

# Détection Expert 1S™ SARS-CoV-2

**KIT DE DÉTECTION QUALITATIVE  
DU SARS-CoV-2 EN UNE ÉTAPE PAR  
PCR EN TEMPS RÉEL**

## NOTICE D'UTILISATION V.3.1

**REF** GS.D1F.31519.2.1000



**REF** GS.D1F.31519.2.100



**IN VITRO DIAGNOSTIC  
QUALITATIF**



[www.genestore.org](http://www.genestore.org)

Version: Février 2021

GS.D1F.31519.2.IFU.FR.V.3.1



### PRINCIPE

Le Kit "Détection Expert 1S™ SARS-CoV-2" produit par Genestore est un test qualitatif de détection du SARS CoV-2 utilisant la RT-PCR<sup>1</sup>.

La détection se fait à partir d'ARN viral présent dans les voies respiratoires supérieures de l'être humain. L'extraction de l'ARN viral chez les individus suspectés d'être porteur du virus, est réalisée au moyen d'écouvillons introduits dans les voies respiratoires nasopharyngées, par aspiration d'échantillon de ces mêmes voies.

Les résultats attendus sont l'identification de l'ARN du SARS-CoV-2 (Gènes cibles N1 et N2). Cet ARN est généralement détectable dans les échantillons issus de l'introduction d'écouvillons dans les voies respiratoires nasopharyngées, et ce durant la phase aiguë de l'infection.

Lorsque les résultats sont positifs, ils indiquent la présence d'ARN du SARS-CoV-2 dans les échantillons. La corrélation clinique entre l'historique médical du patient, et les informations établies par le diagnostic, sont nécessaires pour déterminer si le patient est infecté ou non.

Les résultats, mêmes positifs, n'excluent pas la présence d'une infection bactérienne ou de co-infections avec d'autres virus. L'agent détecté ne doit pas être considéré à lui seul comme la cause unique de la maladie.

Les laboratoires ont pour obligation d'informer les autorités compétentes de santé publique de tous les résultats positifs.

Les résultats négatifs n'empêchent pas une infection au SARS-CoV-2, et ils ne doivent pas être utilisés comme la seule approche de décision des soins à prodiguer au patient. Les résultats négatifs doivent être combinés avec les observations cliniques, l'historique médical du patient, et les informations épidémiologiques.

Les tests utilisant le kit "Détection Expert 1S™ SARS-CoV-2" sont destinés à être utilisés par le personnel de laboratoire d'analyse médicale spécifiquement formés aux techniques de RT-PCR pour les techniques de diagnostics in vitro.

### UTILISATION PREVUE

Le kit "Détection Expert 1S™ SARS-CoV-2" est un test RT-PCR en temps réel destiné à la détection qualitative de l'acide nucléique du SARS-CoV-2 dans un écouvillon nasopharyngé, prélevé sur des personnes qui sont suspectées par leur médecin d'être infectées par le COVID-19.

- Les résultats permettent d'identifier l'ARN du SARS-CoV-2. Les résultats positifs indiquent la présence de l'ARN du SARS-CoV-2.
- Le test consiste en une RT-qPCR en une seule étape (les deux réactions dans le même tube) par transcription inverse de la cible ARN viral en ADNc, suivi de l'amplification de la cible du test et de la détection par la méthode de sonde d'hydrolyse qPCR.

Le kit "Détection Expert 1S™ SARS-CoV-2" de Genestore contient les réactifs suivants:

- Une boîte nommée "Pack réactif d'amplification" qui contient :
  - Mélange enzymatique
  - Sondes/Amorces
- Une boîte nommée "Contrôle positif (N1 + N2)" qui contient:
  - Contrôle positif SARS-CoV-2 - Régions Cibles N1 et N2

### SYMBOLES <sup>2</sup>



Contient suffisamment de réactifs pour (n) tests



Date d'expiration



Dispositif médical de diagnostic in vitro



Référence catalogue



Numéro de lot



Consulter la notice d'utilisation



Prudence/Attention



Composant



Contenu



Numéro



Limites de température (stockage)



Fabricant du dispositif médical



Marquage CE - Conformité Européenne



Contrôle positif



Pack Réactif d'amplification

### NOUS NOUS ENGAGEONS POUR L'AMÉLIORATION ET LA QUALITÉ DES TECHNOLOGIES A ACIDES NUCLÉIQUES

GeneStore France est une compagnie axée sur le diagnostic génomique dont le siège social se situe en Provence, dans le sud de la France.

Genestore est composée de plusieurs sites d'exploitations axés sur la recherche et le développement, ainsi que la fabrication de ses produits, à travers l'Europe, le moyen-orient, l'amérique du sud et le sud de l'Asie.

Nous croyons fermement, en fournissant des produits performants et de très bonne qualité à travers le monde, en l'assurance d'une méthode d'analyse produisant des résultats simples et robustes.

Pour plus d'informations sur Genestore, veuillez vous rendre sur notre site internet : [www.genestore.org](http://www.genestore.org)

## COMPOSITION DU KIT

"Détection Expert 1S™ SARS-CoV-2" 100 Tests <b>REF</b> GS.D1F.31519.2.100			
Composant	Description	Quantité (Volume)	Conditions de stockage
A. Pack ou boîte  Pack Réactifs d'amplification <b>AMPLIFICATION REAGENT PACK</b>	Sondes/Amorces  • N1 [FAM]  • N2 [HEX]  • RNaseP [CY5]	454.50 µL  Nombre de tubes: 01	-25°C à -15°C  -15°C  -25°C
	Mélange enzymatique	1212.00 µL  Nombre de tubes: 01	-25°C à -15°C  -15°C  -25°C
B. Pack ou boîte  CONTROLE POSITIF (N1 + N2)	CONTROLE POSITIF	100.00 µL  Concentration: 10,000 copies/µL  Nombre de tubes: 01	-25°C à -15°C  -15°C  -25°C

"Détection Expert 1S™ SARS-CoV-2" 1000 Tests <b>REF</b> GS.D1F.31519.2.1000			
Composant	Description	Quantité (Volume)	Conditions de stockage
A. Pack ou boîte  Pack Réactifs d'amplification <b>AMPLIFICATION REAGENT PACK</b>	Sondes/Amorces  • N1 [FAM]  • N2 [HEX]  • RNaseP [CY5]	454.50 µL  Nombre de tubes: 10	-25°C à -15°C  -15°C  -25°C
	Mélange enzymatique	1212.00 µL  Nombre de tubes: 10	-25°C à -15°C  -15°C  -25°C
B. Pack ou boîte  CONTROLE POSITIF (N1 + N2)	CONTROLE POSITIF	100.00 µL  Concentration: 10,000 copies/µL  Nombre de tubes: 01	-25°C à -15°C  -15°C  -25°C

## STOCKAGE DES RÉACTIFS, MANIPULATION ET STABILITÉ

1. Stocker les réactifs entre -25 et -15°C.
2. Toujours vérifier les dates d'expiration avant emploi. Ne pas utiliser des réactifs périmés.
3. Protéger les sondes (probes) fluorescents de la lumière.
4. Les primers (amorces) et les probes (aliquots compris), et le mix enzymatique doivent être décongelés sur un bloc réfrigéré durant tout le temps de la préparation et de l'utilisation du kit
5. Ne pas recongeler le master mix (mélange obtenu par le mix des sondes/amorces avec le mélange enzymatique).
6. Les contrôles et leurs aliquots doivent être décongelés sur glace durant tout le temps de la préparation et de l'utilisation du kit.
7. Utilisation réservée uniquement pour le diagnostique in vitro par les laboratoires qualifiés et à usage professionnel.

Stabilité des réactifs fermés:

Voir la date de péremption sur l'étiquette de l'emballage.

### MATERIEL NÉCESSAIRE (NON FOURNI)

1. UTM : tubes stériles avec milieu de transport
2. Vortex, Mixeur
3. Micro Centrifugeuse
4. Micropipettes (2 ou 10µl, 200µl et 1000µl)
5. Pipettes multicanaux ( 5 à 50 µl)
6. Portoirs pour microtubes 1,5 ml
7. 2 x 96 puits, plaques froides (-20°C)
8. Thermocycleur (multicanaux) avec logiciel d'analyse
9. Eau pour biologie moléculaire ( sans RNase)
10. Eau de javel concentrée à 10% (10g/100ml)
11. DNAZap™ (Ambion, cat.#AM9890) ou équivalent
12. RNase Away™ (Fisher Scientific; cat.#21-236-21) ou équivalent
13. Gants (sans poudre) et blouses chirurgicales
14. Pointes avec filtres
15. Microtube 1.5 ml (sans RNase et sans DNase )
16. Tubes 0,2 ml pour PCR (conditionnés en rang ou en plaque)
17. Optical 8-cap Strips (dans le cas de l'utilisation de strip tubes)
18. Bain sec ou étuve

### INSTRUMENTS POUVANT ÊTRE UTILISÉ AVEC CE KIT

1. Ce kit a été validé pour être utilisé avec les instruments suivants :

- CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- BIOER linegene 9660
- ABI® 7500 (Applied Biosystems)



## MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS

- Réservé pour une utilisation In vitro.
- Suivre les précautions habituelles, chaque échantillon de patient et les contrôles positifs doivent être considérés comme potentiellement infectieux et traités en conséquence.
- Ne pas manger, boire, fumer, se maquiller, ou manipuler des lentilles de contact dans les zones où les réactifs et/ou les échantillons humains sont manipulés. Manipuler les échantillons humains avec précaution (risques infectieux), en utilisant les bonnes pratiques de laboratoires.
- Se référer aux instructions de biosécurité en laboratoire pour la manipulation et le traitement des échantillons en contact avec le COVID-19.
- Le traitement des échantillons doit être exécuté en accord avec le règlement national en matière de sécurité biologique.
- En cas d'infection suspectée, établie sur un critère de dépistage clinique ou épidémiologique conseillé par les autorités de santé publique, les échantillons doivent être collectés avec les précautions appropriées pour le contrôle des infections.
- Les caractéristiques de performance ont été déterminées avec des échantillons des voies respiratoires supérieures chez l'homme ou du tractus respiratoire inférieur, qui présente des signes et des symptômes d'infections respiratoires. Réaliser toutes les manipulations avec des échantillons contenant le virus vivant, avec un poste de sécurité microbiologique de classe II au minimum. Utiliser des équipements de protection individuel, comme par exemple (mais pas limité à) les gants, les protections oculaires, les blouses.
- Les technologies d'applications comme la PCR (Polymerase Chain Reaction) sont sensibles à un ajout accidentel de produits de PCR fabriqués lors de réactions d'amplifications précédentes.
- Des résultats incorrects peuvent se produire si les échantillons cliniques ou les réactifs utilisés lors de l'étape d'amplification, deviennent contaminés par l'introduction accidentelle de produit d'amplification (amplicon). La chaîne de travail dans le laboratoire doit être réalisée de manière unidirectionnelle.
- Maintenir séparées les aires de travail pour les tests et la manipulation des acides nucléiques.
- Toujours vérifier la date d'expiration avant l'utilisation des produits. Ne pas employer un réactif expiré. Ne pas substituer ou mélanger les réactifs provenant de différents lots de kit, ou d'un autre fabricant.
- Changer avant chaque pipetage de liquides, les pointes avec filtres des pipettes.
- Durant la préparation des échantillons, la conformité avec les BPL (Bonnes Pratiques de Laboratoire) est essentielle pour minimiser les risques de contaminations croisées entre les échantillons, et l'introduction par inadvertance de nucléases dans les échantillons pendant et après la procédure d'extraction. Les techniques de nettoyage et d'aseptisation appropriées doivent toujours être utilisées lorsque l'on utilise des acides nucléiques.



## MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS

- Maintenir séparé, et désigner chaque équipement à une tâche (pipettes, microcentrifugeuses) ainsi que les consommables (tubes, pointes, ...) pour la préparation des tests et les travaux d'extraction d'acides nucléiques.
- Porter une blouse propre et des gants sans poudre (jamais utilisés) lors de la préparation des tests.
- Changer de gants pendant la préparation des échantillons et à chaque fois qu'une contamination est suspectée.
- Garder les réactifs et les tubes, utilisés pour la réaction, bouchés ou couverts autant que possible.
- Les primers (les amorces génomiques), les probes (les sondes colorées, incluant les aliquotes), et les enzymes du Master Mix, doivent être décongelées et maintenues dans des portoirs froids durant la préparation et l'utilisation.
- Les surfaces de travail, les pipettes et les centrifugeuses doivent être nettoyées et décontaminées avec un produit de nettoyage comme de l'eau de Javel à 10%, pour minimiser les risques de contamination par les acides nucléiques. Les résidus d'eau de Javel peuvent être enlevés avec de l'éthanol à 70%.
- L'ARN doit être maintenu dans un bloc froid ou sur glace durant la préparation et son utilisation pour assurer sa stabilité.
- Jeter les réactifs employés et les échantillons humains selon réglementation en vigueur.

## LIMITATIONS

- Le kit "Détection Expert 1S™ SARS-CoV-2" par RT-PCR peut être utilisé seulement avec les échantillons obtenus au moyen d'écouvillons introduits dans les voies respiratoires nasopharyngées, par aspiration d'échantillon de ces mêmes voies.
  - Tout autre type d'échantillons n'a pas été évalué et ne doit pas être testé de cette façon.
  - Les échantillons doivent être prélevés, transportés et stockés en utilisant les conditions et les procédures adéquates. Un prélèvement, un transport ou un stockage impropre des échantillons peut empêcher la faculté du test à détecter les séquences cibles.
  - L'extraction et l'amplification des acides nucléiques issus des échantillons cliniques doivent être exécutées en accord avec les recommandations décrites dans ce manuel. Les autres approches d'extraction ou procédés d'extraction n'ont pas été évalués.
- Un résultat Faux-négatif peut provenir :**
- D'un prélèvement d'échantillon impropre.
  - D'une dégradation de l'ARN du SARS-CoV-2 durant le transport ou le stockage
  - De l'utilisation d'une extraction ou des réactifs non autorisés.
  - De la présence d'inhibiteurs de la RT-PCR.
  - De la mutation du virus SARS-CoV-2 sur les gènes N1 et N2 simultanément.
  - Du non-suivi des instructions préconisées dans ce manuel.
  - Les résultats négatifs ne doivent pas exclure à eux seuls les infections avec le SARS-CoV-2 et ne doivent pas être la seule base de décision pour l'avenir du patient.

## Un résultat Faux-positif peut provenir :

- D'une contamination croisée durant la manipulation et la préparation des échantillons ; D'une contamination croisée entre des échantillons provenant de différents patients ; D'un mélange d'échantillons.
- D'une contamination de l'échantillon durant sa préparation.
- L'incidence des vaccins, des antiviraux, des antibiotiques, des médicaments chimiothérapeutiques ou immunosuppresseurs n'a pas été évaluée. Le kit "Détection Expert 1S™ SARS-CoV-2" de Genestore pour RT-PCR ne peut pas exclure les maladies causées par d'autres bactéries ou virus pathogènes.
- Les laboratoires ont obligation d'avertir les autorités de santé dans le cas d'obtention de résultats positifs.

## LES CONTRÔLES À UTILISER AVEC LE KIT

### “Détection Expert 1S™ SARS-CoV-2”

#### POUR RT-PCR

Les échantillons des patients doivent être prélevés en accord avec les recommandations préconisées par les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL). Les contrôles positifs et négatifs du test doivent être inclus pour interpréter avec précision les résultats obtenus pour les patients.

Inclure les contrôles suivants :

Contrôle	Utilisé pour le contrôle	Test
N1 ET N2 (Mélange de primers et de sondes inclus dans le test de RT PCR)  CONTROLE POSITIF (N1 ET N2): substrat <u>fourni</u>	Configuration de la réaction de RT-PCR et intégrité du réactif.	“Détection Expert 1S™ SARS-CoV-2”
RNase P  *(Mélange de primer et de sonde inclus dans le test de RT PCR) Contrôle d'origine humaine substrat <u>non fourni</u>	La performance : extraction des acides nucléiques	
CONTROLE NEGATIF  (non fourni avec le kit, utiliser de l'eau sans nucléase ou du sérum physiologique (NaCl 0.9%))		

\* Le marqueur RNase P inclus dans le test multiplexe SARS-CoV-2 RT PCR, sert à mesurer la performance de la méthode d'extraction des acides nucléiques et également comme contrôle interne.

Le test par RNase P repose sur la présence des échantillons d'ADN ou d'ARN génomiques humains issus d'une extraction, on observera une amplification si les performances de l'extraction sont respectées.

## PREPARATION DU CONTROLE POSITIF ⚠

Précautions : Ce réactif doit être manipulé avec précaution, dans une zone dédiée à la manipulation des acides nucléiques, pour prévenir de possible contaminations. Les cycles de congélation/décongélation doivent être le plus possible évités.

Maintenir sur glace lorsque le réactif est décongelé.

Inclure les contrôles suivants :

- Préparer plusieurs aliquots (d'environ 30µl) et les conserver à environ -20°C.
- Décongeler un seul aliquot de contrôle positif pour chaque expérimentation, et conserver sur glace jusqu'à ce qu'il soit ajouté sur la plaque. Jeter tous les restes d'aliquot non utilisés.

### CONTROLE D'ORIGINE HUMAINE (HSC) (non fourni)

Les contrôles d'origine humaine (HSC) ou ceux faisant partis de la liste des contrôles d'extraction alternatifs dits “ acceptables”, doivent être préparés et utilisés pour chaque rendu de résultats de Run de PCR.

### CONTROLE SANS MATRICE (NTC) (non fourni)

1. Utiliser de l'eau stérile sans nucléase
2. Réaliser des aliquots de petits volumes (30ul)
3. Utiliser les NTC pour vérifier les contaminations durant les extractions d'échantillon et/ou la préparation de la plaque.

## PROTOCOLE DU TEST

### COLLECTE DES ECHANTILLONS

Les échantillons analysés avec ce kit doivent avoir été collectés et transportés conformément à la recommandation de l'OMS. Ces échantillons doivent être des échantillons des voies respiratoires supérieures recueillis auprès d'individus soupçonnés de COVID-19 par leur médecin. Assurez vous que l'échantillon est stocké correctement et tenu à l'écart de toute source de contamination/pollution.

### PREPARATION DES EQUIPEMENTS

Nettoyer et décontaminer toutes les surfaces, les pipettes, les centrifugeuses, et tout autre équipement avant usage. Les produits de décontamination doivent être utilisés en incluant de l'eau de Javel à 10%, de l'éthanol à 70%, pour minimiser les risques de contamination avec les acides nucléiques.

### PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR PCR DIRECTE

Le kit GeneStore “Détection Expert 1S™ SARS-CoV-2” permet une amplification directe et une détection qualitative par PCR multiplexe en temps réel de l'ARN du SARS-CoV-2. Pour l'utilisation du kit de détection sans extraction, il est très important que l'échantillon n'ait pas été désactivé par aucun produits chimiques, car ceux-ci peuvent inhiber la réaction de PCR. L'échantillon peut être dans un écouvillon sec plongé dans du sérum physiologique<sup>3</sup> (NaCl 0.9%) ou de l'eau sans RNase. Si le laboratoire veut inactiver le virus (recommander), la méthode d'inactivation doit être: CHAUFFER UNIQUEMENT (incuber l'échantillon à 56°C pendant 30 minutes<sup>3</sup> ou à 95°C pendant 5 minutes dans un bain sec).

## EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES

La performance du test par RT-PCR dépend de la quantité et de la qualité d'ARN purifié à partir d'échantillon humain. Utiliser des kits d'extraction d'ARN disponible dans le commerce et procéder comme cela a été décrit et validé par le fabricant; ceci afin de récupérer et de purifier l'ARN viral dans les échantillons nasopharyngés récupérer à l'aide d'un écouvillon, les échantillons nasopharyngés récoltés par aspiration. Les procédures d'utilisation recommandées par les fabricants doivent être suivies pour l'extraction d'ARN à partir de ces échantillons.

### METHODES A SUIVRE POUR LA PREPARATION DE LA RT-PCR

#### Note importante :

- Préparer la plaque de lecture sur glace et garder sur glace jusqu'à la lecture par RT-PCR.
- Lancer la lecture dès que la préparation de la plaque est finie. Le non respect de ces consignes pourrait entraîner une dégradation de l'ARN.
- Pour éviter les contaminations, préparer les réactifs de la PCR dans une zone de travail dédiée ou une zone de travail équivalente libre de la présence d'amplicon. Ne pas utiliser les mêmes pipettes pour les contrôles et les échantillons, et toujours utiliser pour les pipettes des pointes avec filtres.
- Maintenir un environnement de travail sans RNase.
- Protéger les tests de la lumière.
- Garder les échantillons et les réactifs pendant leur utilisation sur glace.
- Inclure un contrôle positif et un contrôle négatif dans chaque plaque, et installer et lire la plaque dans la RT-PCR.

### PREPARATION DU TEST PAR RT-PCR

Note : Le plan de plaque peut varier avec le nombre d'échantillons et l'organisation du jour. Les contrôles négatifs et positifs doivent être inclus dans chaque lecture.

1. S'ils sont congelés, décongeler les échantillons d'acides nucléiques et les réactifs sur la glace.

Pour la préparation d'échantillon sans extraction: si l'échantillon est un écouvillon qui a séché, réhydrater avec 0,5 à 1ml de sérum physiologique (NaCl 0.9%) ou de l'eau sans RNase et vortexer doucement pendant 15 secondes. Si l'échantillon atteint le laboratoire en UTM, vortexez-le doucement pendant 15 secondes.

2. Mélanger doucement les échantillons et les réactifs, puis les centrifuger brièvement pour récupérer le mélange au fond des puits de plaque/ ou au fond des tubes.

## PREPARATION DU MASTER MIX

- Pour chaque lecture, combiner les réactifs suivants en quantité suffisante pour le nombre de tests désirés, ajouter un contrôle positif et un contrôle négatif.

Composant	Volume pour un échantillon ou un contrôle (µL)	Volume pour N échantillons ou N contrôles
RT PCR ENZYME MIX	12.00 µL	12.00 *(N+1) µL
PROBE MIX	4.50 µL	4.50 *(N+1) µL
Volume réactionnel total	16.50 µL	

- Déposer respectivement les réactifs dans chaque microtubes annotés. Après l'ajout des réactifs, mélanger doucement en pipettant de haut en bas. Ne pas vortexer.
- Centrifuger pendant 5 secondes pour collecter l'ensemble du mélange au fond des tubes, et placer les tubes dans un bloc froid.
- Installer les tubes ou les plaques dans un bloc froid de 96 puits.
- Déposer 16,5µl de chaque Mix dans les puits appropriés (échantillons et contrôles compris).
- Avant de déplacer les acides nucléiques sur l'aire de travail, préparer la réaction avec le contrôle négatif par colonne#1 dans l'aire de préparation des tests.
- Pipetter 3,5µl d'eau sans nucléase dans les puits réservés aux contrôles négatifs. Par mesure de sécurité fermer les puits avant de continuer.
- Couvrir entièrement la plaque et les tubes, déplacer l'ensemble sur l'aire de travail réservée à la manipulation des acides nucléiques.

## ADDITION DES ACIDES NUCLEIQUES

- Mélanger en douceur les acides nucléiques contenus dans les tubes pendant 5 secondes.
- Centrifuger pendant 5 secondes les tubes pour collecter le mélange au fond du tube.
- Après centrifugation, placer les tubes contenant les extraits d'acides nucléiques dans un bloc froid.
- Pipetter avec attention 3,5 µl du premier échantillon et déposer le volume pipeté dans l'ensemble des puits réservés pour cet échantillon (Tube 1 : N1 + N2 + RNaseP multiplexés). Garder les autres puits couverts pendant l'addition des échantillons. Changer la pointe de la pipette après pipetage.
- Fermer les bouchons de la colonne où les échantillons ont été déposés pour prévenir des contaminations croisées, et assurer le suivi des échantillons.
- Changer de gants souvent et dès que nécessaire pour éliminer tout risque de contamination.
- Répéter les étapes 11 et 12 pour les échantillons restants.

## CONDITIONS DE CYCLE EN UNE ETAPE POUR RT-PCR

- Configurez et exécutez le programme de cycle rRT-PCR suivant sur votre instrument rRT-PCR (suivez les instructions du fabricant sur la configuration du logiciel de votre instrument).

**Première incubation :** 42 °C pendant 5 minutes  
**Deuxième incubation :** 95 °C pendant 5 minutes

**Nombre de cycles :** 40 cycles avec les conditions suivantes:

- Dénaturation 95°C pendant 15 secondes

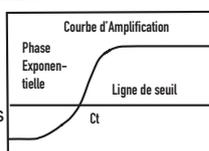
- Hybridation 58°C pendant 30 secondes

**Couleur des canaux de détection:**

- N1 est FAM (couleur verte)
- N2 est HEX (couleur jaune)
- RNase P est CY5 (couleur rouge)

## ANALYSES DES DONNEES 4

Note : Se référer aux instructions du manuel d'utilisation de l'appareil pour générer les courbes d'amplification et les valeurs des Ct pour chaque échantillon.



Note: Pour déterminer les valeurs des Ct ajuster la ligne de seuil (threshold) jusqu'à ce qu'elle se situe dans la phase exponentielle des courbes et au-dessus du signal de fond.

## INTERPRETATION DES RESULTATS & RAPPORT

### Contrôle négatif (NTC)

Le NTC consiste dans l'utilisation d'eau sans RNase dans la réaction de Rt-PCR au lieu de l'ARN. Les réactions NTC pour tous les primers et probes ne doivent pas avoir de courbes d'amplification qui dépasse la ligne de seuil. Si une réaction NTC montre une courbe d'amplification qui coupe la ligne de seuil, une contamination de l'échantillon doit avoir eu lieu. Le test n'est pas validé et doit être répété avec le respect strict des recommandations d'utilisation du manuel.

### Contrôle positif

Le contrôle positif est composé de plasmides contenant la séquence des gènes des régions 1(N1) et 2(N2) de la nucléocapside du SARS CoV 2. Le contrôle positif devra rendre un résultat positif avec les primers / probes suivants : N1 et N2 seulement.

### Contrôle d'extraction d'échantillon d'origine humaine (HEC) (RNase P)

Les fonctions de la RNase P comme les HEC (voir section précédente dans la préparation des tests), est utilisée comme un contrôle de la procédure d'extraction de l'ARN, pour démontrer que l'ARN a été extrait correctement ainsi que l'intégrité des réactifs d'extraction. Une purification des acides nucléiques réussie doit montrer un résultat positif avec le set de primer probe de la RNase P.

## INTERPRETATION DES RESULTATS & RAPPORT

Tableau récapitulatif des résultats attendus pour le diagnostic du SARS-CoV-2 par RT-PCR:

Nature du contrôle	Région 1 du SARS-CoV-2 (N1)	Région 2 du SARS-CoV-2 (N2)	RNase P	Valeurs des Ct attendues
Positif	[+]	[+]	[-]	< 35.00
Négatif	[-]	[-]	[-]	Pas de détection
HEC	[-]	[-]	[+]	< 35.00

### Note importante:

Si l'un des contrôles ci-dessus ne donne pas les résultats décrits dans le tableau, il se peut que le test n'ait pas été préparé et/ou réalisé correctement, et/ou qu'il y ait eu un dysfonctionnement des réactifs et/ou de l'équipement. Le test ne doit pas être validé et doit être répété dans son intégralité.

### Contrôle d'extraction RNase P :

1. Tous les échantillons cliniques doivent montrer des courbes de fluorescence croissantes avec la réaction de RNase P, celles-ci doivent dépasser la ligne de seuil avant d'atteindre les 35 cycles (inf à 35 Ct). Si c'est bien le cas, alors cela indique la présence du gène RNase P. L'échec de détection de la présence du gène RNase P dans les échantillons clinique indique que :

- L'extraction d'acides nucléiques issus des échantillons cliniques a échoué, soit par la perte de l'ARN, soit par la dégradation de ce dernier.
- Les échantillons d'origine humaine n'ont pas été recueillis en quantité suffisante, ou sont absents, soit à cause d'une collecte peu importante de ces échantillons, soit à cause de la perte de ces derniers.
- Le test a été mal réalisé, ou mal préparé.
- Les réactifs et les équipements présentent des dysfonctionnements.

2. Si le test avec la RNase P ne produit pas de résultats positifs avec les échantillons humains d'origine clinique, les résultats peuvent être interpréter comme suit:

- Si les marqueurs N1 et N2 sont positifs même en absence du contrôle positif RNase P, alors les résultats sont tout de même validés. Il est possible que quelques échantillons n'aient pas montré de courbes croissantes à cause de la faible quantité de cellules présentes dans l'échantillon clinique. Un résultat négatif de la RNase P n'empêche pas la présence d'ARN du virus SARS-CoV-2 dans les échantillons cliniques.
- Si tous les marqueurs du virus et de la RNase P sont négatifs avec les échantillons cliniques, les résultats doivent être considérés comme non validés pour les échantillons testés.

Si un échantillon est non validé, alors il faut répéter la procédure d'extraction et répéter également le test. Si tous les marqueurs reviennent négatifs après avoir refait le test, il faut faire remonter que les résultats ne sont pas validés et une nouvelle collecte d'échantillon doit être refaite si cela est encore possible.

**SARS-CoV-2 marqueurs (N1 et N2)**

1. Quand les contrôles montrent les résultats attendus, un échantillon est considéré comme négatif si les deux marqueurs N1 et N2 montrent des courbes croissantes qui NE FRANCHISSENT PAS la ligne de seuil avant 35 cycles ( inf à 35 Ct) ; et que les courbes croissantes de RNase P FRANCHISSENT elles, au contraire, la ligne de seuil avant les 35 cycles (inf à 35 Ct).

2. Quand les contrôles montrent les résultats attendus, un échantillon est considéré comme positif si les deux marqueurs N1 et N2 montrent des courbes croissantes qui FRANCHISSENT la ligne de seuil avant 35 cycles ( inf à 35 Ct). La courbe de la RNase P peut ou ne peut pas être positive comme décrit ci-dessus, dans les deux cas le résultat est validé.

3. Quand tous les contrôles montrent les résultats attendus, et les courbes croissantes des marqueurs N1 et N2 et le marqueur RNase P NE FRANCHISSENT PAS le niveau de seuil avant les 35 cycles ( inf à 35 Ct), le résultat n'est pas validé. Les ARN extraits à partir des échantillons humains doivent être testés à nouveau. Si il n'y a plus d'extrait d'ARN disponible, une nouvelle extraction doit être recommencée et testée. Si de nouveau le test est négatif pour tous les marqueurs (RNase P compris), le résultat n'est pas validé et une nouvelle collecte d'échantillons humains doit être envisagée.

4. Si HSC est positif pour N1 ou N2, il peut y avoir une contamination pendant l'extraction ou le traitement des échantillons. Invalider tous les résultats des échantillons prélevés avec le HSC. Ré-extraire les échantillons et HSC et recommencer.

Le tableau suivant liste les résultats attendus par le test Détection Expert 1S™ SARS-CoV-2 de GENESTORE. Si un laboratoire n'obtient pas les résultats attendus pour les contrôles, ou si des résultats invalides ou peu concluants sont obtenus, et ne peuvent pas être résolus après avoir recommencé le test, merci de contacter votre représentant GENESTORE pour une consultation et un envoi d'un nouveau

Région 1 du SARS-CoV-2 (N1)	Région 2 du SARS-CoV-2 (N2)	RNaseP	Interpretation des résultats	Rapport	Actions
[+]	[+]	[+/-]	SARS-CoV-2 détecté	Positif pour SARS-CoV-2	Faire remonter aux autorités de santé locales et à l'expéditeur.
Si une seule ou les deux cibles sont		[+/-]	SARS-CoV-2 détecté	Positif pour SARS-CoV-2	Faire remonter aux autorités de santé locales et à l'expéditeur.
[-]	[-]	[+]	SARS-CoV-2 non détecté	Non détecté	Faire remonter les résultats à l'expéditeur. On peut tester le patient pour un autre virus respiratoire.
[-]	[-]	[-]	Résultat invalide	Invalide	Répéter l'extraction et la RT-PCR. Si les résultats sont à nouveau invalide, recommencer une nouvelle collecte d'échantillon sur le patient.

Les laboratoires doivent rapporter leur diagnostic comme approprié et en conformité avec leur système de reporting spécifique. Le niveau du pic viral optimal du SARS-CoV-2 et sa durée n'a pas été déterminée dans les différents types d'échantillons. La collecte de différents échantillons d'un même individu est donc nécessaire pour détecter le virus. La possibilité d'un résultat faux négatif, doit être particulièrement prise en compte, si le patient a été exposé au virus ou si il présente des signes cliniques suggérant que l'infection au SARS-CoV-2 est possible, et que les tests réalisés pour d'autres maladies respiratoires se présentent comme étant négatifs. Si l'infection au SARS-CoV-2 est toujours suspectée, un nouveau test doit être à considérer en consultation avec les autorités de santé publique.

**CONTROLE QUALITE**

- Les exigences en matière de contrôle qualité doivent être suivies en conformité avec la réglementation en vigueur, les exigences pour l'accréditation, et le respect des procédures de contrôle qualité par le personnel du laboratoire. Pour obtenir plus d'information sur les méthodes de travail en contrôle qualité, se référer à l'organisme d'accréditations gouvernemental.
- Les procédures de contrôle qualité sont destinées à veiller à la conformité des produits et des tests.
- Tester en premier les contrôles positifs, avant de tester les échantillons pour chaque nouveau lot de kit, afin de s'assurer que les réactifs et les composés du kit marchent correctement.
- Les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) recommandent d'inclure un contrôle d'extraction positif dans chaque lot d'isolation d'acides nucléiques. Bien que HEC ne soit pas inclus dans le panel de diagnostic rRT-PCR SARS-CoV-2, le contrôle de l'extraction HEC doit passer par l'isolement d'acide nucléique par lot d'échantillons à analyser.
- Toujours inclure un contrôle négatif, et le contrôle positif approprié dans chaque PCR. Tous les échantillons cliniques doivent être testés sur la présence du gène RNase P, pour contrôler la qualité de l'échantillon et de son extraction.

## Caractéristiques de la performance INCLUSIVITE: ANALYSES IN SILICO <sup>4</sup>

- La sensibilité analytique du test doit être évaluée plus loin par du matériel de référence recommandé par la FDA, en utilisant les protocoles développés par la FDA si c'est applicable ou si c'est possible. Simulation des analyses pour les séquences des Primers et Probes.
- Un alignement a été réalisé avec les amorces et les séquences des sondes d'oligonucléotides par RT-PCR en temps réel du SARS-CoV-2 Panel de diagnostic avec toutes les séquences d'acides nucléiques disponibles au public pour SARS-CoV-2 dont dispose la GenBank à compter du 1er février 2020, et ceci afin de démontrer l'inclusivité prévue de la RT-PCR en temps réel SARS-CoV-2 panel de diagnostic. Tous les alignements montrent une identité à 100% du CDC panel aux séquences SARS-CoV-2 disponibles, à l'exception d'un mésappariement nucléotidique avec l'amorce directe N1 dans une séquence donnée. Le risque d'une seule discordance entraînant une perte significative de réactivité et un résultat faux négatif, est faible, en raison de la conception des amorces et des sondes avec des températures de fusion > 60 ° C, et des conditions d'exécution du test avec une deuxième incubation à 58 °C, de façon à pouvoir tolérer un à deux mésappariements.

## SPECIFICITE/ EXCLUSIVITE DU TEST: ANALYSES IN SILICO

- Les requêtes d'analyse BLASTn des dosages rRT-PCR SARS-CoV-2 des amorces et des sondes ont été réalisées contre les séquences nucléotidiques du domaine public. Les paramètres de recherche de la base de données étaient les suivantes:
  - La collection de nucléotides se compose de GenBank + EMBL + DDBJ + PDB+ RefSeq, mais exclut EST, STS, GSS, WGS, TSA, séquences de brevets ainsi que les phases 0, 1 et 2, les séquences HTGS et les séquences de plus de 100 Mo;
  - La base de données n'est pas redondante. Des séquences identiques ont été fusionnées en une seule entrée, tout en préservant l'adhésion, l'IG, le titre et les informations de taxonomie pour chaque entrée;
  - La base de données a été mise à jour le 10/03/2019;
  - Les paramètres de recherche ont été automatiquement ajustés pour les séquences d'entrée courtes et le seuil attendu est de 1000;
  - Les scores de correspondance et de non-correspondance sont respectivement de 1 et -3;
  - La pénalité pour créer et prolonger un espace dans un alignement est de 5 et 2 respectivement.

## SPECIFICITE/ EXCLUSIVITE DU TEST: ANALYSES IN SILICO (TEST SARS-CoV-2 N1)

La séquence de la sonde du test rRT-PCR SARS-CoV-2 a montré une homologie de séquence avec le coronavirus du SARS et le génome du coronavirus de chauve-souris. Cependant, les amorces directes et inverses n'ont pas montré une homologie de séquence avec le coronavirus du SARS et le génome du coronavirus de chauve-souris. En combinant amorces et sondes, il n'y a pas d'homologies significatives pour le génome humain, d'autres coronavirus ou la microflore humaine peuvent donner d'éventuels résultats faux positifs par rRT-PCR.

## SPECIFICITE/ EXCLUSIVITE DU TEST: ANALYSES IN SILICO (TEST SARS-CoV-2 N2)

La séquence d'amorces directes de la rRT-PCR SARS-CoV-2 N2 a montré une homologie de séquence élevée avec coronavirus de chauvesouris. L'amorce inverse et les séquences de la sonde n'a pas montré d'homologie significative avec le génome humain, avec d'autres coronavirus ou avec la microflore humaine. En combinant amorces et sondes, il n'y a pas de possibilité d'éventuels faux résultats rRT-PCR positif. En résumé, le test rRT-PCR SARS-CoV-2 N1 et N2, conçu pour la détection spécifique du SARS-CoV-2, n'a montré aucune homologie combinée et significative pour le génome humain, pour d'autres coronavirus ou pour la microflore, qui pourraient prédire d'éventuels résultats faux positifs de rRT-PCR.

## LIMITE DE DETECTION (LOD): ETUDE DE L'INSTITUT PASTEUR <sup>5</sup>

L'objectif de l'évaluation est de tester la sensibilité analytique du kit "Détection Expert 1S™ SARS-CoV-2" - GeneStore, pour la détection du SARS-CoV-2 par comparaison avec la technique de référence utilisée au CNR de l'Institut Pasteur, à partir:

- D'ARN extraits de mélanges d'échantillons respiratoires positifs pour le SARS-CoV-2 et couvrant une large gamme de Ct jusqu'à la limite de détection (pools 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9).
- D'un ARN extrait de mélanges d'échantillons respiratoires négatifs pour le SARS-CoV-2 (pool Négatif).

### Panel d'échantillons testés

- Neuf mélanges d'échantillons respiratoires naso-pharyngés de patients présentant des valeurs de Ct similaires, dont un constitué de sérums négatifs. Les mélanges les plus concentrés (pools 2, 3 et 4) sont testés une seule fois. Les mélanges les moins concentrés (pools 5, 6, 7, 8 et 9) et le négatif sont testés en triplicats
- ARN extrait d'un surnageant de culture virale dilué au 1000e servant de contrôle positif.

### Technique de référence CNR\*

Extraction avec le kit d'extraction de virus NucleoSpin Dx (Réf. Macherey Nagel 740895.50). Système de RT-PCR quantitative en une étape SuperScript™ III Platinum® (Réf. Invitrogen 1732-020). Deux cibles : IP2 et IP4. Taille du test : 5 µL

### Technique évaluée selon le manuel Genestore

Taille de l'échantillon de test : 3,5 µL. Système ABI 7500

### Conclusion de l'étude :

Le CNR considère et valide que le kit GeneStore " Détection Expert 1S™ SARS-CoV-2 " présente une sensibilité acceptable pour la détection du SARS-CoV-2.

## VALIDATION CLINIQUE : SENSIBILITE ET SPECIFICITE <sup>3</sup>

Une étude d'évaluation clinique a été réalisée pour évaluer les performances du test GeneStore (Détection Expert 1S™ SARS-CoV-2) à l'aide d'échantillons d'échantillonnage nasopharyngé (NP) de patients :

Au total, vingt et un (21) échantillons ont été testés:

- 11 échantillons issus de prélèvement nasopharyngé par écouvillons positifs
- 10 échantillons issus de prélèvement nasopharyngé par écouvillons négatifs

Le protocole utilisé dans cette étude vise à valider les performances du test dans la détection de la présence du virus directement sur des échantillons prélevés sans l'étape d'extraction de l'ARN.

Les résultats de l'étude :

- Sensibilité : 100%.
- Spécificité : 100%.
- Précision de l'analyse: excellente (dispersion n'excédant pas 1,5% sur l'ensemble de la population testée)
- Efficacité de la mesure va au-delà d'une dilution au 1/ 10 000 de l'échantillon à tester.
- Gain de temps (généralisé par la simplification du processus d'analyse avec le test GeneStore)

## PRECISION 6 : REPETABILITE

La répétabilité est définie comme la variation des lectures ou la proximité des valeurs mesurées lorsque la même personne mesure plusieurs fois le même échantillon en utilisant le même équipement et la même méthode dans les mêmes conditions.

La répétabilité a été mesurée en analysant les 5 réplicats de chaque dilution d'échantillon en un seul passage. La répétabilité a été calculée comme le pourcentage de coefficient de variance (% CV) de Cqs d'un échantillon au sein d'un seul passage.

Dilution de l'échantillon	SARS-CoV-2 N1			SARS-CoV-2 N2		
	Moyenne des Cq	% de détection des réplicats	Coefficient de Variance (%)	Moyenne des Cq	% de détection des réplicats	Coefficient de Variance (%)
2857 copies par µl	27.59	100%	0.21	27.17	100%	0.25
285.7 copies par µl	30.49	100%	0.67	29.95	100%	0.57
28.57 copies par µl	33.80	100%	0.60	33.13	100%	0.95

## PRECISION 6: REPRODUCTIBILITE INTER-LOT

La reproductibilité est une étude inter-lots qui détermine si le test peut être effectué avec succès sur plusieurs lots du dispositif médical testé et produire les mêmes résultats. Un écart type relatif inférieur à 35 % est acceptable. Ces valeurs rendent compte de la variabilité inhérente des systèmes biologiques.

La reproductibilité a été mesurée en analysant les 5 réplicats de chaque dilution d'échantillon sur trois analyses sur un instrument en utilisant les trois lots de fabrication distincts du test. La répétabilité a été calculée comme le pourcentage de coefficient de variance (% CV) de Cqs d'un échantillon entre les trois séries configurées sur un instrument utilisant la même machine RT-PCR.

Dilution de l'échantillon	SARS-CoV-2 N1			SARS-CoV-2 N2		
	Moyenne des Cq	% de détection des réplicats	Coefficient de Variance (%)	Moyenne des Cq	% de détection des réplicats	Coefficient de Variance (%)
2857 copies par µl	28.32	100%	2.22	27.89	100%	2.23
285.7 copies par µl	31.26	100%	2.13	30.73	100%	2.23

## PRECISION 6: REPRODUCIBILITE JOURNALIERE

La reproductibilité journalière est une étude qui détermine si le test peut être réalisé avec succès pour produire les mêmes résultats sur plusieurs jours. Un écart-type relatif inférieur à 35 % est acceptable. Ces valeurs reflètent la variabilité inhérente des systèmes biologiques.

La reproductibilité a été mesurée en analysant 3 répétitions de différentes dilutions d'échantillons sur 4 jours différents. La reproductibilité a été calculée comme le pourcentage du coefficient de variance (%CV) des Cqs.

Dilution de l'échantillon	SARS-CoV-2 N1			SARS-CoV-2 N2		
	Moyenne des Cq	% de détection des réplicats	Coefficient de Variance (%)	Moyenne des Cq	% de détection des réplicats	Coefficient de Variance (%)
2857 copies par µl	27.78	100%	1.65	27.17	100%	1.56
285.7 copies par µl	31.39	100%	1.39	30.81	100%	1.21

## PRECISION 6: REPRODUCTIBILITE INTER-OPERATEUR

La reproductibilité est une étude inter-technicien qui détermine si le test peut être effectué avec succès par tous les techniciens et produire les mêmes résultats. Un écart type relatif inférieur à 35 % est acceptable. Ces valeurs rendent compte de la variabilité inhérente des systèmes biologiques.

La reproductibilité a été mesurée en analysant les 5 réplicats de chaque dilution d'échantillon en un seul passage. La répétabilité a été calculée comme le pourcentage du coefficient de variance (%CV) du Cqs d'un échantillon par deux préparations de PCR par 2 techniciens différents utilisant le même thermocycleur.

Dilution de l'échantillon	SARS-CoV-2 N1			SARS-CoV-2 N2		
	Moyenne des Cq	% de détection des réplicats	Coefficient de Variance (%)	Moyenne des Cq	% de détection des réplicats	Coefficient de Variance (%)
2857 copies par µl	28.30	100%	2.18	27.86	100%	2.13
285.7 copies par µl	30.72	100%	2.59	30.16	100%	2.47
28.57 copies par µl	34.53	100%	1.85	33.86	100%	1.88

## SPECIFICITE ANALYTIQUE 6 : LIMITE DE DETECTION (LOD)

La sensibilité analytique a été définie comme la plus faible concentration d'échantillons pouvant être détectée de manière fiable.

Cette concentration sert donc de limite de détection de l'essai (LOD).

La reproductibilité a été mesurée en analysant 30 réplicats de la même dilution d'échantillon en un seul passage. La répétabilité a été calculée comme le pourcentage du coefficient de variance (%CV) des Cqs sur les 30 échantillons.

Dilution de l'échantillon	SARS-CoV-2 N1			SARS-CoV-2 N2		
	Moyenne des Cq	% de détection des réplicats	Coefficient de Variance (%)	Moyenne des Cq	% de détection des réplicats	Coefficient de Variance (%)
28.57 copies par µl	32.50	100%	1.6	32.10	100%	1.2

## BIBLIOGRAPHIE

1. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Laboratory support by specialised laboratories in the EU/EEA. At: [ecdc.europa.eu/en/novel-coronavirus/laboratory](https://ecdc.europa.eu/en/novel-coronavirus/laboratory); updated 8 February 2020. Accessed 19 March 2020.

2. ISO15223-1: 2016 - Medical devices Symbols to be used with medical device labels, labelling and information to be supplied — Part 1: General requirements

3. Rapport de validation Clinique – Laboratoire investigateur \* - Octobre 2020, échantillons testés par le Kit GENESTORE sur le thermocycleur Bioer Line-Gene 9660.

4. Protocol: Real-time RT-PCR assays for the detection of SARS-CoV-2, [https:// www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/whoinhouseassays.pdf](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/whoinhouseassays.pdf) US CDC Real-Time Reverse Transcription PCR Panel for Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/ PMC7392423/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7392423/)

5. [https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2020/09/Rapport\\_GENESTORE\\_200907.pdf](https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2020/09/Rapport_GENESTORE_200907.pdf)

6. GeneStore France - étude de la performance analytique du test GeneStore (Précision : répétabilité et reproductibilité, spécificité analytique/ LOD) – 2021/2022 - France

\* Pour plus de détails sur l'étude de validation clinique, merci de nous adresser votre demande à l'adresse email suivante: [qa@genestore.eu](mailto:qa@genestore.eu)

## AVIS AUX UTILISATEURS

Tout incident grave survenu en rapport avec le dispositif doit être signalé à GENESTORE France (e-mail : [qa@genestore.eu](mailto:qa@genestore.eu), Contact : +33 4 88 70 01 65) et à l'autorité compétente de l'État membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

## SUPPORT TECHNIQUE/ RECLAMATIONS

Pour obtenir des informations sur ce kit, ou pour toute réclamation, contactez nous par email : [qa@genestore.eu](mailto:qa@genestore.eu), ou par téléphone au +33 4 88 70 01 65

## LIMITE DE GARANTIE

Genestore France SAS ainsi que les sites Genestore affiliés à travers le monde, garantissent leurs produits conformément aux termes et aux conditions de vente décrites sur [www.genestore.org/terms-andconditions.html](http://www.genestore.org/terms-andconditions.html). Pour toutes questions, merci de nous contacter à l'adresse suivante : [qa@genestore.eu](mailto:qa@genestore.eu)



### GeneStore France SAS

800 Avenue du Château de Jouques,  
Gémenos, Provence-Alpes-Côte  
d'Azur, 13420, France