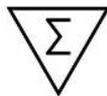


# EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

## RT-PCR EN TEMPS REEL

Pour la RT-PCR **qualitative** en temps réel

**REF** EBX-041-192



192 réactions



Version 8.00 du 21/01/2021

### Validé sur :

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) avec analyse sur CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)
- LightCycler®480 Instrument II (Roche) avec analyse sur LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) avec analyse sur 7500 Software v2
- QuantStudio 5® (Applied Biosystems) avec analyse sur QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.4.0
- Rotor-Gene Q (Qiagen) avec analyse sur Rotor-Gene Q Software 2.3.1.49
- DTprime (DNA-Technology) avec analyse sur le software RealTime\_PCR v 7.9

### Conditions de stockage:

Conserver tous les réactifs entre -15°C et -22°C jusqu'à utilisation et après première utilisation



Mode d'emploi

## SOMMAIRE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Introduction et Utilisation .....</b>                          | <b>3</b>  |
| <b>Principe de la détection .....</b>                             | <b>4</b>  |
| <b>Description et contenu du kit .....</b>                        | <b>4</b>  |
| <b>Conservation .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>Précautions et notes .....</b>                                 | <b>5</b>  |
| <b>Collecte des échantillons, transport et conservation .....</b> | <b>6</b>  |
| <b>Procédure .....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>I-Extraction d'ARN .....</b>                                   | <b>7</b>  |
| <b>II-Réalisation de la RT-PCR en temps réel .....</b>            | <b>7</b>  |
| II-1/ Schéma de la procédure .....                                | 8         |
| II-2/ Procédure détaillée .....                                   | 9         |
| <b>Validation de l'expérimentation .....</b>                      | <b>10</b> |
| <b>Analyse des données et interprétation .....</b>                | <b>11</b> |
| <b>Analyse des performances .....</b>                             | <b>13</b> |
| <b>Bibliographie.....</b>   | <b>16</b> |
| <b>Élimination des déchets .....</b>                              | <b>16</b> |
| <b>Symboles .....</b>   | <b>17</b> |

## INTRODUCTION ET UTILISATION

Le virus SARS-CoV-2 est apparu en Chine fin 2019, dans la ville de Wuhan. Il appartient à la famille des *Coronaviridae* et au sous-genre *Sarbecovirus*. Son génome est constitué de 29903 bases d'acide ribonucléique (ARN). Le SARS-CoV-2 est le septième coronavirus identifié infectant l'humain, après les coronavirus humains (HCoV) 229E, NL63, OC43, HKU1, les SRAS-CoV (coronavirus causant un syndrome respiratoire aigu sévère) et les MERS-CoV (coronavirus induisant le syndrome respiratoire du Moyen-Orient).

Dix-huit génomes ont été isolés et signalés notamment BetaCoV / Wuhan / IVDC-HB-01/2019, BetaCoV / Wuhan / IVDC-HB-04/2020, BetaCoV / Wuhan / IVDC-HB-05/2019, BetaCoV / Wuhan / WIV04 / 2019 et BetaCoV / Wuhan / IPBCAMS-WH-01/2019. Les séquences du SARS-CoV-2 présentent des similitudes avec celles des bêtacoronavirus trouvés chez les chauves-souris. Le virus SARS-CoV-2 est génétiquement distinct des autres coronavirus humains tels que ceux liés au SRAS et au MERS.

Le tableau clinique est variable, recouvrant les symptômes d'un rhume, fièvre, toux, difficultés à respirer à une pneumonie, jusqu'à un syndrome respiratoire sévère qui peut être fatal. Le taux de mortalité est imprécis au début de l'épidémie, autour des 2 % fin janvier 2020, donc moindre par rapport à celui lié au SRAS-CoV ou au MERS-CoV qui sont de 10 % et 30 % respectivement. Le SARS-CoV-2 est hautement contagieux avec plus de 90 000 cas dans le monde début Mars 2020.

L'EurobioPlex SARS-CoV-2 est un test d'amplification par reverse transcription-réaction en chaîne de la polymérase (RT-PCR) en temps réel, pour un *usage in vitro* conçu pour la détermination qualitative de la présence ou de l'absence de SARS-CoV-2 dans un extrait d'acides nucléiques ARN. Le test est indiqué pour poser un diagnostic de présomption d'infection chez l'homme, ou compléter un diagnostic avéré ou indéterminé.

L'EurobioPlex EBX-041 a été conçu pour détecter toutes les séquences de SARS-CoV-2 connues à ce jour, et par alignement *in silico* avec les séquences des autres coronavirus.

Un algorithme de décision basé sur la détection de 3 cibles (2 cibles dans le gène RdRp identiques à celles recommandées par l'Organisation Mondiale de la Santé (<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>: published under Real-time RT-PCR assays for the detection of SARS-CoV-2 Institut Pasteur, Paris (2 March 2020)) et une dans le gène N) peut être utilisé pour déterminer le statut SARS-CoV-2 (voir partie analyse des résultats et interprétation et limites). Le diagnostic doit être toujours posé par un personnel médical et dans le contexte clinique, historique et symptomatique du patient. Le kit permet de tester 94 patients (96 tests) ou 190 patients (192 tests) en plus du contrôle positif et du contrôle négatif nécessaires.

L'extrait d'ARN est le matériel de départ pour le kit EurobioPlex SARS-CoV-2. Il revient à l'utilisateur d'utiliser des méthodes d'extraction adaptées aux prélèvements testés.

Le kit a été testé sur le type de prélèvements suivants :

- Aspirations nasopharyngées
- Liquide broncho-alvéolaire
- Crachat
- Ecouvillon nasal
- Prélèvements salivaires

## PRINCIPE DE LA DETECTION

L'EurobioPlex SARS-CoV-2 est un test d'amplification de l'acide ribonucléique (ARN) de SARS-CoV-2 basé sur 1 test de RT-PCR multiplex détectant 3 cibles du virus (2 cibles dans le gène RdRp et une dans le gène N) dans un même puits. Il suffit qu'une des séquences du gène RdRp soit amplifiée pour que le diagnostic de SARS-CoV-2 puisse être directement rendu positif (voir Analyse des données et Interprétation des résultats).

Le kit contient 1 oligomix pour détecter les 3 cibles, ainsi qu'un contrôle d'extraction d'ARN et d'inhibition de RT-PCR, encapsidé. Le test est réalisé à partir de l'ARN extrait de prélèvement au moyen d'une réaction dans 1 puits/tube.

La recherche des 3 cibles permet de garantir la sensibilité, et la spécificité par rapport aux autres coronavirus connus de type HCoV, SRAS-CoV, les Bétacoronavirus principalement associés aux chiroptères (BtCoV) et les MERS-CoV. Le contrôle d'extraction d'ARN et d'inhibition de RT-PCR (CI-ARN) permet de déterminer de possibles variations pouvant se produire au cours des étapes d'extraction d'ARN d'échantillons biologiques et d'amplification par PCR en temps réel. Il permet ainsi de s'assurer qu'un résultat négatif ne peut être dû à une mauvaise extraction d'ARN et/ou à la présence d'inhibiteurs de PCR en trop grande quantité.

L'ARN du SARS-CoV-2 est détecté à l'aide de sondes spécifiques pour chaque gène respectivement marquées en FAM (cible 1/Gène RdRp), HEX (cible 2/Gène RdRp) et Texas Red (cible 3/Gène N). Le CI-ARN est détecté à l'aide d'une sonde marquée CY5. Au cours de l'élongation du produit d'amplification, les sondes émettent une fluorescence spécifique suite à leur hydrolyse. La mesure de l'intensité de fluorescence en temps réel est relative à l'accumulation des produits d'amplification.

## DESCRIPTION ET CONTENU DU KIT

Le kit de RT-PCR en temps réel EurobioPlex SARS-CoV-2 est prêt à l'emploi et contient les réactifs et les enzymes nécessaires pour la détection de ce virus (Tableau 1).

La fluorescence est émise et mesurée de façon individuelle par un système optique au cours de la PCR. La détection des fragments amplifiés est réalisée par un fluorimètre en utilisant les canaux indiqués dans le Tableau 2.

**Tableau 1 :**

| Couleur de Bouchon | Contenu du kit                               | 96 réactions | 192 réactions | Reconstitution  |
|--------------------|--|--------------|---------------|-----------------|
| <b>Rouge</b>       | Enzyme Taq polymerase                        | 1500 µl      | 2x1500 µl     | Prêt à l'emploi |
| <b>Marron</b>      | Enzyme Reverse transcriptase                 | 24 µl        | 48 µl         | Prêt à l'emploi |
| <b>Transparent</b> | Oligomix                                     | 600 µl       | 1200 µl       | Prêt à l'emploi |
| <b>Jaune</b>       | Contrôle positif CP                          | 160 µl       | 320 µl        | Prêt à l'emploi |
| <b>Bleu</b>        | Eau = contrôle négatif (CN-H <sub>2</sub> O) | 1mL          | 1mL           | Prêt à l'emploi |
| <b>Blanc</b>       | Contrôle ARN (CI-ARN)                        | 1200 µl      | 2x1200 µl     | Prêt à l'emploi |

Oligomix : contient les amorces et sondes pour les 3 cibles et pour le contrôle interne CI-ARN

**Tableau 2 :**

| Cible                 | Fluorophore | Excitation | Emission |
|-----------------------|-------------|------------|----------|
| Cible 1/ Gène RdRp    | FAM         | 495 nm     | 515 nm   |
| Cible 2/Gène RdRp     | HEX         | 535 nm     | 555 nm   |
| Cible 3/Gène N        | Texas red   | 585 nm     | 605 nm   |
| Contrôle ARN (CI-ARN) | Cy5         | 647 nm     | 667 nm   |

Canaux équivalents sur différents instruments de PCR:

- Canal **FAM** (Systèmes ABI, SmartCycler II, Systèmes Mx, Chromo4/CFX96™, T-COR 8™-IVD, DTprime), Canal 510 (LC480), Canal Green (Rotor-Gene Q).

- Canal **HEX** (Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx, T-COR 8™-IVD, DTprime), Canal VIC (Systèmes ABI), Canal Alexa532 (SmartCycler II), Canal 580 (LC 480), Canal Yellow (Rotor-Gene Q),

- Canal **Texas Red** (ABI 7500, Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx, T-COR 8™-IVD), LC Red 610 (LC480), Canal Orange (Rotor-Gene Q), Canal Rox (QuantStudio 5, DTprime)

- Canal **Cy5** (Systèmes ABI, Systèmes Mx, Chromo4/CFX96™, T-COR 8™-IVD, DTprime), Canal Alexa647 (SmartCycler II), Canal 660 (LC480), Canal Red (Rotor-Gene Q).

Note : Sur LC480 instrument II : Appliquer une compensation de couleur pour les longueurs d'ondes FAM-HEX/VIC-TexasRed-Cy5 (465-510, 533-580, 533-610, 618-660).

**Matériel nécessaire non fourni:**

- ◇ Hotte biologique
- ◇ Appareil de PCR temps réel
- ◇ Centrifugeuse pour microtubes
- ◇ Vortex
- ◇ Plaques / tubes pour réaction de PCR temps réel
- ◇ Micropipettes
- ◇ Embouts DNase-free et RNase-free à filtre pour micropipettes
- ◇ Microtubes stériles
- ◇ Gants (sans talc)

**CONSERVATION**

Tous les réactifs doivent être stockés entre -15°C et -22°C.

Tous les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du kit.

Plusieurs cycles de congélation / décongélation (>5x) doivent être évités, cela pourrait réduire la sensibilité de l'analyse.

**PRECAUTIONS ET NOTES**

**Lire attentivement ces instructions avant de débiter la procédure.**

- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée par du personnel compétent, formé aux techniques et procédures de sécurité adaptées.
- ◇ La réglementation de biosécurité locale et nationale en vigueur pour le dépistage du SARS-CoV-2 doit être suivie scrupuleusement en toute circonstance, notamment dans des laboratoires et avec les équipements de laboratoire en accord.

- ◇ S'assurer que les instruments ont été installés, calibrés et maintenus en accord avec les recommandations du fabricant.
- ◇ Il est de la responsabilité de l'utilisateur d'utiliser un autre équipement que ceux validés, et dans ce cas, les performances ne sont pas garanties.
- ◇ Les échantillons cliniques doivent être considérés comme du matériel potentiellement infectieux et doivent être préparés sous une hotte à flux laminaire.
- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée selon les bonnes pratiques de laboratoire.
- ◇ Ne pas utiliser ce kit après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- ◇ Le kit est expédié sous carboglace, et les composants du kit doivent arriver congelés. Si un ou plus des composants arrive décongelé, ou si les tubes ont été endommagés pendant le transport, contacter Eurobio Scientific.
- ◇ Une fois les réactifs décongelés, centrifuger brièvement les tubes avant leur utilisation.
- ◇ Il est recommandé de définir trois zones de travail distinctes : 1) Isolation de l'ARN, 2) Préparation du mélange réactionnel et 3) Amplification / Détection des produits amplifiés.
- ◇ Il est recommandé d'ouvrir et de manipuler les contrôles positifs à l'écart des échantillons biologiques à tester et des autres composants du kit afin d'éviter les contaminations croisées.
- ◇ Porter des blouses et des gants (sans talc) distincts dans chaque zone de travail.
- ◇ Les pipettes, les réactifs et autres matériels de travail ne doivent pas circuler entre ces zones.
- ◇ Une attention particulière doit être mise en œuvre pour conserver la pureté des réactifs et des mélanges réactionnels.
- ◇ Des méthodes appropriées de préparation/extraction d'ARN pour une production d'ARN de qualité et une application de RT-PCR en temps réel doivent être utilisées, notamment afin d'éviter tout risque de contamination avec les RNases.
- ◇ Utiliser des embouts à filtre pour micropipettes, RNase-free et DNase-free.
- ◇ Ne pas pipeter avec la bouche. Ne pas manger, ni boire ou fumer dans le laboratoire.
- ◇ Eviter les aérosols.

## **COLLECTE DES ECHANTILLONS, TRANSPORT ET CONSERVATION**

- ◇ Collecter les échantillons biologiques dans des tubes stériles.
- ◇ Il revient à l'utilisateur de maîtriser ses propres conditions de collecte, transport, conservation et extraction des échantillons biologiques pour que l'extraction d'ARN par des systèmes adaptés produise des ARN de qualité.
- ◇ Il est recommandé que les échantillons biologiques soient extraits immédiatement, ou conservés selon les recommandations de stockage des échantillons avant extraction (Tableau 3).

**Tableau 3 :**

| Recommandations de stockage maximum des échantillons avant extraction |                       |
|---|-----------------------|
| Température ambiante  | 2 h                   |
| + 4°C   | 72 h                  |
| - 20°C (de préférence - 80°C)   | Stockage à long terme |

- ◇ L'utilisateur peut se référer aux recommandations émises par l'Organisation Mondiale de la Santé ou par la Haute Autorité de Santé pour la bonne conservation des échantillons.
- ◇ Les ARNs extraits doivent être stockés à -80°C.
- ◇ Le transport des échantillons cliniques est soumis à la réglementation locale La réglementation de biosécurité locale et nationale en vigueur pour le SARS-CoV-2 doit être suivie.

## PROCEDURE

### **I- Extraction d'ARN**

Il revient aux utilisateurs de s'assurer que le système d'extraction des acides nucléiques utilisé est compatible avec la technologie de RT-PCR en temps réel. Pour le présent coffret, nous recommandons d'utiliser des méthodes d'extraction d'ARN de virus adaptés aux prélèvements respiratoires.

Pour les prélèvements salivaires, nous recommandons l'utilisation d'un fluidifiant à base de Dithiothreitol (DTT) tel que le produit commercialisé par Eurobio (Digest-EUR-ref : DD0DIG00-AI). Dans le cas de l'utilisation de ce dernier, nous recommandons d'utiliser 10 µl de la référence DD0DIG00-AI pour 200 µl de salive. Sans fluidifiant, les performances ne sont pas garanties.

Dans le kit EBX-041, le CI-ARN sur le canal CY5 peut être ajouté avant l'extraction ou dans la réaction de PCR. Il permet de s'assurer qu'un résultat négatif ne peut être dû à un problème d'extraction ou la présence d'inhibiteurs de RT-PCR en trop grande quantité pour valider le test.

Nous recommandons l'ajout de 10 µl de CI-ARN par extraction pour un volume d'élution de 50 µl à la fin de l'extraction. Si le CI-ARN n'est rajouté que pour contrôler la RT-PCR, il est ajouté au mélange réactionnel (1 µl par réaction de PCR). Voir Protocole de RT-PCR en temps réel pour plus de détails.

Le CI-ARN est également disponible chez Eurobio Scientific (Ref EurobioPlex EBX-003).

### **II- Réalisation de la RT-PCR en temps réel**

#### Remarques générales:

- Le contrôle positif et le contrôle d'extraction et d'inhibition de RT-PCR (CI-ARN), contiennent des concentrations élevées de matrice. Les manipulations doivent être réalisées précautionneusement pour éviter toute contamination.
- Pour contrôler le bon fonctionnement de la RT-PCR, il est nécessaire de tester le contrôle positif, ainsi que le contrôle négatif (eau fournie = CN-H<sub>2</sub>O+ CI-ARN) (voir II-2/6 du protocole de RT-PCR en temps réel).

## II-1/ Schéma de la procédure

### 1 - PREPARATION DU MELANGE REACTIONNEL / MASTERMIX

(a) Pour un échantillon ARN extrait sans CI-ARN

(b) Pour un échantillon ARN extrait avec CI-ARN

| Nombre de réactions          | N+3             |
|------------------------------|-----------------|
| Enzyme Taq polymerase        | (N+3) x 12,5 µl |
| Enzyme Reverse transcriptase | (N+3) x 0,2 µl  |
| Eau                          | (N+3) x 2,3 µl  |
| Oligomix                     | (N+3) x 5 µl    |
| CI-ARN                       | (N+3) x 1 µl    |
| Volume total Mastermix       | (N+3) x 21 µl   |

| Nombre de réactions          | N+3             |
|------------------------------|-----------------|
| Enzyme Taq polymerase        | (N+3) x 12,5 µl |
| Enzyme Reverse transcriptase | (N+3) x 0,2 µl  |
| Eau                          | (N+3) x 2,3 µl  |
| Oligomix                     | (N+3) x 5 µl    |
| Volume total Mastermix       | (N+3) x 20 µl   |

### 2 - PREPARATION DES REACTIONS

#### Echantillon

20 µl de Mastermix  
+  
5µl échantillon ARN

#### Contrôle positif

20 µl de Mastermix  
+  
5µl CP

#### Contrôle Négatif

20 µl de Mastermix  
+  
5µl Eau biologie moléculaire (CN-H<sub>2</sub>O)

#### Echantillon

20 µl de Mastermix  
+  
5µl échantillon ARN

#### Contrôle positif

20 µl de Mastermix  
+  
5µl CP

#### Contrôle Négatif

20 µl de Mastermix  
+  
4µl Eau biologie moléculaire (CN-H<sub>2</sub>O)  
+  
1 µl CI-ARN

### 3 – INSTRUMENT PCR EN TEMPS REEL

| Programme             | Température | Durée  | Cycle(s) |                             |
|-----------------------|-------------|--------|----------|-----------------------------|
| Reverse Transcription | 45°C        | 10 min | 1        | -                           |
| Dénaturation          | 95°C        | 3 min  | 1        | -                           |
| Amplification         | 95°C        | 15 sec | 40       | -                           |
|                       | 58°C        | 30 sec |          | Acquisition de fluorescence |

## II-2/ Procédure détaillée

- 1) Homogénéiser les tubes d'Enzymes, et vortexer l' Oligomix, le CP, et le CI-ARN, puis centrifuger brièvement.
- 2) Préparer le Mastermix comme ci-dessous, N étant le nombre de réactions (incluant les contrôles positif et négatif ; prévoir la quantité de Mastermix pour N+3 réactions minimum (se référer à la partie 1-(a) ou 1-(b) du schéma précédent selon le cas).

### Cas (a) : Pour un échantillon ARN extrait SANS CI-ARN

| Nombre de réactions          | N+3             |
|------------------------------|-----------------|
| Enzyme Taq polymerase        | (N+3) x 12,5 µl |
| Enzyme Reverse transcriptase | (N+3) x 0,2 µl  |
| Eau                          | (N+3) x 2,3 µl  |
| Oligomix                     | (N+3) x 5 µl    |
| CI-ARN                       | (N+3) x 1 µl    |
| Volume total Mastermix       | (N+3) x 21 µl** |

### Cas (b) : Pour un échantillon ARN extrait AVEC CI-ARN

| Nombre de réactions          | N+3             |
|------------------------------|-----------------|
| Enzyme Taq polymerase        | (N+3) x 12,5 µl |
| Enzyme Reverse transcriptase | (N+3) x 0,2 µl  |
| Eau                          | (N+3) x 2,3 µl  |
| Oligomix                     | (N+3) x 5 µl    |
| Volume total Mastermix       | (N+3) x 20 µl** |

\*\* : La différence de volume réactionnel entre le cas (a) et le cas (b) est négligeable et n'a pas d'effet sur les performances.

- 3) Homogénéiser le Mastermix préparé en 2) et centrifuger brièvement.
- 4) Distribuer 20 µL de Mastermix à l'aide d'une micropipette et d'embouts à filtre dans des tubes/puits de microplaques indépendants.
- 5) Ajouter 5 µL d'échantillon d'ARN extrait.
- 6) En parallèle réaliser les contrôles suivants :
  - Contrôle positif :
    - 20 µl Mastermix + 5 µl de CP.
  - Contrôle négatif :
    - Cas (a) Pour un échantillon ARN extrait SANS CI-ARN :
      - 20 µl de Mastermix + 5 µl d'eau fournie (CN-H<sub>2</sub>O)
    - Cas (b) Pour un échantillon ARN extrait AVEC CI-ARN
      - 20 µl de Mastermix + 4 µl d'eau fournie (CN-H<sub>2</sub>O) + 1 µl de CI-ARN
- 7) Fermer immédiatement les tubes, ou plaque avec un film adhésif pour éviter toute contamination.
- 8) Centrifuger brièvement pour collecter le mélange réactionnel au fond des tubes ou des puits de microplaque.
- 9) Réaliser le programme suivant sur l'instrument de PCR temps réel.

| Programme                    | Température | Durée  | Cycle(s) |                             |
|------------------------------|-------------|--------|----------|-----------------------------|
| <b>Reverse Transcription</b> | 45°C        | 10 min | 1        | -                           |
| <b>Dénaturation</b>          | 95°C        | 3 min  | 1        | -                           |
| <b>Amplification</b>         | 95°C        | 15 sec | 40       | -                           |
|                              | 58°C        | 30 sec |          | Acquisition de fluorescence |

**Note 1 :** Pour les appareils de la gamme Applied Biosystems, sélectionner « NONE » dans « PASSIVE REFERENCE ».

**Note 2 :** Sur Rotor-Gene Q, utiliser les settings suivants :

| Paramètre / Channel                               | GREEN | YELLOW | ORANGE | RED  |
|---|-------|--------|--------|------|
| Gain  | 8     | 6.67   | 6.67   | 10   |
| Dynamic tube                                      | Yes   | Yes    | Yes    | Yes  |
| Take off adjustment/<br>Dynamic tube optimization | 15 20 | 15 20  | No     | No   |
| Threshold   | 0,015 | 0,03   | 0,03   | 0,03 |
| Eliminate before cycle/Left threshold             | 10    | 10     | 15     | NA   |
| Slope correct                                     | No    | No     | Yes    | Yes  |

**Note 3 :** Sur CFX96™ (Bio-Rad), lancer le run à partir de la version 1.6 ou postérieure, puis analyser avec la version 3.1 (voir § Validation de l'expérience).

**Note 4 :** Sur LightCycler® 480 (Roche), deux systèmes optiques existent : seul le « System II » est compatible avec l'utilisation du kit.

**Note 5 :** Sur LC480 instrument II : Appliquer une compensation de couleur pour les longueurs d'ondes FAM-HEX/VIC-TexasRed-Cy5 (465-510, 533-580, 533-610, 618-660).

**Note 6 :** Sur DTprime (DNA-Technology), utiliser la méthode d'analyse « Treshold (Ct) »

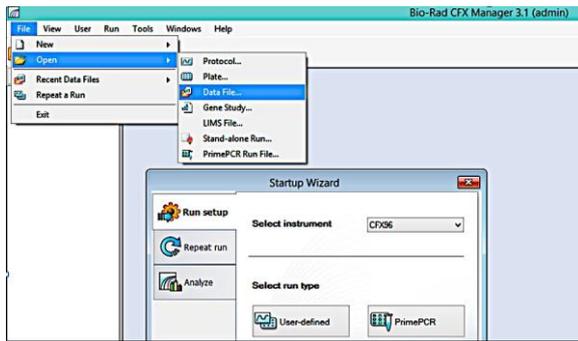
## VALIDATION DE L'EXPERIMENTATION

L'analyse des data post-acquisition sur un appareil de PCR CFX96™ (Bio-Rad) doit être réalisée à l'aide de la version 3.1 du logiciel CFX Manager (Bio-Rad). Afin de passer sur cette version à partir d'un run lancé sur une version antérieure, veuillez suivre la procédure suivante: à la fin du run, le fichier de données avec le suffixe .pcrd doit être ouvert et traité avec la version 3.1 du CFX Manager (Bio-Rad).

Si le run a été lancé avec le logiciel CFX Manager v1.6 par exemple, pour ouvrir un fichier de data avec le logiciel CFX Manager v3.1, cliquer sur l'icône CFX Manager v3.1. L'écran d'accueil apparaîtra.

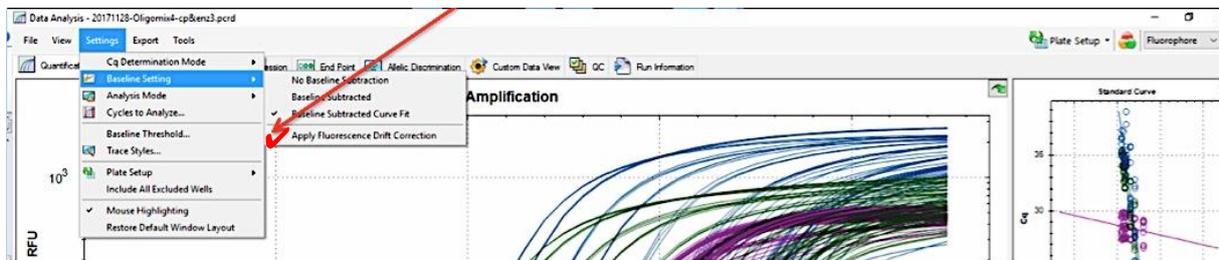


- Cliquer sur « File » et sélectionner « Open » puis « Data File ».



- Sélectionner le fichier que vous souhaitez analyser et cliquer sur « Ouvrir ».

L'option « drift correction » doit être appliquée dans l'onglet « Settings » comme sur l'image ci-dessous : cliquer sur l'onglet « Settings », puis sur « Baseline Setting » et sur « Apply Fluorescence Drift Correction ».



Une fois ces étapes réalisées, l'analyse peut débuter.

Les résultats pour les contrôles doivent remplir les conditions du Tableau 4.

**Tableau 4: Validation du run**

| Contrôle positif |                  |
|------------------|------------------|
| FAM              | Ct ≤ 32          |
| HEX              | Ct ≤ 32          |
| Texas Red        | Ct ≤ 30          |
| Contrôle Négatif |                  |
| FAM              | Ct non déterminé |
| HEX              | Ct non déterminé |
| Texas Red        | Ct non déterminé |
| Cy5              | Ct ≤ 40          |

## ANALYSE DES DONNEES ET INTERPRETATION

### Contrôle d'extraction d'ARN et d'inhibition de RT-PCR dans les échantillons :

Le bon fonctionnement de la réaction de RT-PCR peut être évalué sur le canal Cy5 mesurant le contrôle d'extraction et d'inhibition de RT-PCR (CI-ARN).

Dans certains cas, il est recommandé de répéter l'extraction ou de diluer l'échantillon 5 fois, car le résultat est non interprétable (NI) (Voir colonne « validité du test » du Tableau 5 d'interprétation). Tous les cas de figures sont rassemblés dans le Tableau 5.

Pour des charges élevées détectées dans le canal FAM, la valeur de Ct du CI-ARN peut être augmentée par rapport à celle obtenue dans le contrôle négatif. Cela n'invalide pas la positivité.

**Pour les échantillons cliniques, et la détermination de la présence ou absence du SARS-CoV-2 :**



**Cut-off de valeurs de CT pour la positivité :**  
**Cibles 1 et 2 gènes RdRp cible 3 gène N: Ct < 40**

Les résultats suivants sont possibles :

**Tableau 5:**

| Cible 1<br>RdRp | Cible 2<br>RdRp | Cible 3<br>N | CI-ARN | Validité<br>du test | Présence de SARS-CoV-2 ou<br>interprétation impossible (NI) |
|-----------------|-----------------|--------------|--------|---------------------|---|
| FAM             | HEX             | Texas Red    | CY5    |                     |   |
| +               | +/-             | +/-          | + / -  | Oui                 | <b>OUI</b>  |
| +/-             | +               | +/-          | + / -  | Oui                 | <b>OUI</b>  |
| -               | -               | -            | +      | Oui                 | NON   |
| -               | -               | +            | +      | Oui                 | Indéterminé   |
| -               | -               | +/-          | -      | Partielle           | NI  |

*NI : non interprétable car inhibition de RT-PCR ou problème d'extraction : aucune conclusion ne peut être donnée. Il est alors recommandé de réaliser un nouveau prélèvement et/ou répéter l'extraction et/ou de diluer l'échantillon 5 fois.*

**Limites d'utilisation et d'interprétation :**

- ❖ Tous les échantillons doivent être traités comme potentiellement infectés par le SARS-CoV-2, et la réglementation locale de biosécurité doit être scrupuleusement suivie.
- ❖ L'interprétation des résultats doit prendre en compte la possibilité de faux négatifs et de faux positifs.

Les faux négatifs peuvent être dus à :

- une collecte inadaptée des échantillons, ou un mauvais stockage,
- des échantillons hors de la phase de virémie
- des conditions d'extraction inadaptées ou l'utilisation d'instruments de PCR non validés
- une expérimentation non respectueuse de tous les éléments de ce mode d'emploi

Les faux positifs peuvent être dus à :

- une contamination liée à une mauvaise manipulation d'échantillons fortement positifs, du contrôle positif, ou des produits issus de l'amplification de PCR.
- un non-respect de la procédure décrite dans ce mode d'emploi, notamment pour éviter toute source de contamination.
- ❖ Tout résultat doit être interprété par du personnel médical dans le contexte clinique du patient, son historique et ses symptômes.
- ❖ Ce test n'exclut pas la présence d'autres pathogènes que le SARS-CoV-2
- ❖ Un résultat négatif de ce test n'exclut pas de façon absolue une possible infection au SARS-CoV-2.

## ANALYSE DES PERFORMANCES

### ➤ Limite de détection/sensibilité analytique :

- **Contrôle positif du kit** : 30 copies/μl CP
- **Un ARN synthétique incluant les gènes RdRp et N** de concentration connue (10<sup>e4</sup> copies/μl) additionné à un échantillon négatif à une dilution de 1/10 (10 μl spiking, extraction sur QIAamp viral RNA mini kit et élution dans 60 microlitres) a été détecté.  
Sur cet ARN, la sensibilité est < 16,6 copies ARN/μl.
- **Un ARN synthétique SARS-CoV-2** (Twist Bioscience, USA) est détecté avec une sensibilité de 12,7 copies ARN/μl
- **NATtrol™ SARS-Related Coronavirus 2** (Zeptomatrix, USA), formulé avec des particules virales purifiées intactes, additonnées à 800 copies/ml de prélèvement est détecté dans 100 % de 20 prélèvements nasopharyngés uniques, testés par RT-PCR avec EBX-041, après extraction sur EZ1 Advanced XL card 2.0 (volume d'échantillon 200 μl, volume d'élution : 60 μl).

### ➤ Reproductibilité

La variabilité inter-lots sur le Ct de 3 lots indépendants d'EBX-041 est la suivante :

| Coefficient de variation % | Gène RdRp cible 1 | Gène RdRp cible 2 | Gène N cible 3 |
|----------------------------|-------------------|-------------------|----------------|
| CFX96                      | 0,77              | 1,04              | 1,59           |
| ABI7500                    | 1,16              | 1,63              | 3,31           |
| Quant Studio 5             | 3,69              | 1,86              | 0,94           |
| LC480                      | 2,24              | 2,54              | 2,38           |
| Rotor-Gene Q               | 2,27              | 1,83              | 1,61           |
| DTprime                    | 3,06              | 4,12              | 2,91           |

### ➤ Spécificité diagnostique : (voir limites d'utilisation et d'interprétation)

Cette validation a porté sur :

- 190 échantillons SARS-CoV-2 négatifs pré-testés et caractérisés négatifs par des tests marqués CE.

- 56 échantillons négatifs pour tous les coronavirus connus, dont des échantillons de panels respiratoires caractérisés pour d'autres virus afin de tester les réactions croisées.
- 13 échantillons positifs pour le CoV NL63 (n=7) ou CoV OC43 (n=6) et 2 contrôle NATtrol™ RP Multimarker Respiratory Controls (Zeptomatrix) ci-dessous.

| RP Multimarker 1 Targets          | RP Multimarker 2 Targets             |
|-----------------------------------|--------------------------------------|
| Influenza A H3N2 (Brisbane/10/07) | Influenza A H1 (New Caledonia/20/99) |
| Influenza A H1N1 (NY/02/2009)     | Influenza B (Florida/02/06)          |
| Rhinovirus (Type 1A)              | RSV (Type A)                         |
| Adenovirus (Type 3)               | Parainfluenza (Type 2)               |
| Parainfluenza (Type 1)            | Parainfluenza (Type 3)               |
| Parainfluenza (Type 4)            | Coronavirus (HKU-1 recombinant)      |
| Metapneumovirus (Peru 6-2003)**   | Coronavirus (OC43)                   |
| C. pneumoniae (CWL-029)           | Coronavirus (NL63)                   |
| M. pneumoniae (M129)              | Coronavirus (229E)                   |
| Coxsackievirus (Type A1)          | Bordetella pertussis (A639)          |

Les extractions d'ARN ont été réalisées sur les systèmes suivants :  
 QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen)  
 Magna Pure Compact (Roche Life Science)  
 EZ1 Advanced XL virus card 2.0 (Qiagen)

| Nombre de cas | Méthode d'extraction         | Echantillon Positif pour | Coronavirus | Statut SARS-CoV-2 EBX-041 |
|---------------|------------------------------|--------------------------|-------------|---------------------------|
| /             | EZ1                          | RP1 NATtrol              | Négatif     | Négatif                   |
| /             | EZ1                          | RP2 NATtrol              | Positif     | Négatif                   |
| 2             | Magna Pure compact           | Adenovirus               | Négatif     | Négatif                   |
| 2             | Magna Pure compact           | RSV A ou B               | Négatif     | Négatif                   |
| 4             | EZ1 ou QIAamp                | Influenzae A             | Négatif     | Négatif                   |
| 3             | QIAamp                       | Influenzae B             | Négatif     | Négatif                   |
| 16            | QIAamp                       | Parainfluenzae           | Négatif     | Négatif                   |
| 2             | Magna Pure compact           | Rhinovirus               | Négatif     | Négatif                   |
| 3             | Magna Pure ou QIAamp         | Metapneumovirus          | Négatif     | Négatif                   |
| 1             | Magna Pure compact           | Bocavirus                | Négatif     | Négatif                   |
| 2             | Magna Pure compact           | Legionella pneumophila   | Négatif     | Négatif                   |
| 4             | Magna Pure compact ou QIAamp | Mycoplasma pneumoniae    | Négatif     | Négatif                   |
| 4             | QIAamp                       | Bordetella pertussis     | Négatif     | Négatif                   |
| 2             | QIAamp                       | Bordetella parapertussis | Négatif     | Négatif                   |
| 1             | QIAamp                       | Bordetella holmesii      | Négatif     | Négatif                   |
| 1             | QIAamp                       | Parechovirus Type 1      | Négatif     | Négatif                   |
| 1             | QIAamp                       | Parechovirus Type 2      | Négatif     | Négatif                   |
| 1             | QIAamp                       | Parechovirus Type 3      | Négatif     | Négatif                   |
| 1             | QIAamp                       | Parechovirus Type 4      | Négatif     | Négatif                   |
| 1             | QIAamp                       | Parechovirus Type 5      | Négatif     | Négatif                   |
| 1             | QIAamp                       | Parechovirus Type 6      | Négatif     | Négatif                   |
| 4             | QIAamp                       | Enterovirus              | Négatif     | Négatif                   |

|   |        |          |         |         |
|---|--------|----------|---------|---------|
| 7 | QIAamp | CoV NL63 | Positif | Négatif |
| 6 | QIAamp | CoV OC43 | Positif | Négatif |

Une analyse *in silico* a été employée et démontre la spécificité des amorces et sondes pour le SARS-CoV-2. Par exemple, sur les séquences de virus de MERS et de SRAS, aucune homologie significative des amorces et des sondes SARS-CoV-2 susceptible d'amplifier ces virus n'a été trouvée.

➤ **Sensibilité diagnostique : (voir limites d'utilisation et d'interprétation)**

Cette validation a porté sur :

- 154 échantillons issus de prélèvements d'écouvillon nasopharyngés de patients confirmés positifs:
  - 19 avec une méthode « maison » basée sur l'amplification des 2 séquences du gène RdRp, recommandé par l'OMS (<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance: published under Real-time RT-PCR assays for the detection of SARS-CoV-2> Institut Pasteur, Paris (2 March 2020),
  - 137 pre-testés et caractérisés positifs par des tests marqués CE dont 76 avec le kit Allplex 2019 n-CoV (Seegene).

2 échantillons ont été évalués avec 2 méthodes de pré-test.

L'extraction a été réalisée sur EasyMag (Biomérieux) ou TANbead (Taiwan Advanced Nanotech).

- 34 prélèvements négatifs de type aspiration nasopharyngée, crachat, écouvillon nasal, liquide broncho-alvéolaire ont été additionnés d'un ARN positif de patient dilué 20 fois, puis à raison de 10 µl par 140 µl de prélèvement, puis extraits sur QIAamp viral RNA mini kit et élué dans 60 µl, dont 5 µl testés avec l'EBX-041.

Les 34 échantillons additionnés ont tous été détectés positifs pour le SARS-CoV-2 avec des Ct sur CFX96 tels que ci-dessous :

|                                   | Gène RdRp cible 1 | Gène RdRp cible 2 | Gène N cible 3 |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|----------------|
| Ct +/- Standard Déviation         | 27,37+/-1,06      | 26,11+/-1,06      | 33,15+/-1,11   |
| Coefficient de variation (n=34) % | 3,9               | 4,0               | 3,4            |

Les performances globales sont donc les suivantes :

|            |                | EBX-041        |                |
|------------|----------------|----------------|----------------|
|            |                | POS SARS-CoV-2 | NEG SARS-CoV-2 |
| Pre-testés | POS SARS-CoV-2 | <b>186</b>     | <b>2</b>       |
|            | NEG SARS-CoV-2 | <b>0</b>       | <b>259</b>     |

**Sensibilité: 99 % (186/188)**

**Valeur prédictive positive (VPP) > 99% (186/186)**

**Spécificité: > 99% (259/259)**

**Valeur prédictive négative (VPN): 99 % (257/259)**

**Concordance: 99 % (445/447)**

Les tests ont été réalisés sur CFX96™ (Bio-Rad).

## **BIBLIOGRAPHIE**

Chan JF, Kok KH, Zhu Z, Chu H *et al.* Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg microbes infect.* 2020 Dec; 9(1):221-236.

Cohen J, Normile D. New SRAS-like virus in China triggers alarm, *Science.* 2020 Jan 17;367(6475):234-235.

Drosten C, Muth D, Corman VM, Hussain R *et al.* An observational, laboratory-based study of outbreaks of middle east respiratory syndrome coronavirus in Jeddah and Riyadh, kingdom of Saudi Arabia, 2014. *Clin infect dis.* 2015 Feb 1; 60(3):369-77.

Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, Recommandations de bonnes pratiques, [www.has-santé.fr](http://www.has-santé.fr).

## **ELIMINATION DES DECHETS**

Éliminer tous les déchets conformément à la législation sur les DASRI.

## SYMBOLES

|   |   |
|---|---|
|    | Référence                                 |
|    | Numéro de lot                             |
|    | Limites de température de conservation    |
|    | Date d'expiration                         |
|    | Contenu suffisant pour « N » réactions    |
|    | Conserver à l'abri de la lumière          |
|   | Fabricant                                 |
|  | Produit marqué CE                         |
|  | Dispositif Médical de Diagnostic in vitro |
|  | Mode d'emploi                             |



**eurobio**  
**SCIENTIFIC**

7, avenue de Scandinavie  
ZA Courtaboeuf  
91940 Les Ulis  
FRANCE