

Mode d'emploi

FlexStar[®]

**SARS-CoV-2 Type & FLU
RT-PCR Detection Mix 1.5**

02/2022 FR

Respiratory

FlexStar®

SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5

Pour utilisation avec

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

CFX96™ Dx System (Bio-Rad)

CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)



FS0021515



384



02 2022



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

Sommaire

1.	À propos du présent mode d'emploi.....	6
2.	Usage prévu.....	6
3.	Contenu du produit.....	7
4.	Stockage.....	8
5.	Informations contextuelles.....	9
6.	Description du produit.....	10
6.1	Composants.....	11
6.2	Instruments PCR en temps réel.....	12
6.3	Types d'échantillon.....	12
7.	Matériel nécessaire mais non fourni.....	13
8.	Mises en garde, précautions et limites.....	14
9.	Procédure.....	16
9.1	Prélèvement, manipulation et stockage de l'échantillon.....	16
9.2	Préparation de l'échantillon.....	17
9.3	Configuration du master mix.....	19
9.4	Configuration des réactions.....	20
10.	Programmation de l'instrument PCR en temps réel.....	21
10.1	Paramètres.....	22
10.2	Détecteurs de fluorescence (colorants).....	22
10.3	Profil de température et acquisition de coloration.....	23
11.	Analyse des données.....	23
11.1	Validité des test runs de diagnostic.....	24
11.1.1	Test run de diagnostic valide.....	24

11.1.2	Test run de diagnostic non valide	24
11.2	Interprétation des résultats	24
11.2.1	Analyse qualitative.....	25
12.	Évaluation de la performance	26
12.1	Écouvillons respiratoires.....	26
12.1.1	Sensibilité analytique.....	26
12.1.2	Spécificité analytique.....	30
12.1.2.1	Échantillons négatifs	31
12.1.2.2	Substances interférentes.....	31
12.1.2.3	Réactivité croisée	32
12.1.3	Inclusivité.....	33
12.1.4	Précision.....	36
12.1.5	Taux global de défaillance	38
12.1.6	Contamination croisée.....	39
12.1.7	Performances cliniques	39
13.	Élimination.....	42
14.	Contrôle qualité.....	42
15.	Assistance technique	43
16.	Bibliographie	43
17.	Marques de commerce et clauses de non-responsabilité	44
18.	Explication des symboles	45
19.	Historique de révision	47

1. À propos du présent mode d'emploi

Tout au long de ce manuel d'utilisation les termes ATTENTION et REMARQUE ont les significations suivantes :

ATTENTION



Attire l'attention sur des instructions de fonctionnement ou procédures qui, si elles ne sont pas correctement respectées, peuvent engendrer des blessures corporelles ou nuire au bon fonctionnement du produit. Contactez l'assistance technique d'Altona Diagnostics pour obtenir de l'aide.

REMARQUE



Les informations fournies à l'utilisateur sont utiles mais non essentielles à la tâche à accomplir.

Lisez attentivement le mode d'emploi avant d'utiliser le produit.

2. Usage prévu

Le FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 est un test de diagnostic *in vitro* basé sur la technologie PCR en temps réel, pour la détection qualitative et la différenciation de l'ARN spécifique au coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2) et au virus de la grippe dans les échantillons d'écouillons respiratoires humains. La détection du SARS-CoV-2 est basée sur la détection en parallèle du gène E du bêtacoronavirus de lignée B (y compris le SARS-CoV-2) et du gène S du SARS-CoV-2.

Le FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 est conçu pour une utilisation destinée au diagnostic de l'infection par le SARS-CoV-2 et par virus de la grippe.

Les résultats obtenus avec le FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 doivent être interprétés en tenant compte des autres constatations cliniques et résultats de laboratoire.

Le FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 est destiné à être utilisé par des opérateurs professionnels formés aux techniques propres à la biologie moléculaire et aux procédures de diagnostic *in vitro*.

3. Contenu du produit

Le FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 comprend les composants suivants :

Tableau 1: Composants du kit

Couleur du capuchon	Composant	Nombre de tubes	Volume nominal [µl/tube]
Bleu	Detection Mix ¹⁾	8	240
Rouge	PC ²⁾	2	250
Blanc	NTC ³⁾	2	250

¹⁾ Contient du matériel biologique d'origine animale

²⁾ Positive Control (contrôle positif) [ARN spécifique au lignée B-βCoV (gène E), au SARS-CoV-2 (gène S) et au virus de la grippe]

³⁾ No Template Control (contrôle négatif)

ATTENTION



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

4. Stockage

- Le FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 est livré sur de la neige carbonique. Les composants du produit doivent arriver congelés. Si un ou plusieurs composants ne sont pas congelés à leur réception ou si des tubes ont été abîmés pendant le transport, contactez l'assistance technique d'Altona Diagnostics pour obtenir de l'aide (voir le chapitre 15. Assistance technique).
- Tous les composants doivent être stockés entre -25 °C et -15 °C après réception.
- Les décongelations et congélations répétées du Detection Mix doivent être évitées, car cela peut affecter les performances du produit.
- Les décongelations et congélations répétées du Positive Control (contrôle positif, PC) et du No Template Control (contrôle négatif, NTC) (plus de 4 fois) doivent être évitées, car cela pourrait affecter les performances du produit.
- Le stockage à la température ambiante (+30 °C au maximum) ne doit pas excéder une période de 2 heures.
- Protégez le Detection Mix de la lumière.

ATTENTION



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

ATTENTION



Ne dépassez pas les séquences de décongelation-congélation et les manipulations indiquées dans le présent mode d'emploi. Cela pourrait compromettre les performances du produit.

ATTENTION



N'utilisez pas de produits dont la date d'expiration est dépassée. L'utilisation de produits périmés pourrait compromettre leurs performances.

5. Informations contextuelles

SARS-CoV-2

Le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2) est un virus à ARN simple brin à polarité positive appartenant à la famille des *Coronaviridae*, genre betacoronavirus, sous-genre lignée B.

Le SARS-CoV-2 est apparu dans la région de Wuhan en Chine en décembre 2019 et s'est répandu dans le monde entier en deux mois. D'abord appelé 2019-nCoV (nouveau coronavirus), le virus a été officiellement renommé SARS-CoV-2 par le « Comité international de taxonomie des virus » le 11 février 2020. Dans le même temps, l'OMS a donné à la maladie, causée par le SARS-CoV-2, le nom de COVID-19. Compte tenu de l'escalade et de la propagation rapides de la COVID-19 dans le monde entier, l'OMS a qualifié l'épidémie de pandémie le 12 mars 2020.

Le SARS-CoV-2 est très contagieux et se transmet par le biais d'aérosols et de gouttelettes. Il provoque des infections respiratoires aiguës dont les symptômes ressemblent à ceux de la grippe. Principalement, mais pas exclusivement, chez les personnes âgées et les personnes ayant une maladie préexistante, l'infection par le SARS-CoV-2 peut entraîner une maladie grave et potentiellement mortelle. Des cas d'infection asymptomatique, de maladie légère, de maladie grave et de décès ont été signalés [1,2].

Virus de la grippe

L'influenza, aussi appelée couramment grippe, est une maladie infectieuse provoquée par la famille *Orthomyxoviridae* de virus à ARN (virus de l'influenza) [3,4]. Les virus de la grippe sont caractérisés par le changement continu des antigènes de surface majeurs, l'hémagglutinine (H) et la neuraminidase (N) (variation des antigènes) [5]. Ils infectent les oiseaux et les mammifères par l'intermédiaire d'une transmission par aérosol [6]. Le virus de la grippe A et celui de la grippe B entraînent des infections graves, en particulier des voies respiratoires, et les signes cliniques les plus courants sont la fièvre et la toux. Dans les cas les plus graves, la grippe provoque une pneumonie pouvant entraîner un décès notamment chez les enfants et les personnes âgées [7].

REMARQUE



Compte tenu de l'évolution moléculaire relativement rapide des virus à ARN, n'importe quel système de test RT-PCR court un risque inhérent de résultats faussement négatifs imputables à une accumulation progressive de mutations.

6. Description du produit

Le FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 est un test de diagnostic *in vitro*. Utilisé en association avec le FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5, il permet la détection qualitative et la différenciation de l'ARN spécifique au bêta coronavirus de lignée B (lignée B-βCoV, gène E), au SARS-CoV-2 (gène S) et au virus de la grippe (A+B) dans les échantillons d'écouvillons respiratoires humains.

Le FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 s'appuie sur la technologie RT-PCR en temps réel, en utilisant la réaction de transcriptase inverse (RT) pour convertir l'ARN en ADN complémentaire (ADNc), la réaction en chaîne par polymérase (PCR) pour l'amplification de séquences cibles spécifiques au lignée B-βCoV (gène E), au SARS-CoV-2 (gène S) et à la grippe (A+B) et des sondes cibles spécifiques marquées par fluorescence pour la détection de l'ADNc amplifié.

Outre les systèmes d'amplification et de détection spécifique à l'ARN spécifique à la lignée B-βCoV, le SARS-CoV-2 et au virus de la grippe, le FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 comprend des oligonucléotides pour l'amplification et la détection de l'internal control [AltoStar® Internal Control 1.5 (contrôle interne)]. L'IC est ajouté automatiquement au début de la procédure de purification des acides nucléiques sur l'AltoStar® Automation System AM16 (appelé dans le présent document sous la forme abrégée AltoStar® AM16). Pour en savoir plus, consulter le mode d'emploi AltoStar® Internal Control 1.5 (contrôle interne).

Les sondes spécifiques à l'ARN du lignée B-βCoV (gène E) sont marquées avec le fluorophore ROX™, les sondes spécifiques à l'ARN du SARS-CoV-2 (gène S) sont marquées avec le fluorophore Cy5 et les sondes spécifiques à l'ARN au virus de la grippe (A+B) sont marquées avec le fluorophore FAM™, respectivement. La sonde spécifique à l'IC est marquée avec le fluorophore JOE™.

L'utilisation de sondes reliées à des colorations identifiables permet une détection parallèle des virus lignée B-βCoV (gène E), SARS-CoV-2 (gène S), au virus de la grippe (A+B) et de l'IC des canaux de détection correspondant dans l'instrument PCR en temps réel utilisé.

6.1 Composants

Le FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 contient suffisamment de réactifs pour effectuer 384 réactions. Le produit se compose des composants suivants :

- Detection Mix¹⁾
- PC²⁾
- NTC³⁾

¹⁾ Contient du matériel biologique d'origine animale

²⁾ Positive Control (contrôle positif) [ARN spécifique au lignée B-βCoV (gène E), au SARS-CoV-2 (gène S) et au virus de la grippe]

³⁾ No Template Control (contrôle négatif)

À l'exception de l'ADN-polymérase et de la transcriptase inverse qui sont inclus dans le FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5, le Detection Mix contient tous les réactifs (tampon PCR, sel de magnésium, amorces et sondes) pour permettre la détection et la différenciation du lignée B-βCoV (gène E) et du SARS-CoV-2 (gène S) et la détection de l'ARN spécifique au virus de la grippe (A+B) ainsi que de l'ARN spécifique à l'IC.

Le PC contient de l'ARN spécifique au lignée B-βCoV (gène E) et au SARS-CoV-2 (gène S) ainsi qu'au virus de la grippe. Il est utilisé pour vérifier les fonctions des systèmes d'amplification et de détection spécifiques à la lignée B-βCoV, au SARS-CoV-2 et au virus de la grippe.

Le NTC ne contient ni l'ARN spécifique au lignée B-βCoV, ni au SARS-CoV-2 ni au virus de la grippe (A+B) mais contient la matrice de l'IC. Le NTC est utilisé comme contrôle négatif pour la PCR en temps réel spécifique du lignée B-βCoV (gène E), du SARS-CoV-2 (gène S) et du virus de la grippe (A+B) et il indique une contamination possible du composant de Detection Mix.

6.2 Instruments PCR en temps réel

Le FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 a été développé et validé pour être utilisé avec les instruments PCR en temps réel suivants :

- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)

REMARQUE



Vérifiez que tous les instruments utilisés ont été installés, étalonnés, contrôlés et entretenus conformément aux instructions et aux recommandations du fabricant.

6.3 Types d'échantillon

L'utilisation du FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 a été validée avec le type d'échantillon suivant :

- Échantillon d'écouvillon respiratoire humain

ATTENTION



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

7. Matériel nécessaire mais non fourni

Les instruments et les consommables supplémentaires suivants sont nécessaires pour l'utilisation du FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 mais ne sont pas fournis avec ce produit :

- Instrument PCR en temps réel (voir chapitre 6.2 Instruments PCR en temps réel)
- Système ou kit approprié d'extraction de l'acide nucléique (voir le chapitre 9.2 Préparation de l'échantillon)
- Agitateur vortex
- Centrifugeuse (p. ex. centrifugeuse de bureau) pour la centrifugation des réactifs du kit
- Centrifugeuse pour la centrifugation des PCR plates (plaques PCR)
- Plaques de réaction à 96 puits appropriée ou tubes de réaction avec un matériel de fermeture correspondant (optique)
- Pipettes (réglables)
- Cônes de pipette avec filtres (jetables)
- Gants non poudrés (jetables)

Réactifs requis mais non inclus dans le FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 :

- FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5 (N° de commande FS0011515)
- AltoStar® Internal Control 1.5 (N° de commande IC15-16/IC15-46)

8. Mises en garde, précautions et limites

- Avant la première utilisation, vérifiez que le produit et ses composants sont complets quant au nombre, au type et au remplissage. N'utilisez pas un produit défectueux ou incomplet, ses performances pourraient être compromises.
- De mauvaises conditions de stockage pourraient compromettre les performances du produit.
- Ne dépassez pas les séquences de décongélation-congélation et les manipulations indiquées dans le présent mode d'emploi. Cela pourrait compromettre les performances du produit.
- N'utilisez pas de produits dont la date d'expiration est dépassée. L'utilisation de produits périmés pourrait compromettre leurs performances.
- N'utilisez pas d'autres types d'échantillons ! L'utilisation d'autres types d'échantillons pourrait compromettre les performances du produit.
- Une manipulation incorrecte des composants du produit et des échantillons peut entraîner une contamination et compromettre les performances du produit :
 - N'intervertissez pas les capuchons des bouteilles et des flacons.
 - Conservez le matériel positif et/ou potentiellement positif à l'écart des composants du kit.
 - Utilisez des zones de travail distinctes pour les activités de préparation de l'échantillon/de configuration des réactions et d'amplification/de détection.
 - Jetez toujours vos gants après avoir manipulé du matériel positif et/ou potentiellement positif.
 - N'ouvrez pas les tubes ou PCR plates (plaques PCR) après amplification.
- Ne mélangez pas les composants provenant de différents lots du FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 car cela pourrait compromettre les performances du produit.
- Considérez systématiquement les échantillons comme étant des matériaux infectieux et présentant un danger (biologique) conformément aux procédures de sécurité de votre laboratoire. En cas de déversement d'échantillon, utilisez rapidement un désinfectant adapté. Manipulez les matériaux contaminés comme présentant un danger biologique.
- La présence d'inhibiteurs de PCR peut donner des résultats faussement négatifs ou non valides.

- L'élimination des déchets dangereux et biologiques doit être conforme aux réglementations locales et nationales afin d'éviter toute contamination de l'environnement.
- Un stockage inapproprié des éluats peut entraîner une dégradation des séquences cibles du lignée B-βCoV (gène E), du SARS-CoV-2 (gène S) et/ou du virus de la grippe et pourrait compromettre les performances du produit.
- L'absence de centrifugation des composants du produit après la décongélation peut entraîner leur contamination par des résidus de réactifs dans les couvercles et pourrait compromettre les performances du produit.
- Ne dépassez pas la durée de stockage du mélange PCR, car cela pourrait compromettre la performance du produit.
- Comme pour tout test de diagnostic, les résultats doivent être interprétés en tenant compte des autres constatations cliniques et résultats de laboratoire.
- Si l'échantillon contient d'autres pathogènes que le lignée B-βCoV (gène E), le SARS-CoV-2 (gène S) et/ou le virus de la grippe, il peut y avoir compétition avec l'amplification de la cible ou des réactions croisées, donnant ainsi des résultats d'examen DIV incorrects
- Les mutations potentielles dans les régions cibles du génome lignée B-βCoV (gène E), du génome SARS-CoV-2 (gène S) et/ou du génome virus de la grippe couvertes par amorces et/ou les sondes utilisées dans le kit peuvent empêcher de détecter la présence du pathogène.

9. Procédure

ATTENTION

Une manipulation incorrecte des composants du produit et des échantillons peut entraîner une contamination et compromettre les performances du produit :

- N'intervertissez pas les capuchons des bouteilles et des flacons.
- Conservez le matériel positif et/ou potentiellement positif à l'écart des composants du kit.
- Utilisez des zones de travail distinctes pour les activités de préparation de l'échantillon/de configuration des réactions et d'amplification/de détection.
- Jetez toujours vos gants après avoir manipulé du matériel positif et/ou potentiellement positif.
- N'ouvrez pas les tubes ou PCR plates (plaques PCR) après amplification.



ATTENTION

Ne mélangez pas les composants provenant de différents lots de FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 car cela pourrait compromettre les performances du produit.



9.1 Prélèvement, manipulation et stockage de l'échantillon

Pour le prélèvement d'échantillons, il convient d'utiliser des écouvillons à pointe en fibre de dacron ou polyester disponibles dans le commerce présentant une tige en plastique. Les écouvillons secs doivent être remis en suspension dans un milieu de transport universel (par exemple, l'UTM® de Copan). Les écouvillons d'alginate de calcium, les écouvillons présentant des tiges en bois et/ou des embouts en coton, ainsi que les écouvillons recueillis dans le gel d'agar ne doivent pas être utilisés. Le transport doit être effectué conformément aux instructions locales et nationales en vigueur concernant le transport de matériel biologique.

Avant leur utilisation, les écouvillons respiratoires remis en suspension dans un UTM® ne doit pas être conservés plus de 48 heures à température ambiante (entre +20 °C et 25 °C), 5 jours entre +2 °C et +8 °C ou 2 mois entre -25 °C et -15 °C.

ATTENTION



Considérez systématiquement les échantillons comme étant des matériaux infectieux et présentant un danger (biologique) conformément aux procédures de sécurité de votre laboratoire. En cas de déversement d'échantillon, utilisez rapidement un désinfectant adapté. Manipulez les matériaux contaminés comme présentant un danger biologique.

REMARQUE



Le stockage des échantillons par congélation n'altère pas les performances du kit. Si vous travaillez avec des échantillons congelés, vérifiez que les échantillons sont complètement décongelés et correctement mélangés avant d'être utilisés.

REMARQUE



N'utilisez pas d'écouvillons d'alginate de calcium, car cela pourrait entraîner des résultats incorrects ou non valides en raison de l'inhibition de la PCR.

REMARQUE



N'utilisez pas d'écouvillons présentant des tiges en bois et/ou des embouts en coton ou des écouvillons recueillis dans du gel d'Agar comme milieu de transport, car les résidus de bois, de coton et/ou d'Agar peuvent interférer avec le transfert d'échantillon sur l'AltoStar® AM16 et les échantillons ne seront pas traités.

9.2 Préparation de l'échantillon

L'ARN extrait est le matériau de départ pour le FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5. La qualité de l'ARN extrait a un impact considérable sur les performances du produit.

Le FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 a été validé à l'aide d'échantillons d'écouvillons respiratoires humains en utilisant l'AltoStar® AM16 en combinaison avec le kit AltoStar® Purification Kit 1.5

Une fois l'extraction de l'acide nucléique avec l'instrument AltoStar® AM16 terminée, les éluats présents dans l'eluante plate (plaque d'éluat) non scellée restent stables à température ambiante (max. +30 °C) sur une période allant jusqu'à 4 heures.

Les éluats présents dans une eluante plate (plaque d'éluat) scellée peuvent être stockés entre +2 °C et +8 °C pendant 24 heures maximum avant le démarrage d'une configuration des réactions. Pour des informations détaillées concernant l'étanchéité des eluantes plates (plaques d'éluat), consulter le mode d'emploi du kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

D'autres systèmes et kits d'extraction des acides nucléiques pourraient également convenir. Cependant, la compatibilité de la procédure d'extraction des acides nucléiques avec le FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 doit être validée par l'utilisateur.

ATTENTION



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

ATTENTION



Considérez systématiquement les échantillons comme étant des matériaux infectieux et présentant un danger (biologique) conformément aux procédures de sécurité de votre laboratoire. En cas de déversement d'échantillon, utilisez rapidement un désinfectant adapté. Manipulez les matériaux contaminés comme présentant un danger biologique.

ATTENTION



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

ATTENTION



L'élimination des déchets dangereux et biologiques doit être conforme aux réglementations locales et nationales afin d'éviter toute contamination de l'environnement.

ATTENTION



Un stockage inapproprié des éluats peut entraîner une dégradation des séquences cibles du lignée B-βCoV (gène E), du SARS-CoV-2 (gène S) et/ou du virus de la grippe et pourrait compromettre les performances du produit.

Pour des informations complémentaires et une assistance technique concernant le prétraitement et la préparation de l'échantillon, contacter l'assistance technique d'Altona Diagnostics (voir le chapitre 15. Assistance technique).

9.3 Configuration du master mix

Tous les réactifs et les échantillons doivent être complètement décongelés, mélangés (par pipetage ou agitation douce) et centrifugés brièvement avant utilisation.

Le FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 est configuré pour une utilisation avec le FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5 et l'AltoStar® Internal Control 1.5 (contrôle interne), qui permet le contrôle de la procédure de préparation de l'échantillon (extraction de l'acide nucléique) et de l'analyse RT-PCR ultérieure.

- ▶ L'IC est ajouté automatiquement au début de la procédure de purification des acides nucléiques sur l'AltoStar® AM16.
- ▶ Lorsque d'autres méthodes d'extraction de l'acide nucléique sont utilisées, l'IC doit être ajouté pendant l'étape de lyse, soit manuellement ou automatiquement par l'instrument respectif.
- ▶ Indépendamment de la méthode/du système utilisé pour l'extraction de l'acide nucléique, ne jamais ajouter l'IC directement à l'échantillon. L'IC doit toujours être ajouté au mélange échantillon/lysis buffer (tampon de lyse). Le volume d'IC à ajouter dépend toujours et uniquement du volume d'éluat. Il représente 50 % du volume d'éluat. Par exemple, si l'acide nucléique doit être élué dans 60 µl d'élution buffer (tampon d'éluat) ou d'eau, 30 µl d'IC par échantillon doivent être ajoutés au mélange échantillon/lysis buffer (tampon de lyse).

- ▶ Préparez le master mix selon le schéma de pipetage suivant :

Tableau 2: Schéma de pipetage (configuration du master mix)

Nombre de réactions (rxns)	1	12
Detection Mix	5 µl	60 µl
Amplification Mix	15 µl	180 µl
Volume de master mix	20 µl	240 µl

ATTENTION



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

9.4 Configuration des réactions

- ▶ Pipetez 20 µl du master mix dans chaque puits requis d'une plaque de réaction optique à 96 puits appropriée ou d'un tube de réaction optique approprié.
- ▶ Ajoutez 10 µl de l'échantillon (éluat d'extraction de l'acide nucléique) ou 10 µl des contrôles (PC ou NTC).

Tableau 3: Schéma de pipetage (configuration des réactions)

Configuration des réactions	
Master mix	20 µl
Échantillon ou contrôle	10 µl
Volume total	30 µl

- ▶ Assurez-vous qu'au moins 1 PC et 1 NTC sont utilisés par run.
- ▶ Mélangez soigneusement les échantillons et les contrôles avec le master mix en pipetant de haut en bas.

- ▶ Fermez la plaque de réaction à 96 puits avec des capuchons appropriés ou un film adhésif optique et les tubes de réaction avec des capuchons appropriés.
- ▶ Centrifugez le plateau de réaction à 96 puits dans une centrifugeuse équipée d'un rotor pour microplaques et les tubes de réaction dans une centrifugeuse appropriée pendant 30 secondes à environ 1 000 x g (~ 3 000 tr/min).
- ▶ Le NTC contient déjà la matrice de l'IC avec la bonne concentration.

À la fin de la configuration du mélange PCR, le mélange RT-PCR présent dans la PCR plate (plaque PCR) scellée reste stable à température ambiante (max. +30 °C) pendant 30 minutes.

ATTENTION



Ne dépassez pas la durée de stockage du mélange PCR, car cela pourrait compromettre la performance du produit.

10. Programmation de l'instrument PCR en temps réel

Pour obtenir des informations de base concernant la configuration et la programmation des différents instruments PCR en temps réel, veuillez consulter le mode d'emploi de l'instrument concerné.

Pour obtenir des instructions de programmation détaillées concernant l'utilisation du FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 sur des instruments PCR en temps réel spécifiques, veuillez contacter notre assistance technique (voir le chapitre 15. Assistance technique).

10.1 Paramètres

- Définissez les paramètres suivants :

Tableau 4: Paramètres de run

Paramètres	
Volumes de réaction	30 µl
Taux de rampe	Par défaut
Référence passive	Aucun

10.2 Détecteurs de fluorescence (colorants)

- Définir les marqueurs de fluorescence (colorants) :

Tableau 5: Détecteurs de fluorescence

Cible	Nom du détecteur	Rapporteur	Extincteur
ARN spécifique à la lignée B-βCoV	E gene	ROX™	(Aucun)
ARN spécifique au SARS-CoV-2	S gene	Cy5	(Aucun)
ARN spécifique au virus de la grippe (A+B)	Flu	FAM™	(Aucun)
Internal Control (contrôle interne)	IC	JOE™	(Aucun)

10.3 Profil de température et acquisition de coloration

- Définissez le profil de température et l'acquisition de la coloration :

Tableau 6: Profil de température et acquisition de coloration

	Étape	Répétitions de cycles	Acquisition	Température [°C]	Durée [min:sec]
Transcription inverse	Maintien	1	-	52	05:00
Dénaturation	Maintien	1	-	95	00:05
Amplification	Cyclage	45	-	95	00:05
			Yes (Oui)	58	00:25

11. Analyse des données

Pour obtenir des informations de base concernant l'analyse des données sur des instruments PCR en temps réel, veuillez consulter le mode d'emploi de l'instrument concerné.

Pour obtenir des instructions détaillées concernant l'analyse des données générées avec le FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 sur différents instruments PCR en temps réel, veuillez contacter notre assistance technique (voir le chapitre 15. Assistance technique).

11.1 Validité des test runs de diagnostic

11.1.1 Test run de diagnostic valide

Un test run de diagnostic est **valide** si les conditions de contrôle suivantes sont satisfaites :

Tableau 7: Conditions de contrôle pour un test run valide

ID du contrôle	Canal de détection			
	ROX™	Cy5	FAM™	JOE™
Positive Control (contrôle positif) [lignée B-βCoV (gène E), SARS-CoV-2 (gène S) et virus de la grippe]	+	+	+	Sans objet
Negative control (contrôle négatif)	-	-	-	+

11.1.2 Test run de diagnostic non valide

Un test run de diagnostic est **non valide**, (i) si le run n'est pas terminé (ii) si une quelconque condition de contrôle pour un test run de diagnostic **valide** n'est pas respectée.

Si un test run de diagnostic est **non valide**, veuillez l'effectuer de nouveau en utilisant les acides nucléiques purifiées restantes ou recommencez avec les échantillons d'origine.

11.2 Interprétation des résultats

ATTENTION



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

11.2.1 Analyse qualitative

Tableau 8: Interprétation des résultats

Canal de détection				Interprétation des résultats
ROX™ (gène E)	Cy5 (gène S)	FAM™ [Grippe (A+B)]	JOE™ (IC)	
+	+	-	+/-*	ARN spécifique à la lignée B-βCoV et au SARS-CoV-2 détectée.
+	-	-	+/-*	Seule l'ARN spécifique à la lignée B-βCoV a été détectée.**
-	+	-	+/-*	Seule l'ARN spécifique au SARS-CoV-2 a été détectée.**
-	-	+	+/-*	Seule l'ARN au virus de la grippe (A et/ou B) a été détectée.
+	-	+	+/-*	ARN spécifique à la lignée B-βCoV et au virus de la grippe (A et/ou B) détectée.
-	+	+	+/-*	ARN spécifique au SARS-CoV-2 et au virus de la grippe (A et/ou B) détectée.
+	+	+	+/-*	ARN spécifique à la lignée B-βCoV, au SARS-CoV-2 et au virus de la grippe (A et/ou B) détectée.
-	-	-	+	Aucune ARN spécifique à la lignée B-βCoV, au SARS-CoV-2 ou au virus de la grippe (A et/ou B) n'a été détectée. L'échantillon ne contient pas de quantités détectables d'ARN spécifique à la lignée B-βCoV, au SARS-CoV-2 ou du virus de la grippe.
-	-	-	-	Inhibition de la RT-PCR ou défaillance des réactifs. Répétez les tests à partir de l'échantillon de départ ou prélevez et testez un nouvel échantillon.

* La détection de l'IC dans le canal de détection JOE™ n'est pas requise pour des résultats positifs dans le canal de détection ROX™ et/ou dans le canal de détection Cy5 et/ou dans le canal de détection FAM™. Une charge élevée d'ARN spécifique à la lignée B-βCoV (gène E cible) et/ou au SARS-CoV-2 (gène S cible) et/ou à la grippe (A+B) peut entraîner une réduction ou une absence des signaux de l'IC.

**La détection dans un seul des deux canaux de détection respectifs pour lignée B-βCoV (gène E) et SARS-CoV-2 (gène S) pourrait être due à une faible concentration d'ARN virale proche de la limite de détection ou à la mutation d'une des deux séquences cibles.

12. Évaluation de la performance

La performance du FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 a été réalisée à l'aide de la norme internationale de l'OMS « 1st WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA (NIBSC code: 20/146) », du matériel du virus de la grippe A (grippe A H3N2 souche Wisconsin/67/05) et du matériel du virus de la grippe B (souche Florida/04/06), disponibles dans le commerce.

12.1 Écouvillons respiratoires

12.1.1 Sensibilité analytique

Pour déterminer la limite de détection (LoD), une série de dilutions de la norme internationale de l'OMS « 1st WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA », du matériel du virus de la grippe A (grippe A H3N2 souche Wisconsin/67/05) et du matériel du virus de la grippe B (souche Florida/04/06), disponibles dans le commerce, dilués dans un milieu de transport universel (UTM®, Copan) contenant une matrice nasale simulée [5 % p/v de mucine, 5 % v/v de sang, 0,8 % v/v de NaCl (95 % de solution saline) et 0,00002 % p/v ADN génomique humain (510k Submission for BD MAX™ MRSA XT assay ; numéro d'accès : K133605)] a été réalisée.

Une série de dilutions de la norme internationale de l'OMS « 1st WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA », allant de 1,00E+04 UI/ml à 5,00E-01 UI/ml, a été testée. Pour le virus de la grippe A et celui de la grippe B, une série de dilutions allant de 2,00E+03 copies/ml à 1,00E+01 copies/ml a été testée.

Chaque dilution a été testée en 8 réplicats sur 3 runs différents (total n = 24 par dilution) à l'aide de combinaisons de :

- 3 lots de FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5
- 3 lots de FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5

- 3 lots de kit AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 lots de AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 instruments AltoStar® AM16
- 3 instruments CFX96™ DW Dx

Pour chaque virus, les données de tous les runs ont été combinées et une analyse probit a été réalisée pour déterminer la valeur de la LoD à 95 %.

Tableau 9: Résultats de PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique du FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 pour SARS-CoV-2 (gène S)

Concentration [UI/ml]	N [total]	N [positif]	Taux de réussite [%]
1,00E+04	24	24	100
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	24	100
1,00E+02	24	24	100
3,16E+01	24	10	42
1,00E+01	24	4	17
3,16E+00	24	5	21
1,00E+00	24	1	4
5,00E-01	24	1	4

La LoD du FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 pour la détection du SARS-CoV-2 (gène S) dans l'UTM® est 201 UI/ml (intervalle de confiance à 95 % : 107-501 UI/ml).

Tableau 10: Résultats de PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique du FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 pour SARS-CoV-2 (gène E)

Concentration [UI/ml]	N [total]	N [positif]	Taux de réussite [%]
1,00E+04	24	24	100
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	24	100
1,00E+02	24	23	96
3,16E+01	24	10	42
1,00E+01	24	4	17
3,16E+00	24	2	8
1,00E+00	24	1	4
5,00E-01	24	1	4

La LoD du FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 pour la détection du SARS-CoV-2 (gène E) dans l'UTM® est 226 UI/ml (intervalle de confiance à 95 % : 124-545 UI/ml).

Tableau 11: Résultats de PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique du FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 pour le virus de la grippe A

Concentration [copies/ml]	N [total]	N [positif]	Taux de réussite [%]
2,00E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
7,50E+02	24	24	100
5,00E+02	24	23	96
2,50E+02	24	22	92
1,00E+02	24	17	71
5,00E+01	24	9	38
2,50E+01	24	6	25
1,00E+01	24	1	4

La LoD du FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 pour la détection du virus de la grippe A dans l'UTM® est 341 copies/ml (intervalle de confiance à 95 % : 230-611 copies/ml).

Tableau 12: Résultats de PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique du FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 pour le virus de la grippe B

Concentration [copies/ml]	N [total]	N [positif]	Taux de réussite [%]
2,00E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
7,50E+02	24	24	100
5,00E+02	24	24	100
2,50E+02	24	19	79
1,00E+02	24	3	13
5,00E+01	24	6	25
2,50E+01	24	5	21
1,00E+01	24	1	4

La LoD du FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 pour la détection du virus de la grippe B dans l'UTM® est 432 copies/ml (intervalle de confiance à 95 % : 286-780 copies/ml).

12.1.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 est assurée par la sélection minutieuse des oligonucléotides (amorces et sondes). Les oligonucléotides ont été vérifiés par analyse comparative de séquences par rapport à des séquences librement accessibles au public pour s'assurer que tous les géotypes pertinents du SARS-CoV-2 et du virus de la grippe seraient détectés.

Pour la vérification de la spécificité analytique du FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5, les expériences suivantes ont été réalisées (voir les chapitres 12.1.2.1 Échantillons négatifs à 12.1.2.3 Réactivité croisée).

12.1.2.1 Échantillons négatifs

30 échantillons d'écouvillons respiratoires négatifs au SARS-CoV-2, au virus de la grippe A et au virus de la grippe B provenant de donneurs individuels ont été testés avec le FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5. Tous les échantillons (30 sur 30) ont été testés négatifs pour l'ARN spécifique au SARS CoV-2, au virus de la grippe A et au virus de la grippe B et positifs pour l'IC. La spécificité analytique du FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 pour les échantillons d'écouvillons respiratoires est $\geq 95\%$.

12.1.2.2 Substances interférentes

Pour évaluer l'influence des substances endogènes et exogènes susceptibles de perturber les performances du FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5, des substances choisies ont été ajoutées dans un UTM® contenant le SARS-CoV-2, le virus de la grippe A et le virus de la grippe B à une concentration finale de 3 x LoD (6,03E+02 UI/ml, 1,02E+03 copies/ml et 1,29E+03 copies/ml, respectivement) et dans un UTM® ne contenant pas le SARS-CoV-2, le virus de la grippe A et le virus de la grippe B.

Les résultats obtenus pour les échantillons contenant des substances potentiellement interférentes ont été comparés aux résultats obtenus pour l'UTM® ne contenant aucune substance interférente ajoutée. Chaque échantillon a été traité en 3 réplicats.

Aucune interférence n'a été observée pour les échantillons contenant des niveaux élevés de :

- Substances endogènes
 - ADN génomique humain
 - Sang total humain
 - Mucine
- Substances exogènes
 - Spray nasal antiallergique (contenant du dipropionate de béclo méthasone)

- Spray nasal décongestionnant (contenant du chlorhydrate de xylométazoline et du dexpanthénol)
- Mupirocine
- Zanamivir

ATTENTION



La présence d'inhibiteurs de la PCR est susceptible de produire des résultats faussement négatifs ou non valides.

12.1.2.3 Réactivité croisée

La spécificité analytique du FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 en ce qui concerne la réactivité croisée avec des pathogènes autres que le SARS-CoV-2, le virus de la grippe A et virus de la grippe B été évaluée en testant :

- des pathogènes associés au SARS-CoV-2 et aux virus de la grippe ;
- des pathogènes provoquant des symptômes similaires à une infection par SARS-CoV-2 ou virus de la grippe.

Le FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 ne présente pas de réactivité croisée avec les pathogènes suivants :

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| • Adénovirus | • <i>Legionella pneumophila</i> |
| • <i>Bordetella pertussis</i> | • MERS-coronavirus |
| • <i>Bordetella parapertussis</i> | • <i>Moraxella catarrhalis</i> |
| • <i>Chlamydia pneumoniae</i> | • <i>Mycoplasma pneumoniae</i> |
| • Entérovirus | • Virus parainfluenza 1-4 |
| • <i>Haemophilus influenzae</i> | • <i>Pneumocystis jirovecii</i> |
| • Coronavirus humain 229E | • Virus respiratoire syncytial A |
| • Coronavirus humain NL63 | • Virus respiratoire syncytial B |
| • Coronavirus humain OC43 | • Rhinovirus |
| • Métapneumovirus humain (hMPV) | • <i>Streptococcus pneumoniae</i> |

ATTENTION

Si l'échantillon contient d'autres pathogènes que le lignée B-βCoV (gène E), le SARS-CoV-2 (gène S) et/ou le virus de la grippe, il peut y avoir compétition avec l'amplification de la cible ou des réactions croisées, donnant ainsi des résultats d'examen DIV incorrects.

12.1.3 Inclusivité

La spécificité du FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 en ce qui concerne la détection de différentes variantes du SARS-CoV-2 et de différentes souches du virus de la grippe est surtout assurée par le choix des amorces et des sondes. Pour vérifier que le FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 permet la détection de différentes variantes du SARS-CoV-2 et de différentes souches du virus de la grippe, les variantes/souches suivantes ont été testées (voir les tableaux 13 et 15).

Tableau 13: Lignées de SARS-CoV-2 testées

Variante (lignée)	Canal ROX™ (gène E)	Canal Cy5 (gène S)	Canal VIC™ (IC)
BetaCoV/Munich/ChVir984/2020 (type sauvage)	+	+	+
2019-nCoV/Italy-INMI1 (type sauvage)	+	+	+
Alpha (B.1.1.7)	+	+	+
Beta (B.1.351)	+	+	+
Delta (B.1.617.2)	+	+	+
Gamma (P.1)	+	+	+

Tableau 14: Inclusivité [Analyse *in silico* de 2 993 884 séquences complètes du génome du SARS-CoV-2 publiée via GISAID e.V. (www.gisaid.org) à la date du 10 octobre 2021 et de 518 615 séquences complètes du génome du SARS-CoV-2 publiée via le National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) à la date du 10 octobre 2021 pour les cibles gène E et gène S : FlexStar® SARS-CoV-2 Type et FLU RT-PCR Detection Mix 1.5]

3 512 499 séquences complètes du génome		Séquences présentant une homologie à 100 %	Séquences présentant des discordances (nombre de discordances)
Gène E	Amorce directe	3 505 942	6 549 (1) 8 (2)
	Amorce inverse	3 509 461	3 032 (1) 5 (2) 1 (3)**
	Sonde	3 510 308	2 183 (1) 4 (2)
Gène S	Amorce directe	3 491 594	20 728 (1) 160 (2)
	Amorce inverse	3 490 361	22 061 (1) 77 (2)
	Sonde	3 498 798	13 653 (1) 44 (2) 3 (3) 1 (4)*

* La séquence (accession ID EPI_ISL_415593, GISAID) a produit 4 discordances dans le site de liaison de la sonde au gène S. La séquence a été publiée le 10 mars 2020 et son origine est Washington, États-Unis. Depuis, aucune des séquences publiées n'a plus produit ce nombre de discordances. Les auteurs ont joint le commentaire suivant à la séquence « Caution. Stretches of NNNs (1,74 % of overall sequence) » [(Attention : stretches de NNN (1,74 % de la séquence globale)] indiquant aucune qualité idéale du séquençage ; l'impact des oligonucléotides spécifiques n'a pas par conséquent été étudié.

** La séquence (accession ID MW584978.1, GISAID) a produit 3 discordances dans le site de liaison de la sonde au gène E. L'échantillon a été recueilli le 3 avril 2020 et publié en février 2021 avec pour origine Cleveland, États-Unis. Depuis, aucune des séquences publiées n'a plus produit ce nombre de discordances.

En fonction de la position, dans une seule séquence oligonucléotidique, les événements de mutation conduisant à ≤ 2 discordances n'auront pas d'impact négatif significatif sur la performance du test. De telles séquences (≤ 2 discordances), testées en laboratoire humide dans le cadre d'activités de surveillance post commercialisation pour les kits RealStar®, FlexStar® et AltoStar®, pour la détection du SARS-CoV-2, ont jusqu'à présent confirmé que la performance n'a pas été affectée par de telles mutations. À l'exception d'une séquence unique, aucune des autres séquences analysées ne présentait de discordance pour plus d'un oligonucléotide et aucune des séquences discordantes ne présentait de discordance avec les deux systèmes de détection spécifiques (gène E et gène S), de sorte que la réactivité des oligonucléotides spécifiques inclus dans les kits RealStar®, FlexStar® et AltoStar® pour la détection du SARS-CoV-2 ne devrait pas être affectée.

Tableau 15: Souches testées du virus de la grippe A et du virus de la grippe B

Sous-type/souche	Canal FAM™ (virus de la grippe A et de la grippe B)	Canal VIC™ (IC)
Virus de la grippe A, sous-type H1N1 (New Caledonia/20/98)	+	+
Virus de la grippe A, sous-type H1N1pdm09 (A/NY/02/2009)	+	+
Virus de la grippe A, variant dérivé du sous-type A/H3N2 (A/Sachsen/2/2015)	+	+
Virus de la grippe A, sous-type H5N1 (A/Anhui/1/05)	+	+
Virus de la grippe B, (B/Colorado/6/2017, B-lignée Victoria)	+	+
Virus de la grippe B, (B/Phuket/3073/2013, lignée B/Yamagata 16/88)	+	+

12.1.4 Précision

La précision du FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 a été évaluée à l'aide d'un ensemble comprenant :

- 1 échantillon fortement positif au SARS-CoV-2 [50 x LoD (1,00E+04 UI/ml)] dans UTM® contenant une matrice nasale simulée
- 1 échantillon fortement positif au virus de la grippe A [50 x LoD (1,70E+04 copies/ml)] dans UTM® contenant une matrice nasale simulée
- 1 échantillon fortement positif au virus de la grippe B [50 x LoD (2,16E+04 copies/ml)] dans UTM® contenant une matrice nasale simulée
- 1 échantillon faiblement positif au SARS-CoV-2 [3 x LoD (6,03E+02 UI/ml)] dans UTM® contenant une matrice nasale simulée
- 1 échantillon faiblement positif au virus de la grippe A [3 x LoD (1,02E+03 copies/ml)] dans UTM® contenant une matrice nasale simulée
- 1 échantillon faiblement positif au virus de la grippe B [3 x LoD (1,29E+03 copies/ml)] dans UTM® contenant une matrice nasale simulée
- 1 échantillon négatif au SARS-CoV-2, au virus de la grippe A et au virus de la grippe B (UTM® contenant une matrice nasale simulée)

Chaque élément de l'ensemble a été testé sur au moins 6 répliques par run.

5 runs ont été effectués sur 5 jours utilisant des combinaisons de :

- 3 lots de FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5
- 3 lots de FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5
- 3 lots de kit AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 lots de AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 instruments AltoStar® AM16
- 3 instruments CFX96™ DW Dx

La répétabilité (variabilité intra-run), la variabilité inter-lot et la reproductibilité (variabilité totale) ont été déterminées sur la base de :

- Valeurs de cycle seuil (C_q^*) pour des échantillons fortement positifs au SARS-CoV-2, au virus de la grippe A et au virus de la grippe B (voir les tableaux 16 et 17)
- Valeurs de cycle seuil (C_q^*) pour l'IC dans les échantillons négatifs au SARS-CoV-2, au virus de la grippe A et au virus de la grippe B (voir le tableau 18)

* Veuillez noter que le terme choisi C_q est équivalent à la désignation de C_t , qui pourrait être utilisée par d'autres thermocycleurs que le système CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad).

Tableau 16: Données de précision (% du CV des valeurs de C_q) pour les échantillons fortement positifs au SARS-CoV-2

	Échantillon fortement positif au SARS-CoV-2 (C_q dans le canal ROX™, cible gène E)	Échantillon fortement positif au SARS-CoV-2 (C_q dans le canal Cy5, cible gène S)
Variabilité intra-run	0,21-0,42	0,44-0,60
Variabilité inter-lot	0,59	0,52
Variabilité totale	0,89	0,63

Tous les échantillons testés à 3 x LoD (échantillons positifs faibles) ont été détectés positifs au SARS-CoV-2 (gènes E et S).

Tableau 17: Données de précision (% du CV des valeurs C_q) pour les échantillons fortement positifs du virus de la grippe A et du virus de la grippe B

	Échantillon fortement positif du virus de la grippe A (C_q dans le canal FAM™)	Échantillon fortement positif du virus de la grippe B (C_q dans le canal FAM™)
Variabilité intra-run	0,93-1,16	0,52-1,48
Variabilité inter-lot	1,02	1,02
Variabilité totale	1,48	1,69

Tous les échantillons testés à 3 x LoD (échantillons faiblement positifs) ont été détectés positifs au virus de la grippe A et au virus de la grippe B.

Tableau 18: Données de précision (% du CV des valeurs C_q) pour l'IC dans les échantillons négatifs au SARS-CoV-2, au virus de la grippe A et au virus de la grippe B

	IC
Variabilité intra-run	0,23-0,35
Variabilité inter-lot	0,38
Variabilité totale	0,74

12.1.5 Taux global de défaillance

La fiabilité du FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 a été évaluée en testant 30 échantillons d'écouillons respiratoires humains négatifs du SARS-CoV-2, du virus de la grippe A et du virus de la grippe B prélevés chez des donneurs individuels et enrichis avec le SARS-CoV-2, le virus de la grippe A et le virus de la grippe B à une concentration finale de 3 x LoD (6,03E+02 UI/ml de SARS-CoV-2, 1,02E+03 copies/ml de virus de la grippe A et 1,29E+03 copies/ml de virus de la grippe B). Tous les échantillons (30 sur 30) ont été testés positifs dans les canaux de détection de fluorescence spécifique au SARS-CoV-2 (Cy5 et ROX™) et dans le canal de détection de fluorescence (FAM™) du virus de la grippe A et du virus de la grippe B.

12.1.6 Contamination croisée

La contamination croisée est un risque qui dépend essentiellement du flux de travail de l'essai PCR utilisé. Pour l'AltoStar® Workflow (flux de travail), le kit AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5 a été utilisé comme modèle exemplaire. L'éventuelle contamination croisée par transfert des échantillons positifs élevés a été évaluée en testant en alternance des échantillons positifs à teneur élevée en parvovirus B19 (1,00E + 07 UI/ml) et des échantillons négatifs (n = 44 à chaque run, 2 runs) à l'aide du kit AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5. Aucune contamination croisée n'a été observée, c'est-à-dire que tous les échantillons négatifs au parvovirus B19 ont été testés négatifs.

12.1.7 Performances cliniques

Le FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 a été évalué dans une étude comparative avec le kit *ampliCube* Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik) au marquage CE. Rétrospectivement, 165 échantillons d'écouvillons respiratoires humains individuels ont été testés en parallèle.

Le kit *ampliCube* Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik) a été utilisé en association avec le kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (Roche) et le MagNA Pure 96 Extraction System (Roche).

Le FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 a été utilisé avec le kit AltoStar® Purification Kit 1.5 et l'AltoStar® Internal Control 1.5 (contrôle interne) dans l'AltoStar® AM16 et le CFX96™ DW Dx.

Pour l'analyse qualitative, tous les échantillons dont le résultat était non valide pour un essai ou les deux ont été exclus.

Les résultats pour les échantillons restants (164 pour SARS-CoV-2 et 152 pour le virus de la grippe) sont indiqués dans les tableaux 19 et 20 respectivement.

Tableau 19: Résultats de l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité du diagnostic pour SARS-CoV-2 dans les écouvillons respiratoires

		<i>ampliCube</i> Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik)	
		POSITIF	NÉGATIF
FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5	POSITIF	58	1
	NÉGATIF	0	105

La sensibilité et la spécificité du diagnostic du FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 comparées au kit *ampliCube* Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik) étaient de 100 % (intervalle de confiance 93,8 %-100 %) et 99,1 % (intervalle de confiance 94,9 %-100 %), respectivement.

Tableau 20: Résultats de l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité du diagnostic pour le virus de la grippe dans les écouvillons respiratoires

		<i>ampliCube</i> Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik)	
		POSITIF	NÉGATIF
FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5	POSITIF	37	1
	NÉGATIF	0	114

La sensibilité et la spécificité du diagnostic du FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 comparées au kit *ampliCube* Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik) étaient de 100 % (intervalle de confiance 90,1 %-100 %) et 95,3 % (intervalle de confiance 95,3 %-100 %), respectivement.

13. Élimination

Éliminez les déchets dangereux et biologiques conformément aux réglementations locales et nationales. Les reliquats de composants du produit et les déchets ne doivent pas entrer en contact avec les eaux usées, les cours d'eau ou le sol.

ATTENTION



Considérez systématiquement les échantillons comme étant des matériaux infectieux et présentant un danger (biologique) conformément aux procédures de sécurité de votre laboratoire. En cas de déversement d'échantillon, utilisez rapidement un désinfectant adapté. Manipulez les matériaux contaminés comme présentant un danger biologique.

ATTENTION



L'élimination des déchets dangereux et biologiques doit être conforme aux réglementations locales et nationales afin d'éviter toute contamination de l'environnement.

14. Contrôle qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié EN ISO 13485 d'Altona Diagnostics GmbH, chaque lot du FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 est testé sur la base de spécifications prédéterminées afin d'assurer une qualité constante du produit.

15. Assistance technique

Pour bénéficier d'un service après-vente, contactez l'assistance technique d'Altona Diagnostics aux coordonnées suivantes :

e-mail: support@altona-diagnostics.com

téléphone: +49-(0)40-5480676-0

REMARQUE



Tout incident grave survenu en rapport avec ce produit doit être signalé à Altona Diagnostics et aux autorités compétentes de votre pays.

16. Bibliographie

- [1] Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10^e Edition. ASM Press, 2011.
- [2] Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Troisième édition. Mosby, 2010.
- [3] International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Index of Viruses — Orthomyxovirus (2019). Virus Taxonomy: 2018b Release. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>, consulté le 24 mars 2020.
- [4] Kawaoka Y, ed. (2006). « Influenza Virology: Current Topics ». Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-06-6. <https://www.caister.com/flu>, consulté le 24 mars 2020.
- [5] Bouvier NM, Palese P (2008). « The biology of influenza viruses ». Vaccine. Vol.26, Suppl. 4:D49-D53. doi:10.1016/j.vaccine.2008.07.039. PMID 19230160.
- [6] Richard M, Fouchier RAM (2016) « Influenza A virus transmission via respiratory aerosols or droplets as it relates to pandemic potential ». FEMS Microbiology Reviews. Vol.40, Issue 1:68-85. doi:10.1093/femsre/fuv039. PMID 26385895.
- [7] Organisation mondiale de la santé (OMS). Fact sheets - « Influenza (Seasonal) ». 18 novembre 2018. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)), consulté le 24 mars 2020.

17. Marques de commerce et clauses de non-responsabilité

AltoStar®, FlexStar® (altona Diagnostics) ; CFX96™ (Bio-Rad) ; UTM® (Copan) ; Rotor-Gene® (QIAGEN) ; LightCycler® (Roche) ; FAM™, JOE™, ROX™, VIC™ (Thermo Fisher Scientific).

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
















Le FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 est un kit de diagnostic portant le marquage CE conformément à la directive européenne de diagnostic *in vitro* 98/79/CE.




Produit non homologué auprès de Santé Canada, non approuvé par la FDA.

Produit disponible dans certains pays uniquement.

© 2022 altona Diagnostics GmbH; tous droits réservés.

18. Explication des symboles

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

Symbole	Explication
	Version
	Remarque
	Contient du matériel biologique d'origine animale

19. Historique de révision

Tableau 21: Historique de révision

Identifiant	Date de publication [mois/année]	Modifications
MAN-FS0021510- FR-S01	02/2022	Première publication

page laissée vierge intentionnellement

page laissée vierge intentionnellement

page laissée vierge intentionnellement

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

