

Note d'information pour le produit :
ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex
(Références : **IDSARSCOV-UKSA-100 et IDSARSCOV-UKSA-500**)

Date : 10/03/2021

Chers clients d'ID SOLUTIONS,

Vous utilisez dans vos laboratoires le kit ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex mis sur le marché dans le cadre d'une dérogation délivrée par l'ANSM le 27 janvier 2021.

Par ce courrier, nous vous informons qu'un des composants de ce kit, le Mélange Réactionnel d'Amplification ARM-IDSARSCOV2-UKSA contient du Chlorure de tétraméthylammonium qui est un composant classé dangereux.

Ce composant n'est pas identifié ni dans la notice d'utilisation ni sur les étiquettes qui vous ont été fournies avec le kit ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex mis sur le marché par dérogation.

Les mentions de danger associées au Chlorure de tétraméthylammonium sont les suivantes :

H302 - Nocif en cas d'ingestion.

H371 - Risque présumé d'effets graves pour les organes (système nerveux central) (par ingestion).

H412 - Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

IL EST RECOMMANDE de porter des gants et des lunettes de sécurité et respecter les conseils de sécurité suivants :

P308+P311 - EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P260 - Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.

P264 - Se laver les mains, les avant-bras et le visage soigneusement après manipulation.

P270 - Ne pas manger, boire ou fumer en manipulant ce produit.

P301+P312 - EN CAS D'INGESTION : Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin/ en cas de malaise.

P330 - Rincer la bouche.

P405 - Garder sous clef.

P501 - Éliminer le contenu/récipient dans un centre de collecte de déchets dangereux ou spéciaux, conformément à la réglementation locale, régionale, nationale et/ou internationale.

Pour obtenir plus d'informations, consulter la fiche de données de sécurité (FDS) appropriée. Elle est disponible sur demande à l'adresse : info@id-solutions.fr

Il est à noter qu'il est indispensable de respecter les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

Il n'y a pas de précaution d'utilisation supplémentaire à prendre associée à la présence de ce composant dangereux.

En complément, vous trouverez jointe à ce courrier la notice d'utilisation à jour et en vigueur mentionnant ce composant dangereux.

L'étiquetage intégrant ce produit dangereux est le suivant :

1. ETIQUETTES DU PRODUIT

Référence IDSARSCOV-UKSA-100

▪ Etiquettes à l'extérieur du coffret

 ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex REF IDSARSCOV-UKSA-100	
FOR DETECTION OF SARS-CoV-2 UK and SA variant RNA POUR LA DÉTECTION DE L'ARN DE SARS-CoV-2 variant UK et SA	
 100	
ARM-IDSARSCOV2-UKSA	Amplification Reaction Mixture <i>Mélange Réactionnel d'Amplification</i> 800 µL
PAC-IDSARSCOV2-UKSA	Positive Amplification Control <i>Contrôle d'Amplification Positif</i> 100 µL
<i>In Vitro Diagnostic use only / Utilisation in vitro du dispositif</i>	
 ID SOLUTIONS , 310 rue Louis Pasteur, 34790 Grabels, FRANCE Tel : +33 (0)4 67 79 72 60 / Fax : + 33 (0)4 67 45 36 95	
 	

ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex IDSARSCOV-UKSA-100		
	ZZZZ/YY	LOT XXX
ARM-IDSARSCOV2-UKSA  	Amplification Reaction Mixture <i>Mélange Réactionnel d'Amplification</i> WARNING / ATTENTION Contains: Tetramethylammonium chloride / Contient: Chlorure de tetramethylammonium H412 - Harmful to aquatic life with long lasting effects. Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.	XXX
PAC-IDSARSCOV2-UKSA	Positive Amplification Control <i>Contrôle d'Amplification Positif</i> Product not classified as dangerous according to the regulations / Produit non classé comme dangereux selon le règlement (CE) N° 1272/2008 [CLP]	VVV
	Ver0221 www.id-solutions.fr - E-mail: info@id-solutions.fr	 -16°C 

▪ Etiquettes à l'intérieur du coffret

Attention	GHS07  GHS08 
Chlorure de tétraméthylammonium H302 - Nocif en cas d'ingestion. H371 - Risque présumé d'effets graves pour les organes (système nerveux central) (par ingestion). H412 - Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.	
P308+P311 - EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. P260 - Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. P264 - Se laver les mains, les avant-bras et le visage soigneusement après manipulation. P270 - Ne pas manger, boire ou fumer en manipulant ce produit. P301+P312 - EN CAS D'INGESTION: Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin/ en cas de malaise. P330 - Rincer la bouche. P405 - Garder sous clef. P501 - Éliminer le contenu/récipient dans un centre de collecte de déchets dangereux ou spéciaux, conformément à la réglementation locale, régionale, nationale et/ou internationale.	

WARNING	GHS07  GHS08 
Chlorure de tetramethylammonium H302 - Harmful if swallowed. H371 - May cause damage to organs. H412 - Harmful to aquatic life with long lasting effects.	
P308+P311 - IF exposed or concerned: call a POISON CENTER or doctor/physician. P260 - Do not breathe dust/fume/gas/mist/vapours/spray. P264 - Wash hands/skin thoroughly after handling. P270 - Do not eat, drink or smoke when using this product. P301+P312 - IF SWALLOWED: call a POISON CENTER or doctor/physician IF you feel unwell. P330 - Rinse mouth. P405 - Store locked up. P501 - Dispose of contents/container to hazardous or special waste collection center, in accordance with local, regional, national and / or international regulations.	

▪ **Etiquettes à l'extérieur du coffret**

 ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex REF IDSARSCOV-UKSA-500	
FOR DETECTION OF SARS-CoV-2 UK and SA variant RNA POUR LA DÉTECTION DE L'ARN DE SARS-CoV-2 variant UK et SA	
 500	
ARM-IDSARSCOV2-UKSA	Amplification Reaction Mixture <i>Mélange Réactionnel d'Amplification</i>
	5 x 800 µL
PAC-IDSARSCOV2-UKSA	Positive Amplification Control <i>Contrôle d'Amplification Positif</i>
	100 µL
In Vitro Diagnostic use only / Utilisation in vitro du dispositif	
 ID SOLUTIONS, 310 rue Louis Pasteur, 34790 Grabels, FRANCE Tel : +33 (0)4 67 79 72 60 / Fax : + 33 (0)4 67 45 36 95	
 	

ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex IDSARSCOV-UKSA-500	
 ZZZZ/YY	
 XXX	
ARM-IDSARSCOV2-UKSA	Amplification Reaction Mixture <i>Mélange Réactionnel d'Amplification</i>
	XXX
  WARNING / ATTENTION Contains: Tetramethylammonium chloride / Contient: Chlorure de tetramethylammonium H412 - Harmful to aquatic life with long lasting effects. Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.	
PAC-IDSARSCOV2-UKSA	Positive Amplification Control <i>Contrôle d'Amplification Positif</i>
	VVV
Product not classified as dangerous according to the regulations / Produit non classé comme dangereux selon le règlement (CE) N° 1272/2008 [CLP]	
 Ver0221 www.id-solutions.fr - E-mail: info@id-solutions.fr	 -16°C  -26°C 

▪ **Etiquettes à l'intérieur du coffret**

Attention	GHS07  GHS08 
Chlorure de tétraméthylammonium H302 - Nocif en cas d'ingestion. H371 - Risque présumé d'effets graves pour les organes (système nerveux central) (par ingestion). H412 - Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.	
P308+P311 - EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.	
P260 - Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. P264 - Se laver les mains, les avant-bras et le visage soigneusement après manipulation. P270 - Ne pas manger, boire ou fumer en manipulant ce produit.	
P301+P312 - EN CAS D'INGESTION: Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin/ en cas de malaise.	
P330 - Rincer la bouche. P405 - Garder sous clef. P501 - Éliminer le contenu/récipient dans un centre de collecte de déchets dangereux ou spéciaux, conformément à la réglementation locale, régionale, nationale et/ou internationale.	

WARNING	GHS07  GHS08 
Chlorure de tetramethylammonium H302 - Harmful if swallowed. H371 - May cause damage to organs. H412 - Harmful to aquatic life with long lasting effects.	
P308+P311 - IF exposed or concerned: call a POISON CENTER or doctor/physician.	
P260 - Do not breathe dust/fume/gas/mist/vapours/spray. P264 - Wash hands/skin thoroughly after handling. P270 - Do not eat, drink or smoke when using this product.	
P301+P312 - IF SWALLOWED: call a POISON CENTER or doctor/physician IF you feel unwell.	
P330 - Rinse mouth. P405 - Store locked up. P501 - Dispose of contents/container to hazardous or special waste collection center, in accordance with local, regional, national and / or international regulations.	

2. ETIQUETTES DES RÉACTIFS

ARM

id solutions **IVD**

ARM-IDSARSCOV2-UKSA

Amplification Reaction Mix Σ 100
Mélange Réactionnel d'Amplification

LOT XXX  YYYY/ZZ  -16°C 

Contains: Tetramethylammonium chloride / *Contient: Chlorure de tetraméthylammonium*

H412 - Harmful to aquatic life with long lasting effects. / Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme

Warning  **Attention** 

ID SOLUTIONS, 310, rue Louis Pasteur, 34790 Grabels, FRANCE - Tel. +33 4 67 79 72 60

PAC

id solutions **CONTROL+** **IVD**

PAC-IDSARSCOV2-UKSA

Positive Amplification Control 100 μ L
Contrôle d'Amplification Positif

LOT XXX  YYYY/ZZ  -16°C

ID SOLUTIONS, 310, rue Louis Pasteur, 347100 Grabels, FRANCE

Dans ce cadre, nous vous demandons de bien vouloir prendre en compte la présence de ce composant dangereux et respecter les recommandations et conseils de sécurité décrits plus haut lors de l'utilisation de ce kit.

Pour toute question concernant ces informations, vous pouvez nous contacter à l'adresse mail suivante : info@id-solutions.fr.

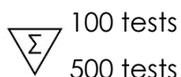
Nous vous remercions pour votre confiance continue dans les produits ID SOLUTIONS.

Bien sincèrement,

Lise Grewis
 Directrice



Mode d'emploi du kit
ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex



Système de RT-PCR **qualitative** en temps réel pour le **criblage des variants du SARS-CoV-2** à partir d'ARN extrait

Echantillon : Acides nucléiques extraits à partir d'échantillons biologiques humains



Prévu pour une utilisation in vitro



SOMMAIRE

1	Utilisation prévue	3
2	Principe du Test	3
1.	Type d'échantillons	3
2.	Extraction des acides nucléiques.....	3
3.	Amplification et détection en temps réel	3
4.	Contrôles	4
3	Réactifs et matériel	5
1.	Composition du kit.....	5
2.	Préparation et conditions de stockage des réactifs	5
3.	Réactifs et Matériel requis mais non fourni dans le kit	6
4	Consignes et précautions d'utilisation	6
1.	Consignes d'hygiène et de sécurité	6
2.	Précautions d'utilisation	7
5	Procédure	8
1.	Protocole d'extraction d'acides nucléiques et conditions de stockage des échantillons d'ARN.....	8
2.	Protocole de détection en temps réel	8
6	Analyse et interprétation des résultats	9
1.	Analyse des résultats	9
2.	Validation et interprétation des résultats.....	10
7	Evaluation des performances analytiques	13
1.	Spécificité analytique.....	13
2.	Sensibilité analytique – Limite de détection	14
3.	Précision.....	17
8	Evaluation des performances cliniques	19
9	Résolution des problèmes	22
10	Limitations	23
11	Support technique et documentation	24
12	Symboles utilisés	25
13	Dernière révision	25

1 UTILISATION PREVUE

Le kit ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex est un test de diagnostic *in vitro* basé sur la technologie de la RT-PCR en temps réel (ou RT-qPCR) pour la détection qualitative de l'ARN viral du coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2) et d'identifier s'il s'agit du **variant VOC20212/01 (501Y.V1**, dit « Variant Anglais ») ou d'un **variant 501Y.V2** (dit « variant Sud-africain ») ou **501Y.V3** (dit « variant Brésilien »).

Le kit ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex est destiné aux laboratoires cliniques recevant des échantillons nasopharyngés, oropharyngés par écouvillonnage, des échantillons d'expectorations (prélèvements réalisés par un professionnel de santé autorisé). Ainsi, une extraction d'acides nucléiques doit être réalisée au préalable avant de procéder au test. Le kit doit être utilisé avec un thermocycleur de PCR en temps réel. Les performances de ce réactif sont garanties uniquement si les laboratoires utilisateurs respectent la norme ISO15189.

Les résultats du kit ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex permettent de dépister, parmi les personnes positive au SARS-CoV-2, celles infectées par les variants « Anglais », « Sud-Africain » ou « Brésilien » et donc d'aider au diagnostic de la COVID-19. Cependant, il ne doit pas être utilisé seul, mais en association avec d'autres techniques de diagnostic jugées nécessaires par le clinicien.

Le kit ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex ne doit être utilisé qu'en seconde intention, sur des échantillons pour lesquels la détection virologique du SARS-CoV-2 a été préalablement réalisée par un réactif autorisé selon la réglementation en vigueur.

Le kit ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex doit être utilisé uniquement par des professionnels de laboratoires, ayant reçus les instructions et la formation aux techniques de PCR en temps réel en lien avec le thermocycleur utilisé et aux procédures de diagnostic *in vitro*.

Le kit ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex est destiné à une utilisation pour le diagnostic *in vitro*.

2 PRINCIPE DU TEST

1. Type d'échantillons

Le kit ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex doit être utilisé avec des échantillons d'acides nucléiques préalablement extraits à partir d'échantillons provenant de prélèvements nasopharyngés, oropharyngés par écouvillonnage, des échantillons d'expectorations.

2. Extraction des acides nucléiques

Les acides nucléiques du génotype initial et des variants SARS-CoV-2 doivent être extraits des échantillons avant d'être amplifiés par RT-qPCR.

Il est important de s'assurer que le système d'extraction des acides nucléiques utilisé est compatible avec la technologie de PCR en temps réel. La qualité des ARN extraits est primordiale pour assurer la performance de l'ensemble du test.

L'aptitude de la procédure d'extraction des acides nucléiques à utiliser avec le kit ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex doit être validée par l'utilisateur.

3. Amplification et détection en temps réel

▪ Principe

La technologie utilisée pour le test est la RT-PCR en temps réel, qui permet dans un premier temps la transcription inverse de l'ARN extrait en ADN complémentaire (ADNc), puis dans un deuxième temps, l'amplification de séquences spécifiques des génomes ciblés. La présence des acides nucléiques est ensuite détectée par une augmentation de la fluorescence due à l'hydrolyse des sondes spécifiques lors de l'étape d'amplification (technique des sondes d'hydrolyse 5' nucléase).

▪ Séquences amplifiées du SARS-CoV-2 et des variants

Les amorces utilisées dans le test **SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex** permettent d'amplifier :

- Deux séquences cibles spécifiques du coronavirus SARS-CoV-2 au niveau de la séquence codant la protéine de nucléocapside (nommée N) et de la séquence codant l'ARN polymérase dépendante de l'ARN (nommée RdRP).
- Deux séquences cibles au niveau de la séquence codant la protéine de spicule (SPIKE - S) dont une spécifique des variants VOC202012/01, 501Y.V2 et 501Y.V3 et une spécifique du variant VOC202012/01 uniquement.

ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex est un système triplex qualitatif qui permet, pour chaque échantillon, l'amplification simultanée des ARN cibles en une seule réaction. Les amorces et les sondes doublement marquées (sonde d'hydrolyse) sont conçues dans une région spécifique pour permettre une amplification et une détection sensibles et spécifiques de l'ARN du virus SARS-CoV-2 et ses variants s'ils sont présents dans l'échantillon.

La présence d'acides nucléiques est détectée par une augmentation de la fluorescence due à l'hydrolyse des sondes lors de l'amplification. Les signaux de fluorescence pour l'amplification des sondes spécifiques du gène N et RdRP sont mesurés dans le canal Cy5 (cible N et RdRP) ; le signal pour la détection du variant VOC202012/01 est mesuré à la fois sur le canal FAM™ (mutation Spike Del69-70) et VIC®/HEX™ (cible N501Y), alors que les variants 501Y.V2 et 501Y.V3 sont mesurés dans le canal VIC®/HEX™ uniquement (cible N501Y).

▪ Instruments de PCR en temps réel

Le kit **ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex** a été développé et validé pour être utilisé avec les thermocycleurs de PCR en temps réel listés dans le tableau 1.

Tableau 1. LISTE DES INSTRUMENTS DE PCR EN TEMPS REEL VALIDES AVEC LE KIT **ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex**

Fabricant	Modèle
Applied Biosystems	QuantStudio 5
Roche	LightCycler 480 (System II)
Bio-Rad	CFX96 Touch real-Time PCR detection System



S'assurer que les instruments et les équipements ont été vérifiés et étalonnés conformément aux recommandations du fabricant.

4. Contrôles

▪ Contrôles d'amplification

Les contrôles suivants doivent être utilisés pour chaque série d'analyse :

Contrôle d'Amplification Positif (PAC)

Ce contrôle est présent dans le kit (PAC-IDSARSCOV2-UKSA). Il contient un mélange d'ADN synthétique de chaque cible, calibré aux valeurs mentionnées dans la fiche de contrôle qualité du lot correspondant.

Il permet de valider l'étape d'amplification de chaque cible.

Contrôle Négatif d'Amplification (NAC)

Ce contrôle n'est pas présent dans le kit. Il correspond au dépôt de 8 µL de mélange réactionnel d'amplification (ARM- IDSARSCOV2-UKSA) et 5 µL d'eau sans nuclease.

Le contrôle doit être amplifié en même temps et selon le même protocole que les échantillons extraits de patients. Il permet de vérifier l'absence de contamination lors de l'étape d'amplification.

3 REACTIFS ET MATERIEL

1. Composition du kit

Le kit **ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex** est disponible sous deux références : IDSARSCOVID2-UKSA-100 (100 réactions) et IDSARSCOVID2-UKSA-500 (500 réactions). La composition des kits est présentée dans le tableau ci-dessous :

TABEAU 2. COMPOSITION DES KITS **ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex**

COMPOSANT		REFERENCE KIT 100 réactions	REFERENCE KIT 500 réactions	COULEUR ETIQUETTE	DESCRIPTION
DESIGNATION	NOM	IDSARSCOVID2-UKSA-100	IDSARSCOVID2-UKSA-500		
PAC-IDSARSCOVID2-UKSA	Contrôle d'Amplification Positif	100 µL 1 tube	100 µL 1 tube		Mélange d'acides nucléiques spécifiques du SARS-CoV-2, des variants VOC202012/01, 501Y.V2 et 501Y.V3.
ARM-IDSARSCOVID2-UKSA	Mélange Réactionnel d'Amplification	800 µL 1 tube	800 µL 5 tubes		Mélange réactionnel contenant la Reverse Transcriptase, la Taq polymérase, les amorces et les sondes d'hydrolyse pour la détection des cibles du SARS-CoV-2 et des variants VOC202012/01, 501Y.V2 et 501Y.V3.

2. Préparation et conditions de stockage des réactifs

Le kit **ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex** doit arriver congelé à la réception. Si l'un des composants du kit n'est pas congelé à l'arrivée ou si l'un des tubes a été endommagé pendant le transport, veuillez contacter **ID SOLUTIONS**.

Avant et après ouverture du kit	Les réactifs doivent être stockés entre -16 °C et -26 °C et à l'abri de la lumière
Après décongélation	Les réactifs doivent être maintenus sur bloc réfrigérant (+2 °C/+8 °C) ou sur glace durant toute leur utilisation
Avant utilisation	Les réactifs doivent être totalement décongelés, puis ils doivent être homogénéisés
Après utilisation	Les réactifs doivent être replacés au plus vite entre -16 °C et -26 °C à l'abri de la lumière

TABEAU 3. CONDITIONS DE PREPARATION, DE STOCKAGE ET D'UTILISATION DES REACTIFS DU KIT **ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex**

DESIGNATION	NOM	PREPARATION	CONDITIONS DE STOCKAGE ET D'UTILISATION
PAC-IDSARSCOVID2-UKSA	Contrôle d'Amplification Positif	Prêt-à-l'emploi	Ne pas dépasser 3 cycles de congélation/décongélation
ARM-IDSARSCOVID2-UKSA	Mélange Réactionnel d'Amplification	Prêt-à-l'emploi	Ne pas dépasser 3 cycles de congélation/décongélation. Doit être conservé à l'abri de la lumière (stockage, durant la décongélation). Est sensible aux variations de température. Une fois décongelé, le réactif doit être utilisé immédiatement puis être replacé au congélateur entre -16 °C et -26 °C après son utilisation. Ne pas stocker le tube à température ambiante ou à 4 °C. Utiliser un bloc réfrigérant (+2 °C/+8 °C) ou de la glace tout au long de sa manipulation avant de le replacer dès que possible au congélateur.

Lorsqu'il est stocké dans les conditions de stockage spécifiées, le kit est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée. Il est recommandé de stocker les réactifs de PCR dans une zone de pré-amplification (tube(s) vert(s)) et le contrôle (tube rouge) dans une zone de post-amplification (manipulation des ADN).

Le kit est stable pendant 3 mois après ouverture en l'absence de contamination.



L'ARM-IDSARSCOVID2-UKSA est sensible aux variations de températures, suivre scrupuleusement les consignes de conditions de stockage et d'utilisation dans le tableau ci-dessus.

3. Réactifs et Matériel requis mais non fourni dans le kit

- Systèmes ou kits appropriés à l'extraction des acides nucléiques, respecter les instructions du fabricant (cf. principe du test)
- Thermocycleurs de PCR en temps réel validés avec le kit (cf. principe du test)
- Centrifugeuse pour tubes réactionnels ou plaque
- Plaques de 96 ou 384 puits ou tubes réactionnels avec films adhésifs ou bouchons pour la fermeture adaptés à chaque thermocycleur validé
- Portoir réfrigéré ou glace
- Pipettes de précision et pointes sans nucléases à filtres adaptés au volume à pipeter
- Eau distillée ou sans nucléases (DNase et RNase)

4 CONSIGNES ET PRECAUTIONS D'UTILISATION

L'utilisation de ce produit est limitée au personnel qualifié et formé aux techniques de PCR en temps réel et aux procédures de diagnostic *in vitro*. Les bonnes pratiques de laboratoire doivent être respectées.

Veillez lire les instructions avant de commencer le test.

1. Consignes d'hygiène et de sécurité

▪ Risque chimique

Les composants suivants (listés dans le tableau ci-dessous) de **SARS-CoV-2/UK/SA Variant** contiennent des substances dangereuses.

- Porter des gants et des lunettes de sécurité et respecter les conseils de sécurité de la présente rubrique.

Note : Les substances dangereuses n'ont pas obligation d'être accompagnées des mentions de danger et des conseils de prudence lorsque les quantités sont inférieures à 125 mL (EU 1272/2008 Annex I 1.5.2).

Composant	Substance dangereuse	Pictogrammes de danger	Mention de danger	Conseils de prudence
ARM-IDSARSCOV2-UKSA	Chlorure de tétraméthylammonium CAS 75-57-0	 ATTENTION	H302 H371 H412	P308+P311 P260 P264 P270 P301+P312 P330 P405 P501

Mention de danger

H302 - Nocif en cas d'ingestion.

H371 - Risque présumé d'effets graves pour les organes (système nerveux central) (par ingestion).

H412 - Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

Conseils de prudence

P308+P311 - EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P260 - Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.

P264 - Se laver les mains, les avant-bras et le visage soigneusement après manipulation.

P270 - Ne pas manger, boire ou fumer en manipulant ce produit.

P301+P312 - EN CAS D'INGESTION: Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin/ en cas de malaise.

P330 - Rincer la bouche.

P405 - Garder sous clef.

P501 - Éliminer le contenu/récipient dans un centre de collecte de déchets dangereux ou spéciaux, conformément à la réglementation locale, régionale, nationale et/ou internationale.

- Pour obtenir plus d'informations, consulter la fiche de données de sécurité (FDS) appropriée. Elle est disponible sur demande à l'adresse : info@id-solutions.fr.

▪ Risque infectieux

- Porter des vêtements de protection, notamment une blouse de laboratoire, un dispositif de protection des yeux et du visage ainsi que des gants jetables (des gants synthétiques sans latex sont recommandés) et manipuler les réactifs du kit ainsi que les échantillons de patients conformément aux bonnes pratiques de laboratoire requises. Se laver soigneusement les mains après avoir réalisé le test.
- Ne pas fumer, boire ni manger dans les zones où des échantillons ou des réactifs du kit sont manipulés.
- Les surfaces souillées par un liquide contaminant doivent être soigneusement nettoyées avec un désinfectant efficace. Le matériel utilisé pour le nettoyage devra être éliminé dans un container spécial pour déchets contaminés.
-  Ne pas placer de solutions contenant de l'eau de Javel dans un autoclave.
- Éliminer l'ensemble des échantillons et du matériel utilisé pour réaliser le test comme s'ils étaient potentiellement infectieux conformément à la réglementation locale, régionale, nationale et/ou internationale.

2. Précautions d'utilisation

- Le risque infectieux et/ou dangereux doit être pris en compte lors des manipulations, en accord avec les procédures de sécurité en vigueur du laboratoire.

 **Les échantillons provenant des patients et les échantillons d'ARN conservés dans de mauvaises conditions peuvent donner des résultats erronés.**

- Ne pas utiliser le kit ni l'un des réactifs du kit au-delà de la date de péremption indiquée.
- Ne pas mélanger de réactifs provenant d'autres kits portant des numéros de lot différents.
- Ne pas utiliser de réactifs ayant été mal conservés.
- Tous les réactifs doivent être décongelés à +18 °C/+25 °C et homogénéisés avant utilisation. Se reporter au chapitre 3.2 « Préparation et conditions de stockage des réactifs pour les précautions d'utilisation à respecter ».

Faire attention à l'ensemble des points listés ci-dessous :

- Suivez attentivement les recommandations d'utilisation fournies pour vous assurer que le test est effectué correctement. Tout écart peut affecter les performances de test.
- Avant toute utilisation, vérifier que le produit et ses composants ne sont pas endommagés, sont conformes (nombre de tubes, volume), sont correctement étiquetés, ont été congelés à la réception du produit.
- Utiliser des zones de travail séparées les unes des autres pour les différentes étapes : préparation des échantillons et préparation de la réaction d'amplification/détection. Il est recommandé d'adopter « une marche en avant » lors de la réalisation des différentes étapes. Porter des gants dans chaque zone de travail et changer les avant d'entrer dans une zone différente.
- Utiliser du matériel et des consommables dédiés pour chaque zone de travail et ne pas les déplacer d'une zone à l'autre.
- Éviter les contaminations par DNase et RNase de l'échantillon et des composants du kit qui pourraient entraîner une dégradation de l'ARN / ADN matrice, ou une contamination par transfert de PCR, ce qui pourrait entraîner un signal faussement positif. Utiliser du matériel de laboratoire exempts de nucléase (pipettes, pointes de pipette, flacons de réaction) et porter des gants lors de l'exécution du test. Utilisez des pointes de pipette résistantes aux aérosols pour toutes les étapes de pipetage.
- Séparer et ne pas mettre en contact le matériel positif et/ou potentiellement positif avec des composants du kit.
- Ne pas ouvrir les tubes/plaques de réaction après l'amplification afin d'éviter toute contamination par les amplicons.
- Ne pas réutiliser des tubes réactionnels après une PCR (ex : autoclaver les tubes). Les acides nucléiques amplifiés ne seront pas dégradés.

5 PROCEDURE

1. Protocole d'extraction d'acides nucléiques et conditions de stockage des échantillons d'ARN

Pour chaque extraction, inclure un contrôle négatif d'extraction (NEC-H₂O)(cf. principe du test).

Du fait des risques de contamination par des ribonucléases (RNases), l'extraction des ARN est plus délicate qu'une extraction d'ADN. Des précautions strictes doivent être prises pour éviter une dégradation des ARN post-extraction. Se référer aux recommandations du fabricant du système d'extraction pour les conditions de conservation de l'échantillon après extraction.

2. Protocole de détection en temps réel

▪ Préparation de la réaction d'amplification par RT-qPCR

L'échantillon à amplifier correspond au produit d'éluion obtenu après extraction des acides nucléiques.

Remarque : La réaction d'amplification est à réaliser dans la zone dédiée à l'amplification.

1. Préparer un plan d'analyse des échantillons et contrôles, en prenant soin d'éloigner, si possible, le contrôle d'amplification positif (**PAC-IDSARSCOV2-UKSA**) des échantillons. Il est également conseillé d'encadrer les échantillons par deux contrôles NAC, au début et à la fin de la série d'échantillons.
2. Décongeler les réactifs du kit ID™ **SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex** à une température de +18 °C/+25 °C à l'abri de la lumière. Une fois décongelés, les placer sur un bloc réfrigérant (+2 °C/+8 °C) ou de la glace.



Après utilisation replacer les réactifs dès que possible, ARM-IDSARSCOV2-UKSA et le PAC-IDSARSCOV2-UKSA, à une température de -16 °C/-26 °C.

3. Homogénéiser (vortex) les tubes **ARM-IDSARSCOV2-UKSA** et **PAC-IDSARSCOV2-UKSA** et les centrifuger brièvement.
4. Distribuer **8 µL d'ARM-IDSARSCOV2-UKSA** par puits.



Veillez utiliser du matériel (plaques de 96 puits ou tubes réactionnels avec films adhésifs ou bouchons pour la fermeture) adapté au thermocycleur à utiliser. Respecter les instructions fournies par le fabricant.



Après dépôt de l'ARM limiter au maximum le temps avant lancement du run sur le thermocycleur.

5. Ajouter dans le mix réactionnel soit :
 - 5 µL d'ARN extrait de chaque échantillon à analyser
 - 5 µL de PAC-IDSARSCOV2-UKSA
 - 5 µL de NEC extrait
 - 5 µL d'eau sans nuclease (NAC)
6. Couvrir la plaque ou les tubes avec un film adhésif ou des bouchons adaptés.
7. Centrifuger à 1000 rpm pendant 1 minute pour collecter tous les réactifs.



Après dépôt limiter au maximum le temps avant lancement du run sur le thermocycleur.

▪ Programmation de la phase d'amplification de la PCR du thermocycleur

Remarque : Veuillez consulter les manuels d'utilisation des différents instruments de PCR en temps réel pour obtenir des informations générales sur leurs programmations.

1. Programmer sur le thermocycleur la lecture des détecteurs suivants pour chacun des puits à analyser

Tableau 4. PARAMETRES DE LECTURE DES THERMOCYCLEURS

CIBLE	CANAL DE LECTURE	LONGUEUR D'ONDES	QUENCHER
SPIKE Del69-70	FAM™	530 nm	non fluorescent
SPIKE N501Y	VIC®/HEX™	560 nm	non fluorescent
SARS-CoV-2	Cy5	670 nm	non fluorescent

Remarque : Pour les instruments nécessitant une référence interne, le mélange réactionnel d'amplification contient déjà du ROX.

2. Programmer sur le thermocycleur le programme d'amplification suivant :

Tableau 5. PROGRAMME DE RT-QPCR

ETAPES	PROGRAMME	CYCLES	ACQUISITION DE LA FLUORESCENCE		
			Applied Biosystems validés	Roche validés	CFX96
(1) Reverse Transcription	10 min 50 °C	1	---	---	---
(2) Activation de la Taq Polymérase	2 min 95 °C	1	---	---	---
(3) Amplification	Dénaturation de l'ADN	40	---	---	---
	Hybridation et élongation		FAM CY5 VIC	FAM (465-510) Cy5 / Cy5.5 (618-660) VIC/HEX/Yellow555 (533-580)	FAM Cy5 VIC

Note : La lecture de la fluorescence est réalisée à la **fin** de la phase d'élongation à 65°C.

- Sélectionner un volume final de **13 µL par PCR**.
- Placer la plaque dans le thermocycleur et lancer le programme décrit ci-dessus.
- Sceller la plaque en vue de son élimination conformément à la réglementation en vigueur.

6 ANALYSE ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Grâce à la PCR en temps réel l'intégralité de la cinétique d'amplification est mesurable (au-dessus de la ligne de base) et peut être quantifiée.

Les fluorescences peuvent alors être exprimées en logarithme. La phase exponentielle est linéarisée.

Note : Ct = Threshold cycle, Cq = cycle de quantification ou CP = Crossing point

1. Analyse des résultats

▪ Analyse des données sur les instruments Applied Biosystems validés

- Vérifier que **ROX** a bien été sélectionné dans le champ **PASSIVE REFERENCE** (le mix d'amplification contient une référence passive).
- Les cibles SARS-CoV-2 et des variants sont analysées une fois que les détecteurs/rapporteurs **CY5**, **FAM** et **VIC** ont été sélectionnés dans le champ **DETECTOR/REPORTER**.
- Placer les seuils au-dessus de la ligne de base, au milieu de la phase exponentielle.
- Pour chaque échantillon positif variant, un Ct est calculé en **FAM** et/ou en **VIC**. Les échantillons négatifs portant la mention **UNDETERMINED** sont affichés dans la colonne **Ct**.

- Pour les échantillons négatifs en FAM et en VIC, vérifier la présence d'un Ct en CY5.

▪ **Analyse des données sur les instruments Roche validés**

- L'analyse des cibles est effectuée en mode **ABSOLUTE QUANTIFICATION** en **CY5, FAM et VIC**.

- Pour chaque échantillon positif variant, un **CROSSING POINT (CP)** est calculé en **FAM** et/ou **VIC**.

- Pour chaque échantillon négatif variant, un **CROSSING POINT (CP)** est calculé en **CY5**.

- Utiliser la méthode **FIT POINTS** pour déterminer l'état (positif/négatif) des échantillons et des contrôles.

- Analyse à l'aide de la méthode Fit Points :

L'analyse à l'aide de la méthode **FIT POINTS** se déroule en trois étapes : **CYCLE RANGE ; NOISE BAND ; ANALYSIS**.

Lors de l'**ÉTAPE 1**, définir l'étendu du bruit de fond (background), pour cela définir le background entre 2 et 16 cycles.

Lors de l'**ÉTAPE 2**, sélectionner la définition du bruit de fond (noise band) en automatique et s'assurer que la ligne horizontale élimine le bruit de fond et traverse toutes les courbes au début de leur phase exponentielle. Sinon, ajuster le ligne de seuil manuellement.

Puis, lors de l'**ÉTAPE 3**, sélectionner la définition du seuil (threshold) de manière automatique.

▪ **Analyse des données sur l'instrument CFX96**

- Les cibles sont analysées sous l'onglet **QUANTITATION** en laissant uniquement les boutons **CY5, FAM et VIC** cochés.

- Dans l'onglet **SETTINGS**, sélectionner **Baseline Setting** puis **Apply Fluorescence Drift Correction**

- En mode **SINGLE THRESHOLD**, déplacer manuellement la ligne de seuil de façon qu'elle se trouve :

- au-dessus du bruit de fond
- dans la phase exponentielle de chaque courbe d'amplification.

- Un Cq en FAM et en VIC est calculé pour chaque échantillon positif. Les échantillons négatifs ou les contrôles sont désignés par la mention **N/A** dans la colonne **Cq**. Pour les échantillons négatifs en FAM et VIC, vérifier la présence d'un Cq en CY5.

2. Validation et interprétation des résultats

▪ **Validation de l'essai RT-PCR**

L'essai n'est validé que si tous les critères de validation décrits ci-dessous sont remplis.

Tableau 6. CRITERES DE VALIDATION POUR UN ESSAI DE RT-PCR DU KIT ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex

CONTROLE	RESULTAT ATTENDU	CRITERE DE VALIDATION
PAC-IDSARSCOV2-UKSA	Courbe spécifique du SARS-CoV-2 détecté en Cy5	Présence des trois courbes caractéristiques Se référer à la valeur de Cq indiquée sur la fiche de contrôle qualité (FCQ) du lot correspondant
	Courbe spécifique des variants avec la délétion 69-70 détecté en FAM™	
	Courbe spécifique des variants mutés en N501Y sur le gène spike détecté en VIC™	
NAC	Aucune détection	Absence totale de courbe caractéristique

Si tous les critères sont remplis, **l'essai est validé et les résultats peuvent être interprétés.**

Si tous les critères ne sont pas remplis, **l'essai est invalidé.** L'utilisateur peut décider de refaire le test après avoir vérifié les éléments décrits dans la section 9.

■ Interprétation des résultats

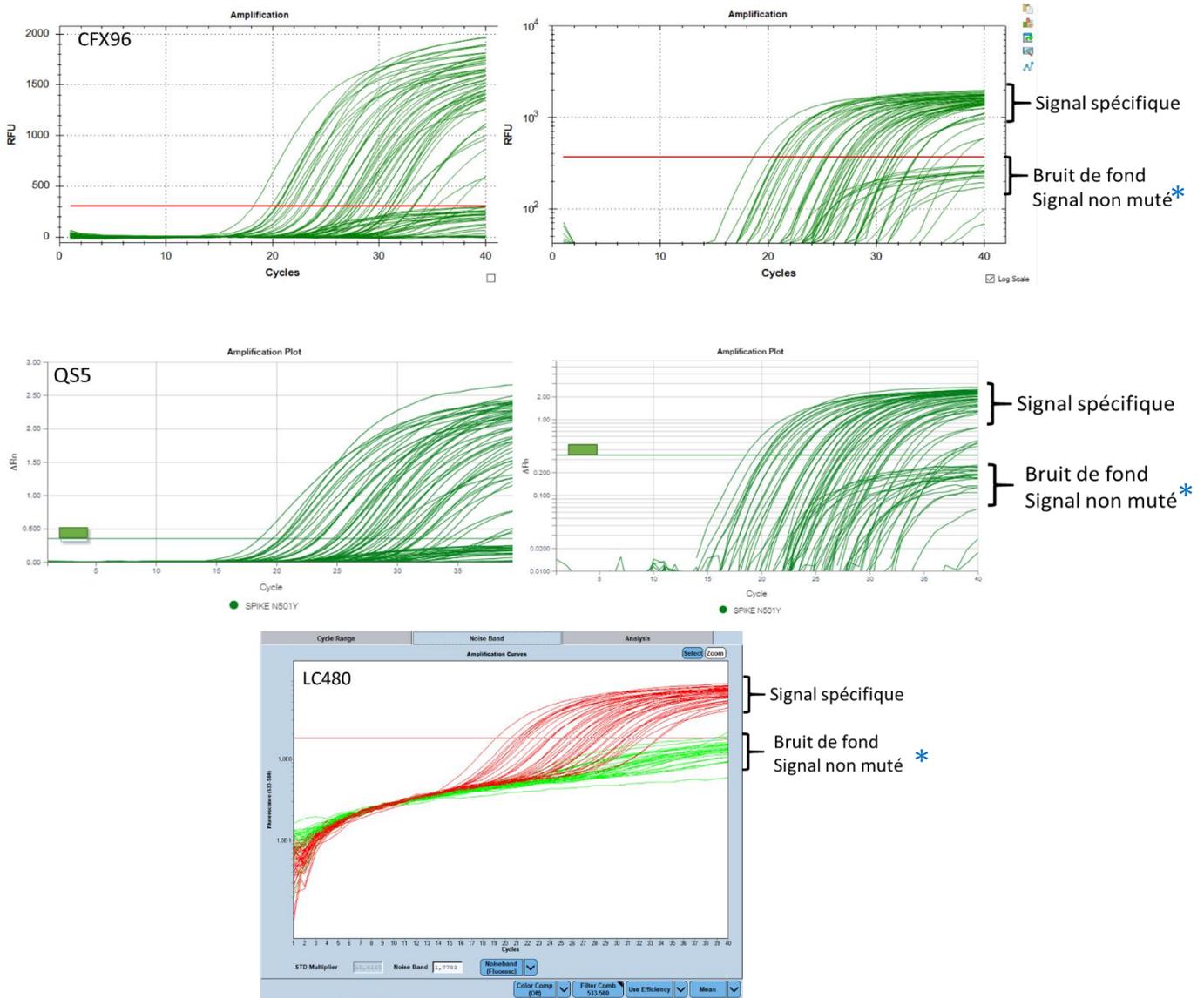
La présence ou l'absence d'ARN de SARS-CoV-2 dans l'échantillon testé est déterminée de façon **qualitative** à l'aide des valeurs de Cq (Quantification cycle) obtenues pour chaque échantillon et ce, pour chacune des cibles.

Note : le Cq est aussi nommé Ct (Threshold cycle).

Ajustez le seuil au-dessus de tout signal de bruit de fond vers le milieu de la phase exponentielle de la courbe d'amplification du témoin positif PAC-IDSARSCOV2-UKSA dans la vue logarithmique. La procédure choisie pour définir le seuil doit être utilisée de manière cohérente.

Du fait de la forte homologie de séquences entre les variants (différence d'un seul nucléotide), le canal VIC (mutation SPIKE N501Y) peut présenter un signal positif de faible amplitude dû à l'hybridation non-spécifique de la sonde sur la séquence non mutée N501*.

Il est donc important pour l'analyse du canal VIC de placer le seuil en suivant les exemples décrits pour chaque thermocycleur ci-dessous :



Concernant les canaux FAM et Cy5, suivre la procédure standard de fixation de seuil.

Pour chaque échantillon analysé, les résultats doivent être interprétés selon les critères suivants :

Tableau 7. INTERPRETATION DES RESULTATS

SARS-CoV-2 (Cy5)	SPIKE Del69-70 (FAM)	SPIKE N501Y (VIC)	INTERPRETATION	CONCLUSION
+	+	+	ARN spécifique au SARS-CoV-2 déecté avec présence des mutations Del69-70 et N501Y	L'échantillon contient des quantités détectables de l'ARN spécifique du SARS-CoV-2 avec suspicion du variant VOC202012/01 (dit « Variant Anglais »)
+	-	+	ARN spécifique au SARS-CoV-2 avec présence de la mutation N501Y	L'échantillon contient des quantités détectables de l'ARN spécifique du SARS-CoV-2 avec suspicion du variant 501Y.V2 (dit « variant Sud-africain) ou du variant 501Y.V3 (dit « variant Brésilien »)
+	+	-	ARN spécifique au SARS-CoV-2 détecté avec présence de la délétion Del69-70	L'échantillon contient des quantités détectables de l'ARN spécifique du SARS-CoV-2 « variant non recherché »
+	-	-	ARN spécifique au SARS-CoV-2 détecté	L'échantillon contient des quantités détectables de l'ARN spécifique du SARS-CoV-2
-	-	-	Non interprétable	Répéter le test ou réextraire puis répéter le test.

- L'absence d'une **courbe caractéristique et d'un Cq en FAM et en VIC/HEX** couplée à la **présence de Cq pour le CY5** correspond à un **échantillon positif pour la cible SARS-CoV-2**.
- La **présence** d'une **courbe caractéristique et d'un Cq en FAM et en VIC/HEX** couplée à la présence de Cq pour le CY5 correspond à un **échantillon positif pour la cible SARS-CoV-2 variant VOC202012/01 (dit « Variant Anglais »)**
- La **présence** d'une **courbe caractéristique et d'un Cq en VIC/HEX** et à l'**absence** d'une **courbe caractéristique et d'un Cq en FAM** couplée à la présence de Cq pour le CY5 correspond à un **échantillon positif pour les cibles SARS-CoV-2 variant 501Y.V2 (dit « variant Sud-africain) ou 501Y.V3 (dit « variant Brésilien »)**
- La **présence** d'une **courbe caractéristique et d'un Cq en FAM** et à l'**absence** d'une **courbe caractéristique et d'un Cq en VIC/HEX** couplée à la présence de Cq pour le CY5 correspond à un **échantillon positif pour la cible SARS-CoV-2 « variant non recherché »**.
- Un Cq supérieur ou égal à 36 cycles pour la cible SARS-CoV-2 en Cy5 correspond à un échantillon « sous la limite de détection » et ne doit pas être considéré pour la recherche de mutations.
- L'**absence de tout signal** rend le **résultat non interprétable**.

7 EVALUATION DES PERFORMANCES ANALYTIQUES

Les performances analytiques du kit **ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex** ont été déterminées au moyen d'analyses *in silico* et d'échantillons positifs fabriqués à partir de fragments d'ADN synthétiques représentant les différentes cibles recherchées par le test. L'ensemble des performances suivantes ont été obtenues conformément aux conditions décrites dans la procédure et avec l'utilisation des thermocycleurs suivants :

Fabricant	Modèle	Performances évaluées
Applied Biosystems	QuantStudio 5	Limite de détection Reproductibilité Inclusivité/Exclusivité Répétabilité Reproductibilité
Roche	LightCycler 480 (System II)	Limite de détection
Bio-Rad	CFX96 Touch real-Time PCR detection System	Limite de détection

1. Spécificité analytique

Inclusivité

Les séquences spécifiques de la souche SARS-CoV-2 ciblées par le test **ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex** sont recommandées et validées par l'**OMS**. Il s'agit de séquences spécifiques de la souche SARS-CoV-2 déterminées par le centre de contrôle des maladies américains (CDC) et par l'hôpital de la Charité de Berlin.

La spécificité des amorces et des sondes permettant la détection du SARS-CoV-2 et des variants du SARS-COV-2 détectés par le test **ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex** a été déterminée par une analyse *in silico* des séquences sur les bases de données du NCBI et du GISAID. Ces analyses montrent que le test détecte spécifiquement la souche SARS-CoV-2, les variants 501Y.V1, 501Y.V2 et 501Y.V3 et ne présente aucune réactivité croisée avec d'autres séquences de la base de données (la détection d'un nouveau variant non ciblé pouvant présenter les mêmes altérations ne peut être exclue).

Exclusivité et interférences biologiques

La spécificité des amorces et des sondes permettant la détection du SARS-CoV-2 et des variants du SARS-COV-2 du test **ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex** a été démontrée par le biais d'une analyse *in silico* et d'une analyse expérimentale menée sur un panel commercial contenant des agents pathogènes susceptibles d'être retrouvés dans des échantillons de patients (voir liste ci-dessous). L'extraction a été effectuée sur l'instrument IDEAL® 32 avec le kit IDGENE MAGVIRUS250 (ID SOLUTIONS) et l'amplification sur le thermocycleur QuantStudio 5 Applied Biosystems.

Les pathogènes ont été testés :

- Sans co-infection avec du SARS-CoV-2 présentant ou non les mutations del69-70 et N501Y (étude d'exclusivité)

Résultat : Aucune réaction croisée n'a été signalée pour les agents pathogènes listés ci-dessous, testés seuls ou mélangés ensemble.

- **Virus** : coronavirus humain : 229E, NL63, OC43, HKU1, adénovirus (type 1 ; 3 ; 31), métapneumovirus humain (MPVh), virus parainfluenza de type 1 à 4, influenza A (H1 ; H3), influenza B, virus respiratoire syncytial (VRS), et rhinovirus.
- **Bactérie** : *Chlamydia pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Mycoplasma pneumoniae*.

▪ En co-infection avec du SARS-CoV-2 présentant ou non les mutations del69-70 et N501Y (étude des interférences biologiques).

Afin de mesurer l'interférence sur le kit **ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex**, plusieurs mélanges (listés ci-dessous) ont été réalisés et testés afin de mimer des échantillons fortement ou faiblement positifs pour les cibles d'intérêt, en présence de pathogènes :

- L'échantillon nommé « **RP** » correspond au mélange de tous les pathogènes respiratoires cités précédemment à l'exception du virus SARS-CoV-2 et de ses variants.
- L'échantillon nommé « **RP + SARS-CoV-2** » correspond au mélange de tous les pathogènes respiratoires cités ci-dessus en incluant le **SARS-CoV-2 « VOC202012/01 » en concentration moyenne**.
- L'échantillon nommé « **RP + variant 501Y.V1** » correspond au mélange de tous les pathogènes respiratoires cités ci-dessus en incluant le virus **501Y.V1 en concentration moyenne**.
- L'échantillon nommé « **RP + variant 501Y.V2** » correspond au mélange de tous les pathogènes respiratoires cités ci-dessus à l'exception du virus SARS-CoV-2 mais incluant le virus **501Y.V2 en concentration moyenne**.

Le tableau ci-dessous exprime les résultats obtenus pour le passage en triplicat des mélanges considérés.

Tableau 8. RESULTATS DE L'ETUDE D'INTERFERENCE

	SARS-CoV-2	SPIKE N501Y	SPIKE Del69-70
RP	-	-	-
RP + SARS-CoV-2	+	-	-
RP + variant 501Y.V1	+	+	+
RP + variant 501Y.V2	+	+	-

Résultat : Aucune interférence n'a donc été signalée pour les agents pathogènes cités ci-dessus.

2. Sensibilité analytique – Limite de détection

La sensibilité analytique (ou limite de détection à 95%) du kit **ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex** a été déterminée sur deux gammes de 5 dilutions effectuées à partir de deux extraits d'ARN de suspension virale inactivées fournis par le CNR de Lyon correspondant à la lignée 20I.501Y.V1 (Variant Anglais) ainsi qu'à la lignée 20H/501Y.V2 (Variant Afrique du Sud). Ces échantillons ont été préalablement titrés par PCR digitale (méthode interne ID SOLUTIONS). Ces échantillons ont ensuite été amplifiés avec le kit **ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex** sur les thermocycleurs validés. La LoD a été déterminée comme étant la plus faible concentration de matrice pouvant être détectée de manière fiable à un niveau de confiance de 95%.

Chaque échantillon a été testé 24 fois*. Les tableaux ci-dessous expriment les résultats sur la moyenne des 24 répliquats pour chacune des cibles.

Tableau 9. RESULTATS DE L'ETUDE DE SENSIBILITE ANALYTIQUE POUR LA CIBLE SARS-CoV-2

	Cibles	Modèle de thermocycleur	Concentration (copies/PCR)	Cq moyen	Ecart type	CV (%)	% détecté
Lignée 20I.501Y.V1 Variant Anglais	SARS-CoV-2 (N2 + RdRP)	QuantStudio 5™ Applied Biosystems	80*	32,3	0,297	0,92%	100,00%
			40*	33,6	0,519	1,54%	100,00%
			20	34,6	0,670	1,94%	100,00%
			10	35,9	0,840	2,34%	87,50%
			5	37,3	0,860	2,31%	83,33%
		CFX96 Touch real-Time PCR detection System	80*	34,3	0,228	0,67%	100,00%
			40*	35,5	0,602	1,70%	100,00%
			20	36,6	0,603	1,65%	100,00%
			10	37,7	0,669	1,77%	100,00%
		LightCycler 480 (SystemII)	80*	31,9	0,357	1,12%	100,00%
			40*	33,1	1,228	3,71%	100,00%
			20	34,0	1,502	4,42%	100,00%
			10	35,1	0,742	2,12%	100,00%
			5	35,9	0,730	2,03%	91,67%
		Lignée 20H/501Y.V2 Variant Afrique du Sud	SARS-CoV-2 (N2 + RdRP)	QuantStudio 5™ Applied Biosystems	80*	32,9	0,440
40*	34,0				0,502	1,48%	100,00%
20	34,7				0,655	1,89%	100,00%
10	36,1				0,971	2,69%	100,00%
5	37,2				0,854	2,37%	91,67%
CFX96 Touch real-Time PCR detection System	80*			34,6	0,366	1,06%	100,00%
	40*			35,5	0,412	1,16%	100,00%
	20			36,6	0,773	2,11%	100,00%
	10			37,6	0,755	2,01%	95,83%
LightCycler 480 (SystemII)	80*			32,6	0,649	1,99%	100,00%
	40*			32,9	2,294	6,98%	100,00%
	20			34,8	0,594	1,71%	100,00%
	10			35,3	0,790	2,24%	100,00%
	5			35,7	0,773	2,16%	91,67%

*testé sur 8 répliquats uniquement.

Tableau 10. RESULTATS DE L'ETUDE DE SENSIBILITE ANALYTIQUE POUR LA CIBLE SPIKE N501Y

	Cibles	Modèle de thermocycleur	Concentration (copies/PCR)	Cq moyen	Ecart type	CV (%)	% détecté
Lignée 20I.501Y.V1 Variant Anglais	N501Y	QuantStudio 5™ Applied Biosystems	80*	33,0	0,379	1,15%	100,00%
			40*	34,0	0,481	1,41%	100,00%
			20	35,4	1,047	2,96%	100,00%
			10	36,4	1,020	2,80%	95,83%
			5	37,2	0,830	2,23%	83,33%
		CFX96 Touch real-Time PCR detection System	80*	34,2	0,292	0,86%	100,00%
			40*	35,1	0,397	1,13%	100,00%
			20	36,3	0,603	1,66%	100,00%
			10	37,6	0,878	2,34%	100,00%
			5	38,2	0,794	2,08%	79,17%
		LightCycler 480 (SystemII)	80*	33,5	0,260	0,78%	100,00%
			40*	34,5	0,480	1,39%	100,00%
			20	35,7	0,549	1,54%	100,00%
			10	36,0	0,760	2,11%	100,00%
			5	36,9	0,635	1,72%	79,17%
Lignée 20H/501Y.V2 Variant Afrique du Sud	N501Y	QuantStudio 5™ Applied Biosystems	80*	33,5	0,478	1,43%	100,00%
			40*	34,2	0,593	1,74%	100,00%
			20	35,5	0,886	2,49%	100,00%
			10	36,8	1,097	2,98%	100,00%
			5	37,7	0,653	1,77%	75,00%
		CFX96 Touch real-Time PCR detection System	80*	34,1	0,298	0,87%	100,00%
			40*	35,6	0,479	1,35%	100,00%
			20	36,2	0,534	1,48%	100,00%
			10	37,3	0,906	2,43%	95,83%
			5	38,0	0,674	1,77%	75,00%
		LightCycler 480 (SystemII)	80*	32,1	0,374	1,17%	100,00%
			40*	33,3	0,820	2,46%	100,00%
			20	34,8	0,887	2,55%	100,00%
			10	34,8	0,847	2,43%	100,00%
			5	35,3	1,095	3,10%	83,33%

*testé sur 8 répliquats uniquement.

Tableau 11. RESULTATS DE L'ETUDE DE SENSIBILITE ANALYTIQUE POUR LA CIBLE SPIKE DEL69-70

	Cibles	Modèle de thermocycleur	Concentration (copies/PCR)	Cq moyen	Ecart type	CV (%)	% détecté
Lignée 20I.501Y.V1 Variant Anglais	Del69-70	QuantStudio 5™ Applied Biosystems	80*	31,0	0,576	1,86%	100,00%
			40*	32,3	0,456	1,41%	100,00%
			20	33,3	0,641	1,93%	100,00%
			10	34,1	0,712	2,08%	100,00%
			5	35,4	0,704	1,99%	70,83%
		CFX96 Touch real-Time PCR detection System	80*	33,6	0,526	1,57%	100,00%
			40*	34,2	0,303	0,89%	100,00%
			20	35,4	0,563	1,59%	100,00%
			10	36,7	0,833	2,27%	95,83%
			5	37,2	0,951	2,55%	87,50%
		LightCycler 480 (SystemII)	80*	31,8	0,473	1,49%	100,00%
			40*	33,1	1,319	3,98%	100,00%
			20	34,1	1,322	3,88%	100,00%
			10	35,0	0,827	2,37%	95,83%
			5	35,9	0,868	2,42%	91,67%

*testé sur 8 répliquats uniquement.

La limite de détection à 95% du kit ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex est de **20 copies/PCR** pour le SARS-CoV-2 et de 10 copies/PCR pour les cibles N501Y et Del69-70.

3. Précision

Les études de précision comprennent une évaluation de la répétabilité (intra-essais) et de la fidélité intermédiaire (inter-essais). La précision du test a été évaluée sur différentes dilutions du contrôle positif d'amplification (PAC-IDSARSCOV2-UKSA). Ces échantillons non-natifs ont ensuite été amplifiés avec le kit ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex.

- La précision intra-essai (tableau 12) a été évaluée sur 16 répétitions de 3 dilutions d'une gamme d'ADN synthétique de chaque cible séparée à des concentrations > 3x la LoD ainsi que sur 3 dilutions du PAC-IDSARSCOV2-UKSA Lot p0121-01.
- Les études inter-essais (tableaux 13 et 14) ont été réalisées sur un même lot de réactifs testé sur 3 instruments différents (2 QuantStudio 5, CFX96 Touch real-Time PCR detection System) par 2 utilisateurs différents sur 3 séries de tests indépendantes ; avec 8 répétitions par échantillons, sur 3 échantillons, dont 2 échantillons présentant des concentrations proche de la LoD.

Le Cq moyen, l'écart type, la précision intra-essai et inter-essais (%CV) pour chacun des échantillons du panel sont présentés dans les tableaux suivants.

Tableau 12. REPETABILITE DU TEST

Cibles		Concentration (copies/PCR)	Répétabilité		
			Cq moyen	Ecart type	%CV
SARS-CoV-2		500	28.7	0.24	0.82
		100	31.5	0.30	0.94
		50	32.6	0.28	0.86
SPIKE N501Y		500	29.2	0.21	0.73
		100	31.7	0.30	0.94
		50	32.3	0.20	0.62
SPIKE Del69-70		500	28.6	0.34	1.18
		100	31.1	0.32	1.03
		50	32.2	0.19	0.59
PAC- IDSARSCOV2- UKSA	SARS-CoV-2	500	28.7	0.40	1.41
	SPIKE N501Y	500	28.7	0.24	0.85
	SPIKE Del69-70	500	27.6	0.37	1.35
	SARS-CoV-2	100	31.2	0.20	0.64
	SPIKE N501Y	100	30.7	0.24	0.80
	SPIKE Del69-70	100	30.0	0.15	0.49
	SARS-CoV-2	25	33.1	0.34	1.04
	SPIKE N501Y	25	32.8	0.38	1.15
	SPIKE Del69-70	25	32.2	0.30	0.94

Tableau 13. FIDELITE INTERMEDIAIRE DU TEST SUR CHACUNE DES CIBLES

Cibles	Niveau (copies/PCR)	ESSAI 1 (QuantStudio 5 n°1)		ESSAI 2 (QuantStudio 5 n°2)		ESSAI 3 (CFX96 Touch real-Time PCR detection System)		ESSAI 1+2+3		
		Cq moyen	Ecart type	Cq moyen	Ecart type	Cq moyen	Ecart type	Cq moyen	Ecart type	%CV
SARS- CoV-2	500	28.2	0.271	28.0	0.271	28.7	0.454	28.3	0.341	1.20
	100	30.7	0.353	30.5	0.353	30.8	0.580	30.7	0.467	1.52
	50	31.7	0.422	31.9	0.422	32.0	0.558	31.9	0.462	1.45
SPIKE N501Y	500	28.8	0.217	28.2	0.217	28.7	0.230	28.5	0.232	0.81
	100	31.3	0.252	30.7	0.252	31.1	0.219	31.0	0.265	0.86
	50	32.0	0.285	32.0	0.285	32.2	0.161	32.1	0.236	0.74
SPIKE Del69-70	500	28.2	0.126	28.1	0.126	28.3	0.202	28.0	0.221	0.79
	100	30.7	0.258	30.7	0.258	30.7	0.359	30.4	0.374	1.24
	50	31.7	0.238	31.7	0.238	31.5	0.247	31.3	0.239	0.76

Tableau 14. FIDELITE INTERMEDIAIRE DU TEST SUR LE PAC-IDSARSCOV2-UKSA

		Cible du PAC-IDSARSCOV2-UKSA		
		SARS-COV-2 500 copies/PCR	SPIKE N501Y 500 copies/PCR	SPIKE Del69-70 500 copies/PCR
ESSAI 1 (QuantStudio 5 n°1)	Cq moyen	28.4	28.5	27.9
	Ecart-type	0.222	0.062	0.010
ESSAI 2 (QuantStudio 5 n°2)	Cq moyen	28.9	28.7	27.6
	Ecart-type	0.107	0.071	0.144
ESSAI 3 (CFX96 Touch real-Time PCR detection System)	Cq moyen	29.1	28.7	28.1
	Ecart-type	0.304	0.092	0.028

Cible du PAC- IDSARSCOV2-UKSA	Niveau (copies/PCR)	ESSAI 1+2+3		
		Cq moyen	Ecart type	%CV
SARS-CoV-2	500	28.8	0.211	0.73
SPIKE N501Y	500	28.6	0.075	0.26
SPIKE Del69-70	500	27.8	0.061	0.22

Les données de précision montrent que le test est précis dans des valeurs > 3 fois la LoD (%CV < 5%), et varient sur les valeurs proches de la LoD (%CV < 5%), ou entre les thermocycleurs. Cependant, la LoD n'est pas impactée par ces variations.

8 EVALUATION DES PERFORMANCES CLINIQUES

L'évaluation clinique du test **ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex** utilisé pour la détection des mutations Del69-70 et N501Y du coronavirus SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel a été réalisée par une étude rétrospective menée sur 130 extraits d'acides nucléiques. Ces extraits proviennent d'échantillons natifs de patients prélevés dans le cadre d'une suspicion à infection respiratoire.

Les extraits ont été inclus dans cette étude sous la condition d'un résultat positif à SARS-CoV-2 obtenu en première intention avec un dispositif de diagnostic *in vitro* commercial marqué CE.

Ces échantillons positifs en 1^{ère} intention, ont été retestés en seconde intention avec IDSARSCOV-UKSA et ont été séquencés (technique NGS) en parallèle par un laboratoire certifié par le Centre National de Référence des infections respiratoires (dont la grippe) conformément aux critères définis par le ministère de la sante français.

Les résultats obtenus avec IDSARSCOV-UKSA sont comparés au test commercial de première intention pour évaluer la concordance de détection de SARS-CoV-2 ainsi qu'à la méthode de séquençage qui sert de méthode de référence pour la concordance de détection des délétions et mutations ciblées Del 69-70 et N501Y.

Tableau 17. DETECTION DE LA MUTATION N501Y

Reference Next Generation sequencing	IDSARSCOV-UKSA		
	Négatif	Positif	Total
Négatif	31	--	31
Positif	1	98	99
Total	32	98	130

Sensibilité relative de détection de N501Y	98/99	98,99% [97.0;100.00] IC (95%)
Spécificité relative de détection de N501Y	31/31	100% [90.3;100.0] IC (95%)
Concordance relative de détection de N501Y	129/130	99,2% [97.7;100.0] IC (95%)

1 échantillon sort discordant entre les 2 méthodes mais son Ct de RT-PCR de 34,95 montre une charge virale modérée voire très faible.

Conclusion

Les résultats obtenus avec la trousse ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex concordent parfaitement avec la méthode de RT-PCR de référence, marquée CE-IVD, utilisée en routine pour la caractérisation des échantillons extraits à partir de patients dans le cadre d'une suspicion à infection par SARS-CoV-2.

Les résultats obtenus avec la trousse ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex concordent avec la méthode de séquençage servant de comparateur pour la détection de la délétion Del69-70.

Les résultats obtenus avec la trousse ID™ SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex concordent avec la méthode de séquençage servant de comparateur pour la détection de la mutation N501Y.

9 RESOLUTION DES PROBLEMES

ESSAIS INVALIDES

Cause potentielle	Solution
Les courbes d'amplification caractéristiques n'apparaissent pas du fait de la dégradation des réactifs du kit, dont le mix d'amplification	Vérifier que les conditions de stockage et de manipulation des réactifs sont suivies scrupuleusement (voir section 3) Vérifier les dates d'expiration des réactifs
Erreur dans la mise en œuvre de la procédure de test	Vérifier l'ensemble de la procédure du test vis-à-vis du protocole décrit dans ce mode d'emploi
Contamination des réactifs	Vérifier les conditions de stockage et d'utilisation des réactifs Valider l'absence de contamination des réactifs Procéder à une décontamination des équipements et des locaux

Cause potentielle	Solution
Dégradation des réactifs du kit, dont le mix d'amplification	Vérifier que les conditions de stockage et de manipulation des réactifs sont suivies scrupuleusement (voir section 3) Vérifier les dates d'expiration des réactifs Vérifier que les critères de validation des contrôles sont remplis
Problème rencontré lors de l'extraction	Vérifier que les conditions d'extraction et opération de maintenance des dispositifs d'extraction ont été respectées conformément au protocole du fabricant Vérifier que les échantillons ont bien été homogénéisés avant de démarrer l'étape d'extraction
Erreur dans la mise en œuvre	Vérifier l'ensemble de la procédure du test vis-à-vis du protocole décrit dans ce mode d'emploi
Erreur de programmation	Vérifier l'ensemble des paramètres de programmation du thermocycleur tels que préconisés dans ce mode d'emploi Contacter info@id-solutions.fr pour plus de détails.
Problème lors de l'étape d'amplification	Valider la conformité du thermocycleur Valider tous les éléments mis en œuvre de la réaction (consommables utilisés, plaque correctement scellée...). Se référer au manuel du constructeur de l'équipement pour plus de détails
Problème d'analyse des résultats	Valider le positionnement du seuil de positivité Contacter info@id-solutions.fr pour plus de détails.
Problème d'interprétation des résultats	Valider que tous les critères de validations sont respectés

PATHOGENE NON PRESENT MAIS DETECTE DANS LES ECHANTILLONS : FAUX POSITIFS

Cause potentielle	Solution
Contamination	Vérifier les conditions de stockage et d'utilisation des réactifs Vérifier que les critères de validation des contrôles sont remplis Valider l'absence de contamination des réactifs Procéder à une décontamination des équipements et des locaux
Erreur dans la mise en œuvre	Vérifier l'ensemble de la procédure du test vis-à-vis du protocole décrit dans ce mode d'emploi
Erreur de programmation	Vérifier l'ensemble des paramètres de programmation du thermocycleur tels que préconisés dans ce mode d'emploi Contacter info@id-solutions.fr pour plus de détails.
Problème d'analyse des résultats	Valider le positionnement du seuil de positivité Contacter info@id-solutions.fr pour plus de détails.
Problème d'interprétation des résultats	Valider que tous les critères de validations sont respectés

INHIBITION DES ECHANTILLONS

Cause potentielle	Solution
Problème rencontré lors de l'extraction	Vérifier que les conditions d'extraction ont été respectées conformément au protocole du fabricant Valider les résultats du contrôle d'extraction (s'il a été réalisé comme préconisé) Vérifier la validité des lots de réactif utilisé Vérifier que les échantillons ont bien été homogénéisés avant de démarrer l'étape d'extraction

10 LIMITATIONS

- Le produit est destiné à être utilisé uniquement par des professionnels de la santé ayant reçu les instructions et la formation aux techniques de PCR en temps réel en lien avec le thermocycleur utilisé et aux procédures de diagnostic *in vitro*.
- Le produit ne doit être utilisé qu'en seconde intention, sur des échantillons pour lesquels la détection virologique du SARS-CoV-2 a été préalablement réalisée par un réactif autorisé selon la réglementation en vigueur.
- Respecter les bonnes pratiques de laboratoire pour garantir le bon fonctionnement de ce test. Préserver la pureté des composants du kit au moment de la préparation des échantillons, qui constitue une étape source de contaminations. Une surveillance du laboratoire et des réactifs doit être réalisée, afin d'éviter qu'ils ne soient contaminés ou contiennent des impuretés. Si un réactif est suspecté, le laboratoire doit procéder à son élimination.
- Une méthode d'extraction des acides nucléiques adéquate doit être utilisée avant de réaliser le test. Il est important d'évaluer la qualité de l'étape d'extraction avant de procéder au test.
- Les réactifs composant le kit sont prêts à l'emploi, donc aucune dilution ne doit être réalisée dans la mesure où les performances en seraient affectées.

- Si l'échantillon ou les réactifs ne sont pas utilisés conformément aux instructions de la procédure, le résultat du test peut être erroné. La répétition du test sur un nouvel échantillon du même patient doit être envisagée ou lorsqu'une erreur est survenue au cours de la procédure.
- La procédure et l'interprétation des résultats décrites pour le test doivent être respectées lors de la réalisation de la détection d'ARN dans les échantillons. Il est recommandé à l'utilisateur du kit de lire attentivement le mode d'emploi avant de réaliser le test. La procédure du test doit être strictement respectée.
- L'obtention d'un résultat négatif sur des échantillons n'exclut pas l'infection par le SARS-CoV-2 ou par les variants associés.
- Des résultats positifs n'excluent pas une infection bactérienne ou une co-infection avec d'autres virus.
- Les procédures de prélèvement, de transport, de conservation et de traitement des échantillons patients doivent être respectées scrupuleusement selon les recommandations données par le fabricant de systèmes ou kits pour l'extraction d'acides nucléiques, afin d'assurer les performances optimales du test.
- De potentielles mutations dans les zones ciblées du génome du SARS-CoV-2 et ses variants reconnues par les amorces et/ou les sondes du test peuvent empêcher la détection de celui-ci.

11 SUPPORT TECHNIQUE ET DOCUMENTATION

Pour toutes questions ou support technique, veuillez nous contacter à l'adresse suivante : info@id-solutions.fr

12 SYMBOLES UTILISES

Les symboles suivants peuvent apparaître sur l'emballage et l'étiquetage :



Contient des réactifs suffisants pour n réactions



Numéro de lot



Numéro de référence



Date limite d'utilisation



Contrôle positif



Ce produit répond aux exigences de la directive européenne 98/79 CE pour les dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*



Dispositif médical de diagnostic *in vitro*



Consulter le mode d'emploi avant utilisation



Fabricant



Conserver à l'abri du soleil



Limite de température



Avertissement

13 DERNIERE REVISION

VERSION	DATE D'EDITION	REFERENCES	DESCRIPTION DE LA MODIFICATION
ver0321	09/03/2021	DOC0798	NA

Note :

Note :

