



Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit  
K1180A



## Mode d'emploi

**Pour une utilisation diagnostique in vitro**

**Pour l'exportation uniquement. Non destiné à la vente aux États-Unis.**

Révision B2, Mai 2022

## Tableau des symboles

	Conformité européenne		Attention
	Dispositif médical de diagnostic in vitro		Référence/code
	Fabricant		Consulter le mode d'emploi
	Date de péremption		Contenu suffisant pour <N> tests
	Code du lot		Ne pas réutiliser
	Limites de température		Identifiant unique des dispositifs (IUD)
	Représentant agréé dans la Communauté européenne		

### Avis destiné à l'acheteur : Licence limitée

Ce produit est vendu dans le cadre d'accords de licence entre Agilent et Life Technologies Corporation. Le prix d'achat de ce produit comprend des droits limités et non transférables détenus par Life Technologies Corporation pour utiliser uniquement cette quantité de produit pour les tests *in vitro* du SARS-CoV-2 chez l'homme conformément au mode d'emploi accompagnant ce produit. Aucun autre droit n'est transmis. De plus amples informations sur l'achat de licences dans le cadre du brevet susmentionné peuvent être obtenues en contactant le service des licences : Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. E-mail : [outlicensing@lifetech.com](mailto:outlicensing@lifetech.com).

## **1 Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx KitInformations relatives au produit**

Utilisation prévue	6
Description du produit	7
Aperçu du produit/principe de test	7
Description des étapes du test	7
Matériels de contrôle à utiliser avec l'Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit	7
Processus analytique du dosage	9

## **2 Matériels, sécurité et manipulation**

Matériels fournis	11
Réactifs, matériels, équipement et logiciel requis mais non fournis	12
Mesures de sécurité	15
Conservation et manipulation	17
Conditionnement du produit	17
Stockage, manipulation et stabilité des réactifs	17
Prélèvement, manipulation et stockage des échantillons	17

## **3 Instructions pour l'extraction des acides nucléiques**

Extraction des acides nucléiques	19
----------------------------------	----

## **4 Instructions pour la préparation des réactions de qRT-PCR**

Configurer l'expérience qRT-PCR sur le système de PCR en temps réel	21
Créer et configurer l'expérience AriaMx/AriaDx (obligatoire si un modèle n'a pas encore été créé)	21
Créer l'expérience AriaMx/AriaDx à partir du modèle sauvegardé	27
Créer et configurer l'expérience ABI 7500 Fast (obligatoire si un modèle n'a pas encore été créé)	27
Créer l'expérience ABI 7500 Fast à partir du modèle sauvegardé	33
Créer et configurer l'expérience Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR (obligatoire si les fichiers de protocole et de plaque enregistrés n'ont pas encore été créés)	34
Créer l'expérience Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR à partir de fichiers de protocoles et de plaques sauvegardés	40
Préparer les réactions de qRT-PCR	41

## **5 Instructions pour l'exécution de la qRT-PCR**

Effectuer une qRT-PCR sur l'Agilent AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System	46
Exécuter le programme de qRT-PCR sur l'AriaMx/AriaDx system	46
Attribuer des paramètres d'analyse de données pour l'expérience AriaMx/AriaDx	47
Exporter les données du logiciel Aria	51
Effectuer une qRT-PCR sur l'ABI 7500 Fast Real Time PCR Instrument	54
Exécuter le programme de qRT-PCR sur l'ABI 7500 Fast Real Time PCR Instrument	54

Attribuer des paramètres d'analyse de données pour l'expérience ABI 7500 Fast	54
Exporter les données de Well Table du logiciel Design & Analysis vers un fichier CSV	59
Effectuer une qRT-PCR sur le Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System	61
Exécuter le programme de qRT-PCR sur le CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System	61
Attribuer des paramètres d'analyse de données pour le CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System	61
Exporter les données depuis CFX Maestro Software	66

## **6 Analyse et résultats**

Interprétation des résultats	69
Résultats et interprétation pour les échantillons de contrôle	69
Résultats et interprétation pour les échantillons cliniques	70

## **7 Contrôle qualité**

Contrôle qualité	74
------------------	----

## **8 Limites du dosage**

Limites	76
---------	----

## **9 Caractéristiques de performance**

Caractéristiques de performance	78
Sensibilité analytique (Limite de détection)	78
Inclusivité analytique	79
Réactivité croisée	79
Évaluation clinique	80

## **10 Références**

Étiquettes de produits	82
------------------------	----

1

## Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx KitInformations relatives au produit

Utilisation prévue **6**

Description du produit **7**

Processus analytique du dosage **9**

Le présent chapitre contient des informations de présentation du dosage.

## Utilisation prévue

Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit est un test de diagnostic in vitro par RT-PCR en temps réel destiné à la détection qualitative de l'ARN du SARS-CoV-2 isolé et purifié à partir d'échantillons prélevés par écouvillonnage nasopharyngé (NP), nasal et oropharyngé (OP) provenant d'individus répondant aux critères cliniques et/ou épidémiologiques de la COVID-19.\*

Les résultats sont destinés à l'identification de l'ARN du SARS-CoV-2. L'ARN du SARS-CoV-2 est généralement détectable dans les échantillons des voies respiratoires supérieures pendant la phase aiguë de l'infection. Des 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 le statut de l'infection du patient. Des résultats positifs n'excluent pas une infection bactérienne ou une co-infection avec d'autres virus. L'agent détecté peut ne pas être la cause précise de la maladie.

Des résultats négatifs n'excluent pas l'infection par le SARS-CoV-2 et ne doivent pas être utilisés comme seule base pour les décisions de prise en charge des patients. Les résultats négatifs doivent être combinés à d'autres observations cliniques, aux antécédents du patient et aux informations épidémiologiques.

L'Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit est destiné à être utilisé par du personnel de laboratoire clinique qualifié et formé spécifiquement au fonctionnement du système Agilent et aux procédures de diagnostic in vitro.

\* La performance du dosage Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit a été établie à partir d'échantillons de type écouvillon nasopharyngien prélevés dans des milieux de transport UTM ou VCM. Les écouvillons oropharyngés, les écouvillons nasaux et les écouvillons du cornet nasal moyen sont considérés comme des types d'échantillons acceptables pour le dosage Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit mais les performances avec ces types d'échantillons n'ont pas été établies. Les tests des écouvillons oropharyngés, des écouvillons nasaux et des écouvillons du cornet nasal moyen (prélevés par le patient lui-même sous la supervision d'un prestataire de soins ou par un prestataire de soins) sont limités aux patients présentant des symptômes de la COVID-19.

# Description du produit

## Aperçu du produit/principe de test

L'Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit est un test de réaction en chaîne de la polymérase de transcription inverse (qRT-PCR) en temps réel. L'ensemble d'amorces et de sondes SARS-CoV-2 est conçu pour détecter l'ARN du SARS-CoV-2 dans les échantillons prélevés par écouvillonnage nasopharyngien (NP), nasal et oropharyngien (OP) chez les patients suspectés de COVID-19 par leur prestataire de soins.

## Description des étapes du test

Les acides nucléiques sont isolés et purifiés à partir de ~140–200 µl (selon la méthode d'extraction) d'échantillons d'écouvillonnage nasopharyngé (NP) à l'aide d'un système d'extraction automatisé (Qiagen QIAasympnhy DSP Virus/Pathogen Mini Kit avec QIAasympnhy, ThermoFisher MagMAX Viral/Pathogen II Kit avec KingFisher Flex). L'acide nucléique purifié (5 µl) est retrancrit en ADNc puis amplifié dans une réaction de qRT-PCR en une étape à l'aide des Agilent Brilliant III qRT-PCR reagents sur des instruments de PCR en temps réel pris en charge. Au cours de ce processus, la sonde se recuit sur une séquence cible spécifique située entre les amorces avant et arrière. Pendant la phase d'extension du cycle PCR, l'activité de nucléase 5' de la *Taq* polymérase dégrade la sonde, provoquant la séparation du colorant rapporteur et du colorant d'extinction, générant un signal fluorescent. À chaque cycle, des molécules de colorant rapporteur supplémentaires sont clivées de leurs sondes respectives, ce qui augmente l'intensité de la fluorescence. L'intensité de la fluorescence est contrôlée à chaque cycle de PCR par des instruments de PCR en temps réel pris en charge (Agilent AriaMx/AriaDx, ABI 7500 Fast ou Bio-Rad CFX96).

## Matériels de contrôle à utiliser avec l'Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit

- Un contrôle « sans modèle » (négatif) est nécessaire pour vérifier la contamination dans le processus de dosage qui pourrait générer des faux-positifs et doit être utilisé au moins une fois par plaque PCR. L'utilisateur ajoute de l'eau à la place de l'ARN extrait pour l'utiliser comme un contrôle sans modèle.
- Un contrôle à modèle positif est nécessaire pour garantir que le mécanisme de détection de l'ARN ciblé du SARS-CoV-2 n'est pas compromis et doit être utilisé au moins une fois par plaque PCR (50 copies/réaction). Le contrôle positif dans le kit est de l'ARN synthétique correspondant aux séquences cibles virales.
- Un contrôle d'extraction (Human Specimen Control, ou HSC) est nécessaire pour garantir que l'ARN de l'échantillon original est bien préservé pendant l'extraction et doit être utilisé au moins une fois par lot d'extraction.

- Un contrôle interne (gène P de la RNase humaine) est nécessaire pour s'assurer que l'ARN de l'échantillon original est détectable dans une réaction de qRT-PCR. Il est prévu qu'il soit détecté dans le HSC ainsi que dans la plupart des échantillons humains ayant suffisamment d'ARN cellulaire. Dans les échantillons humains, le contrôle interne peut ne pas être détecté si l'ARN viral du SARS-CoV-2 est présent à des concentrations élevées.

### Contrôles fournis avec le kit

Tableau 1 Contrôle fourni avec l'Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit

Type de contrôle	Nom du contrôle	Nom du fournisseur	Référence du fournisseur
Positif	Agilent SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx	Agilent	K1180-64200

### Contrôles requis mais non fournis avec le kit

- Eau de qualité moléculaire, exempte de nucléase, à utiliser comme contrôle « sans modèle » (négatif)
- Contrôle d'extraction : plusieurs options sont offertes au client sur la base des recommandations du CDC
  - Contrôle des échantillons humains, fabriqué par le CDC, KT0189
  - Matériel d'échantillon humain négatif : les laboratoires peuvent préparer un volume d'échantillon humain (par exemple, des sérums humains ou des restes d'échantillons respiratoires négatifs regroupés) à extraire et à analyser avec des échantillons cliniques comme contrôle d'extraction. Ce matériel doit être préparé en volume suffisant pour être utilisé sur plusieurs cycles. Le matériel doit être testé avant son utilisation comme contrôle d'extraction afin de s'assurer qu'il génère les résultats attendus pour le HSC énumérés dans ce mode d'emploi.
  - Matériel d'échantillon humain synthétique : les laboratoires peuvent préparer des échantillons humains synthétiques en suspendant toute lignée de cellules humaines (par exemple, A549, Hela ou 293) dans la PBS. Ce matériel doit être préparé en volume suffisant pour être utilisé sur plusieurs cycles. Le matériel doit être testé avant son utilisation comme contrôle d'extraction afin de s'assurer qu'il génère les résultats attendus pour le HSC énumérés dans ce mode d'emploi.

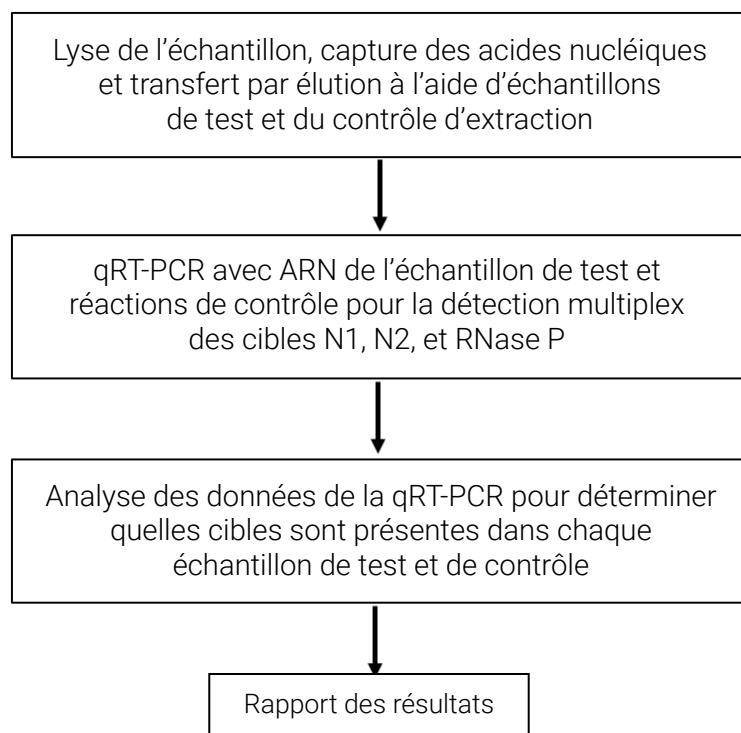
# Processus analytique du dosage

Pour commencer le dosage, extraire l'acide nucléique des échantillons de test nasopharyngés en même temps qu'un contrôle d'échantillon humain approprié.

Effectuer ensuite une expérience multiplex de qRT-PCR en utilisant les échantillons d'ARN extraits et le contrôle d'ARN positif fourni. Inclure un contrôle sans modèle (NTC).

Une fois le cycle de qRT-PCR terminé, analyser les données pour l'amplification des cibles virales N1 et N2 et la cible du gène P de la RNase humaine.

Enfin, rapporter les résultats des échantillons de test.



**Figure 1** Processus analytique du dosage SARS-CoV2 qRT-PCR Dx

## 2

# Matériels, sécurité et manipulation

Matériels fournis **11**

Réactifs, matériels, équipement et logiciel requis mais non fournis **12**

Mesures de sécurité **15**

Conservation et manipulation **17**

Ce chapitre décrit les réactifs et autres matériels utilisés dans le dosage et fournit des informations pour effectuer le dosage en toute sécurité.

## Matériels fournis

Le **Tableau 2** répertorie le matériel fourni avec l'Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit et ses exigences en matière de température. Voir « **Conservation et manipulation** » à la page 17 pour obtenir des instructions supplémentaires sur le stockage des matériels.

**Tableau 2 Matériels fournis avec l'Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, réf K1180A**

Matériels	Quantité	Composants	Température de conservation
Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Reagents, réf K1180-64100*	Suffisant pour 400 réactions de qRT-PCR (échantillons de test et contrôles)  <i>Noter que chaque plaque de réaction de qRT-PCR doit comprendre au moins 3 puits pour les réactions de contrôle.</i>	2× Brilliant III Ultra-Fast qRT-PCR Master Mix Dx  RT/RNase Block Dx  Reference Dye Dx <sup>†</sup>  100 mM DTT Dx  10× SARS-CoV-2 Primer/Probe Mix Dx <sup>†</sup>	Conserver à -20 °C à la réception.  Conserver à -20 °C à la réception.
Agilent SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx, réf K1180-64200 <sup>‡</sup>	Suffisant pour 8 tests de dosage	SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx	Conserver à -80 °C à la réception.

\* Le SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Reagents kit est aussi vendu séparément comme Agilent réf K1180B.

<sup>†</sup> Ce réactif est sensible à la lumière et doit être conservé à l'abri de la lumière dans la mesure du possible.

<sup>‡</sup> Le SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx est aussi vendu séparément comme Agilent, réf K1180C.

# Réactifs, matériels, équipement et logiciel requis mais non fournis

Le **Tableau 3** énumère les options pour l'étape d'extraction de l'ARN du protocole, qui est effectuée sur un instrument pour l'automatisation. La procédure d'extraction de l'ARN est décrite dans « **Instructions pour l'extraction des acides nucléiques** » à la page 18.

**Tableau 3 Options d'extraction de l'ARN - Obligatoire mais non fourni**

Kit d'extraction d'ARN	Instrument
QIAGEN QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit, réf 937055	QIAGEN QIAAsymphony SP, réf 9001297 (automatisation)
Thermo Fisher Scientific MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit, Thermo Fisher réf A48383	Thermo Fisher Scientific KingFisher Flex Purification System, réf 5400630 (automatisation)

Le **Tableau 4** présente les options du contrôle des échantillons humains. Cet échantillon de contrôle est une préparation de culture cellulaire humaine utilisée comme contrôle de procédure d'extraction pour démontrer la récupération réussie de l'acide nucléique, ainsi que l'intégrité du réactif d'extraction.

**Tableau 4 Options de contrôle des échantillons humains - Obligatoire mais non fourni**

Contrôle des échantillons humains	Description
Contrôle des échantillons humains (HSC), 10 flacons x 500 µL, CDC réf KT0189	Fabriqué et vendu par le CDC. Le HSC CDC est constitué de matériel cellulaire humain cultivé non infectieux (traité à la bêta-propiolactone) fourni sous forme de liquide en suspension dans de la PBS 0,01 M à un pH de 7,2 à 7,4.
Matériel d'échantillon humain négatif	Préparé par le laboratoire. Ce type de contrôle d'échantillons humains est un volume de matériel d'échantillons humains (par exemple, des sérums humains ou des restes d'échantillons respiratoires négatifs regroupés) à extraire et à analyser avec des échantillons cliniques comme contrôle d'extraction. Ce matériel doit être préparé en volume suffisant pour être utilisé sur plusieurs cycles. Le matériel doit être testé avant son utilisation comme contrôle d'extraction afin de s'assurer qu'il génère les résultats attendus pour le HSC énumérés dans ce mode d'emploi.
Matériel d'échantillon humain synthétique	Préparé par le laboratoire. Ce type de contrôle d'échantillons humains est un matériel d'échantillons humains synthétiques, préparé par la suspension de toute lignée cellulaire humaine (par exemple, A549, Hela ou 293) dans de la PBS. Ce matériel doit être préparé en volume suffisant pour être utilisé sur plusieurs cycles. Le matériel doit être testé avant son utilisation comme contrôle d'extraction pour s'assurer qu'il génère les résultats attendus pour le contrôle des échantillons humains figurant dans ce mode d'emploi.

Du **Tableau 5** au **Tableau 6** indiquent les réactifs, matériels, équipements et instruments supplémentaires qui sont nécessaires mais qui ne sont pas fournis avec l'Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit.

**Tableau 5 Réactifs et matériaux requis mais non fournis**

Réactif ou matériel	Forme
Eau de qualité moléculaire, exempte de nucléase	Réactif
Solution d'eau de Javel à 10 % (dilution 1:10 de 5,25–6 % de blanchiment à l'hypochlorite)	Matériel
DNAZap, Ambion réf AM9890 ou un agent de décontamination équivalent	Matériel
RNase AWAY, Fisher Scientific réf 21-236-21 ou un agent de décontamination équivalent	Matériel
Gants non poudrés et blouses chirurgicales jetables	Matériel
Embouts de pipette stériles, exempts de nucléase, à filtre contre les aérosols	Matériel
Tubes à microcentrifuger de 1,5 ml, exempts de nucléase	Matériel
Tubes à microcentrifuger de 2 ml, exempts de nucléase	Matériel
Plaques de 96 puits exemptes de nucléase, 200 µl	Matériel
<i>Utiliser des plaques compatibles avec le système de PCR en temps réel choisi</i>	
Bandes de 8 tubes exempts de nucléase	Matériel
Opercules de plaques adhésifs exempts de nucléase, ou bandes de 8 capuchons optiques exempts de nucléase pour les plaques PCR à 96 puits	Matériel
<i>Utiliser des opercules ou des bandes compatibles avec le système de PCR en temps réel choisi</i>	
Tampons de compression à film optique MicroAmp, Thermo Fisher Scientific, réf 4312639*	Matériel

\* Les tampons de compression ne sont nécessaires que lorsque des opercules adhésifs sont utilisés pour sceller les plaques pour l'AriaMx/AriaDx Real-Time PCR system

**Tableau 6 Instruments, logiciels et équipements obligatoires mais non fournis**

Instrument, logiciel ou équipement	Forme
Système de PCR en temps réel	Instrument avec ordinateur et logiciel
<ul style="list-style-type: none"> <li>Agilent AriaMx Real-Time PCR System (réf G8830A) ou AriaDx Real-Time PCR System (réf K8930AA)             <b>Logiciel</b> : logiciel Aria version 1.71 ou 1.8 et logiciel de suivi électronique (inclus avec la réf K8930AA ou disponible séparément sous la réf G5380AA)</li> <li>ABI 7500 Fast Real Time PCR Instrument avec ordinateur portable (réf 4351106) ou ordinateur de bureau (réf 4351107)             <b>Logiciel</b> : logiciel 7500 version 2.3 et logiciel Design &amp; Analysis version 2.4.3</li> <li>Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (réf 1855195) ou CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System avec Starter Package (réf 1855196)             <b>Logiciel</b> : CFX Maestro Software 2.0 version 4.1.2 (inclus avec la réf 1855196 ou disponible séparément sous la réf 12004110)</li> </ul>	
Logiciel permettant de visualiser les données exportées du logiciel de PCR en temps réel, par exemple Microsoft Excel	Logiciel
Agitateur à vortex	Équipement
Microcentrifugeuse	Équipement

**Tableau 6 Instruments, logiciels et équipements obligatoires mais non fournis (suite)**

Instrument, logiciel ou équipement	Forme
Centrifugeuse à plaques pour plaques à 96 puits	Équipement
Micropipettes P10, P20, P200 et P1000	Équipement
Pipettes multicanaux (5–50 µl)	Équipement
Portoirs pour tubes de microcentrifugeuse	Équipement
Deux (2) portoirs réfrigérants de 96 puits	Équipement
Seau à glace	Équipement

# Mesures de sécurité

- 1 Le processus analytique de l'Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit doit être effectué par un personnel qualifié et formé afin d'éviter le risque de résultats erronés. Utiliser des zones séparées pour la préparation des échantillons et des contrôles des patients afin d'éviter les faux positifs.
- 2 Ce test a été autorisé uniquement pour la détection de l'acide nucléique du SARS-CoV-2 et non pour d'autres virus ou agents pathogènes.
- 3 Lire attentivement l'ensemble du mode d'emploi.
- 4 Les échantillons et les contrôles doivent toujours être traités comme s'ils étaient infectieux et/ou présentant un danger biologique, conformément aux procédures de sécurité du laboratoire. Voir les directives provisoires de biosécurité en laboratoire pour la manipulation et le traitement des échantillons associés au 2019-nCoV.  
<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/lab-biosafety-guidelines.html>
- 5 Suivre les précautions nécessaires lors de la manipulation des échantillons. Utiliser un équipement de protection individuelle (EPI) conforme aux directives en vigueur pour la manipulation d'échantillons potentiellement infectieux. Si un déversement se produit, désinfecter immédiatement.
- 6 Les échantillons peuvent être infectieux. Utiliser les précautions universelles lors de la réalisation de ce dosage. Les méthodes de manipulation et d'élimination appropriées doivent être établies par le directeur du laboratoire. Seul le personnel suffisamment formé à la manipulation des matières infectieuses devrait être autorisé à effectuer cette procédure de diagnostic.
- 7 Si une infection par le 2019-nCoV est suspectée sur la base des critères de dépistage clinique actuels recommandés par les autorités de santé publique, les échantillons doivent être prélevés avec les précautions de contrôle des infections appropriées.
- 8 Utiliser uniquement les articles de laboratoire jetables fournis ou spécifiés.
- 9 Utiliser toujours des embouts de pipette avec des barrières anti-aérosols. Les embouts utilisés doivent être stériles et exempts de DNases et de RNases.
- 10 Les dosages basés sur la PCR sont sensibles à l'introduction accidentelle de produits d'amplification provenant de réactions de PCR antérieures. Toute contamination des échantillons ou des réactifs peut entraîner un résultat incorrect. Le processus analytique dans le laboratoire doit se faire de manière unidirectionnelle. Appliquer les meilleures pratiques suivantes pour éviter la contamination des échantillons par les produits de PCR tout au long du processus analytique :
  - Attribuer des postes de travail séparés pour la pré-PCR et la post-PCR et utiliser des fournitures et des réactifs spécifiques dans chaque domaine. En particulier, ne jamais utiliser les matériels désignés pour le travail post-PCR pour les segments pré-PCR du processus analytique. Toujours utiliser des pipettes dédiées à la pré-PCR avec des embouts résistants aux aérosols exempts de nuclease pour pipeter les solutions pré-PCR dédiées.
  - Maintenir les zones de travail propres. Nettoyer les surfaces pré-PCR quotidiennement et entre chaque dosage en utilisant une solution d'eau de Javel à 10 % et/ou un produit tel que DNAZap ou RNase AWAY. Enlever les résidus d'eau de Javel avec de l'éthanol à 70 %.

- Porter une blouse de laboratoire propre et des gants propres et non poudrés. Exercer une bonne hygiène de laboratoire, notamment en changeant de gants après un contact avec toute surface potentiellement contaminée.
- Changer les embouts des pipettes à barrière anti-aérosols entre tous les transferts manuels de liquides.
- Lors de l'extraction de l'acide nucléique des échantillons, utiliser une technique aseptique appropriée pour minimiser le risque de contamination croisée entre les échantillons et éviter l'introduction accidentelle de nucléases dans les échantillons.
- Dans la mesure du possible, garder les tubes de réactifs et de réaction bouchés ou couverts.

**11** Ne pas manger, boire, fumer ou appliquer de produits cosmétiques dans les zones de travail.

**12** Les modifications des réactifs de dosage, du protocole de dosage ou de l'instrumentation ne sont pas autorisées.

**13** Les réactifs doivent être stockés et manipulés comme indiqué dans le **Tableau 2** à la page 11 et dans « **Conservation et manipulation** » à la page 17.

**14** Ne pas utiliser le kit après la date d'expiration indiquée.

**15** Éliminer les déchets conformément aux réglementations locales, régionales et fédérales.

**16** Les fiches de données de sécurité sont disponibles sur [www.agilent.com](http://www.agilent.com).

**17** Ne pas utiliser de matériel pouvant contenir du thiocyanate de guanidinium ou tout autre matériel contenant de la guanidine sur l'instrument de PCR en temps réel. Des composés hautement réactifs et/ou toxiques peuvent se former s'ils sont combinés avec de l'hypochlorite de sodium (eau de Javel).

**18** Des résultats positifs indiquent la présence de l'ARN du SARS-CoV-2.

# Conservation et manipulation

## Conditionnement du produit

Après réception de l'Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, vérifier soigneusement que le carton ne présente aucun dommage visible. Si des dommages sont constatés sur le carton, contacter l'assistance technique d'Agilent.

## Stockage, manipulation et stabilité des réactifs

- Toujours vérifier la date d'expiration avant de l'utiliser. Ne pas utiliser de réactifs expirés.
- Protéger les sondes fluorogènes de la lumière.
- Les amorces, les sondes (y compris les aliquotes) et les mélanges réactionnels d'enzymes doivent être décongelés et conservés sur de la glace ou sur un portoir réfrigérant à tout moment pendant la préparation et l'utilisation.
- Les contrôles doivent être décongelés et conservés sur de la glace ou sur un portoir réfrigérant à tout moment pendant la préparation et l'utilisation.
- Consulter le **Tableau 2** à la page 11 pour connaître les températures de stockage des réactifs de l'Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit.

## Prélèvement, manipulation et stockage des échantillons

Un prélèvement, un stockage et un transport d'échantillons inadéquats ou inappropriés sont susceptibles de donner de faux résultats. La formation en matière de prélèvement des échantillons est fortement recommandée en raison de l'importance de la qualité des échantillons. Le CLSI MM13-A peut être référencé comme une ressource appropriée.

- Prélèvement de l'échantillon
  - Consulter les directives provisoires pour le prélèvement, la manipulation et l'analyse d'échantillons cliniques de patients étudiés (PUI) pour le nouveau coronavirus 2019 (2019-nCoV)  
<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html>
  - Suivre les instructions du fabricant de l'appareil de prélèvement des échantillons pour connaître les méthodes de prélèvement appropriées.
- Transport des échantillons
  - Matériel clinique prélevé sur le patient et placé dans un système de transport approprié. Pour l'Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, cela comprend les échantillons NP dans un milieu de transport viral (VTM), un milieu de transport universel (UTM), une solution saline, un milieu Amies liquide ou un milieu de transport d'échantillons (STM).

## 3 Instructions pour l'extraction des acides nucléiques

Extraction des acides nucléiques **19**

Ce chapitre contient des instructions pour l'extraction de l'ARN à partir d'échantillons de tests cliniques et du contrôle des échantillons humains.

## Extraction des acides nucléiques

Les performances de l'Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit dépendent de la quantité et de la qualité de l'ARN modèle purifié à partir d'échantillons humains. Les kits et procédures d'extraction d'ARN suivants, disponibles dans le commerce, ont été qualifiés et validés pour la récupération et la pureté de l'ARN à utiliser avec le kit.

Les procédures recommandées par le fabricant (à l'exception des recommandations ci-dessous) doivent être suivies pour l'extraction des échantillons. Le contrôle des échantillons humains doit être inclus dans chaque lot d'extraction.

### **QIAGEN QIAsymphony DSP Virus/Pathogène Midi Kit, protocole d'automatisation**

Recommandation : utiliser 140 µl d'échantillon et éluer avec 60 µl de tampon.

### **MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit, protocole d'automatisation**

Recommandation : utiliser 200 µl d'échantillon et éluer avec 50 µl de tampon.

4

## Instructions pour la préparation des réactions de qRT-PCR

Configurer l'expérience qRT-PCR sur le système de PCR en temps réel **21**

Préparer les réactions de qRT-PCR **41**

Ce chapitre contient des instructions pour la préparation des réactions de PCR quantitative à transcription inverse (qRT-PCR) pour les échantillons à tester et les échantillons de contrôle.

# Configurer l'expérience qRT-PCR sur le système de PCR en temps réel

Avant de configurer la plaque de réaction de qRT-PCR, configurer l'expérience dans le système de PCR en temps réel afin que l'instrument soit prêt à fonctionner dès que la plaque de réaction est préparée.

Suivre les instructions relatives à votre système de PCR spécifique en temps réel.

## Agilent AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System

- Consulter « **Créer et configurer l'expérience AriaMx/AriaDx (obligatoire si un modèle n'a pas encore été créé)** » à la page 21 si vous ne disposez pas d'un fichier modèle avec les paramètres nécessaires.
- Si vous avez un fichier modèle à utiliser, consulter « **Créer l'expérience AriaMx/AriaDx à partir du modèle sauvegardé** » à la page 27.

### REMARQUE

Allumer l'AriaMx ou AriaDx instrument au moins 3 heures avant l'utilisation. L'instrument peut être laissé allumé à tout moment pour être toujours prêt à l'emploi.

Selon les spécifications de l'instrument, les conditions de fonctionnement sont les suivantes : 20–30 °C, 20–80 % d'humidité et ≤ 2000 mètres d'altitude.

## ABI 7500 Fast Real Time PCR Instrument

- Consulter « **Créer et configurer l'expérience ABI 7500 Fast (obligatoire si un modèle n'a pas encore été créé)** » à la page 27 si vous ne disposez pas d'un fichier modèle avec les paramètres nécessaires.
- Si vous avez un fichier modèle à utiliser, consulter « **Créer l'expérience ABI 7500 Fast à partir du modèle sauvegardé** » à la page 33.

## Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System

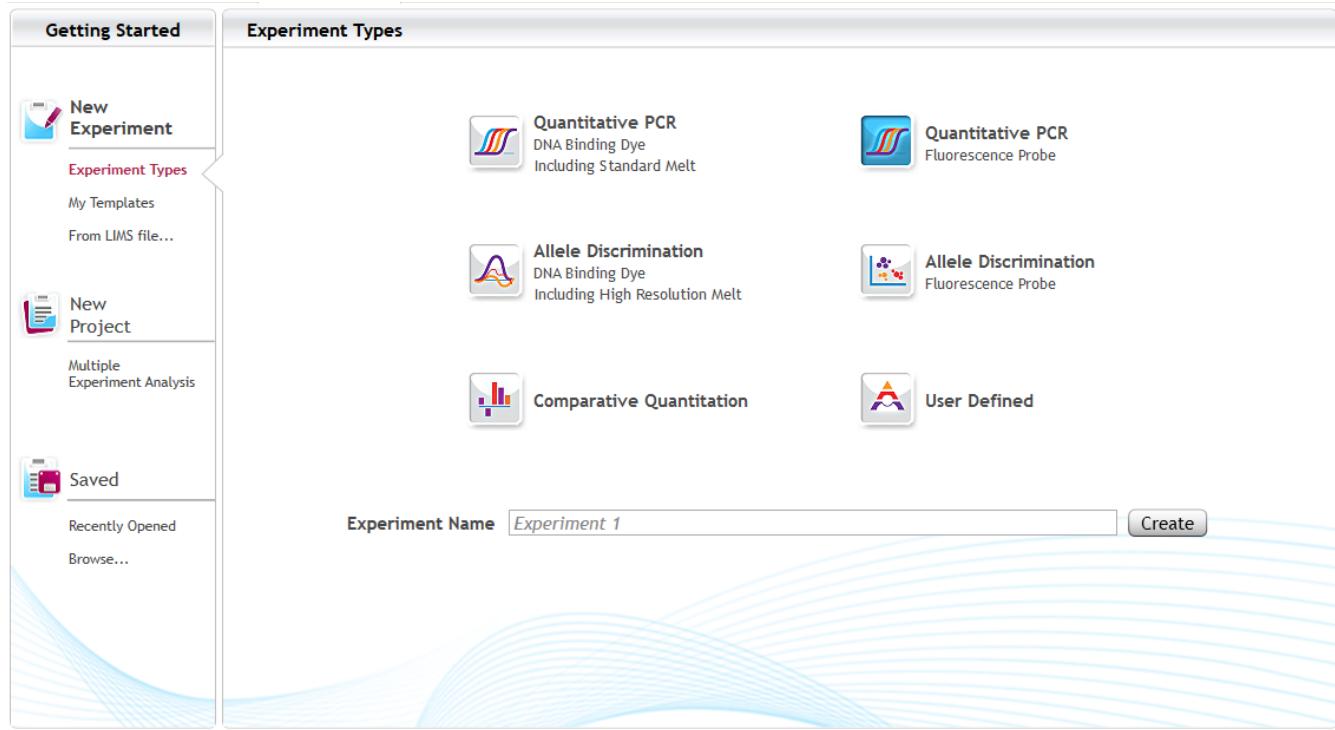
- Consulter « **Créer et configurer l'expérience Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR (obligatoire si les fichiers de protocole et de plaque enregistrés n'ont pas encore été créés)** » à la page 34 si vous n'avez pas sauvegardé les fichiers de protocole et de plaque avec les paramètres nécessaires.
- Si vous avez sauvegardé les fichiers de protocole et de plaque, consulter « **Créer l'expérience Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR à partir de fichiers de protocoles et de plaques sauvegardés** » à la page 40.

## Créer et configurer l'expérience AriaMx/AriaDx (obligatoire si un modèle n'a pas encore été créé)

Si un modèle pour l'expérience existe déjà, consulter « **Créer l'expérience AriaMx/AriaDx à partir du modèle sauvegardé** » à la page 27.

## Étape 1. Créer l'expérience

- 1 Depuis le PC connecté à l'instrument, ouvrir l'application logicielle Aria sur l'écran Getting Started.
- 2 Sous **New Experiment**, cliquer sur **Experiment Types** (si ce n'est pas déjà sélectionné).
- 3 Au centre de l'écran, sélectionner **Quantitative PCR, Fluorescence Probe**, comme indiqué à la **Figure 2**.



**Figure 2** Écran Getting Started d'Aria – **Quantitative PCR, Fluorescence Probe** sélectionné

- 4 Saisir un nom pour l'expérience dans le champ Experiment Name et cliquer sur **Create**.

La nouvelle expérience s'ouvre sur l'écran Plate Setup. Tous les puits de la carte des plaques sont sélectionnés par défaut.

*La sélection de l'ensemble des 96 puits est appropriée si tous les puits de la plaque comprennent une réaction de qRT-PCR. Si l'un des puits de la plaque est vide, désélectionner ces puits à cette étape.*

## Étape 2. Attribuer les types de puits et les noms de puits

- 5 Dans le panneau Properties sur le côté droit de l'écran, développer la liste déroulante **Well type** et sélectionner **Unknown**.

Tous les puits sont marqués comme Unknown sur la carte des plaques.
- 6 Assigner le puits A12 comme contrôle sans modèle (NTC).
  - a Cliquer sur le puits A12 sur la carte des plaques pour sélectionner ce puits individuel.
  - b Dans le panneau Properties sur le côté droit de l'écran, développer la liste déroulante **Well type** et sélectionner **NTC**.

Le puits A12 est marqué comme NTC dans la carte des plaques, tandis que tous les autres puits restent affectés au type de puits Unknown.

**7** Sur la carte des plaques, sélectionner à nouveau tous les puits.

En cliquant sur la case à cocher dans le coin supérieur gauche de la carte des plaques, tous les puits sont sélectionnés.

La configuration de la plaque apparaît maintenant comme indiqué à la **Figure 3**.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unknown	NTC										
B	Unknown											
C	Unknown											
D	Unknown											
E	Unknown											
F	Unknown											
G	Unknown											
H	Unknown											

**Figure 3** Assignations des types de puits sur l'écran Plate Setup d'Aria

**8** Attribuer des noms de puits aux puits de contrôle et, si vous le souhaitez, aux puits utilisés pour les échantillons de test. Les noms des puits à attribuer aux puits de contrôle sont indiqués dans le **Tableau 7**. Vous pouvez attribuer des noms de puits manuellement ou en important une feuille de calcul Excel ou un fichier texte délimité par des virgules qui énumère les ID de puits à côté des noms de puits à attribuer.

- Pour attribuer les noms de puits manuellement, changer le paramètre d'affichage de **Type** à **Name**. Sélectionner le(s) puits sur la plaque, puis saisir le nom du (des) puits sélectionné(s) dans le champ **Well Name**.
- Pour attribuer des noms de puits à partir d'un fichier Excel ou texte, cliquer avec le bouton droit de la souris sur la carte des plaques et sélectionner **Import Well Name**. Dans la boîte de dialogue qui s'ouvre, sélectionner le fichier Excel ou texte. Consulter le système d'aide Aria pour connaître les exigences en matière de formatage des fichiers.

**Tableau 7 Attribution de noms de puits pour les puits de contrôle**

Well ID	Well name
A12	NTC
B12	HSC*
H12	Pos

\* Si vous avez plus d'un échantillon de contrôle d'échantillon humain qui doit être inclus sur la plaque, utiliser des puits supplémentaires dans la colonne 12 pour ces réactions et nommer les puits en conséquence (par exemple, HSC1, HSC2, etc.).

### Étape 3. Attribuer des colorants et des cibles

**9** Dans le panneau Properties, sous **Add Dyes**, cocher les cases FAM, HEX et Cy5.

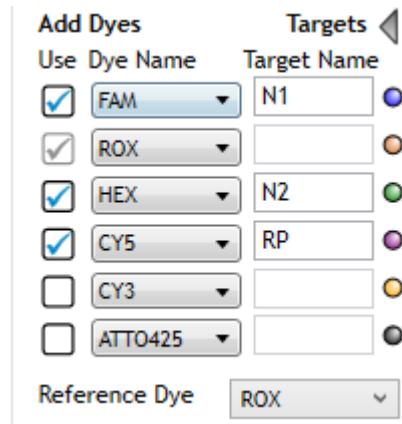
Des points de couleur pour chacun des colorants marqués apparaissent dans tous les puits de la carte des plaques.

**10** Dans la liste déroulante Reference Dye, sélectionner **ROX**.

Un point de couleur marqué « R » apparaît dans tous les puits de la carte des plaques.

**11** Cliquer sur la flèche ➤ à côté de **Targets**.

**12** Dans les champs Target Name qui apparaissent, saisir les noms des cibles selon la **Figure 4**.



**Figure 4** Assignation des colorants et des cibles sur l'écran Plate Setup d'Aria

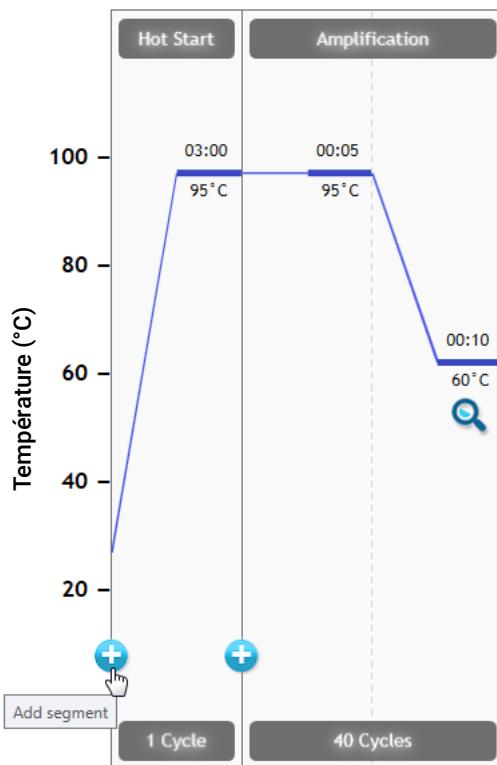
### Étape 4. Configurer le profil thermique

**13** Dans la partie gauche de l'écran, sous **Set Up**, cliquer sur **Thermal Profile**.

L'écran Thermal Profile s'ouvre et affiche le profil thermique par défaut.

**14** Ajouter un segment RT au début du programme de cycle.

**a** Sur l'écran, placer le curseur sur le segment Hot Start. Cliquer sur l'icône + (comme indiqué à la **Figure 5**) qui apparaît sur le côté gauche du segment Hot Start.

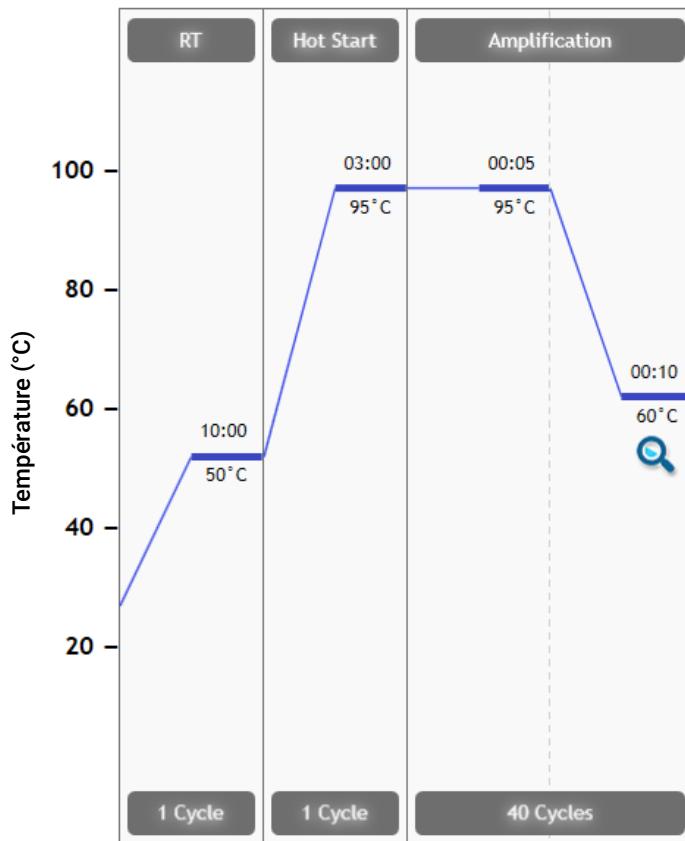


**Figure 5** Ajout d'un nouveau segment sur l'écran Thermal Profile d'Aria

Le programme ouvre un espace réservé pour le nouveau segment, en indiquant les types de segments disponibles.

- b** Dans le segment de l'espace réservé, cliquer sur **RT**.

Le profil thermique apparaît maintenant comme indiqué à la **Figure 6**.



**Figure 6** Profil thermique sur l'écran Thermal Profile d'Aria

**15** Veiller à ce que le profil thermique sur votre écran corresponde au programme de cycle thermique indiqué dans le **Tableau 8**.

**Tableau 8** Programme de cycle thermique pour l'AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System

Numéro du segment	Nombre de cycles	Durée	Température
1	1	10 minutes	50 °C
2	1	3 minutes	95 °C
3	40	5 secondes	95 °C
		10 secondes	60 °C

#### Étape 5. Enregistrer l'expérience comme modèle

**16** Cliquer sur **File > Save As Template**.

La boîte de dialogue Save as s'affiche. Le type de fichier est défini comme **AriaMx Template Files** (extension de fichier *amxt*) ou **AriaDx Template Files** (extension de fichier *adxt*).

**17** Sélectionner un dossier pour le nouveau modèle.

**18** Dans le champ **File Name**, saisir **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR**.

**19** Cliquer sur **Save**.

La boîte de dialogue se ferme et le programme enregistre le nouveau fichier modèle dans le dossier désigné.

Pour les dosages futurs, utiliser le modèle sauvegardé pour créer et configurer l'expérience qRT-PCR comme décrit dans « **Créer l'expérience AriaMx/AriaDx à partir du modèle sauvegardé** ».

À ce stade, aller directement à « **Préparer les réactions de qRT-PCR** » à la page 41.

## Créer l'expérience AriaMx/AriaDx à partir du modèle sauvegardé

Si un modèle de l'expérience avec la configuration de plaque et le profil thermique nécessaires n'a pas été créé, consulter « **Créer et configurer l'expérience AriaMx/AriaDx (obligatoire si un modèle n'a pas encore été créé)** » à la page 21.

- 1** Depuis le PC connecté à l'instrument, ouvrir l'application logicielle Aria sur l'écran Getting Started.
- 2** Sous **New Experiment**, cliquer sur **My Templates**.
- 3** Dans le champ Experiment Name, saisir un nom pour la nouvelle expérience.
- 4** Sélectionner le modèle **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR** et créer l'expérience.
  - Si le modèle se trouve dans le dossier par défaut, cliquer directement sur le modèle pour le sélectionner, puis cliquer sur **Create** (ou double-cliquer directement sur le modèle). Le programme crée la nouvelle expérience et l'ouvre à l'écran Plate Setup.
  - Si le modèle ne se trouve pas dans le dossier actuellement sélectionné, cliquer sur l'icône **Browse to Template** (ci-dessous) pour ouvrir la fenêtre du navigateur. Naviguer jusqu'au dossier contenant le fichier modèle **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR**. Sélectionner le fichier et cliquer sur **Open**. Le programme crée la nouvelle expérience et l'ouvre à l'écran Plate Setup.



À ce stade, aller directement à « **Préparer les réactions de qRT-PCR** » à la page 41.

## Créer et configurer l'expérience ABI 7500 Fast (obligatoire si un modèle n'a pas encore été créé)

Si un modèle pour l'expérience existe déjà, consulter « **Créer l'expérience ABI 7500 Fast à partir du modèle sauvegardé** » à la page 33.

### Étape 1. Créer l'expérience

- 1** Allumer l'ABI 7500 Fast instrument.
- 2** Depuis le PC connecté à l'instrument, ouvrir l'application logicielle du 7500 System.
- 3** Sur l'écran Home, sous **Set Up**, cliquer sur **Advanced Setup**.

L'écran Experiment s'ouvre.

- 4 Dans **Experiment Menu**, à gauche de l'écran, sous **Setup**, cliquer sur **Experiment Properties** (si ce n'est pas déjà sélectionné).

Les paramètres Experiment Properties sont affichés au centre de l'écran.

- 5 Répondre aux questions à l'écran en utilisant les sélections et les entrées indiquées dans le **Tableau 9**.

**Tableau 9 Paramètres Experiment Properties**

Question	Sélections/entrées
How do you want to identify this experiment? (Comment voulez-vous identifier cette expérience ?)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Experience Name (Nom de l'expérience) : entrer un nom unique pour l'expérience</li> <li>• Barcode (Code-barres) : laisser vide</li> <li>• User Name (Nom d'utilisateur) : entrer votre nom</li> <li>• Comments (Commentaires) : entrer les commentaires souhaités ou laisser vide</li> </ul>
Which instrument are you using to run the experiment? (Quel instrument utilisez-vous pour mener l'expérience ?)	7500 Fast (96 Wells) (7500 Fast [96 puits])
What type of experiment do you want to set up? (Quel type d'expérience souhaitez-vous configurer ?)	Quantification – Standard Curve (Quantification – Courbe standard)
Which reagents do you want to use to detect the target sequence? (Quels réactifs voulez-vous utiliser pour détecter la séquence cible ?)	TaqMan® Reagents (Réactifs TaqMan®)
Which ramp speed to you want to use in the instrument run? (Quelle vitesse de rampe souhaitez-vous utiliser dans le cycle de l'instrument ?)	Fast (Rapide)

## Étape 2. Définir les cibles et les échantillons

- 6 Dans **Experiment Menu**, à gauche de l'écran, sous **Setup**, cliquer sur **Plate Setup**. Veiller à ce que l'onglet **Define Targets and Samples** soit sélectionné en haut.

Les outils permettant de définir les cibles et les échantillons sont affichés au centre de l'écran.

- 7 Dans le tableau Define Targets, créer des cibles pour N1, N2 et RP comme indiqué à la **Figure 7**. Cliquer sur **Add New Target** pour ajouter une ligne au tableau selon les besoins.

Pour la sélection du **Quencher**, sélectionner **NFQ-MGB** pour toutes les cibles. Pour la sélection de **Color**, utiliser la couleur par défaut ou sélectionner la couleur souhaitée.

Define Targets			
<a href="#">Add New Target</a> <a href="#">Add Saved Target</a> <a href="#">Save Target</a> <a href="#">Delete Target</a>			
Target Name	Reporter	Quencher	Color
N1	FAM	NFQ-MGB	<span style="background-color: blue;"></span>
N2	VIC	NFQ-MGB	<span style="background-color: green;"></span>
RP	CY5	NFQ-MGB	<span style="background-color: magenta;"></span>

**Figure 7** Définitions des cibles sur l'écran Plate Setup du logiciel 7500

- 8** Dans le tableau Define Samples, créer des noms d'échantillons comme indiqué à la **Figure 8**. Cliquer sur **Add New Sample** pour ajouter une ligne au tableau selon les besoins.

Les trois échantillons sont le contrôle d'échantillon humain (**HSC**), le contrôle sans modèle (**NTC**) et le contrôle positif (**Pos**) avec le contrôle d'ARN positif synthétique du SARS-CoV-2. Noter que les échantillons de test ne reçoivent pas de nom d'échantillon.

Pour la sélection de **Color**, utiliser la couleur par défaut ou sélectionner la couleur souhaitée.

Define Samples	
<a href="#">Add New Sample</a> <a href="#">Add Saved Sample</a> <a href="#">Save Sample</a> <a href="#">Delete Sample</a>	
Sample Name	Color
HSC	<span style="background-color: blue;"></span>
NTC	<span style="background-color: cyan;"></span>
Pos	<span style="background-color: yellow;"></span>

**Figure 8** Exemples de définitions sur l'écran Plate Setup du logiciel 7500

### Étape 3. Attribuer des cibles et des tâches

- 9** En haut de l'écran, cliquer sur l'onglet **Assign Targets and Samples**. Veiller à ce que l'onglet **View Plate Layout** est sélectionné.

L'écran affiche une carte de la plaque de 96 puits.

- 10** Dans la carte des plaques, sélectionner les 96 puits.

Les puits sélectionnés sont surlignés en bleu avec un ovale blanc au centre.

*La sélection des 96 puits est appropriée si tous les puits de la plaque comprennent une réaction de qRT-PCR. Si l'un des puits de la plaque est vide, ne pas le sélectionner à cette étape.*

- 11** Dans le tableau sous **Assign target(s) to the selected wells**, cocher les trois cases de la colonne **Assign** pour indiquer que les trois cibles seront surveillées et signalées dans tous les puits. Dans la colonne **Task**, veiller à ce que « U » soit sélectionné pour les trois cibles. Voir la **Figure 9**.

La carte des plaques affiche un symbole pour chaque cible dans les 96 puits.

### Assign target(s) to the selected wells.

Assign	Target	Task	Quantity
<input checked="" type="checkbox"/>	N1		
<input checked="" type="checkbox"/>	N2		
<input checked="" type="checkbox"/>	RP		

**Figure 9** Affectations des cibles dans l'onglet View Plate Layout du logiciel 7500

**12** Modifier la tâche assignée au puits de contrôle sans modèle.

- Dans la carte des plaques, sélectionner le puits A12.
- Dans le tableau sous **Assign target(s) to the selected wells**, modifier la sélection dans la colonne Task en « N » pour les trois cibles. Veiller à ce que les cases à cocher dans la colonne Assign restent cochées.

La carte des plaques apparaît maintenant telle qu'elle est affichée à la **Figure 10**.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**Figure 10** Carte des plaques sur l'écran Plate Setup du 7500 System

### Étape 4. Attribuer des échantillons de contrôle

**13** Attribuer le contrôle sans modèle au puits A12.

- Sélectionner le puits A12 sur la carte des plaques.
- Dans le tableau sous **Assign sample(s) to the selected wells**, marquer NTC.

Le nom de l'échantillon NTC est affiché dans le(s) puits sélectionné(s).

**14** Attribuer l'échantillon de contrôle des échantillons humains au puits B12.

- a Sélectionner le puits B12 sur la carte des plaques.

Si vous avez plus d'un échantillon de contrôle des échantillons humains qui doit être inclus sur la plaque, sélectionner le nombre nécessaire de puits supplémentaires dans la colonne 12 de la carte des plaques.

- b Dans le tableau sous **Assign sample(s) to the selected wells**, marquer **HSC**.

Le nom de l'échantillon HSC est affiché dans le(s) puits sélectionné(s).

**15** Attribuer l'échantillon de contrôle d'ARN positif synthétique pour le SARS-CoV-2 au puits H12.

- a Sélectionner le puits H12 sur la carte des plaques.

- b Dans le tableau sous **Assign sample(s) to the selected wells**, marquer **Pos**.

Le nom de l'échantillon Pos est affiché dans le puits sélectionné.

### Étape 5. Attribuer le colorant de référence

**16** Dans le tableau sous **Select the dye to use as the passive reference**, sélectionner **ROX**.

### Étape 6. Configurer la méthode de cycle

**17** Dans **Experiment Menu**, à gauche de l'écran, sous **Setup**, cliquer sur **Run Method**. Cliquer sur l'onglet **Tabular View** en haut de la page.

Les outils permettant de définir le volume de réaction et le profil thermique sont affichés au centre de l'écran.

**18** Veiller à ce que le champ **Reaction Volume Per Well** soit fixé à 20  $\mu$ L. Si ce n'est pas le cas, taper **20** dans le champ.

**19** Ajuster le profil thermique pour qu'il corresponde à celui indiqué à la **Figure 11**. Les paramètres sont également résumés dans le **Tableau 10**.

Si vous devez ajouter une nouvelle étape de maintien au début du profil thermique pour l'étape de transcription inverse à 50 °C, suivre les étapes ci-dessous.

- a Sélectionner l'étape la plus à gauche sur l'image du profil thermique.

- b Cliquer sur **Add Stage > Holding**.

Une nouvelle étape de maintien est ajoutée au début du profil thermique. Ajuster la température et la durée pour qu'elles correspondent à celles de la **Figure 11**.

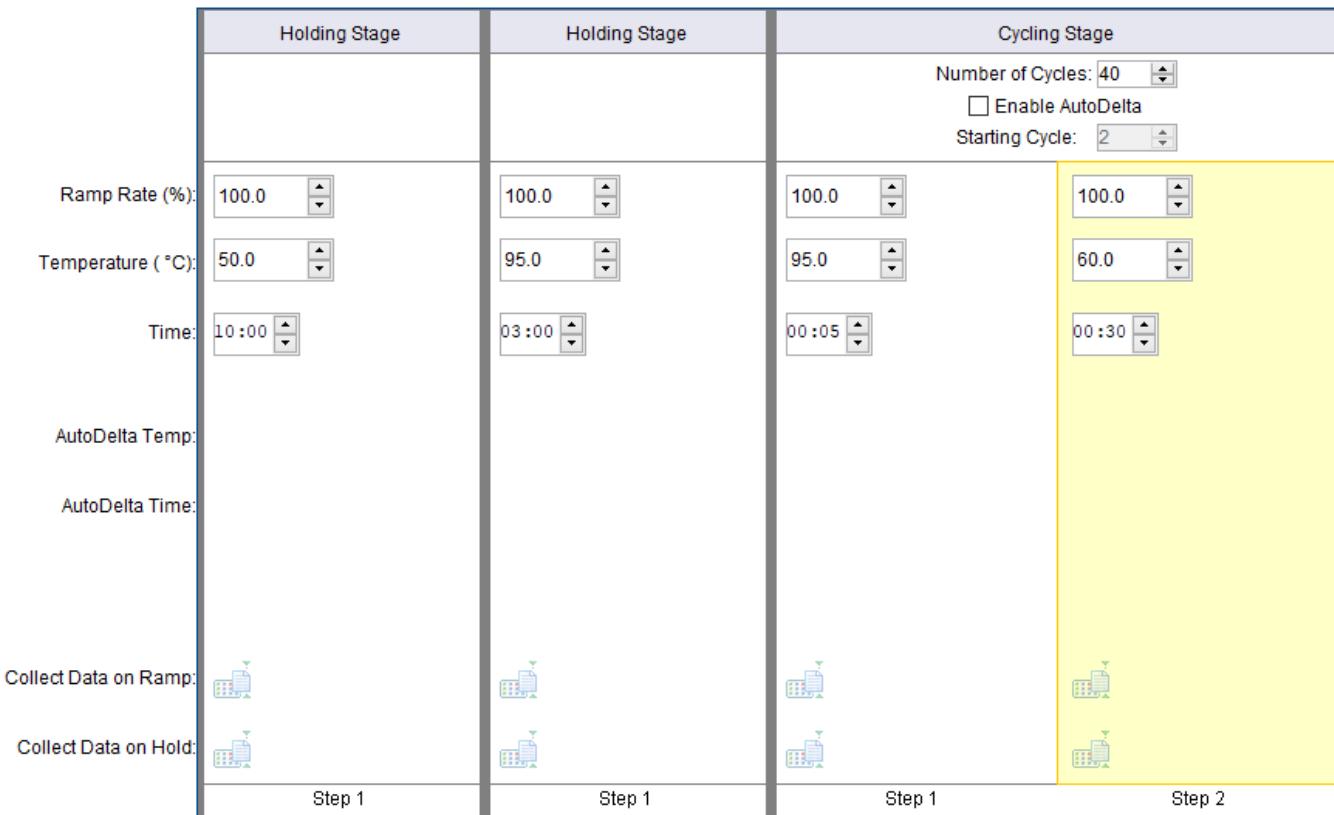


Figure 11 Profil thermique sur l'écran Run Method du logiciel 7500

Tableau 10 Paramètres du profil thermique pour le 7500 Fast Real Time PCR Instrument

Numéro du segment	Nombre de cycles	Durée	Température
1	1	10 minutes	50 °C
2	1	3 minutes	95 °C
3	40	5 secondes	95 °C
		30 secondes	60 °C

### Étape 7. Enregistrer l'expérience

- 20 En haut de l'écran, cliquer sur la flèche vers le bas à côté du bouton **Save** pour développer le menu des options d'enregistrement.
- 21 Sélectionner **Save As** dans le menu.
  - La boîte de dialogue Save as s'affiche.
- 22 Sélectionner un dossier pour le nouveau fichier d'expérience.
- 23 Dans le champ File Name, saisir le nom de l'expérience.
- 24 Veiller à ce que le type de fichier soit défini sur **Experiment Document Single files (\*.eds)**.
- 25 Cliquer sur **Save**.
  - La boîte de dialogue se ferme et le programme enregistre le fichier de l'expérience dans le dossier désigné.

## Étape 8. Enregistrer l'expérience comme modèle pour une utilisation ultérieure

**26** Cliquer sur la flèche vers le bas à côté du bouton **Save** pour développer le menu des options d'enregistrement.

**27** Sélectionner **Save As Template** dans le menu.

La boîte de dialogue Save As Template s'affiche.

**28** Sélectionner un dossier pour le nouveau modèle.

**29** Dans le champ File Name, saisir **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR**.

**30** Veiller à ce que le type de fichier soit défini sur **Experiment Document Template files (\*.edt)**.

**31** Cliquer sur **Save**.

La boîte de dialogue se ferme et le programme enregistre le nouveau fichier modèle dans le dossier désigné.

Pour les dosages futurs, utiliser le modèle sauvegardé pour créer et configurer l'expérience qRT-PCR comme décrit dans « **Créer l'expérience ABI 7500 Fast à partir du modèle sauvegardé** ».

À ce stade, aller directement à « **Préparer les réactions de qRT-PCR** » à la page 41.

## Créer l'expérience ABI 7500 Fast à partir du modèle sauvegardé

Si un modèle de l'expérience avec la configuration de plaque et le profil thermique nécessaires n'a pas été créé, consulter « **Créer et configurer l'expérience ABI 7500 Fast (obligatoire si un modèle n'a pas encore été créé)** » à la page 27.

### Étape 1. Créer l'expérience

**1** Allumer l'ABI 7500 Fast instrument.

**2** Depuis le PC connecté à l'instrument, ouvrir l'application logicielle du 7500 System.

**3** Sur l'écran Home, sous **Set Up**, cliquer sur **Template**.

La boîte de dialogue Open s'affiche.

**4** Dans la boîte de dialogue, naviguer jusqu'au dossier où le modèle est enregistré.

**5** Double-cliquer directement sur le fichier **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR.edt**.

L'instrument s'initialise.

Le logiciel du 7500 System s'ouvre sur l'écran Experiment et affiche Plate Setup.

### Étape 2. Enregistrer l'expérience

**6** En haut de l'écran, cliquer sur la flèche vers le bas à côté du bouton **Save** pour développer le menu des options d'enregistrement.

**7** Sélectionner **Save As** dans le menu.

La boîte de dialogue Save as s'affiche.

**8** Sélectionner un dossier pour le nouveau fichier d'expérience.

**9** Dans le champ File Name, saisir le nom de l'expérience.

**10** Veiller à ce que le type de fichier soit défini sur **Experiment Document Single files (\*.eds)**.

**11** Cliquer sur **Save**.

La boîte de dialogue se ferme et le programme enregistre le fichier de l'expérience dans le dossier désigné.

À ce stade, aller directement à « **Préparer les réactions de qRT-PCR** » à la page 41.

## Créer et configurer l'expérience Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR (obligatoire si les fichiers de protocole et de plaque enregistrés n'ont pas encore été créés)

Si des fichiers de protocole et de plaque appropriés existent déjà, consulter « **Créer l'expérience Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR à partir de fichiers de protocoles et de plaques sauvegardés** » à la page 40.

### Étape 1. Créer l'expérience

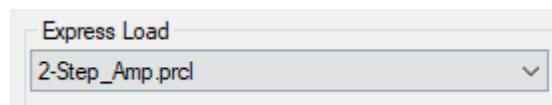
- 1 Allumer le CFX96 Touch Real-Time PCR instrument.
- 2 Depuis le PC connecté à l'instrument, ouvrir l'application Bio-Rad CFX Maestro Software.
- 3 Dans l'assistant de démarrage, régler la liste déroulante **Select instrument** sur **CFX96** puis cliquer sur **User-defined**.

L'écran Run Setup s'ouvre sur l'onglet Protocol. Le profil thermique par défaut est affiché au centre de l'écran.

### Étape 2. Configurer le profil thermique

- 4 Dans la liste déroulante Express Load, sélectionner **2-Step\_Amp.prcl**.

Le profil thermique est mis à jour aux paramètres par défaut d'un protocole d'amplification à 2 étapes adapté à une utilisation avec des sondes fluorescentes.



**Figure 12** Chargement express réglé sur **2-Step\_Amp.prcl** dans l'onglet CFX Maestro Protocol

- 5 Cliquer sur **Edit Selected**.

La fenêtre Protocol Editor s'ouvre.

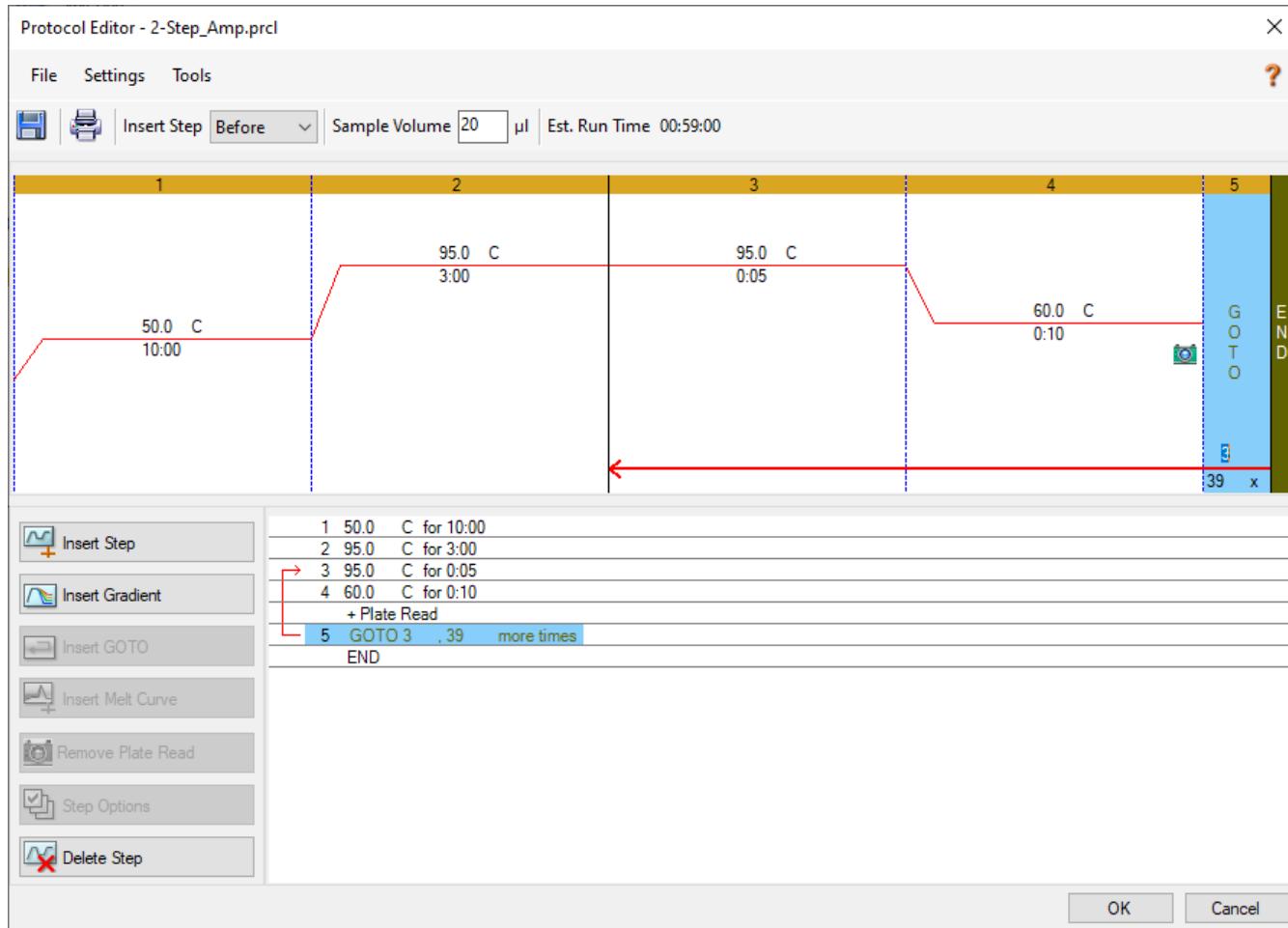
- 6 Dans la fenêtre Protocol Editor, ajouter une étape au début du profil thermique pour la transcription inverse.

- Sélectionner l'étape 1 dans l'image du profil thermique.
- Dans la liste déroulante Insert Step, sélectionner **Before**.
- Cliquer sur **Insert Step**.

Une nouvelle étape 1 est ajoutée avant l'étape sélectionnée.

- Modifier les paramètres de la nouvelle étape à 50 °C pendant 10 minutes.

- 7 Ajuster les autres étapes du profil thermique pour qu'elles correspondent à la **Figure 13**. Les paramètres sont également résumés dans le **Tableau 11**. Veiller à ce que l'étape GOTO (étape 5) soit configurée pour se répéter 39 fois.



**Figure 13** Profil thermique sur la fenêtre CFX Maestro Protocol Editor

**Tableau 11** Programme de cycle thermique pour le Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Instrument

Numéro du segment	Nombre de cycles	Durée	Température
1	1	10 minutes	50 °C
2	1	3 minutes	95 °C
3	40	5 secondes	95 °C
		10 secondes	60 °C

### Étape 3. Enregistrer le fichier de protocole

8 Cliquer sur **Save**.

La boîte de dialogue Save As s'ouvre et vous invite à enregistrer le fichier de protocole pour l'expérience. Le fichier de protocole contient les paramètres de l'onglet Protocol de l'écran Run Setup.

9 Sélectionner un dossier pour le fichier de protocole.

10 Dans le champ File Name, saisir **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Protocol**.

11 Veiller à ce que le type de fichier soit défini sur **Protocol File (\*.prcl)**.

12 Cliquer sur **Save**.

La boîte de dialogue se ferme et le programme enregistre le fichier de protocole dans le dossier désigné.

13 Cliquer sur **OK** pour fermer la fenêtre Protocol Editor.

Pour les dosages futurs, utiliser le fichier de protocole enregistré pour configurer l'onglet Protocol comme décrit dans « **Créer l'expérience Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR à partir de fichiers de protocoles et de plaques sauvegardés** ».

### Étape 4. Sélectionner les fluorophores et attribuer des noms de cibles

14 En bas de l'écran Run Setup, cliquer sur **Next**.

L'écran Run Setup passe à l'onglet Plate. Une image de la carte des plaques s'affiche au centre de l'écran.

15 Veiller à ce que la liste déroulante Scan Mode soit réglée sur **All Channels**.

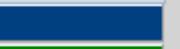
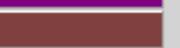
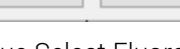
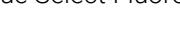
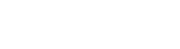
16 Cliquer sur **Edit Selected**.

La fenêtre Plate Editor s'ouvre.

17 Dans la fenêtre Plate Editor, cliquer sur **Select Fluorophores**.

La boîte de dialogue Select fluorophores s'affiche.

18 Dans la boîte de dialogue, cocher les cases des fluorophores **FAM**, **HEX** et **Cy5**. Cocher les cases pour tous les autres fluorophores. Voir la **Figure 14**.

Select Fluorophores				
	Channel	Fluorophore	Selected	Color
	1	FAM	<input checked="" type="checkbox"/>	
		SYBR	<input type="checkbox"/>	
	2	HEX	<input checked="" type="checkbox"/>	
		TET	<input type="checkbox"/>	
		Cal Orange 560	<input type="checkbox"/>	
		Cal Gold 540	<input type="checkbox"/>	
		VIC	<input type="checkbox"/>	
	3	ROX	<input type="checkbox"/>	
		Texas Red	<input type="checkbox"/>	
		Cal Red 610	<input type="checkbox"/>	
		Tex 615	<input type="checkbox"/>	
	4	Cy5	<input checked="" type="checkbox"/>	
		Quasar 670	<input type="checkbox"/>	
	5	Quasar 705	<input type="checkbox"/>	
		Cy5-5	<input type="checkbox"/>	

**Figure 14** Sélections de fluorophores dans la boîte de dialogue Select Fluorophores de CFX Maestro

**19** Cliquer sur **OK**.

La boîte de dialogue Select Fluorophores se ferme. Les trois fluorophores sélectionnés sont répertoriés sur le côté droit de la fenêtre Plate Editor, sous **Target Names**.

**20** Sélectionner tous les puits sur la carte des plaques.

Les puits sélectionnés sont surlignés en bleu.

*La sélection des 96 puits est appropriée si tous les puits de la plaque comprennent une réaction de qRT-PCR. Si l'un des puits de la plaque est vide, ne pas le sélectionner à cette étape.*

**21** Dans la rubrique **Target Names**, veiller à ce que les trois fluorophores soient marqués et que tous les puits affichent le nom des trois fluorophores.

**22** Dans les champs à côté des noms des fluorophores, saisir les noms des cibles des fluorophores comme indiqué à la **Figure 15**. Appuyer sur **Enter** après avoir saisi chaque nom pour appliquer le nom aux puits de la plaque.

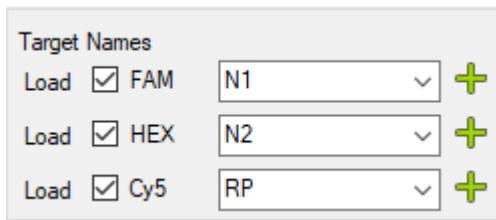


Figure 15 Assignations de noms de cibles dans la fenêtre CFX Maestro Plate Editor

### Étape 5. Attribuer des types d'échantillons et des noms d'échantillons

23 Attribuer le type d'échantillon de contrôle sans modèle.

- Selectionner le puits A12 sur la carte des plaques.
- Dans la liste déroulante Sample Type, sélectionner **NTC**.

L'étiquette **NTC** est affichée en haut du puits A12.

24 Veiller à ce que les puits restants soient affectés au type d'échantillon Unknown, comme indiqué par l'étiquette **Unk** en haut des puits, comme indiqué à la Figure 16.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk	NTC										
	N1											
	N2	RP										
B	Unk											
	N1											
	N2	RP										
C	Unk											
	N1											
	N2	RP										
D	Unk											
	N1											
	N2	RP										
E	Unk											
	N1											
	N2	RP										
F	Unk											
	N1											
	N2	RP										
G	Unk											
	N1											
	N2	RP										
H	Unk											
	N1											
	N2	RP										

Figure 16 Assignations de types d'échantillons dans la fenêtre CFX Maestro Plate Editor

**25** Attribuer un nom à l'échantillon de contrôle des échantillons humains dans le puits B12.

- a** Sélectionner le puits B12 sur la carte des plaques.

Si vous avez plus d'un échantillon de contrôle des échantillons humains qui doit être inclus sur la plaque, sélectionner le nombre nécessaire de puits supplémentaires dans la colonne 12 de la carte des plaques.

- b** Dans le champ sous **Sample Names**, saisir **HSC**, comme indiqué à la **Figure 17**. Appuyer sur la touche **Enter**.

Le nom de l'échantillon HSC est affiché dans le(s) puits sélectionné(s).



**Figure 17** Ajout du nom de l'échantillon HSC dans la fenêtre CFX Maestro Plate Editor

**26** Attribuer un nom à l'échantillon de contrôle d'ARN positif synthétique de SARS-CoV-2 dans le puits H12.

- a** Sélectionner le puits H12 sur la carte des plaques.

- b** Dans le champ sous **Sample Names**, saisir **Pos**. Appuyer sur **Enter**.

Le nom de l'échantillon Pos est affiché dans le puits H12.

## Étape 6. Enregistrer le fichier de plaque

**27** Cliquer sur **Save**.

La boîte de dialogue Save As s'ouvre et vous invite à enregistrer le fichier de la plaque pour l'expérience. Le fichier de plaque contient les paramètres de l'onglet Plate de l'écran Run Setup.

**28** Sélectionner un dossier pour le fichier de plaque.

**29** Dans le champ File Name, saisir le nom **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Plate**.

**30** Veiller à ce que le type de fichier soit défini sur **Plate File (\*.pltd)**.

**31** Cliquer sur **Save**.

La boîte de dialogue se ferme et le programme enregistre le fichier de plaque dans le dossier désigné.

**32** Cliquer sur **OK** pour fermer la fenêtre Plate Editor.

**33** En bas de l'écran Run Setup, cliquer sur **Next**.

L'écran Run Setup passe à l'onglet Start Run.

Pour les dosages futurs, utiliser le fichier de plaque enregistré pour configurer l'onglet Plate comme décrit dans « **Créer l'expérience Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR à partir de fichiers de protocoles et de plaques sauvegardés** ».

À ce stade, aller directement à « **Préparer les réactions de qRT-PCR** » à la page 41.

# Créer l'expérience Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR à partir de fichiers de protocoles et de plaques sauvegardés

Si une expérience avec la configuration de plaque et le profil thermique nécessaires n'a pas été créée, consulter « **Créer et configurer l'expérience Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR (obligatoire si les fichiers de protocole et de plaque enregistrés n'ont pas encore été créés)** » à la page 34.

## Étape 1. Créer l'expérience

- 1 Allumer le CFX96 Touch Real-Time PCR instrument.
- 2 Depuis le PC connecté à l'instrument, ouvrir l'application Bio-Rad CFX Maestro Software.
- 3 Dans l'assistant de démarrage, régler la liste déroulante **Select instrument** sur **CFX96** puis cliquer sur **User-defined**.

L'écran Run Setup s'ouvre sur l'onglet Protocol. Le profil thermique par défaut est affiché au centre de l'écran.

## Étape 2. Charger le fichier de protocole

- 4 Cliquer sur **Select Existing**.
- La boîte de dialogue Select Protocol s'ouvre.
- 5 Dans la boîte de dialogue, accéder au dossier où le fichier **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Protocol.prcl** est enregistré.
  - 6 Double-cliquer directement sur le fichier de protocole.

Les paramètres du fichier de protocole sont chargés dans l'expérience.

## Étape 3. Charger le fichier des plaques

- 7 En bas de l'écran Run Setup, cliquer sur **Next**.
- L'écran Run Setup passe à l'onglet Plate. Une image de la carte des plaques s'affiche au centre de l'écran.
- 8 Cliquer sur **Select Existing**.
- La boîte de dialogue Select Plate s'ouvre.
- 9 Dans la boîte de dialogue, accéder au dossier où le fichier **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Plate.ptld** est enregistré.
  - 10 Double-cliquer directement sur le fichier de la plaque.
- Les paramètres du fichier de la plaque sont chargés dans l'expérience.
- 11 En bas de l'écran Run Setup, cliquer sur **Next**.
- L'écran Run Setup passe à l'onglet Start Run.
- À ce stade, aller directement à « **Préparer les réactions de qRT-PCR** » à la page 41.

# Préparer les réactions de qRT-PCR

## MISE EN GARDE

Préparer la plaque de qRT-PCR juste avant l'utilisation et la conserver sur de la glace ou dans un portoir réfrigérant à tout moment jusqu'à ce qu'elle soit chargée dans l'instrument de PCR en temps réel.

## Étape 1. Préparer le mélange de réactifs qRT-PCR et le placer sur la station de travail pour la pré-PCR

- 1 Décongeler les réactifs qRT-PCR congelés sur de la glace. Consulter le **Tableau 12** pour obtenir la liste des réactifs nécessaires. Conserver 10x SAR-CoV-2 Primer/Probe Mix Dx et Reference Dye Dx à l'abri de la lumière.
- 2 Préparer une dilution au 1:500 du Reference Dye Dx fourni avec de l'eau exempte de nucléase (pour une concentration finale de 30 nM dans les réactions). Garder toutes les solutions contenant le colorant de référence à l'abri de la lumière.  
Le Reference Dye Dx dilué, s'il est stocké dans un tube protégé de la lumière à 4 °C, peut être utilisé dans la journée pour mettre en place des dosages supplémentaires.
- 3 Préparer le mélange de réactifs en combinant les composants du **Tableau 12** dans l'ordre indiqué. Préparer un seul mélange de réactifs pour tous les échantillons (3 contrôles et jusqu'à 93 échantillons de test) en utilisant des multiples de chaque composant énuméré ci-dessous. Conserver le mélange de réactifs sur de la glace et à l'abri de la lumière. Préparer le mélange de réactifs juste avant l'utilisation.
  - Pour 96 réactions, préparer le mélange de réactifs dans un tube de 2 ml.
  - Pour 48 réactions, préparer le mélange de réactifs dans un tube de 1,5 ml.

Pour votre commodité, le **Tableau 12** comprend des volumes pour la préparation d'une réaction, de 48 réactions et de 96 réactions.

**Tableau 12** Mélange de réactifs qRT-PCR

Composant	Volume pour 1 réaction	Volume pour 48 réactions (y compris les surdosages)	Volume pour 96 réactions (y compris les surdosages)
Eau exempte de nucléase	1,5 µl	81 µl	162 µl
2x Brilliant III Ultra-Fast qRT-PCR Master Mix Dx	10 µl	540 µl	1080 µl
10x SAR-CoV-2 Primer/Probe Mix Dx	2 µl	108 µl	216 µl
100 mM DTT Dx	0,2 µl	10,8 µl	21,6 µl
Reference Dye Dx dilué (de l' <b>étape 2</b> )	0,3 µl	16,2 µl	32,4 µl
RT/RNase Block Dx	1 µl	54 µl	108 µl

- 4 Mélanger doucement le mélange de réactifs sur un agitateur à vortex sans créer de bulles, puis centrifuger le tube dans une microcentrifugeuse pendant 5 secondes.

- 5 Distribuer 15  $\mu$ l de mélange de réactifs dans les puits de la plaque de 96 puits en suivant la procédure suivante.
  - a Mettre une bande de 8 tubes propre dans un portoir réfrigérant de 96 puits.
  - b Distribuer 190  $\mu$ l de mélange de réactifs (pour l'analyse de 96 réactions) ou 100  $\mu$ l de mélange de réactifs (pour l'analyse de 48 réactions) dans chacun des 8 tubes de la bande. Si nécessaire, déloger les grosses bulles qui peuvent être présentes au fond des tubes.
  - c Avec une pipette multicanaux, transférer 15  $\mu$ l de mélange de réactifs de la bande de tubes à 8 puits aux colonnes de la plaque de 96 puits. Conserver la plaque sur de la glace ou dans un portoir réfrigérant de 96 puits, à l'abri de la lumière, pendant toute la durée du processus.

**REMARQUE**

S'il y a que 48 réactions, laisser les colonnes 1 à 6 vides.

- 6 Une fois la plaque recouverte, la placer dans la zone du poste de travail pré-PCR désignée pour l'ajout de l'échantillon. Conserver les échantillons mélangés sur de la glace ou sur un portoir réfrigérant.

**Étape 2. Ajouter les échantillons de contrôle et de test à la plaque qRT-PCR dans le poste de travail pré-PCR (zone d'ajout d'échantillons)**

- 7 Diluer le contrôle d'ARN positif synthétique du SARS-CoV-2 dans un stock de travail de 10 copies/ $\mu$ l.
  - a Ajouter 99  $\mu$ l d'eau exempte de nucléase dans un tube propre de 1,5 ml. À ce tube, ajouter 1  $\mu$ l de contrôle d'ARN positif synthétique non dilué du SARS-CoV-2. Bien mélanger dans un agitateur à vortex et centrifuger brièvement dans une microcentrifugeuse.
  - b Ajouter 99  $\mu$ l d'eau exempte de nucléase à un autre tube propre de 1,5 ml. À ce tube, ajouter 1  $\mu$ l du contrôle d'ARN positif synthétique dilué du SARS-CoV-2 préparé à l'**étape a**. Bien mélanger dans un agitateur à vortex et centrifuger brièvement dans une microcentrifugeuse.

Ce tube contient le stock de travail du contrôle d'ARN positif synthétique du SARS-CoV-2, avec une concentration de 10 copies/ $\mu$ l.

Le stock de travail, s'il est stocké à 4 °C, peut être utilisé dans la journée pour mettre en place des dosages supplémentaires. Remettre le stock initial de contrôle d'ARN positif synthétique du SARS-CoV-2 à -80 °C.

**8** Mettre en place les réactions de contrôle comme indiqué à la **Figure 18**.

- Pour le contrôle sans modèle (NTC), ajouter 5 µl d'eau exempte de nucléase au puits A12.
- Pour le contrôle des échantillons humains (HSC), passer brièvement à l'agitateur à vortex l'ARN préparé à partir du contrôle des échantillons humains. Ensuite, ajouter 5 µl de l'ARN au puits B12.

Si vous avez plus d'un échantillon de HSC qui doit être inclus sur la plaque, utiliser des puits supplémentaires dans la colonne 12 comme indiqué lors de la configuration de la plaque dans le logiciel de l'instrument qRT-PCR.

- Pour le contrôle de l'ARN positif synthétique du SARS-CoV-2 (Pos), ajouter 5 µl du contrôle ARN positif synthétique du SARS-CoV-2 dilué au puits H12.

**9** Définir les réactions pour les échantillons de test (S1 à S93) comme indiqué à la **Figure 18**. Changer de gants fréquemment pour éviter la contamination.

- Passer brièvement à l'agitateur à vortex les échantillons d'ARN préparés à partir des échantillons de test. Ensuite, centrifuger dans une microcentrifugeuse pendant 5 secondes.
- Pour chaque échantillon, ajouter 5 µl à un puits de la plaque qRT-PCR. Suivre attentivement l'échantillon qui a été ajouté à chaque puits. Changer d'embout après chaque ajout.
- Si la plaque qRT-PCR doit être scellée avec un opercule adhésif, mélanger les réactions avant de sceller en pipettant brièvement les mélanges de haut en bas sans créer de bulles.

**REMARQUE**

S'il n'y a que 48 réactions, laisser vides les puits de la plaque marqués pour S1 à S48.

**10** Sceller la plaque à l'aide d'un opercule adhésif ou de bandes de bouchons de tube.

**11** Si la plaque est scellée avec des bandes de bouchons de tubes, mélanger brièvement sur un agitateur à vortex. (Ne pas utiliser d'agitateur à vortex pour les plaques scellées avec un opercule adhésif)

**12** Centrifuger brièvement la plaque dans une centrifugeuse à plaques.

**13** Si vous utilisez l'Agilent AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System et que vous avez scellé la plaque avec un opercule adhésif, ajouter un tampon de compression sur la plaque.

**14** Passer directement à l'exécution de la qRT-PCR sur votre système de PCR en temps réel.

- Voir la section « **Effectuer une qRT-PCR sur l'Agilent AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System** » à la page 46
- Voir la section « **Effectuer une qRT-PCR sur l'ABI 7500 Fast Real Time PCR Instrument** » à la page 54
- Voir la section « **Effectuer une qRT-PCR sur le Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System** » à la page 61

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

**Figure 18** Configuration des plaques pour les échantillons de test 1–93 et les échantillons de contrôle (contrôle sans modèle [NTC], contrôle d'échantillon humain [HSC] et contrôle d'ARN positif synthétique Dx [Pos])

## 5

## Instructions pour l'exécution de la qRT-PCR

Effectuer une qRT-PCR sur l'Agilent AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System **46**

Effectuer une qRT-PCR sur l'ABI 7500 Fast Real Time PCR Instrument **54**

Effectuer une qRT-PCR sur le Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System **61**

Ce chapitre contient des instructions sur l'exécution du programme de cycle de qRT-PCR sur l'instrument de PCR en temps réel sélectionné.

# Effectuer une qRT-PCR sur l'Agilent AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System

Cette section décrit la procédure pour effectuer une qRT-PCR sur un Agilent AriaMx ou un AriaDx Real-Time PCR System.

## Exécuter le programme de qRT-PCR sur l'AriaMx/AriaDx system

- 1 Veiller à ce que l'AriaMx/AriaDx instrument soit sous tension.
- 2 Depuis le PC connecté à l'instrument, ouvrir l'expérience que vous avez créée précédemment dans l'application Aria.
- 3 Accéder à l'écran Thermal Profile, à l'écran Run Status ou à l'écran Raw Data Plots.
- 4 Cliquer sur **Run**.

La boîte de dialogue Instrument Explorer s'affiche.

- 5 Localiser l'instrument que vous utiliserez pour l'exécution et cliquer sur **Send Config**. (Voir l'AriaMx ou l'AriaDx Set Up and User Guide pour des instructions sur la recherche et l'ajout d'instruments)
    - Si c'est la première fois que vous vous connectez à un instrument depuis le dernier lancement du programme Aria, la boîte de dialogue Login s'ouvre. Sélectionner votre nom d'utilisateur dans la liste déroulante, saisir votre mot de passe de connexion dans le champ Password et cliquer sur **Login**. Pour vous connecter avec un autre compte d'utilisateur, faire un clic droit sur le nom de l'instrument et cliquer sur **Log off current user**. Vous pouvez ensuite vous connecter en utilisant le compte d'utilisateur souhaité.
    - Si l'expérience n'est pas encore enregistrée, vous serez invité à l'enregistrer avant de poursuivre.
  - 6 Amener votre plaque de réaction à l'instrument et la charger dans le bloc thermique.
  - 7 Sur l'écran tactile de l'instrument, ouvrir l'expérience amorcée sur l'écran Thermal Profile et appuyer sur **Run Experiment**.
- L'instrument lance l'expérience.
- 8 Retourner au programme PC. Le programme vous dirige vers l'écran Run Status, où vous pouvez suivre la progression du cycle.
- Il n'est pas nécessaire de surveiller le cycle. Si vous fermez le logiciel Aria avant la fin du cycle, noter l'endroit où sera enregistré le fichier d'expérience après le cycle.

# Attribuer des paramètres d'analyse de données pour l'expérience AriaMx/AriaDx

## Étape 1. Voir les graphiques d'amplification pour toutes les cibles dans tous les puits

1 Une fois le cycle terminé, ouvrir le fichier d'expérience dans le logiciel Aria.

2 Cliquer sur **Analysis Criteria** dans la partie gauche de l'écran.

L'écran Analysis Criteria s'ouvre, avec les paramètres permettant de spécifier les paramètres d'analyse.

3 Veiller à ce que tous les puits, types de puits et cibles soient sélectionnés pour l'analyse, comme indiqué à la **Figure 19**.

### REMARQUE

Si la plaque contient des puits vides, veiller à ce que ceux-ci soient affectés au type de puits Blank dans l'onglet Plate Setup.

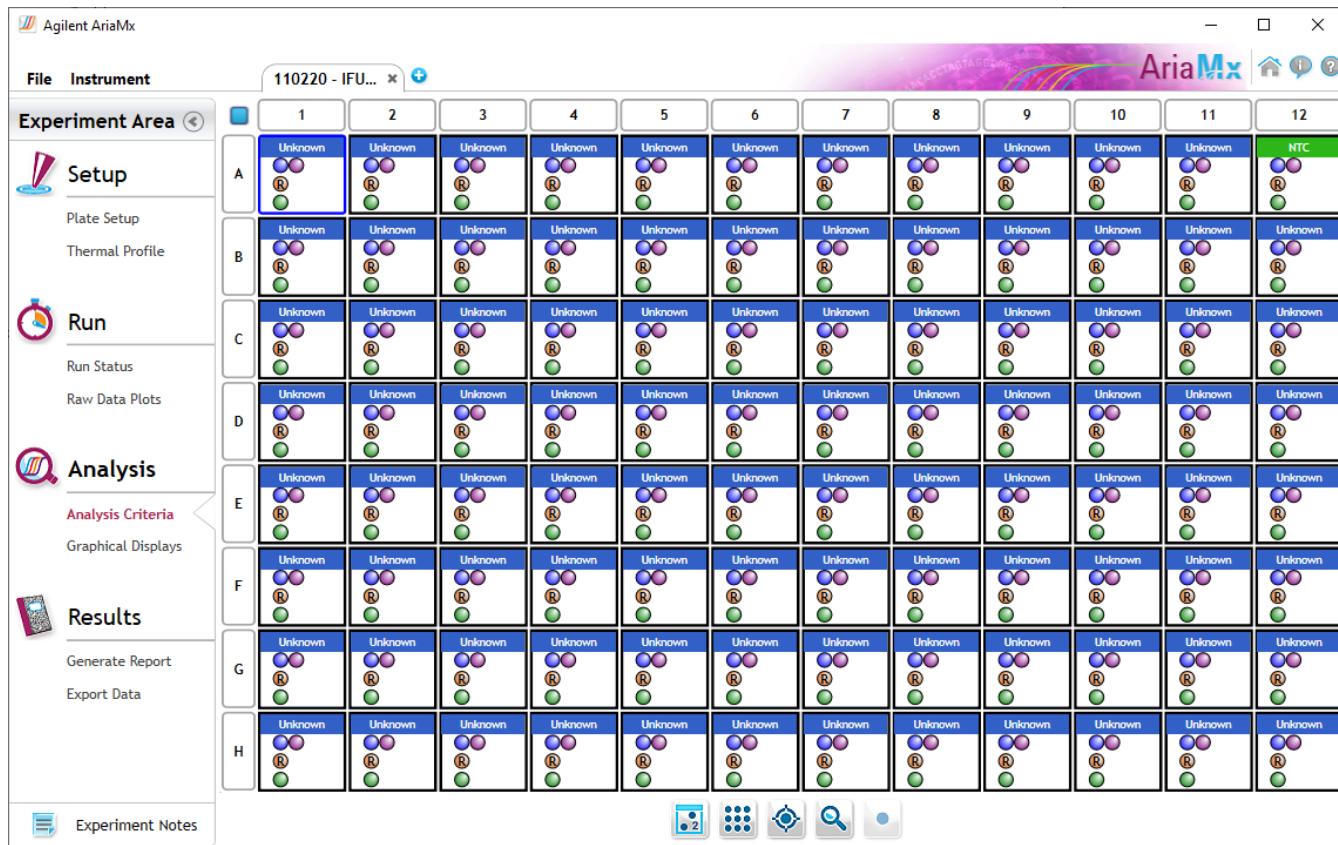


Figure 19 Écran Analysis Criteria d'Aria

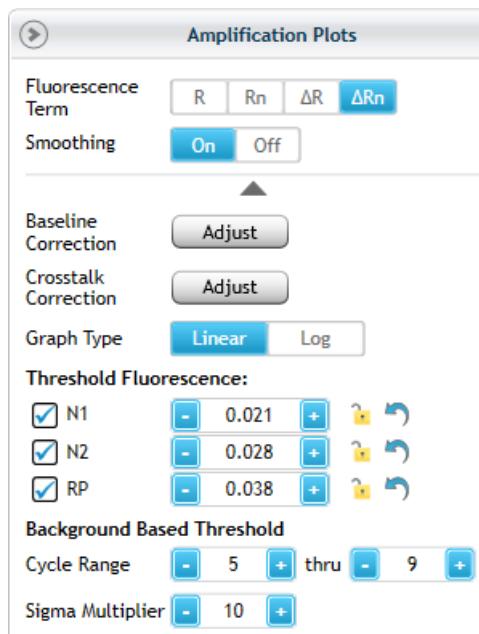
4 Cliquer sur **Graphical Displays** sur le côté gauche de l'écran.

L'écran Graphical Displays s'ouvre. Il présente les données avec des outils permettant de définir les paramètres d'analyse.

- 5 Veiller à ce que l'écran affiche le graphique Amplification Plots et que les paramètres d'analyse par défaut correspondent à ceux indiqués à la **Figure 20**.

Si vous ne voyez pas le panneau complet des paramètres d'analyse comme indiqué à la **Figure 20**, cliquer sur la flèche vers le bas juste sous le paramètre **Smoothing** pour agrandir le panneau.

Noter que les valeurs par défaut du Threshold Fluorescence dans votre expérience seront probablement différentes de celles indiquées à la **Figure 20**. Le logiciel calcule les valeurs par défaut en fonction du niveau de bruit de fluorescence dans la plage du cycle de fond. Par conséquent, les valeurs par défaut varient d'une expérience à l'autre.



**Figure 20** Paramètres par défaut pour les Amplification Plots dans le logiciel Aria (les valeurs Threshold Fluorescence varient selon les expériences)

- 6 Dans **Background Based Threshold**, veiller à ce que la plage de cycles par défaut soit comprise entre 5 et 9.
- 7 Vérifier s'il existe des graphiques d'amplification avec une amplification précoce (c'est-à-dire avant le cycle 9). Exclure de l'analyse tout échantillon ayant subi une amplification précoce et le tester à nouveau à une concentration inférieure.

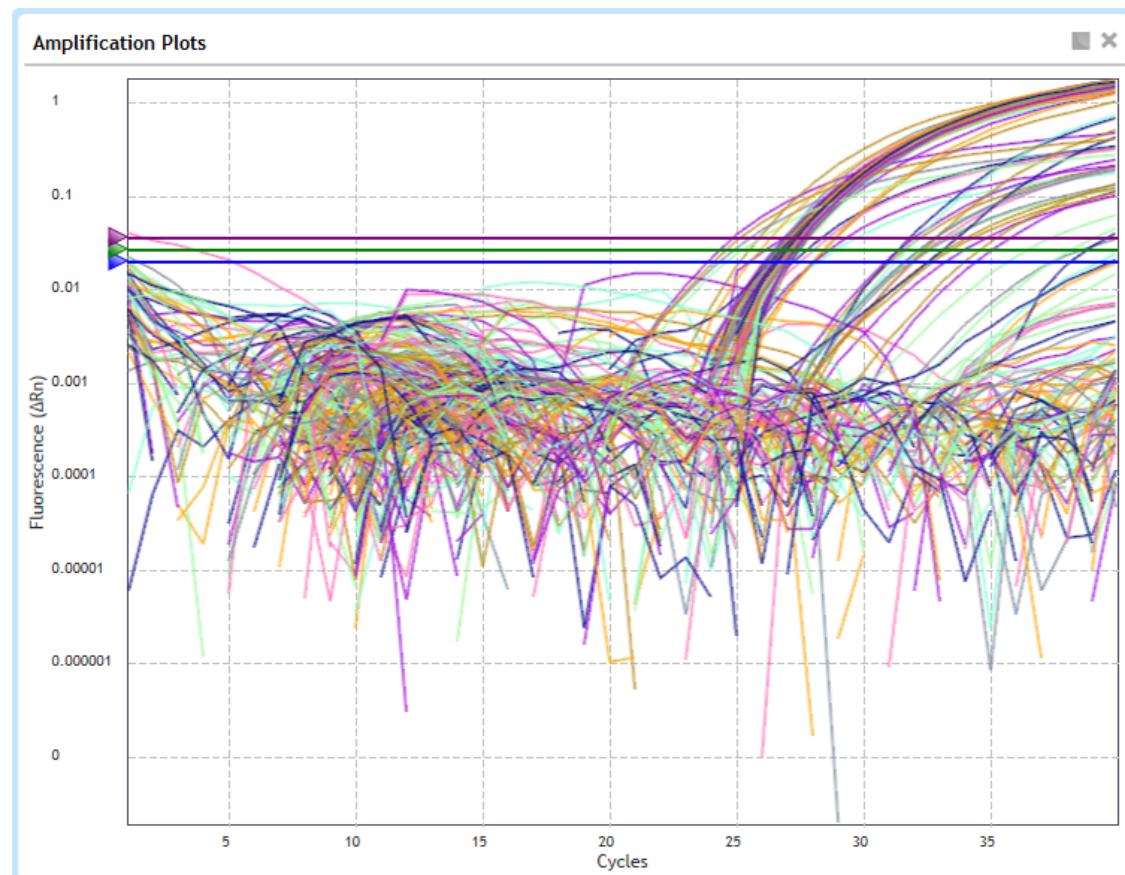
Dans les échantillons de test présentant des concentrations exceptionnellement élevées d'ARN viral, l'amplification des cibles virales peut atteindre des niveaux détectables à un nombre de cycles très précoce (< 9). Dans le cadre des calculs de correction de référence, le logiciel peut interpréter ces signaux d'amplification précoce comme du bruit de fond et ne pas attribuer de valeur Cq aux cibles virales de ces échantillons.

Surveiller la présence de ces échantillons de test en consultant les graphiques d'amplification sans correction de référence (Fluorescence Term R ou Rn). Si certains des échantillons de test montrent des signes d'amplification avant le cycle 9, alors retirer ces puits de l'analyse en les désélectionnant sur l'écran Analysis Criteria. Répéter la réaction de qRT-PCR pour l'échantillon en diluant l'acide nucléique à 1:100 à l'aide du tampon d'élution approprié.

## Étape 2. Évaluer les valeurs seuils

- 8 Dans le paramètre Graph Type, basculer de **Linear** à **Log**. Veiller à ce que le Fluorescence Term soit réglé sur  $\Delta Rn$ .

L'affichage des Amplification Plots en valeurs log permet de mieux visualiser le bruit de fond du signal. La **Figure 21** en montre un exemple. La ligne de seuil pour chaque cible est affichée sous forme de ligne horizontale.



**Figure 21** Aria Amplification Plots à l'échelle logarithmique – seuils cibles affichés sous formes de lignes horizontales

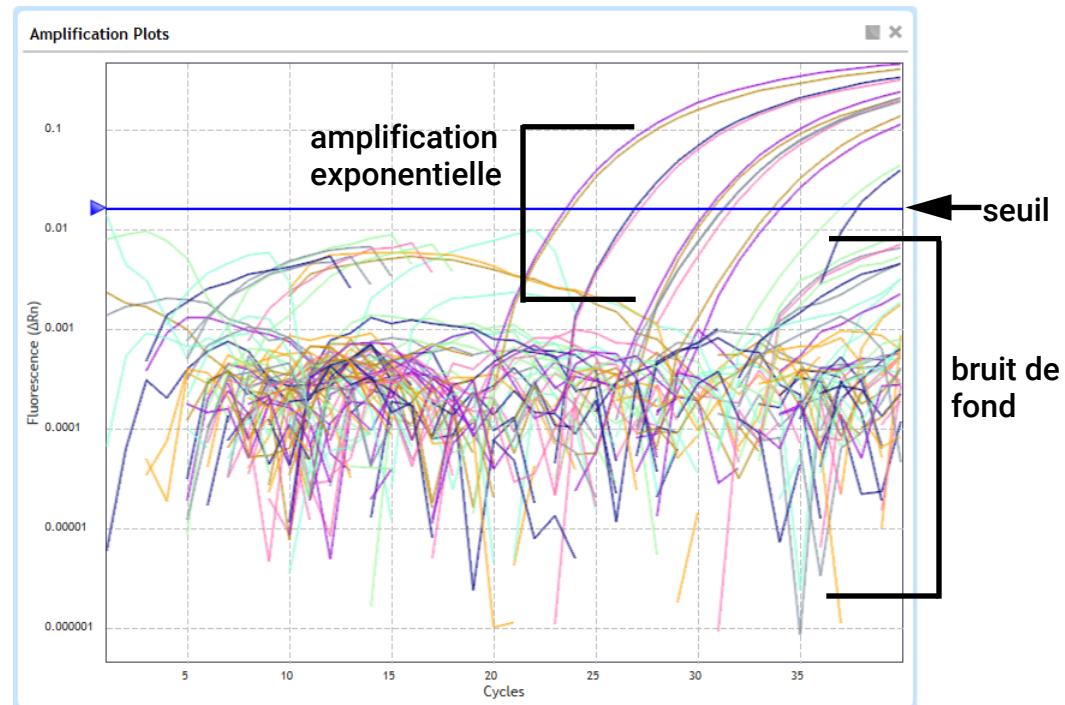
- 9 Évaluer visuellement les graphiques d'amplification et le seuil par défaut de la cible N1.
- Cliquer sur l'icône des cibles d'affichage située sous le graphique.
  - Dans le menu qui s'ouvre, décocher les cases de toutes les autres cibles afin que seule la cible N1 soit affichée dans le graphique Amplification Plots.
  - Déterminer si le seuil est à la fois suffisamment élevé pour être au-dessus du bruit de fond et suffisamment bas pour inclure des graphiques dans la phase d'amplification exponentielle (voir la **Figure 23**). Sur la base de cette détermination, procéder comme indiqué dans le **Tableau 13**.
- 10 Répéter l'**étape 9** pour la cible N2 et encore pour la cible RP.
- 11 Sous **Threshold Fluorescence**, veiller à ce que les trois cibles soient marquées et que les trois valeurs du Threshold Fluorescence soient verrouillées, comme indiqué à la **Figure 22**.

**12** Cliquer sur l'icône des cibles d'affichage située sous le graphique.  Veiller à ce que toutes les cibles soient sélectionnées.

**Threshold Fluorescence:**

<input checked="" type="checkbox"/> N1	<input type="button" value="-"/> 0.021 <input type="button" value="+"/>	 
<input checked="" type="checkbox"/> N2	<input type="button" value="-"/> 0.028 <input type="button" value="+"/>	 
<input checked="" type="checkbox"/> RP	<input type="button" value="-"/> 0.038 <input type="button" value="+"/>	 

**Figure 22** Cibles sélectionnées et valeurs Threshold Fluorescence verrouillées



**Figure 23** Aria Amplification Plots pour la cible N1

**Tableau 13 Vérification du réglage de seuil optimal dans le logiciel Aria**

Position du seuil	Description	Action
Position optimale	Au-dessus du bruit de fond et inclut tous les graphiques en phase d'amplification exponentielle	<ul style="list-style-type: none"> <li>Verrouiller la valeur du Threshold Fluorescence sur le côté droit de l'écran en cliquant sur l'icône de verrouillage.</li> </ul> <p>Lorsque la valeur est verrouillée, l'icône du cadenas est en position fermée. Le verrouillage de la valeur empêche la valeur de changer si l'un des critères d'analyse est modifié.</p>
Trop élevé	Certains graphiques en phase d'amplification exponentielle ne passent pas le seuil	<ul style="list-style-type: none"> <li>Chercher des puits dont le bruit de fond est exceptionnellement élevé. De tels puits aberrants peuvent amener le logiciel à fixer le seuil trop haut.</li> <li>Retourner à l'écran Analysis Criteria pour exclure ce puits de l'analyse. Le logiciel recalculera le seuil une fois que le puits aberrant aura été exclu. Il est également possible d'utiliser la souris pour faire glisser manuellement la ligne de seuil sur le graphique vers une nouvelle position.</li> <li>Vérifier que le nouveau seuil est dans une position optimale et verrouiller la valeur du Threshold Fluorescence comme décrit ci-dessus.</li> <li>Une fois que la nouvelle valeur est verrouillée, retourner à nouveau à l'écran Analysis Criteria pour réintégrer le puits aberrant dans l'analyse.*</li> </ul> <p>* Si le graphique d'amplification du puits aberrant ne montre pas d'amplification exponentielle à un nombre quelconque de cycles, alors veiller à ce que le seuil abaissé n'amène pas le logiciel à attribuer une valeur Cq au puits (en raison du bruit de fond du signal qui franchit le seuil). Si c'est le cas, essayer de modifier d'autres paramètres d'analyse pour ce puits, par exemple en ajustant le paramètre Baseline Correction.</p>
Trop faible	Certains graphiques ne sont pas au-dessus du bruit de fond.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Augmenter le seuil pour qu'il se situe juste au-dessus du niveau de bruit de fond.</li> </ul>

### Étape 3. Vérifier les résultats dans le puits NTC

**13** Dans le tableau des résultats, localiser la réaction du contrôle sans modèle (NTC), située dans le puits A12.

**14** Veiller à ce que la colonne Cq pour les trois cibles indique « No Cq » ou a une valeur Cq > 37,00.

*Si la réaction NTC a une valeur Cq ≤ 37,00 pour l'une des cibles, alors une contamination de l'échantillon peut avoir eu lieu. Invalider le cycle et répéter le dosage en respectant strictement les directives.*

## Exporter les données du logiciel Aria

### Étape 1. Définir et enregistrer les paramètres d'exportation

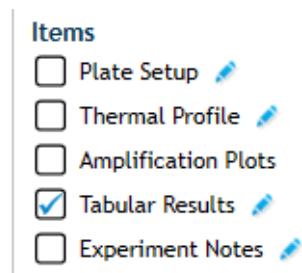
Si les paramètres d'exportation ont déjà été enregistrés, aller directement à l'**« Étape 2. Exporter les données »** à la page 53.

**1** Dans la partie gauche de l'écran, sous **Results**, cliquer sur **Export Data**.

L'écran Export Data s'ouvre.

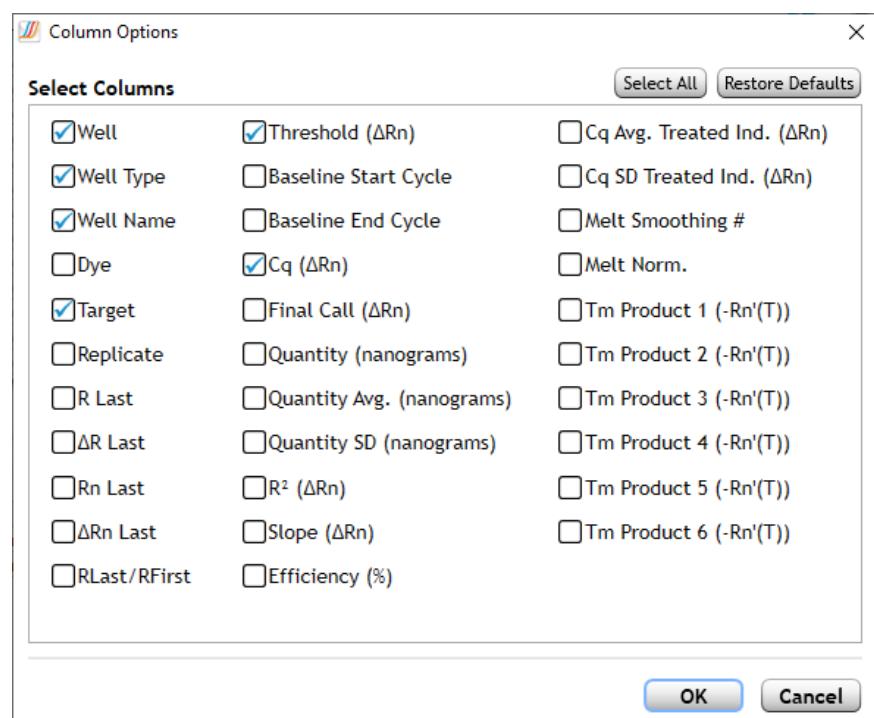
**2** Dans le panneau Export Configuration, sélectionner un type de fichier pour les données exportées, par exemple **Excel**.

- 3 Dans la rubrique **Items**, veiller à ce que la case Tabular Results soit cochée. Décocher les cases pour les autres éléments. Voir la **Figure 24**.



**Figure 24** Écran Export Data du logiciel Aria – Éléments à exporter

- 4 Cliquer sur l'icône en forme de crayon à côté de **Tabular Results** pour personnaliser les colonnes de données à inclure.
- La boîte de dialogue Column Options s'affiche.
- 5 Ajuster les paramètres de manière à ce que les seules colonnes marquées pour l'inclusion soient celles qui figurent à la **Figure 25**.

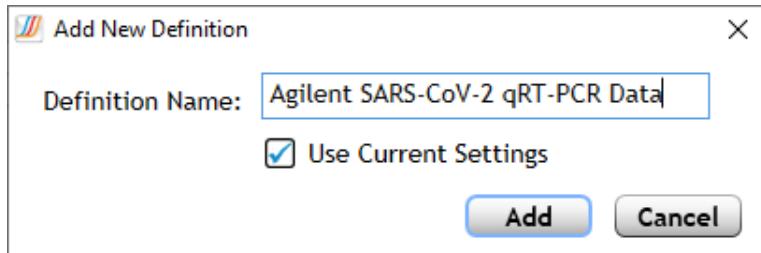


**Figure 25** Boîte de dialogue Colum Options d'Aria

- 6 Cliquer sur **OK** pour appliquer vos changements et fermer la boîte de dialogue.
- 7 Sauvegarder les paramètres d'exportation comme une nouvelle définition.
- a Dans le panneau Export Configuration, développer la liste déroulante Definition.
- b Cliquer sur **Add New**.

La boîte de dialogue Add New Definition s'affiche.

- c Dans le champ Definition Name, saisir **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Data**. Voir la **Figure 26**.
- d Veiller à ce que la case Use Current Settings soit cochée.
- e Cliquer sur **Add**.



**Figure 26** Boîte de dialogue Add New Definition d'Aria

## Étape 2. Exporter les données

- 8 Dans le panneau Export Configuration, veiller à ce que la liste déroulante Definition soit réglée sur **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Data**.
- 9 Cliquer sur **Export Data**.

Le rapport s'ouvre dans l'application par défaut pour le type de fichier sélectionné.

- 10 Examiner les données Cq pour chacun des échantillons et des contrôles de test afin d'interpréter les résultats. Voir la section **Chapitre 6**, « Analyse et résultats ».

# Effectuer une qRT-PCR sur l'ABI 7500 Fast Real Time PCR Instrument

Cette section décrit la procédure à suivre pour effectuer une qRT-PCR sur un Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR Instrument.

## Exécuter le programme de qRT-PCR sur l'ABI 7500 Fast Real Time PCR Instrument

- 1 Veiller à ce que l'ABI 7500 Fast instrument soit sous tension.
- 2 Depuis le PC connecté à l'instrument, ouvrir l'expérience que vous avez créée précédemment dans le logiciel 7500.
- 3 Sur l'instrument, pousser la porte du plateau pour ouvrir le couvercle. Charger votre plaque de réaction dans le bloc thermique de l'instrument.
- 4 Pousser la porte du plateau pour fermer le couvercle.
- 5 Sur le PC, cliquer sur **START RUN**.

L'instrument lance l'expérience.

## Attribuer des paramètres d'analyse de données pour l'expérience ABI 7500 Fast

### Étape 1. Voir les graphiques d'amplification pour toutes les cibles dans tous les puits

- 1 Une fois le cycle terminé, ouvrir l'expérience dans l'application logicielle Design & Analysis.
- 2 En haut de l'écran, cliquer sur l'onglet Quality Check, s'il n'est pas déjà sélectionné. Dans la liste déroulante, veiller à ce que l'option **Amplification Plot** soit sélectionnée.

L'écran affiche les graphiques d'amplification, un tableau des résultats dans chaque puits et un diagramme de la carte des plaques.

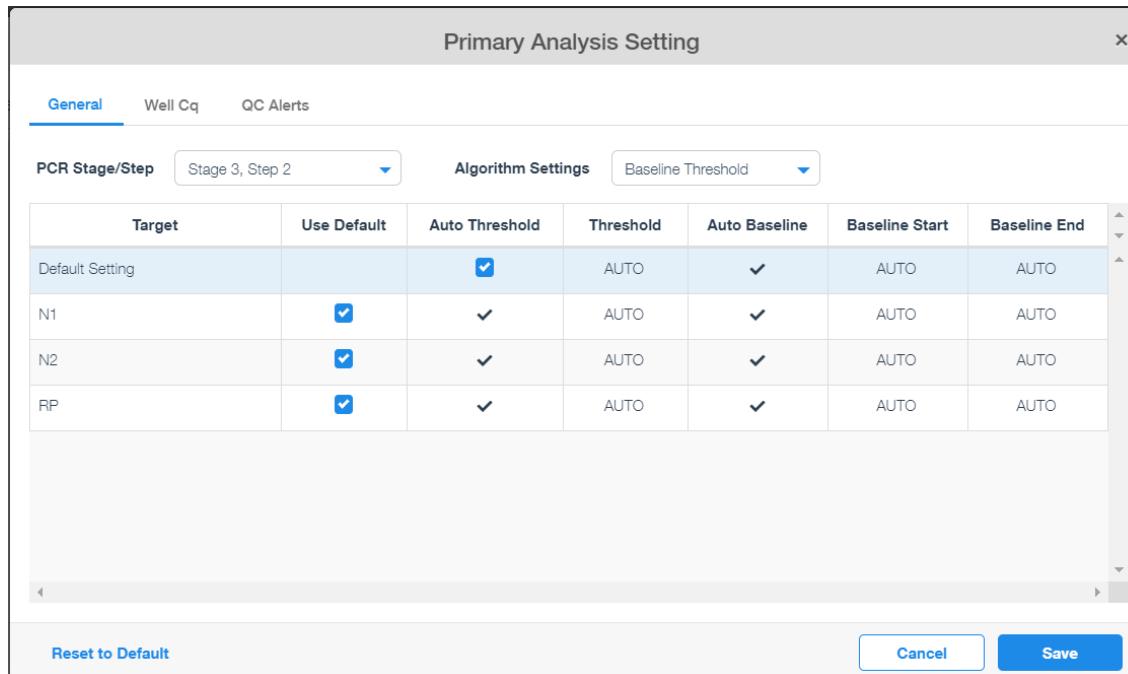
#### REMARQUE

Si la plaque contient des puits vides, omettre toutes les cibles de ces puits de l'analyse et réanalyser.

- 3 Cliquer sur **Actions > Primary Analysis Setting**.

La boîte de dialogue Primary Analysis Settings s'ouvre. Les paramètres par défaut de cette boîte de dialogue sont indiqués à la **Figure 27**.

- 4 Veiller à ce que les paramètres correspondent à ceux indiqués à la **Figure 27**. Si nécessaire, cliquer sur **Reset to Default**.



**Figure 27** Paramètres par défaut dans la boîte de dialogue Primary Analysis Setting de Design & Analysis

**5** Cliquer sur **Save**.

La boîte de dialogue Primary Analysis Setting se ferme.

**6** Veiller à ce que le bouton Analyze ait une coche verte dans le coin. Si ce n'est pas le cas, cliquer sur **Analyze**.

**7** Vérifier s'il existe des graphiques d'amplification avec une amplification précoce (c'est-à-dire avant le cycle 9). Omettre de l'analyse tout échantillon ayant subi une amplification précoce et le tester à nouveau à une concentration inférieure.

Dans les échantillons de test présentant des concentrations exceptionnellement élevées d'ARN viral, l'amplification des cibles virales peut atteindre des niveaux détectables à un nombre de cycles très précoce (< 9). Dans le cadre des calculs de correction de référence, le logiciel peut interpréter ces signaux d'amplification précoce comme du bruit de fond et ne pas attribuer de valeur Cq aux cibles virales de ces échantillons.

Surveiller la présence de ces échantillons en consultant l'Amplification Plot sans correction de référence (fixer **Y Value** sur **Rn**). Si l'un des échantillons de test présente des signes d'amplification avant le cycle 9, alors retirer ces puits de l'analyse en les omettant de l'écran Quality Check. Répéter la réaction de qRT-PCR pour l'échantillon en diluant l'acide nucléique à 1:100 à l'aide du tampon d'élution approprié.

## Étape 2. Évaluer les valeurs seuils

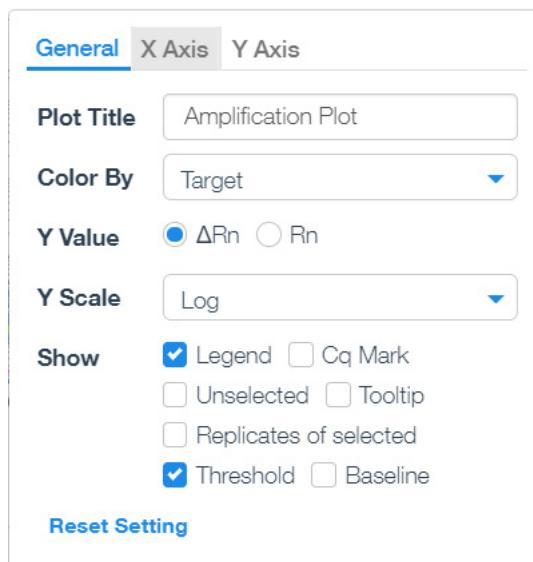
**8** Cliquer sur l'icône Settings juste au-dessus du graphique Amplification Plot

La boîte de dialogue Settings s'ouvre sur l'onglet General.

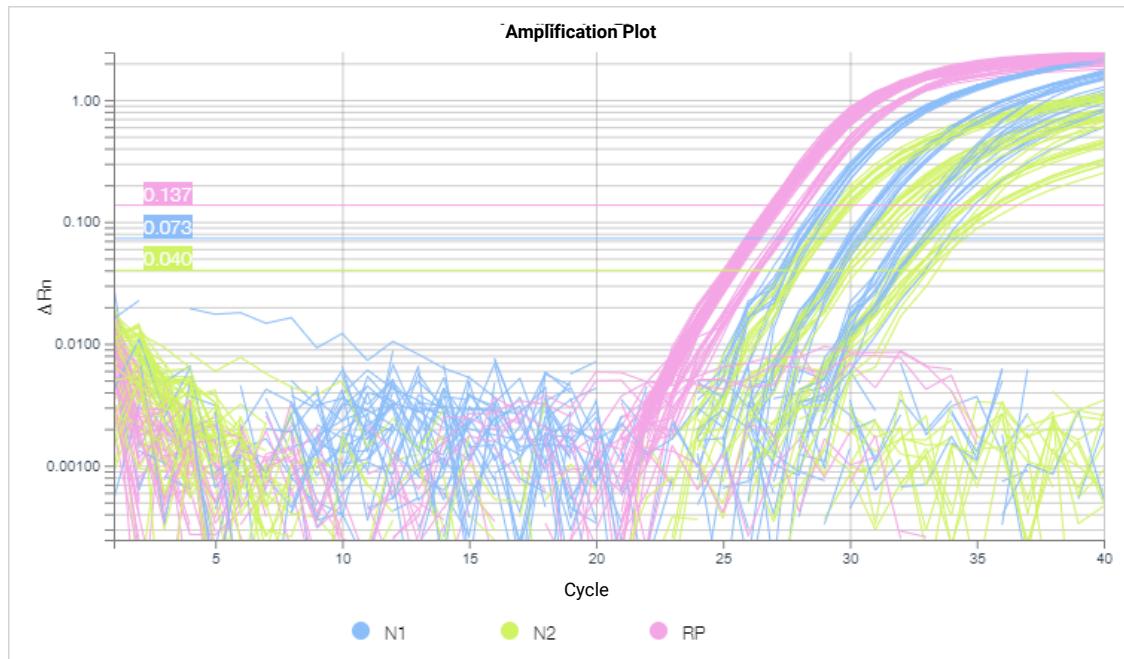
**9** Veiller à ce que le paramètre Y Value soit fixé sur **ΔRn**.

**10** Dans la liste déroulante Y Scale, passer de la sélection **Linear** à **Log**, comme indiqué à la **Figure 28**.

L'affichage des Amplification Plots en valeurs log permet de mieux visualiser le bruit de fond du signal. La **Figure 29** en montre un exemple. La ligne de seuil pour chaque cible est affichée sous forme de ligne horizontale.



**Figure 28** General Settings de Design & Analysis pour Amplification Plot



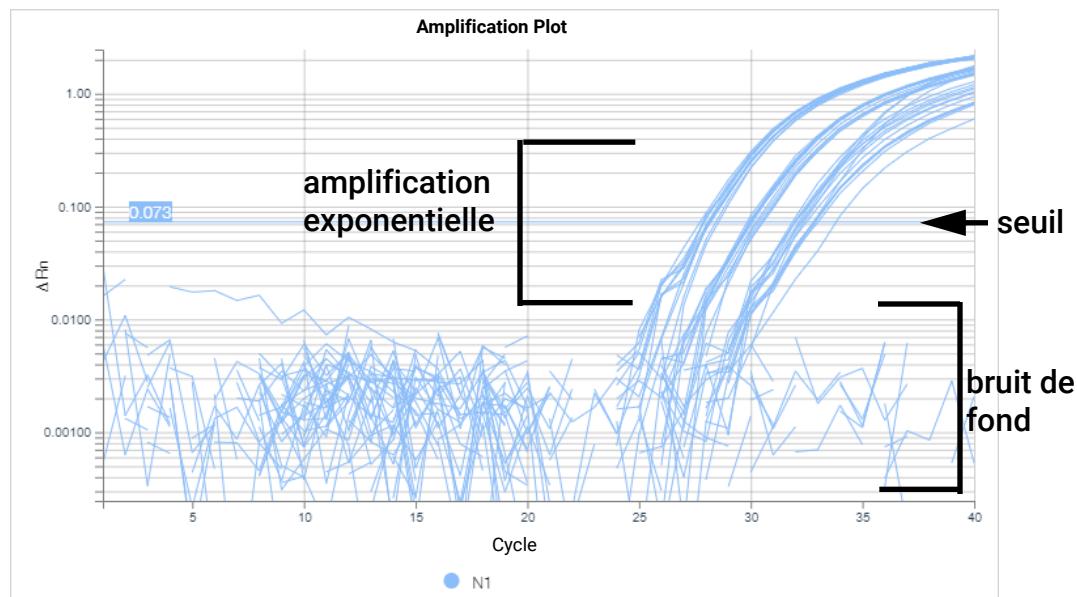
**Figure 29** Amplification Plots de Design & Analysis à l'échelle logarithmique – seuils cibles affichés sous forme de lignes horizontales

**11** Évaluer visuellement les graphiques d'amplification et le seuil par défaut de la cible N1.

- a** Dans la partie gauche de l'écran, développer la liste déroulante Targets.
- b** Sélectionner uniquement la cible N1, puis réduire la liste déroulante.
- c** Déterminer si le seuil est à la fois suffisamment élevé pour être au-dessus du bruit de fond et suffisamment bas pour inclure des graphiques dans la phase d'amplification exponentielle (voir la **Figure 30**). Sur la base de cette détermination, procéder comme indiqué dans le **Tableau 14**.

**12** Répéter l'**étape 11** pour la cible N2 et encore pour la cible RP.

**13** Sur le côté gauche de l'écran, sous **Targets**, cliquer sur **Clear all** pour supprimer le filtrage par cible.



**Figure 30** Amplification Plots de Design & Analysis pour la cible N1

Tableau 14 Vérification du réglage optimal des seuils dans le logiciel Design & Analysis

Position du seuil	Description	Action
Position optimale	Au-dessus du bruit de fond et inclut tous les graphiques en phase d'amplification exponentielle	<ul style="list-style-type: none"> <li>Laisser les seuils à leur valeur actuelle.</li> </ul>
Trop élevé	Certains graphiques en phase d'amplification exponentielle ne passent pas le seuil	<ul style="list-style-type: none"> <li>Chercher des puits dont le bruit de fond est exceptionnellement élevé. De tels puits aberrants peuvent amener le logiciel à fixer le seuil trop haut.</li> <li>Sélectionner le puits aberrant sur la carte des plaques.</li> <li>Dans la barre d'outils située juste au-dessus de la carte des plaques, cliquer sur le bouton comportant trois points. Dans le menu qui s'ouvre, cliquer sur <b>Omit Wells</b>.</li> <li>Cliquer sur <b>Analyze</b>. Le logiciel recalculera le seuil une fois que le puits aberrant aura été exclu. Il est également possible d'utiliser la souris pour faire glisser manuellement la ligne de seuil sur le graphique vers une nouvelle position.</li> <li>Sélectionner tous les puits sur la carte des plaques pour visualiser tous les graphiques d'amplification. Vérifier que le nouveau seuil est dans une position optimale.</li> <li>Cliquer à nouveau sur le bouton avec trois points. Dans le menu qui s'ouvre, cliquer sur <b>Unomit Wells</b> pour réintégrer le puits aberrant dans l'analyse.*</li> </ul> <p>* Si le graphique d'amplification du puits aberrant ne montre pas d'amplification exponentielle à un nombre quelconque de cycles, alors veiller à ce que le seuil abaissé n'amène pas le logiciel à attribuer une valeur Cq au puits (en raison du bruit de fond du signal qui franchit le seuil). Si c'est le cas, essayer de modifier d'autres paramètres d'analyse pour ce puits, par exemple en ajustant les numéros de cycle de la Baseline Start et/ou de la Baseline End.</p>
Trop faible	Certains graphiques ne sont pas au-dessus du bruit de fond.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Augmenter le seuil pour qu'il se situe juste au-dessus du niveau de bruit de fond.</li> </ul>

### Étape 3. Vérifier les résultats dans le puits NTC

14 Dans Well Table, localiser la réaction du contrôle sans modèle (NTC), située dans le puits A12.

15 Veiller à ce que la colonne Cq pour les trois cibles indique « Undetermined » ou a une valeur Cq > 37,00.

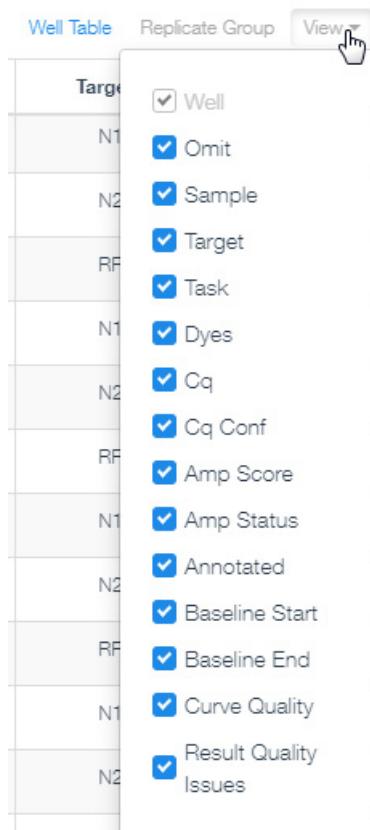
*Si la réaction NTC a une valeur Cq ≤ 37,00 pour l'une des cibles, alors une contamination de l'échantillon peut avoir eu lieu. Invalider le cycle et répéter le dosage en respectant strictement les directives.*

## Exporter les données de Well Table du logiciel Design & Analysis vers un fichier CSV

### Étape 1. Personnaliser les colonnes incluses dans Well Table

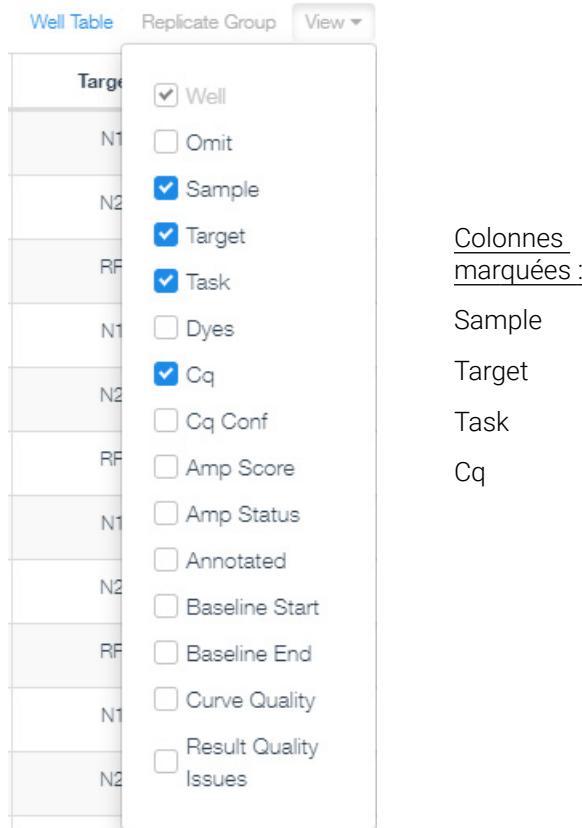
- 1 Dans la barre d'outils située juste au-dessus du Well Table, cliquer sur **View**.

Un menu s'ouvre, comme le montre la **Figure 31**, énumérant toutes les colonnes du tableau disponibles.



**Figure 31** Menu View pour le Well Table de Design & Analysis – sélection de colonnes par défaut

- 2 Ajuster les paramètres de sorte que les seules colonnes marquées pour l'inclusion soient Well, Sample, Target, Task et Cq. Voir la **Figure 32**.



**Figure 32** Menu View pour le Well Table de Design & Analysis – sélection de colonnes personnalisées

3 Cliquer sur **View** pour réduire le menu.

## Étape 2. Exporter les données

4 Dans la barre d'outils située juste au-dessus du Well Table, cliquer sur le bouton de la barre d'outils comportant trois points.

5 Dans le menu qui s'ouvre, cliquer sur **Export**.

Une boîte de dialogue s'ouvre pour enregistrer le fichier CSV.

6 Sélectionner un dossier pour le fichier.

7 Dans le champ File Name, saisir le nom du fichier.

8 Cliquer sur **Save**.

La boîte de dialogue se ferme et le programme exporte les données vers le type de fichier CSV et les enregistre dans le dossier désigné.

9 Ouvrir le fichier et examiner les données Cq pour chacun des échantillons et des contrôles afin d'interpréter les résultats. Voir la section [Chapitre 6](#), « Analyse et résultats ».

# Effectuer une qRT-PCR sur le Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System

Cette section décrit la procédure à suivre pour effectuer une qRT-PCR sur un Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System.

## Exécuter le programme de qRT-PCR sur le CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System

- 1 Veiller à ce que le CFX96 Touch instrument soit sous tension.
- 2 Depuis le PC connecté à l'instrument, ouvrir l'expérience que vous avez créée précédemment dans l'application CFX Maestro Software.
- 3 Accéder à l'onglet Start Run de l'écran Run Setup.  
Si l'instrument est activé mais n'est pas affiché sous **Block Name**, cliquer sur **Detect Instrument(s)** dans le coin supérieur gauche de l'écran.
- 4 Dans le tableau, sélectionner l'instrument à utiliser pour mener l'expérience.
- 5 Cliquer sur **Open Lid**.  
Le couvercle de l'instrument s'ouvre.
- 6 Charger votre plaque de réaction dans le bloc thermique de l'instrument.
- 7 Sur le PC, cliquer sur **Close Lid**.  
Le couvercle de l'instrument se referme.
- 8 Cliquer sur **Start Run**.
- 9 Enregistrer le fichier du cycle dans le dossier souhaité. Saisir un nom de fichier et cliquer sur **Save**.  
L'instrument lance l'expérience.

## Attribuer des paramètres d'analyse de données pour le CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System

- ### Étape 1. Voir les graphiques d'amplification pour toutes les cibles dans tous les puits
- 1 Lorsque l'expérience est terminée, ouvrir l'expérience dans l'application CFX Maestro Software.  
L'expérience s'ouvre dans la fenêtre Data Analysis.
  - 2 En haut de la fenêtre, cliquer sur l'onglet Quantification, s'il n'est pas déjà sélectionné.  
La fenêtre affiche les graphiques d'amplification, un tableau des résultats dans chaque puits et un diagramme de la carte des plaques.

**3** Appliquer la fonction Fluorescence Drift Correction.

- En haut de la fenêtre Data Analysis, cliquer sur **Settings > Baseline Settings > Apply Fluorescence Drift Correction**.

Le logiciel corrige automatiquement toute déviation du signal de fluorescence qui pourrait être présent dans la plage du cycle de référence.

**4** Vérifier s'il existe des graphiques d'amplification avec une amplification précoce (c'est-à-dire avant le cycle 9). Exclure de l'analyse tout échantillon ayant subi une amplification précoce et le tester à nouveau à une concentration inférieure.

Dans les échantillons de test présentant des concentrations exceptionnellement élevées d'ARN viral, l'amplification des cibles virales peut atteindre des niveaux détectables à un nombre de cycles très précoce (< 9). Dans le cadre des calculs de correction de référence, le logiciel peut interpréter ces signaux d'amplification précoce comme du bruit de fond et ne pas attribuer de valeur Cq aux cibles virales de ces échantillons.

Surveiller la présence de ces échantillons de test en visualisant les graphiques d'amplification sans correction de référence (régler **Baseline Setting** sur **No Baseline Subtraction**). Si l'un des échantillons de test montre des signes d'amplification avant le cycle 9, alors retirer ces puits de l'analyse dans la fenêtre Plate Editor. Répéter la réaction de qRT-PCR pour l'échantillon en diluant l'acide nucléique à 1:100 à l'aide du tampon d'élution approprié.

## Étape 2. Évaluer les valeurs seuils

**5** Vérifier la sélection dans **Settings > Baseline Setting** pour vous assurer que le réglage est bien **Baseline Subtracted Curve Fit**.

**6** Cliquer avec le bouton droit de la souris sur le graphique Amplification et sélectionner **Show Threshold Values** (si elles ne sont pas déjà marquées).

La ligne de seuil pour chaque cible est affichée sous forme de ligne horizontale.

**7** Près du coin inférieur droit du graphique Amplification, cocher la case Log.

L'affichage des Amplification Plots en valeurs log permet de mieux visualiser le bruit de fond du signal.

**8** Fixer la valeur minimale de l'axe des Y à 0,0.

**a** À droite du graphique Amplification, cliquer sur l'icône Chart Settings. 

La boîte de dialogue Chart Settings s'affiche.

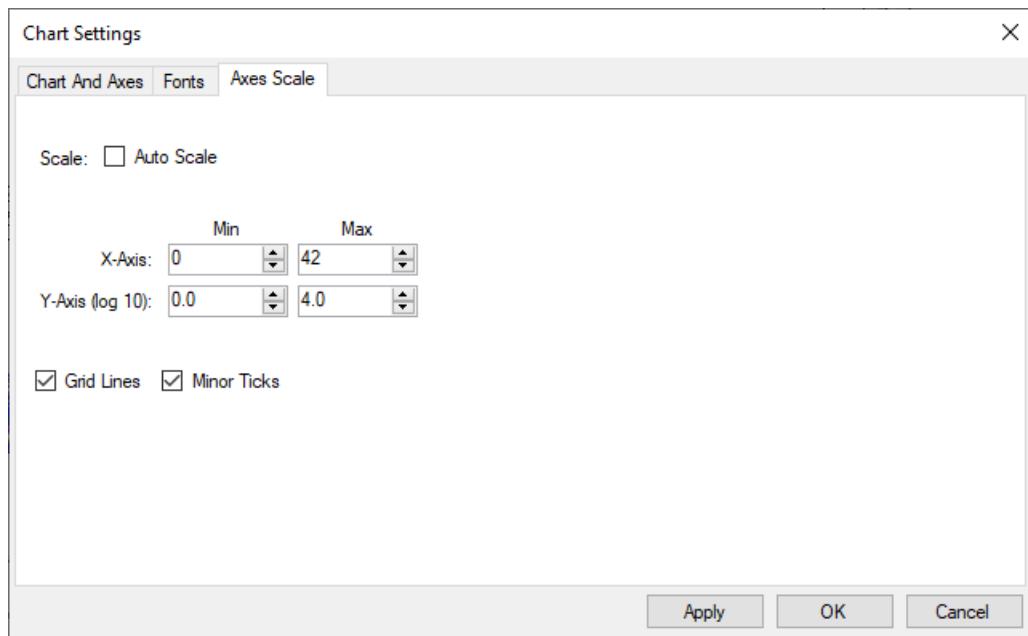
**b** Cliquer sur l'onglet Axes Scale.

**c** DÉCOCHER la case Auto Scale.

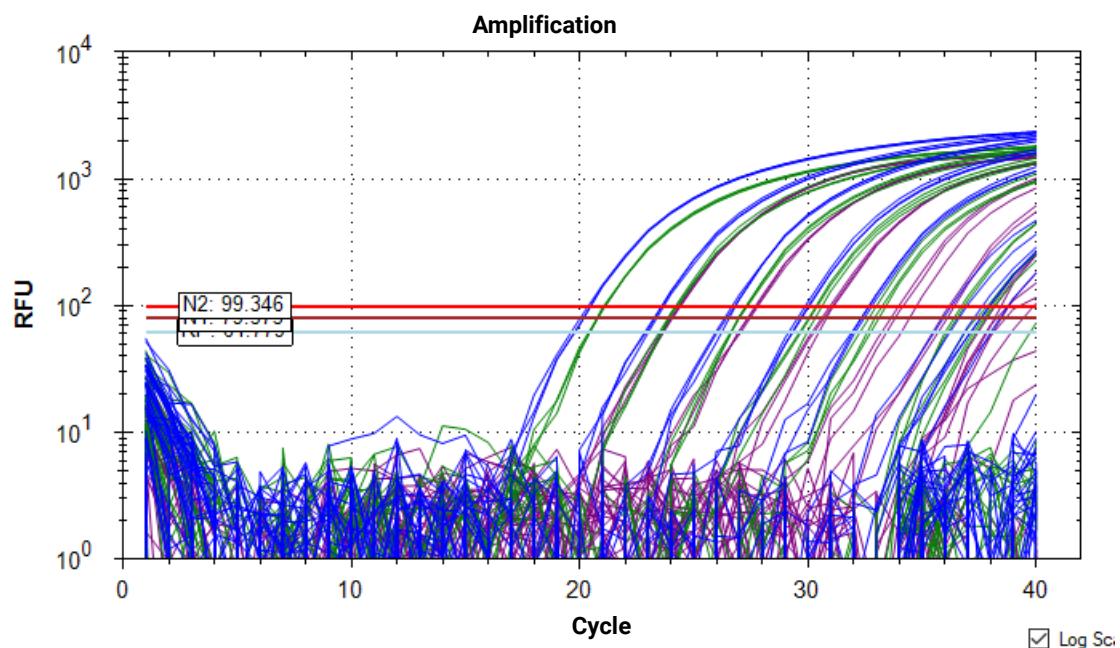
**d** Dans la colonne **Min** pour l'**Y-Axis (log 10)**, saisir **0,0**, comme indiqué à la **Figure 33**.

**e** Cliquer sur **OK**.

La boîte de dialogue se ferme et l'échelle de l'axe Y commence à 0,0, ce qui permet d'afficher le bruit du signal dans les graphiques. Le **Figure 34** en montre un exemple.

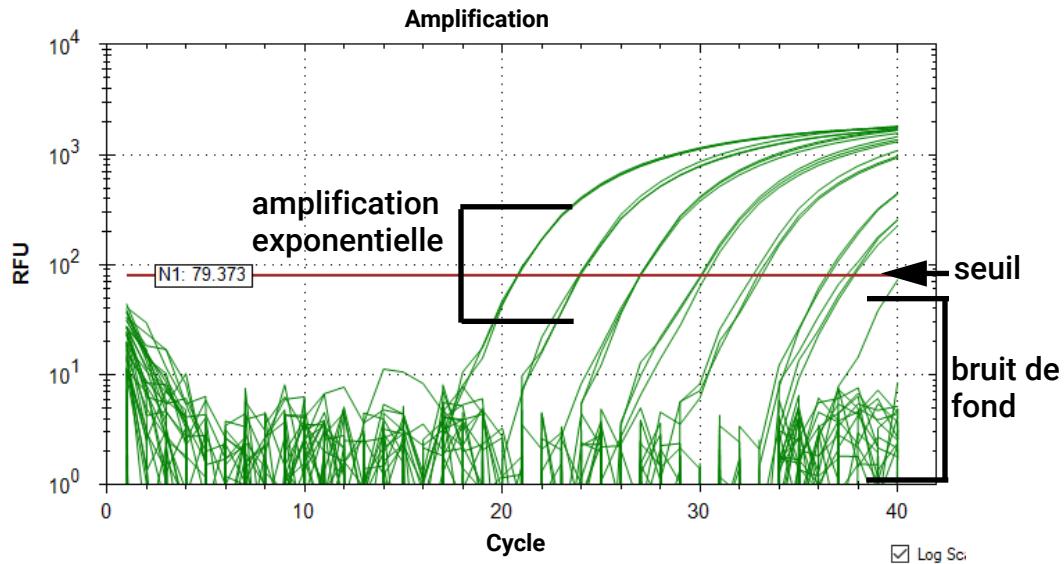


**Figure 33** Boîte de dialogue Chart Settings de Maestro – Onglet Axes Scale



**Figure 34** Graphique Maestro Amplification à l'échelle logarithmique – les seuils cibles sont affichés sous forme de lignes horizontales

- 9** Évaluer visuellement les graphiques d'amplification et le seuil par défaut de la cible N1.
- Sous le graphique Amplification, utiliser les cases à cocher pour sélectionner uniquement la cible FAM (N1) à afficher.
  - Déterminer si le seuil est à la fois suffisamment élevé pour être au-dessus du bruit de fond et suffisamment bas pour inclure des graphiques dans la phase d'amplification exponentielle (voir la **Figure 35**). Sur la base de cette détermination, procéder comme indiqué dans le **Tableau 15**.
- 10** Répéter l'**étape 11** pour la cible N2 et encore pour la cible RP.



**Figure 35** Graphique Maestro Amplification pour la cible N1

**Tableau 15 Vérification du réglage optimal des seuils dans le logiciel Design & Analysis**

Position du seuil	Description	Action
Position optimale	Au-dessus du bruit de fond et inclut tous les graphiques en phase d'amplification exponentielle	<ul style="list-style-type: none"> <li>Laisser les seuils à leur valeur actuelle.</li> </ul>
Trop élevé	Certains graphiques en phase d'amplification exponentielle ne passent pas le seuil	<ul style="list-style-type: none"> <li>Chercher des puits dont le bruit de fond est exceptionnellement élevé. De tels puits aberrants peuvent amener le logiciel à fixer le seuil trop haut.</li> <li>Cliquer sur <b>Plate Setup &gt; View/Edit Plate</b> pour ouvrir le Plate Editor.</li> <li>Sélectionner le puits aberrant sur la carte des plaques.</li> <li>Dans le panneau situé sur le côté droit du Plate Editor, cocher la case <b>Exclude Wells in Analysis</b> (située en bas du panneau).</li> <li>Cliquer sur <b>OK</b>. Lorsque l'on vous demande si vous souhaitez appliquer les changements, cliquer sur <b>Yes</b>. Le logiciel recalculera le seuil une fois que le puits aberrant sera exclu. Il est également possible d'utiliser la souris pour faire glisser manuellement la ligne de seuil sur le graphique vers une nouvelle position.</li> <li>Sur le côté droit du graphique d'amplification, cliquer sur l'icône Baseline Threshold pour ouvrir la boîte de dialogue Baseline Threshold.</li> <li>Sous <b>Single Threshold</b>, changer la sélection de <b>Auto Calculated</b> à <b>User Defined</b>. (Cela empêche le logiciel de recalculer le seuil une fois que le puits aberrant est réintégré.) Cliquer sur <b>OK</b> pour fermer la boîte de dialogue.</li> <li>Cliquer sur <b>Plate Setup &gt; View/Edit Plate</b> pour rouvrir le Plate Editor. Sélectionner le puits aberrant et décocher la case <b>Exclude Wells in Analysis</b>. Cliquer sur <b>OK</b> puis sur <b>Yes</b>.</li> <li>Dans la carte des plaques sous le graphique Amplification, sélectionner tous les puits pour réintégrer le puits aberrant dans l'analyse.*</li> </ul>
Trop faible	Certains graphiques ne sont pas au-dessus du bruit de fond.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Augmenter le seuil pour qu'il se situe juste au-dessus du niveau de bruit de fond.</li> </ul>

### Étape 3. Vérifier les résultats dans le puits NTC

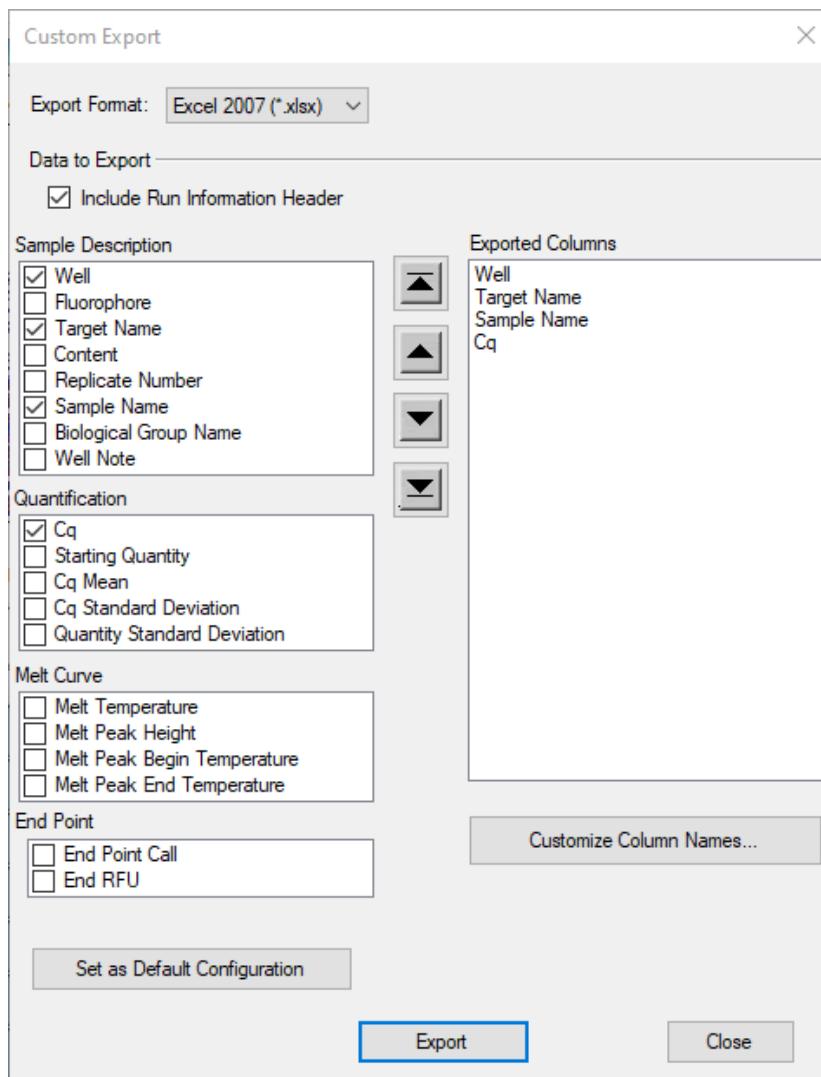
**11** Dans le tableau affichant les résultats, localiser la réaction du contrôle sans modèle (NTC), située dans le puits A12.

**12** Veiller à ce que la colonne Cq pour les trois cibles indique « N/A » ou a une valeur Cq > 37,00.

*Si la réaction NTC a une valeur Cq ≤ 37,00 pour l'une des cibles, alors une contamination de l'échantillon peut avoir eu lieu. Invalider le cycle et répéter le dosage en respectant strictement les directives.*

## Exporter les données depuis CFX Maestro Software

- 1 En haut de la fenêtre Data Analysis, cliquer sur **Export > Custom Export**.  
La boîte de dialogue Custom Export s'ouvre.
- 2 Dans le champ Export Format, sélectionner un type de fichier pour les données exportées, par exemple **Excel 2007 (\*.xlsx)**.  
Veiller à ce que votre PC dispose du logiciel nécessaire pour ouvrir le type de fichier sélectionné.
- 3 Dans la boîte de dialogue, cocher les cases comme indiqué dans la **Figure 36**. Examiner la section Exported Columns pour vous assurer qu'elle indique les éléments **Well**, **Target Name**, **Sample Name** et **Cq**.



**Figure 36** Paramètres d'exportation de données personnalisés pour l'application CFX Maestro

**4** Cliquer sur **Export**.

La boîte de dialogue Save as s'affiche.

**5** Sélectionner un dossier pour le fichier.

**6** Dans le champ File Name, saisir un nom pour le fichier ou utiliser le nom par défaut.

**7** Cliquer sur **Save**.

La boîte de dialogue se ferme. Le programme exporte les données vers le type de fichier sélectionné et les enregistre dans le dossier désigné.

**8** Ouvrir le fichier et examiner les données Cq pour chacun des échantillons et des contrôles afin d'interpréter les résultats. Voir la section [Chapitre 6](#), « Analyse et résultats ».

## 6 Analyse et résultats

Interprétation des résultats **69**

Ce chapitre contient des informations sur l'interprétation des résultats des dosages basés sur les données de qRT-PCR.

# Interprétation des résultats

## Résultats et interprétation pour les échantillons de contrôle

Si l'un des contrôles ne présente pas les performances attendues telles que décrites dans le **Tableau 16**, il est possible que le dosage ait été mal configuré ou mal exécuté ou qu'un réactif ou un dysfonctionnement de l'équipement se soit produit. Dans ce cas, invalider le cycle et répéter le dosage.

### Contrôle sans modèle (NTC)

Le NTC consiste à utiliser de l'eau exempte de nucléase dans la réaction de qRT-PCR au lieu de l'ARN. La réaction NTC ne doit pas présenter de courbes de croissance de fluorescence qui franchissent la ligne de seuil en 37,00 cycles pour aucune des trois cibles. Si la réaction NTC présente une courbe de croissance avec un  $Cq \leq 37,00$ , alors il est possible que l'échantillon ait été contaminé. Invalider le cycle et répéter le dosage en respectant strictement les directives.

### SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx

La réaction de qRT-PCR pour le SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx donnera un résultat positif avec les cibles 2019-nCoV\_N1 et 2019-nCoV\_N2 avec une valeur  $Cq$  inférieure ou égale à 37,00, tout en donnant un résultat négatif (signalé comme aucun  $Cq$  détecté ou  $Cq > 37,00$ ) avec la cible du gène P de la RNase humaine.

### Contrôle des échantillons humains

Le contrôle des échantillons humains consiste en des cellules humaines non infectieuses et est utilisé comme contrôle de procédure d'extraction d'ARN pour démontrer le succès de l'extraction d'ARN et l'intégrité des réactifs d'extraction. La réaction de qRT-PCR pour l'ARN extrait du contrôle des échantillons humains devrait donner un résultat positif avec la cible RP avec une valeur  $Cq$  inférieure ou égale à 37,00. Les cibles N1 et N2 du SARS-CoV-2 devraient donner des résultats négatifs (signalé comme aucun  $Cq$  détecté ou  $Cq > 37,00$ ).

**Tableau 16** Performances attendues des contrôles

Type de contrôle	Nom du contrôle	Utilisé pour surveiller	Résultat cible N1	Résultat cible N2	Résultat cible RP
Positif	SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx	Défaillance substantielle des réactifs, y compris l'intégrité de l'amorce et de la sonde	Positif ( $Cq \leq 37,00$ )	Positif ( $Cq \leq 37,00$ )	Négatif (aucun $Cq$ détecté ou $Cq > 37,00$ )

**Tableau 16 Performances attendues des contrôles**

Type de contrôle	Nom du contrôle	Utilisé pour surveiller	Résultat cible N1	Résultat cible N2	Résultat cible RP
Négatif	NTC	Contamination du réactif et/ou de l'environnement	Négatif (aucun Cq détecté ou Cq > 37,00)	Négatif (aucun Cq détecté ou Cq > 37,00)	Négatif (aucun Cq détecté ou Cq > 37,00)
Extraction	Contrôle des échantillons humains	Échec de la lyse et de la procédure d'extraction, contamination potentielle pendant l'extraction	Négatif (aucun Cq détecté ou Cq > 37,00)	Négatif (aucun Cq détecté ou Cq > 37,00)	Positif (Cq ≤ 37,00)

## Résultats et interprétation pour les échantillons cliniques

Le **Tableau 17** énumère les résultats attendus du dosage. Si un laboratoire obtient des résultats inattendus pour les contrôles de dosage ou si des résultats non concluants ou non valides sont obtenus et ne peuvent être résolus par les nouveaux tests recommandés, contacter le CDC pour une consultation et un éventuel renvoi d'échantillons.

### Cible du gène P de la RNase humaine (RP)

Tous les échantillons cliniques doivent présenter des courbes de croissance de la fluorescence pour la cible RP qui franchissent la ligne de seuil dans un délai de 37,00 cycles ( $Cq \leq 37,00$ ), indiquant ainsi la présence du gène P de la RNase humaine. La non-détection de la cible RP dans les échantillons cliniques peut indiquer :

- Une extraction incorrecte de l'acide nucléique à partir de matériel clinique entraînant une perte d'ARN et/ou une dégradation de l'ARN ou un transfert de substances inhibitrices.
- Une absence de matériel cellulaire humain suffisant en raison d'un mauvais prélèvement ou de la perte d'intégrité des échantillons.
- Une mise en place et exécution incorrectes du dosage.
- Un dysfonctionnement d'un réactif ou d'un équipement.

Si le dosage de RP ne donne pas de résultat positif pour les échantillons cliniques humains, interpréter cela comme suit :

- Si les cibles N1 et N2 sont positives ( $Cq \leq 37,00$ ) 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 courbes de croissance de la RNase P en raison du faible nombre de cellules dans l'échantillon clinique initial ou du fait que les cibles virales réduisent l'efficacité de l'amplification du RP, en particulier dans les échantillons ayant une charge virale élevée. Un signal de RP négatif n'exclut pas la présence de l'ARN du virus du SARS-CoV-2 dans un échantillon clinique.
- Si la cible RP est négative (aucun Cq détecté ou Cq > 37,00) alors que l'une ou les deux cibles N1 et N2 sont négatives (aucun Cq détecté ou Cq > 37,00), alors le résultat doit être considéré comme non valable pour l'échantillon. Si un échantillon résiduel est disponible, répéter la procédure d'extraction et recommencer le test. Si toutes les cibles restent négatives après un nouveau test, signaler les résultats comme non valables et un nouvel échantillon doit être prélevé si possible.

## Cibles 2019-nCoV\_N1 and 2019-nCoV\_N2

- Lorsque tous les contrôles présentent les performances attendues, un échantillon est considéré comme **positif** au SARS-CoV-2 si la condition suivante est remplie.
  - Les courbes de croissance pour les cibles N1 et N2 franchissent la ligne de seuil en 37,00 cycles ( $Cq \leq 37,00$ ). La cible RP peut être positive ou non (voir la description ci-dessus) mais le résultat du SARS-CoV-2 est toujours valable.
- Lorsque tous les contrôles présentent les performances attendues, un échantillon est considéré comme **négatif** au SARS-CoV-2 si les DEUX conditions suivantes sont remplies.
  - Les courbes de croissance des cibles N1 et N2 NE FRANCHISSENT PAS la ligne de seuil dans un délai de 37,00 cycles (aucun  $Cq$  détecté ou  $Cq > 37,00$ ).
  - La courbe de croissance de la cible RP FRANCHIT la ligne de seuil dans un délai de 37,00 cycles ( $Cq \leq 37,00$ ).
- Lorsque tous les contrôles présentent les performances attendues, un échantillon est considéré comme **non concluant** au SARS-CoV-2 si les DEUX conditions suivantes sont remplies.
  - La courbe de croissance de l'une des cibles de 2019-nCoV franchit la ligne de seuil en 37,00 cycles ( $Cq \leq 37,00$ ) tandis que la courbe de croissance de l'autre cible de 2019-nCoV ne franchit pas la ligne de seuil dans un délai de 37,00 cycles (aucun  $Cq$  détecté ou  $Cq > 37,00$ ). La courbe de croissance de la cible RP franchit la ligne de seuil en 37,00 cycles ( $Cq \leq 37,00$ ).

Pour les échantillons non concluants, l'ARN extrait de l'échantillon doit être testé à nouveau. Si l'ARN résiduel n'est pas disponible, extraire l'ARN de l'échantillon résiduel et le tester à nouveau. Si le même résultat est obtenu, signaler le résultat non concluant.

- Si le contrôle des échantillons humains est positif pour N1 ou N2 ( $Cq \leq 37,00$ ), alors la contamination peut avoir eu lieu pendant l'extraction ou le traitement des échantillons. Invalider tous les résultats pour les échantillons extraits en même temps que le contrôle des échantillons humains. Re-extraire des échantillons et le contrôle des échantillons humains et re-tester.

**Tableau 17 Résultats attendus du dosage SARS-CoV-2 qRT-PCR**

2019-nCoV_N1	2019-nCoV_N2	Gène P de la RNase humaine	Interprétation des résultats*	Rapport	Actions
Positif (Cq ≤ 37,00)	Positif (Cq ≤ 37,00)	Positif OU Négatif	SARS-CoV-2 détecté	Positif au SARS-CoV-2	Communiquer les résultats au CDC et à l'expéditeur
Négatif (aucun Cq détecté ou Cq > 37,00)	Négatif (aucun Cq détecté ou Cq > 37,00)	Positif (Cq ≤ 37,00)	SARS-CoV-2 non détecté	Non détecté	Communiquer les résultats à l'expéditeur. Envisager de faire des tests pour d'autres virus respiratoires. <sup>†</sup>
Positif (Cq ≤ 37,00)	Négatif (aucun Cq détecté ou Cq > 37,00)	Positif (Cq ≤ 37,00)	Résultat non concluants	Non concluant	Répétition des tests sur l'échantillon extrait et/ou répétition de l'extraction et qRT-PCR.
Négatif (aucun Cq détecté ou Cq > 37,00)	Positif (Cq ≤ 37,00)	Positif (Cq ≤ 37,00)	Résultat non concluants	Non concluant	Répétition des tests sur l'échantillon extrait et/ou répétition de l'extraction et qRT-PCR.
Si l'une des cibles de 2019-nCoV ou les deux sont négatives (aucun Cq détecté ou Cq > 37,00)		Négatif (aucun Cq détecté ou Cq > 37,00)	Résultat non valide	Non valide	Répéter l'extraction et la qRT-PCR. Si le résultat répété reste non valide, envisager de prélever un nouvel échantillon au patient.

\* Les laboratoires doivent communiquer leurs résultats de diagnostic de manière appropriée et conformément à leur système de notification spécifique.

<sup>†</sup> Les types d'échantillons optimaux et le moment optimal pour atteindre les niveaux viraux maximums lors des infections causées par le 2019-nCoV n'ont pas été déterminés. Le prélèvement de plusieurs échantillons d'un même patient peut être nécessaire pour détecter le virus. La possibilité d'un faux négatif doit surtout être envisagée si les expositions récentes du patient ou ses données cliniques suggèrent qu'une infection à 2019-nCoV est possible, et que les tests de diagnostic pour d'autres causes de maladie (par exemple, d'autres maladies respiratoires) sont négatifs. Si l'infection par le 2019-nCoV est toujours suspectée, il faut envisager de refaire le test en consultation avec les autorités de santé publique.

## Contrôle qualité

Contrôle qualité **74**

Ce chapitre contient des informations sur les mesures de contrôle de la qualité du dosage.

## Contrôle qualité

- Les exigences en matière de contrôle de la qualité doivent être respectées conformément aux réglementations ou aux exigences d'accréditation locales, étatiques et fédérales et aux procédures de contrôle de la qualité standard du laboratoire de l'utilisateur.
- Les procédures de contrôle de la qualité sont destinées à surveiller les performances des réactifs et des dosages.
- Avant d'analyser les échantillons de diagnostic avec chaque nouveau lot de kit, tester tous les contrôles positifs pour vérifier que tous les réactifs et les composants du kit fonctionnent correctement.
- Les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) recommandent d'inclure un contrôle d'extraction positif dans chaque lot d'isolement d'acide nucléique.
- Le contrôle des échantillons humains **doit** procéder à une extraction d'acide nucléique avec chaque lot d'échantillons à tester.
- **Toujours** inclure un contrôle sans modèle (NTC) et le contrôle d'ARN positif synthétique du SARS-CoV-2 dans chaque cycle d'amplification et de détection.
- L'ensemble sonde/amorce configuré pour le gène P de la RNase humaine (inclus dans le 10x SARS-CoV-2 Primer/Probe Mix) contrôle la qualité et l'extraction des échantillons.

## Limites du dosage

Limites **76**

Ce chapitre décrit les limites du dosage effectué avec l'Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit.

## Limites

- 1 L'utilisation de ce dosage est limitée au personnel formé à la procédure. Le non-respect de ces instructions peut entraîner des résultats erronés.
- 2 La fiabilité des résultats dépend de la qualité du prélèvement, du transport, du stockage et du traitement des échantillons.
- 3 Éviter la contamination en respectant les bonnes pratiques de laboratoire et les procédures spécifiées dans ce mode d'emploi.
- 4 Des résultats négatifs n'excluent pas les infections par le SARS-CoV-2 et ne doivent pas être utilisés comme seule base pour le traitement ou d'autres décisions de gestion.
- 5 Un résultat positif indique la détection d'acide nucléique du virus concerné. L'acide nucléique peut persister même lorsque le virus n'est plus viable.
- 6 La performance du dosage Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit a été établie à partir d'échantillons de type écouvillon nasopharyngien prélevés dans des milieux de transport UTM ou VCM. Les écouvillons oropharyngés, les écouvillons nasaux et les écouvillons du cornet nasal moyen sont considérés comme des types d'échantillons acceptables pour le dosage Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit mais les performances avec ces types d'échantillons n'ont pas été établies. Les tests des écouvillons oropharyngés, des écouvillons nasaux et des écouvillons du cornet nasal moyen (prélevés par le patient lui-même sous la supervision d'un prestataire de soins ou par un prestataire de soins) sont limités aux patients présentant des symptômes de la COVID-19.
- 7 L'Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit ne contient pas d'échantillon destiné à être utilisé comme contrôle des échantillons humains. L'échantillon utilisé pour ce contrôle doit être validé par le laboratoire.

## Caractéristiques de performance

Caractéristiques de performance **78**

Ce chapitre décrit les caractéristiques de performance de l'Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit.

# Caractéristiques de performance

Les données suivantes démontrent les caractéristiques de performance de l'Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit. Toutes les extractions d'échantillons ont utilisé les volumes d'entrée et les volumes d'élution des échantillons recommandés dans la section « **Extraction des acides nucléiques** » à la [page 19](#).

## Sensibilité analytique (Limite de détection)

Agilent a mené une étude sur la limite de détection (LDD) pour établir la plus faible concentration virale du SARS-CoV-2 (exprimée en nombre de copies du génome viral) pouvant être détectée par l'Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit au moins 95 % du temps avec chacune des procédures d'extraction d'acide nucléique prises en charge sur chacun des trois systèmes de PCR en temps réel pris en charge.

Les panels d'échantillons pour le test LDD ont été élaborés en diluant un échantillon clinique SARS-CoV-2 Standard quantifié avec des échantillons cliniques négatifs regroupés (matrice négative) pour obtenir une série de concentrations cibles souhaitées de SARS-CoV-2. Tous les échantillons cliniques étaient des écouvillons nasopharyngés préalablement testés au SARS-CoV-2 par le vendeur au moyen d'un test de SARS-CoV-2 avec autorisation d'utilisation d'urgence et confirmé par Agilent.

L'expérience préliminaire de LDD du dosage complet ont utilisé une gamme de concentrations virales avec trois doubles par concentration. La gamme de concentration dans l'expérience préliminaire a testée des concentrations de 0,75 à 3 copies/ $\mu$ l. Les résultats de l'expérience préliminaire ont indiqué que la limite de détection finale se situerait probablement dans cette plage et varierait en fonction de la méthode d'extraction et du système de PCR en temps réel.

La dernière expérience de confirmation de la LDD du dosage complet a été menée sur trois niveaux d'entrée cibles : 0,75, 1 et 1,5 copies/ $\mu$ l. À chacun des trois niveaux d'entrée cibles, 20 répliques d'extraction individuelles ont été testées sur toutes les combinaisons possibles de méthodes d'extraction et de systèmes de PCR en temps réel. Le **Tableau 18** montre les taux de détection positifs de cette expérience. Un taux de détection de 20/20 indique que les 20 répliques d'extraction étaient toutes détectables avec cette combinaison particulière de méthode d'extraction et de système de PCR en temps réel.

**Tableau 18 Limite finale de confirmation de détection -- Taux de détection positive\* avec chaque méthode d'extraction des acides nucléiques sur chaque système de PCR en temps réel (Agilent AriaMx, ABI 7500, et Bio-Rad CFX96)**

Niveau d'entrée de la cible virale SARS-CoV-2 avant l'extraction (copies/ $\mu$ l)	QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit avec QIAAsymphony (extraction automatisée)			MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit avec KingFisher Flex (extraction automatisée)		
	AriaMx	7500	CFX96	AriaMx	7500	CFX96
1,5	19/19 (1)	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
1	1/10 (10)	20/20	17/18 (2)	19/19 (1)	18/19 (1)	18/18 (2)
0,75	3/13 (7)	15/16 (4)	18/18 (2)	15/16 (4)	19/19 (1)	16/16 (4)

\* Les taux de détection sont exprimés en nombre de doubles positifs sur le nombre total de doubles positifs et négatifs. Les chiffres entre parenthèses, lorsqu'ils sont présents, indiquent le nombre de doubles non concluants. Dans ces cas, le nombre total de doubles positifs et négatifs est inférieur à 20.

Le **Tableau 19** résume les valeurs finales de la LDD pour chaque combinaison de méthode d'extraction/système de PCR en temps réel. Ces valeurs représentent le nombre de copies virales par  $\mu$ l d'extrait d'acide nucléique qui peut être détecté par l'Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit au moins 95 % du temps.

**Tableau 19 Résumé de la limite de détection finale -- LDD pour chaque méthode d'extraction des acides nucléiques sur chaque système de PCR en temps réel (Agilent AriaMx, ABI 7500 et Bio-Rad CFX96)**

Méthode d'extraction des acides nucléiques	Limite de détection du dosage complet (copies/ $\mu$ l)		
	AriaMx	7500	CFX96
QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit avec QIAAsymphony (extraction automatisée)	1,5	1	1,5
MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit avec KingFisher Flex (extraction automatisée)	1	1,5	1,5

## Inclusivité analytique

Sur l'Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, les séquences des amorces et des sondes oligonucléotidiques pour les cibles virales N1 et N2 et le gène P de la RNase humaine sont identiques à celles utilisées dans le panel de diagnostic en temps réel par RT-PCR du nouveau coronavirus 2019 CDC (2019-nCoV), pour une utilisation en urgence uniquement. Le caractère inclusif de ce panel a déjà été établi.

## Réactivité croisée

Sur l'Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, les séquences des amorces et des sondes oligonucléotidiques pour les cibles virales N1 et N2 et le gène P de la RNase humaine sont identiques à celles utilisées dans le panel de diagnostic en temps réel par RT-PCR du nouveau coronavirus 2019 CDC (2019-nCoV), pour une utilisation en urgence uniquement. La réactivité croisée de ce panel a été précédemment établie.

## Évaluation clinique

Une étude d'évaluation clinique a été menée avec l'Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit à partir d'échantillons d'écouvillonnage nasopharyngien (NP) humain. Pour chaque condition de test, 80 échantillons au total ont été testés : 40 échantillons NP négatifs et 40 échantillons NP positifs. L'état positif ou négatif de chaque échantillon a été confirmé par un dosage qRT-PCR du SARS-CoV-2 avec autorisation d'utilisation d'urgence (EUA). L'objectif de l'évaluation clinique était d'évaluer la concordance clinique (positive/négative) des résultats obtenus avec l'Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit par rapport à ceux obtenus avec le dosage qRT-PCR pour le SARS-CoV-2 de comparaison avec EUA.

L'extraction des acides nucléiques a été effectuée sur chaque échantillon à l'aide des deux plateformes d'extraction automatisées prises en charge (QIAGEN QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit avec le QIAAsymphony SP et Thermo Fisher Scientific MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit avec le KingFisher Flex Purification System) en utilisant le protocole du fabricant et les recommandations fournies dans ce mode d'emploi. Chaque échantillon extrait a ensuite été testé sur les trois systèmes de PCR en temps réel pris en charge (Agilent AriaMx, ABI 7500 et Bio-Rad CFX96) comme décrit dans ce mode d'emploi. Ainsi, chaque échantillon a été testé dans six (6) conditions différentes dans cette étude. Comme critère d'acceptation, un minimum de 95 % de concordance positive et négative était requis entre l'Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit et le dosage de comparaison. Les résultats de la concordance sont résumés dans le **Tableau 20**.

**Tableau 20 Concordance en pourcentage positif (PPA), concordance en pourcentage négatif (NPA) et concordance globale (OA) entre l'Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit et le dosage qRT-PCR de comparaison pour le SARS-CoV-2 avec EUA**

Plateforme d'extraction :	QIAAsymphony	QIAAsymphony	QIAAsymphony	KingFisher	KingFisher	KingFisher
Système de PCR en temps réel :	AriaMx	7500	CFX96	AriaMx	7500	CFX96
PPA	97,4 %	100,0 %	100,0 %	97,5 %	97,5 %	97,5 %
NPA	100,0 %	97,5 %	100,0 %	97,5 %	97,5 %	97,5 %
OA	98,7 %	98,8 %	100,0 %	97,5 %	97,5 %	97,5 %

## 10

## Références

Étiquettes de produits **82**

Ce chapitre contient des copies des étiquettes de produits pour l'Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit.

## Étiquettes de produits

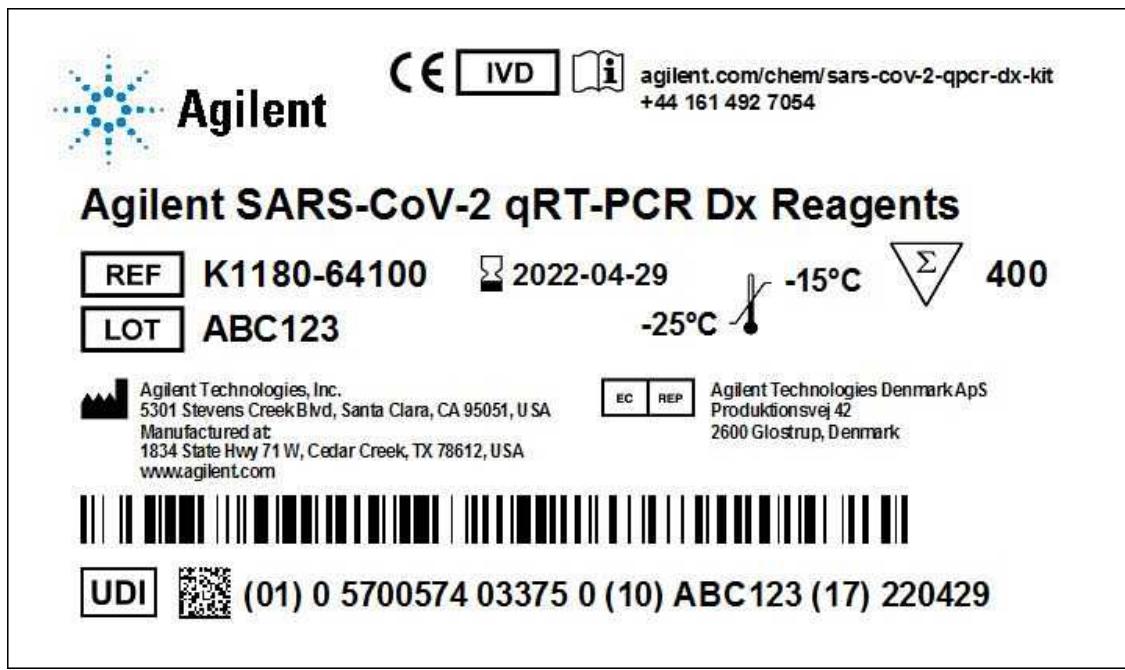


Figure 37 Étiquette de boîte pour K1180-64100

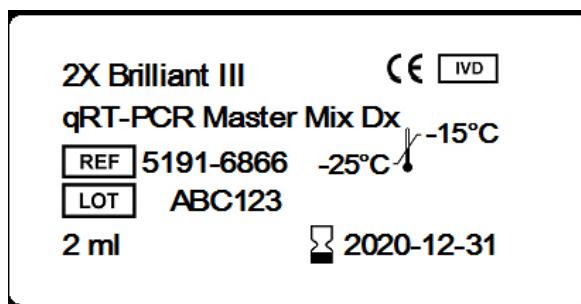


Figure 38 Étiquette de flacon pour 5191-6866

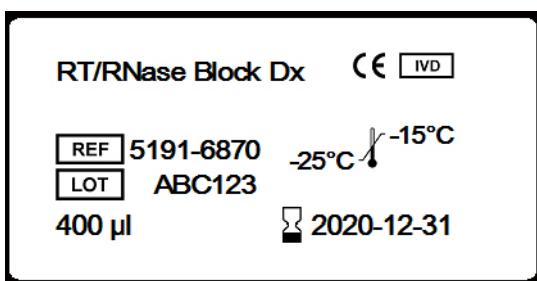


Figure 39 Étiquette de tube pour 5191-6870

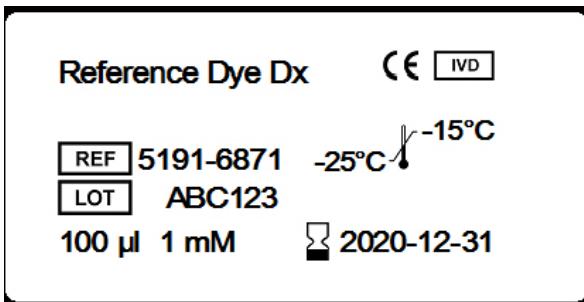


Figure 40 Étiquette de tube pour 5191-6871

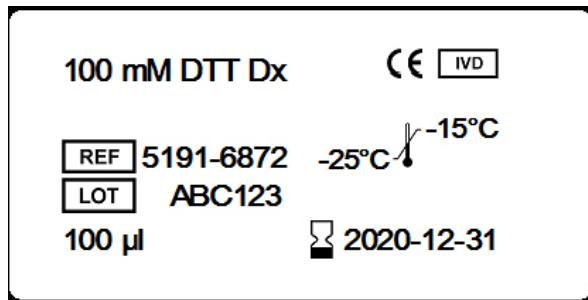


Figure 41 Étiquette de tube pour 5191-6872

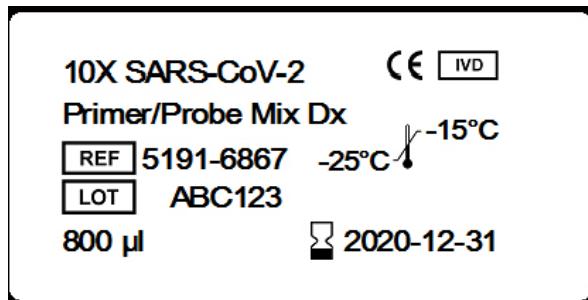


Figure 42 Étiquette de tube pour 5191-6867

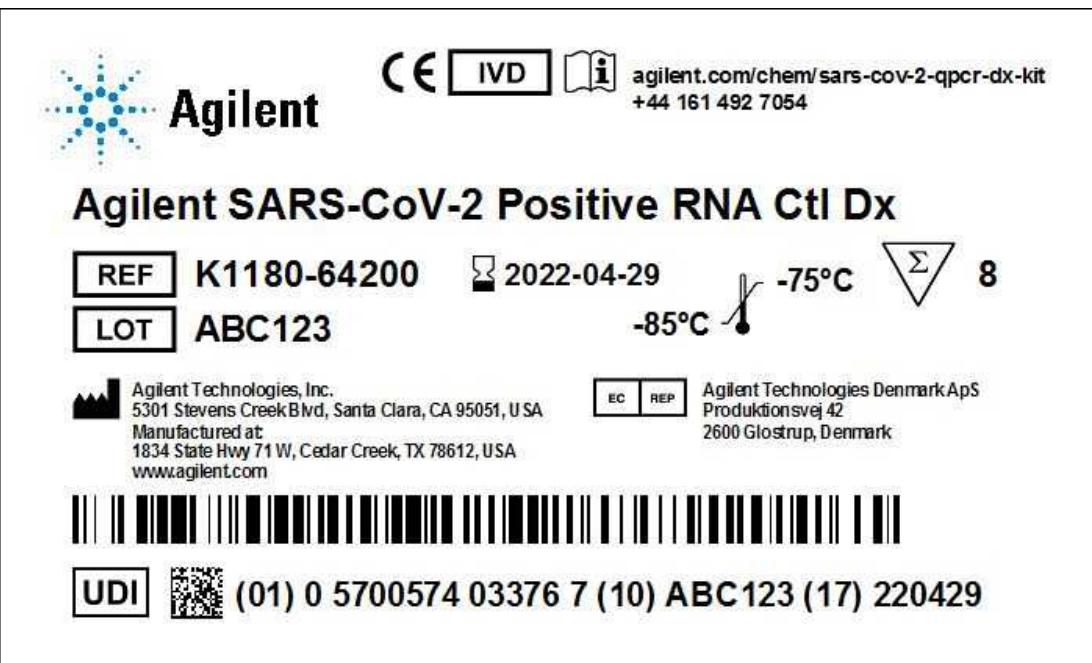


Figure 43 Étiquette de boîte pour K1180-64200

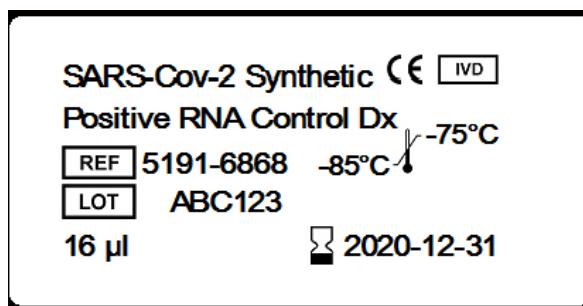


Figure 44 Étiquette de tube pour 5191-6868

**Fabriqué par**



Agilent Technologies, Inc.  
5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, CA 95051, USA  
Fabriqué à:  
1834 State Hwy 71 W, Cedar Creek, TX 78612, USA  
[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

**Représentant agréé dans l'Union européenne**



AGILENT TECHNOLOGIES FRANCE  
PARC TECHNOPOLIS – ZA COURTABOEUF  
3 AVENUE DU CANADA  
CS 90263  
91978 LES ULIS CEDEX  
FRANCE

**Assistance technique Agilent**

Consulter le site [www.agilent.com/en/contact-us/page](http://www.agilent.com/en/contact-us/page) pour trouver les numéros de téléphone spécifiques à chaque pays  
ou envoyer un e-mail à [covid.support@agilent.com](mailto:covid.support@agilent.com)

© Agilent Technologies, Inc. 2021–2022

Aucune partie du présent manuel ne peut être reproduite sous quelque forme ou par quelque moyen que ce soit (y compris sous forme électronique et de récupération ou de traduction dans une autre langue) sans l'autorisation écrite préalable d'Agilent Technologies, Inc., conformément aux dispositions des lois américaines et internationales sur la propriété intellectuelle.

© Agilent Technologies, Inc. 2021–  
2022

Révision B2, Mai 2022

