

DIAGNOVITAL

Kit de détection de mutation K417N de SARS-CoV-2

Détection qualitative basée sur la RT-PCR pour la mutation K417N de SARS-CoV-2

Pour la recherche uniquement. Ne pas utiliser dans les procédures de diagnostic.

RUO

REF



090R07025 25 tests

090R07050 50 tests

090R07100 100 tests

Table des matières

Utilisation prévue	3
Description du produit.....	3
Matériel fourni	4
Matériel supplémentaire requis	4
Stockage.....	5
Caractéristiques de performance	6
Considérations avant de commencer	7
Préparation des échantillons	7
Configuration de la réaction	8
Analyse et dépannage.....	10
Limites	13
Marques déposées	13
Symboles.....	14

Utilisation prévue

Le kit de détection de mutation K417N de SARS-CoV-2 DIAGNOVITAL® est un test basé sur la RT-PCR en temps réel pour la détection et la discrimination de la mutation K417N de SARS-CoV-2 dans les échantillons respiratoires. **Ce kit est conçu pour analyser uniquement les échantillons qui se sont précédemment révélés positifs pour le SARS-CoV-2.**

Le kit de détection de mutation K417N de SARS-CoV-2 DIAGNOVITAL® détecte la mutation K417N dans l'ARN extrait du SARS-CoV-2 à partir d'échantillons d'écouvillonnage nasopharyngé et oropharyngé pendant l'infection. Des résultats positifs indiquent que la présence d'ARN du SARS-CoV-2 détecte une mutation ponctuelle unique qui entraîne l'échange de l'acide aminé Lysine en Asparagine dans la protéine de spicule à la position 417. Des mutations à la position 417 se trouvent dans deux lignées variantes, mais l'échange contre une Asparagine est spécifique à la lignée sud-africaine B.1.351 et peut aider à distinguer avec précision les différents types de variantes du SARS-CoV-2. Le K417N est une mutation qui se produit dans différentes lignées et a déjà été trouvée dans la lignée sud-africaine (B.1.351) et brésilienne (B.1.1.28). Les mutations K417N et E484K qui l'accompagnent dans la souche sud-africaine offrent un contrepois à l'affinité accrue de la spicule due à la mutation N501Y. Elles empêchent la formation de deux ponts salins qui aident à former et à stabiliser le complexe RBD-ACE2. Cela réduit l'affinité de liaison ACE2. Ainsi, cette souche est moins infectieuse et se propage moins rapidement que la souche britannique. C'est même si les deux partagent cette dernière substitution. La mutation se trouve dans la protéine de spicule et semble avoir un impact sur la réponse immunitaire du corps et, éventuellement, sur l'efficacité du vaccin. Les anticorps monoclonaux et dérivés du sérum seraient de 10 à 60 fois moins efficaces pour neutraliser les virus porteurs de la mutation K417N.

Description du produit

Le kit de détection de mutation K417N de SARS-CoV-2 DIAGNOVITAL® est un système de détection et de discrimination en temps réel basé sur la RT-PCR pour la mutation K417N de SARS-CoV-2. **Ce kit est conçu pour analyser uniquement les échantillons qui se sont précédemment révélés positifs pour le SARS-CoV-2.**

Le kit de détection de mutation K417N de SARS-CoV-2 DIAGNOVITAL® détecte également la présence d'une cible humaine spécifique à la séquence (RNaseP) servant de contrôle d'extraction humaine (HEC) en plus des séquences de type sauvage (K417) et mutante (N417) dans différents canaux.

DÉTECTION DU SARS-CoV-2 PAR PCR EN TEMPS RÉEL

La première étape de la détection de la mutation K417N de SARS-CoV-2 est la conversion de l'ARN viral en ADNc. Ensuite, les séquences cibles virales et la RNaseP (HEC) sont simultanément amplifiées en une seule réaction avec une amplification surveillée en temps réel grâce à l'utilisation de sondes marquées par fluorescence : lors de l'incorporation dans les brins d'ADN nouvellement amplifiés, le fluorophore est libéré et une augmentation du signal de fluorescence peut être observée.

Avec le **kit de détection de mutation K417N de SARS-CoV-2 DIAGNOVITAL®**, la discrimination entre les cibles virales est obtenue grâce à l'utilisation de deux fluorophores différents qui sont détectés dans deux canaux différents : FAM™ pour le K417 de SARS-CoV-2 de type sauvage, HEX/VIC pour la mutation N417 et la RNaseP (HEC) est détecté dans le canal Cy5.

En raison du taux de mutation intrinsèque des virus, il est possible que des mutations dans la séquence cible se produisent et s'accumulent au fil du temps. Cela peut conduire à des résultats faussement négatifs avec une approche de détection basée sur la PCR.

Le kit de détection de mutation K417N de SARS-CoV-2 DIAGNOVITAL® est validé avec Applied Biosystems Quant Studio 5 Dx et compatible avec les systèmes de PCR en temps réel BioRad CFX96, Applied Biosystems Quant Studio 5 avec canaux FAM™, HEX/VIC et Cy5 calibrés.



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400
Gebze /Kocaeli /Turquie **Téléphone** : +90 262 648 5300
Fax : +90 262 751 0677 E-mail : rt@rtalabs.com.tr
Site Internet : www.rtalabs.com.tr
Date de révision / N° de révision RTA : 0



RTA.KK.707 Rev. Tarihi/ Rev. No: -/-

Matériel fourni

	Réactifs	Quantité et Volume (25 tests)	Quantité et Volume (50 tests)	Quantité et Volume (100 tests)
1	Mélange maître PCR	1 × 375 µl	1 × 750 µl	1 × 1500 µl
2	Contrôle positif	1 × 38 µl	1 × 75 µl	1 × 150 µl
3	H ² O distillée exempte de nucléase	1 × 38 µl	1 × 75 µl	1 × 150 µl



IMPORTANT ! Le tableau ci-dessus reflète le schéma de couleurs standard du kit. En raison de problèmes avec les fournisseurs pendant la crise COVID-19, les couleurs individuelles des bouchons de tube peuvent être remplacées en fonction de la disponibilité. Vérifiez toujours l'étiquetage du réactif avant utilisation.

Matériel supplémentaire requis

- Moyens et équipements appropriés pour l'extraction des acides nucléiques
- Système de détection PCR en temps réel équipé pour la détection FAM™, HEX/VIC et Cy5
- Pipettes réglables et embouts de pipettes filtrants adaptés
- Équipement de protection individuelle et espaces de travail appropriés pour travailler avec des échantillons potentiellement infectieux
- Décontaminants de surface tels que DNAzap™ (Life Technologies), DNA Away™ (Fisher Scientific), RNase Away™ (Fisher Scientific), eau de Javel à 10 % (dilution 1:10 d'hypochlorite de sodium commercial à 5,25 et 6,0 %)
- Tubes / barrettes / plaques sans nucléase pour préparer des dilutions, des mélanges maîtres, etc.
- Tubes / plaques / capillaires de réaction PCR en temps réel
Pour **BIO-RAD CFX96** : Plaques PCR à 96 puits à paroi mince et à coque dure avec codes-barres (BIO-RAD, Cat # : HSP-9955), Plaques PCR à 96 puits à paroi mince et à coque dure (BIO-RAD, Cat # : HSP-9655), Joints adhésifs Microseal 'B', optiquement transparents (BIO-RAD, Cat # : MSB-1001), Tubes PCR individuels, bandes de tube bas, bande de 8 tubes, 0,2 ml profil bas, blanc (BIO-RAD, Cat # : TLS0851), Bandes de bouchon plat, optiquement transparentes, bande de 8 bouchons, 0,2 ml (BIO-RAD, Cat # : TCS0803).
- Pour le **Système de PCR en Temps Réel Quant Studio 5 d'Applied Biosystems**, Plaque de réaction optique à 96 puits MicroAmp® (Thermo Fisher, Cat # : 4306737), Film adhésif optique MicroAmp® (Thermo Fisher, Cat # : 4311971), Bande optique de 8 tubes MicroAmp®, 0,2 ml (Thermo Fisher, Cat # : 4316567), Bandes optiques de 8 bouchons MicroAmp® (Thermo Fisher, Cat # : 4323032)
- Options de stockage appropriées pour les réactifs et les échantillons (4°C, -20°C, -70°C)



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400
Gebze /Kocaeli /Turquie **Téléphone** : +90 262 648 5300
Fax : +90 262 751 0677 E-mail : rtal@rtalabs.com.tr
Site Internet : www.rtalabs.com.tr
Date de révision / N° de révision RTA : 0



RTA.KK.707 Rev. Tarihi/ Rev. No: -/-

Stockage

- Conserver tous les composants à -15°C / -25°C et évitez plus de 3 cycles de congélation et décongélation.
- Protéger le mélange maître qPCR de la lumière car une exposition prolongée peut diminuer les performances des fluorophores.
- Si les composants du kit ont été endommagés pendant le transport, contactez Laboratoires RTA. Ne pas les utiliser car les performances peuvent être compromises.
- Conserver les réactifs à l'écart de l'échantillon pour éviter la contamination.
- Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée.



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400
Gebze /Kocaeli /Turquie **Téléphone** : +90 262 648 5300
Fax : +90 262 751 0677 E-mail : ta@rtalabs.com.tr
Site Internet : www.rtalabs.com.tr
Date de révision / N° de révision RTA : 0



RTA.KK.707 Rev. Tarihi/ Rev. No: -/-

Caractéristiques de performance

Sensibilité analytique

La sensibilité analytique ou la limite de détection pour les dosages basés sur les acides nucléiques doit être exprimée par la valeur seuil positive de 95 %. Il s'agit de la concentration d'analyte pour laquelle 95 % des séries de tests donnent des résultats positifs après des dilutions en série à l'aide d'un matériau de référence. Dans cette étude, la sensibilité analytique a été analysée à l'aide d'une série de dilutions de VIRCELL AMPLIRUN® SARS-CoV-2 RNA CONTROL (21MBC137002-R) pour le canal de type sauvage et VIRCELL AMPLIRUN® SARS-CoV-2 B.1.351 (21MBC139001-R)

RNA CONTROL pour canal mutant. Des dilutions ont été faites par un échantillon d'ARN clinique négatif. Chaque dilution a été testée avec 23 réplicats. Les systèmes de PCR en temps réel QuantStudio 5-DX ont été utilisés pour l'amplification, la détection du signal et l'analyse des résultats. L'analyse des probits a été effectuée par le programme IBM SPSS Statistics 27. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1 : Détection de mutation K417N DIAGNOVITAL - Valeurs de limite de détection (LoD) et plages de confiance à 95 %

Gène cible	Limite de détection (copies/ml)	Limite inférieure de confiance à 95 %	Limite supérieure de confiance à 95 %
K417	7947.595	5653.225	18316.030
N417	7168.476	4676.692	36608,421

Spécificité diagnostique

Un total de 192 échantillons cliniques qui ont été collectés auprès de patients présentant des symptômes de Covid ont été analysés par le kit de détection de mutation K417N de SARS-CoV-2 **DIAGNOVITAL®** et les résultats ont été comparés à une analyse de séquençage de nouvelle génération. 186 d'entre eux se sont révélés négatifs pour la mutation K417N et 6 d'entre eux se sont révélés positifs par les deux méthodes. Le pourcentage de concordance positif (PCP) du kit de détection de mutation K417N de SARS-CoV-2 **DIAGNOVITAL®** par rapport au NGS est de 100 % et le pourcentage de concordance négatif (PCN) est de 100 %. Tous les contrôles internes (RNAseP) ont été testés positifs.

Tableau 2. Kit de détection de mutation K417N de SARS-CoV-2 **DIAGNOVITAL®** – Étude de corrélation qPCR NGS

Écouvillon NP		Comparateur (NGS et qPCR)	
		Mutant	Type sauvage
Kit de détection de mutation K417N de SARS-CoV-2 DIAGNOVITAL	N417	6	0
	K417	0	186
	Indéfinit	0	0
	Total	6	186



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400
Gebze /Kocaeli /Turquie **Téléphone** : +90 262 648 5300
Fax : +90 262 751 0677 E-mail : rtal@rtalabs.com.tr
Site Internet : www.rtalabs.com.tr
Date de révision / N° de révision RTA : 0



RTA.KK.707 Rev. Tarihi/ Rev. No: -/-

Considérations avant de commencer

BIOSÉCURITÉ

- Porter un équipement de protection individuelle approprié (par exemple, blouses, gants non poudrés, protection oculaire) lorsque vous travaillez avec des échantillons cliniques.
- Le traitement des échantillons doit être effectué dans une enceinte de sécurité biologique certifiée de classe II conformément aux directives de niveau de sécurité biologique 2 ou supérieur.
- Pour plus d'informations, consulter :
 - Lignes directrices provisoires pour la collecte, la manipulation et les tests d'échantillons cliniques de patients sous enquête (PUI) pour le nouveau coronavirus 2019 (SARS-CoV-2) <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/guidelines-clinical-specimens.html>
 - Biosécurité dans les laboratoires microbiologiques et biomédicaux, 6e édition, disponible sur <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/>.
- L'utilisation du kit de détection de mutation K417N de SARS-CoV-2 DIAGNOVITAL® et l'évaluation des données sont réservées uniquement au personnel de laboratoire formé.
- De bonnes pratiques de laboratoire sont essentielles pour une performance optimale de ce test. Des précautions particulières doivent être prises pour éviter la contamination des composants du kit. Tous les réactifs doivent être étroitement surveillés pour détecter les impuretés et la contamination. Jeter les réactifs suspects conformément aux directives et réglementations locales.

ÉCHANTILLONS

Utiliser uniquement des échantillons appropriés pour les tests, tels que :

- Échantillons respiratoires, y compris écouvillonnages nasopharyngés / oropharyngés.
- Les échantillons sur écouvillon doivent être prélevés uniquement sur des écouvillons avec un embout synthétique (comme le polyester ou le Dacron®) et des tiges en plastique. Les écouvillons avec des pointes en alginate de calcium ou en coton et des tiges en bois ne sont pas acceptables.

ÉCHANTILLONS - MANUTENTION ET STOCKAGE

- Les échantillons peuvent être conservés à 2-8°C jusqu'à 72 heures après le prélèvement.
- Si un retard d'extraction est attendu, conserver les échantillons à -20°C ou moins.
- Les acides nucléiques extraits doivent être conservés à -20°C ou moins.

Ne pas utiliser d'échantillons

- s'ils n'ont pas été conservés à 2-8°C (≤ 4 jours) ou congelés à -20°C ou moins,
- s'ils sont insuffisamment étiquetés ou manquent de documentation,
- s'ils ne sont pas adaptés à cette fin (voir ci-dessus pour un échantillon approprié),
- si le volume de l'échantillon est insuffisant.

Préparation des échantillons

- Les performances des tests RT-PCR dépendent fortement de la quantité et de la qualité de la matrice d'ARN de l'échantillon. Il est fortement recommandé de qualifier et de valider les procédures d'extraction d'ARN pour la récupération et la pureté avant de tester les échantillons.
- Le **Kit de Détection de Mutation K417T de SARS-CoV-2 DIAGNOVITAL®** est validé avec le kit d'isolement d'ARN viral RTA.
- Le **Kit de Détection de Mutation K417T de SARS-CoV-2 DIAGNOVITAL®** est compatible avec le système d'extraction Tianlong Generotex96 et le kit QIAamp® MinElute Virus Spin, les réactifs VERSANT® Sample



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400
Gebze /Kocaeli /Turquie **Téléphone** : +90 262 648 5300
Fax : +90 262 751 0677 E-mail : rtal@rtalabs.com.tr
Site Internet : www.rtalabs.com.tr
Date de révision / N° de révision RTA : 0



RTA.KK.707 Rev. Tarihi/ Rev. No: -/-

Préparation 1.0.

- Systèmes de PCR en Temps Réel validés : Applied Biosystems Quant Studio 5 Dx.
- Systèmes de PCR en Temps Réel Compatibles : Systèmes de PCR en temps réel de BioRad CFX96, Applied Biosystems Quant Studio 5.
- Stocker et conserver les échantillons résiduels et les acides nucléiques extraits à -20°C ou -80°C.
- Ne décongelez que le nombre d'extraits d'échantillons qui seront testés en une seule journée.
- Ne pas congeler / décongeler l'extrait plus d'une fois avant le test car chaque cycle de congélation / décongélation diminuera la qualité de l'ARN.
- Il peut être possible d'utiliser directement des échantillons de patients, selon le type d'échantillon. Cependant, cela peut nécessiter une étape de lyse préalable et un titrage de la quantité sur l'échantillon qui peut être utilisée sans inhiber la réaction. Cette procédure n'a pas été validée, l'utilisation d'ARN isolé est recommandée.

Configuration de la réaction

1. Assurez-vous que tous les équipements et dispositifs nécessaires sont adaptés, calibrés et fonctionnels avant de commencer les essais.
2. Décontaminer l'équipement et l'espace de travail et préparer tout le nécessaire pour l'expérience suivante afin que le flux de travail soit court et reproductible.
3. Allumer le système de détection PCR et programmer-le pour éviter les retards après la configuration des réactions.
4. Décongeler tous les composants du kit de détection de mutation K417N de SARS-CoV-2 **DIAGNOVITAL®** sur de la glace et mélanger doucement mais soigneusement pour assurer une répartition uniforme des composants. Recueillir le liquide au fond du tube avec une rotation rapide (par microcentrifugeuse).
5. Le **mélange maître PCR** fourni avec le kit de détection de mutation K417N de SARS-CoV-2 **DIAGNOVITAL®** est prêt à l'emploi. Une réaction sera préparée pour chaque échantillon. Une réaction distincte doit être préparée pour le contrôle négatif (NTC) et le contrôle positif (TPC).

Composant	Volume (µl)
Mélange maître PCR	15
Isolat d'ARN / TPC / NTC	5
Total	20

6. Distribuez **15 µl** de mélange maître PCR sur vos barrettes / plaques et ajoutez **5 µl** à vos **échantillons**. (Un exemple de configuration est donné dans la **figure 1**).



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400
Gebze /Kocaeli /Turquie **Téléphone** : +90 262 648 5300
Fax : +90 262 751 0677 E-mail : rtalabs.com.tr
Site Internet : www.rtalabs.com.tr
Date de révision / N° de révision RTA : 0




RTA.KK.707 Rev. Tarihi/ Rev. No: -/ -

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S9	S17	S25	S33	S41	S49	S57	S65	S73	S81	TPC
B	S2	S10	S18	S26	S34	S42	S50	S58	S66	S74	S82	S89
C	S3	S11	S19	S27	S35	S43	S51	S59	S67	S75	S83	S90
D	S4	S12	S20	S28	S36	S44	S52	S60	S68	S76	S84	S91
E	S5	S13	S21	S29	S37	S45	S53	S61	S69	S77	S85	S92
F	S6	S14	S22	S30	S38	S46	S54	S62	S70	S78	S86	S93
G	S7	S15	S23	S31	S39	S47	S55	S63	S71	S79	S87	S94
H	S8	S16	S24	S32	S40	S48	S56	S64	S72	S80	S88	NTC

Figure 1 : Exemple de schéma de pipetage pour la distribution de mélange maître avec les mélanges de dosage individuels.

7. Transférer les réactions sur le dispositif PCR, puis procéder selon ces directives :

Étape	Cycles	Température	Durée
Transcription inversée	1	50°C	10 minutes
Dénaturation initiale	1	95°C	5 minutes
Amplification	40	95°C	5 secondes
		57°C* 	30 secondes

*Activer la collecte de données pour **FAM™** (type sauvage K417 SARS-CoV-2), **HEX/VIC** (mutation N417 SARS-CoV-2) et **Cy5** (HEC).

8. Une fois l'analyse terminée, ne pas ouvrir les tubes de réaction pour éviter toute contamination et jeter conformément aux directives et réglementations locales. Ne pas autoclaver car cela pourrait contaminer le matériel de laboratoire avec des amplicons.



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
 Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400
 Gebze /Kocaeli /Turquie **Téléphone** : +90 262 648 5300
 Fax : +90 262 751 0677 E-mail : rtal@rtalabs.com.tr
 Site Internet : www.rtalabs.com.tr
 Date de révision / N° de révision RTA : 0



RTA.KK.707 Rev. Tarihi/ Rev. No: -/-

Analyse et dépannage

DES RÉSULTATS EXEMPLAIRES

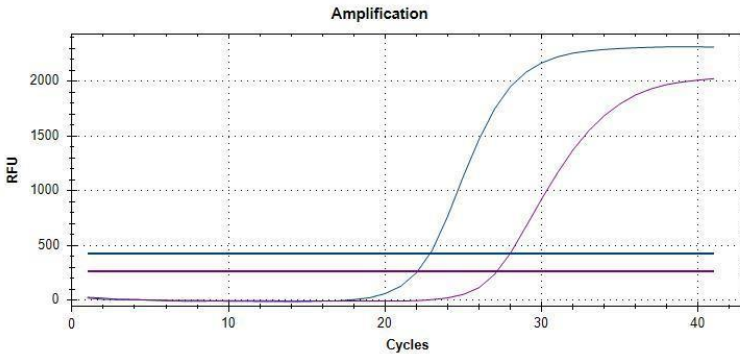


Figure 2 : *Courbes bleues :* Échantillon de type sauvage K417 au canal FAM, *courbes violettes:* contrôle interne au canal Cy5.

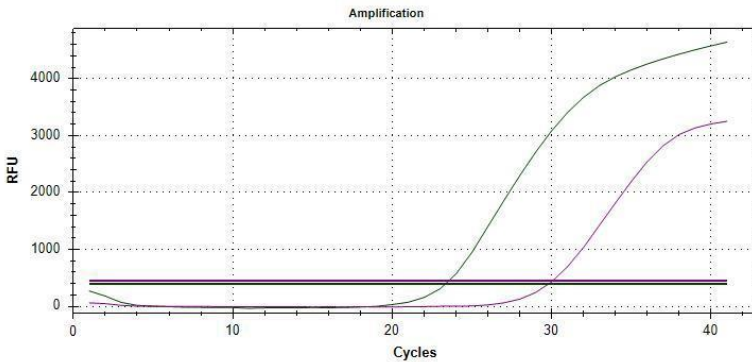


Figure 3 : *Courbes vertes :* N417 Échantillon positif mutant au canal HEX, *courbes violettes:* contrôle interne au canal Cy5.

- Les contrôles de H₂O (NTC) distillée ne doivent donner un Ct positif pour aucun dosage. S'ils le font, la réaction a été contaminée par l'échantillon d'ARN / ADN. Décontaminer l'équipement et l'espace de travail et répéter les réactions.
- Toutes les réactions contenant de l'isolat d'ARN doivent donner des valeurs Ct positives pour le test de contrôle interne. Les valeurs Ct doivent être < 38 cycles. L'absence d'amplification du contrôle interne indique une extraction d'ARN défectueuse ou une perte d'isolat d'ARN en raison d'une contamination par la RNase. L'échantillon n'est pas suffisant, les résultats ne peuvent pas être interprétés.



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400
Gebze /Kocaeli /Turquie Téléphone : +90 262 648 5300
Fax : +90 262 751 0677 E-mail : rtal@rtalabs.com.tr
Site Internet : www.rtalabs.com.tr
Date de révision / N° de révision RTA : 0



RTA.KK.707 Rev. Tarihi/ Rev. No: -/-

- Pour qu'un échantillon soit considéré comme **négatif pour la mutation K417N**, le canal **FAM™** doit donner une valeur Ct positive. L'amplification du HEC dans le canal **Cy5** est attendue vers 20-38 Ct.
- Pour qu'un échantillon soit considéré comme **positif pour la mutation du mutant K417N**, le canal **HEX/VIC** doit donner une valeur Ct positive. Si le HEC ne parvient pas à s'amplifier, l'échantillon doit toujours être considéré comme positif. Ce résultat est possible lorsque le titre viral est inhabituellement élevé ou que l'échantillon n'était pas d'origine humaine, mais qu'il s'agissait d'une culture cellulaire ou d'une analyse de contamination de surface.
- Pour le contrôle positif, un Ct positif au niveau des canaux FAM et HEX/VIC doit être observé. La valeur Ct pour le contrôle positif doit être 20±3. Si la valeur Ct ne correspond pas à la valeur attendue ou si le contrôle positif n'a pas été testé positif, la PCR a été compromise. Vérifiez la configuration de la réaction et les paramètres du périphérique PCR et répétez les réactions. Des cycles de congélation et de décongélation répétés du **contrôle positif** peuvent compromettre sa qualité, entraînant des valeurs Ct tardives.
- Si Ct est < 38 pour chacun des canaux FAM, HEX/VIC et Cy5, le résultat dans le canal respectif doit être considéré comme **POSITIF**, si Ct est > 38 ou aucune valeur n'est reçue, le résultat dans le canal concerné doit être considéré comme **NÉGATIF**.

FAM	HEX/VIC	Cy5	Résultat
-	-	+	L'échantillon est négatif pour le SARS-CoV-2. Ce kit est conçu pour analyser uniquement les échantillons qui se sont précédemment révélés positifs pour le SARS-CoV-2. - Assurez-vous que l'échantillon est SARS-CoV-2 positif. - Des variations sont recommandées dans l'analyse des séquences des régions de liaison de la sonde avec une méthode différente.
+	-	+	L'échantillon est négatif pour la mutation K417N .
-	+	+	L'échantillon est positif pour la mutation K417N .
-	-	-	L'absence d'amplification dans n'importe quel canal indique un isolement d'ARN défectueux, une dégradation de l'échantillon ou une inhibition de la PCR. Les résultats ne peuvent pas être interprétés. - L'ARN peut être dégradé lors du transport, de l'extraction ou du stockage.
+	+	-	Résultat attendu pour le Contrôle Positif (TPC) .
-	-	-	Résultat attendu pour le Contrôle Négatif (NTC) .

Configuration de l'Appareil

Pour **QUANTSTUDIO5DX**, dans l'écran d'accueil, créez ou ouvrez un modèle. Dans le volet « Nouvelle expérience », cliquez sur le bouton « Créer une nouvelle expérience » pour créer un nouveau modèle. Dans l'onglet « Propriétés », entrez les informations du modèle. Dans l'onglet « Méthode », ajustez le volume de réaction et configurez le profil thermique approprié. Dans l'onglet « Plaque » (Configuration rapide), attribuez des attributs de plaque en sélectionnant la référence passive dans la liste déroulante. Dans l'onglet « Plaque » (Configuration rapide), définissez et attribuez des attributs de puits et sélectionnez des puits dans la Disposition de la plaque ou le Tableau des puits. Ensuite, attribuez des échantillons et des cibles aux puits sélectionnés.



Note : Les nouveaux noms d'échantillons ou de cibles saisis dans le sous-onglet Configuration rapide sont automatiquement renseignés avec des valeurs par défaut telles que FAM pour Reporter, NFQ-MGB pour Désactivateur (Quencher) et Inconnu (Unknown) pour Tâche (Task). Modifiez ces valeurs dans le sous-onglet Configuration avancée. Pour les sondes TaqMan, l'option NFQ-MGB doit être utilisée comme désactivateur. Ensuite, démarrez l'exécution.

Pour **BIORAD CFX 96**, dans l'application Logiciel, ouvrir le protocole à partir de l'élément de menu Fichier. Créez le protocole approprié pour le kit destiné à être utilisé. Dans l'onglet « Plaque », définir et attribuer des attributs de puits et sélectionner des puits dans la Disposition de la plaque ou le Tableau des puits. Ensuite, attribuez des échantillons et des cibles aux puits sélectionnés. Ensuite, démarrez l'exécution.

Paramètres de ligne de base et de seuil

Après l'exécution,

Pour **QUANTSTUDIO5DX**, cliquez sur le bouton « Afficher les paramètres de tracé » pour changer le type de graphique de l'échelle logarithmique à l'échelle linéaire. La cible peut être modifiée dans la section Cible. Cliquez ensuite sur le bouton « Paramètres d'analyse » pour ajuster la ligne de base et le seuil. Décochez le Seuil automatique et décochez la Ligne de base automatique. Définissez le cycle de début de ligne de base sur 7-8 et le cycle de fin de ligne de base sur 20 afin de normaliser les graphiques.

Pour **BIORAD CFX 96**, le seuil peut être ajusté en fonction du rapport entre la hauteur du signal FAM et HEX.

La ligne de base de la courbe d'amplification est l'un des paramètres pouvant affecter les résultats de la PCR. Si la ligne de base est mal définie, une valeur Ct peut être affichée même si aucune amplification réelle ne s'est produite. Le seuil automatique est utilisé avec le **kit de détection de mutation K417N de SARS-CoV-2 DIAGNOVITAL®** pour les systèmes de détection par PCR. Si l'augmentation d'un échantillon dans n'importe quel canal est **inférieure à 10 %** de l'augmentation de l'échantillon le plus croissant dans le même canal, cette augmentation est considérée comme **NÉGATIVE**. Dans certains cas, le seuil doit être réglé manuellement pour éviter la fluorescence de fond. Pour chaque échantillon, le rapport de la hauteur du signal FAM vs HEX doit être vérifié ; le signal qui l'emporte de 3 fois ou plus sur l'autre doit être considéré comme positif, car un seul d'entre eux doit s'amplifier.



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400
Gebze /Kocaeli /Turquie **Téléphone** : +90 262 648 5300
Fax : +90 262 751 0677 E-mail : rtalabs.com.tr
Site Internet : www.rtalabs.com.tr
Date de révision / N° de révision RTA : 0



RTA.KK.707 Rev. Tarihi/ Rev. No: -/-

PROBLÈME	RAISONS POTENTIELLES	SOLUTION
Résultat négatif pour le contrôle interne	Le mélange maître PCR peut ne pas avoir été homogène.	Le pipetage doit être effectué pour le mélange maître PCR.
	L'isolement de l'ARN peut ne pas être effectué correctement.	L'étude doit être répétée à partir de l'isolement.
	L'isolat peut contenir un inhibiteur.	L'étape de PCR en temps réel doit être répétée en diluant l'isolat au 1/10.
Résultat positif pour NTC	Une contamination peut s'être	Une contamination peut s'être produite depuis la zone de travail jusqu'aux articles consommables sur lesquels on travaille. Il est recommandé de jeter les consommables et d'en ouvrir de nouveaux et de nettoyer l'environnement d'abord avec une solution de NaClO à 10 %, puis avec de l'alcool à 70 %.

Limites










- Ce kit est conçu pour analyser uniquement les échantillons qui se sont précédemment révélés positifs pour le SARS-CoV-2.
- Pour des résultats fiables, il est essentiel de respecter les directives données dans ce manuel. Des changements dans la configuration de la réaction ou le protocole de cyclage peuvent conduire à l'échec des expériences.
- Selon la matrice de l'échantillon, des inhibiteurs peuvent être présents dans l'ARN isolé et désactiver la transcription inverse et/ou l'amplification par PCR. Si tel est le cas, un autre type d'échantillon ou une autre méthode d'isolement peut être bénéfique.
- Des mutations spontanées au sein de la séquence cible peuvent entraîner l'échec de la détection de la séquence cible.
- Les résultats doivent toujours être interprétés en tenant compte de toutes les autres données recueillies à partir d'un échantillon. L'interprétation doit être effectuée par du personnel formé et expérimenté avec ce type d'expérience.


Marques déposées

NucliSens® (bioMérieux), QIAamp®, RNeasy® (QIAGEN), ChargeSwitch® (Invitrogen), FAM™ (Life Technologies), DNAZap™, DNA Away™, RNase Away™

Les noms déposés, marques déposées, etc. utilisés dans ce document, même s'ils ne sont pas spécifiquement marqués comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi

Symboles

	Date d'expiration
	Lot
	Numéro de catalogue
	Limitation de température
	Attention
	Fabricant
	Consulter les instructions d'utilisation ou consulter les instructions d'utilisation électroniques
	Contient une quantité suffisante pour (n) tests
	Pour la recherche uniquement

 **RTA LABORATUVARLARI**
BİYOLOJİK ÜRÜNLER İLAÇ
VE MAKİNE SAN. TİC. A.Ş.
GEPOSB Cumhuriyet Cad. No:3
41400 Gebze / Kocaeli / Turquie
Téléphone : +90 262 648 5300
E-mail : rta@rtalabs.com.tr
Site Internet : www.rtalabs.com.tr

 **RTA Laboratuvarları**

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400
Gebze /Kocaeli /Turquie **Téléphone** : +90 262 648 5300
Fax : +90 262 751 0677 E-mail : rta@rtalabs.com.tr
Site Internet : www.rtalabs.com.tr
Date de révision / N° de révision RTA : 0

RTA.KK.707 Rev. Tarihi/ Rev. No: -/-

