

SARS-CoV-2 RT-qPCR DETECTION KIT

Détection qualitative de l'ARN du SARS-CoV-2 par RT-qPCR fluorescente multiplex en temps réel

Référence catalogue : KSC2-AB69

Notice : *KSC2-AB69.NT.version005.11/06/21*

Révision : 2021-06-11



UTILISATION PRÉVUE : DIAGNOSTIC *IN VITRO*



205 rue des frères Lumière
69 970 CHAPONNAY
FRANCE
+33 (0)4 37 57 00 54
contact@appolonbiotech.com

www.appolonbiotech.fr

Table des matières

I. Nom du produit.....	3
II. Utilisation prévue du produit.....	3
III. Principe du kit	3
IV. Description du produit	4
V. Conditions de stockage et date de validité	4
VI. Matériel requis (non fourni)	4
VI.1. Matériel de prélèvement et de transport viral.....	4
VI.2. Système d'extraction d'ARN	5
VI.3. Systèmes de PCR en temps réel	5
VI.4. Equipements de laboratoire	5
VI.5. Réactifs	5
Types d'échantillons pouvant être analysés.....	5
Modalité de prélèvement.....	5
VII. Précautions d'emploi.....	6
VII.1 Précautions générales.....	6
VII.2 Précautions particulières pour la biologie moléculaire.....	6
VIII. Préparation des échantillons, transport et stockage	6
IX. Protocole d'extraction de l'ARN du SARS-CoV-2	7
IX.1. Extraction par lyse chimique	7
IX.2. Extraction des ARN par billes magnétiques	7
X. Protocole d'amplification en temps réel	7
XI. Analyse des résultats.....	9
XI.1. Canaux de lecture de fluorescence	9
XI.2. Validation des contrôles RT-qPCR	9
XI.3. Interprétation des résultats.....	9
XII. Limites.....	10
XIII. Performances analytiques du SARS-CoV-2 DETECTION KIT	11
XIII.1. Spécificité des amorces et des sondes	11
XIII.1.1. Inclusivité	11
XIII.1.2. Exclusivité /réaction croisée in silico	11
XIII.1.3. Exclusivité / réaction croisée par RT-qPCR.....	11
XIII.2. Sensibilité analytique.....	11
XIII.2.1. Sensibilité analytique sur prélèvements nasopharyngés	11
XIII.2.2. Sensibilité analytique sur prélèvements salivaires	11
XIII.3. Effets des substances interférentes	12
XIII.4. Performances cliniques du SARS-CoV-2 DETECTION KIT (Référence KSC2-AB69)	12
XIV. Résolution des problèmes.....	14
XIV.1. Problèmes d'amplification	14
XIV.2. Problème de contamination	15
XIV.3. Echantillons inhibés	15

XV. Bibliographie	15
XVI. Symboles et logos utilisés	15

Table des tableaux et figures

Tableau 1 : Composition du SARS CoV-2 DETECTION KIT (Appolon Bioteck Référence KSC2-AB69).....	4
Tableau 2 : Volumes de mélange réactionnel et d'échantillon à distribuer par puits de RT-qPCR.....	8
Tableau 3 : Programme de RT-qPCR.....	8
Tableau 4 : Critères de validation d'une série RT-qPCR.....	9
Tableau 5 : Interprétation des résultats de RT-qPCR pour l'échantillon analysé.....	10
Tableau 6 : Synthèse des résultats de performance clinique du SARS-CoV-2 DETECTION KIT (Appolon Bioteck Référence KSC2-AB69) sur prélèvements nasopharyngés.....	12
Tableau 7 : Synthèse des résultats de performance clinique du SARS-CoV-2 DETECTION KIT (Appolon Bioteck Référence KSC2-AB69) sur prélèvements salivaires.....	13
Figure 1 : Profil d'amplification des gènes cibles testés par SARS-CoV-2 RT-qPCR DETECTION KIT (KSC2-AB69). .	9
Figure 2 : Exemple de résultats de RT-qPCR pour le diagnostic du SARS-CoV-2..	9

I. Nom du produit

SARS-CoV-2 RT-qPCR DETECTION KIT

Détection qualitative de l'ARN du SARS-CoV-2 par RT-qPCR fluorescente multiplex en temps réel

II. Utilisation prévue du produit

La maladie à Coronavirus 19 (COVID-19) est causée par un nouveau virus à ARN simple brin de 29 903 nucléotides, désigné sous le nom de Coronavirus-2 du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère (SARS-CoV-2), apparu dans la ville de Wuhan (Chine) en 2019.

SARS-CoV-2 RT-qPCR DETECTION KIT (Appolon Biotech, Référence KSC2-AB69) est une trousse de diagnostic *in vitro* permettant la détection qualitative des acides nucléiques (ARN) du SARS-CoV-2 présents dans un échantillon biologique. La trousse contient une solution enzymatique permettant, en 1 heure et 15 minutes, la réalisation de la réaction de transcription et d'amplification PCR en temps réel (RT-qPCR), un contrôle positif (ARN viral SARS-CoV-2 quantifié dans une solution d'inactivation virale) et un contrôle négatif (lignée cellulaire humaine qualifiée sans présence de SARS-CoV-2 ou d'autres agents viraux) utilisés pour valider les étapes d'extraction et de RT-qPCR.

SARS-CoV-2 RT-qPCR DETECTION KIT est utilisé pour le diagnostic du SARS-CoV-2 sur prélèvements nasopharyngés et salivaires de patients présentant des signes et des symptômes évocateurs d'une infection par le SARS-CoV-2 (par exemple, fièvre et / ou symptômes d'une maladie respiratoire aiguë), de patients ayant eu un contact avec un individu ayant contracté le virus, de patients susceptibles d'être infectés suite à leur présence dans un rassemblement ou un « cluster », ou devant faire l'objet d'une campagne de dépistage mise en œuvre par les autorités de santé.

Les résultats positifs sont indicatifs de la présence de l'ARN du SARS-CoV-2 chez le patient testé. La prise en charge médicale du patient doit être effectuée sur la base de l'ensemble des données cliniques et biologiques disponibles. Les résultats positifs ne peuvent en aucun cas exclure une infection d'origine bactérienne ou une co-infection avec des virus autres que le SARS-CoV-2.

Les résultats négatifs n'excluent pas une infection par le SARS-CoV-2. Ils ne doivent pas être utilisés comme seule base de décision dans la prise en charge des patients. Ils doivent être associés aux observations cliniques, aux antécédents du patient et aux informations épidémiologiques disponibles par ailleurs.

SARS-CoV-2 RT-qPCR DETECTION KIT est destiné au personnel des laboratoires de biologie médicale dûment formé et habilité aux procédures de bonnes pratiques de diagnostic de laboratoire. Il est exclusivement réservé aux laboratoires de biologie médicale dotés d'une structure conforme aux recommandations de l'Agence Régionale de Santé avec un personnel qualifié et formé aux techniques de biologie moléculaire, en particulier, la PCR en temps réel. Les laboratoires sont tenus de déclarer tous les résultats aux autorités de santé compétentes.

SARS-CoV-2 RT-qPCR DETECTION KIT est marqué CE-IVD selon la Directive Européenne 98/79/CE et respecte les exigences de la norme ISO 13485.

III. Principe du kit

SARS-CoV-2 DETECTION KIT est basé sur l'amplification de deux régions spécifiques du génome SARS-CoV-2. La détection utilise la propriété 5' exonucléasique de la *Taq* polymérase et sa capacité à dégrader les sondes d'hydrolyse incluses dans le mix réactionnel. Cette dégradation émet une fluorescence pouvant être lue par les capteurs optiques d'un thermocycleur pour un suivi, en temps réel, de l'amplification de la cible recherchée.

La solution réactionnelle est constituée d'amorces et de sondes spécifiques des régions génomiques ORF 1ab et N du SARS-CoV-2. Les sondes d'hydrolyse (TaqMan™) spécifiques du gène ORF 1ab et du gène N du SARS-CoV-2 sont marquées à leur extrémités 5' par les fluorochromes FAM et HEX, respectivement.

La solution contient également un contrôle interne endogène de la RT-qPCR (2 amorces et 1 sonde d'hydrolyse (TaqMan™), marquée avec le fluorochrome Cy5 à son extrémité 5' pour la détection du gène de la RNase P humaine). Le contrôle interne est amplifié dans chaque échantillon y compris dans le témoin positif et le témoin négatif d'extraction (fournis dans le kit) afin de valider le processus d'extraction des acides nucléiques ou de lyse, d'évaluer le statut d'inhibition de l'échantillon et de valider l'étape de RT-qPCR.

IV. Description du produit

Tableau 1 : Composition du SARS CoV-2 DETECTION KIT (Appolon Bioteck Référence KSC2-AB69)

Nom du composant	Composition	Quantité	Volume par tube	Cibles (Fluorescence)	Stockage	Conservation
SARS-CoV-2 Mix RT-qPCR	Mélange réactionnel de RT-qPCR: <ul style="list-style-type: none"> • Amorces et sondes spécifiques des gènes ORF1ab et N du SARS-COV-2 • Amorces et sonde spécifiques du gène RNaseP humain. • Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, MgCl₂, dNTPs, UDG... • Enzymes RT, Hot start <i>Taq</i> DNA polymerase. 	1 tube Bouchon translucide	1500 µL	ORF1ab (FAM) N (HEX)	-25 / -15 °C	12 mois
Contrôle négatif	ARN de lignée cellulaire humaine qualifiée sans présence de SARS-CoV-2 ou autres agents pathogènes, dans une solution d'inactivation virale et de préservation	1 tube Bouchon bleu	400 µL	RNase P (Cy5)		
Contrôle positif	ARN Sars-CoV-2 quantifié et ARN de lignée cellulaire humaine qualifiée sans présence de SARS-CoV-2 ou autres agents pathogènes, dans une solution d'inactivation virale et de préservation	1 tube Bouchon rouge	400 µL			

Les contrôles positif et négatif permettent l'évaluation de l'efficacité de la préparation de l'échantillon et l'absence d'inhibiteurs dans la réaction de RT-qPCR.

V. Conditions de stockage et date de validité

Le kit doit être stocké à -20°C ± 5°C, et sa période de validité est de 12 mois.

Les congélations et décongélations répétées doivent être évitées. Les cycles de congélation-décongélation ne doivent pas être répétés plus de 3 fois.

Voir l'étiquette du produit pour la date de fabrication et de validité du kit.

VI. Matériel requis (non fourni)

VI.1. Matériel de prélèvement et de transport viral

- Matériel de recueil des prélèvements nasopharyngés :
 - Ecouvillons secs stériles
 - Milieu de transport et d'inactivation virale
- Matériel de recueil des prélèvements salivaires :
 - Flacons stériles à ouverture large
 - Kits de prélèvement salivaire contenant un tube de collecte avec un entonnoir de recueil stérile
 - « Pastette » ou pipette de prélèvement et un tube contenant un tampon inactivateur prêt à l'emploi

Le milieu de transport viral MTL (Appolon Bioteck ; MTL02-AB69) est recommandé pour utilisation avec SARS-CoV-2 RT-qPCR DETECTION KIT. Pour tout autre milieu de transport, veuillez suivre les recommandations du fournisseur.

VI.2. Système d'extraction d'ARN

Tous les systèmes d'extraction d'ARN à billes magnétiques peuvent être utilisés avec SARS-CoV-2 RT-qPCR DETECTION KIT. Suivre les recommandations d'utilisation du fournisseur retenu.

VI.3. Systèmes de PCR en temps réel

Line-Gene 9600 Plus Real-time PCR Detection System, QuantGene 9600 Real-time PCR Detection System, AGS 4800 Real-time PCR Detection System, CFX96 Touch™, LightCycler 480 System SP

VI.4. Equipements de laboratoire

- Congélateur à -20°C, Réfrigérateur +4°C
- Gants jetables non poudrés
- Blouse de laboratoire
- Centrifugeuse de paillasse à plaque et/ou pour tubes de 1,5 ml et 2,0 ml
- Vortex de paillasse
- Micropipettes ajustables P10, P20, P200, P1000
- Cônes stériles à filtre pour 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl
- Microtubes Eppendorf 1,5 ml ou équivalent
- Microtubes, barrettes ou plaques PCR 96 positions 0,2 ml
- Films optiques spécifique pour la PCR (ou les bouchons s'il s'agit de barrettes)
- Poste de Sécurité Microbiologique (PSM) pour la manipulation des pathogènes de classe I ou II
- Portoir froid ou glace pilée

VI.5. Réactifs

- Kit de transport et d'extraction de l'ARN viral MTL (Appolon Biotech, MTL02-AB69)
- NX-48S Viral NA Kit for Covid-19 (Appolon Biotech, VN143) ou équivalent
- Eau de qualité biologique moléculaire
- Produits de décontamination ADN-ARN

Types d'échantillons pouvant être analysés

- Prélèvements nasopharyngés
- Prélèvements salivaires

Les prélèvements peuvent être réalisés sur des patients :

- Présentant des signes ou les symptômes évocateurs d'une infection par le SARS-CoV-2 (fièvre et/ou symptômes d'une maladie respiratoire aiguë)
- Ayant eu un contact avec un individu ayant contracté le virus
- Issus de « clusters » connus de SARS-CoV-2
- Faisant l'objet de campagnes de dépistage mises en œuvre par les autorités de santé
- S'apprêtant à effectuer, ou ayant effectué un déplacement à l'étranger ou hors métropole

Modalité de prélèvement

Concernant les modalités de prélèvement il est conseillé de suivre les recommandations des autorités de santé compétentes ainsi que celles du fournisseur du kit de prélèvement retenu.

• Prélèvement nasopharyngé

- 1- Immerger l'écouvillon dans le milieu de transport viral MTL (MTL02-AB69) immédiatement après réalisation du prélèvement nasopharyngé
- 2- Tourner l'écouvillon afin de relarguer le matériel biologique dans le tube de prélèvement MTL
- 3- Retirer l'écouvillon du tube
- 4- Jeter l'écouvillon dans une poubelle spécifique pour les matières biologiques dangereuses
- 5- Fermer soigneusement le tube avec le bouchon dédié.

• Prélèvement salivaire

1. Recueillir le crachat salivaire à l'aide du kit de prélèvement salivaire retenu
2. Transférer entre 50 µl et 150 µl de prélèvement salivaire dans le milieu de transport viral MTL (MTL02-AB69)
3. Fermer soigneusement le tube avec le bouchon dédié.

VII. Précautions d'emploi

VII.1 Précautions générales

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

VII.2 Précautions particulières pour la biologie moléculaire

Les procédures d'amplification nécessitent des aménagements particuliers et un personnel qualifié pour éviter les contaminations croisées.

Les étapes du processus doivent se faire dans des pièces séparées pour éviter tout risque de contamination. Le passage d'une zone à l'autre doit se faire de manière unidirectionnelle dans le sens zone de prélèvement vers la zone de préparation des réactifs et vers la zone d'amplification PCR.

Important :

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

VIII. Préparation des échantillons, transport et stockage

Important :

- Des conditions d'échantillonnage, de traitement de l'échantillon, de transport et de stockage inappropriées, peuvent conduire à des résultats erronés.
- Les prélèvements doivent être réalisés selon les instructions du laboratoire
- Le transport des prélèvements doit être effectué dans le respect des réglementations en vigueur.
- Si les échantillons sont transportés dans un milieu de transport autre que le MTL (MTL02-AB69), nous vous recommandons de suivre les recommandations du fournisseur en respectant les consignes pour les applications de biologie moléculaire.
- Les performances du SARS-CoV-2 RT-qPCR DETECTION KIT ont été prouvées sur prélèvements nasopharyngés (écouvillon nasopharyngé) et sur prélèvements salivaires (crachat salivaire ou prélèvement recueilli sur pipettes) collectés sur le milieu de transport MTL (MTL02-AB69).
- Le volume du prélèvement salivaire recueilli doit être compris entre 50 µl et 150 µl.

Le milieu MTL permet la collecte, l'inactivation, la lyse membranaire virale et la préservation des acides nucléiques viraux pendant le transport à +4°C.

Les conditions de stockage recommandées pour les prélèvements nasopharyngés et salivaires dans le milieu MTL (MTL02-AB69) sont :

- 7 jours à +4°C
- 6 mois à -20°C (avec un maximum de 3 cycles de congélation / décongélation).

IX. Protocole d'extraction de l'ARN du SARS-CoV-2

IX.1. Extraction par lyse chimique

Avant le prélèvement, reporter les identifiants du patient sur le tube de transport MTL (Appolon Bioteck, MTL02-AB69) et suivre les indications suivantes :

Prélèvements nasopharyngés collectés sur écouvillons :

1. Déposer l'écouvillon dans 1 ml du milieu de transport MTL sans toucher les bords de celui-ci.
2. Relarguer le matériel biologique prélevé dans le tube de prélèvement.
3. Retirer l'écouvillon du tube, sans toucher les parois de celui-ci
4. Jeter l'écouvillon dans une poubelle spécifique pour les matières biologiques dangereuses
5. Fermer soigneusement le tube avec le bouchon dédié.
6. Agiter le prélèvement dans son milieu de transport MTL au vortex pendant 1 minute
7. Laisser reposer le tube, sans agitation, pendant 5 minutes et répéter 3 fois cette opération

Prélèvements salivaires :

1. Déposer 50µL à 150 µl de salive dans 1 ml de milieu MTL sans toucher les bords de celui-ci
2. Fermer soigneusement le tube avec le bouchon dédié.
3. Agiter le prélèvement dans son milieu de transport MTL au vortex pendant 1 minute
4. Laisser reposer le tube, sans agitation, pendant 5 minutes et répéter 2 fois cette opération

IX.2 Extraction des ARN par billes magnétiques

L'extraction des ARN SARS-CoV-2 peut être réalisée par un système automatisé à billes magnétiques ou équivalent. Il est recommandé de suivre les préconisations précisées dans les notices d'utilisation des kits et des systèmes d'extraction retenus.

X. Protocole d'amplification en temps réel

Important :

- Après la distribution de 15 µl du mélange réactionnel dans les puits de plaque PCR, déposer 5 µl des lysats ou des éluas des ARNs des patients dans chaque puits, suivant votre plan de plaque.
- Une fois la plaque PCR scellée par un film adhésif, placer celle-ci immédiatement dans le système de PCR en temps réel. Le non-respect de cette consigne pourrait entraîner une dégradation de l'ARN.
- Pour éviter toute contamination, préparez les réactifs dans un poste de travail dédié à la RT-qPCR
- N'utilisez pas la même pipette pour les contrôles et les échantillons d'ARN
- Utilisez toujours des pointes de pipette stériles anti-aérosols.
- Maintenez un environnement sans RNase.
- Protégez les tests de la lumière.
- Pour chaque plaque RT-PCR, incluez les contrôles suivants dans les séries de tests :
 - Le contrôle positif inclus dans le SARS-CoV-2 RT-qPCR DETECTION Kit
 - Le contrôle négatif inclus dans le SARS-CoV-2 RT-qPCR DETECTION Kit
 - Le contrôle négatif sans aucune matrice nucléique (eau de qualité biologie moléculaire qualifiée exempte d'ADN, d'ARN et de RNase)

Etapes du protocole de RT-qPCR :

1. Etablir une feuille de route technique (plan de plaque) spécifiant l'identité des patients
2. Décongeler les réactifs et pour chaque série RT-qPCR, prévoir le nombre de réactions comme suit :
 - 1 réaction pour chaque échantillon (patient) d'ARN extrait à tester
 - 1 réaction pour le témoin positif
 - 1 réaction pour le témoin négatif d'extraction.
 - 1 réaction de témoin négatif de PCR sans ARN (eau de qualité biologie moléculaire)

3. Distribuer les mélanges réactionnels suivant le tableau 2 :
 - a. Distribuer 15 µl du mix d'amplification dans chaque puits de PCR suivant le nombre de patients et de contrôles.
 - b. Ajouter 5 µl de chaque ARN extraits ou de lysats préparés, suivant le plan de plaque
 - c. Déposer 5 µl du matériau de contrôle positif dans le puits témoin positif.
 - d. Déposer 5 µl du témoin négatif d'extraction dans le puits témoin négatif.
 - e. Déposer 5 µl du témoin négatif de PCR sans ARN (eau de qualité biologie moléculaire) suivant le plan de plaque.
 - f. Sceller la plaque avec un film adhésif optique
 - g. Lancer le profil thermique d'amplification (Cf Tableau 3)

4. Programmer le thermocycleur en temps réel comme indiqué dans le Tableau 3.

Tableau 2: Volumes de mélange réactionnel et d'échantillon à distribuer par puits de RT-qPCR

Produit	Volume par puits d'échantillon	Volume / puits Témoin négatif d'extraction	Volume / puit Témoin positif d'extraction	Volume / puits Témoin négatif de PCR
SARS-CoV-2 Mix RT-qPCR	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
ARN extrait ou lysat de l'échantillon à tester	5 µl	-	-	-
ARN témoin positif d'extraction	-	-	5 µl	-
ARN témoin négatif d'extraction	-	5µl	-	-
Eau de qualité biologie moléculaire	-	-	-	5 µl
Volume total de réaction	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

Tableau 3: Programme de RT-qPCR

Etapes	Temps	Température	Cycles	Acquisition de fluorescence
Transcription inverse (RT)	10 minutes	50°C	1	Non applicable
Activation de la Taq polymérase	10 minutes	95°C	1	Non applicable
Amplification	5 secondes	95°C	45	FAM HEX Cy5
	5 secondes	59°C		

XI. Analyse des résultats

XI.1. Canaux de lecture de fluorescence

SARS-CoV-2 RT-qPCR DETECTION Kit permet la détection des gènes ORF 1ab et N du SARS-CoV-2 et le gène RNase P humain (contrôle endogène). La Figure 1 montre un exemple de profil d'amplification de chacun des gènes cibles testés.

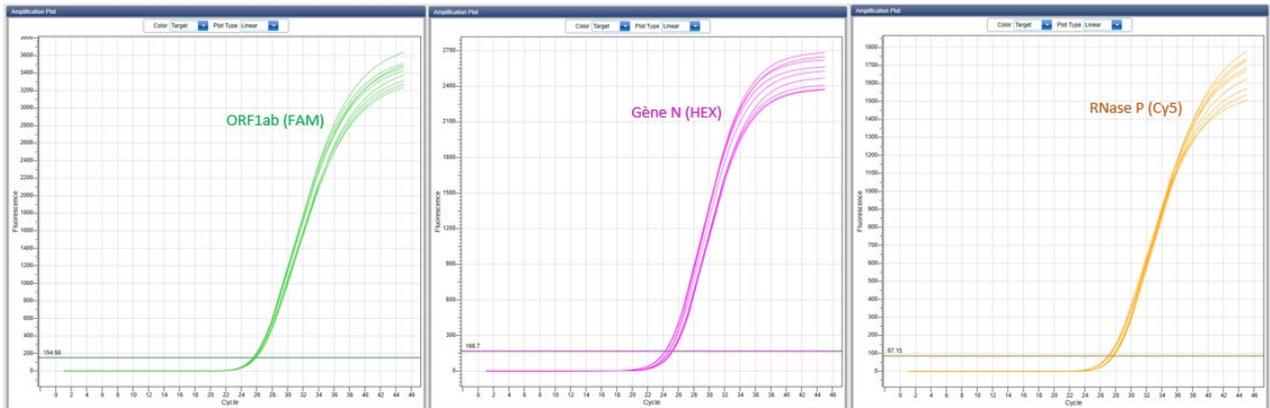


Figure 1: Profil d'amplification des gènes cibles testés par SARS-CoV-2 RT-qPCR DETECTION KIT (KSC2-AB69). La sonde du gène ORF 1ab émet dans le canal de lecture 494 nm "FAM". La sonde du gène N émet dans le canal de lecture 530 nm "HEX". La sonde du gène RNase P émet dans le canal de lecture 650 nm "CY5".

XI.2. Validation des contrôles RT-qPCR

Pour tous les patients analysés par SARS-CoV-2 DETECTION KIT, les courbes d'amplification des contrôles internes doivent être examinées soigneusement. La réaction de PCR est considérée validée lorsque les critères suivants sont respectés (Tableau 4).

Tableau 4: Critères de validation d'une série RT-qPCR

	Canal FAM (ORF1ab)	Canal HEX (Gène N)	Canal CY5 (RNase P)	Statut de l'analyse
Témoin positif	22 < Ct < 32	22 < Ct < 32	22 < Ct ≤ 35	PCR validée
Témoin négatif	Absence ou Ct > 40	Absence ou Ct > 40	22 < Ct ≤ 35	Extraction validée

XI.3. Interprétation des résultats

Chaque échantillon doit être analysé individuellement. L'absence d'inhibition pour chaque échantillon est vérifiée par la présence d'une courbe d'amplification dans le canal 650 nm (Cy5) qui correspond au contrôle endogène (gène de la RNase P). Les résultats type sont résumés sur la figure 2.

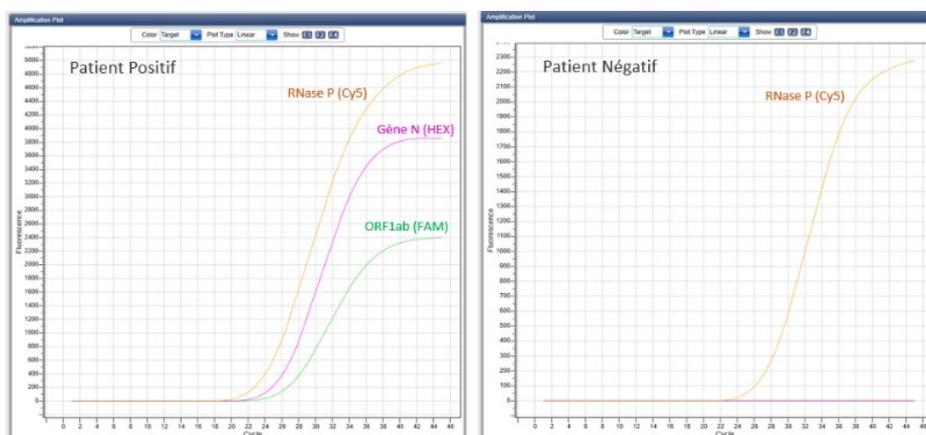


Figure 2: Exemple de résultats de RT-qPCR pour le diagnostic du SARS-CoV-2. Le résultat type d'un patient positif (à gauche) montre les courbes d'amplification correspondant aux gènes ORF1ab, N et RNaseP dans les canaux FAM, HEX et Cy5, respectivement. Le résultat type d'un patient négatif (à droite) montre une seule courbe d'amplification correspondant au gène RNaseP dans le canal Cy5.

Les valeurs seuil des Ct pour le SARS-CoV-2 DETECTION KIT sont fixées à 40 pour le gène ORF1ab, à 38,5 pour le gène N. Le biologiste doit examiner les courbes d'amplification de chaque cible du SARS-CoV-2 testée avant de rendre les résultats. Les valeurs Ct permettant l'interprétation des résultats sont indiquées dans le Tableau 5.

Tableau 5: Interprétation des résultats de RT-qPCR pour l'échantillon analysé.

ORF 1ab <i>Canal FAM</i>	Gène N <i>Canal HEX</i>	Contrôle endogène RNase P <i>Canal CY5</i>	Interprétation des résultats
Ct ≤ 40	Ct ≤ 38,5	Ct ≤ 35	Résultat positif
Ct > 40	Ct > 38,5	Ct ≤ 35	Résultat négatif
Ct ≤ 40	Ct ≥ 38,5	Ct ≤ 35	Résultat douteux
Ct > 40	Ct ≤ 38,5	Ct ≤ 35	Résultat douteux
Ct > 40	Ct > 40	Ct > 35	Indice d'échantillon dégradé ou de problème de prélèvement

Résultat positif

Lorsqu'un patient testé est positif pour le SARS-CoV-2, les courbes d'amplification apparaissent évidentes dans les canaux FAM avec un Ct ≤ 40 et HEX avec un Ct ≤ 38,5. La courbe d'amplification dans le canal Cy5 présente une valeur Ct ≤ 35.

Dans certains cas la fluorescence dans le canal Cy5 peut être absente alors que les deux courbes d'amplification dans les canaux FAM et HEX sont évidente. Le résultat est considéré positif.

Résultat négatif

Lorsqu'un patient est testé négatif pour le SARS-CoV-2, aucune courbe d'amplification dans les canaux FAM et HEX n'est détectée, ou présente des valeurs de Ct en FAM Ct > 40 et en HEX Ct > 38,5. La courbe d'amplification dans le canal Cy5 présente une valeur Ct ≤ 35.

Résultat douteux

Les résultats peuvent être considérés douteux lorsque le patient présente un des résultats suivants :

- 1-Seule une cible parmi celles recherchées est détectée (détection uniquement du gène ORF 1ab ou du gène N)
- 2-Lorsque la cible dans le canal FAM présente un Ct ≤ 40 et la cible dans le canal HEX présente un Ct ≥ 38,5
- 3-Lorsque la cible dans le canal FAM présente un Ct > 40 et la cible dans le canal HEX présente un Ct ≤ 38,5

Lorsque les résultats sont douteux, nous vous recommandons de refaire l'analyse et si les résultats restent identiques, le patient doit être considéré comme positif pour SARS-CoV-2.

Résultat invalide

Les résultats sont considérés invalides dans les situations suivantes :

- Aucune courbe d'amplification pour les gènes ORF1ab, N et RNase P (Absence de fluorescence de FAM, HEX et Cy5)
- Aucune courbe d'amplification pour les gènes ORF1ab et N (Absence de fluorescence de FAM et HEX) avec un Ct > 35 pour le gène RNase P (Cy5).

XII. Limites

- L'utilisation de SARS-CoV-2 DETECTION KIT est réservée au personnel dûment formé aux procédures et techniques de biologie moléculaire.
- Le non-respect des instructions mentionnées dans ce Manuel d'utilisation peut conduire à des résultats erronés.
- Les performances du SARS-CoV-2 DETECTION KIT ont été établies sur prélèvements salivaires et nasopharyngés dans un milieu de transport et de lyse MTL (MTL02-AB69). Les échantillons doivent être collectés, transportés et conservés selon les procédures et conditions appropriées. A défaut, la capacité du kit à détecter les séquences cibles d'intérêt peut être affectée.
- L'extraction et l'amplification des acides nucléiques doivent être réalisées en utilisant le matériel et les méthodes listées dans ce manuel d'utilisation. Pour tout autre matériel non cité dans ce manuel, nous recommandons d'évaluer son efficacité par une procédure de validation interne du laboratoire.

Des résultats faux négatifs peuvent provenir de :

- Non-respect des procédures de recueil des prélèvements
- Non-respect des conditions de transport ou de conservation des échantillons

- Présence d'inhibiteurs de PCR
- Utilisation de réactifs non autorisés ou périmés
- Utilisation de réactifs non conservés dans les conditions spécifiées dans le manuel d'utilisation
- Présence de nouvelles mutations dans le génome du virus SARS-CoV-2 non répertoriées à ce jour
- Non-respect des instructions d'utilisation du kit

Des résultats faux positifs peuvent provenir de :

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

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

XIII. Performances analytiques du SARS-CoV-2 DETECTION KIT

Les performances décrites ci-dessous ont été obtenues et validées avec les systèmes d'extraction chimique MTL (MTL02-AB69).

XIII.1. Spécificité des amorces et des sondes

XIII.1.1. Inclusivité

Les séquences des amorces et des sondes utilisées dans le SARS-CoV-2 DETECTION KIT sont celles publiées et recommandées par le CDC de Chine [1]. L'analyse *in silico* par BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) a montré une homologie de séquence de plus de 90% avec toutes les souches du nouveau Coronavirus impliquées dans le syndrome respiratoire aigu sévère (amorces sens, amorces antisens ou les sondes) y compris les nouveaux variants SARS-CoV-2 (20I/501Y.V1, 20H/501Y.V2 et 20J/501Y.V3). SARS-CoV-2 DETECTION KIT est capable de détecter toutes les souches et variants connus à ce jour du SARS-CoV-2.

XIII.1.2. Exclusivité /réaction croisée *in silico*

Les séquences des amorces et des sondes utilisées ne montrent aucune homologie avec d'autres souches virales (42 organismes dont des Coronavirus) ou bactériennes de la sphère ORL

XIII.1.3. Exclusivité / réaction croisée par RT-qPCR

L'analyse d'exclusivité et de réaction croisée des amorces et des sondes sur un large panel de souches virales et bactériennes ne montrent aucune homologie avec d'autres souches virales (dont des Coronavirus) ou bactériennes testées. Aucune réaction croisée avec des séquences de pathogènes autres que celles recherchées par SARS-CoV-2 DETECTION KIT n'a été observée.

XIII.2. Sensibilité analytique

XIII.2.1. Sensibilité analytique sur prélèvements nasopharyngés

Les limites de détection (LoD) pour chaque cible testée du SARS-CoV-2 par SARS COV-2 DETECTION KIT sur les prélèvements nasopharyngés sont fixées à :

- LoD pour le gène ORF1ab : 50 copies de génome / RT-qPCR
- LoD pour le gène N : 10 copies de génome / RT-qPCR

XIII.2.2 Sensibilité analytique sur prélèvements salivaires

Les limites de détection (LoD) pour chaque cible testée du SARS-CoV-2 par SARS COV-2 DETECTION KIT sur les prélèvements salivaires sont fixées à :

- LoD pour le gène ORF1ab : 100 copies de génome / RT-qPCR
- LoD pour le gène N : 50 copies de génome / RT-qPCR

XIII.3. Effets des substances interférentes

Aucun effet de substances interférentes (faux résultat ou effet d'inhibition de réaction de PCR) n'a été observé sur l'efficacité du SARS-CoV-2 DETECTION KIT (recherche des faux négatifs, faux positifs ou présence d'inhibition).

XIII.4. Performances cliniques du SARS-CoV-2 DETECTION KIT (Référence KSC2-AB69)

XIII.4.1. Performances cliniques sur les prélèvements nasopharyngés

L'évaluation clinique du SARS-CoV-2 DETECTION KIT (Appolon Bioteck Référence KSC2-AB69) a été réalisée avec des échantillons nasopharyngés de patients testés dans deux laboratoires français. Les résultats obtenus par SARS-CoV-2 DETECTION KIT (Appolon Bioteck Référence KSC2-AB69) ont été comparés avec ceux des deux laboratoires ainsi qu'avec les résultats obtenus avec un kit marqué CE IVD (Daan Gene / Appolon Bioteck, Référence DA0930) et référencé par l'ANSM.

L'étude s'est portée sur 104 prélèvements nasopharyngés positifs et 102 échantillons négatifs pour le SARS-CoV-2. Les échantillons cliniques obtenus ont été testés à l'aveugle pour générer les valeurs prédictives positive (VPP) et négative (VPN), la sensibilité et la spécificité du SARS-CoV-2 DETECTION KIT (Appolon Bioteck Référence KSC2-AB69).

La synthèse des résultats de performance clinique sur les prélèvements nasopharyngés est présentée dans le Tableau 6.

Tableau 6: Synthèse des résultats de performance clinique du SARS-CoV-2 DETECTION KIT (Appolon Bioteck Référence KSC2-AB69) sur prélèvements nasopharyngés

Appolon Bioteck KSC2-AB69 / Synthèse des résultats de l'étude clinique du SARS-CoV-2 DETECTION KIT sur prélèvements nasopharyngés									
Sensibilité	95% IC	Spécificité	95% IC	Précision	95% IC	Valeur Positive Prédictive VPP	95% IC	Valeur Prédictive Négative VPN	95% IC
100%	96,52% - 100%	100%	96,45% - 100%	100%	98,23% - 100%	100%	-	100%	-

XIII.4.2. Performances cliniques sur les prélèvements salivaires

L'évaluation clinique du SARS-CoV-2 DETECTION KIT (Appolon Bioteck Référence KSC2-AB69) a été réalisée avec des échantillons salivaires de patients provenant d'un laboratoire français. Les résultats obtenus par SARS-CoV-2 DETECTION KIT (Appolon Bioteck Référence KSC2-AB69) sur ces échantillons salivaires ont été comparés avec ceux obtenus par ce laboratoire sur les échantillons nasopharyngés prélevés sur ces mêmes patients ainsi qu'avec les résultats obtenus avec un Kit marqué CE IVD (Daan Gene, Référence DA0930).

L'étude s'est portée sur 53 prélèvements nasopharyngés testés positifs et 170 prélèvements nasopharyngés testés négatifs pour le SARS-CoV-2 avec le kit marqué CE IVD (Daan Gene, DA0930) et le laboratoire de référence.

Les résultats obtenus sur ces échantillons nasopharyngés de référence ont été comparés avec les résultats obtenus sur les prélèvements salivaires des mêmes patients avec le SARS-CoV-2 DETECTION KIT (Appolon Bioteck, KSC2-AB69).

Les échantillons salivaires cliniques obtenus ont été testés à l'aveugle pour générer les valeurs prédictives positive (VPP) et négative (VPN), la sensibilité et la spécificité du SARS-CoV-2 DETECTION KIT (Appolon Bioteck Référence KSC2-AB69).

La synthèse des résultats de performance clinique sur les prélèvements salivaires est présentée dans le Tableau 7: **Synthèse des résultats de performance clinique du SARS-CoV-2 DETECTION KIT (Appolon Bioteck Référence KSC2-AB69) sur prélèvements salivaires**

Tableau 7: Synthèse des résultats de performance clinique du SARS-CoV-2 DETECTION KIT (Appolon Biotech Référence KSC2-AB69) sur prélèvements salivaires

Appolon Biotech KSC2-AB69 / Synthèse des résultats de l'étude clinique du SARS-CoV-2 DETECTION KIT sur prélèvements salivaires									
Sensibilité	95% IC	Spécificité	95% IC	Précision	95% IC	Valeur Positive Prédictive VPP	95% IC	Valeur Prédictive Négative VPN	95% IC
100%	93,28% - 100%	99%	96,78% - 99,99%	100%	97,54% - 99,99%	99%	88,25% - 99,73%	100%	-

XIV. Résolution des problèmes

XIV.1. Problèmes d'amplification

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

XIV.2 Problème de contamination

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

XIV.3. Echantillons inhibés

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

XV. Bibliographie

[1] Na Zhu, Dingyu Zhang, M.D., Wenling Wang, Xingwang Li, M.D., et al. 2020: A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019 ; N ENGL J MED 382;8.

[2] Kim, J.M., Chung, Y.S., Jo, H.J., Lee, N.J., Kim, M.S., Woo, S.H., Park, S., Kim, J.W., Kim, H.M., and Han, M.G. (2020). Identification of Coronavirus Isolated from a Patient in Korea with COVID-19. Osong Public Health Res. Perspect. 11, 3–7.

[3] Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H.R., Zhu Y., Li B., Huang C.L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature. 2020;579:270–273.

[4] Dongwan Kim, Joo-Yeon Lee, Jeong-Sun Yang, Jun Won Kim, V. Narry Kim, and Hyeshik Chang The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. Cell. 2020 May 14; 181(4): 914–921.e10.

XVI. Symboles et logos utilisés

	Utilisation in vitro seulement		Ne pas réutiliser
	Date d'expiration		Lire les instructions avant utilisation
	Danger, se référer aux instruction annexe		Craint l'humidité
	Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé		A conserver à l'abri de la lumière
	Date de fabrication		Numéro de lot
	Fabricant		Risque biologique
	Le produit respecte les exigences européennes		



APPOLON
BIOTECK



205 rue des frères Lumière
69 970 CHAPONNAY
FRANCE
+33 (0)4 37 57 00 54
contact@appolonbioteck.com
www.appolonbioteck.fr