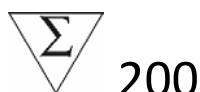


Kit de dosage RT-PCR (IVD) Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2

Dosage qualitatif à utiliser sur les instruments
de RT-PCR en temps réel

Instructions d'utilisation



REF 12015534

SARS-CoV-2 RT-PCR Oligos (1 de chaque)

Reliance One-Step Multiplex RT-qPCR Supermix (1 de chaque)

Exact Diagnostics : Standard SARS-CoV-2 (2 de chaque)

Exact Diagnostics : Contrôle négatif SARS-CoV-2 (2 de chaque)

IVD



Bio-Rad Laboratories, Inc.
4000 Alfred Nobel Drive Hercules, CA États-Unis 94547




















FRANCE, Bio-Rad, 3 boulevard Raymond Poincaré, 92430 Marnes-la-Coquette,

Traductions

Les documents produits peuvent être fournis dans d'autres langues sur des supports électroniques.

Lexique des symboles

 Conformité européenne	 Fabricant	 Mandataire dans l'Union européenne
 Numéro de lot	 Date limite d'utilisation	 Pour un usage diagnostique in vitro
 Limite de température	 Références	 Consulter les instructions d'utilisation
 Nombre de tests	 À utiliser avec	 Numéro de série
Rx Only Utilisation sur ordonnance uniquement	 Système d'identification unique des dispositifs - Identificateur du dispositif	 Contient du latex
 Destiné à la recherche uniquement	 À usage unique	 Risque biologique

Mentions légales

La reproduction ou la transmission du présent document, en totalité ou en partie, sous quelque forme ou par quelque procédé que ce soit, électronique ou mécanique, y compris la photocopie ou l'enregistrement, ou tout système de stockage ou d'extraction de données, est interdite sans l'autorisation écrite de Bio-Rad Laboratories.

Bio-Rad Laboratories se réserve le droit de modifier ses produits et ses services à tout moment. Des modifications sont susceptibles d'être apportées à ce manuel d'instructions sans préavis. Bien que sa rédaction ait été guidée par un souci d'homogénéité, Bio-Rad décline toute responsabilité en cas d'erreurs ou d'omissions, ou de tout dommage découlant de l'application ou de l'utilisation des présentes informations.

Kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD

BIO-RAD, HARD-SHELL et MICROSEAL sont des marques commerciales de Bio-Rad Laboratories, Inc. dans certaines juridictions.

Les plaques Hard-Shell sont couvertes par un ou plusieurs des brevets américains suivants, ou leurs homologues étrangers détenus par Eppendorf AG : numéros des brevets américains 7,347,977 ; 6,340,589 et 6,528,302.

Toutes les marques commerciales utilisées dans le présent document sont la propriété de leur propriétaire respectif.

Ce produit et / ou son utilisation sont couverts par des revendications de brevets américains et / ou par des demandes de brevets américains et étrangers en instance appartenant à Bio-Rad Laboratories, Inc ou sous licence de celui-ci. L'achat du produit inclut un droit limité non transférable, au titre de la propriété intellectuelle concernant l'utilisation du produit à des fins de recherche et de diagnostic internes uniquement. Pour les besoins du COVID-19 exclusivement, Bio-Rad accorde le droit d'utilisation du produit à des fins commerciales de toute nature, y compris, mais sans s'y limiter, la fabrication, le contrôle qualité ou les services commerciaux, tels que les services contractuels ou les frais de service. Les informations relatives à une licence pour une telle utilisation peuvent être obtenues auprès de Bio-Rad Laboratories. À toute fin autre que le test COVID-19, il appartient à l'acheteur / utilisateur final d'acquiescer les droits de propriété intellectuelle supplémentaires éventuellement requis.

Avertissements et précautions d'emploi du kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR

Pour un usage diagnostique in vitro. Pour usage hospitalier par des professionnels.

Ce kit de test doit être manipulé uniquement par du personnel qualifié, formé aux procédures de laboratoire et en maîtrisant les dangers potentiels. Porter des vêtements de protection appropriés, des gants et une protection oculaire / faciale et manipuler de manière appropriée selon les bonnes pratiques de laboratoire requises.

Équipement de protection individuelle (EPI)

Il est recommandé d'utiliser correctement les gants lors de la manipulation des composants et des plaques d'échantillon. Tous les gants dont la capacité de protection est réduite doivent être jetés et remplacés. Tenez compte de la toxicité des produits chimiques et de facteurs tels que la durée d'exposition, la conservation et la température avant de décider de réutiliser des gants chimiquement exposés. Les caractéristiques ci-après guident le choix de gants appropriés pour la manipulation des machines, des dosages, des huiles et des solvants de nettoyage :

- Les gants en butyle sont faits de caoutchouc synthétique et protègent contre le peroxyde, l'acide fluorhydrique, les bases fortes, les alcools, les aldéhydes et les cétones.
- Les gants en caoutchouc naturel (latex) sont confortables à porter et présentent une résistance à la traction, une élasticité et une résistance à la température exceptionnelles.

Kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD

- Les gants en néoprène sont faits de caoutchouc synthétique et offrent une bonne souplesse, une certaine dextérité manuelle, une haute densité et une résistance à la déchirure ; ils protègent contre les alcools, les acides organiques et les alcalis.
- Les gants en nitrile sont faits d'un copolymère et offrent une protection contre les solvants chlorés tels que le trichloréthylène et le tétrachloroéthylène ; ils offrent une protection lors de la manipulation des huiles, des graisses, des acides et des substances caustiques.

Sommaire

Traductions	2
Lexique des symboles	2
Mentions légales	2
Avertissements et précautions d'emploi du kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR	3
Équipement de protection individuelle (EPI)	3
Usage prévu	7
Résumé et principe	7
Flux de travail du kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR	8
Réactifs et instruments	9
Matériel fourni	9
Matériel requis mais non fourni	9
Précautions générales et avertissements	10
Prélèvement, manipulation et stockage des échantillons	11
Utilisation du matériel de contrôle	12
Manipulation et conservation des réactifs	13
Kit de dosage de Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR	13
Zones de travail	13
Manipulation générale	13
Protocole du kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR	14
Aperçu	14
Extraction d'acide nucléique	14
Préparation de la réaction RT-PCR en une étape	15
Configuration de l'instrument Bio-Rad CFX96 Dx	16
Exécution de la plaque RT-PCR sur le système de PCR en temps réel CFX96 Dx	17
Analyse des données sur le système de PCR en temps réel CFX96 Dx	18
Configuration de l'instrument AB7500 Fast Dx	19
Analyse des données sur le système de PCR en temps réel AB7500 Fast Dx	20
Interprétation des résultats	20
Contrôles du kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR - CSM, positif et négatif	20
Examen et interprétation des résultats des échantillons de patients	21
Limites	23
Caractéristiques de performance analytique	23
Sensibilité analytique	23

Kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD

Inclusivité	26
Spécificité analytique (réactivité croisée)	26
Évaluation clinique	29
Références bibliographiques	30
Annexe A : Protocole de qualification des instruments.....	31
Annexe B : Étude d'équivalence des types d'échantillons.....	33

Usage prévu

Le kit de dosage de réaction en chaîne par polymérase de transcription inverse (RT-PCR) en temps réel Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 est destiné à la détection qualitative de l'acide nucléique du SARS-CoV-2 dans des échantillons des voies respiratoires supérieures, notamment des échantillons sur écouvillon nasopharyngiens, du cornet moyen, oropharyngiens et de la nasale antérieure prélevés sur des personnes soupçonnées de COVID-19 par leur professionnel de santé. Les résultats concernent l'identification de l'ARN du SARS-CoV-2, qui est généralement détectable dans les échantillons des voies respiratoires supérieures pendant la phase aiguë de l'infection. Les résultats positifs indiquent la présence d'ARN du SARS-CoV-2 ; une corrélation clinique avec les antécédents du patient et d'autres informations diagnostiques est nécessaire pour déterminer l'état infectieux du patient. Des résultats positifs n'excluent pas la présence d'une infection bactérienne ou d'une co-infection avec d'autres virus. Des résultats négatifs n'excluent pas la présence d'une infection par le SARS-CoV-2 et ne doivent pas être utilisés comme seule base de décision de prise en charge des patients. Les résultats négatifs doivent être associés aux observations cliniques, aux antécédents du patient et aux informations épidémiologiques.

Le kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR est destiné à être utilisé par du personnel de laboratoire clinique qualifié spécialement formé et instruit aux techniques de RT-PCR et aux procédures de diagnostic in vitro.

Résumé et principe

Une épidémie de pneumonie causée par un nouveau coronavirus (SARS-CoV-2) dans la ville de Wuhan, province du Hubei, Chine, a été identifiée et signalée à l'Organisation mondiale de la santé (OMS) le 31 décembre 2019. La propagation rapide du SARS-CoV-2 dans de nombreuses régions du monde nécessite un plan de préparation et d'intervention dans les établissements de santé et de laboratoire. La disponibilité de dosages spécifiques et sensibles pour la détection du virus est essentielle pour un diagnostic précis des cas, l'évaluation de l'étendue de l'épidémie, le suivi des stratégies d'intervention et les études de surveillance.

Le kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR est un test de diagnostic moléculaire in vitro contenant les réactifs nécessaires pour réaliser un test RT-PCR. Les ensembles d'amorces et de sondes sont conçus pour détecter l'ARN du virus SARS-CoV-2 dans les échantillons des voies respiratoires supérieures, notamment des échantillons sur écouvillon nasopharyngiens, du cornet moyen, oropharyngiens et de la nasale antérieure prélevés sur des patients soupçonnés de COVID-19. Des tests supplémentaires et des procédures de confirmation doivent être effectués en consultation avec les autorités de santé publique et/ou d'autres autorités auxquelles un rapport est exigé. Les résultats des tests doivent également être communiqués conformément aux exigences réglementaires. Les performances sont inconnues chez les patients asymptomatiques.

Les amorces et sondes oligonucléotidiques pour la détection du SARS-CoV-2 sont les mêmes que celles signalées par le Centre américain de contrôle et de prévention des maladies (CDC) et ont été sélectionnées dans les régions du gène de la nucléocapside du virus (N1 et N2). Le panel est conçu pour la détection spécifique du SARS-CoV-2 (deux ensembles amorce / sonde). Un ensemble supplémentaire amorces / sonde pour détecter le gène de la RNase P (*RP*) humaine dans des échantillons témoins et des échantillons cliniques est également inclus dans le panel. Pour réaliser un test, l'ARN est isolé et purifié à partir d'échantillons de contrôle et d'échantillons cliniques, puis ajouté à un mélange-maître réalisé à l'aide de Bio-Rad Reliance One-Step Multiplex RT-qPCR Supermix. Le mélange-maître comprend une

Kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD

transcriptase inverse qui transcrit l'ARN en ADNc et une ADN polymérase qui amplifie les fragments d'ADNc qui partagent l'homologie avec les ensembles amorce/sonde. L'amplification de cibles spécifiques est surveillée par le changement d'intensité de fluorescence dans des longueurs d'onde d'excitation / émission spécifiques à l'aide d'un instrument de PCR en temps réel.

L'emploi du kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR peut être associé au Bio-Rad CFX96 Dx et au Thermo Fisher Scientific, Inc. Système de PCR en temps réel Applied Biosystems 7500 Fast Dx (Tableau 1). Le flux de travail se compose de quatre étapes (Tableau 2).

Tableau 1. Instruments requis

Références	Nom du produit	Logiciel
12014330	Système CFX Opus 96 Dx	Version 2.0 et postérieures du logiciel CFX Maestro Dx SE
1845097-IVD 1841000-IVD	CFX96 Dx Thermocycleur C1000 Dx	Logiciel CFX Manager Dx v 3.1 et versions postérieures
4406985 ou 4406984	Système de PCR en temps réel Applied Biosystems 7500 Fast Dx	Logiciel SDS v1.4.1 et versions postérieures

Flux de travail du kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR

Tableau 2. Flux de travail du kit de dosage de Bio-Rad SARS-CoV-2 RT-PCR

Flux de travail	
Étape 1	Isolement de l'ARN viral à partir d'échantillons des voies respiratoires supérieures, notamment les échantillons sur écouvillon nasopharyngiens, du cornet moyen, oropharyngiens ou de la nasale antérieure
Étape 2	Configuration de la plaque RT-PCR
Étape 3	Transcription inverse et PCR en une étape
Étape 4	Analyse

Réactifs et instruments

Matériel fourni

Le kit de dosage Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR contient suffisamment de réactifs pour traiter un total de 200 réactions (Tableau 3).

Tableau 3. Matériel requis, mais non fourni, pour l'exécution sur le système de PCR en temps réel CFX Opus 96 Dx et CFX96 Dx

Nom du produit	Numéro de référence	QTÉ (Tubes)	Volume (µL)	Conditions d'entreposage, °C
4x Reliance One-Step Multiplex Supermix	12010177	1	1000	-20 °C
Standard SARS-CoV-2 : Exact Diagnostics	16008441	2	300	-20 °C
Contrôle négatif SARS-Cov-2 : Exact Diagnostics	16008440	2	300	-20 °C
Oligos SARS-CoV-2 RT-PCR	12014116	1	300	-20 °C

Remarque : Les fiches de données de sécurité (FDS) sont disponibles sur bio-rad.com

Matériel requis mais non fourni

Réactifs et consommables :

Réactifs pour la purification de l'ARN

Le kit d'isolement d'acide nucléique viral / pathogène MagMAX Thermo Fisher Scientific (Référence n ° A48310, n ° A42352) et le kit QIAGEN QIAamp Viral Mini (Référence n ° 52906, n ° 52904) sont validés pour une utilisation avec le kit de dosage de Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR selon les instructions du fabricant.

Remarque : L'extraction automatisée (sur QIAcube ou Kingfisher) à l'aide de ces kits est prise en charge par les fabricants et nécessite une validation.

Réactifs et consommables génériques pour la PCR en temps réel

Une solution saline tamponnée au phosphate, pH 7,4 (référence Thermo Fisher n ° 10010023 ou équivalent) est nécessaire pour préparer les contrôles. Le matériel supplémentaire requis mais non fourni pour exécuter le kit de test Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR sur les systèmes de PCR en temps réel Bio-Rad et Thermo Fisher Scientific est répertorié dans Tableau 4 et Tableau 5.

Kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD

Tableau 4. Matériel requis mais non fourni pour l'exécution sur le système de PCR en temps réel CFX96 Dx

No de référence Bio-Rad	Nom	QTÉ (chacun)	Conditions d'entreposage
MSB1001	Film d'étanchéité pour plaques PCR Microseal 'B', adhésif, optique	100	15 à 30 °C
HSP9955 ou équivalent*	HSP9955, Plaques PCR 96 puits à coque dure, profil bas, paroi mince, avec jupe, blanc / blanc	50	15 à 30 °C

* Consultez la Brochure 5496 de Bio-Rad sur les plaques PCR Hard-Shell pour les autres plaques PCR à 96 puits colorés / puits blancs

Tableau 5. Matériel requis mais non fourni pour l'exécution sur le système AB7500 de PCR en temps réel AB7500 Fast Dx

Numéro de référence Thermo Fisher Scientific	Nom du produit	QTÉ (chacun)	Conditions d'entreposage
4311971	Film adhésif optique MicroAmp	100	15 à 30 °C
4346906	Plaque de réaction optique rapide MicroAmp 96 puits avec code-barres, 0,1 ml	20	15 à 30 °C

Instrumentation, logiciel et équipement général de laboratoire :

L'équipement général de laboratoire requis mais non fourni pour l'exécution du kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR est répertorié dans Tableau 6.

Tableau 6. Équipement général de laboratoire requis mais non fourni

Descriptions	Source
Pipettes ajustables monocanaux et multicanaux (1,00 à 1000 µL)	Rainin ou Eppendorf
Microcentrifugeuse	Fournisseurs multiples
Centrifugeuse à plaques à micropuits, avec un rotor qui accueille des microplaques standard	Fournisseurs multiples
Mélangeur de laboratoire, vortex ou équivalent	Fournisseurs multiples
Congélateurs de laboratoire • -30 °C à -10 °C • ≤ -70 °C	Fournisseurs multiples
Bloc froid ou glace à 96 puits	Fournisseurs multiples
Tubes de microcentrifugeuse antiadhésifs, sans RNase (1,5 ml et 2,0 ml)	Fournisseurs multiples
Embouts de pipette stériles à barrière aérosol (filtrés)	Fournisseurs multiples

Précautions générales et avertissements

1. Pour le diagnostic in vitro (IVD) uniquement.
2. Usage professionnel uniquement.
3. Des résultats positifs indiquent la présence d'ARN du SARS-CoV-2.

4. Tous les échantillons biologiques doivent être traités comme s'ils étaient capables de transmettre des agents infectieux. Utilisez des procédures de laboratoire sûres.
5. Nettoyez et désinfectez soigneusement toutes les surfaces de travail à l'aide d'une solution fraîchement préparée d'hypochlorite de sodium à 0,5 % (eau de javel à 10 %) dans de l'eau déminéralisée ou distillée, suivie d'alcool à 70 %.
6. Pour minimiser la contamination par les acides nucléiques, décontaminez régulièrement l'espace de paillasse, les pipettes et l'équipement, et séparez l'échantillon et la zone de manipulation d'ARN / ADN de la zone de préparation du test.
7. Optimisez le flux de travail et l'espace afin de minimiser le risque de contamination par transfert des PCR terminées.
8. Assurez-vous que le système de PCR en temps réel et le système d'automatisation disposent d'un espace dédié dans des zones séparées pour éviter la contamination par l'amplicon.
9. Effectuez la configuration du test et l'ajout du modèle à différents endroits avec des pipettes dédiées.
10. Utilisez les procédures de sécurité de laboratoire appropriées pour travailler avec des produits chimiques et manipuler des échantillons.
11. Changez fréquemment de gants lorsque vous transportez et travaillez avec différents réactifs.
12. Le non-respect des procédures et conditions décrites dans ce document peut entraîner des effets indésirables et fausser les résultats.
13. Ne pas remplacer les réactifs du kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR par d'autres réactifs.
14. La configuration et l'ajout du modèle doivent être effectués dans des conditions exemptes de RNase / DNase.
15. Il est recommandé de vérifier dûment les instruments avant de les utiliser avec le kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR en vous conformant aux protocoles de test établis. Consultez le protocole de qualification de l'instrument fourni à l'annexe A.
16. Assurez-vous que la maintenance et l'étalonnage réguliers sont effectués sur tous les équipements conformément aux recommandations du fabricant.
17. Utilisez des pointes et des réactifs non contaminés en nucléase, et nettoyez régulièrement les pipettes.
18. Assurez-vous que seul le protocole de cyclage thermique recommandé est utilisé.
19. N'utilisez pas d'eau traitée au diéthyl pyrocarbonate (DEPC) pour l'amplification par PCR.
20. Suivez attentivement les procédures et les directives fournies pour vous assurer que le test est effectué correctement. Tout écart relatif aux procédures et aux directives peut affecter les performances optimales des tests.
21. Des faux positifs peuvent survenir si le transfert d'échantillons n'est pas correctement contrôlé pendant la manipulation et le traitement des échantillons.

Prélèvement, manipulation et stockage des échantillons

Une collecte, un stockage et un transport adéquats et appropriés des échantillons sont importants pour obtenir des résultats de test sensibles et précis. Une formation aux procédures correctes de prélèvement d'échantillons est fortement recommandée pour garantir des échantillons et des résultats qualitatifs. CLSI MM13-Ed2 (août 2020) peut être référencé comme une ressource appropriée.

Kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD

1. Exemple de critères d'acceptation
 - Les échantillons doivent être prélevés dans des tubes stériles étiquetés et expédiés conformément aux exigences du laboratoire de test.
2. Critères de rejet des échantillons
 - Les échantillons qui n'ont pas été pré-approuvés pour les tests et ceux qui sont mal étiquetés ne seront pas testés tant que les informations requises ne seront pas obtenues.
3. Prélèvement de l'échantillon
 - Reportez-vous aux directives du CDC ou de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) pour le prélèvement, la manipulation et l'analyse d'échantillons cliniques provenant de personnes atteintes de la maladie à coronavirus 2019 (COVID-19).
 - Suivez les instructions du fabricant pour une utilisation correcte des dispositifs de prélèvement d'échantillons.
 - Les échantillons sur écouvillon doivent être prélevés uniquement à l'aide d'écouvillons avec une pointe synthétique, comme le nylon ou le Dacron®, et une tige en aluminium ou en plastique. Les écouvillons d'alginate de calcium sont inacceptables et les cotons-tiges avec tige en bois ne sont pas recommandés. Placer immédiatement les écouvillons dans des tubes stériles contenant 2 à 3 ml de milieu de transport viral ou de milieu de transport universel.
4. Transport des échantillons
 - Les échantillons doivent être emballés, expédiés et transportés conformément à l'édition actuelle du règlement sur les marchandises dangereuses de l'Association du transport aérien international (IATA). Respectez les réglementations d'expédition pour la substance biologique UN 3373, catégorie B lors de l'envoi d'échantillons potentiels 2019-nCoV au laboratoire d'essai.
 - Conserver les échantillons entre 2 et 8 °C et les expédier pendant la nuit au laboratoire d'analyse sur un bloc réfrigérant. Si un échantillon est congelé à -70 °C ou moins, expédiez-le pendant la nuit au laboratoire d'essai sur glace sèche.
5. Conservation des échantillons
 - Les échantillons peuvent être conservés entre 2 et 8 °C jusqu'à 72 heures après le prélèvement.
 - Si un retard dans l'extraction est prévu, conserver les échantillons à -70 °C ou moins.
 - L'acide nucléique extrait doit être conservé à 4 °C s'il doit être utilisé dans les 4 heures, ou à -70 °C ou moins s'il est conservé plus de 4 heures.

Utilisation du matériel de contrôle

Les contrôles à utiliser avec le kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR :

- Un contrôle sans échantillon (NTC) est nécessaire pour détecter la contamination du réactif et / ou de l'environnement. Un NTC utilise de l'eau exempte de RNase / DNase à la place d'un échantillon clinique avec au moins un puits par plaque de réaction.
- Un contrôle positif est nécessaire pour détecter une transcriptase inverse substantielle et / ou une défaillance de réactif, y compris l'intégrité de l'amorce et de la sonde. Le test utilise le standard SARS-CoV-2 Exact Diagnostics, qui est fabriqué avec des transcriptions d'ARN synthétique contenant cinq gènes cibles : *Gènes E, N, ORF1ab, RdRP et S* du SARS-CoV-2, chacun quantifié à 200 000 copies / ml. Ce matériel de contrôle est enrichi dans une matrice semblable à un échantillon pour atteindre une concentration finale de 1 000 copies / ml et l'acide nucléique est extrait. Un contrôle positif doit être inclus par lot d'échantillons extraits, avec au moins un puits de contrôle positif par plaque de réaction.

Kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD

- Un contrôle négatif est nécessaire pour détecter l'échec de l'étape d'extraction ou la contamination du réactif / de l'environnement. Le test utilise le contrôle négatif SARS-CoV-2 Exact Diagnostics, qui est fabriqué avec de l'ADN et de l'ARN génomiques humains. Ce matériel de contrôle est enrichi dans une matrice de type échantillon et l'acide nucléique est extrait. Un contrôle négatif doit être inclus par lot d'échantillons extraits, avec au moins un puits de contrôle négatif par plaque de réaction.

Manipulation et conservation des réactifs

Kit de dosage de Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR

- Le kit contient un supermix RT-PCR, des oligos de test, un standard et un contrôle négatif
- Un stockage à -20 °C est recommandé, avec des cycles minimum de gel-dégel

Zones de travail

Toutes les précautions de sécurité nécessaires doivent être prises conformément aux bonnes directives de laboratoire. Des précautions doivent également être prises pour éviter la contamination croisée des échantillons.

Des zones de travail séparées doivent être utilisées pour :

- L'extraction d'acide nucléique
- La préparation des réactifs (par exemple, préparation du mélange-maître)
 - Aucune réaction amplifiée, aucune solution cible ou aucun échantillon clinique ne doit être introduit dans la zone de préparation des réactifs. Après avoir travaillé dans cette zone, la blouse de laboratoire et les gants doivent être changés avant de passer dans la zone d'ajout d'acide nucléique
- Ajout d'acide nucléique
- Instrumentation (par exemple, thermocycleurs)

Manipulation générale

Une technique microbiologique et aseptique appropriée doit toujours être utilisée lorsque vous travaillez avec de l'ARN. Les mains et les particules de poussière peuvent transporter des bactéries et des moisissures et sont les sources les plus courantes de contamination par les RNase. Portez toujours des gants en latex, en vinyle ou en nitrile sans poudre lors de la manipulation des réactifs, des tubes et des échantillons d'ARN pour éviter la contamination par la RNase, de la surface de la peau ou de l'équipement de laboratoire. Changez fréquemment de gants et gardez les tubes fermés. Pendant la procédure, travaillez rapidement et gardez tout sur des blocs froids lorsque cela est possible pour éviter la dégradation de l'ARN par les RNases endogènes ou résiduelles. Nettoyez les surfaces de travail, les pipettes, etc. avec de l'eau de Javel à 10 % ou d'autres solutions susceptibles de détruire les acides nucléiques et les RNases. Pour éliminer la détérioration accélérée des plastiques et métaux, essuyez avec de l'éthanol à 70 % après avoir utilisé de l'eau de javel à 10 %. Assurez-vous que l'agent de blanchiment est entièrement éliminé afin d'éviter les réactions chimiques possibles entre l'eau de Javel et le thiocyanate de guanidine, qui est présent dans les réactifs d'extraction.

Protocole du kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR

Aperçu

Le kit de dosage Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR est destiné à la détection qualitative de l'ARN du SARS-CoV-2 dans les échantillons des voies respiratoires supérieures, notamment des échantillons sur écouvillon nasopharyngiens, du cornet moyen, oropharyngiens et de la nasale antérieure. Le test détecte deux régions du gène de la nucléocapside du SARS-CoV-2 (*nommées N1 et N2*) et un gène humain *RP* exprimé de manière constitutive, le tout en une seule réaction. La détection de l'ARN viral aide non seulement au diagnostic de la maladie, mais fournit également des informations épidémiologiques et de surveillance.

Le test se compose de deux étapes principales : (1) extraction d'ARN à partir d'échantillons de patients et (2) transcription inverse en une étape et amplification par réaction en chaîne par polymérase et détection des cibles *N1 et N2* spécifiques du SARS-CoV-2, qui détectent l'infection virale, et le test *RP* qui détecte le bruit de fond acide nucléique humain dans l'échantillon du patient.

Description des étapes du test

Les acides nucléiques sont isolés et purifiés à partir d'échantillons des voies respiratoires supérieures à l'aide du kit d'isolement d'acide nucléique viral / pathogène Thermo Fisher Scientific MagMAX ou du kit QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini, selon les instructions du fabricant. Les acides nucléiques purifiés sont transcrits en sens inverse et amplifiés à l'aide de Reliance One-Step Multiplex RT-qPCR Supermix. Le SARS-CoV-2 RT-PCR Oligos contient un mélange des amorces et des sondes pour les cibles SARS-CoV-2 (*N1 et N2*) et le gène *RP* humain pour permettre la détection multiplexée des cibles.

Extraction d'acide nucléique

Les performances du kit de dosage Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR dépendent de la quantité et de la qualité de l'ARN matriciel purifié à partir d'échantillons humains. Les kits et procédures d'extraction commerciaux suivants ont été qualifiés et validés pour la récupération et la pureté de l'ARN à utiliser avec le test :

- Le kit d'isolement d'acide nucléique viral / pathogène MagMAX Thermo Fisher Scientific (Référence N° A48310, N° A42352)
- Mini kit d'ARN viral QIAGEN QIAamp (Référence N° 52906, N° 52904)

Suivez les procédures recommandées par le fabricant pour l'extraction des échantillons. Des contrôles positif et négatif doivent être inclus dans chaque lot d'extraction.

Remarque : L'extraction automatisée (sur QIAcube ou Kingfisher) à l'aide de ces kits est prise en charge par les fabricants et nécessite une validation.

Préparation des contrôles

Contrôle positif : Introduire 5 µL du standard SARS-CoV-2 Exact Diagnostics dans un tube contenant 995 µL de solution saline tamponnée au phosphate (PBS). Traiter comme un échantillon de patient et procéder à l'extraction d'acide nucléique avec d'autres échantillons selon les instructions du fabricant.

Kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD

Contrôle négatif : Introduire 5 µL de contrôle négatif SARS-CoV-2 Exact Diagnostics dans un tube contenant 995 µL de PBS. Traiter comme un échantillon de patient et procéder à l'extraction d'acide nucléique avec d'autres échantillons selon les instructions du fabricant.

Préparation de la réaction RT-PCR en une étape

1. Assurez-vous que le ou les échantillons d'ARN extraits sont décongelés sur de la glace.

Remarque : Ne pas faire tourbillonner les échantillons d'ARN. Les échantillons d'ARN peuvent être mélangés en effleurant les tubes, suivi d'une brève centrifugation pour en recueillir le contenu au fond des tubes.

2. Décongelez tous les composants du kit sur de la glace.
3. Bien mélanger en faisant tourbillonner légèrement chaque tube pour obtenir l'homogénéité, puis centrifuger par impulsions pour en recueillir le contenu au fond de chaque tube

Remarque : Le Reliance One-Step Multiplex Supermix est visqueux. Il est essentiel de secouer avant de commencer la préparation du mélange d'essai.

4. Préparation du mélange-maître de la RT-PCR :
 - a. Préparez un mélange-maître en fonction du nombre d'échantillons de patients et de contrôles à tester plus 10 % de volume supplémentaire (Tableau 7) lorsque plus d'un échantillon est testé.
 - b. Faites tourbillonner légèrement le mélange-maître, puis centrifugez par impulsions pour en recueillir le contenu au fond du tube.

Tableau 7. Volumes des composants du mélange-maître de la RT-PCR

Composant	Volume pour 1 échantillon (µL)	Volume pour 96 échantillons (µL)	Volume pour N échantillons (µL)
Reliance One-Step Multiplex RT-qPCR Supermix	5,0	528	(5,0 x N) x 1,1
SARS-CoV-2 RT-PCR Oligos	1,5	158	(1,5 x N) x 1,1
Eau sans RNase / DNase	3,5	370	(3,5 x N) x 1,1
Volume par réaction	10,0	1056	(10,0 x N) x 1,1

5. Distribuer 10 µL du mélange-maître dans les puits appropriés de la plaque RT-PCR.
6. Ajouter 10 µL d'eau sans RNase / DNase dans un puits pour un NTC.
7. Ajouter 10 µL de matériel de contrôle négatif dans un puits pour un contrôle négatif.
8. Ajouter 10 µL de matériel de contrôle positif dans un puits pour un contrôle positif.
9. Pour les puits restants, ajouter 10 µL d'échantillon d'ARN extrait par puits.
10. Sceller la plaque avec un film d'étanchéité pour plaque PCR Microseal 'B' ou un film adhésif optique MicroAmp.
11. Faites tourbillonner la plaque pendant 30 secondes à une vitesse élevée.
12. Centrifuger la plaque de réaction RT-PCR pendant 30 secondes à 1000 RCF pour éliminer les bulles d'air et permettre à la réaction RT-PCR de se déposer au fond des puits. S'il reste des bulles, faites à nouveau tourner la plaque.
13. Procédez au chargement de la plaque de réaction RT-PCR sur un instrument de PCR en temps réel CFX Opus 96 Dx, CFX96 Dx ou AB7500 Fast Dx.

Configuration de l'instrument Bio-Rad CFX96 Dx

Les instructions suivantes concernent l'exécution du kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR sur un système de PCR en temps réel CFX96 Dx contrôlé par ordinateur. Pour plus d'informations, reportez-vous au manuel de l'instrument.

Trois étapes doivent être suivies pour une analyse RT-PCR en utilisant le logiciel Bio-Rad CFX Maestro Dx SE ou CFX Manager Dx :

1. Configuration du protocole
2. Configuration de la plaque
3. Exécution de la réaction RT-PCR

Configuration du protocole de cyclage pour le système de PCR en temps réel CFX Opus 96 Dx ou CFX96 Dx

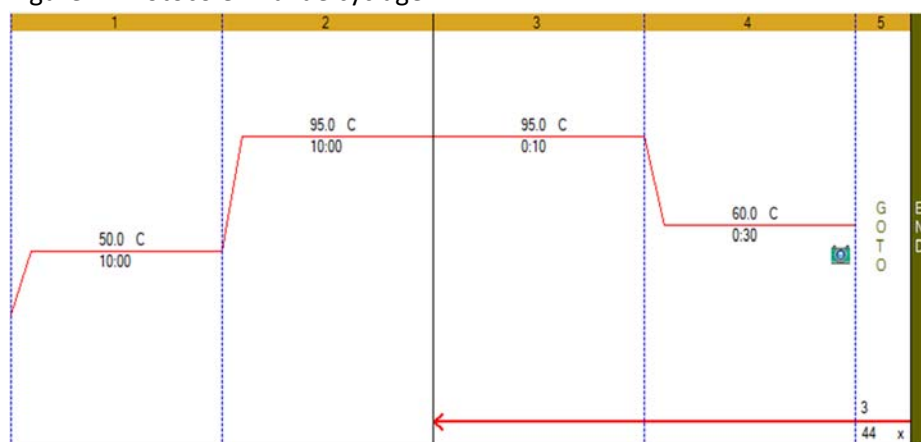
1. Cliquez sur **Fichier** -> **Nouveau** -> **Protocole** dans la barre de menu pour ouvrir l'éditeur de protocole
2. Changez le volume d'échantillon à 20 µL
3. Modifiez le protocole de cyclage selon les directives de Tableau 8 au dessous de :

Tableau 8. Protocole de cyclage thermique

Numéro de l'étape	Étape de cyclage	Température (°C)	Durée	Cycles
1	Transcription inverse	50	10 minutes	1
2	Activation enzymatique	95	10 minutes	1
3	Dénaturation	95	10 secondes	45
4	Recuit / extension / lecture de plaque	60	30 secondes	
5	Passez à l'étape 3 et répétez-la 44 fois	--	--	

4. Confirmez que l'étape 4 comprend une lecture de plaque, comme l'indique le symbole de la caméra à l'étape
5. Pour ajouter une lecture de plaque à l'étape 4, cliquez sur l'étape à mettre en surbrillance, puis cliquez sur **Ajouter une lecture de plaque à l'étape**

Figure1 : Protocole final de cyclage



Kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD

6. Enregistrez le protocole en cliquant sur **Fichier** -> **Enregistrer sous**
7. Nommez le fichier de protocole « **Bio-Rad SARS-CoV-2 RT-PCR Protocol** »
8. Cliquez sur OK pour quitter l'écran Protocol Editor (Éditeur de protocole).

Configuration de la plaque pour le système de PCR en temps réel CFX96 Dx ou CFX Opus 96 Dx

1. Cliquez sur **File** (Fichier) -> **New** (Nouveau) -> **New Plate** (Nouvelle plaque) dans la barre de menu pour ouvrir Plate Editor (Éditeur de plaque)
2. Sélectionnez **Settings** (Paramètres) -> **Plate Size** (Taille de la plaque) -> sélectionnez 96 puits
3. Sélectionnez **Settings** (Paramètres) -> **Plate type** (Type de plaque) -> sélectionnez BR White
4. Cliquez sur le menu déroulant à droite du **Scan Mode** (Mode de balayage) et sélectionnez **All Channels** (Tous les canaux)
5. Mettez en évidence les puits où les échantillons et les contrôles seront sur la plaque. Pour mettre en évidence tous les puits, cliquez sur le coin supérieur gauche du graphique de la plaque.
6. Cliquez sur **Select Fluorophores** (Sélectionner les fluorophores) et sélectionnez FAM, HEX et Texas Red en cochant la case (Selected) Sélectionné à droite du fluorophore (décochez SYBR). Cliquez sur OK pour appliquer les modifications.
7. Définissez le type d'échantillon pour chaque puits en mettant en surbrillance les puits, puis choisissez l'identificateur approprié dans le menu déroulant Type d'échantillon.
8. Appliquez **les noms des cibles et les fluorophores** à tous les puits en mettant en évidence les puits, puis en cochant la case Load (Charger) à gauche de chacun des fluorophores répertoriés dans la section Target Name (Nom de la cible). Pour insérer le nom de la cible, remplacez <none> (<aucun>) dans la zone de texte ouverte à droite du fluorophore par ce qui suit :
 - FAM - SARS-CoV-2 (N1)
 - HEX – SARS-CoV-2 (N2)
 - Texas - RNase PSuggestion : Cliquez sur Entrée après avoir modifié chaque nom de cible pour l'appliquer à la disposition de plaque
9. Enregistrez le fichier en cliquant sur **File** (Fichier) -> **Save As** (Enregistrer sous)
10. Nommez le fichier de plaque « **Bio-Rad SARS-CoV-2 RT-PCR Plate Setup** »
11. Cliquez sur **Save** (Enregistrer) pour appliquer
12. Fermez le fichier en cliquant sur **File** (Fichier) -> **Close** (Fermer)

Exécution de la plaque RT-PCR sur le système de PCR en temps réel CFX96 Dx

1. Sélectionnez l'instrument dans le menu déroulant Select Instrument (Sélectionner l'instrument) dans la Startup Wizard (Assistant de démarrage)
2. Cliquez sur User-defined (Défini par l'utilisateur) dans la section Select run type (Sélectionner le type de série) de la Startup Wizard (Assistant de démarrage). Cela ouvre le panneau Run Setup (Configuration de la série).
3. Cliquez sur **Select Existing** (Sélectionner existant) dans l'onglet Protocol (Protocole)
4. Sélectionnez le fichier de protocole de cyclage « **Bio-Rad SARS-CoV-2 RT-PCR Protocol.prc1** »
5. Cliquez sur Open (Ouvrir) pour appliquer
6. Confirmez que le protocole de cyclage est comme indiqué dans Tableau 8
7. Cliquez sur l'onglet Plate (Plaque) dans le panneau Run Setup (Configuration de la série)
8. Cliquez sur **Select Existing** (Sélectionner existant)

Kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD

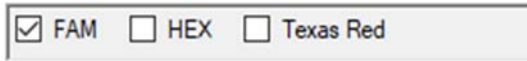
- Sélectionnez le fichier de configuration de la plaque « **Bio-Rad SARS-CoV-2 RT-qPCR Plate Setup.pltd** »
- Cliquez sur Open (Ouvrir) pour appliquer
- Cliquez sur l'onglet **Start Run** (Démarrer la série) dans le panneau Run Setup (Configuration de la série)
- Sélectionnez l'instrument dans la section Start Run on Selected Blocks (Démarrer la série sur les blocs sélectionnés) en cochant la case à gauche du nom de l'instrument
- Chargez la plaque dans l'instrument
- Cliquez sur **Start Run** (Démarrer la série)
- Nommez le fichier de la série et cliquez sur Save (Enregistrer) pour démarrer la série

Analyse des données sur le système de PCR en temps réel CFX96 Dx

Le fichier de données de la série s'ouvre automatiquement une fois la série terminée. Pour ouvrir un fichier qui a été fermé, cliquez sur **File** (Fichier) -> **Open** (Ouvrir) -> **Data File** (Fichier de données) -> Sélectionnez le fichier de données dans le menu.

Pour analyser les données, ajustez les valeurs de référence et de seuil pour chaque fluorophore dans l'onglet Quantification.

- Cliquez sur Settings (Paramètres) -> Cycles to Analyze (Cycles à analyser) -> entrez « 5 » dans la première cellule pour remplacer le paramètre par défaut « 1 ». Cliquez sur Ok pour appliquer.
- Désélectionnez les fluorophores HEX et Texas Red en décochant les cases correspondantes sous l'onglet amplification plot (tracé d'amplification). Seule la case FAM doit être sélectionnée.



- Sélectionnez Log Scale (Échelle logarithmique) en cochant la case en bas à droite du tracé d'amplification
 Log Scale
- Inspectez visuellement les traces. Tout puits avec amplification dans le canal FAM devrait montrer une augmentation exponentielle des valeurs RFU jusqu'aux plateaux de réaction.
- Un ajustement manuel de la ligne de base peut être nécessaire si les traces d'amplification ne sont pas exponentielles. Pour définir manuellement la ligne de base, sélectionnez **Settings** (Paramètres) -> **Baseline Threshold** (Seuil de référence). Mettez en surbrillance le puits à ajuster, entrez 2 dans la cellule **Baseline Begin** (Départ référence), entrez un numéro de cycle correspondant à 2 cycles avant que la trace d'amplification ne commence à augmenter dans la cellule **Baseline End** (Fin référence). Cliquez sur **OK** pour appliquer.
- Définissez le seuil FAM dans le tracé d'amplification en cliquant et en faisant glisser la ligne de seuil jusqu'à ce qu'elle se trouve dans la phase exponentielle des courbes de fluorescence et au-dessus de tout signal de fond.
- Confirmer la ligne de base et définir le seuil pour les canaux HEX et Texas Red en sélectionnant le fluorophore approprié à l'étape 2 et en répétant le processus défini ci-dessus

Configuration de l'instrument AB7500 Fast Dx

Les instructions suivantes sont essentielles pour faire fonctionner le kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR sur un système de PCR en temps réel AB7500 Fast Dx. Pour plus d'informations sur la configuration des plaques et du protocole de cyclage, reportez-vous au manuel de l'instrument AB7500 Fast Dx Real-Time PCR.

1. Lancez le logiciel 7500
2. Sélectionnez **File** (Fichier) -> **New** (Nouveau) dans la barre de menus
3. Définir ce qui suit :
 - a. **Dosage - Courbe standard (quantification absolue)**
 - b. **Container - 96 puits transparent**
 - c. **Modèle - Document vierge**
 - d. **Mode de fonctionnement - Standard 7500**
4. Attribuez le colorant de rapport comme défini dans Tableau 9

Tableau 9 : Colorants de rapport requis

Colorant de rapport	Détecteur
FAM	N1
HEX	N2
RED TEXAS	RP

Remarque : Pour le test N2, le canal VIC est applicable pour détecter cette cible.

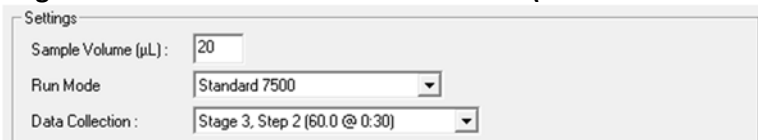
5. Sélectionnez **Passive Reference** (Référence passive) -> **None** (Aucune)
6. Définissez le protocole de cyclage en utilisant les valeurs répertoriées dans Tableau 10

Tableau 10. Protocole de cyclage thermique pour AB7500 Fast Dx

Étape de cyclage	Température (°C)	Durée	Nombre de cycles
Transcription inverse	50	10 minutes	1
Activation enzymatique	95	10 minutes	1
Dénaturation	95	10 secondes	45
Recuit / extension	60	30 secondes	

7. Définissez l'étape de collecte de données en sélectionnant Étape 3, étape 2 (60,0 @ 0:30) dans le menu déroulant Data Collection (Collecte de données), sélectionnez Étape 3, Étape 2 (60,0 @ 0:30), voir Figure 2.

Figure 2 : Menu déroulant Data Collection (Collecte de données)



Analyse des données sur le système de PCR en temps réel AB7500 Fast Dx

Les instructions suivantes sont essentielles pour l'analyse des résultats obtenus à l'aide du kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR avec le système de PCR en temps réel AB7500 Fast Dx. Pour plus d'informations sur l'analyse des données, consultez le manuel de l'instrument AB7500 Fast Dx Real-Time PCR.

Définition des valeurs de référence et de seuil

1. Sélectionnez **File** (Fichier) -> **Open** (Ouvrir) -> Sélectionnez le fichier de données à analyser
2. Sélectionnez l'onglet **Result** (Résultat) dans le coin supérieur gauche du logiciel
3. Cliquez sur l'onglet **Amplification Plot** (Tracé d'amplification)
4. Mettez en surbrillance tous les échantillons de l'analyse pour afficher toutes les courbes d'amplification
5. Définissez **Data** sur **Delta Rn vs. Cycle** sur le côté droit du panneau
6. Réglez le **détecteur** sur **N1**
7. Définissez **Line Color** (couleur de la ligne) sur **Detector Color** (couleur du détecteur)
8. Sélectionnez **Manual Ct** et **Manual Baseline** sous **Analysis Settings** (Paramètres d'analyse). Ne modifiez pas les valeurs par défaut de la Référence manuelle
9. Cliquez et faites glisser la ligne de seuil jusqu'à ce qu'elle se trouve dans la phase exponentielle des courbes de fluorescence et au-dessus de tout signal de fond
10. Cliquez sur le bouton **Analyze** (Analyser) dans le coin inférieur droit de la fenêtre. Le seuil rouge passera au vert, ce qui indique que les données ont été analysées
11. Répétez les étapes 6 à 10 pour analyser les résultats de chaque ensemble de marqueurs

Interprétation des résultats

Le CSM, les contrôles positif et négatif doivent être examinés avant d'interpréter les résultats du patient. Si les contrôles ne sont pas valides, les résultats du patient ne peuvent pas être interprétés.

Contrôles du kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR - CSM, positif et négatif

Contrôle sans modèle (NTC)

Les réactions NTC pour le mélange d'oligo SARS-CoV-2 RT-PCR ne doivent présenter de signaux positifs dans aucun canal (FAM, HEX ou Texas Red) pour l'une des trois cibles testées, *N1*, *N2* ou *RP*. Si l'une des réactions NTC présente une positivité, une contamination de l'échantillon peut s'être produite. Invalidez l'analyse et répétez le test avec l'acide nucléique extrait résiduel en respectant strictement les directives. Si le résultat du test répété est positif, extrayez à nouveau et retestez tous les échantillons inclus dans ce lot.

Positive Control (Contrôle positif)

Le contrôle positif donnera des résultats positifs ($Cq < 40$) pour la détection des ensembles d'amorces et de sondes *N1*, *N2* et *RP*.

Kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD

Negative Control (Contrôle négatif)

Le contrôle négatif doit donner un résultat positif avec l'ensemble d'amorces et de sondes *RP* ($Cq < 40$) et des résultats négatifs avec toutes les cibles SARS-CoV-2 *N1* et *N2*.

Examen et interprétation des résultats des échantillons de patients

L'évaluation des résultats des tests sur échantillons cliniques doit être effectuée après que les contrôles positifs et négatifs ont été examinés et jugés valides et acceptables. Les performances attendues des contrôles de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR sont indiquées dans Tableau 11.

Tableau 11. Performances attendues des contrôles dans le kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR

Type de contrôle	Nom du contrôle externe	Utilisé pour surveiller	SARS-CoV-2		Contrôle interne RP	Cq attendu		
			N1	N2		N1	N2	RP
NTC	Eau sans RNase / DNase	Contamination des réactifs et / ou de l'environnement	Négatif	Négatif	Négatif	Cq ≥ 40 ou N / A		
Négatif	Contrôle négatif SARS-CoV-2	Contamination des réactifs et / ou de l'environnement	Négatif	Négatif	Positif	Cq ≥ 40 ou N / A	Cq ≥ 40 ou N / A	< 40
Positif	Standard SARS-CoV-2	Échec substantiel du réactif, y compris l'intégrité de l'amorce et de la sonde	Positif	Positif	Positif	< 40	< 40	< 40

Si un contrôle ne répond pas à ces critères, il se peut que le test ait une configuration ou une exécution incorrecte, ou un dysfonctionnement ou une défaillance du réactif ou de l'équipement. Invalidez l'analyse et recommencez le test.

RP (Contrôle Interne)

Tous les échantillons cliniques doivent présenter des signaux positifs avec les amorces *RP* et la sonde ($Cq < 40$), indiquant ainsi la présence de l'ARN *RP* humain. Un échec de détection de *RP* dans les échantillons cliniques peut indiquer :

- Extraction incorrecte de l'acide nucléique à partir de matériaux cliniques entraînant une perte d'ARN et / ou une dégradation de l'ARN
- Absence de matériel cellulaire humain suffisant en raison d'une mauvaise collecte ou d'une perte d'intégrité de l'échantillon
- Mauvaise configuration et exécution du test
- Dysfonctionnement du réactif ou de l'équipement

Si le test *RP* ne produit pas de résultat positif pour un échantillon clinique humain, interpréter comme suit :

- Si les SARS-CoV-2 *N1* et *N2* sont positifs, même en l'absence d'un *RP* positif, le résultat doit être considéré comme valide. Il est possible que certains échantillons ne présentent pas de *RP* comme positif ($Cq < 40$) en raison du faible nombre de cellules dans l'échantillon clinique d'origine. Un signal *RP* négatif n'exclut pas la présence d'ARN du virus SARS-CoV-2 dans un échantillon clinique.

Kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD

- Si tous les marqueurs SARS-CoV-2 et *RP* sont négatifs pour l'échantillon, le résultat doit être considéré comme invalide pour l'échantillon. Si un échantillon résiduel est disponible, répétez la procédure d'extraction et répétez le test. Si tous les marqueurs restent négatifs après un nouveau test, signalez les résultats comme non valides et un nouvel échantillon doit être prélevé.

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

- SARS-CoV-2 est détecté lorsque tous les contrôles présentent les performances attendues et que les courbes d'amplification des marqueurs SARS-CoV-2 (*N1* et *N2*) franchissent la ligne de seuil en 40 cycles. Le *RP* peut être positif ou non comme décrit ci-dessus, mais le résultat SARS-CoV2 est toujours valide.
- Le SARS-CoV-2 n'est pas détecté lorsque tous les contrôles présentent les performances attendues et que toutes les courbes d'amplification des marqueurs SARS-CoV-2 (*N1*, *N2*) NE franchissent PAS la ligne de seuil dans les 40 cycles ET que la courbe d'amplification RNase P franchit la ligne de seuil dans les 40 cycles.
- Le résultat n'est pas concluant lorsque tous les contrôles présentent les performances attendues et les courbes d'amplification pour l'un ou l'autre des marqueurs SARS-CoV-2 (*N1* ou *N2*, mais pas les deux marqueurs) franchissent le seuil de cycle dans les 40 cycles. L'ARN extrait doit être retesté. Si l'ARN résiduel n'est pas disponible, extraire à nouveau l'ARN de l'échantillon résiduel et effectuer un nouveau test. Si le même résultat est obtenu, indiquez le résultat non concluant.
- Le résultat est invalide lorsque tous les contrôles présentent les performances attendues et les courbes d'amplification pour les marqueurs SARS-CoV-2 (*N1*, *N2*) ET le marqueur *RP* NE franchit PAS le seuil de cycle dans les 40 cycles. L'ARN extrait de l'échantillon doit être retesté. Si l'ARN résiduel n'est pas disponible, extraire à nouveau l'ARN de l'échantillon résiduel et effectuer un nouveau test. Si l'échantillon retesté est négatif pour tous les marqueurs et *RP*, le résultat est non valide et le prélèvement d'un nouvel échantillon sur le patient doit être envisagé.

Pour faciliter l'interprétation, reportez-vous aux directives dans Tableau 12.

Tableau 12. Guide d'interprétation des résultats du kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR

SARS-CoV-2 Résultat N1	SARS-CoV-2 Résultat N2	Contrôle interne Résultat RP	Interprétation	Actions
Positif (Cq < 40)	Positif (Cq < 40)	Positif ou Négatif	SARS-CoV-2 détecté	Conserver les échantillons à -70 °C, au besoin, et rapporter les résultats à l'autorité de santé publique compétente
Si une seule des deux cibles est positive (Cq < 40)		Positif ou négatif	Non concluant	Répéter le test de l'acide nucléique et / ou ré-extraire et répéter la RT-PCR. Si le résultat répété reste non concluant, contactez l'autorité de santé publique compétente pour obtenir des instructions quant au transfert de l'échantillon, ou des conseils supplémentaires.
Négatif (Cq ≥ 40 ou N / A)	Négatif (Cq ≥ 40 ou N / A)	Positif (Cq < 40)	SARS-CoV-2 non détecté	Signaler les résultats à l'autorité de santé publique compétente
Négatif (Cq ≥ 40 ou N / A)	Négatif (Cq ≥ 40 ou N / A)	Négatif (Cq ≥ 40 ou N / A)	Résultat non valide	Répétez l'extraction et la RT-PCR. Si le résultat répété reste non valide, envisagez de prélever un nouvel échantillon sur le patient.

Limites

1. Le kit de dosage Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR a été évalué uniquement pour une utilisation sur les systèmes de PCR en temps réel CFX Opus 96 Dx, CFX96 Dx et AB7500 Fast Dx.
2. La performance du kit de dosage Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR a été établie dans les échantillons des voies respiratoires supérieures, notamment des échantillons sur écouvillon nasopharyngiens, du cornet moyen, oropharyngiens et de la nasale antérieure. L'utilisation du kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR avec d'autres types d'échantillons n'a pas été évaluée et les caractéristiques de performance sont inconnues.
3. Des résultats fiables dépendent de procédures conformes de prélèvement, de conservation et de manipulation des échantillons.
4. Ce test est utilisé pour la détection de l'ARN du SARS-CoV-2 dans des échantillons des voies respiratoires supérieures collectés dans un milieu de transport universel (UTM) ou un système de transport viral universel (UVT). Le test d'autres types d'échantillons avec le kit de dosage de Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR peut entraîner des résultats inexacts.
5. La détection de l'ARN du SARS-CoV-2 peut être affectée par les méthodes de prélèvement d'échantillons, les facteurs liés au patient (par exemple, la présence de symptômes) et / ou le stade de l'infection.
6. Le résultat du kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR consiste en une évaluation qualitative d'échantillons de patients testés positifs au SARS-CoV-2. L'utilisateur examine les résultats de RT-PCR pour les contrôles et les échantillons de patients afin de faire un appel qualitatif du SARS-CoV-2 détecté ou non détecté. Les valeurs rapportées ne doivent pas être utilisées ou interprétées comme quantitatives.
7. Comme pour tout test moléculaire, des mutations dans les régions cibles du kit de dosage de Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR peuvent affecter la liaison de l'amorce et / ou de la sonde, entraînant une incapacité à détecter la présence d'un virus.
8. En raison des différences inhérentes entre les technologies, il est recommandé aux utilisateurs, avant de passer d'une technologie à une autre, d'effectuer des études préalables de corrélation des méthodes dans leur laboratoire afin de qualifier les différences technologiques. Il ne faut pas s'attendre à une concordance absolue entre les résultats en raison des différences susmentionnées entre les technologies. Les utilisateurs doivent suivre leurs propres politiques / procédures spécifiques.

Caractéristiques de performance analytique

Sensibilité analytique

Des études de limite de détection (LoD) ont été menées pour déterminer la concentration détectable la plus basse de SARS-CoV-2 à laquelle une valeur supérieure ou égale à 95% de tous les réplicats (vrais positifs) testés positifs en utilisant le Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT -Kit de dosage de PCR. Les études LoD ont été réalisées par le biais d'échantillons de patients simulés composés de virus SARS-CoV-2 synthétique (AccuPlex SARS-COV-2, Seracare, Cat # 0505-0126) titrés dans un fond de matrice d'écouvillon nasopharyngé négatif pour le SARS-CoV-2 avant purification d'acide nucléique. Une série de dilutions au 1/2 allant de 31,5 à 500 copies par mL a été testée. Vingt réplicats pour chaque concentration ont été extraits à l'aide du kit QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini ou du kit d'isolement d'acide nucléique viral / pathogène Thermo Fisher MagMax. Les échantillons d'acide nucléique extraits ont ensuite été testés avec le kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR sur les CFX96 Dx et

Kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD

AB7500 Fast Dx. La LoD a été identifiée comme la plus faible quantité de virus détectée avec au moins 19 réplicats testés positifs pour les dosages N1 et N2.

Les résultats LoD du kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR pour la détection du SARS-CoV-2 à partir d'échantillons extraits à l'aide du kit QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini sont présentés dans les tableaux 13 et 14. Sur le CFX96 Dx, la LoD est de 125 copies virales / ml (tableau 13). Sur le CFX Opus 96 Dx et l'AB7500 Fast Dx, la LoD est de 250 copies virales / ml (Tableau 14 et 15). Les résultats LoD du kit de test Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR pour la détection du SARS-CoV-2 à partir d'échantillons extraits à l'aide du kit d'isolement d'acide nucléique viral / pathogène Thermo Fisher MagMax sont présentés dans les tableaux 16 à 18. Sur le CFX Opus 96 Dx, le CFX96 Dx et l'AB7500 Fast Dx, la LoD est de 125 copies virales / ml. En résumé, la plage de LoD est de 125 à 250 copies virales / ml sur les instruments indépendamment de la méthode de purification d'acide nucléique (Tableau 19).

Tableau 13. Résultats du CFX96 Dx LoD pour les échantillons extraits du kit QIAamp Viral RNA Mini

SARS-CoV-2 copies / mL	Système de PCR en temps réel CFX96 Dx			
	Dosage N1		Dosage N2	
	Réplicats positifs / Nombre total de réplicats	Réplicats positifs Cq moyenne	Réplicats positifs / Nombre total de réplicats	Réplicats positifs Cq moyenne
500	N / A	N / A	N / A	N / A
250	20/20	31,25	20/20	32,88
125	19/20	32,4	20/20	34,6
62,5	19/20	32,86	18/20	35,57
31,25	15/20	33,49	15/20	36,36

Tableau 14. Résultats de la LoD du CFX Opus 96 Dx pour les échantillons extraits du kit QIAamp Viral RNA Mini

SARS-CoV-2 copies / mL	Système de PCR en temps réel AB7500 Dx			
	Dosage N1		Dosage N2	
	Réplicats positifs / Nombre total de réplicats	Réplicats positifs Cq moyenne	Réplicats positifs / Nombre total de réplicats	Réplicats positifs Cq moyenne
500	20/20	31,39	20/20	32,19
250	20/20	33,00	20/20	33,64
125	16/20	33,89	19/20	35,06
62,5	N / A	N / A	N / A	N / A
31,25	N / A	N / A	N / A	N / A

Kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD

Tableau 15. Résultats AB7500 Fast Dx LoD pour les échantillons extraits du kit QIAamp Viral RNA Mini

SARS-CoV-2 copies / mL	Système de PCR en temps réel AB7500 Dx			
	Dosage N1		Dosage N2	
	Réplicats positifs / Nombre total de réplicats	Réplicats positifs Cq moyenne	Réplicats positifs / Nombre total de réplicats	Réplicats positifs Cq moyenne
500	20/20	33,06	20/20	34,36
250	20/20	34,61	20/20	36,04
125	19/20	36,07	15/20	37,95
62,5	18/20	35,84	17/20	37,38
31,25	N / A	N / A	N / A	N / A

Tableau 16. Résultats du CFX96 Dx LoD pour les échantillons extraits du kit d'isolation de l'acide nucléique viral / pathogène MagMax

SRAS-CoV-2 copies / mL	Système de PCR en temps réel CFX96 Dx			
	Dosage N1		Dosage N2	
	Réplicats positifs / Nombre total de réplicats	Réplicats positifs Cq moyenne	Réplicats positifs / Nombre total de réplicats	Réplicats positifs Cq moyenne
500	20/20	33,31	20/20	33,53
250	19/20	33,45	20/20	33,63
125	19/20	34,48	20/20	35,07
62,5	18/20	35,56	15/20	37,47
31,25	11/20	36,14	10/20	38,06

Tableau 17. Résultats de la LoD du CFX Opus 96 Dx pour les échantillons extraits du kit d'isolation de l'acide nucléique viral / pathogène MagMax

SRAS-CoV-2 copies / ml	Système de PCR en temps réel CFX Opus 96 Dx			
	Dosage N1		Dosage N2	
	Réplicats positifs / Nombre total de réplicats	Réplicats positifs Cq moyenne	Réplicats positifs / Nombre total de réplicats	Réplicats positifs Cq moyenne
500	20/20	33,57	20/20	33,52
250	20/20	33,65	20/20	33,82
125	20/20	34,99	19/20	34,98
62,5	N / A	N / A	N / A	N / A

Kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD

Tableau 18. Résultats du AB7500 Dx LoD pour les échantillons extraits du kit d'isolation de l'acide nucléique viral / pathogène MagMax

SARS-CoV-2 copies / mL	Système de PCR en temps réel AB7500 Dx			
	Dosage N1		Dosage N2	
	Réplicats positifs / Nombre total de réplicats	Réplicats positifs Cq moyenne	Réplicats positifs / Nombre total de réplicats	Réplicats positifs Cq moyenne
500	20/20	33,72	20/20	35,44
250	20/20	34,29	20/20	35,94
125	20/20	35,34	20/20	37,04
62,5	13/20	36,76	12/20	38,2
31,25	6/20	37,47	9/20	39,17

Tableau 19. Résumé de la LoD du kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR

	Mini kit d'ARN viral QIAamp	Kit d'isolement d'acide nucléique viral / pathogène MagMax
CFX96 Dx	125 copies / ml	125 copies / ml
Système CFX Opus 96 Dx	250 copies / ml	125 copies / ml
AB7500 Dx	250 copies / ml	125 copies / ml

Inclusivité

Les séquences Oligos (amorces et sondes) de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR pour *N1*, *N2* et *RP* ont été développées par les CDC. Les CDC ont effectué un alignement avec les séquences d'amorce et de sonde oligonucléotidiques du panel de diagnostic CDC 2019 nCoV Real-Time RT-PCR avec toutes les séquences d'acide nucléique disponibles au public pour le SARS-CoV-2 dans le cadre de l'Initiative mondiale sur le partage de toutes les données sur la grippe (GISAID, <https://www.gisaid.org>) au 20 juin 2020, pour démontrer l'inclusivité prévue du panel de diagnostic RT-PCR en temps réel du CDC 2019 nCoV. Une évaluation de 31 623 séquences SARS-CoV-2 disponibles dans le GISAID a été utilisée dans cette étude. À l'exception d'un mésappariement d'un nucléotide avec une fréquence > 1 % (2,00 %) à la troisième position de la sonde N1, la fréquence de tous les mésappariements était <1 %, indiquant que la prévalence des mésappariements était sporadique. Une seule séquence (0,0032 %) avait deux mésappariements de nucléotides dans la sonde N1, et une autre séquence d'un isolat différent (0,0032 %) avait deux mésappariements de nucléotides dans l'amorce inverse N1. Aucune séquence ne s'est avérée avoir plus d'un mésappariement dans une quelconque région d'amorce / sonde N2.

Le risque d'une seule discordance entraînant une perte significative de réactivité et un faux résultat négatif est faible en raison de la conception des amorces et des sondes avec des températures de fusion > 60 °C et des conditions d'exécution du test avec une température d'annelage à 55 °C pour tolérer une à deux discordances.

Spécificité analytique (réactivité croisée)

L'analyse in silico des agents pathogènes répertoriés dans le tableau 20 a été réalisée en téléchargeant une séquence de référence GenBank par génome pour chacun des organismes. Les séquences de référence ont été comparées aux cibles Bio-Rad SARS-CoV-2, N1 et N2 pour toutes les combinaisons possibles (amorce directe, amorce inverse, sonde et compléments inverses pour toutes celles-ci) pour

Kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD

déterminer le pourcentage d'homologie. Si l'une de ces combinaisons d'amorces était mise en correspondance avec une séquence sur des brins opposés avec une homologie > 80 % sur la même cible à une courte distance (≤ 100 pb), les amplifications potentielles étaient signalées. Aucune réactivité croisée involontaire potentielle n'est attendue sur la base de cette analyse in silico, sauf pour le SARS-coronavirus (SARS-CoV) avec la cible N2.

L'analyse in silico pour l'ensemble amorces / sondes N1 a montré une homologie de séquence élevée de la sonde N1 avec le génome du coronavirus SARS-CoV et du coronavirus de type SARS de chauve-souris. Cependant, les amorces avant et arrière n'ont montré aucune homologie de séquence avec le génome du coronavirus du SARS et du coronavirus de type SARS de la chauve-souris. En combinant les résultats des amorces et des sondes, il n'existe aucune homologie significative avec le génome humain, d'autres coronavirus ou la microflore humaine qui permettrait de prédire d'éventuels faux résultats positifs de la RT-PCR.

Tableau 20. Analyse in silico pour le SARS-CoV-2

Agents pathogènes testés in Silico	Réactivité croisée involontaire avec le N1	Réactivité croisée involontaire avec le N2
SARS-CoV	RAS	Correspondance d'homologie 92 % *
MERS-coronavirus	RAS	RAS
Adénovirus humain A	RAS	RAS
Adénovirus humain B1	RAS	RAS
Adénovirus humain B2	RAS	RAS
Adénovirus humain C	RAS	RAS
Adénovirus humain D	RAS	RAS
Adénovirus humain E	RAS	RAS
Adénovirus humain F	RAS	RAS
Métapneumovirus humain (hMPV)	RAS	RAS
Virus parainfluenza 1	RAS	RAS
Virus parainfluenza 2	RAS	RAS
Virus parainfluenza 3	RAS	RAS
Virus parainfluenza 4	RAS	RAS
Grippe A H3N2	RAS	RAS
Grippe A H2N2	RAS	RAS
Grippe A H7N9	RAS	RAS
Grippe A H1N1	RAS	RAS
Grippe B	RAS	RAS
Entérovirus humain A	RAS	RAS
Entérovirus humain B	RAS	RAS
Entérovirus E, entérovirus bovin	RAS	RAS
Entérovirus F	RAS	RAS
Entérovirus G, entérovirus porcin 9	RAS	RAS
Entérovirus H, entérovirus simien A	RAS	RAS

Kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD

Agents pathogènes testés in Silico	Réactivité croisée involontaire avec le N1	Réactivité croisée involontaire avec le N2
Entérovirus J, souche 1631	RAS	RAS
Enterovirus J, souche N203	RAS	RAS
Virus respiratoire syncytial	RAS	RAS
Rhinovirus A, rhinovirus humain 89	RAS	RAS
Rhinovirus A, souche ATCC VR-1559 du rhinovirus humain 1	RAS	RAS
Rhinovirus B	RAS	RAS
Rhinovirus C, rhinovirus humain C	RAS	RAS
Rhinovirus C, rhinovirus humain NAT001	RAS	RAS
<i>Haemophilus influenzae</i>	RAS	RAS
<i>Legionella pneumophila</i>	RAS	RAS
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	RAS	RAS
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	RAS	RAS
<i>Streptococcus pyogenes</i>	RAS	RAS
Entérovirus (par exemple EV68)	RAS	RAS
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	RAS	RAS

* L'analyse de l'amorce avant de la cible N2 a montré une forte homologie avec les coronavirus de type SARS de chauve-souris. Cependant, les séquences de l'amorce inverse et de la sonde n'ont montré aucune homologie significative avec le génome humain, d'autres coronavirus ou la microflore humaine qui permettrait de prédire d'éventuels faux résultats positifs de la RT-PCR. En combinant les résultats des amorces et des sondes, il n'est pas possible de prédire les éventuels faux résultats positifs de la RT-PCR.

En plus de l'analyse *in silico*, les CDC ont fait état d'une spécificité et d'une exclusivité analytiques démontrant que les résultats attendus sont obtenus pour chaque organisme mentionné dans le Tableau 21 afin de démontrer que les résultats finaux ne sont pas influencés par ces virus.

Tableau 21. Spécificité / Exclusivité rapportée par les CDC

Virus	Souche	Source	2019-nCoV_ N1	2019-nCoV_ N2	Résultat final
Coronavirus humain	229E	Isoler	0/3	0/3	Négatif
Coronavirus humain	OC43	Isoler	0/3	0/3	Négatif
Coronavirus humain	NL63	Échantillon clinique	0/3	0/3	Négatif
Coronavirus humain	HKU1	Échantillon clinique	0/3	0/3	Négatif
MERS-coronavirus		Isoler	0/3	0/3	Négatif
SARS-coronavirus		Isoler	0/3	0/3	Négatif
Bocavirus		Échantillon clinique	0/3	0/3	Négatif
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		Isoler	0/3	0/3	Négatif
<i>Streptocoque</i>		Isoler	0/3	0/3	Négatif
Influenza A(H1N1)		Isoler	0/3	0/3	Négatif
Grippe A(H3N2)		Isoler	0/3	0/3	Négatif
Grippe B		Isoler	0/3	0/3	Négatif
Adénovirus humain, type 1	Ad71	Isoler	0/3	0/3	Négatif
Métapneumovirus		Isoler	0/3	0/3	Négatif
Virus respiratoire syncytial	Long A	Isoler	0/3	0/3	Négatif
Rhinovirus		Isoler	0/3	0/3	Négatif
Virus parainfluenza 1	C35	Isoler	0/3	0/3	Négatif
Virus parainfluenza 2	Greer	Isoler	0/3	0/3	Négatif
Virus parainfluenza 3	C-43	Isoler	0/3	0/3	Négatif
Virus parainfluenza 4	M-25	Isoler	0/3	0/3	Négatif

Évaluation clinique

La performance du kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR avec des échantillons cliniques sur écouvillon nasopharyngé a été évaluée à l'aide de 34 échantillons cliniques négatifs individuels et de 34 échantillons cliniques positifs confirmés. Les échantillons fournis par iSpecimen ont été prélevés sur des patients présentant des signes et symptômes d'une infection des voies respiratoires supérieures. Les échantillons ont été prélevés par du personnel qualifié conformément à la notice du dispositif de prélèvement et conservés congelés à -80 °C. Les échantillons positifs représentaient une large gamme de charge virale et comprenaient des échantillons à faible positivité. Les échantillons ont été fournis avec les résultats obtenus en utilisant un test de comparaison moléculaire à haute sensibilité.

L'acide nucléique a été purifié à partir des 68 échantillons cliniques en utilisant le kit d'isolement d'acide nucléique viral / pathogène Thermo Fisher MagMax en utilisant un volume d'échantillon de 200 µL et un volume d'éluion de 100 µL. Les échantillons ont été randomisés, mis en aveugle et évalués avec le kit de dosage de Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR de Bio-Rad en utilisant le système de PCR en temps réel Bio-Rad CFX96 Dx, qui a une LDD similaire à celle du système de PCR en temps réel AB7500 Fast Dx. Le kit d'isolement d'acide nucléique viral / pathogène MagMax a été utilisé pour l'étude d'évaluation clinique

Kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD

parce que la LoD se situait à 2x de la LoD établie avec la méthode d'extraction d'ARN viral Mini QIAamp sur les deux instruments. Les résultats obtenus à partir d'échantillons testés à l'aide du kit de dosage Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR de Bio-Rad ont été comparés aux résultats obtenus à partir d'un test de comparaison moléculaire.

Les résultats des études cliniques (Tableau 22) montrent une concordance positive (PPA) de 97,1 % avec un intervalle de confiance à 95 % de 85,1 % à 99,5 % et une concordance négative à 100 % (NPA) avec un intervalle de confiance à 95 % de 89,9 % à 100 %.

Tableau 22. PPA et NPA du kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR par rapport au comparateur

Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR	Test de comparaison positif	Test de comparaison négatif	Total	PPA [IC à 95 %]	NPA [IC à 95 %]
Test positif	33	0	34	97,1 % [85,1 % - 99,5 %]	100 % [89,9 % – 100 %]
Non concluant	1	0	0		
Test négatif	0	34	34		
Total	34	34	68		

Deux résultats discordants (échantillons 37 et 65) s'affichaient lors du test initial ; le kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR n'était pas concluant et le test du comparateur moléculaire était positif. La répétition du kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR sur l'échantillon 37 a résolu le résultat non concluant et confirmé que l'échantillon est positif. Un échantillon résiduel insuffisant a empêché le nouveau test de l'échantillon 65.

Références bibliographiques

1. Centre de contrôle et de prévention des maladies. Biosécurité dans les laboratoires microbiologiques et biomédicaux, 5e édition. Département de la Santé et des Services sociaux des États-Unis Service de santé publique, Centres pour le contrôle et la prévention des maladies, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, révisée en décembre 2009.
2. Institut des normes cliniques et de laboratoire (CLSI). Protection des travailleurs de laboratoire contre les infections d'origine professionnelle. Ligne directrice approuvée - Quatrième édition. Document CLSI M29-A4 : Wayne, PA ; CLSI, 2014.
3. Institut des normes cliniques et de laboratoire (CLSI). Collecte, transport, préparation et conservation des échantillons pour les méthodes moléculaires. Ligne directrice approuvée - Deuxième édition. Document CLSI MM13-Ed2. Wayne, PA ; CLSI, 2020.
4. Organisation mondiale de la Santé. Tests de laboratoire pour la maladie à coronavirus (COVID-19) dans les cas humains suspects : Recommandations intérimaires. 19 mars 2020, Organisation mondiale de la Santé, <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331501> (consulté le 08/05/2020)

- Centres pour le contrôle et la prévention des maladies. Services de panel de diagnostic RT-PCR en temps réel pour le Nouveau coronavirus 2019 (2019-nCoV) dans les CDC (Révision :05). Centres pour le contrôle et la prévention des maladies 2020, Atlanta, Géorgie.
<https://www.fda.gov/media/134922/> téléchargement.

Annexe A : Protocole de qualification des instruments

Usage

Cette annexe est destinée à fournir une recommandation sur la façon de préparer un panel d'échantillons factices à utiliser pour vérifier les performances du kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR par l'utilisateur final.

Matériel requis

Descriptions	relative	Compris dans le kit
Standard SARS-CoV-2 : Exact Diagnostics	1 flacon	Oui
Contrôle négatif SARS-Cov-2 : Exact Diagnostics	1 flacon	Oui
Solution saline tamponnée au phosphate (PBS, pH 7,4)	3 mL*	Non

* La quantité indiquée est destinée à la préparation d'un jeu de 9 échantillons factices

Précautions

Le contrôle positif fourni avec le kit de dosage de Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR est composé d'un transcrite d'ARN codant pour les gènes SARS-CoV-2 N1 et N2 et d'ADN génomique humain pour l'amplification du gène RP. Ce contrôle n'est pas infectieux. Les contrôles standard et négatif Exact Diagnostics SARS-CoV-2 sont à usage unique seulement ; ne pas recongeler. Le kit de dosage de Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR doit être manipulé conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.

Le matériel de contrôle et les autres composants du kit doivent être conservés à des températures appropriées, comme décrit dans le mode d'emploi (IFU), et être conservés sur de la glace une fois décongelés. Les échantillons d'ARN extraits doivent être conservés au froid pendant la préparation et l'utilisation.

Instructions pour la préparation d'échantillons factices avant l'extraction avec le mini kit QIAGEN QIAamp Viral RNA

- Préparer suffisamment de tampon AVL (avec l'ARN porteur) pour 9 échantillons, selon les instructions du fabricant.
- Étiqueter trois tubes sans RNase de 1,5 ml comme A, B et C. Étiqueter neuf tubes de 1,5 ml comme 1 à 9.
- Aliquoter 995 µL de SSTP dans le tube « A » puis ajouter 5 µL de standard SARS-CoV-2 d'Exact Diagnostics. Bien mélanger.
- Aliquoter 900 µL de SSTP dans le Tube « B » puis ajouter 100 µL de Tube « A ». Bien mélanger.

Kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD

5. Aliquoter 995 µL de SSTP dans le tube « C » puis ajouter 5 µL de contrôle négatif SARS-CoV-2 d'Exact Diagnostics. Bien mélanger.
6. Aliquoter 560 µL de tampon AVL contenant l'ARN porteur dans chacun des neuf tubes étiquetés 1-9.
7. Ajouter 140 µL du Tube A dans chacun des tubes 1-3.
8. Ajouter 140 µL du Tube B dans chacun des tubes 4-6.
9. Ajouter 140 µL du Tube C dans chacun des tubes 7-9.
10. Extraire les échantillons à l'aide du mini kit QIAamp Viral RNA selon les instructions du fabricant, en éluant les échantillons dans 60 µL d'AVE.

Instructions pour la préparation d'échantillons factices avant l'extraction avec le kit d'isolement d'acide nucléique viral / pathogène Thermo Fisher MagMAX

1. Étiqueter trois tubes sans RNase de 1,5 ml comme A, B et C.
2. Aliquoter 995 µL de SSTP dans le tube « A » puis ajouter 5 µL de standard SARS-CoV-2 d'Exact Diagnostics. Bien mélanger.
3. Aliquoter 900 µL de SSTP dans le Tube « B » puis ajouter 100 µL du Tube « A ». Bien mélanger.
4. Aliquoter 995 µL de SSTP dans le Tube « C » puis ajouter 5 µL de contrôle négatif SARS-CoV-2 d'Exact Diagnostics
5. Aliquoter 10 µL de Proteinase K provenant du kit d'isolement de l'acide nucléique viral / pathogène MagMAX dans chacun des neuf puits, désignés 1-9, d'une plaque de 96 puits profonds
6. Ajouter 200 µL du contenu du tube A dans chacun des puits désigné 1-3.
7. Ajouter 200 µL du contenu du tube B dans chacun des puits désigné 4-6.
8. Ajouter 200 µL du contenu du tube C dans chacun des puits désigné 7-9.
9. Extraire les échantillons à l'aide du kit d'isolement d'acide nucléique viral / pathogène MagMAX selon les instructions du fabricant, en éluant les échantillons dans 100 µL de solution d'éluion.

Test des échantillons extraits

Suivez la notice d'utilisation du kit Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR pour tester au moins une fois chacun des échantillons à concentration modérée, faible et négative.

Résultats attendus

Les tubes 1 à 3 et les puits 1 à 3 contiennent une concentration modérée de SARS-CoV-2 et doivent être positifs pour N1, N2 et RP.

Les tubes 4-6 et les puits 4-6 contiennent une faible concentration de SARS-CoV-2 et devraient être positifs pour N1, N2 et RP.

Les tubes 7-9 et les puits 7-9 sont des échantillons négatifs et doivent être négatifs pour N1 et N2 mais positifs pour RP.

Critères d'acceptation

Échantillons négatifs (Tubes 7-9) : 100 % (3/3) devrait être en accord avec les résultats attendus.

Échantillons modérés (Tubes 1 à 3) : 100 % (3/3) devrait être en accord avec les résultats attendus.

Échantillons à faible positivité (Tubes 4-6) : Au moins 66 % (2/3) devraient être en accord avec les résultats attendus.

Annexe B : Étude d'équivalence des types d'échantillons

Une étude d'équivalence des types d'échantillons a été réalisée afin de déterminer si la sensibilité de la détection d'un virus particulier est affectée lorsque les échantillons proviennent de matrices cliniques autres que des écouvillons nasopharyngiens. Plus précisément, la capacité du kit RT-PCR Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR (CE-DIV) à détecter le SARS-CoV-2 à la concentration de 3x la LoD précédemment établie dans les échantillons sur écouvillon nasopharyngiens (Tableau A1) a été évaluée dans des échantillons sur écouvillon de la nasale antérieure, du cornet moyen et oropharyngiens. La LoD en NP a été précédemment déterminée comme la plus petite quantité de virus détectée avec au moins 95 % des réplicats positifs ; une détection à 3x la LoD est considérée comme équivalente. Reportez-vous à la section sur la LoD pour plus d'informations.

L'étude d'équivalence des types d'échantillons a utilisé des échantillons artificiels du virus inactivé du SARS-CoV-2, introduits dans des échantillons sur écouvillon de la nasale antérieure, du cornet moyen ou oropharyngiens groupés cliniquement négatifs. Des échantillons artificiels ont été préparés en dopant chaque virus individuellement à 3x la LoD dans une matrice clinique négative pour chaque type d'échantillon. Les échantillons de contrôle positifs et négatifs ont été préparés à l'aide des contrôles standards et négatifs Exact Diagnostic SARS-CoV-2 (Bio-Rad, Cat# 16008441, 16008440) dopés dans une matrice clinique négative pour chaque type d'échantillon. Chaque échantillon a été extrait en triple exemplaire à l'aide du mini-kit QIAamp Viral RNA (140 µl d'entrée d'échantillon et 60 µl de volume d'élution). L'acide nucléique de ces extractions a été testé sur le CFX96 Touch avec le kit de dosage Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR (CE-DIV) comme indiqué dans le manuel d'utilisation.

Tableau A1. Résumé de la LoD des souches virales évaluées dans l'étude d'équivalence des types d'échantillons

Virus	Souche	3x LoD
SARS-CoV-2	2019-nCoV/USA-WA1/2020	375 cp/ml

Tous les contrôles se sont déroulés comme prévu. Pour chacune des matrices cliniques, les échantillons artificiels contenant le virus du SARS-CoV-2 se sont révélés positifs comme prévu et négatifs dans l'échantillon de contrôle sans virus (Tableau A2).

Tableau A2. Résultats de l'étude d'équivalence des types d'échantillons

Type d'échantillon	Dosage N1		Dosage N2	
	Nbr Pos	Cq moy	Nbr Pos	Cq moy
Échantillon sur écouvillon nasopharyngien	3/3	37,83	3/3	38,78
Échantillon sur écouvillon de la nasale antérieure	3/3	36,89	3/3	38,56
Échantillon sur écouvillon du cornet moyen	3/3	35,36	3/3	36,00
Échantillon sur écouvillon osopharyngien	3/3	37,41	3/3	37,21

Ces données indiquent une sensibilité équivalente du kit de dosage RT-PCR Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 (CE-DIV) pour la détection du SARS-CoV-2 dans les échantillons sur écouvillon nasopharyngiens, de la nasale antérieure, du cornet moyen et oropharyngiens.

Kit de dosage de Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD

ASSISTANCE TECHNIQUE

Contactez votre bureau régional Bio-Rad. Rendez-vous sur www.bio-rad.com pour obtenir des informations sur les contacts.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

**For further information, please contact the Bio-Rad office nearest
you or visit our website at www.bio-rad.com**

4000 Alfred Nobel Drive
Hercules, California 94547
Telephone (510) 724-7000
FAX (510) 741-6373
www.bio-rad.com

Australia, Bio-Rad Laboratories Pty. Ltd., Level 5, 446 Victoria Road, Gladesville, New South Wales 2111 • Phone +61 (2) 9914 2800 • Fax +61 (2) 9914 2888
Austria, Bio-Rad Laboratories Ges.m.b.H., Hummelgasse 88/3-6, A-1130 Vienna • Phone +43 (0) 1 877 89 01 9 • Fax +43 (0) 1 876 56 29
Belgium, Bio-Rad Laboratories N.V., Winninglaan 3, BE-9140 Temse • Phone +32 (0) 3 710 53 00 • Fax +32 (0) 3 710 53 01
Brazil, Bio-Rad Laboratórios Brasil Ltda, Avenida Doutor Churci Zaidan, 1.240 of 1902 e 1904 Morumbi Corporate Santo Amaro, São Paulo, SP CEP 04711-130 • Phone +55 11 3065 7550
Canada, Bio-Rad Laboratories Ltd., 2403 Guénette Street, Montréal, Québec H4R 2E9 • Phone +1 514 334 4372 • Fax +1 514 334 0872
China, Bio-Rad Laboratories (Shanghai) Co., Ltd. Room 601, Allian Plaza, No. 168 Jingzhou Road, Yangpu District, Shanghai 200082 • Phone +86 21 6169 8500 • Fax +86 21 6169 8599
Czech Republic, Bio-Rad spol. s r.o., Ptkrtova 1737/1a, 14000 Prague 4 • Phone +420 241 431 660
Denmark, Bio-Rad Laboratories, Symbion Science Park, Fruebjergvej 3, DK-2100 Copenhagen East • Phone +45 44 52 10 00 • Fax +45 44 52 10 01
Finland, Bio-Rad Finland Oy, Kutomotte 16 FI-00380, Helsinki • Phone +358 9 804 22 00
France, Bio-Rad, 3 boulevard Raymond Poincaré, 92430 Marnes-la-Coquette • Phone +33 (0) 1 47 95 60 00 • Fax +33 (0) 1 47 41 91 33
Germany, Bio-Rad Laboratories GmbH, Kapellenstraße 12, D-85622 Feldkirchen, Munich • Phone +49 (0) 89 31884 393 • Fax +49 (0) 89 31884 136
Greece, Bio-Rad Laboratories M.E.P.E., 2-4 Mesogion Ave. (Athens Tower) 11527 Ampelokipi, Athens • Phone +30 210 7774396 • Fax +30 210 7774376
Hong Kong, Bio-Rad Pacific Ltd., Unit 1101, 11/F DCH Commercial Centre, 25 Westlands Road, Quarry Bay • Phone +85 2 2789 3300 • Fax +85 2 2789 1257
Hungary, Bio-Rad Hungary Ltd., Futó utca 47-53, 1082, Budapest • Phone +36 1 459 6190 • Fax +36 1 459 6101
India, Bio-Rad Laboratories India Pvt. Ltd., EMAAR Digital Greens, 9th Floor, Tower A- Sector 61 Gurugram-122 102, Haryana 122 015 • Phone +91 124 4029300 • Fax +91 124 2398115
Israel, Bio-Rad Laboratories Ltd., 14 Homa Street, New Industrial Area, Rishon Le Zion 75150 • Phone +972 3 963 6025 • Fax +972 3 951 4129
Italy, Bio-Rad Laboratories S.r.l., Via Cellini 18/A, 20090 Segrate, Milan • Phone +39 02 94 86 600 • Fax +39 02 21609399
Japan, Bio-Rad Laboratories K.K., Tennoz Central Tower 20F, 2-2-24 Higashi-Shinagawa, Shinagawa-ku, Tokyo 140-0002 • Phone +81 3 6361 7070 • Fax +81 3 5463 8481
Korea, Bio-Rad Korea Ltd., 10th Floor, Hyunjuk Building, 832-41, Yeoksam-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-080 • Phone +82 080 007 7373 • Fax +82 (2) 3472 7003
Mexico, Bio-Rad, S.A., Avenida Eugenia 197, Piso 10-A, Colonia Narvarte, Delegación Benito Juárez C.P. 03020 Mexico, D.F. • Phone +52 (55) 5488 7670 • Fax +52 (55) 1107 7246
The Netherlands, Bio-Rad Laboratories B.V., Postbus 222, 3900 AE Veenendaal • Phone +31 (0) 318 540 666 • Fax +31 (0) 318 542 216
New Zealand, Bio-Rad New Zealand, 189 Bush Road Rosevale, Auckland • Phone +64 (9) 415 2280 • Fax +64 (9) 415 2284
Norway, Bio-Rad Laboratories, Nydalsveien 33, 0481 Oslo • Phone +47 23 38 41 30 • Fax +47 23 38 41 39
Poland, Bio-Rad Patska Sp. z o.o., Pzykocypowa 33, Level 4, Building A, 01-208, Warsaw • Phone +48 22 331 99 99 • Fax +48 22 331 99 88
Portugal, Bio-Rad Laboratories, Lda., Edifício Prima, Ave. Quinta Grande, 53 – Fracção 3B Alfragide 26114-521, Amadora • Phone +351 21 47 27 700 • Fax +351 21 47 27 777
Russia, Bio-Rad Laboratorij, 117105, Russian Federation, Moscow, Varshavskoe sh., 9, Bldg., 1B • Phone +7 495 721 1404 • Fax +7 495 721 1412
Singapore, Bio-Rad Laboratories (Singapore) Pte. Ltd., 3A International Business Park Road, #11-10/16, ICON @ IBP Tower B, Singapore 609935 • Phone +65 6415 3170 • Fax +65 6415 3189
South Africa, Bio-Rad Laboratories (Pty) Ltd., 34 Bolton Ave, Rosebank, Johannesburg • Phone +27 11 442 8506 • Fax +27 11 442 8525
Spain, Bio-Rad Laboratories, S.A., C/ Caléndula, 95, Edificio M. Miriparc II, El Soto de la Moraleja, 28109 Alcobendas • Phone +34 91 490 6580 • Fax +34 91 590 5211
Sweden, Bio-Rad Laboratories A.B., Solna Strandväg 3, SE-171 54 Solna, P.O. Box 1097, SE-172 22 Sundbyberg • Phone +46 844 98053 • Fax +46 8 55 51 27 80
Switzerland, Bio-Rad Laboratories AG, Pra Rond 23, CH-1785 Cressier • Phone +41 (0) 61 717 9555 • Fax +41 (0) 61 717 9550
Taiwan, Bio-Rad Laboratories Taiwan Ltd., 14th F.B, No. 126, Sec. 4, Nan-King East Road, Taipei 10546 Taiwan, R.O.C. • Phone +886 (2) 2578 7189 • Fax +886 (2) 2578 6890
Thailand, Bio-Rad Laboratories Ltd., 1st & 2nd Floor, Lumpini I Bldg., 239/2 Rajdamri Road., Lumpini, Pathumwan, Bangkok 10330 • Phone (662)651 8311 • Fax (662) 651 8312
United Kingdom, Bio-Rad Laboratories Ltd., The Junction Station Road, Watford, Hertfordshire, WD17 1ET • Phone +44 (0) 1923 471301 • Fax +44 (0) 1923 471340