

PaxView® COVID-19 real-time RT-PCR Kit

Utilisation prévue

Le kit PaxView® COVID-19 RT-PCR en temps réel est conçu pour la détection qualitative de l'ARN viral COVID-19 dans un écouvillon oropharyngé, un écouvillon nasopharyngé, des crachats et du liquide de lavage bronchoalvéolaire (BAL).

Introduction

COVID-19 (Corona Virus disease 2019) est la maladie infectieuse respiratoire causée par un nouveau coronavirus qui n'a pas été identifié auparavant chez l'homme. L'épidémie a commencé en décembre 2019. Des symptômes respiratoires légers avec fièvre, toux et essoufflements ont été rapportés mais aussi des cas plus sévères avec mortalité. La période d'incubation du COVID-19 a été estimée, par la plupart, de 1 à 14 jours. Le taux de létalité est d'environ 2%.

Le nouveau coronavirus (nCoV) nommé SARS-CoV-2 est un bêta-coronavirus comme le MERS-CoV et le SARS-CoV. Ces trois virus ont leur origine chez les chauves-souris. L'analyse de séquençage de plusieurs souches virales de patients COVID-19 a suggéré que l'animal sauvage était le réservoir naturel du virus. Le virus peut se propager de personne à personne. Le virus se transmet principalement par contact avec des gouttelettes respiratoires.

Principes de la procédure

Le kit PaxView® COVID-19 real-time RT-PCR détecte le nouveau coronavirus, COVID-19 en utilisant la RT-PCR, en temps réel, en une seule étape, dans un seul tube. Les gènes cibles pour la détection du virus sont les gènes Orf1ab et N. La séquence d'amorces et les sondes pour l'amplification ont été adaptées à partir de sources publiées par China CDC et l'OMS. Le kit comprend des amorces et des sondes ciblant le gène humain RNase P qui sert de contrôle positif interne pour la RT-PCR en temps réel.

Cible	Fluorescence	Détection Wave length (nm)
Orf1ab	FAM	510 - 530
N gene	HEX/JOE	560 - 580
RNase P (Internal Control)	CY5	675 - 690

Composants du kit

Composants	Volume	Tubes
4X RT-PCR PREMIX	240 µl/tube	2 tubes
PRIMER/PROBE MIX	240 µl/tube	2 tubes
POSITIVE CONTROL	50 µl/tube	1 tube

Préparation des échantillons

1. Nous recommandons d'utiliser de l'ARN viral extrait d'écouvillon oropharyngé, d'écouvillon nasopharyngé, de crachats et d'échantillon de lavage bronchoalvéolaire (BAL)
2. Les échantillons cliniques doivent être conservés entre 2 et 8 ° C, 1 semaine au maximum.
3. Les échantillons cliniques doivent être transportés dans un conteneur de transport incassable pour éviter toute potentielle infection par fuite d'échantillon.
4. Assurez-vous que l'échantillon est maintenu en bon état jusqu'à ce que le test soit effectué, pour obtenir des résultats précis. Le stockage des échantillons pendant de longues périodes ou des congélations / décongélations répétées peuvent réduire la sensibilité du test.

Méthode

1. Toutes les étapes sont effectuées sur de la glace ou un support réfrigéré.
2. Avant de commencer, décongeler les réactifs du kit RT-PCR sur glace pendant 10 ~ 15 minutes.
3. Mélangez brièvement le tube par retournement pendant 3 à 5 secondes.
4. Préparez le mélange de 4X RT-PCR PREMIX et de PRIMER / SONDE MIX dans un micro tube stérilisé de 1,5 ml (sans RNase). Utilisez les quantités ci-dessous, pour les échantillons et contrôles.

Composants	Volume/ test
4X RT-PCR PREMIX	5µl
PRIMER/PROBE MIX	5µl
Volume total	10 µl

5. Mettre 10 µl du mélange préparé dans un tube PCR et ajouter 10µl d'échantillons d'ARN extraits, contrôle positif ou contrôle négatif.
* Nous ne fournissons pas de contrôle négatif ni d'eau sans nucléase. Utilisez de l'eau sans nucléase comme contrôle négatif.
6. Mélangez brièvement le tube par mouvements rotatifs pendant 3 à 5 secondes.
7. Placer le tube dans un thermocycleur en temps réel et démarrer l'amplification et la détection avec les conditions de cyclage indiquées dans le tableau ci-dessous.
8. Analysez les résultats

Etape	Temp.	Temps	Cycle
Reverse transcription	50°C	30 min	1
Pre-denaturation	95°C	10 min	1
Denaturation	95°C	15 sec	40
Annealing/Extension/détection	60°C	60 sec	

Equipement PCR Real-Time pour le test

1. ABI 7500/7500Fast (Applied Biosystems)
2. CFX96 (Bio-Rad)
3. SLAN96S (Hongshi)

Analyse des résultats

1. Définir le seuil

Equipement PCR Real-Time	Level		
	FAM (Orf1ab)	HEX (N)	Cy5 (IC)
CFX96-DX	250	250	250
7500/7500Fast	40,000	20,000	20,000
SLAN96S	0.12	0.12	0.12

2. Définir la ligne de base

Equipement PCR Real-Time	Level		
	FAM (Orf1ab)	HEX (N)	Cy5 (IC)
CFX96-DX	3-15	3-15	3-15
7500/7500Fast	3-15	3-15	3-15
SLAN96S	6-12	6-12	6-12

3. Ct. Valeur pour les contrôles

Control	FAM (Orf1ab)	HEX (N)	Cy5 (IC)
Positive control	28-32	28-32	28-32
Negative control	No Ct.	No Ct.	No Ct.

4. Ct. Valeur pour la détermination du résultat positif ou négatif

Détermination	FAM (Orf1ab)	HEX (N)	Cy5 (IC)
Positif	≤40.0	≤40.0	≤40.0
Résultat non concluant	≤40.0	No Ct.	≤40.0
	No Ct.	≤40.0	≤40.0
Négatif	No Ct.	No Ct.	≤40.0
Invalide	No Ct.	No Ct.	No Ct.

Remarque :

* Lorsque la quantité de produits PCR (FAM ou HEX) est substantielle sur les données de résultats positifs, le signal du contrôle (Cy5) n'est pas augmenté.

Caractéristiques de performance

1. Sensibilité analytique (limite de détection)

Une série de dilutions de l'ARN de transcription in vitro, de 10^5 à 0,1 copie / μ l a été testée pour déterminer la sensibilité du kit. La limite de détection (LoD) est de 10 copies / μ l (100 copies / réaction).

2. Spécificité analytique (réactivité croisée)

Les Gènes de 12 virus respiratoires et de 14 souches bactériennes ont été testés pour évaluer la spécificité analytique du Kit PaxView COVID-19 RT-PCR real-time. Les micro-organismes testés n'ont pas été détectés.

Microorganismes	Concentration	Source	Result
Corona virus 229E	10^5 copies/ μ l	H-GUARD	Not detected

Corona virus OC43	10^5 copies/ μ l	H-GUARD	Not detected
Influenza A virus	10^5 copies/ μ l	H-GUARD	Not detected
Influenza B virus	10^5 copies/ μ l	H-GUARD	Not Detected
Adeno virus	10^5 copies/ μ l	H-GUARD	Not Detected
Respiratory syncytial virus A	10^5 copies/ μ l	H-GUARD	Not Detected
Respiratory syncytial virus B	10^5 copies/ μ l	H-GUARD	Not Detected
Parainfluenza virus 1	10^5 copies/ μ l	H-GUARD	Not Detected
Parainfluenza virus 2	10^5 copies/ μ l	H-GUARD	Not Detected
Parainfluenza virus 3	10^5 copies/ μ l	H-GUARD	Not Detected
Rhino virus	10^5 copies/ μ l	H-GUARD	Not detected
Herpes simplex Virus 1	10^6 copies/ μ l	KBPV	Not detected
<i>Haemophilus influenzae</i>	10^6 copies/ μ l	H-GUARD	Not Detected
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10^6 copies/ μ l	KMRC	Not Detected
<i>Mycobacterium avium</i>	10^6 copies/ μ l	KMRC	Not Detected
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	10^6 copies/ μ l	KCTC	Not Detected
<i>Legionella pneumophila</i>	10^6 copies/ μ l	KCTC	Not Detected
<i>Enterobacter cloacae</i>	10^6 copies/ μ l	KCTC	Not Detected
<i>Streptococcus pseudoneumoniae</i>	10^6 copies/ μ l	KCTC	Not Detected
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10^6 copies/ μ l	KCTC	Not Detected
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10^6 copies/ μ l	KCTC	Not Detected
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10^6 copies/ μ l	KCTC	Not Detected
<i>Proteus vulgaris</i>	10^6 copies/ μ l	KCTC	Not Detected
<i>Proteus mirabilis</i>	10^6 copies/ μ l	KCTC	Not Detected
<i>Escherichia coli</i>	10^6 copies/ μ l	KCTC	Not Detected
<i>Enterobacter aerogenes</i>	10^6 copies/ μ l	KCTC	Not Detected

3. Spécificité analytique (étude d'interférences)

Le kit PaxView COVID-19 RT-PCR real-time ne présente aucune réaction d'interférence en présence des 12 agents d'interférence suivants :

Agents d'interférence		Résultat	
		Orf1ab	N
Hémoglobine		Positive	Positive
Expectorant (COUGHSTOP)	Guaïfénésine	Positive	Positive
	Noscapine hydrochloride	Positive	Positive

Agents d'interférence		Résultat	
		Orf1ab	N
Expectorant (COUGHSTOP)	Dextromethorphan Hydrobromide Hydrate	Positive	Positive
	Trimetoquinol Hydrochloride Hydrate	Positive	Positive
	Alpha-Chlorpheniramine Maleate	Positive	Positive
Nasals spray OTRIVIN	Xylometazoline Hydrochloride	Positive	Positive
Bains de bouche (LISTERINE)	Eucalyptol	Positive	Positive
	Methyl salicylate	Positive	Positive
	Thymol	Positive	Positive
	Levomenthol	Positive	Positive
	Sodium fluoride	Positive	Positive

4. Répétabilité et Reproductibilité

Pendant 2 jours, 2 fois /jour, 3 lots de kit différents ont été testés aux dilutions 5xLoD, 3xLoD et 1xLoD, par 2 expérimentateurs différents. Chaque dilution a été testée en triplicate.

La répétition des mesures, réalisées dans les mêmes conditions, montre un CV inférieur à 5%, ce qui confirme la répétabilité du kit.

La répétition des mesures réalisées, soit par deux expérimentateurs différents, soit avec des lots différents, montre un CV inférieur à 5%, ce qui confirme la reproductibilité du kit

5. Evaluation clinique

Un essai clinique a été mené au Seoul National University Bundang Hospital :

- Trois échantillons positifs et trois échantillons négatifs ont été utilisés.

- Une comparaison avec un kit de référence sous licence approuvé par l'agence KFDA coréenne a été réalisée.

- Un échantillon négatif a été utilisé pour la solution mère d'ARN

- Pour confirmer les performances cliniques du kit, l'ARN de l'échantillon positif a été dilué par pas successifs de 1/2 jusqu'à concentration de $(1/2)^{12}$.

Les résultats cliniques du produit de référence sous licence et du kit PaxView COVID-19 RT-PCR real-time étaient cohérents.

De plus, un échantillon positif est confirmé positif pour des dilutions allant de $(1/2)^7$ à $(1/2)^9$, selon l'échantillon.

Précautions

1. Ce kit est destiné à un usage diagnostic *in vitro*.
2. N'utilisez pas de kits après leur date d'expiration.
3. Pour des résultats fiables, collecte, stockage, transport et manutention appropriés, doivent être effectués.
4. Le matériel de Contrôle de la Qualité doit être conforme aux directives en vigueur de chaque laboratoire.

5. Ne regroupez pas les réactifs de différents kits ou lots.
6. Congélations et décongélations répétées des réactifs doivent être évitées car cela peut affecter la sensibilité du test.
7. Conserver les extraits d'acide nucléique à -20°C et les placer sur de la glace lors de l'utilisation.
8. Il faut veiller à ce que les réactifs ne soient pas contaminés par des extraits d'acide nucléique, des produits d'amplification PCR ou des témoins positifs. Nous vous recommandons d'utiliser des filtres jetables stériles.
9. Attention à la contamination microbienne et croisée, aux déversements d'échantillons lors de la préparation des échantillons. Nous recommandons d'utiliser un tube à vis pendant le test.
10. Ne pas manger, boire ou fumer dans les zones de travail de laboratoire. Lors de la manipulation des échantillons et des réactifs, porter gants, blouses et lunettes jetables adaptés au testeur.
11. Les gants doivent être portés et doivent être changés entre la manipulation des échantillons et des réactifs pour éviter toute contamination. Si une contamination est suspectée, remplacer immédiatement les gants et traiter le réactif pour éliminer la contamination.
12. Utilisez différentes pipettes pour l'extraction d'acide nucléique, mélange de réactifs, mélange de modèles d'acide nucléique et mélange de produits PCR d'amplification.
13. Évitez tout contact cutané avec tous les réactifs. Assurez-vous de vous laver les mains après avoir manipulé des échantillons et des réactifs.

Conditionnement

R0501N2001EX : 96 tests/kit

Stockage des produits

Conserver à $-25 \sim -15^{\circ}\text{C}$

6 mois à compter de la date de fabrication.

* Une fois ouverts, les composants sont stables pendant la période ci-dessous.

COMPOSANTS	Durée de conservation après ouverture
4X RT-PCR PREMIX	3 mois
PRIMER/PROBE MIX	3 mois
POSITIVE CONTROL	3 mois

Références

1. Directive 98/79/CE Du Parlement Européen et du Conseil du 27 Octobre 1998 relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*.
2. National institute for viral disease control and prevention (China); http://ivdc.chinacdc.cn/kjyz/202001/t20200121_211337.html

3. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases Interim guidance (WHO)
4. Real-Time RT-PCR Panel for Detection 2019-Novel Coronavirus (CDC)
5. CDC protocol of real time RTPCR for influenza A(H1N1) (WHO)
6. Technical File - TCF-R0501-07-00 §7. Performances

Updated : 22. May. 2020



PaxGenBio Co., Ltd.

#803~807, 361, Simin-daero, Dongan-gu, Anyang-si,
Gyeonggi-do, 14057 Rep. of Korea
Customer services: (+82) 31-244-5036,
info@paxgenbio.com

Mandataire

MT Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
66386 St. Ingbert Germany
Phone | + 49 6894 581020
Fax | + 49 6894 581021
info@mt-procons.com



N° d'enregistrement :
DE/CA70/40838-154470