



# BforCure

## Bfast™ [SARS-CoV-2] RT-PCR kit Pour diagnostic *in vitro*

Bfast™ [SARS-CoV-2] RT-PCR kit      Product ID : A11\_A1  
Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit - Réactif RT-PCR -  
RT-PCR Reagent  
Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit - Tampon de Lyse -  
Lysis Buffer

Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit - 48      Product ID : A11\_B2  
Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit - 48 - Réactif  
RT-PCR - RT-PCR Reagent  
Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit - 48 - Tampon de  
Lyse - Lysis Buffer

REF

A11\_A1\_M

REF

A11\_A1\_L

REF

A11\_B2\_M

REF

A11\_B2\_L

CE

IVD

## **Droits d'auteur et Marques**

### **Droits d'auteurs**

Copyright (c) 2020 BforCure

Ce mode d'emploi est protégé par les lois internationales sur les droits d'auteur.

Il est interdit de reproduire, distribuer, traduire ou transmettre sous quelque forme et par quelque moyen que ce soit, électronique ou mécanique, notamment par photocopie, enregistrement ou stockage dans un système de stockage et de recherche documentaire, tout ou partie de ce mode d'emploi, sans le consentement préalable écrit de BforCure.

### **Marques**

- Chronos™, BforCure et le logo BforCure sont des marques déposées de BforCure.
- Toutes les autres marques et droits d'auteur demeurent la propriété de leurs propriétaires respectifs.

# Sommaire

Utilisation prévue	3
Résumé du test	3
Contenu du kit	5
Matériels requis/recommandés mais non fournis	5
Condition de stockage, manipulation et de stabilité du produit	6
Instrument compatible	6
Exigences relatives aux spécimens	6
Avertissements et mises en garde	7
Préparation du mélange réactionnel (version Chronos Dx)	9
Protocole et paramètres de PCR (version Chronos Dx)	10
Paramètres de RT-PCR (version Chronos Dx)	11
Analyse des résultats (version Chronos Dx)	11
Procédure de contrôle (version Chronos Dx)	12
Préparation du mélange réactionnel (version Bio-Rad CFX96)	14
Protocole et paramètres de RT-PCR (version Bio-Rad CFX96)	15
Analyse des résultats (version Bio-Rad CFX96)	16
Procédure de contrôle (version Bio-Rad CFX96)	16
Tableaux d'interprétation des résultats	17
Limites du test	18
Performances analytiques	19
Performances cliniques	19
Elimination	21
Révision du document	21
Symboles	21

# Utilisation prévue

Le kit **Bfast™ [SARS-CoV-2] RT-PCR**, conçu pour être utilisé avec Chronos™ Dx, est un test multiplex en temps réel de transcription inverse par polymérase en chaîne (RT-PCR) destiné au diagnostic *in vitro* rapide (moins de 20 minutes) du SRAS-CoV-2 (Syndrome Respiratoire Aigu Sévère Coronavirus 2), dans des prélèvements nasopharyngés.

Le kit **Bfast™ [SARS-CoV-2] RT-PCR-48**, destiné à être utilisé avec l'instrument Bio-Rad CFX96, est un test multiplex en temps réel de transcription inverse par polymérase en chaîne (RT-PCR) destiné au diagnostic *in vitro* du SRAS-CoV-2 (Syndrome Respiratoire Aigu Sévère Coronavirus 2), dans des prélèvements nasopharyngés et salivaires.

Les kits permettent la détection qualitative des séquences du gène E et N de l'ARN viral SARS-CoV-2 à partir de milieu de transport ayant servi au déchargement d'un prélèvement nasopharyngé ou d'un échantillon salivaire\* de patients avec ou sans signes et symptômes d'infection respiratoire. Le tampon de lyse fourni dans le kit permet la libération des acides nucléiques qui sont ensuite amplifiés par PCR.

## Résumé du test

Les kits Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR utilisent la technologie RT-PCR fluorescente en temps réel pour détecter des séquences cibles du gène E et N de l'ARN viral SARS-CoV-2 à partir de milieu de transport ayant servi au déchargement d'un prélèvement nasopharyngé ou d'un échantillon salivaire\*. L'échantillon examiné est considéré comme POSITIF ou NÉGATIF selon les résultats du test et du type de l'échantillon analysé (*voir les Tableaux d'interprétation des résultats*). Le test est considéré comme positif si une des deux cibles E et N sont détectées, si le test est réalisé sur des échantillons salivaires. Si le test est réalisé sur des échantillons nasopharyngés, le test est positif si les deux cibles E et N sont détectées. Des résultats positifs indiquent une infection active mais n'excluent pas une infection bactérienne ou une co-infection avec d'autres agents pathogènes non détectés par le test. Cependant, des résultats négatifs n'excluent pas une infection du patient et ne doivent pas être utilisés comme seule base pour le traitement du patient. Les résultats négatifs doivent être combinés aux observations cliniques, aux antécédents du patient et aux informations épidémiologiques.

Ces kits doivent être utilisés par du personnel de laboratoire clinique qualifié ayant une connaissance avérée de la PCR en temps réel et des procédures de diagnostic *in vitro*.

\*Le test a été validé sur des échantillons salivaires avec l'instrument de PCR temps réel Bio-Rad CFX96 et le kit Bfast [Sars-CoV-2] - 48. L'utilisation et les performances du test sur Chronos Dx à partir d'échantillons salivaires sont sous la responsabilité de l'utilisateur.

## Principe du test

Ce kit permet la détection des séquences cibles du gène E et N de l'ARN viral du SARS-CoV-2 via deux canaux optiques distincts. Un canal supplémentaire est dédié au contrôle endogène (CE) qui assure à la fois la fidélité de la réaction et estime qualitativement la présence de l'échantillon prélevé.

### NOTE :

Le kit **Bfast™ [SARS-CoV-2] RT-PCR** est utilisé sur l'instrument **Chronos Dx**, se référer au "Protocole pour Bfast [SARS-Cov-2] RT-PCR kit sur Chronos Dx" **page 8** pour la description des étapes du test.

Le kit **Bfast™ [SARS-CoV-2] RT-PCR-48** est utilisé sur l'instrument **Bio-Rad CFX96**, se référer au "Protocole pour Bfast [SARS-Cov-2] RT-PCR kit - 48 sur Bio-Rad CFX96" **page 13** pour la description des étapes du test.

# Contenu du kit

Le kit contient des réactifs pour 25 réactions (en tubes unitaires) ou 48 réactions selon la version. Les deux kits fournissent un contrôle positif d'amplification (PAC).

Les composants de chaque kit sont répertoriés dans le tableau suivant :

## Boite Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit - Tampon de lyse :

Boite	Couleur du tube	Nom du réactif	Quantité Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit	Quantité Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit - 48	Description	Symbole de sécurité
Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit - Tampon de lyse	 BLEU	Tube 0 Tampon de lyse	25	2	Le tampon de lyse contient un mélange chimique utilisé pour libérer les acides nucléiques de SARS-CoV-2	

## Boite Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit - Réactif RT-PCR :

Boite	Couleur du tube	Nom du réactif	Quantité Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit	Quantité Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit - 48	Description	Symbole de sécurité
Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit - Réactif RT-PCR	 VIOLET	Tube 1 Mix RT-PCR	25	2	Le Mix RT-PCR contient un mélange de réactifs (enzymes, oligonucléotides pour la détection de cibles) dans un tampon avec additifs	
	 ROUGE	Tube 2 Contrôle d'Amplification Positif (PAC)	1	1	ADN plasmidique avec des séquences spécifiques ciblées par les amorces et les sondes contenues dans le mix PCR	Non applicable

## Matériels requis/recommandés mais non fournis

- Instrument de PCR en temps réel Chronos Dx et puces de réaction Chronos™ ou thermocycleur Bio-Rad CFX96 et microplaques ou microtubes adaptés
- Écouvillon nasopharyngé et milieu de transport, tubes pour la collecte de salive
- De l'eau sans nucléases
- Micropipettes et pointes stériles avec filtres pour transférer des volumes compris entre 1 et 30 µL (par exemple P10 et P100/P200). Pour transférer le mélange réactionnel dans la puce de réaction Chronos Dx, il est recommandé d'utiliser des pointes de 100 µL ou 200 µL.
- Des blocs froids sont recommandés pour maintenir les réactifs à basse température.

# Condition de stockage, manipulation et de stabilité du produit

Les réactifs doivent être conservés comme indiqués dans le tableau suivant :

Couleur du tube	Nom du réactif	Température de stockage
 BLEU	Tube 0 - Tampon de lyse	+20°C à +25°C (température ambiante)
 VIOLET	Tube 1 - Mix RT-PCR	-15°C à -25°C
 ROUGE	Tube 2 - PAC	-15°C à -25°C

La température indiquée est considérée maximale pour la stabilité des réactifs. Le Mix PCR et le contrôle d'amplification positif (PAC) doivent être conservés à une température comprise entre -15°C et -25°C. Le tampon de lyse peut être conservé à température ambiante entre +20°C et +25°C.

- Ce kit doit être protégé de la lumière et peut-être utilisé jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette extérieure.
- Ne pas ouvrir l'emballage individuel des tubes à essai tant que l'utilisateur n'est pas prêt à effectuer le test.
- Éviter les cycles de congélation / décongélation inutiles.
- Ne pas utiliser de test si l'emballage primaire ou secondaire a été altéré.
- Ne pas mélanger les composants de différents lots de kits.
- Lire attentivement les fiches de données de sécurité du produit avant utilisation.

Les réactifs sont stables jusqu'à la date indiquée sur l'étiquette du tube ou sur l'étiquette et la boîte de réactifs.

Le Mix RT-PCR de Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit - 48 pour Bio-Rad CFX96 peut supporter 6 cycles de décongélation-congélation sans perte de performances.

Le Mix RT-PCR de Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit pour Chronos Dx ne peut pas être recongelé après décongélation.

## Instrument compatible

Le kit de diagnostic Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit a été développé et validé pour une utilisation avec Chronos Dx.

Le kit de diagnostic Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit - 48 a été développé et validé pour une utilisation avec Bio-Rad CFX96.

## Exigences relatives aux spécimens

Prélèvement nasopharyngé déchargé dans un milieu de transport non inactivant.

Prélèvement salivaire déchargé dans un milieu de transport non activant

# Avertissements et mises en garde

- Utilisation réservée au diagnostic in vitro (IVD).
- Respecter les règles de manipulations d'échantillons chimiques et biologiques en vigueur dans votre institution ou établissement.
- Tous les échantillons biologiques, y compris les tubes de réactifs usagés, doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être traités avec les précautions de sécurité adéquates.
- Aucune substance biologique dangereuse n'est émise si les précautions d'utilisation sont respectées.
- Aucune émission de substance dangereuse n'a lieu lors d'une utilisation normale du kit.
- Porter une tenue de protection ainsi que des gants et une paire de lunettes de protection.
- Changer de gants régulièrement. Si un contact direct avec un échantillon biologique potentiellement contaminé est avéré, changez de gants immédiatement et lavez les mains précautionneusement.
- Protéger toutes coupures cutanées ou abrasion contre un éventuel contact avec des matières infectées ou dangereuses. Retirer tout bijou susceptible d'être contaminés (pendentif, bague, montre...).
- Ne toucher ni les yeux, ni le nez, ni la bouche.
- Nettoyer, décontaminer les emplacements et les instruments non jetables après utilisation, avec un agent biocide et/ou un produit pour éliminer les contaminations ADN, en suivant les bonnes pratiques de laboratoire.
- Éviter le croisement de matériaux contaminés avec des matériaux non contaminés.
- Ne pas exposer de matériaux (ex : cahier, papier...) qui ne peuvent être décontaminés suite à une potentielle contamination.
- Ne pas toucher d'effets personnels ou toute autre surface non dédiée, avec les gants qui sont potentiellement contaminés.
- Prévoir un emplacement pour la manipulation d'échantillons biologiques et leur pré-traitement.
- Retirer les protections (blouse, gants, lunettes de protection) avant de quitter le laboratoire.
- Se laver les mains avec application après avoir été en contact d'échantillons biologiques.

# Protocole pour Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit sur Chronos Dx

Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit - Réactif RT-PCR - RT-PCR Reagent

**REF**

A11\_A1\_M

Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit - Tampon de Lyse - Lysis Buffer

**REF**

A11\_A1\_L

# Préparation du mélange réactionnel (version Chronos Dx)

Décongeler les réactifs avant utilisation et les conserver à l'abri de la lumière.



**Précautions de manipulation :** Après décongélation, il est recommandé de placer les tubes dans un bloc froid ou au réfrigérateur, si l'échantillon n'est pas traité dans les 5 minutes. Il n'est pas recommandé de conserver les tubes décongelés au froid plus d'une heure.

## Étape 1 : Libération des ARN viraux par lyse chimique

1. Prélever 200  $\mu$ l du milieu de transport dans lequel le prélèvement nasopharyngé a été déchargé, et les rajouter dans le **Tube 0** (tampon de lyse).
2. Faire 10 allers-retours avec la micropipette et jeter le cône dans une poubelle de type DASRI (Déchets d'activités de soins à risques infectieux).

## Étape 2 : Préparation de la réaction de PCR

3. Prélever 1,2  $\mu$ L du lysat traité ci-dessus contenu dans le **Tube 0** et le transférer dans le **Tube 1** contenant le mix RT-PCR.
4. Avec une pipette réglée à un volume de 25  $\mu$ l, mélanger le contenu du **Tube 1** (10 allers-retours) et injecter 25  $\mu$ l du mélange réactionnel dans une puce réaction Chronos **de type IVD** à l'aide d'une micropipette en prenant soin de ne pas former de bulles.
5. Sceller immédiatement la puce de réaction hermétiquement à l'aide du film adhésif pré-appliqué.



### Précautions de manipulation :

- Décongeler les réactifs avant de les utiliser. Évitez de conserver les réactifs sous une exposition directe à la lumière. Après décongélation du mélange RT-PCR, il est recommandé de le conserver à une température froide (sur un bloc froid).
- Manipuler les mélanges échantillon-réactif comprenant l'échantillon et le tampon de lyse (**Tube 0**, **Tube 1**) comme s'ils étaient potentiellement infectieux.
- En cas de fuite de la puce de réaction, décontaminer les surfaces (paillasse de laboratoire, dispositif Chronos Dx, pipettes) avec des agents de détérioration des acides nucléiques avant d'effectuer une nouvelle manipulation.
- Se référer au manuel d'utilisation Chronos Dx.
- Ne pas réutiliser les puces de réaction, elles sont à usage unique.

# Protocole et paramètres de PCR (version Chronos Dx)



Se référer au manuel utilisateur de Chronos Dx pour démarrer le dispositif et lancer une PCR.

La configuration du test PCR à choisir dans le menu déroulant de l'onglet configuration est : **BFast SARS-CoV-2** suivant ce protocole :

1. Allumer le dispositif Chronos Dx et se connecter au logiciel Chronos Soft.
2. Aller dans l'onglet Configuration et choisir le protocole « **BFast SARS-CoV-2** ».
3. Cliquer sur le bouton « Start Experiment ».
4. Renseigner et valider une description si nécessaire (ne pas renseigner de nom de patients ou information similaire).
5. Scanner les code-barres :
  - a. De la puce de réaction de type IVD (information renseignée à la base de la puce, au niveau du code DataMatrix)
  - b. Du patient (ou entrer manuellement si non disponible)
  - c. \*Du réactif RT-PCR et/ou du tampon de Lyse (numéro de lot sur le tube sous forme de DataMatrix)
6. Quand le logiciel Chronos Soft affiche « Insérer une puce » sur l'interface, insérer la puce de réaction (remplie et scellée) dans la fente d'insertion du dispositif.
7. La PCR débute automatiquement. Visualisation de la fluorescence à l'écran.
8. A la fin de la PCR, retirer la puce de réaction du dispositif Chronos Dx et la jeter dans une poubelle de type DASRI (Déchets d'activités de soins à risques infectieux).



## Précautions de manipulation :

- Après retrait de la puce de la fente d'insertion du Chronos, si observation de liquide sur la puce, il existe un risque de contamination pour les tests suivants. Faire un contrôle négatif est fortement recommandé avant de refaire une analyse.
- Après utilisation, jeter les tubes contenant les réactifs et la puce de réaction PCR conformément aux procédures de laboratoire appropriées afin d'éviter toute contamination.
- Ne pas réutiliser les tubes et les puces de réaction. Ils ne doivent être utilisés qu'une seule fois.

\*Si la boîte des réactifs ne comporte pas de code-barres sous forme de datamatrix, noter manuellement le numéro de lot du mix de RT-PCR, figurant sur l'étiquette du Tube 1.

## Paramètres de RT-PCR (version Chronos Dx)

Se référer au manuel d'utilisation de Chronos Dx et du logiciel associé Chronos Soft pour démarrer le dispositif et lancer une PCR. La configuration de PCR à choisir dans le logiciel Chronos™ Soft, au niveau du menu déroulant est : **BFast SARS-CoV-2**.

Etapes	Température (°C)	Temps (seconde)	Cycle (No.)
Transcription inverse	60	60	1
Dénaturation initiale	98	60	1
Dénaturation	98	3	40
Elongation	60	15	

### Canaux optiques :

La détection des trois cibles est réalisée sur trois canaux optiques différents. Les valeurs de fluorescence (RFU) sur Chronos Dx sont affichées sur trois courbes de couleurs différentes comme indiquées ci-dessous :

Canal optique Chronos DX	Fluorophore	Cible
Canal 1 : FAM	FAM	Gène E SARS-Cov-2
Canal 3 : Texas Red	ATTO 565	Gène N SARS-Cov-2
Canal 4 : Cy5	Cy5	Gène RNase P (Contrôle Endogène (CE))

## Analyse des résultats (version Chronos Dx)

Une fois la PCR terminée, le logiciel Chronos Soft bascule automatiquement vers l'onglet « Analysis » (Analyse). Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau récapitulatif. Lorsqu'il y a amplification d'un gène cible, celui-ci aura une valeur de seuil de détection (Ct). S'il n'y pas eu d'amplification d'un gène cible, celui-ci n'aura pas de valeur de seuil de détection. Il sera indiqué N/A.

Pour interpréter les résultats obtenus, aller dans la rubrique « Tableaux d'interprétation des résultats » de ce manuel d'utilisation.

# Procédure de contrôle (version Chronos Dx)

Il est possible d'effectuer des contrôles positifs et négatifs afin de vérifier que les performances du kit Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR n'ont pas été affectées par les conditions de transport ou de conservation ainsi que l'absence de contamination. Les valeurs de Ct des contrôles doivent répondre aux exigences énumérées dans le tableau suivant pour garantir des résultats valides.

Valeurs attendues pour le contrôle négatif et positif :

Contrôle	Ct, Gène E, FAM	Ct, Gène N ATTO565	Ct, CE Cy5
Négatif	N/A	N/A	N/A
Positif	Ct < 32	Ct < 32	Ct < 32

## Contrôle positif (fourni)

Ajouter 1,2 µL du **Tube 2** dans le **Tube 1**. Mélanger (10 allers-retours) et injecter 25 µl du mélange réactionnel dans une puce réaction Chronos. Lancer la PCR.

## Contrôle négatif (non fourni)

Aucun tube de contrôle négatif n'est fourni dans le kit. Pour effectuer un contrôle négatif de la technique, le protocole suivant peut être utilisé.

Ajouter 1,2 µL du **Tube 0** dans le **Tube 1**. Mélanger (10 allers-retours) et injecter 25 µl du mélange réactionnel dans une puce réaction Chronos. Lancer la PCR.

Aucune amplification des cibles E et N du SARS-CoV-2 et du contrôle endogène ne doit être détectée. Si une ou plusieurs cibles est/sont détectée(s), il est recommandé de décontaminer le laboratoire avec un biocide et un agent de détérioration des acides nucléiques.



**Précautions de manipulation :** Vérifier la correcte élimination des puces de réaction Chronos après PCR, même pour les échantillons définis négatifs avec le test.

# Protocole pour

## Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit - 48

### sur Bio-Rad CFX96

Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit - 48 - Réactif RT-PCR - RT-PCR Reagent

**REF**

A11\_B2\_M

Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit - 48 - Tampon de Lyse - Lysis Buffer

**REF**

A11\_B2\_L

# Préparation du mélange réactionnel (version Bio-Rad CFX96)

Décongeler les réactifs avant utilisation et les conserver à l'abri de la lumière.



**Précautions de manipulation :** Après décongélation, il est recommandé de placer les tubes dans un bloc froid ou au réfrigérateur, si l'échantillon n'est pas traité dans les 5 minutes. Il n'est pas recommandé de conserver les tubes décongelés au froid plus d'une heure.

## Étape 1 : Libération des ARN viraux par lyse chimique

1. **Échantillon nasopharyngé:** Prélever 50  $\mu$ L du milieu de transport dans lequel le prélèvement nasopharyngé a été déchargé et les ajouter à 50 $\mu$ L de tampon de lyse du **Tube 0** déposé dans un puits de microplaque ou dans un microtube.

**Échantillon salivaire:** Prélever 25  $\mu$ L de salive et les ajouter à 25  $\mu$ L d'eau sans nucléases (non fourni dans le kit). Ajouter les 50 $\mu$ L (salive + eau sans nucléase) dans 50 $\mu$ L de tampon de lyse du **Tube 0** déposé dans un puits de microplaque ou dans un microtube.

2. Faire 10 allers-retours avec la micropipette dans chaque puits ou microtube et jeter le cône dans une poubelle de type DASRI (Déchets d'activités de soins à risques infectieux).

## Etape 2 : Préparation de la réaction de PCR

3. Prélever 4  $\mu$ L du lysat traité ci-dessus et le transférer dans un tube ou un puits de microplaque contenant 36 $\mu$ L du **Tube 1** contenant le mix RT-PCR.
4. Homogénéiser le volume du mix final à l'aide de la micropipette réglée à 36  $\mu$ L (10 allers-retours) en prenant soin de ne pas former de bulles.
5. Sceller la microplaque ou les tubes à l'aide du film adhésif ou de bouchons compatibles avec la RT-PCR.



### **Précautions de manipulation :**

- Manipuler les mélanges échantillon-réactif comprenant l'échantillon et le tampon de lyse (Tube 0, Tube 1) comme s'ils étaient potentiellement infectieux.
- En cas de fuite des microplaques ou tubes de réactions, décontaminer les surfaces (paillasse de laboratoire, dispositif CFX96, pipettes) avec des agents de détérioration des acides nucléiques avant d'effectuer une nouvelle manipulation.
- Se référer au manuel d'utilisation de Bio-Rad CFX 96.

# Protocole et paramètres de RT-PCR (version Bio-Rad CFX96)



Se référer au manuel utilisateur de Bio-Rad CFX96 pour démarrer le dispositif et lancer une PCR.

La configuration des paramètres PCR est la suivante :

Etapes	Température (°C)	Temps (seconde)	Cycle (No.)
Transcription inverse	60	60	1
Dénaturation initiale	95	60	1
Dénaturation	95	3	40
Elongation	60	15	

## Canaux optiques :

La détection des trois cibles est réalisée sur trois canaux optiques différents. Les valeurs de fluorescence (RFU) sur Bio-Rad CFX96 sont affichées sur trois courbes de couleurs différentes comme indiquées ci-dessous :

Canal optique Bio-Rad CFX 96	Fluorophore	Cible
Canal 1 : FAM	FAM	Gène E SARS-Cov-2
Canal 3 : Texas Red	ATTO 565	Gène N SARS-Cov-2
Canal 4 : Cy5	Cy5	Gène RNase P (Contrôle Endogène (CE))



## Précautions de manipulation :

- Après utilisation, jeter les tubes contenant les réactifs et les microplaques/tubes pour Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit - 48 selon les procédures de laboratoire appropriées pour éviter toute contamination.
- Ne pas réutiliser les tubes et les microplaques de réaction. Ils sont à usage unique.

# Analyse des résultats (version Bio-Rad CFX96)

Une fois la PCR terminée, le logiciel d'analyse Bio-Rad analyse automatiquement les résultats obtenus. Lorsqu'il y a amplification d'un gène cible, celui-ci aura une valeur de seuil de détection (Ct). S'il n'y pas eu d'amplification d'un gène cible, celui-ci n'aura pas de valeur de seuil de détection. Il sera indiqué N/A.

Pour interpréter les résultats obtenus, aller dans la rubrique « Tableaux d'interprétation des résultats » de ce manuel d'utilisation et le manuel d'utilisation du logiciel d'analyse.

## Procédure de contrôle (version Bio-Rad CFX96)

Il est possible d'effectuer des contrôles positifs et négatifs afin de vérifier que les performances du kit Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR - 48 n'ont pas été affectées par les conditions de transport ou de conservation ainsi que l'absence de contamination. Les valeurs de Ct des contrôles doivent répondre aux exigences énumérées dans le tableau suivant pour garantir des résultats valides.

Valeurs attendues pour le contrôle négatif et positif :

Contrôle	Ct, Gène E, FAM	Ct, Gène N ATTO565	Ct, CE Cy5
Négatif	N/A	N/A	N/A
Positif	Ct < 32	Ct < 32	Ct < 32

### Contrôle positif (fourni)

Afin de réaliser un contrôle positif, voici le protocole à suivre:

- Ajouter 4 µL du **Tube 2** à 36µL du **Tube 1**, dans un puits de microplaque ou un microtube vide.
- Mélanger les 40 µL formés en faisant 10 allers-retours.
- Lancer la réaction de PCR.

### Contrôle négatif (non fourni)

Aucun tube de contrôle négatif n'est fourni dans le kit. Pour effectuer un contrôle négatif de la technique, le protocole suivant peut être utilisé:

- Ajouter 4 µL du **Tube 0** à 36µL du **Tube 1**, dans un puits de microplaque ou un microtube vide.
- Mélanger les 40 µL formés en faisant 10 allers-retours.
- Lancer la réaction de PCR.

Aucune amplification des cibles E et N du SARS-CoV-2 et du contrôle endogène ne doit être détectée. Si une ou plusieurs cibles est/sont détectée(s), il est recommandé de décontaminer le laboratoire avec un biocide et un agent de détérioration des acides nucléiques.



**Précautions de manipulation :** Vérifier la correcte élimination des tubes ou microplaques de réaction après PCR, même pour les échantillons définis négatifs avec le test.

# Tableaux d'interprétation des résultats

La table d'interprétation des résultats diffère suivant la nature de l'échantillon traité.

Pour l'interprétation des résultats obtenus avec **des échantillons nasopharyngés** (version Chronos Dx ou Bio-Rad CFX96) voir le tableau suivant :

Ct Gène E FAM	Ct Gène N ATTO565	Ct Contrôle Endogène Cy5	Interprétation	Action
<37	<37	< 40 ou N/A	Positif	
>37 ou N/A	>37 ou N/A	< 37	Négatif	
>37 ou N/A	>37 ou N/A	>37 ou N/A	Invalide	Réitérer l'expérience
<37	N/A	< 40 ou N/A	Suspicion de présence de SARS-CoV-2	Réitérer l'expérience
N/A	<37	< 40 ou N/A	Suspicion de présence de SARS-CoV-2	Réitérer l'expérience

Pour l'interprétation des résultats obtenus avec **des échantillons salivaires** (version Bio-Rad CFX96), voir le tableau suivant :

Ct Gène E FAM	Ct Gène N ATTO565	Ct Contrôle Endogène Cy5	Interprétation	Action
<37	<37	< 40 ou N/A	Positif	
<37	N/A	< 40 ou N/A	Positif	
N/A	<37	< 40 ou N/A	Positif	
>37 ou N/A	>37 ou N/A	< 37	Négatif	
>37 ou N/A	>37 ou N/A	>37 ou N/A	Invalide	Réitérer l'expérience



**Important :** Les tableaux d'interprétation des résultats sont spécifiques aux protocoles PCR décrits dans cette notice d'utilisation.

# Limites du test

- Les kits **Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit** et **Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit-48** ont été validés en utilisant la procédure décrite dans ce document uniquement. La modification de ces procédures peut altérer les performances du test.
- L'utilisation de ce test est strictement limitée au personnel expérimenté et formé à l'utilisation des kits **Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit** et **Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit-48** et des systèmes de détection en temps réel associés.
- Les performances du kit **Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit** n'a été évalué que sur des prélèvements nasopharyngés déchargé dans un milieu de transport non lytique. Les performances du kit **Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit-48** a été évalué sur des prélèvements nasopharyngés et salivaires déchargés dans un milieu de transport non lytique. L'utilisation avec d'autres types d'échantillons n'a pas été évaluée et les caractéristiques de performance sont inconnues.
- Le test fournit des résultats qualitatifs. Aucune corrélation ne peut être établie entre l'amplitude de la valeur Ct et le nombre de cellules présentes dans un échantillon infecté.
- Un résultat faux négatif peut se produire si un échantillon n'est pas correctement prélevé, transporté ou manipulé.
- Si les résultats de certains échantillons ne sont pas valides, l'échantillon doit être ré-analysé en commençant par une nouvelle étape de prétraitement.
- La présence d'inhibiteurs de PCR (substance interférente, sang...) peut entraîner des résultats non valides.
- Comme pour tous les tests de diagnostic in-vitro basés sur la PCR, des mutations dans la zone cible couverte par les amorces et/ou les sondes des kits **Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit** et **Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit-48** peuvent empêcher la détection de virus.
- Une concentration en cible inférieure à la sensibilité analytique du test peut être détectée mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles et conduire à des faux négatifs.
- Un résultat faux positif avec d'autres cibles peut provenir d'une contamination par des produits PCR issus de tests antérieurs.
- Ce test ne peut pas exclure les maladies causées par d'autres agents pathogènes bactériens ou viraux.
- Les technologies d'amplification telles que la PCR sont sensibles à l'introduction accidentelle de produits provenant de réactions d'amplification précédentes. Des résultats incorrects peuvent se produire si l'échantillon clinique ou les réactifs utilisés sont contaminés par l'introduction accidentelle de quelques molécules de produit d'amplification. Les mesures visant à réduire le risque de contamination dans le laboratoire comprennent la séparation physique des activités impliquées dans la préparation des mélanges réactionnels et la réalisation de la PCR dans le respect des bonnes pratiques de laboratoire.

# Performances analytiques

Sensibilité analytique : la sensibilité analytique (Limit Of Detection) a été déterminée avec de l'ARN quantifié de SARS-CoV-2 dilué dans le tampon de lyse fourni dans le kit. La limite de détection mesurée correspond à 83 copies d'ARN SARS-CoV-2 dans la réaction PCR pour Chronos et 100 copies d'ARN SARS CoV-2 par réaction pour Bio-Rad CFX 96.

Spécificité analytique : elle a été évaluée *in silico* par alignement des amorces et sondes utilisées dans le kit SARS-CoV-2 contre des séquences génomiques disponibles sur la base de données NCBI (National Center for Biotechnology Information, nih.gov) et dont la liste est : H. coronavirus 229E/OC43/HKU1/NL63, Sars-coronavirus, MERS-coronavirus, Adenovirus, RSV, Influenza A et B, Parainfluenza 1-4, hMPV, Rhinovirus, *C. pneumoniae*, *H. influenzae*, *L. pneumophila*, *M. tuberculosis*, *S. pneumoniae/pyogenes*, *B. pertussis*, *M. pneumoniae*, *P. jirovecii*, *Parechovirus*, *C. albicans*, *C. diphtheriae*, *Legionella non-pneumophila*, *B. anthracis*, *M. catarrhalis*, *N. elongata/meningitidis*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis/salivarius/aureus*, *Leptospira*, *C. psittaci*, *C. burnetii*. Aucune homologie n'a été identifiée permettant d'exclure toute réactivité croisée potentielle.

La spécificité analytique a été évaluée expérimentalement pour un groupe d'organismes (Human RSV A, Human RSV B, Human Influenza A, Human Influenza B, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Legionella anisa*, *Legionella longbeachae*, *Legionella cherii*, *Legionella jordanis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*). L'analyse expérimentale réalisée avec des échantillons d'ARN et d'ADN purifiés a confirmé la spécificité du test. Concernant les organismes listés ci-dessus, aucune amplification des cibles E et N du SARS-CoV-2 n'a été observée.

# Performances cliniques

Les performances cliniques ont été évaluées en laboratoire à partir de prélèvements nasopharyngés dans un milieu de transport caractérisé par RT-PCR avec des techniques de référence marquées CE-IVD. Les résultats suivants ont été obtenus :

## - Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit (Chronos Dx) - Nasopharyngé

		Kit Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR		
		Positif	Négatif	Total
Procédure de référence*	Positif	28 (a)	1 (b)	29
	Négatif	0 (c)	34 (d)	34
	Total	28	35	63

\*Procédure de référence : test RT-PCR marqué CE IVD utilisé avec le thermocycleur QuantStudio 5 ThermoFisher

Concordance positive :  $\frac{a}{(a+b)} \times 100 = \frac{28}{29} \times 100 = 97 \%$

Concordance négative :  $\frac{d}{(c+d)} \times 100 = \frac{34}{34} \times 100 = 100 \%$

- Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit - 48 (Bio-Rad CFX96) - Nasopharyngé

		kit Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR- 48		
		Positif	Négatif	Total
Procédure de référence*	Positif	27 (a)	0 (b)	27
	Négatif	0 (c)	12 (d)	12
	Total	27	12	39

\*Procédure de référence : test RT-PCR marqué CE IVD utilisé avec le thermocycleur Bio-Rad CFX96

Concordance positive :  $\frac{a}{(a+b)} \times 100 = \frac{27}{27} \times 100 = 100 \%$

Concordance négative :  $\frac{d}{(c+d)} \times 100 = \frac{12}{12} \times 100 = 100 \%$

- Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR kit - 48 (Bio-Rad CFX96) - Salive

		kit Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR- 48		
		Positif	Négatif	Total
Procédure de référence*	Positif	14 (a)	3 (b)	17
	Négatif	10 (c)	48 (d)	58
	Total	24	51	75

\*Procédure de référence : test RT-PCR marqué CE IVD utilisé avec le thermocycleur LINEGENE 9600 BIOER

Concordance positive :  $\frac{a}{(a+b)} \times 100 = \frac{14}{17} \times 100 = 82 \%$

Concordance négative :  $\frac{d}{(c+d)} \times 100 = \frac{48}{58} \times 100 = 83 \%$

# Elimination

Éliminez tous les réactifs utilisés et tout autre matériel jetable contaminé en suivant les procédures applicables aux déchets infectieux ou potentiellement infectieux. Il incombe à chaque laboratoire de traiter les déchets solides et liquides en fonction de leur nature et de leur degré de dangerosité et de les traiter et éliminer (ou de les faire traiter et éliminer) conformément aux réglementations en vigueur.

# Révision du document

Révision	Date	Description
A1 FR	2021-09-07	Version originale pour évaluation performance
A2 FR	2021-09-17	Version après évaluation performance
A3 FR	2021-10-08	Mise à jour des performances
A4 FR	2021-11-04	Mise à jour utilisation contrôle positif et conservation
A5 FR	2021-12-16	Mise à jour des symboles avec ajout du logo CE Mise à jour des données de performances analytiques
A6 FR	2022-04-11	Mise à jour suite la création de la variante "Kit Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR - 48"
A7 FR	2022-05-22	Mise à jour suite à la validation sur des échantillons salivaires
A8 FR	2022-11-10	Mise à jour du protocole de traitement de l'échantillon du Kit Bfast [SARS-CoV-2] RT-PCR - 48 nasopharyngé
A9 FR	2023-02-23	Mise à jour des numéros de références de produit

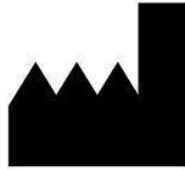
Tout incident grave survenu en lien avec le dispositif fait l'objet d'une notification au fabricant et à l'autorité compétente de l'État membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

# Symboles

Symbole	Signification	Symbole	Signification
	Pour une utilisation de diagnostic <i>in vitro</i>		Date de fabrication (AAAA-MM)
	Numéro de lot		Date de péremption (AAAA-MM-JJ)
	Numéro de Référence		Limites de température
	Attention, consultez les documents d'accompagnement		Lire attentivement la notice
	Nombre de tests		Contrôle d'Amplification Positif
	Danger pour la santé		Protéger contre la lumière du soleil
	Fabricant		Marquage CE
	Échantillons biologiques		



## Notes



BforCure

14, Rue de la Beaune  
93100 Montreuil, France  
Tél. : +33 (0)1 84 25 16 15  
[www.bforcure.com](http://www.bforcure.com)