

Mode d'emploi

RealStar[®] SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

03/2020 FR

RealStar[®]

SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

Usage réservé à la recherche !

(RUO)



821005



384



03 2020



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

Sommaire

1.	Application.....	5
2.	Composants du kit.....	5
3.	Stockage	5
4.	Description du produit.....	7
4.1	Instruments de PCR en temps réel	8
5.	Procédure	8
5.1	Préparation du prélèvement.....	9
5.2	Préparation du Mastermix.....	10
5.3	Préparation de la réaction	12
6.	Programmation des instruments de PCR en temps réel.....	13
6.1	Paramètres.....	14
6.2	Marqueurs de fluorescence (fluorophores)	14
6.3	Profil de température et acquisition du fluorophore	15
7.	Analyse des données	15
7.1	Interprétation des résultats.....	16
7.1.1	Analyse qualitative	16
8.	Assistance technique	16
9.	Marques de commerce et clauses de non-responsabilité	17
10.	Explications des symboles	18

1. Application

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

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

2. Composants du kit

Couleur du bouchon	Composants	Nombre de tubes	Volume [μL/tube]
Bleu	Master A	8	240
Violet	Master B	8	720
Rouge	Positive Control*	2	250
Vert	Internal Control	4	1000
Blanc	Water (PCR grade)	2	500

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

Internal Control (IC) = Contrôle interne

Positive Control = Contrôle positif

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

3. Stockage

- Le kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 est livré sur de la neige carbonique. Les composants du kit doivent arriver congelés. Si un ou plusieurs composants ne sont pas congelés à 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 (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.

4. Description du produit

Le kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 est un système de réactifs basé sur la technologie de PCR en temps réel pour la détection et la différenciation qualitatives de l'ARN spécifique au lignée B-beta-coronavirus (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).

Les sondes spécifiques de l'ARN de B-βCoV (gène E cible) sont marquées par le fluorophore FAM™, tandis que les sondes spécifique de l'ARN de SARS-CoV-2 (gène S cible) sont marquées par le fluorophore Cy5. La sonde spécifique du contrôle interne est marquée par 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 réalisés dans un même tube réactionnel :

- La transcription inverse de l'ARN cible en ADNc
- L'amplification par PCR de l'ADNc cible et contrôle interne
- La détection simultanée des amplicons de PCR par des sondes marquées par un fluorophore

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

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

Internal Control (IC) = Contrôle interne

Positive Control = Contrôle positif

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

Les réactifs du Master A et du Master B contiennent tous les composants nécessaires (tampon PCR, transcriptase inverse, ADN Polymérase, sel de magnésium, amorces et sondes) afin de réaliser la transcription inverse, l'amplification par PCR et la détection de la cible ARN spécifique de B-βCoV (gène E cible), de la cible ARN spécifique de SARS-CoV-2 (gène S cible) ainsi que du contrôle interne en une seule étape de réaction.

4.1 Instruments de PCR en temps réel

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

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 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™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

REMARQUE



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

5. Procédure

5.1 Préparation du prélèvement

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

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

- AltoStar® Automation System AM16 (altona Diagnostics)
- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

D'autres kits ou systèmes d'extraction des acides nucléiques peuvent être appropriés.

Si la préparation des échantillons s'effectue sur une colonne comportant des tampons de lavage à l'éthanol, une étape de centrifugation supplémentaire de 10 minutes à environ 17 000 x g (~ 13 000 tr/min), dans un nouveau tube à essai, est vivement recommandée avant l'élution des acides nucléiques.

ATTENTION



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

ATTENTION



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

Pour toute information complémentaire ou assistance technique sur le prétraitement et la préparation des échantillons, merci de contacter notre support technique (voir chapitre 8. Assistance technique).

5.2 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 ou le système utilisé pour l'extraction des acides nucléiques, le contrôle interne **ne doit jamais** être ajouté directement à l'échantillon. Le contrôle interne doit toujours être ajouté au mélange échantillon/tampon de lyse. Le volume du contrôle interne à ajouter dépend toujours et uniquement du volume d'élution, dont il représente 10 %. Par exemple si les acides nucléiques doivent être élués dans 60 µL de tampon d'élution ou d'eau, 6 µL de contrôle interne par échantillon doivent être ajoutés au mélange échantillon/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

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

ATTENTION

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

5.3 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 run.
- ▶ Homogénéiser avec soin les échantillons et les contrôles avec le Master Mix par pipetage.
- ▶ Couvrir la plaque 96 puits avec un film adhésif transparent approprié et les tubes réactionnels à l'aide de bouchons appropriés.
- ▶ 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).

6. 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 8. Assistance technique).

6.1 Paramètres

- Définir les paramètres suivants :

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

6.2 Marqueurs de fluorescence (fluorophores)

- Définir les marqueurs de fluorescence (fluorophores) :

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

6.3 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

7. 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 8. Assistance technique).

7.1 Interprétation des résultats

7.1.1 Analyse qualitative

Canal de détection			Interprétation des résultats
FAM™	Cy5	JOE™	
+	+	+*	ARN spécifique au B-βCoV (gène E cible) et au SARS-CoV-2 (gène S cible) détecté.
+ [†]	-	+*	ARN spécifique au B-βCoV (gène E cible) détecté.
-	+ [†]	+*	ARN spécifique au SARS-CoV-2 (gène S cible) détecté.
-	-	+	ARN spécifique au B-βCoV (gène E cible) ou au SARS-CoV-2 (gène S cible) non détecté. L'échantillon ne contient pas de quantités détectables d'ARN spécifique au B-βCoV (gène E cible) ou au SARS-CoV-2 (gène S cible).
-	-	-	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 du contrôle interne dans le canal de détection JOE™ n'est pas requise pour des résultats positifs dans le canal de détection FAM™ ou Cy5. De fortes charges en ARN spécifique de B-βCoV (gène E cible) et/ou de SARS-CoV-2 (gène S cible) dans l'échantillon peuvent conduire à des signaux absents ou très faibles pour le contrôle interne.

[†] Les sensibilités des systèmes de détection des cibles B-βCoV (FAM™) et SARS-CoV-2 (Cy5) étant légèrement différentes, des échantillons faiblement positifs peuvent, dans de rares cas, présenter un signal dans le canal FAM™ et non dans le canal Cy5, ou vice versa.

8. 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**

9. 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) ; SmartCycler® (Cepheid) ; Maxwell® (Promega) ; Mx 3005P™ (Stratagene) ; NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux) ; Rotor-Gene®, QIAamp®, MinElute®, QIASymphony® (QIAGEN) ; VERSANT® (Siemens Healthcare).

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

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

© 2020 altona Diagnostics GmbH; tous droits réservés.

10. Explications des symboles

Symbole	Explication
	Usage réservé à la recherche
	Code du lot
	Couleur du capuchon
	Numéro de catalogue
	Contenu
	Numéro
	Composant
	Consultez le mode d'emploi
	Contenu suffisant pour « n » tests/réactions (rxns)
	Limites de température
	Date de péremption
	Fabricant
	Attention
	Note
	Version

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