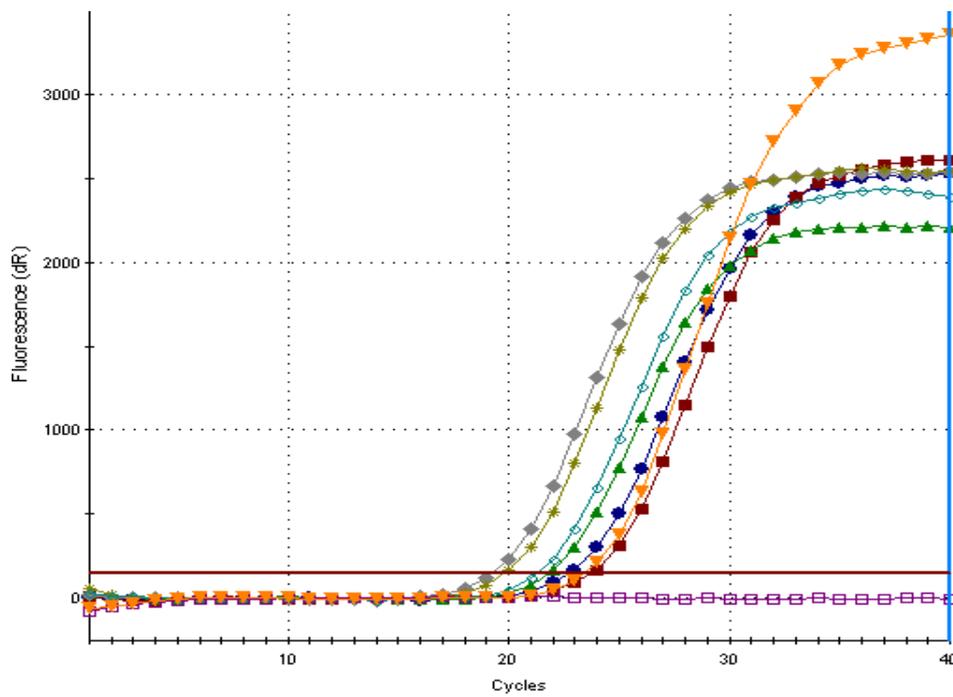


Figure 3 : Signaux de l'amplification de l'ISC dans le canal ROX. La figure montre les valeurs CT des éluats des écouvillons respiratoires après extraction d'acide nucléique à l'aide du kit d'extraction d'acide nucléique NukEx Mag ARN/ADN (Appareil de PCR en temps réel Stratagene Mx3005 P).

13. Validation du test

Pour augmenter la sécurité du processus, l'IPC est inclus dans le contrôle négatif et le contrôle positif.

Contrôles négatifs

Tous les contrôles négatifs doivent être inférieurs au seuil, à l'exception du canal HEX, qui doit présenter un CT inférieur à 34. En cas de contamination potentielle (apparition d'une courbe dans le contrôle négatif ou d'un groupe de courbes dans les échantillons à CT élevé - pour exemple au-dessus de 36), les résultats obtenus ne sont pas interprétables et l'ensemble du cycle (y compris l'extraction) doit être répété.

Contrôles positifs

Tous les contrôles positifs doivent montrer une courbe d'amplification positive (c'est-à-dire exponentielle) dans les différents canaux FAM, Cy5, ROX et HEX. Les contrôles positifs doivent tomber en dessous d'un CT de 30 sauf pour le canal HEX, qui doit montrer un CT inférieur à 34.

Contrôle internes

Les valeurs suivantes, pour l'amplification des contrôles internes sont valables, en utilisant les kits d'extraction d'acide nucléique Gerbion NukEx Mag RNA/DNA ou NukEx Pure RNA/DNA.

Les valeurs suivantes, pour l'amplification des contrôles internes, sont valables en utilisant les kits d'extraction d'acide nucléique Gerbion NukEx Mag RND/DNA ou NukEx Pure RNA/DNA. Tous les contrôles internes (ISC et IPC, seqc – contrôle de qualité de l'échantillon et de l'extraction) doivent montrer une courbe d'amplification positive (c'est-à-dire exponentielle). L'ARN de contrôle (IPC) doit se situer en dessous d'un CT de 34. Si l'ARN de contrôle est au-dessus de CT 34, cela indique un problème d'extraction ou un échantillon fortement positif qui peut inhiber l'IPC.

Dans ce dernier cas, le test est valide. Il est recommandé d'effectuer l'extraction d'un contrôle de l'eau à chaque cycle. L'IPC dans le contrôle de l'eau doit se situer en dessous d'un CT de 34. Pour les échantillons de prélèvement respiratoire prélevés avec précaution, l'ISC affiche les valeurs CT de l'app. 15 à l'app 28. Un signal fortement retardé supérieur à un CT de 35 indique une faible quantité d'échantillon. Par conséquent, de faux résultats négatifs ne peuvent pas être exclus. En l'absence d'amplifications ni dans le canal FAM ni dans le canal HEX (ISC) lors de l'utilisation d'éluats d'échantillons primaires provenant de plusieurs espèces telles que les mammifères et les oiseaux.

Si d'autres kits d'extraction d'acide nucléique sont utilisés, le client doit définir ses propres seuils. Dans ce cas, la valeur CT de l'ARN de contrôle (IPC) dans un éluat d'un échantillon ne doit pas être retardée de plus de 4 CT par rapport à un éluat extrait d'un contrôle de l'eau.

14. Limites de la méthode

- Une stricte conformité aux instructions d'utilisation est requise pour des résultats optimaux.
- L'utilisation de ce produit est limitée au personnel spécialement qualifié et formé aux techniques de real time PCR et des procédures de diagnostic in vitro.
- De bonnes pratiques de laboratoire sont essentielles pour la bonne exécution de ce test.
- Tous les réactifs doivent être étroitement contrôlés pour détecter toute impureté et contamination. Tous les réactifs suspects doivent être jetés.
- Ce test ne doit pas être utilisé directement sur un échantillon biologique. Des méthodes appropriées d'extraction d'acide nucléique doivent être menées avant d'utiliser ce test.
- La présence d'inhibiteurs de la RT-PCR peuvent provoquer des faux négatifs ou des résultats invalides.

- Des mutations potentielles au sein des régions cibles des génomes du SARS-CoV-2 et du β -coronavirus, couverts par les amorces et/ou sondes utilisées dans le kit, peuvent entraîner l'échec de la détection des ARN respectifs.
- Comme avec tout test diagnostic, les résultats du kit real time PCR virellaSARS-CoV-2 seqc ont besoin d'être interprétés en prenant en considération toutes les données cliniques et tous les résultats d'analyses de laboratoire disponibles.

15. Recherche de cause d'erreurs

Ce guide de recherche de cause d'erreurs doit permettre de résoudre d'éventuels problèmes qui peuvent survenir lors de l'exécution du test RT-PCR en temps réel.

Aucun signal de fluorescence dans les canaux FAM et Cy5 du contrôle positif	
Le canal sélectionné pour l'analyse n'est pas conforme avec le protocole	Sélectionner le canal FAM pour l'analyse de l'amplification spécifique du SARS-CoV-2, le canal Cy5 pour l'analyse de l'amplification spécifique du Beta coronavirus, le canal HEX pour l'amplification de l'ARN de contrôle et le canal ROX pour l'amplification de l'ISC.
Préparation incorrecte du Master Mix	S'assurer que l'enzyme est ajoutée au Master Mix (chapitre 11).
Configuration incorrecte de la RT-PCR en temps réel	Vérifier le protocole étape par étape et comparer le avec la procédure (chapitre 11.b)
La programmation du profil thermique est incorrecte	Comparer le profil thermique avec le protocole 11.c
Conditions de stockage incorrectes pour un ou plusieurs composants du kit ou le kit est périmé	Vérifier les conditions de stockage et la date de péremption imprimées sur l'étiquette du kit. Si nécessaire, utiliser un nouveau kit et s'assurer que les composants du kit sont stockés comme décrit dans le chapitre 6 : Transport, stockage stabilité.
Signal faible ou inexistant de l'ARN de contrôle et de l'ISC et absence simultanée d'un signal dans le canal FAM et / ou Cy5.	
Les conditions RT-PCR en temps réel ne sont pas conformes au protocole	Vérifier les conditions real time RT-PCR (chapitre 11).
La RT-PCR en temps réel inhibée	S'assurer que la méthode appropriée d'extraction a été utilisée (voir chapitre 9 : Préparation d'échantillon) et suivre les instructions du fabricant. S'assurer que les tampons de lavage contenant de l'alcool ont été complètement supprimés.
Volume d'échantillon insuffisant	S'assurer que suffisamment d'échantillon a été appliqué pour l'extraction. Utiliser une méthode d'extraction appropriée (voir chapitre « Préparation de l'échantillon ») et suivre les instructions du fabricant.
Perte d'ARN pendant le processus d'isolement	Dans le cas où l'ARN de contrôle a été ajouté avant l'extraction, l'absence d'un signal d'amplification peut indiquer que l'extraction de l'ARN n'a pas réussi. S'assurer qu'une méthode appropriée d'extraction a été utilisée (des kits commerciaux sont recommandés) et respecter le protocole du fabricant.
Conditions de conservation incorrectes pour un ou plusieurs composants ou kit expirés	Vérifier les conditions de stockage et la date d'expiration imprimées sur l'étiquette du kit. Si nécessaire, utiliser un nouveau kit et s'assurer que les composants du kit sont stockés comme décrit dans le chapitre 6 : Transport, stockage et stabilité

Détection d'un signal de fluorescence dans le canal FAM et / ou Cy5 du contrôle négatif

Contamination lors de la préparation de la RT-PCR en temps réel

Répéter la RT-PCR en temps réel. Si le résultat est négatif dans la répétition, la contamination s'est produite lorsque les échantillons ont été pipetés dans les tubes de réaction de PCR. S'assurer de pipeter le contrôle positif en dernier et de fermer le tube de réaction de PCR immédiatement après l'ajout de l'échantillon. Si le même résultat se produit, un ou plusieurs des composants du kit peuvent être contaminés. S'assurer que l'espace de travail et les instruments sont régulièrement décontaminés. Utiliser un nouveau kit et répéter la RT-PCR en temps réel.

16. Performances

a. Sensibilité analytique

La limite de détection (LoD) du kit de RT-PCR en temps réel virellaSARS-CoV-2 seqc a été déterminée en utilisant des dilutions en série de fragments d'ARN synthétiques contenant la séquence cible SARS-CoV-2 et la séquence cible β -coronavirus dans un Strategene Mx3005, instrument de PCR en temps réel. La LoD du kit de RT-PCR en temps réel virellaSARS-CoV-2 seqc est ≤ 10 copies du génome par réaction.

b. Spécificité analytique

La spécificité du kit de RT-PCR en temps réel virellaSARS-CoV-2 seqc a été évaluée avec différents autres virus et bactéries pertinents, trouvés dans des échantillons cliniques et sur la base d'analyses in silico.

Résultats :

Le kit de RT-PCR en temps réel virellaSARS-CoV-2 seqc a montré un résultat positif pour les échantillons contenant les séquences d'ARN du SARS-CoV-2 et du β -coronavirus, tandis que les échantillons contenant d'autres agents pathogènes ont été testés négatifs. Les résultats sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7 : ADN et ARN élués provenant de pathogènes bactériens et viraux testés pour la détermination de la spécificité analytique de la real time RT-PCR virellaSARS-CoV-2 seqc.

Éluats dont le statut est connu	Résultat attendu Beta CoV	Résultat attendu SARS-CoV-2	virellaSARS- Beta CoV	virellaSARS- CoV-2 seqc
	Cy5 canal	FAM canal	Cy5 canal	FAM canal
HCoV-OC43	Positif	Négatif	Positif	Négatif
HCoV-229E	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
MERS-CoV	Positif	Négatif	Positif	Négatif
Influenza A H3N2	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
Influenza A H5N1	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
Influenzavirus B	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
Virus Respiratoire Syncytial A	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
Virus Respiratoire Syncytial B	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
Para Influenzavirus 1	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
Para Influenzavirus 2	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
Para Influenzavirus 3	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
Para Influenzavirus 4	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
Métapneumovirus	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
Adénovirus	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
Rhinovirus	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
Entérovirus	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif

Human Boca virus	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
Legionella pneumonie	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
Mycoplasma pneumonie	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
Mycobacterium tuberculose complexe	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
Bordetella pertussis	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
Bordetella parapertussis	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
S. aureus	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
MRSA	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
MSSA	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
Streptococcus spp.	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif

c. Echantillons cliniques

Des échantillons confirmés positifs (50) et négatifs (153) (écouvillons oraux et nasaux) de la pandémie 2020 en Europe ont été testés.

L'ARN a été extrait en utilisant le kit d'extraction NukEx Mag ARN / ADN (Gerbion Cat. No. G05012) sur un instrument KingFisher Prime Duo.

Les expériences de PCR ont été effectuées sur un cycleur Stratagene MX3005p. Le re-test des échantillons confirmés avec virellaSARS-CoV-2 seqc a montré une sensibilité de 100% et une spécificité de 100%. Aucun des échantillons n'a été inhibé dans la PCR.

	Échantillons positifs	Échantillons négatifs
virellaSARS-CoV-2 seqc positif	50	0
virellaSARS-CoV-2 seqc négatif	0	153
	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
	100	100

d. Linéarité

La gamme linéaire du kit de RT-PCR en temps réel virellaSARS-CoV-2 seqc a été évaluée en analysant une série de dilutions logarithmiques de transcrits in vitro et de fragments d'ADN synthétiques.

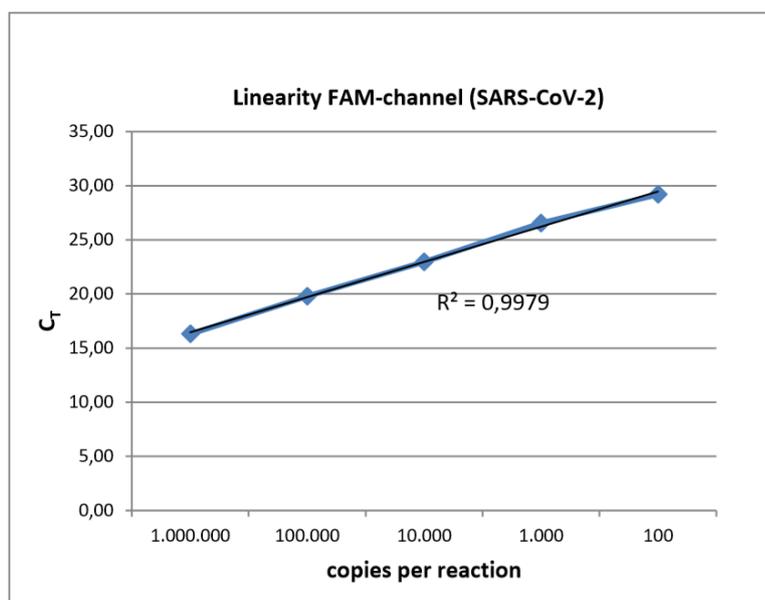


Figure 4 Détermination de la gamme linéaire du kit de RT-PCR en temps réel virellaSARS-CoV-2 seqc dans le canal FAM.

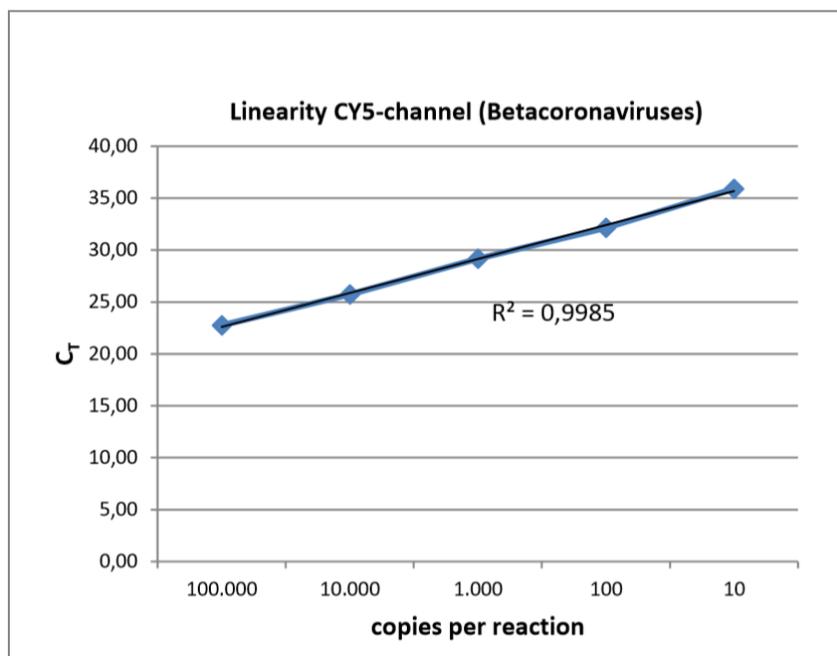


Figure 5 Détermination de la gamme linéaire du kit de RT-PCR en temps réel virellaSARS-CoV-2 seqc dans le canal Cy5.

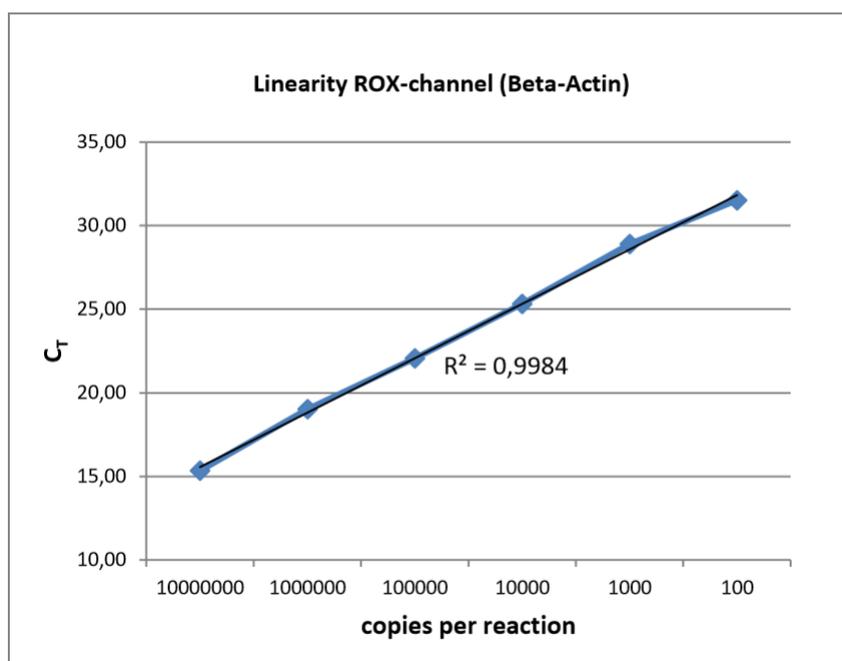


Figure 6 Détermination de la gamme linéaire du kit RT-PCR en temps réel virellaSARS-CoV-2 seqc dans le canal ROX.

e. Précision

La précision du Kit RT-PCR en temps réel virellaSARS-CoV-2 seqc a été déterminée sous forme de variabilités intra-essai, inter-essai et inter-lots.

Les données de variabilité sont exprimées par l'écart-type et en coefficient de variation. Les données sont basées sur des analyses de quantification de concentrations définies d'ARN spécifique au SARS-CoV-A, d'ARN spécifique au β -coronavirus, d'ADN spécifique à l'ISC et sur le cycle de seuil de l'ARN de contrôle (IPC).

Tableau 8 Précision du kit RT-PCR en temps réel virellaSARS-CoV-2 seq

SARS-CoV-2 (FAM)	Copies/ μ l	Déviati on standard	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra- essai	25	0,23	0,77
Variabilité inter- essai	25	0,51	1,71
Variabilité inter-Lot	25	0,76	2,56

Beta CoV (Cy5)	Copies/ μ l	Déviati on standard	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra- essai	25	0,27	0,84
Variabilité inter- essai	25	0,51	1,50
Variabilité inter-Lot	25	0,52	1,61

ISC (ROX)	Copies/ μ l	Déviati on standard	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra- essai	25	0,28	0,90
Variabilité inter- essai	25	0,40	1,27
Variabilité inter-Lot	25	0,25	0,77

IPC (HEX)	Copies/ μ l	Déviati on standard	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra- essai	25	0,69	2,31
Variabilité inter- essai	25	0,58	1,91
Variabilité inter-Lot	25	0,37	1,22

f. Sensibilité diagnostique

La sensibilité diagnostique des tests (RT-)PCR en temps réel dépend principalement de la méthode d'extraction de l'ADN/ARN utilisée pour isoler l'ADN et l'ARN de divers échantillons biologiques. Les réactifs d'extraction de l'ADN/ARN ne font pas partie des kits de (RT-)PCR en temps réel de Gerbion. Les kits de (RT-)PCR en temps réel de Gerbion comprennent un contrôle d'extraction et des directives pour les critères de validation du contrôle d'extraction dans chaque réaction. Le contrôle d'extraction indique l'inhibition de la PCR (RT-) en temps réel et/ou une extraction inefficace des acides nucléiques. Il ne peut pas être utilisé comme calibreur.

Par conséquent, Gerbion garantit les sensibilités et spécificités analytiques des kits (RT-) en temps réel réalisés avec de l'ADN et de l'ARN élués de matériaux de référence et d'échantillons d'essais circulaires et avec des fragments d'acides nucléiques synthétiques. Gerbion ne garantit pas les sensibilités diagnostiques. Si des sensibilités diagnostiques sont mentionnées dans les manuels des kits (RT-)PCR en temps réel de Gerbion, les données sont strictement corrélées à une méthode spécifique d'extraction des acides nucléiques qui a été utilisée lors de la validation des kits respectifs et ne peuvent être transférées à d'autres méthodes d'extraction.

Il est de la responsabilité de l'utilisateur de qualifier les méthodes d'extraction utilisées pour l'isolement de l'ADN/ARN à partir d'échantillons biologiques.

17. Symboles et abréviations

ARN	Acide Ribo Nucléique		Limite supérieure de température
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction		Fabricant
REACTION MIX	Réaction Mix		Utilisation avant AAAA-MM-JJ
Enzyme	Enzyme	LOT	Numéro de lot
CONTROL +	Contrôle positif	CONT	Contenu
CONTROL -	Contrôle négatif		Lire attentivement les instructions d'utilisation
CONTROL RNA IPC	ARN de contrôle (IPC)	IVD	Dispositif médical de diagnostic in vitro
REF	Référence	CE	Conformité Européenne
	Contient suffisamment pour <n> tests		

18. Bibliographie

- [1] www.who.int/health-topics/coronavirus
- [2] Corman et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real time RT-PCR. Eurosurveillance, Volume 25, Issue 3, 23/Jan/2020.
- [3] www.nature.com/articles/s41564-020-0695-z, 02/March/2020