

## **Mode d'emploi**

**RealStar<sup>®</sup>**

**MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0**

01/2017 FR

# RealStar®

## MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0

Pour utilisation avec

m2000rt (Abbott Diagnostics)

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)

VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)

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™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



391012

48

01 2017

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

## Sommaire

<b>1. Usage prévu</b>	<b>6</b>
<b>2. Composants du kit</b>	<b>6</b>
<b>3. Conservation</b>	<b>6</b>
<b>4. Matériel requis non fourni</b>	<b>7</b>
<b>5. Informations générales</b>	<b>8</b>
<b>6. Description du produit</b>	<b>9</b>
6.1 Instruments de PCR en temps réel	12
<b>7. Mises en garde et précautions</b>	<b>12</b>
<b>8. Mode d'emploi</b>	<b>14</b>
8.1 Préparation du prélèvement	14
8.2 Préparation du Mastermix	15
8.3 Préparation de la réaction	17
<b>9. Programmation des instruments de PCR en temps réel</b>	<b>18</b>
9.1 Paramètres	18
9.2 Marqueurs de fluorescence (fluorophores)	18
9.3 Profil de température et acquisition du fluorophore	19
<b>10. Analyse des données</b>	<b>20</b>
10.1 Validation des tests de diagnostic	20
10.1.1 Validité des tests de diagnostic	20
10.1.2 Invalidité des tests de diagnostic	20
10.2 Interprétation des résultats	21
10.2.1 Analyse qualitative	21

<b>11. Evaluation des performances</b>	<b>22</b>
11.1 Sensibilité analytique	22
11.2 Spécificité analytique	24
11.3 Précision	24
11.4 Evaluation en diagnostic	26
<b>12. Limites</b>	<b>27</b>
<b>13. Contrôle qualité</b>	<b>28</b>
<b>14. Assistance technique</b>	<b>28</b>
<b>15. Bibliographie</b>	<b>29</b>
<b>16. Marques déposées et responsabilité</b>	<b>30</b>
<b>17. Explications des symboles</b>	<b>30</b>

## 1. Usage prévu

Le kit RealStar® MERS-CoV 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 du coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient.

## 2. Composants du kit

Couleur du bouchon	Composants	Nombre de tubes	Volume [ $\mu$ L/tube]
Bleu	Master A Target <i>orf1a</i>	4	60
Violet	Master B Target <i>orf1a</i>	4	120
Bleu	Master A Target <i>upE</i>	4	60
Violet	Master B Target <i>upE</i>	4	120
Rouge	Positive Control	1	250
Vert	Internal Control	1	1000
Blanc	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control = Contrôle interne

Positive Control = Contrôle positif

Water PCR grade = Eau ultra-pure pour biologie moléculaire

## 3. Conservation

- Le kit RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 est expédié sous glace 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  $-25^{\circ}\text{C}$  et  $-15^{\circ}\text{C}$  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  $+2^{\circ}\text{C}$  et  $+8^{\circ}\text{C}$  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. Matériel requis non fourni

- Instrument adapté à la PCR en temps réel (Chapitre 6.1 Instruments de PCR en temps réel)
- Système ou kit approprié à l'extraction des acides nucléiques
- 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 talqués (jetables)

### NOTE



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



**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

En 2012, le *Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient*, MERS-CoV, (anciennement nommé : le Coronavirus humain Centre Médical Erasmus, HCoV-EMC), a été identifié pour la première fois comme étant la cause de maladie grave chez l'homme [1, 2]. La détection du virus est réalisée de préférence à partir d'échantillons des voies respiratoires inférieures. Des échantillons des voies respiratoires supérieurs (écouvillons) ont montré des taux de détection du virus inférieurs [3]. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande l'utilisation de deux PCR indépendantes pour la confirmation des cas MERS-CoV [4].

Des nombreux tests de RT-PCR en temps réel ont été publiés. Deux tests, un ciblant une région en amont du gène E (upE) et l'autre ciblant le cadre de lecture ouvert 1a (orf1a), ont montré une meilleure sensibilité [5,6]. Le RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 a été développé en se basant sur ces deux tests précédemment décrits.

- [1] Bermingham A, Chand MA, Brown CS, Aarons E, Tong C, Langrish C, et al. Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus, in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 2012. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* 2012;17:20290.
- [2] Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* 2012;367:1814–20.
- [3] Guery B, Poissy J, el Mansouf L, Séjourné C, Ettahar N, Lemaire X, et al. Clinical features and viral diagnosis of two cases of infection with Middle East Respiratory Syndrome coronavirus: a report of nosocomial transmission. *Lancet* 2013;381:2265–72.
- [4] WHO. Laboratory Testing for Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus 2013:[http://www.who.int/csr/disease/coronavirus\\_infections/MERS\\_Lab\\_recos\\_16\\_Sept\\_2013.pdf](http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/MERS_Lab_recos_16_Sept_2013.pdf).
- [5] Corman VM, Müller MA, Costabel U, Timm J, Binger T, Meyer B, et al. Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* 2012;17.

- [6] Corman VM, Eckerle I, Bleicker T, Zaki A, Landt O, Eschbach-Bludau M, et al. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* 2012;17.

### NOTE



***En raison de l'évolution moléculaire relativement rapide des virus à ARN, il y a un risque inhérent, pour tous les systèmes basés sur la RT-PCR en temps réel, d'accumulation de mutations au cours du temps qui pourraient conduire à des résultats faussement négatifs.***

## 6. Description du produit

Le RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 est un test de diagnostic *in vitro*, basé sur la technologie PCR en temps réel, pour la détection de l'ARN spécifique du coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV).

Le kit RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 consiste en 2 tests indépendant, l'un ciblant la région en amont du gène E (upE) et autre ciblant la cadre de lecture ouvert 1a (orf1a) du génome du MERS-CoV. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) recommande l'utilisation de 2 tests de PCR indépendants pour la confirmation de cas atteints de MERS-CoV [5].

Les 2 tests comprennent un système d'amplification hétérologue (contrôle interne, internal control) 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).

Dans les 2 tests, les sondes spécifiques de l'ARN du MERS-CoV sont marquées par le fluorophore FAM™. La sonde spécifique du contrôle interne est marquée par le fluorophore JOE™.

L'utilisation de sondes associées à des fluorophores différents permet la détection en parallèle de l'ARN spécifique du MERS-CoV et du contrôle interne dans les canaux correspondants de l'instrument de PCR en temps réel.

Les oligonucléotides de ces deux essais ont été précédemment publiés par Victor Corman et al. 2012 a [6] et 2012 b [7]. L'un des essais de RT-PCR cible *orf1a* (Master A au couvercle bleu, Master B correspondant au couvercle violet) alors que l'autre essai cible une région en amont du gène E (*upE*) ((Master A au couvercle bleu, Master B correspondant au couvercle violet).

Selon l'OMS, les cas doivent être confirmés en laboratoire par deux résultats de RT-PCR positifs portant sur deux cibles indépendantes (<http://www.who.int>). La réalisation en parallèle de l'essai ciblant *orf2a* et de l'essai ciblant *upE*, tous deux inclus dans le kit RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0, sur le même échantillon satisfait donc les exigences de l'OMS pour la confirmation de cas de MERS-CoV en laboratoire.

En raison de l'assemblage moléculaire et de l'évolution possible du MERS-CoV, il existe un risque lié à l'accumulation de mutations au cours du temps, pouvant entraîner des faux négatifs avec le système de RT-PCR. Le fait de cibler deux régions indépendantes du génome réduit considérablement ce risque. Dans le cas où seul un des deux essais de ce kit donne un résultat positif, l'échantillon doit être testé à nouveau. **De plus, tout échantillon positif doit être envoyé au laboratoire national de référence pour la réalisation d'un test de confirmation.**

Néanmoins, dans le cas où les souches en circulation évoluent et accumulent des mutations, une mise à jour des couples d'amorces / sonde peut s'avérer nécessaire.

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'ADN, et du contrôle interne
- la détection simultanée des amplicons de PCR par des sondes marquées par un fluorophore

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

- Deux Masters (Master A et Master B)
- Quatre Masters
  - (Master A et Master B cible *orf1a*)
  - (Master A et Master B cible *upE*)
- Un contrôle interne
- Un contrôle positif
- De l'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 spécifique de la cible (ARN spécifique du MERS-CoV et du contrôle interne) en une seule étape de réaction.

## 6.1 Instruments de PCR en temps réel

Le kit RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 a été développé et validé pour être utilisé avec les instruments de PCR en temps réel suivants:

- m2000rt (Abbott Diagnostics)
- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- 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™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

## 7. Mises en garde et précautions

*Lire attentivement le manuel d'utilisation avant d'utiliser le produit.*

- Avant toute utilisation, veuillez vérifier que le produit et ses composants:
  - Ne sont pas endommagés,
  - Sont complets : nombre, type et volume (voir le chapitre 2. Composants du kit)
  - Sont correctement étiquetés,
  - Sont congelés à la réception
- L'utilisation de ce produit est limitée au personnel qualifié et formé aux techniques de PCR en temps réel et aux procédures de diagnostic *in vitro*.
- Manipuler les échantillons comme s'ils étaient infectieux et/ou dangereux, en accord avec les procédures de sécurité en vigueur dans le laboratoire.

- Porter des gants jetables non talqués, une blouse de laboratoire et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons.
- Éviter les contaminations microbiennes et nucléaires (par ADNase/ARNase) de l'échantillon et des composants du kit.
- Toujours utiliser des pipettes à cônes jetables avec filtre, non contaminées par de l'ADNase et de l'ARNase.
- Toujours porter des gants de protection non talqués lors de la manipulation des composants du kit.
- Utiliser des zones de travail séparées les unes des autres pour les différentes activités de (i) préparation des échantillons, (ii) préparation de la réaction et (iii) les étapes d'amplification/détection. Le sens de travail dans le laboratoire doit être unidirectionnel. Porter des gants dans chaque zone de travail et les changer avant d'entrer dans une zone différente.
- Dédier des fournitures et du matériel pour chaque zone de travail et ne pas les déplacer d'une zone à une autre.
- Conserver le matériel positif et/ou potentiellement positif séparément des autres composants du kit.
- Ne pas ouvrir les tubes/plaques de réaction après l'amplification afin d'éviter toute contamination par les amplicons.
- Des témoins additionnels peuvent devoir être testés selon les directives des organisations locales/gouvernementales ou des organismes d'accréditation.
- Ne pas autoclaver des tubes réactionnels après une PCR, car ceci ne dégrade pas les acides nucléiques amplifiés et risque de contaminer le laboratoire.
- Ne pas utiliser les composants au-delà de leur date de péremption.
- Éliminer les échantillons et les déchets de l'essai conformément aux règles de sécurité locales.

## 8. Mode d'emploi

### 8.1 Préparation du prélèvement

L'ARN extrait constitue le matériel de départ pour le kit RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0.

La qualité de l'ARN extrait a un impact significatif sur la performance de l'ensemble du test. Il est important de s'assurer que le système d'extraction des acides nucléiques utilisé est compatible avec la technologie de PCR en temps réel. Les kits et systèmes suivants sont compatibles pour l'extraction des acides nucléiques:

- 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. L'aptitude de la procédure d'extraction des acides nucléiques à utiliser avec RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 doit être validé par l'utilisateur.

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 17000 x g (~ 13000 tr/min), dans un nouveau tube à essai, est vivement recommandée avant l'élution des acides nucléiques.

#### ATTENTION



**L'éthanol est un fort inhibiteur de la PCR en temps réel. 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'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 (Chapitre 14. Assistance technique).

### 8.2 Préparation du Mastermix

Tous les réactifs doivent être complètement décongelés, homogénéisés (par pipetage ou léger vortexage) et brièvement centrifugés avant utilisation.

Le kit RealStar® MERS-CoV 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 Mastermix doit être préparé comme décrit par le schéma de pipetage ci-dessous:

Nombre de réactions (rxns)	1	12
Master A ( <i>orf1a</i> or <i>upE</i> )	5 µL	60 µL
Master B ( <i>orf1a</i> or <i>upE</i> )	10 µL	120 µL
Internal Control (contrôle interne)	1 µL	12 µL
<b>Volume de Mastermix</b>	<b>16 µL</b>	<b>192 µL</b>



- ▶ 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.
- ▶ Quelque 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 Mastermix doit être préparé selon le schéma de pipetage suivant:

Nombre de réactions (rxns)	1	12
Master A ( <i>orf1a</i> or <i>upE</i> )	5 µL	60 µL
Master B ( <i>orf1a</i> or <i>upE</i> )	10 µL	120 µL
<b>Volume de Mastermix</b>	<b>15 µL</b>	<b>180 µL</b>

**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.*



*Ne jamais ajouter le contrôle interne directement à l'échantillon.*

**8.3 Préparation de la réaction**

- ▶ Pipeter 15 µL de Mastermix dans chacun des puits nécessaires de la plaque 96 puits ou d'un tube à essai permettant les réactions optiques.
- ▶ Ajouter 10 µL de l'échantillon (éluat issu de l'extraction des acides nucléiques) ou 10 µL des contrôles (contrôles positifs ou négatifs).

Préparation de la réaction	
Mastermix	15 µL
Echantillon ou contrôle	10 µL
<b>Volume total</b>	<b>25 µL</b>

- ▶ S'assurer qu' au moins un contrôle positif et un contrôle négatif sont utilisés par essai.
- ▶ Homogénéiser avec soin les échantillons et les contrôles avec le Mastermix 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 1000 x g (~ 3000 tr/min).

## 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® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 avec un instrument de PCR en temps réel spécifique, merci de contacter notre support technique (Chapitre 14. Assistance technique).

### 9.1 Paramètres

- Définir les paramètres suivants:

Paramètres	
Volume de réaction	25 µL
Vitesse de la rampe	par défaut
Référence passive	Aucun

### 9.2 Marqueurs de fluorescence (fluorophores)

- Définir les marqueurs de fluorescence (fluorophores):

Cible	Nom du marqueur	Fluorophore (Reporter)	Désactivateur (Quencher)
ARN spécifique du MERS-CoV ( <i>orf1a</i> )	<i>orf1a</i>	FAM™	(aucun)
ARN spécifique du MERS-CoV ( <i>upE</i> )	<i>upE</i>	FAM™	(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:

	Étape	Nombre 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	58	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® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 sur différents instruments de PCR en temps réel, merci de contacter notre support technique (Chapitre 14. Assistance technique).

### 10.1 Validation des tests de diagnostic

#### 10.1.1 Validité des tests de diagnostic

Un test de diagnostic est **valide**, si les valeurs suivantes des contrôles sont obtenues:

Nom du Contrôle	Canal de détection			
	FAM™ <i>upE</i>	JOE™ <i>upE</i>	FAM™ <i>orf1a</i>	JOE™ <i>orf1a</i>
Contrôle positif	+	+/-*	+	+/-*
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 Invalidité des tests de diagnostic

Un test de diagnostic est **invalide**, (i) si l'essai n'est pas complet ou (ii) si l'ensemble des conditions de contrôle pour un test de diagnostics valide n'est pas obtenu.

En cas d'**invalidité** du test de diagnostic, répéter le test avec les acides nucléiques purifiés restants ou recommencer depuis l'échantillon de départ.

## 10.2 Interprétation des résultats

### 10.2.1 Analyse qualitative

Canal de détection				Interprétation des résultats
FAM™ <i>upE</i>	JOE™ <i>upE</i>	FAM™ <i>orf1a</i>	JOE™ <i>orf1a</i>	
+	+*	+	+*	ARN spécifique du MERS-CoV <i>upE</i> et <i>orf1a</i> détecté. Envoyer des échantillons positifs au laboratoire national de référence pour des tests de confirmation.
+	+*	-	+	ARN spécifique de MERS-CoV <i>upE</i> détecté. Aucun ARN spécifique de MERS-CoV <i>orf1a</i> détecté. Répéter le test. Envoyer un échantillon au laboratoire national de référence pour les tests de confirmation.
-	+	+	+*	ARN spécifique du MERS-CoV <i>upE</i> détecté. Aucun ARN spécifique de MERS-CoV <i>orf1a</i> détecté. Répéter le test. Envoyer un échantillon au laboratoire national de référence pour les tests de confirmation.
-	+	-	+	Ni ARN spécifique de MERS-CoV <i>upE</i> ni MERS-CoV <i>orf1a</i> détecté. L'échantillon ne contient pas de quantités détectables d'ARN spécifique de MERS-CoV.
-	-	-	-	Inhibition de la RT-PCR ou défaillance des réactifs. Répéter le test à partir de l'échantillon d'origine ou bien prélever et tester 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™. De fortes charges en ARN spécifique du MERS-CoV dans l'échantillon peuvent conduire à des signaux absents ou très faibles pour le contrôle interne.

## 11. Evaluation des performances

L'évaluation de la performance de RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 a été réalisée en collaboration avec les experts en coronavirus du groupe du Prof. Dr. Christian Drosten (Département de Virologie, Centre Médical de l'Université de Bonn, Bonn, Allemagne). Des échantillons de patients d'un cas importé à Munich, en Allemagne, et de l'ARN de MERS-CoV extraits de culture cellulaire ont été utilisés comme matériel positif caractérisé. Des transcrits *in vitro* spécifiques de concentration connue ont été utilisés pour des buts quantitatifs. On a utilisé des transcrits *in vitro* spécifiques de MERS-CoV *upE* et *orf1a*.

### 11.1 Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du kit RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 est définie comme étant la concentration (copies par  $\mu\text{L}$  d'éluat) de molécules d'ARN spécifique de *upE* ou *orf1a* pouvant être détectées avec un taux de positivité à 95%. La sensibilité analytique a été déterminée en analysant des séries de dilution en transcrits *in vitro* de concentration connue spécifiques du MERS-CoV *upE* et *orf1a*.

Tableau 1: Résultats de **RT-PCR** utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique concernant la détection de l'ARN spécifique du *orf1a*

[C] initiale [copies/ $\mu\text{L}$ ]	Nombre de répétitions	Nombre de Positifs	Taux de réussite [%]
10,000	13	13	100
3,162	13	13	100
1,000	13	12	92
0,316	13	7	54
0,100	13	1	8
0,032	13	1	8
0,010	13	0	0
0,003	13	0	0

Tableau 2: Résultats de **RT-PCR** utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique concernant la détection de l'ARN spécifique du *upE*

[C] initiale [copies/ $\mu\text{L}$ ]	Nombre de répétitions	Nombre de Positifs	Taux de réussite [%]
10,000	13	13	100
3,162	13	13	100
1,000	13	13	100
0,316	13	6	46
0,100	13	3	23
0,032	13	0	0
0,010	13	0	0
0,003	13	0	0

La sensibilité analytique du kit RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 a été déterminée par analyse Probit.

- Pour la détection de l'ARN spécifique du *orf1a*, la sensibilité analytique est de 0,93 copies/ $\mu\text{L}$  [Intervalle de confiance à 95% (CI) : 0,70-1,41 copies/ $\mu\text{L}$ ]
- Pour la détection de l'ARN spécifique du *upE*, la sensibilité analytique est de 0,54 copies/ $\mu\text{L}$  [Intervalle de confiance à 95% (CI) : 0,40-0,97 copies/ $\mu\text{L}$ ]

## 11.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du kit RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 est assurée par une sélection minutieuse des oligonucléotides (amorces et sondes). Les séquences de ces derniers ont été comparées aux séquences publiques disponibles afin de s'assurer que toutes les souches intéressantes du MERS-CoV seront détectées.

Le kit RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 n'a présenté aucune réaction croisée avec l'un des pathogènes spécifiés ci-dessous:

- Coronavirus NL63
- Coronavirus OC43
- Coronavirus humain 229E
- Coronavirus HKU-1
- Virus Influenza A de souche H3N2
- Virus Influenza A de souche H1N1
- Virus Influenza B
- Entérovirus 71
- Rhinovirus 16
- Virus Parainfluenza humain de type 1
- Virus Parainfluenza humain de type 2
- Virus Parainfluenza humain de type 3
- Virus Parainfluenza humain de type 4 a/b
- Virus respiratoire syncytial A
- Virus respiratoire syncytial B
- Métapneumovirus humain types A
- Métapneumovirus humain types B

## 11.3 Précision

Les données de précision du kit RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 ont été déterminées comme étant la variabilité intra-essai (variabilité au sein d'une expérience), la variabilité inter-essai (variabilité entre différentes expériences) et la variabilité inter-lot (variabilité entre différents lots de production). La variabilité totale a été calculée en combinant les trois analyses.

Les données de variabilité sont exprimées en termes de valeur moyenne, écart type et de coefficient de variation, sur la base des valeurs de cycle seuil ( $C_t$ ). Pour déterminer la variabilité intra-essai, la variabilité inter-essai et la variabilité inter-lot, au moins six réplicats par échantillon ont été analysés.

Tableau 3: Données de précision pour l'ARN spécifique du *orf1a* et *upE*

<i>orf1a</i> et <i>upE</i>		Valeurs $C_t$ moyennes	Ecart type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	<i>orf1a</i>	28,96	0,08	0,29
	<i>upE</i>	29,35	0,08	0,28
Variabilité inter-essai	<i>orf1a</i>	28,69	0,31	1,08
	<i>upE</i>	29,43	0,12	0,40
Variabilité inter-lot	<i>orf1a</i>	28,49	0,14	0,49
	<i>upE</i>	29,14	0,39	1,34
Variabilité totale	<i>orf1a</i>	28,71	0,18	0,62
	<i>upE</i>	29,31	0,19	0,67

Tableau 4: Données de précision pour le contrôle interne

Contrôle interne	Valeurs $C_t$ moyennes	Ecart type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	29,39	0,160	0,56
Variabilité inter-essai	29,80	0,558	1,87
Variabilité inter-lot	29,72	0,632	2,13
Variabilité totale	29,64	0,450	1,52

## 11.4 Evaluation en diagnostic

Les sensibilités et spécificités du kit RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 a été effectuée à l'institut de Virologie, Centre médical de l'Université de Bonn, Bonn, Allemagne.

Dix-neuf échantillons différents d'un patient ont été analysés avec une technique *in-house* spécifique de *upE* et *orf1a* et avec le kit RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 également spécifique de *upE* et *orf1a*. Parmi ceux-ci, 8 ont été testés positifs avec l'essai *in-house* et avec le kit RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0; 7 ont montré des résultats négatifs avec l'essai *in-house* ainsi qu'avec le RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0; 4 a montré un résultat discordant (3 échantillons n'étaient positifs qu'avec RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 et 1 était positif seulement avec l'essai *in-house*). Les résultats discordants ont tous été générés avec des échantillons avec une charge virale très faible indiquée par une valeur élevée de  $C_t$ , représentant plutôt une variation statistique à la limite de détection qu'une différence de sensibilité réelle.

Tableau 5: Les échantillons de patients testés avec RT-PCR spécifique à MERS-CoV et RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0

Sample	Jour après début	<i>in-house</i> ( <i>upE</i> ) <sup>1</sup>	RealStar® MERS-CoV ( <i>upE</i> ) <sup>1</sup>	RealStar® MERS-CoV ( <i>orf1a</i> ) <sup>1</sup>
Tube d'aspiration, rincé avec du PBS	16	40,00	40,00	37,74
Tube d'aspiration, filtre	16	35,80	35,00	36,17
BAL	12	34,06	31,82	32,44
BAL	12	34,96	32,67	33,16
BAL	14	35,99	34,60	34,82
BAL	13	-	-	-
Exsudat, bouche <sup>2</sup>	16	-	36,60	-
Exsudat, bouche	16	-	-	-

Sample	Jour après début	<i>in-house</i> ( <i>upE</i> ) <sup>1</sup>	RealStar® MERS-CoV ( <i>upE</i> ) <sup>1</sup>	RealStar® MERS-CoV ( <i>orf1a</i> ) <sup>1</sup>
Exsudat, bouche	16	-	-	-
Exsudat, nez <sup>3</sup>	16	38,38	-	-
Exsudat, nez <sup>2</sup>	16	-	40,00	40,00
Exsudat, bouche	16	-	-	-
Stool	12	38,98	31,69	31,78
Stool	12	39,37	40,00	-
Stool	16	40,00	40,00	-
Urine <sup>2</sup>	12	-	40,00	37,86
Urine (cathéter)	12	-	-	-
Urine (cathéter)	13	-	-	-
Cathéter veineux central, tube rincé	12	-	-	-

<sup>1</sup> Les numéros dans les colonnes indiquent les  $C_t$  respectifs de RT-PCR positives en temps réel

<sup>2</sup> Résultat positif seulement avec l'essai commercial

<sup>3</sup> Résultat positif seulement avec un essai interne (*in-house*)

## 12. Limites

- Une stricte conformité aux instructions d'utilisation est nécessaire afin d'obtenir les meilleurs résultats.
- L'utilisation de ces produits est limitée au personnel compétent et formé aux techniques de PCR en temps réel et aux procédures de diagnostic *in vitro*.
- Le respect des bonnes pratiques de laboratoire est essentiel pour garantir le bon fonctionnement de ce test. Une attention particulière doit être apportée à la préparation des échantillons afin de préserver la pureté des composants du

kit. Tous les réactifs doivent faire l'objet d'une surveillance étroite afin d'éviter des impuretés et des contaminations. Tout réactif suspect doit être éliminé.

- Il est nécessaire de respecter les procédures de prélèvement, de transport, de conservation et de traitement des échantillons afin d'assurer les performances optimales du test.
- Ce test n'est pas destiné à être utilisé directement sur l'échantillon. Des méthodes appropriées d'extraction des acides nucléiques doivent être employées avant son utilisation.
- La présence d'inhibiteurs de RT-PCR (p.ex. héparine) est susceptible d'entraîner des résultats faussement négatifs ou erronés.
- De potentielles mutations dans les zones cibles du génome du virus couvertes par l'amorce et/ou les sondes du test peuvent empêcher la détection de pathogènes.
- Le RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 est un test de diagnostic. En conséquence, ses résultats doivent être interprétés en prenant en considération l'ensemble des symptômes cliniques et des résultats obtenus en laboratoire.

### 13. Contrôle qualité

Conformément au système de management de la qualité d'Altona Diagnostics GmbH, certifié ISO EN 13485, chaque lot du RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 est testé selon des spécifications prédéfinies afin de garantir une qualité constante des produits.

### 14. Assistance technique

Pour obtenir une assistance sur nos produits, merci de contacter notre support technique:

**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. 10th Edition. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Third Edition. Mosby, 2010.

### 16. Marques déposées et responsabilité

RealStar® (Altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIA Symphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

Les noms et marques déposés cités dans ce document, même si non mentionnés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

















Le kit RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 est un kit de diagnostic *in vitro*, marqué CE conformément à la Directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs de diagnostic *in vitro*.

Produits non homologués pour la vente par Santé Canada et n'ayant pas fait l'objet d'une notification (510(k)) ou d'une approbation (PMA) de pré-commercialisation par la FDA.

Produit distribué dans certains pays uniquement.

© 2017 Altona Diagnostics GmbH; tous droits réservés.

## 17. Explications des symboles

	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Numéro de lot
	Couleur du bouchon
	Référence produit
	Contenu
	Nombre
	Composant
	Code article international
	Lire les instructions d'utilisation
	Contient la quantité suffisante pour réaliser "n" tests (rxns)
	Limites de température
	À utiliser avant
	Fabricant
	Attention
	Note
	Version

## Notes:



**always a drop ahead.**

altona Diagnostics GmbH  
Mörkenstr. 12  
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0  
fax +49 40 548 0676 10  
e-mail [info@altona-diagnostics.com](mailto:info@altona-diagnostics.com)

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

