



BioGX
Molecular Made Easy

SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 & RNase P Multiplex

REF 400-058-E-HMP

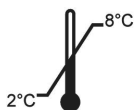


24/48 réactions

Mode d'emploi

Pour le diagnostic *in vitro*

À utiliser avec les réactifs en système ouvert BD MAX™ sur le système BD MAX™, les plateformes Bio-Rad CFX96 Touch™ et Applied Biosystems QuantStudio™ 5



BioGX BV
Science Park 408, 1098 XH Amsterdam, Pays-Bas
Téléphone : +31.20.893.4261
Télécopie : +31.20.240.9149



Straker Translations
Level 2, 49 Parkway drive, Rosedale
Auckland, 0632
Nouvelle-Zélande
Téléphone: +64 9 801 0648

NOM COMMERCIAL

BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 & RNase P Multiplex

UTILISATION PRÉVUE

BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 & RNase P Multiplex est un test en temps réel de transcriptase inverse et d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) à utiliser sur les plateformes BD MAXTM, Bio-Rad CFX96 TouchTM et Applied Biosystems QuantStudioTM 5 pour la détection qualitative de la présence d'ARN du gène de la phosphoprotéine de la nucléocapside (gène N) du coronavirus SARS-CoV-2 et du gène de la RNase P humaine. Les ensembles d'amorces et de sondes sont basés sur le test des Centers for Disease Control and Prevention (CDC) des États-Unis pour la détection spécifique du SRAS-CoV-2 par amplification de deux régions uniques du gène N (c'est-à-dire N1 et N2)^{1, 2, 3}. La détection du gène de la RNase P humaine sert de témoin endogène du traitement des échantillons (SPC). Les types d'échantillons suivants ont été validés :

- Prélèvement d'écouvillons nasopharyngés
 - Solution saline (0,85 % de NaCl), Copan Universal Transport Media (UTM[®]) et BD Universal Viral Transport (UVT)
- Prélèvement d'écouvillons oropharyngés
 - Solution saline (0,85 % de NaCl), Copan Universal Transport Media (UTM[®]) et BD Universal Viral Transport (UVT)

Le test ne peut être réalisé que sur l'instrument automatisé d'extraction d'acide nucléique et de PCR en temps réel BD MAXTM en utilisant la bandelette d'extraction BD MAXTM ExKTM TNA-2 et le fichier BioGX UDP qui l'accompagne. Le test PCR en temps réel peut également être réalisé sur les plateformes Bio-Rad CFX96 TouchTM et Applied Biosystems QuantStudioTM 5 en utilisant de l'ARN viral purifié et extrait à l'aide d'une méthode validée d'extraction des acides nucléiques par billes magnétiques ou colonne de silice.

Le réactif BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 & RNase P Multiplex cible spécifiquement le gène humain de la RNase P pour servir d'ARN endogène de contrôle du traitement des échantillons (SPC). Ce SPC fait office de témoin pour l'extraction des acides nucléiques de l'échantillon et de témoin d'amplification interne. L'ajout externe de SPC par l'utilisateur n'est pas nécessaire.

Le test PCR multiplex est fourni au format lyophilisé BioGX Sample-Ready™ dans un tube de 2 ml à bouchon à vis. Chaque tube contient tous les composants PCR tels que les amorces, les sondes, les enzymes, les dNTP, le MgCl₂ et les tampons nécessaires à l'analyse par PCR en temps réel de 24 échantillons BD MAX™ ou de 48 échantillons analysés sur les plateformes Bio-Rad CFX96 Touch™ ou Applied Biosystems QuantStudio™ 5.

La marque BD MAX appartient à Becton Dickinson & Company

La marque Bio-Rad CFX96 Touch™ appartient à Bio-Rad Laboratories

La marque Applied Biosystems QuantStudio 5 appartient à ThermoFisher Scientific

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Le syndrome respiratoire aigu sévère 2 (SRAS-CoV-2) est le nouveau bêtacoronavirus qui cause la maladie respiratoire COVID-19. La maladie respiratoire COVID-19 se transmet entre humains infectés au sein des populations par les gouttelettes respiratoires émises par la parole, la toux et les éternuements^{4, 5}. Les symptômes de la COVID-19 vont d'une maladie bénigne (toux sèche, fatigue, fièvre et essoufflement) à une maladie grave, voire au décès⁴.

La maladie COVID-19 a été identifiée pour la première fois le 31 décembre 2019 parmi des patients souffrant de pneumonie à Wuhan, en Chine^{4, 5}. Le SRAS-CoV-2 est le septième coronavirus identifié comme un agent pathogène pour l'homme qui a probablement évolué au sein d'un hôte animal ou chez l'homme à la suite d'un transfert zoonotique⁶.

Le 11 avril 2020, l'OMS a confirmé 1 610 909 infections par le SRAS-CoV-2 et 99 960 décès dus au SRAS-CoV-2 dans le monde⁵. Il a été constaté que les personnes âgées, les personnes immunodéprimées et celles souffrant de maladies cardiovasculaires, de diabète et de maladies respiratoires chroniques présentaient un risque plus élevé de développer une forme grave de la maladie^{4,5}. En amont des efforts de vaccination mondiaux, les tests de dépistage sur les patients et les mesures de distanciation sociale imposées par les gouvernements du monde entier se sont avérés être le seul moyen d'endiguer les taux de transmission.

PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

Le BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 & RNase P Multiplex doit être utilisé avec l'une des plateformes suivantes :

1. Système ouvert BD MAX™ pour le traitement automatisé des échantillons de patients et l'analyse moléculaire. Le système BD MAX™ utilise une combinaison de réactifs de lyse et d'extraction pour réaliser la lyse des cellules et l'extraction des acides nucléiques. Après une lyse enzymatique des cellules à température élevée, les acides nucléiques libérés sont capturés par des billes d'affinité magnétique. Pour contrôler l'efficacité de l'extraction, les réactifs BioGX amplifient et détectent le gène humain de la RNase P dans chaque échantillon de patient correctement collecté. Les billes contenant les acides nucléiques liés sont lavées et les acides nucléiques sont élués par la chaleur dans un tampon d'élution. L'acide nucléique élué est ensuite mélangé avec le Master Mix réhydraté. Le réactif Master Mix et l'acide nucléique sont ensuite distribués automatiquement dans la cartouche PCR BD MAX™. Les micro-vannes de la cartouche PCR BD MAX™ sont scellées par le système avant le lancement de PCR pour éviter l'évaporation et la contamination de l'amplicon.
2. Le Bio-Rad CFX96 Touch™ prend en charge l'analyse moléculaire de l'acide nucléique extrait à partir d'une méthode validée d'extraction de l'acide nucléique par billes magnétiques ou colonne de silice.
3. La plateforme Applied Biosystems QuantStudio™ 5 prend en charge l'analyse moléculaire de l'acide nucléique extrait à partir d'une méthode validée d'extraction de l'acide nucléique par billes magnétiques ou colonne de silice.

L'ARN extrait est soumis à une transcription inverse en ADNc et les séquences cibles sont amplifiées par PCR. Là où les cibles amplifiées sont détectées pendant l'amplification à l'aide de sondes d'hydrolyse marquées à une extrémité par un colorant rapporteur fluorescent (fluorophore) et à l'autre extrémité par un fragment désactivateur. Des sondes marquées avec différents fluorophores sont utilisées pour détecter des amplicons spécifiques provenant du gène de la phosphoprotéine de la nucléocapside du SRAS-CoV-2 (N1), du gène de la phosphoprotéine de la nucléocapside du SRAS-CoV-2 (N2) et du gène de la RNase P humaine (témoin endogène de traitement de l'échantillon) dans les trois différents canaux optiques suivants :

- Détection du gène de la phosphoprotéine de la nucléocapside (N2) :
 - Canal équivalent FAM (495 nm / 520 nm)
- Détection du gène de la phosphoprotéine de la nucléocapside (N1) :
 - Canal équivalent Texas Red (590 nm / 610 nm)
- Détection de la RNase P endogène (SPC) :
 - Canal équivalent Cy 5.5 (690 nm / 705 nm)

Lorsque les sondes sont dans leur état natif, la fluorescence du fluorophore est éteinte en raison de sa proximité avec le désactivateur. Cependant, en présence de leur ADNc cible spécifique, les sondes s'hybrident à leurs séquences complémentaires et sont hydrolysées par l'activité exonucléase 5'-3' de l'ADN polymérase lorsqu'elle synthétise le brin naissant le long de la matrice d'ADNc. En conséquence, les fluorophores sont séparés de leurs molécules extinctrices et une fluorescence est émise. La quantité de fluorescence détectée dans les trois canaux optiques utilisés pour le BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 and RNase P Multiplex est directement proportionnelle à la quantité de la sonde correspondante qui est hydrolysée, et donc généralement proportionnelle à la quantité de cible synthétisée. Le système BD MAX™, les plateformes Bio-Rad CFX96 Touch™ et Applied Biosystems QuantStudio™ 5 mesurent ces signaux à la fin de chaque cycle d'amplification en temps réel et interprètent les données pour fournir un résultat qualitatif pour chacune des cibles ci-dessus. Un résultat positif pour la détection de l'ARN cible est indiqué par la présence d'une courbe de croissance de la PCR en temps réel et d'une valeur Ct (seuil de cycle) associée.

RÉACTIFS

Qté	RÉF	Contenu	Tests
1	400-058-HMP	BioGX SARS-CoV-2 HMP N1, N2 & RNase P Multiplex Sample-Ready™ lyophilized PCR Master Mix contenant une polymérase, une transcriptase inverse, des nucléotides, des amorces et des sondes moléculaires spécifiques et des tampons PCR.	24/48 tests par sachet
1	800-031-E	BioGX Rehydration Buffer E* Tube de réactif contenant le tampon de réhydratation BioGX Rehydration Buffer à utiliser pour la réhydratation du mélange maître PCR Master Mix lyophilisé.	24/48 tests par sachet

*BioGX Rehydration Buffer E est uniquement destiné à être utilisé avec la plateforme BD MAX. Pour Bio-Rad CFX96 Touch™ et Applied Biosystems QuantStudio™ 5, les réactifs lyophilisés sont réhydratés avec de l'eau de qualité moléculaire.

REMARQUE : Les fiches de données de sécurité (FDS) sont disponibles sur www.biogx.com ou sur demande.

ÉQUIPEMENT ET MATÉRIEL NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

- Instrument automatisé d'extraction d'acides nucléiques et de PCR en temps réel BD MAXTM, instrument de PCR en temps réel Applied Biosystems QuantstudioTM 5 ou Bio-Rad CFX96 TouchTM
- BD MAXTM ExKTM TNA-3 (n° de catalogue BD 442828).
Les kits d'extraction comprennent des tubes de tampon d'échantillon (SBT), des bouchons de septum, des tubes d'extraction, des tubes coniques de 0,3 ml et des bandelettes réactives unitaires en nombre suffisant pour 24 tests.
- Cartouches PCR BD MAXTM (n° de catalogue BD 437519).
- Kit de modèles de témoins d'ARN synthétiques BioGX (n° de catalogue BioGX 720-0678) :
 - Région du gène de la phosphoprotéine de la nucléocapside (N1) (n° de catalogue BioGX 720-0206).
 - Région du gène de la phosphoprotéine de la nucléocapside (N2) (n° de catalogue BioGX 720-0207).
 - Gène de la RNase P humaine (n° de catalogue BioGX 720-0208).
- Dispositif stérile de collecte d'écouvillons adapté aux écouvillons nasopharyngés/oropharyngés collecte et stockage dans des milieux de transport universel Copan (UTM[®]), BD Universal Viral Transport (UVT) ou une solution saline (0,85 %).
- Tubes Thermo Fisher, bandelettes de 8 tubes (n° de catalogue 4316567).
- Bouchons optiques Thermo Fisher pour bandelettes de 8 tubes (réf. AB-0866).
- Plaques à 96 puits Thermo Fisher (n° de catalogue A36924).
- Joints pour plaques à 96 puits Thermo Fisher (n° de catalogue AB-1170).
- Bandelettes à 8 tubes Bio-Rad (n° de catalogue TLS0851).
- Bouchons optiques pour bandelettes à 8 tubes Bio-Rad (n° de catalogue TCS0803).
- Plaques à 96 puits Bio-Rad (n° de catalogue HSP9655).
- Joints pour plaques à 96 puits Bio-Rad (n° de catalogue MSB1001).
- Vortex Genie 2 Vortexer (n° de catalogue VWR 58815-234) ou équivalent.
- Gants jetables en nitrile.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS



- Le test BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 & RNase P Multiplex peut être réalisé sur l'instrument automatisé d'extraction d'acide nucléique et de PCR en temps réel BD MAX™ en utilisant la bandelette d'extraction BD MAX™ ExK™ TNA-3 et le fichier UDP BioGX qui l'accompagne, ou sur Applied Biosystems Quantstudio™ 5 ou Bio-Rad CFX96 Touch™
- Il convient de traiter tous les échantillons biologiques, y compris les kits d'extraction et les cartouches PCR utilisés, comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des agents infectieux, conformément aux procédures de laboratoire sécurisées telles que celles décrites dans le document M297 du CLSI (Institut des normes cliniques et de laboratoire) et dans la publication « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories »^{7,8}.
- Les caractéristiques relatives à l'efficacité de ce test ont été déterminées uniquement avec les types de prélèvements énumérés dans la rubrique « Utilisation prévue ». L'efficacité de ce test avec d'autres types de prélèvements ou d'échantillons n'a pas été évaluée.
- N'utilisez pas les réactifs si les sachets de protection sont ouverts ou déchirés à l'arrivée.
- Refermez rapidement les sachets de protection des réactifs au moyen de la fermeture éclair après chaque utilisation. Supprimez tout excès d'air dans les sachets avant de les sceller et conservez-les à une température comprise entre 2 et 8 °C.
- Ne retirez pas le déshydratant des sachets de PCR Master Mix.
- N'utilisez pas le mélange maître Master Mix si le déshydratant n'est pas présent ou est cassé à l'intérieur des sachets.
- N'utilisez pas les tubes de réactif si la feuille d'étanchéité a été ouverte ou endommagée.

- Ne mélangez pas les réactifs de différents sachets, kits ou lots.

- N'utilisez pas de réactifs et/ou de matériaux périmés.

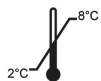


- Chaque tube Master Mix et BioGX Rehydration Buffer est utilisé pour traiter un seul échantillon. Ne réutilisez pas les tubes Master Mix ou BioGX Rehydration Buffer.



- Reportez-vous aux instructions du kit d'extraction BD MAX™ ExK™ TNA-3 pour obtenir des informations sur la manipulation correcte, les précautions à prendre et l'élimination appropriée des déchets.
- Ne mélangez pas les bouchons de septum entre les tubes de tampon d'échantillon et ne réutilisez pas les bouchons de septum car une contamination pourrait se produire et compromettre les résultats du test.
- Vérifiez que les bandelettes réactives unitaires BD sont correctement remplies de liquide (assurez-vous que les liquides sont au fond des tubes).
- N'utilisez pas la pipette à la bouche.
- Ne fumez pas, ne buvez pas et ne mangez pas dans les zones où des échantillons ou des kits sont manipulés.
- Éliminez les réactifs non utilisés et les déchets conformément aux réglementations nationales, fédérales, provinciales, nationales et locales.
- Utilisez des gants propres lors de la manipulation des composants du kit d'extraction, des réactifs PCR et des tubes de tampon.

STOCKAGE ET STABILITÉ



- BioGX recommande un stockage à long terme des sachets non ouverts entre 2 et 8 °C. Consultez l'étiquette du sachet du produit pour connaître sa durée de conservation.



- Les réactifs restent stables pendant 5 jours à une température comprise entre 2 et 30 °C pendant le transport.



- Les réactifs ont été testés pour prouver leur efficacité optimale lorsqu'ils sont stockés correctement et utilisés avant la date de péremption. Des études de stabilité à long terme sont en cours et la date de péremption sera modifiée au fur et à mesure que des données supplémentaires seront disponibles.

- Évitez d'exposer les réactifs (lyophilisés ou réhydratés) à la lumière directe du soleil ou à un éclairage ambiant à long terme.



- Refermez hermétiquement le sachet avec les réactions non utilisées et conservez le sachet dans un endroit sec immédiatement après ouverture.
- Si le sachet est ouvert par l'utilisateur mais que le réactif lyophilisé n'est pas réhydraté, évitez l'exposition du réactif lyophilisé à l'humidité et utilisez tout le contenu du sachet ouvert dans les 2 mois lorsqu'il est conservé à une température comprise entre 2 et 8 °C.

MODE D'EMPLOI

BD MAX™

(Logiciel d'exploitation BD MAX™ Logiciel Windows V4.70A ou plus récent)

Installez le protocole eUDP de BioGX sur le BD MAX™

Il sera nécessaire d'importer un protocole eUDP sur le BD MAX™. L'eUDP le plus récent est disponible en téléchargement sur www.biogx.com dans le menu déroulant en haut à droite de la page d'accueil. Sélectionnez « Education Center », puis « Int. Product Documents ». Choisissez le numéro de produit approprié après avoir cliqué sur « Instructions for Use Manual & Product Inserts » et téléchargez l'eUDP. Veuillez vous référer au manuel d'utilisation⁹ de BD MAX™ pour les instructions de téléchargement.

Bio-Rad CFX96 Touch™

(Logiciel d'exploitation Bio-Rad CFX Maestro 1.1 ou plus récent)

Installez le protocole BioGX sur le Bio-Rad CFX96 Touch™

Il sera nécessaire d'importer le fichier de protocole et de plaque Bio-Rad CFX96 Touch™. L'eUDP le plus récent est disponible en téléchargement sur www.biogx.com dans le menu déroulant en haut à droite de la page d'accueil. Sélectionnez « Education Center », puis « Int. Product Documents ». Choisissez le numéro de produit approprié après avoir cliqué sur « Instructions for Use Manual & Product Inserts » et téléchargez l'eUDP. Veuillez vous référer au manuel d'utilisation¹¹ de Bio-Rad CFX96 Touch™ pour les instructions sur le téléchargement.

Applied Biosystems QuantStudio™ 5

(Logiciel d'exploitation QuantStudio Design & Analysis Software v1.5.0 ou version ultérieure)

Installez le protocole BioGX sur Applied Biosystems QuantStudio™ 5

Il sera nécessaire d'importer le modèle Applied Biosystems QuantStudio™ 5. L'eUDP le plus récent est disponible en téléchargement sur www.biogx.com dans le menu déroulant en haut à droite de la page d'accueil. Sélectionnez « Education Center », puis « Int. Product Documents ». Choisissez le numéro de produit approprié après avoir cliqué sur « Instructions for Use Manual & Product Inserts » et téléchargez l'eUDP. Veuillez vous référer au manuel d'utilisation¹² d'Applied Biosystems QuantStudio™ 5 pour les instructions sur le téléchargement.

Collecte et transport d'échantillons

Les prélèvements nasopharyngés et oropharyngés doivent être collectés, transportés et conservés conformément aux recommandations du fabricant et aux procédures opérationnelles standard de l'établissement et du laboratoire.

Préparation des échantillons

Dispositifs de collecte et de transport d'écouvillons nasopharyngés / oropharyngés dans Copan UTM[®] ou BD[™] (volume de prélèvement de 3 ml)

BD MAX[™]

Vortexez bien l'échantillon avant de l'ajouter au SBT. Introduisez à la pipette 500 µL d'échantillon dans le tube de tampon d'échantillon (SBT), placez de manière aseptique le bouchon de septum BD[™] sur chaque SBT. Mélangez par pulsation le SBT pendant 1 à 3 secondes et placez le SBT dans le plateau d'extraction.

Bio-Rad CFX96/Applied Biosystems QuantStudio[™] 5

Introduisez à la pipette 500 µL d'échantillon dans le tube/la plaque d'extraction d'échantillon approprié et procédez à l'extraction de l'acide nucléique à l'aide d'une méthode ou d'une plateforme d'extraction de billes magnétiques ou de colonne de silice validée conformément aux instructions d'utilisation du fabricant respectif.

Dispositifs de collecte et de transport d'écouvillons nasopharyngés / oropharyngés dans Copan UTM[®] ou BD[™] (volume de prélèvement de 1 ml)

BD MAX[™]

Introduisez à la pipette 150 µL d'échantillon et 350 µL d'eau de qualité moléculaire dans le tube de tampon pour échantillon (SBT) et placez de manière aseptique un bouchon à septum BD[™] sur le SBT. Mélangez par pulsation le SBT pendant 1 à 3 secondes et placez le SBT dans le plateau d'extraction.

Bio-Rad CFX96/Applied Biosystems QuantStudio[™] 5

Introduisez à la pipette 150 µL d'échantillon et 350 µL d'eau de qualité moléculaire dans le tube/la plaque d'extraction d'échantillon approprié(e) et procédez à l'extraction des acides nucléiques en utilisant une méthode ou une plateforme d'extraction validée par billes magnétiques ou colonne de silice, conformément aux instructions d'utilisation du fabricant respectif.

**Écouvillon nasopharyngé/oropharyngé dans une solution saline à 0,85 %
(volume de prélèvement de 3 ml)**

BD MAX™

Vortexez bien l'échantillon avant de l'ajouter au SBT. Introduisez à la pipette 500 µL d'échantillon dans le tube de tampon d'échantillon (SBT), placez de manière aseptique le bouchon de septum BD™ sur chaque SBT. Mélangez par pulsation le SBT pendant 1 à 3 secondes et placez le SBT dans le plateau d'extraction.



Bio-Rad CFX96/Applied Biosystems QuantStudio™ 5

Introduisez à la pipette 500 µL d'échantillon dans le tube/la plaque d'extraction d'échantillon approprié et procédez à l'extraction de l'acide nucléique à l'aide d'une méthode ou d'une plateforme d'extraction de billes magnétiques ou de colonne de silice validée conformément aux instructions d'utilisation du fabricant respectif.

**Écouvillon nasopharyngé/oropharyngé dans une solution saline à 0,85 %
(volume de prélèvement de 1 ml)**

BD MAX™

Introduisez à la pipette 150 µL d'échantillon et 350 µL d'eau de qualité moléculaire dans le tube de tampon pour échantillon (SBT) et placez de manière aseptique un bouchon à septum BD™ sur le SBT. Mélangez par pulsation le SBT pendant 1 à 3 secondes et placez le SBT dans le plateau d'extraction.

Bio-Rad CFX96/Applied Biosystems QuantStudio™ 5

Introduisez à la pipette 150 µL d'échantillon et 350 µL d'eau de qualité moléculaire dans le tube/la plaque d'extraction d'échantillon approprié(e) et procédez à l'extraction des acides nucléiques en utilisant une méthode ou une plateforme d'extraction validée par billes magnétiques ou colonne de silice, conformément aux instructions d'utilisation du fabricant respectif.

Autres types d'échantillons

Ce test a été optimisé pour être utilisé avec les types et quantités de prélèvements décrits ci-dessus. L'utilisation de tout autre type de prélèvement, de méthode de collecte ou de quantité d'échantillon peut inhiber la réaction en chaîne par polymérase (PCR) ou perturber l'extraction si l'on ne procède pas aux ajustements appropriés de Guardrail et du volume de traitement. BioGX décline toute responsabilité quant aux méthodes de traitement ou types d'échantillons autres que ceux décrits dans cette notice.

Mise en place de la bandelette réactive unitaire sur le BD MAX™

1. Portez des gants en nitrile lorsque vous manipulez les réactifs lyophilisés Sample-Ready™ afin de réduire la génération de charges statiques. N'UTILISEZ PAS de gants en latex.



2. Utilisez uniquement les kits d'extraction BD MAX™ ExK™ TNA-3 avec le BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 & RNase P Multiplex.
3. Chargez une cartouche d'extraction dans le plateau d'extraction par échantillon à tester.
4. Placez un tube d'extraction BD MAX™ à la position 1 (point 1) de chaque bandelette réactive unitaire (figure 1).
5. Insérez un tube conique vide BD MAX™ de 0,3 ml à la position 3 (point 3) de chaque bandelette réactive unitaire (figure 1). Remarque : chaque kit d'extraction BD MAX™ ExK™ TNA-3 contient 24 tubes coniques vides de 0,3 ml.
6. Procédez à la génération de la liste de travail et au chargement des échantillons conformément au mode d'emploi de BD MAX™. Sélectionnez le protocole défini par l'utilisateur (eUDP) approprié fourni par BioGX.
7. À l'aide d'une pointe de pipette de 1 000 µL, transférez **360 µL de BioGX Rehydration Buffer E** dans un tube de réactifs lyophilisés BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 & RNase P Multiplex.
8. Mélangez en pipetant doucement de haut en bas avec une pointe de pipette de 1 000 µL. (**IMPORTANT** : Conservez le Master Mix réhydraté dans un bloc réfrigérant ou sur de la glace jusqu'à ce qu'il soit distribué dans le tube conique BD MAX à la position 3. Le Master Mix réhydraté qui n'est pas utilisé immédiatement peut être conservé jusqu'à 24 heures à une température entre 2 et 8 °C à l'abri de la lumière.)
9. Transférez **15 µL** de Master Mix réhydraté au fond de chaque tube conique vide de 0,3 ml dans la position 3 (point 3) de chaque bandelette réactive unitaire (figure 1).

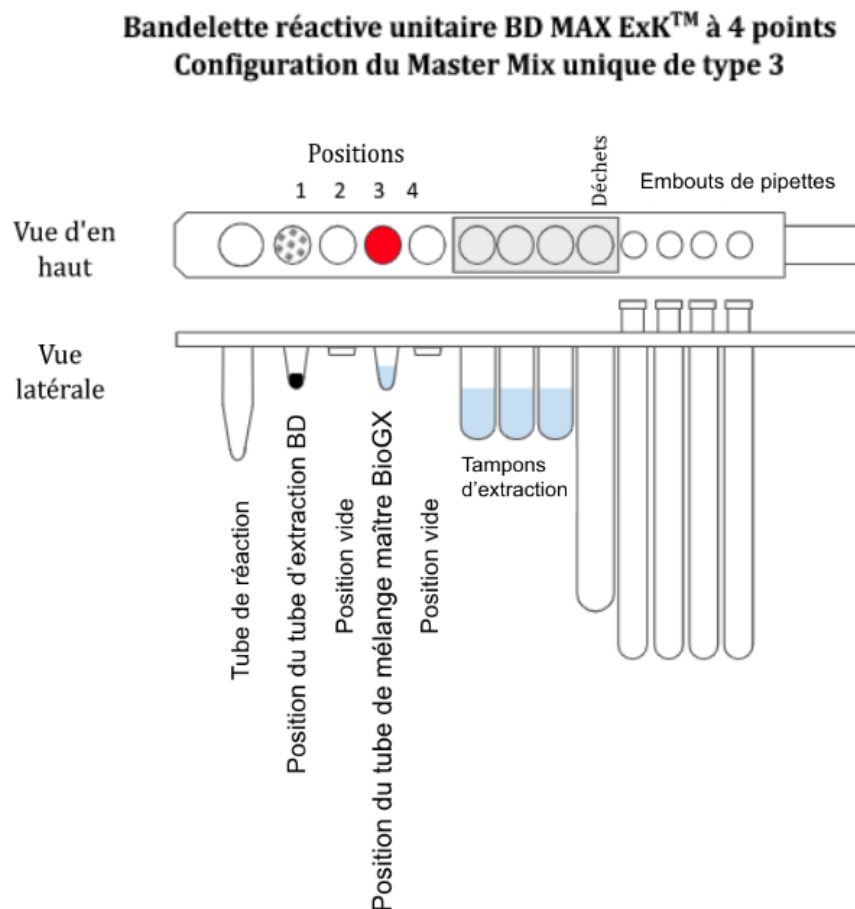


Figure 1. Schéma des bandelettes réactives unitaires BD MAX™ ExK™ TNA-3 à 4 points.

10. Soulevez le plateau et examinez brièvement le fond de chaque bandelette réactive unitaire pour vous assurer que tous les réactifs se trouvent au fond de chaque tube.
11. Chargez le plateau d'extraction et, si nécessaire, une nouvelle carte PCR dans l'instrument, fermez la porte et cliquez sur « Start Run ». Évitez tout retard inutile une fois les supports chargés.

Configuration de bandelettes à 8 tubes ou de plaques à 96 puits pour le Bio-Rad CFX96 Touch™ ou Applied Biosystems QuantStudio™ 5



1. Portez des gants en nitrile lorsque vous manipulez les réactifs lyophilisés Sample-Ready™ afin de réduire la génération de charges statiques. N'UTILISEZ PAS de gants en latex.
2. Préparez le nombre approprié de bandelettes à 8 tubes ou de plaques à 96 puits.
3. À l'aide d'une pointe de pipette de 1000 µL, transférez **500 µL d'eau de qualité moléculaire** (non incluse) dans un tube de réactifs lyophilisés BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 & RNase P Multiplex.
4. Mélangez en pipetant doucement de haut en bas avec une pointe de pipette de 1 000 µL. (**IMPORTANT** : Conservez le Master Mix réhydraté dans un bloc froid ou sur de la glace jusqu'à ce qu'il soit distribué dans le tube/la plaque. Si le Master Mix réhydraté ne peut pas être utilisé immédiatement, il peut être conservé jusqu'à 24 heures à une température entre 2 et 8 °C à l'abri de la lumière)
5. Transférez **10 µL** de Master Mix réhydraté au fond de chaque tube vide (bandelettes à 8 tubes) ou vide (plaque à 96 puits).
6. À chaque puits contenant 10 µL de Master Mix réhydraté, ajoutez **5 µL** d'acide nucléique extrait de l'échantillon du patient.
7. Placez les bouchons optiques ou les joints de plaque optique appropriés.
8. Essorez par impulsions pour amener le liquide au fond.
9. Chargez les bandelettes à 8 tubes et/ou les plaques à 96 puits dans la plateforme PCR en temps réel et démarrez. Évitez tout retard inutile une fois les supports chargés.

CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

CONTRÔLE

L'étalonnage de BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 & RNase P Multiplex n'est pas requis. Chaque test BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 & RNase P Multiplex comprend des amorces moléculaires et des sondes spécifiques pour la détection du gène de la RNase P humaine afin de servir de témoin du traitement des échantillons d'ARN endogène (SPC) présent dans un échantillon de patient correctement collecté. Aucun ajout externe de SPC n'est nécessaire. Le SPC est utilisé à la fois comme témoin de l'extraction de l'échantillon et comme témoin d'amplification interne (IAC) de la PCR.

Les laboratoires doivent déterminer le nombre, le type et la fréquence des tests des échantillons de contrôle conformément aux directives ou aux exigences des réglementations locales, provinciales, étatiques, fédérales et/ou nationales ou des organismes d'accréditation, afin de contrôler l'efficacité de l'ensemble du processus analytique. Pour des conseils généraux sur le contrôle de la qualité, l'utilisateur est invité à consulter les documents MM3 et EP12^{7,8} du CLSI.

Les témoins externes disponibles auprès de BioGX (n° de catalogue 720-0678) sont traités comme s'il s'agissait d'échantillons de patients. (Reportez-vous au tableau 1 de la partie consacrée à l'interprétation des résultats pour interpréter les résultats du test de témoin externe.)

Il est recommandé de lancer un (1) témoin positif externe et un (1) témoin négatif externe au moins une fois par jour jusqu'à ce qu'une validation adéquate du processus soit obtenue sur le système BD MAXTM dans chaque laboratoire. La fréquence des tests de contrôle devrait être réduite conformément à la réglementation en vigueur.

Le témoin positif externe est destiné à surveiller les défaillances importantes des réactifs. Le témoin négatif externe est destiné à détecter la contamination du réactif ou de l'environnement (ou transfert) par les acides nucléiques cibles.

Différents types de témoins externes sont recommandés afin de permettre à l'utilisateur de choisir le plus approprié pour le programme de contrôle de la qualité de son laboratoire.

Témoin négatif externe : un échantillon déjà qualifié et connu pour être négatif ou SBT avec 500 µL d'eau ajoutée. BioGX recommande que le témoin négatif externe soit préparé avant le témoin positif externe afin de réduire le risque de contamination pendant la préparation.

Témoin positif externe : il est possible d'utiliser du matériau de contrôle disponible dans le commerce auprès de BioGX ou tout autre matériau de contrôle autorisé.

Pour la préparation des suspensions de contrôle externe BioGX, il est recommandé de préparer les suspensions d'ARN dans le tube de tampon échantillon (SBT). Veuillez vous référer aux matrices de témoins d'ARN synthétique SARS-CoV-2 & RNase P de BioGX (n° de catalogue 720-0678) Veuillez vous référer aux instructions d'utilisation de BioGX disponibles en téléchargement sur www.biogx.com en cliquant sur « Int. Product Documents » sous « Education Center » et en sélectionnant le produit approprié sous « Template Controls ».

Tous les témoins externes doivent donner les résultats escomptés (positif pour le témoin positif externe et négatif pour le témoin négatif externe).

Un témoin négatif externe qui donne un résultat positif indique une manipulation et/ou une contamination de l'échantillon. Un témoin positif externe dont le résultat est négatif indique un problème de manipulation ou de préparation de l'échantillon. Passez en revue la technique de manipulation/préparation des échantillons.

Un témoin externe dont le résultat est incertain, indéterminé ou incomplet indique une défaillance du réactif ou du système BD MAX™. Vérifiez que le moniteur du système BD MAX™ ne contient pas de messages d'erreur. Reportez-vous à la partie « Résumé des erreurs du système » du manuel d'utilisation du système⁹ BD MAX™ pour l'interprétation des codes d'avertissement et d'erreur. Si le problème persiste, utilisez des réactifs provenant d'un sachet non ouvert ou utilisez un nouveau kit de test.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

BD MAX™

Les résultats sont disponibles à l'onglet *Results* de la fenêtre *Results* sur le moniteur du système BD MAX™. Le logiciel du système BD MAX™ interprète automatiquement le résultat du test lorsque l'eUDP de BioGX est utilisé. La présence d'une ou plusieurs cibles est possible et entraînera la positivité de plusieurs cibles à la fois. Reportez-vous à la partie « Dépannage » du manuel d'utilisation du système⁹ BD MAX™ pour l'interprétation des codes d'avertissement et d'erreur.

Applied Biosystems QuantStudio™ 5

Les résultats sont disponibles à l'onglet « Results » du logiciel de conception et d'analyse QuantStudio™. Pour télécharger les données, l'utilisateur peut accéder à l'onglet « Export » et exporter les données sous différents formats (*.xls, *.xlsx et *.txt). L'utilisateur peut également accéder à « Print report » sous l'onglet « File » pour prévisualiser et enregistrer le rapport au format *.PDF. Veuillez vous référer au manuel d'utilisation de QuantStudio™ 5 pour plus d'instructions¹².

Bio-Rad CFX96 Touch™

Les résultats peuvent être visualisés et téléchargés au format PDF en accédant à l'onglet « Tools » et en sélectionnant l'option « Report » sur le logiciel Bio-Rad CFX Maestro™/Manager en mode d'analyse des données. L'utilisateur peut également accéder à l'onglet « Export » et exporter toutes les feuilles de données brutes sous différents formats (CSV, Test, Excel, XML). Veuillez vous référer au manuel d'utilisation¹¹ de Bio-Rad CFX96 Touch™ **pour les instructions.**

Témoins négatifs et positifs externes

Si le témoin positif ou négatif ne donne pas les résultats escomptés, comme décrit dans le tableau 1, il se peut que le test ait été mal préparé ou exécuté ou qu'il y ait eu un dysfonctionnement des réactifs ou de l'équipement. Dans ce cas, invalidez la série et testez à nouveau tous les échantillons de cette série.

Le gène de la RNase P sert à la fois de témoin d'extraction d'échantillon et de témoin d'amplification interne. Dans le cas où les résultats des régions N1 et N2 sont négatifs, un résultat de RNase P doit être positif pour que le résultat soit un résultat négatif valide. Lorsque le résultat cible N1 ou N2 est positif, le résultat RNase P est ignoré. Si l'un des témoins ci-dessus ne présente pas les résultats escomptés tels qu'ils sont décrits, il se peut que le test ait été préparé ou exécuté de manière incorrecte ou qu'il y ait eu un dysfonctionnement des réactifs ou de l'équipement. Invalidez l'analyse et refaites le test.

Tableau 1. Interprétation des témoins externes BioGX.

Type de témoin	Applicabilité pour la surveillance	Résultats escomptés		
		N1	N2	RNase P
Témoin négatif - ajout de 500 µL d'eau	Contamination des réactifs et/ou de l'environnement	-	-	-
Témoin négatif - échantillon négatif connu		-	-	+
Témoin d'extraction et témoin positif RNase P	Défaillance substantielle des réactifs, y compris l'intégrité des amorces et des sondes	-	-	+
Témoin positif N1 et N2	Défaillance substantielle des réactifs, y compris l'intégrité des amorces et des sondes	+	+	-

Examen et interprétation des résultats des échantillons de patients

L'évaluation des résultats des tests sur les échantillons cliniques doit être effectuée après que les témoins positifs et négatifs externes ont été examinés et déterminés comme étant valides et acceptables. Si les témoins ne sont pas valides, les résultats du patient ne peuvent pas être interprétés. La liste des résultats escomptés est présentée dans les tableaux 2 et 3. Si les résultats obtenus ne sont pas conformes à ces directives, extrayez à nouveau l'échantillon et testez-le à nouveau. Si les tests répétés donnent des résultats similaires, prélevez un nouvel échantillon du patient pour le tester.

Tableau 2. Interprétation des résultats des échantillons de patients¹⁰.

Région du gène N1	Région du gène N2	RNase P	Interprétation du SARS-CoV-2	Action recommandée
+	+	+/-	POSITIF	Signaler comme POSITIF
+	-	+/-	PRÉSUMÉ POSITIF	si positif lors de la répétition, signaler comme POSITIF ^a
-	+	+/-	PRÉSUMÉ POSITIF	si positif lors de la répétition, signaler comme POSITIF ^a
-	-	+	NÉGATIF	Signaler comme NÉGATIF
-	-	-	INCERTAIN ^a	Répéter le test ^a

^aRépéter le test en préparant une nouvelle extraction et une PCR à partir de la collection d'échantillons restants du patient pour confirmer un résultat POSITIF (c'est-à-dire la confirmation d'un résultat positif avec un test répété détectant N1 et/ou N2). Inversement, un test répété ne permettant de détecter ni N1 ni N2 confirme un résultat NÉGATIF.

RÉPÉTER LA PROCÉDURE DE TEST

En cas de défaillance de l'instrument, il est possible de répéter le test en établissant une nouvelle série de tests à l'aide de l'échantillon/prélèvement original et d'un nouveau SBT, comme décrit ci-dessus au paragraphe « Préparation des échantillons ».

LIMITES DE LA PROCÉDURE

- Ce dispositif n'est pas conçu comme le seul moyen de diagnostic des maladies infectieuses. De par la nature inhérente de la technologie utilisée pour l'extraction et la détection d'acide nucléique, l'acide nucléique peut être détecté à partir d'organismes morts. L'utilisation prévue est limitée à la détection de la présence de la signature d'un acide nucléique d'un organisme, et non au diagnostic d'une maladie ou d'un état pathologique.
- Ce produit est destiné à être utilisé avec des échantillons prélevés à l'aide de dispositifs de prélèvement et de transport d'échantillons répertoriés dans la partie « Équipement et matériel requis mais non fournis ».
- Ce produit ne doit être utilisé qu'avec les réactifs en système ouvert BD MAX™ sur le système BD MAX™, les plateformes Bio-Rad CFX96 Touch et Applied Biosystems QuantStudio 5.

- Des résultats de test erronés peuvent résulter d'un prélèvement, d'une manipulation ou d'un stockage inappropriés des échantillons, d'une erreur technique, d'un mélange d'échantillons ou du fait que le nombre d'organismes présents dans l'échantillon est inférieur à la sensibilité analytique du test. Il est nécessaire de respecter scrupuleusement les instructions de la notice et les manuels d'utilisation du système BD MAX™, de Bio-Rad CFX96 Touch et d'Applied Biosystems QuantStudio 5 pour éviter des résultats erronés.
- Une bonne technique de laboratoire est essentielle pour la bonne exécution de ce test. En raison de sa grande sensibilité analytique, il convient de prendre des précautions particulières pour préserver la pureté de tous les matériaux et réactifs.
- Un résultat de test positif n'indique pas nécessairement la présence d'organismes infectieux viables. Un résultat positif indique la présence de l'acide nucléique cible. Un résultat négatif n'exclut pas la présence d'organismes infectieux et ne doit pas servir de base unique pour le traitement ou d'autres décisions de prise en charge du patient.
- Comme pour tous les tests de diagnostic *in vitro* basés sur la PCR, il est possible de détecter des niveaux extrêmement faibles de la cible, inférieurs à la limite de détection du test, mais il se peut que ces résultats ne soient pas reproductibles.
- Des résultats faussement négatifs peuvent survenir en raison d'une perte d'acide nucléique due à une collecte, un transport ou un stockage inadéquats des échantillons ou en raison d'une lyse et/ou d'une extraction cellulaire inadéquate. Le témoin du traitement des échantillons a été ajouté au test pour faciliter l'identification des échantillons contenant des inhibiteurs de l'amplification par PCR et pour contrôler l'intégrité des réactifs et du système de test dans son ensemble.
- Les résultats de BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 & RNase P Multiplex peuvent parfois être considérés comme incertains à cause d'un témoin du traitement des échantillons invalide, ou indéterminés ou incomplets à cause d'une défaillance de l'instrument, et nécessiter un nouveau test qui peut entraîner un retard dans l'obtention des résultats finaux.
- Des mutations ou des polymorphismes dans les zones de liaison aux amorces ou aux sondes peuvent affecter la détection de variants nouveaux ou inconnus du SARS-CoV-2, entraînant un résultat faussement négatif avec le BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 & RNase P Multiplex.
- Le BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 & RNase P Multiplex nécessite l'utilisation de trois (3) canaux optiques sur le système BD MAX™, les plateformes Bio-Rad CFX96 Touch et Applied Biosystem Quantstudio 5 pour détecter les fluorophores dans les canaux FAM, Texas Red et Cy 5.5.

CARACTÉRISTIQUES D'EFFICACITÉ

Spécificité analytique et diagnostique

La spécificité a été déterminée en analysant la matrice d'échantillons négatifs (échantillons nasopharyngés Copan UTM®) dopée avec des matrices de témoin positif. Le BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 & RNase P Multiplex était positif pour toutes les cibles respectives.

Sensibilité analytique et diagnostique

La sensibilité analytique du test SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 & RNase P Multiplex a été déterminée comme suit : pour la plateforme BD MAX™, des échantillons fictifs (n=20) ont été générés en introduisant un nombre connu de copies d'ARN synthétique de la région N1 du SRAS-CoV-2 et de l'ARN de la région N2 du SRAS-CoV-2 dans des prélèvements nasopharyngés négatifs Copan UTM. Pour les plateformes Bio-Rad CFX96 Touch et Applied Biosystems QuantStudio 5, une série de dilutions d'échantillons d'ARN synthétique positifs pour N1 et N2 a été ajoutée directement au Master Mix réhydraté (n = 20). La sensibilité analytique (limite de détection, LdD) est définie comme la concentration la plus faible à laquelle 95 % de tous les échantillons répliqués sont positifs. Il a été confirmé que la LdD était égale ou supérieure avec l'ARN viral génomique titré (numéro de référence Vircell MBC137-R).

Tableau 3. Résumé de la LoD pour BD MAX™

Cible	LdD/ml (500 µL d'entrée d'échantillon)	LdD/GBT (copies d'ARN par BD MAX SBT)	LdD/réaction (copies d'ARN par réaction RT-PCR)	Seuil de cycle (Ct) escompté
Région N1	~1 000	508	30	32-34
Région N2	~1 000	508	30	32-34

Tableau 4. Résumé de la LdD pour CFX96 Touch et QuantStudio 5

Cible	LdD/mL (500 µL d'entrée d'échantillon) ^b	LdD/réaction (copies d'ARN par réaction RT-PCR)	Seuil de cycle (Ct) escompté
Région N1	600	30	33-35
Région N2	600	30	33-35

^b Limite de détection basée sur une extraction d'échantillon de 500 µL avec élution dans 50 µL.

Inclusivité (*in silico*)

Les amorces et les sondes BioGX SARS-CoV-2 N1 et N2 ont une séquence identique à celle du panel de diagnostic RT-PCR en temps réel 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) de CDC. Les CDC ont fait état d'une analyse *in silico* des séquences d'amorces et de sondes dans sa notice d'utilisation (CDC-006-0019, rév. 02).³ Un alignement a été réalisé avec les séquences d'amorces et de sondes oligonucléotidiques du panel de diagnostic par RT-PCR en temps réel de CDC 2019 nCoV avec toutes les séquences d'acide nucléique publiquement disponibles pour le 2019-nCoV dans GenBank au 1er février 2020, afin de démontrer l'inclusivité prévue du panel de diagnostic par RT-PCR en temps réel de CDC 2019 nCoV. Tous les alignements montrent une identité à 100 % entre le panel CDC et les séquences 2019-nCoV disponibles, à l'exception d'une discordance de nucléotides avec l'amorce directe N1 dans une séquence déposée.

Réactivité croisée (*in silico*)

Les séquences de la sonde pour N1 et N2 utilisées dans le BioGX SARS-CoV-2 ont montré une homologie élevée avec le coronavirus du SARS et le génome du coronavirus de chauve-souris lié au SARS. Cependant, les amorces directes et inverses n'ont montré aucune homologie de séquence avec le coronavirus du SARS et le génome du coronavirus de chauve-souris lié au SARS. En combinant les amorces et les sondes, il n'y a pas d'homologies significatives avec le génome humain, d'autres coronavirus ou la microflore humaine qui permettraient de prédire d'éventuels résultats faussement positifs de la rRT-PCR.

Reproductibilité

L'étude de reproductibilité a détecté une matrice d'ARN synthétique analysée indépendamment par trois techniciens différents à l'aide de deux instruments BD MAX™, deux instruments Bio-Rad CFX96 Touch et un instrument Applied Biosystem QuantStudio 5 sur deux jours distincts. Tous les utilisateurs ont obtenu des résultats équivalents sur les deux instruments et les deux jours.

Reproductibilité de fabrication

Deux lots distincts ont été fabriqués et ont été jugés équivalents sur la base des procédures internes de validation du contrôle de la qualité.

















RÉFÉRENCES

1. US Centers for Disease Control and Prevention. 2020. 2019-Novel coronavirus (2019-nCoV) real-time rRT-PCR panel primers and probes.
<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-primer-probes.pdf>
2. US Centers for Disease Control and Prevention. 2020. Revision to Test Instructions CDC 2019 Novel Coronavirus (nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel (EUA200001).
https://www.cdc.gov/Features/Signatures/CDC_Letter_to_PHLs-N3_Removal_Instructions_26Feb2020.pdf
3. US Centers for Disease Control and Prevention. 2020. 2019-Novel coronavirus (2019-nCoV) real-time rRT-PCR panel primers and probes. CDC-006-00019, 2e révision.
<https://www.fda.gov/media/134922/download>
4. Coronavirus disease 2019: COVID-19 Background. 2020. Consulté le 11 avril 2020.
<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-updates/summary.html>
5. Coronavirus disease 2019 pandemic: Rolling updates on coronavirus disease (COVID-19). 2020. Consulté le 11 avril 2020.
<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
6. Andersen, K.G., Rambaut, A., Lipkin, W.I. *et al.* 2020. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (v. dernière édition).
8. Centers for Disease Control and Prevention et National Institutes of Health. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Choosewood L.C. et Wilson D.E. (eds) (2009). N° de publication HHS (CDC) 21-1112.
9. Manuel d'utilisation du système BD MAX™ (v. dernière révision), BD Life Sciences, Sparks, Maryland 21152 États-Unis.
10. United States Food and Drug Administration updated guidance for use of *single* viral target as acceptable for detection of SARS-CoV-2. FAQs on Testing for SARS-CoV-2. (2020). Consulté le 25 juin 2020.
<https://www.fda.gov/medical-devices/emergency-situations-medical-devices/faqs-testing-sars-cov-2>
11. Mode d'emploi des systèmes CFX96 Touch™, CFX96 Touch™ Deep Well, CFX Connect et CFX384 Touch™ (v. dernière version), Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, Californie, États-Unis (v. dernière version).
12. Guide de l'utilisateur du logiciel de conception et d'analyse QuantStudio™, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis (v. dernière version).

HISTORIQUE DES RÉVISIONS

Révision	Date	Description de la modification
02	25 Septembre 2023	Clarification des conditions de stockage à long terme et spécification du stockage en sachet ouvert à 2-8°C des réactifs.
01	02 Décembre 2022	Première version

SYMBOLES

Symbole	Signification	Symbole	Signification
	Numéro de catalogue		Contient la quantité suffisante pour <n> tests
	Marquage CE de conformité		Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Ne pas réutiliser		Limitation de température
	Code du lot		Garder au sec
	Mise en garde		Tenir à l'écart de la lumière du soleil
	Consulter le mode d'emploi		Date de péremption
	Fabricant		Risques biologiques
	Contrôle		Traduction



BioGX

Science Park 408, 1098 XH Amsterdam, Pays-Bas
Téléphone : +31.20.893.4261 Télécopie : +31.20.240.9149