



AMPIPROBE® SARS-CoV-2 Test System (RUO)

MODE D'EMPLOI

Test RT-PCR multiplex en temps réel pour la détection qualitative d'acides nucléiques du SARS-CoV-2.

ENZ-GEN225-0100 [AMPIXTRACT™ SARS-CoV-2 Extraction (RUO), 1 x 96 échantillons]

ENZ-GEN230-0100 [AMPIPROBE® SARS-CoV-2 Assay (RUO), 1 x 96 échantillons]

ENZ-GEN231-0004 [AMPIPROBE® SARS-CoV-2 Controls (RUO), 1 x 4 échantillons]

Pour obtenir les dernières informations sur le produit, y compris la documentation d'assistance, visitez notre site internet : www.enzolifesciences.com

Assistance technique (États-Unis) : 800-942-0430

Assistance technique (UE) : +41 61926 8989



UTILISER UNIQUEMENT À DES FINS DE RECHERCHE

Tous les produits vendus ci-dessous sont destinés à la recherche et ne peuvent pas être utilisés à des fins différentes, sauf mention contraire sur l'emballage. Ne pas utiliser pour des procédures diagnostiques.

L'achat n'inclut aucun droit ou licence d'utilisation, de développement ou d'exploitation commerciale de ces produits. Toute utilisation commerciale, développement ou exploitation de ces produits sans autorisation explicite et écrite préalable d'Enzo Life Sciences, Inc. est strictement interdite. L'acheteur assume tous les risques et responsabilités en rapport avec l'utilisation des produits inclut dans la facture et / ou les résultats obtenus avec ceux-ci, qu'ils soient utilisés seuls ou en combinaison avec d'autres produits.

GARANTIE LIMITÉE

Ces produits sont proposés sous une garantie limitée. Toutes les spécifications décrites dans la notice d'emballage des produits au moment de l'expédition sont garanties. La seule obligation d'Enzo Life Sciences est de remplacer le produit dans la limite du prix d'achat. Toutes les réclamations doivent être adressées à Enzo Life Sciences, Inc., dans les cinq (5) jours suivant la réception de la commande.

CETTE GARANTIE REMPLACE EXPLICITEMENT TOUTE AUTRE GARANTIE OU RESPONSABILITÉ, EXPRESSE OU IMPLICITE, Y COMPRIS LES GARANTIES DE QUALITÉ MARCHANDE, D'ADEQUATION À UN USAGE PARTICULIER ET DE NON-VIOLATION DE BREVET OU D'AUTRES DROITS DE PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE D'AUTRUI. CES GARANTIES (ET TOUTE AUTRE GARANTIE IMPLICITE PREVUE PAR LA LOI) SONT EXPRESSÉMENT REJETÉES.

MARQUES ET BREVETS

Plusieurs produits et applications Enzo Life Sciences sont couverts par des brevets américains et étrangers ou sont en instance de brevet.

AMPIPROBE, AMPIXTRACT et GENFLEX sont des marques déposées d'Enzo Life Sciences. Inc. QuantStudio est une marque d'Applied Biosystems. Microlab Star est une marque déposée d'Hamilton.



TABLE DES MATIERES

USAGE PRÉVU	4
DESCRIPTION DU PRODUIT	4
CONTENU ET STOCKAGE DU KIT	5
MATÉRIELS REQUIS NON INCLUS	6
AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS.....	7
CONTRÔLE QUALITÉ	8
COLLECTE / TRANSPORT / STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS	9
FLUX DE TRAVAIL	9
PRÉPARATION DES RÉACTIFS ET DES ÉCHANTILLONS	9
EXTRACTION D'ARN ET PRÉPARATION DES RÉACTIONS DE RT-PCR.....	10
(Méthode automatisée utilisant la plateforme Enzo GENFLEX™).....	10
EXTRACTION D'ARN ET PRÉPARATION DES RÉACTIONS DE RT-PCR (Méthode manuelle).....	17
RT-PCR AVEC L'INSTRUMENT DE PCR EN TEMPS RÉEL QUANTSTUDIO® 5 D'APPLIED BIOSYSTEMS™	20
ANALYSE DES DONNÉES.....	22
RÉSULTATS.....	22
TROUBLESHOOTING	23
INFORMATIONS DE CONTACT	24



USAGE PRÉVU

L'AMPIPROBE® SARS-CoV-2 Test System est un système multiplex de rétro-transcription et réaction en chaîne par polymérase (rRT-PCR) pour la détection qualitative d'acides nucléiques de SARS-CoV-2 dans les échantillons de voies respiratoires supérieures.

Destiné à la recherche uniquement (Research Use Only – RUO) ! Ne pas utiliser à des fins diagnostiques.

DESCRIPTION DU PRODUIT

L'AMPIPROBE® SARS-CoV-2 Test System comprend les composants suivants :

- AMPIXTRACT™ SARS-CoV-2 Extraction kit (RUO)
- AMPIPROBE® SARS-CoV-2 Assay kit (RUO)
- AMPIPROBE® SARS-CoV-2 Controls kit (RUO)

Le AMPIXTRACT™ SARS-CoV-2 Extraction kit (RUO) utilise une technologie basée sur des particules magnétiques pour l'isolement et la purification d'acides nucléiques dans différents types d'échantillons biologique. Le kit est compatible avec une méthode d'extraction manuelle ou automatisée. La méthode d'extraction automatisée est compatible avec n'importe quelle plateforme ouverte pour la manipulation des liquides.

Ce kit est suffisant pour 100 extractions. Le kit a été validé avec les protocoles suivants :

- Méthode automatisée utilisant la plateforme GENFLEX™ (plateforme ouverte) : faire référence au paragraphe « Extraction d'ARN et préparation de la réaction RT-PCR (méthode automatisée utilisant la plateforme GENFLEX™) »
- Méthode manuelle : faire référence au paragraphe « Extraction d'ARN et préparation de la réaction RT-PCR (méthode manuelle) »

L'AMPIPROBE® SARS-CoV-2 Assay kit (RUO) est un test RT-PCR multiplex en temps réel qui contient deux ensembles d'amorces et de sondes pour détecter deux régions du gène de nucléocapside (N) de SARS-CoV-2 ainsi qu'un ensemble d'amorces et de sondes pour détecter la RNase P (RP) humaine dans l'échantillon. L'ARN isolé à partir d'échantillons de voies respiratoires supérieures est rétro-transcrit en ADNc et ensuite amplifié à l'aide d'un instrument qPCR, comme QuantStudio® 5 (QS5) d'Applied Biosystems. Pendant le processus d'amplification, la sonde se lie à une séquence cible spécifique située entre les amorces directe et inverse. Au cours de la phase d'extension du cycle de PCR, l'activité nucléase 5' de la Taq polymérase dégrade la sonde liée, amenant le colorant rapporteur (FAM, HEX et Quasar 670) à se séparer du colorant d'extinction (BHQ1 ou BHQ2), générant ainsi un signal fluorescent. L'intensité de la fluorescence est contrôlée à chaque cycle de PCR par le thermocycleur. Chaque AMPIPROBE® SARS-CoV-2 Test kit fournit assez de réactifs pour 100 tests.

L'AMPIPROBE® SARS-CoV-2 Controls kit contient un contrôle ARN positif spécifique des régions génomiques de SARS-CoV-2 ciblées par le test ainsi que de la RNase P humaine, un contrôle ARN négatif qui contient une cible de la RNase P humaine et un contrôle sans matrice (no-template, NTC). Chaque kit fournit assez de réactifs de contrôle pour 4 analyses. Le kit peut être utilisé avec n'importe quel instrument qPCR.

CONTENU ET STOCKAGE DU KIT

Conservez tous les réactifs et contrôles non ouverts comme recommandé dans les tableaux suivants. Quand stockés de manière appropriée, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur les étiquettes.

AMPIXTRACT™ SARS-CoV-2 Extraction kit (ENZ-GEN225-0100)^[a]		
Composants	Quantité	Stockage
AMPIXTRACT™ Wash Reagent	10 x 50 mL	RT (20-25°C)
AMPIXTRACT™ Lysis Reagent	10 x 80 mL	RT (20-25°C)
AMPIXTRACT™ Elution Buffer	10 x 12 mL	2-8°C
AMPIXTRACT™ Magnetic beads	1 x 5 mL	2-8°C
AMPIXTRACT™ PK dilution Buffer	1 x 9 mL	2-8°C
SPC Pack	AMPIXTRACT™ Stabilizer	2 x 900 µL
	AMPIXTRACT™ Proteinase	1 x 350 µL
	AMPIXTRACT™ Carrier RNA	1 x 1.2 mL

[a] Ce kit peut être commandé séparément.

AMPIPROBE® SARS-CoV-2 Assay (RUO) (ENZ-GEN230-0100)^[a]		
Composants	Quantité	Stockage
AMPIPROBE® RT-PCR Buffer	1.3 mL	-20°C
AMPIPROBE® SARS-CoV-2 Primer/Probe Mix	260 µL	-20°C
AMPIPROBE® RT-PCR Enzyme Mix	130 µL	-20°C
Nuclease-free Water	1 mL	-20°C

[a] Ce kit peut être commandé séparément.

AMPIPROBE® SARS-CoV-2 Controls (ENZ-GEN231-0004)^[a]		
Composants	Quantité	Stockage
AMPIPROBE® SARS-CoV-2 Positive Control	100 µL	-80°C
AMPIPROBE® SARS-CoV-2 Negative Control	100 µL	-80°C
No Template Control (NTC)	100 µL	-80°C

[a] Ce kit peut être commandé séparément.



MATÉRIELS REQUIS NON INCLUS (à fournir par l'utilisateur)

1. Composants requis mais non inclus dans l'AMPIPROBE® SARS-CoV-2 Test System pour l'extraction AUTOMATISÉE et la préparation de la PCR à l'aide de la plateforme GENFLEX™.

Instruments et équipement

- a. Auge de 200 mL (Hamilton 56695-01)
- b. Auge de 20 mL (Hamilton 96424-02)
- c. Sac à déchets en plastique (Hamilton 185319)
- d. Conteneur à déchets pour déchets dangereux (Hamilton 281520)
- e. Doublure en plastique Bio Hazard pour récipient à déchets (Hamilton 53686-01)
- F. Mélangeur vortex
- g. Microcentrifugeuse
- h. La plateforme GENFLEX™ (ENZ-GEN-FLX) inclut un manipulateur de liquide automatisé utilisé pour l'extraction et la préparation de la PCR, et le système de PCR en temps réel QuantStudio® 5 (Applied Biosystems A28139), 96-puits, avec QuantStudio® Design & Analysis Desktop Software version 1.5.1

Consommables

- a. Plaques à puits profonds (DWP) (Thomas Scientific 1162C08)
- b. Microplaque d'élution (Thomas Scientific 1144B80)
- c. Plaque PCR 96 puits (DN Biotech 5371009)
- d. Film adhésif optique (Applied Biosystems 4311971), à utiliser dans l'instrument de PCR
- e. Film adhésif (Thomas Scientific 6980A10), pour stocker la plaque d'ARN
- F. Petits tubes de réactif (Sarstedt 72.703)
- g. Pointes de 1 ml (Hamilton 235940)
- h. Pointes de 300 µL (Hamilton 235938)

Réactifs

- a. 100% Ethanol, Molecular Biology Grade (Sigma E7023 ou équivalent)

2. Composants requis mais non inclus avec l'AMPIPROBE® SARS-CoV-2 Test System pour extraction MANUELLE et configuration de la PCR avec la plateforme GENFLEX™ (à fournir par l'utilisateur).

Instruments et équipement

- a. Aimant en plaque (par exemple, plaque magnétique universelle améliorée Alpaqua, Alpaqua # A000400), pour l'extraction d'ARN.
- b. Agitateur chauffant (par exemple, Bull Dog # 1808-0506), pour l'extraction d'ARN.
- c. Système de PCR en temps réel capable de détecter les rapporteur FAM, HEX et Cy5 (e.g. QuantStudio® 5 Real-Time PCR System, Applied Biosystems A28139).

Consommables

- a. Plaques à puits profonds (DWP) (Thomas Scientific 1162C08)
- b. Plaque PCR 96 puits (DN Biotech 5371009)
- c. Film adhésif optique (Applied Biosystems 4311971), à utiliser dans l'instrument de PCR

Réactifs

- a. 100% éthanol, qualité biologie moléculaire (Sigma E7023)

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

1. Ce produit est destiné uniquement à la recherche.
2. L'essai SARS-CoV-2 L'AMPIPROBE® SARS-CoV-2 Test System doit être effectué par un personnel qualifié et formé afin d'éviter le risque de résultats erronés. Utilisez des zones séparées pour la préparation d'échantillons de patients et de contrôles afin d'éviter les faux positifs. Les échantillons et les réactifs doivent être manipulés sous une hotte à flux d'air laminaire ou enceinte de sécurité biologique.
3. Les composants du kit doivent être stockés aux bonnes températures, comme indiqué sur les étiquettes. Il faut prendre soin de limiter le nombre de cycles de congélation-décongélation le cas échéant.
4. Vérifiez toujours la date de péremption avant d'utiliser les réactifs. NE PAS utiliser des réactifs expirés.
5. Lorsque vous travaillez avec des produits chimiques, portez toujours une blouse de laboratoire appropriée, des gants jetables et des lunettes de protection.
6. Les échantillons doivent toujours être traités comme s'ils étaient infectieux et / ou dangereux conformément aux procédures sécuritaires de laboratoire.
7. Manipulez tous les échantillons et contrôles comme s'ils étaient capables de transmettre des agents infectieux. Des résultats positifs indiquent la présence d'ARN du SARS-CoV-2.
8. Certains composants de l'AMPIXTRACT™ SARS-CoV-2 Extraction kit contiennent des substances dangereuses. Le réactif de lyse, qui contient du perchlorate de sodium, de l'éthanol, et de la protéinase peut être nocif s'il est ingéré ou absorbé par la peau et peut provoquer une irritation des yeux. Consultez la fiche de données de sécurité (FDS) pour plus d'informations.
9. Si du liquide contenant les tampons est renversé, nettoyez avec un détergent de laboratoire approprié et de l'eau. Plus précisément, le réactif de lyse AMPIXTRACT™ contient du sodium perchlorate, un corrosif. Les déversements de ce réactif doivent être évités. Si ce réactif est renversé, nettoyez l'instrument ou la surface avec de l'éthanol à 70%.
10. Si un liquide contenant des agents potentiellement infectieux est renversé, nettoyez d'abord la zone avec un détergent de laboratoire et de l'eau, puis avec 10% d'hypochlorite de sodium (v/v) suivi d'éthanol à 70%.
11. Pratiquez une technique aseptique lors de la manipulation des réactifs pour éviter l'introduction de contaminants qui pourraient interférer avec l'interprétation du test.
12. L'utilisation de tubes à bouchon à vis et de pointes à barrière pour pipette est fortement encouragée pour empêcher la formation d'aérosols à partir des échantillons et des réactifs, et ainsi limiter les risques de contamination.
13. Évitez l'exposition des réactifs à une lumière UV (utilisée pour la décontamination) ou une lumière continue, en particulier les réactifs fluorogènes. Cela peut provoquer un vieillissement accéléré des réactifs et des tampons.
14. Observez les bonnes pratiques de laboratoire. Ne jamais pipeter à la bouche. Ne pas manger, boire ou fumer dans les zones du laboratoire. Tout matériel biologique doit être traité comme potentiellement dangereux et manipulé comme tel. Ils doivent être éliminés conformément aux procédures établies de sécurité.

CONTRÔLE QUALITÉ

CONTRÔLES

Les contrôles suivants fournis dans l'AMPIPROBE® SARS-CoV-2 Controls kit (RUO) (ENZ-GEN231-0004) doivent être inclus pour chaque série afin d'interpréter avec précision les résultats du patient:

- Un contrôle positif (PC) contenant les cibles SARS-CoV-2 N1 et N2, et la cible RNase P humaine.
- Un contrôle négatif (NC) contenant la cible RNase P humaine.
- Un contrôle « no-template » (NTC) qui ne contient aucune cible.

Remarque :

Contrôle interne (IC). L'IC est constitué de la RNase P humaine, présente chez les échantillons humains. L'AMPIPROBE® SARS-CoV-2 Test System utilise une séquence du gène de la RNase P humaine comme cible IC. La présence de RNase P humaine doit être détectée dans chaque échantillon de patient, les contrôles d'extraction (CE), ainsi que les contrôles positifs et négatifs (PC et NC). Le contrôle interne vérifie que l'acide nucléique est présent dans l'échantillon et est utilisé pour chaque échantillon analysé. Il est également utilisé en tant que contrôle d'extraction pour s'assurer que les échantillons jugés comme étant négatifs contiennent des acides nucléiques pour le test.

Contrôles positifs (PC). Le PC est l'ARN viral cible N1 et N2 de SARS-CoV-2 transcrit et purifié *in vitro*. Celui-ci est nécessaire pour vérifier que l'essai fonctionne comme prévu. Il est utilisé dans chaque plaque de test RT-PCR à partir de l'ajout du master mix. 12 µL de PC fourniraient 108 copies par PCR et équivalent à 1544 copies/mL de matière première. Le contrôle positif comprend également une cible RNase P et celui-ci fournit 2160 copies par PCR ; le résultat sera « positif » pour ce marqueur.

Contrôle négatif (NC). Le NC est nécessaire pour vérifier que le test fonctionne comme prévu et est utilisé sur chaque plaque de dosage à partir de l'ajout du master mix. Il ne contient pas de cible ARN SARS-CoV-2, mais une cible de RNase P transcrite *in vitro* à 2160 copies par PCR et se traduira comme résultat « Négatif » pour le SARS-CoV-2.

Contrôle « no-template » (NTC). Le NTC est nécessaire pour éliminer la possibilité de contamination d'échantillon durant le test et est utilisé dans chaque plaque de test RT-PCR.

En plus de ce qui précède, un contrôle d'extraction (EC) peut également être inclus. Le contrôle d'extraction (EC) à utiliser est un échantillon de patient négatif précédemment confirmé qui est repris lors de chaque procédure d'extraction. La présence de RNase P humaine doit être détectée dans le contrôle d'extraction. Il sert de contrôle négatif pour surveiller toute contamination croisée qui se produit pendant le processus d'extraction. En outre, il valide l'extraction réussie de l'ARN ainsi que les réactifs d'extraction.

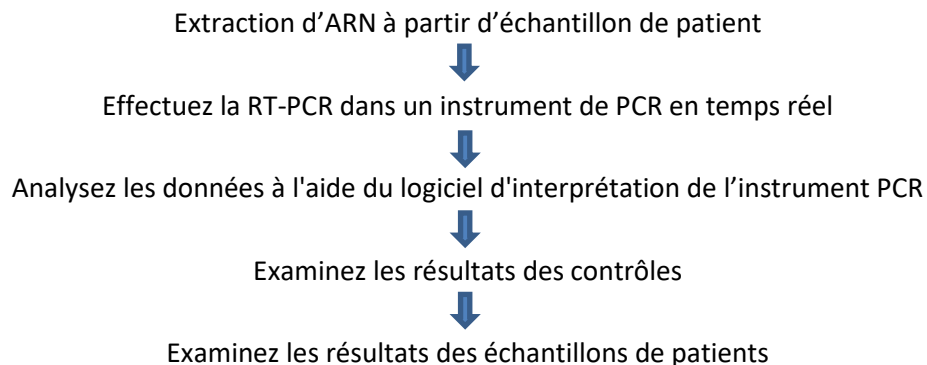
ACTION CORRECTIVE POUR DES RÉSULTATS HORS CONTRÔLE

1. Si un résultat de contrôle (PC, NC ou NTC) est invalide, l'étape de PCR est invalide et aucun résultat de patients ne peut être rapporté.
2. Action corrective, y compris l'examen du processus de traitement des échantillons, décontamination de la paillasse et / ou des postes de travail, répétition des tests de contrôle qualité et d'échantillons et une consultation avec les fabricants de kits et d'instruments, sera prise et documenté au besoin. En général, si les commandes sont en dehors de leur gamme attendue, tous les échantillons et contrôles de cette série doivent être traités à partir de l'étape de préparation des échantillons.

COLLECTE / TRANSPORT / STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS

Manipulez tous les échantillons et contrôles comme s'ils étaient capables de transmettre des agents infectieux. Les échantillons de voies respiratoires supérieures sont collectés dans un milieu de transport. Le BD Universal Viral Transport Medium avec 3 ml de milieu de collecte (BD # 220527) ou un dispositif de prélèvement **équivalent** sont acceptables pour le test SARS-CoV-2. Reportez-vous au manuel du fabricant pour connaître les procédures détaillées de prélèvement des échantillons.

FLUX DE TRAVAIL



Le flux de travail commence par l'extraction d'ARN à partir d'échantillons des voies respiratoires supérieures. L'ARN est isolé et purifié à partir de l'échantillon à l'aide de l'AMPIXTRACT™ SARS-CoV-2 Extraction kit (RUO) (Enzo ENZ-GEN225-0100). L'isolement d'ARN peut être effectué manuellement avec l'AMPIXTRACT™ SARS-CoV-2 Extraction kit ou via un processus automatisé utilisant une plateforme comme GENFLEX™ d'Enzo. Pour plus d'informations sur l'utilisation de la plateforme GENFLEX™, voir les sections **EXTRACTION D'ARN et PRÉPARATIONS de RÉACTIONS de RT-PCR (méthode automatisée utilisant la plateforme Enzo GENFLEX™)**. L'AMPIXTRACT™ SARS-CoV-2 Extraction kit (RUO) utilise la technologie des particules magnétiques pour l'isolement et la purification des acides nucléiques à partir d'échantillons des voies respiratoires supérieures. La technologie des particules magnétiques permet la purification d'acides nucléiques de haute qualité sans protéines, nucléases et autres impuretés.

L'ARN purifié est rétro-transcrit en ADNc et amplifié en utilisant l'AMPIPROBE® SARS-CoV-2 Assay kit (RUO) (Enzo ENZ-GEN230-0100) avec un instrument de PCR en temps réel, comme QuantStudio® 5 d'Applied Biosystems (AB # A28569).

Les données sont analysées, puis interprétées par le logiciel de l'instrument de RT-PCR.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS ET DES ÉCHANTILLONS

PRÉPARATION DES RÉACTIFS D'EXTRACTION

1. Solution de travail du réactif de lavage AMPIXTRACT™ : Ajoutez 200 ml d'éthanol à 100% dans chaque bouteille contenant le réactif de lavage (Wash Reagent). Conservez à température ambiante jusqu'à utilisation.



2. Solution de travail du réactif de lyse AMPIXTRACT™ : Ajoutez 40 mL d'éthanol à 100% dans chaque flacon contenant le réactif de lyse (Lysis Reagent). Mélangez bien avant utilisation. Conservez à température ambiante jusqu'à utilisation.
3. Stabilizer AMPIXTRACT™ : Placer le (s) flacon (s) de Stabilizer sur la plateforme GENFLEX™ une fois le réactif complètement décongelé.

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

1. Amenez les échantillons du patient à température ambiante. Préparez les tubes de prélèvement d'échantillons dans l'enceinte BSL2. Débouchez soigneusement les tubes d'échantillon, et tout en tenant le capuchon au-dessus du flacon, retirez soigneusement les écouvillons des échantillons de patients à l'aide d'une longue pince et jetez les écouvillons dans un contenant à déchets contenant une solution à 10% d'hypochlorite de sodium.
2. Procédez à l'extraction d'ARN et traitez les échantillons selon la méthode d'extraction d'ARN de votre choix.

EXTRACTION D'ARN ET PRÉPARATION DES RÉACTIONS DE RT-PCR (Méthode automatisée utilisant la plateforme Enzo GENFLEX™)

Les procédures suivantes concernent l'extraction automatique d'ARN et la réaction RT-PCR en utilisant la plateforme GENFLEX™ d'Enzo (ENZ-GEN-FLX). La plateforme GENFLEX™ comprend une station de travail de manipulation de liquides (Hamilton Microlab STAR™) et un instrument RT-PCR (Instrument de PCR en temps réel QuantStudio® 5 d'Applied Biosystems). Pour d'autres méthodes automatisées, reportez-vous au manuel d'utilisation du fabricant.

NOTES DE PROCÉDURE

1. Ne pas mélanger les composants de différents lots de kit ou utiliser des réactifs au-delà de la date d'expiration du kit.
2. Nettoyez soigneusement toutes les surfaces de travail avec de l'eau de Javel à 10% suivi d'éthanol à 70% frais avant et après chaque utilisation.
3. La plateforme GENFLEX™ doit être vérifiée avant les analyses quotidiennes. La documentation de ces procédures est enregistrée dans le dossier de maintenance de chaque instrument. Nous recommandons de suivre les instructions d'entretien données dans le manuel d'utilisation pour réduire le risque de contamination.
4. Il est recommandé de mettre sous tension la plateforme GENFLEX™, ainsi que l'unité de chauffage Inheco, avant la préparation des échantillons et des réactifs afin que le processus d'initialisation soit terminé avant que l'instrument ne soit nécessaire.
5. Avant de commencer une analyse, assurez-vous que vous disposez de suffisamment de réactifs pour le nombre d'échantillons que vous prévoyez d'analyser.
6. Utilisation de kits d'extraction en combinaison avec des systèmes d'amplification utilisant le contrôle d'extraction nécessite l'inclusion de ce contrôle dans la procédure de purification pour surveiller l'efficacité de la préparation des échantillons et du dosage en aval.
7. Étant donné que de petites quantités de liquide sont perdues pendant le transfert et le contact avec les billes magnétiques, le volume initial de la solution d'élution doit être supérieur au volume sélectionné pour garantir que l'éluat final est du volume correct.
8. Les ribonucléases (RNases) sont très stables et les enzymes actives ne nécessitent généralement pas de cofacteurs pour fonctionner. Puisque les RNases sont difficiles à inactiver et des quantités infimes suffisent pour détruire l'ARN, n'utilisez pas d'articles en plastique ou verrerie sans éliminer

au préalable une éventuelle contamination par RNase. Des précautions doivent être prises pour éviter d'introduire par inadvertance des RNases dans l'échantillon d'ARN pendant ou après la procédure de purification.

9. La PCR doit être mise en place immédiatement après extraction d'ARN. À court terme ou long terme, nous recommandons un stockage à $<-70^{\circ}\text{C}$ en évitant les cycles répétés de congélation et décongélation.

PROCÉDURE D'EXTRACTION

Préparation des échantillons pour l'extraction

1. Placez le contrôle d'extraction (EC), un échantillon de patient précédemment confirmé comme négatif, en position porte-échantillon **1**.
2. Une fois les écouvillons retirés des flacons d'échantillons de patient, placez les tubes d'échantillons contenant au moins 1.5 ml d'échantillon de patient, en commençant à la position **2** du porte-échantillon. Chargez tous les tubes d'échantillons sur des porte-échantillons supplémentaires, si nécessaire.
3. Une fois les échantillons, y compris le contrôle, placés dans le support avec les couvercles retirés, les amener soigneusement de l'enceinte BSL2 à la plateforme GENFLEX™ pour la procédure de chargement.

Préparation des réactifs pour l'analyse

1. Déballez les auge de 200 ml et 20 ml avant utilisation. Reportez-vous au **tableau 1** ci-dessous.

TABLEAU 1. Solutions de travail et volume des auge	
Solutions de travail	Volume des auge
AMPIXTRACT™ Wash Reagent	200 mL
AMPIXTRACT™ Lysis Reagent	200 mL
AMPIXTRACT™ PK Dilution Buffer	20 mL
AMPIXTRACT™ Magnetic Beads	20 mL
AMPIXTRACT™ Elution Buffer	20 mL

2. Transférez les réactifs des flacons fournis dans le kit dans les auge suivant les instructions telles qu'elles apparaissent sur l'écran de l'instrument.

Procédure d'extraction sur la plateforme GENFLEX™

Remarque : Le volume d'entrée de l'échantillon pour l'extraction est de 350 μL et le volume d'éluat d'acide nucléique est de 60 μL .

1. Mettez l'instrument sous tension, si ce n'est déjà fait. L'interrupteur d'alimentation (interrupteur vert) est situé dans le coin inférieur gauche de l'instrument.
2. Allumez l'unité de chauffage Inheco après la mise en marche de la plateforme GENFLEX™. L'interrupteur d'alimentation de l'unité de chauffage est situé à l'arrière de l'unité.
3. Cliquez sur l'icône «Method Manager» sur le bureau.
4. Sélectionnez l'icône COVID-19 en rouge dans la liste qui apparaît sur l'écran de l'instrument.
5. Cliquez sur l'icône verte «Run» à côté de la méthode COVID-19 pour lancer l'analyse.
6. Une fois que l'instrument a terminé son protocole de démarrage et son initialisation, une boîte de dialogue utilisateur s'affiche dans une fenêtre supplémentaire nommée «Run Control». Sélectionnez «Extraction» dans la fenêtre de saisie utilisateur. Cliquez sur "Continue" et dans la fenêtre suivante, choisissez le format de puits «96» pour la configuration PCR.

7. Dans l'écran suivant, sélectionnez «Primary Tube» comme type d'échantillon, saisissez le nombre d'échantillons chargés sur l'instrument, y compris le contrôle d'extraction. L'ajout du Stabilizer et de l'ARN carrier sont essentiels pour l'extraction du COVID-19 et l'ajout de ces réactifs doit être sélectionné.
8. Suivez les instructions qui s'affichent ensuite à l'écran. L'écran affichera une liste de contrôle des réactifs qui doivent être chargés sur le pont de la plateforme GENFLEX™ comme le montre la **Figure 1**. Cette liste de contrôle sert également d'instructions sur le transfert de chaque réactif vers des auge et sur le placement des auge dans des emplacements spécifiques le long de pistes données. De plus, il fournit des informations sur le placement des tubes contenant le Stabilizer, l'ARN carrier et la Protéinase. Les tubes contenant le Stabilizer, l'ARN carrier et la Protéinase du kit peuvent être placés directement sur la plateforme aux positions correctes comme indiqué sur la liste de contrôle des réactifs pour les placements.

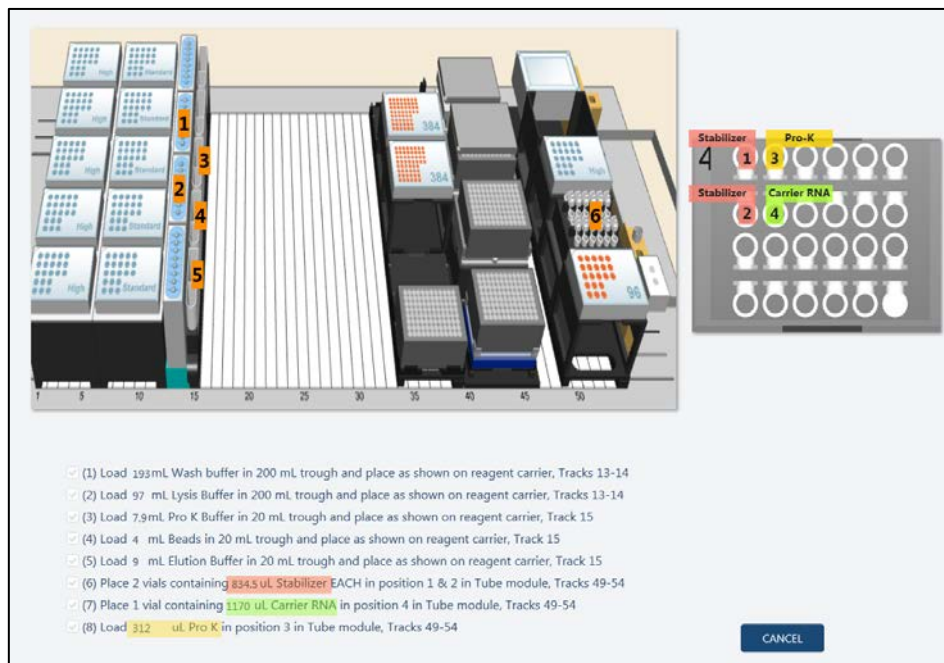


Figure 1. Schéma de disposition de la plateforme pour l'entrée des réactifs, comme illustré dans le logiciel GENFLEX™ Venus.

9. La **Figure 1** détaille les positions de chargement individuelles surlignées en rouge. Chargez les bacs individuels avec les volumes appropriés de réactifs du kit d'extraction indiqués dans le **tableau 2** ci-dessous pour 96 échantillons.

Tableau 2. Volume des réactifs d'extraction à ajouter aux auge individuelles			
Position de charge	Solutions de travail	Volume	Lignes (#)
1	AMPIXTRACT™ Wash Reagent pré-dilué	193 mL	13-14
2	AMPIXTRACT™ Lysis Reagent pré-dilué	97 mL	13-14
3	AMPIXTRACT™ PK Dilution Buffer	7.9 mL	15
4	AMPIXTRACT™ Magnetic Beads	4 mL	15
5	AMPIXTRACT™ Elution Buffer	9 mL	15
6	AMPIXTRACT™ Stabilizer	0.850 mL x 2 flacons	49-54
7	AMPIXTRACT™ Proteinase	0.312 mL	49-54
8	AMPIXTRACT™ Carrier RNA	1.2 mL	49-54

10. Une fois que les réactifs sont chargés comme indiqué et que la liste est vérifiée, cliquez sur «Continue».
11. Chargez les tubes d'échantillons et les consommables, y compris les porteurs de pointes noirs à filtre, la plaque à puits profonds et la plaque vide d'éluition pour PCR comme indiqué dans la **Figure 2**. Suivez la disposition de la plateforme comme indiqué dans le diagramme et le **Tableau 3** pour identifier les supports et les positions pour compléter le processus de chargement.



Figure 2. Schéma de disposition du plateau pour les consommables comme indiqué dans le logiciel GENFLEX™ Venus.

Tableau 3. Consommables à charger			
Position de charge	Consommables	N° de Catalogue	Lignes (#)
1	Pointes à filtre (1 mL)	Hamilton 235940	1-6
2	Pointes à filtre (300 µL)	Hamilton 235938	7-12
3	Tubes échantillon dans des supports à partir de l'emplacement 1	Sarstedt 72.703	30
4	Plaque 2 mL "ON MAGNET"	Thomas Scientific 1162C08	40-46
5	Rack complet de pointes à filtre de 1 mL dans module pour pointes	Hamilton 235940	49-54
6	Plaque vide pour PCR dans module pour PCR	DN Biotech 5371009	49-54

12. Placez les tubes d'échantillons avec le contrôle d'extraction et les échantillons de patient dans le support et faites glisser le support à travers les rails sur la plateforme de chargement. Le chargeur automatique de lecture de code-barres tirera le porte-échantillon vers le plateau de l'instrument une fois l'analyse commencée. D'ici là, les porte-échantillons doivent rester sur la plateforme de chargement. Placez la plaque à puits profonds, qui est appelée plaque de 2 mL «on magnet», comme indiqué dans le tableau ci-dessus et une plaque PCR vide qui sert de plaque d'éluition sur le module PCR comme indiqué sur la disposition du pont et dans le tableau ci-dessus.

13. Cliquez sur «Continue» une fois le processus de chargement des consommables terminé. L'onglet «Continue» n'apparaîtra qu'après la sélection des éléments de la liste de contrôle.
14. L'écran suivant qui apparaît affichera le nombre minimum de pointes de 1 mL nécessaires pour l'extraction en fonction du nombre d'échantillons entré.
15. Cliquez sur «Continue». La fenêtre suivante affichera la disposition des pointes de 1 mL sur le pont. Voir **Figure 3**. Chargez le nombre nécessaire de pointes jusqu'à ce que le manchon en plastique qui contient chacune des 96 pointes s'enclenche dans le porte-pointes du plateau. Assurez-vous que le nombre de pointes chargés sur le pont atteint au moins ou dépasse le nombre de pointes nécessaires à l'extraction.

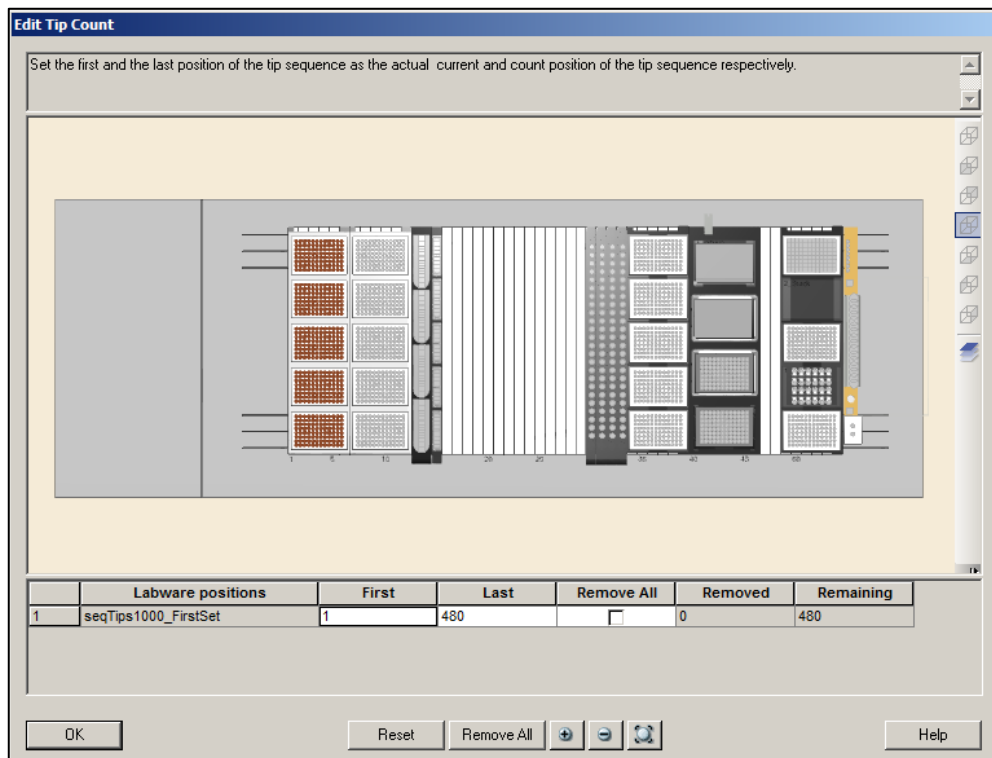


Figure 3. Emplacement des pointes chargées nécessaires à l'analyse dans le logiciel GENFLEX™ Venus

16. Dans l'affichage interactif, saisissez l'emplacement réel des pointes de 1 mL chargés sur le pont en cliquant ou en faisant glisser les positions des pointes. Lorsqu'elles sont sélectionnées, les positions chargées seront surlignées en marron.
17. Assurez-vous que la disposition physique des pointes de 1 mL qui viennent d'être chargés sur le pont est identique à la disposition des pointes de 1 mL surlignées en marron. Si d'autres pointes doivent être ajoutées, effectuez un zoom avant sur l'affichage, puis sélectionnez soit les emplacements individuels des pointes, les colonnes ou le format 96 puits entier en cliquant ou en faisant glisser les positions des pointes. Cliquez sur «OK» après que les positions de la séquence de pointes soient mises à jour en marron dans l'affichage correspondant à la disposition réelle des pointes sur le pont.
18. Les écrans suivants afficheront le nombre de pointes de 300 µL nécessaires pour l'analyse. La fenêtre de saisie pour la mise à jour de l'emplacement des pointes sera affichée. Mettez à jour le nombre de pointes dans la fenêtre affichée puis cliquez sur «OK».
19. L'extraction commencera et plusieurs fenêtres affichant les durées des étapes d'incubation apparaîtront pendant l'analyse. Aucune entrée de l'utilisateur n'est nécessaire jusqu'à la fin de l'analyse.

20. Une fois le processus terminé, une fenêtre indiquant «AMPIPROBE is now complete» s'affichera.
21. Cliquez sur «Continue» pour fermer la fenêtre «Run Control» du logiciel.
22. Les échantillons sont maintenant prêts pour les applications en aval. Gardez la plaque d'éluotion d'ARN scellée avec le film adhésif à 4°C si la PCR est réalisée dans les 2-3 heures, ou à <-70°C pour une utilisation ultérieure.

Préparation du Master Mix de RT-PCR (MMX)

Remarque : La préparation MMX doit être effectuée sous hotte PCR, et cette hotte doit résider à l'extérieur de la zone de post-amplification (de préférence dans la salle de pré-amplification). Tous les réactifs utilisés dans la préparation MMX proviennent du kit de test AMPIPROBE® SARS-CoV-2 (RUO) (ENZ-GEN230-0100) et tous les contrôles proviennent du kit de contrôles AMPIPROBE® SARS-CoV-2 (RUO) (ENZ-GEN231-0004).

1. Retirez tous les réactifs RT-PCR de la boîte de l'AMPIPROBE® SARS-CoV-2 Assay kit et tous les contrôles PCR de la boîte d'AMPIPROBE® SARS-CoV-2 Controls. Décongeler les réactifs à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 10 à 15 minutes, à l'exception de l'AMPIPROBE® RT-PCR Enzyme Mix. Le mélange d'enzymes RT-PCR du kit doit toujours rester sur glace ou dans le congélateur à -20°C jusqu'à ce qu'il soit nécessaire. Tous les autres réactifs, après avoir été décongelés, doivent être placés dans un seau à glace ou une grille froide pour être conservés pendant la préparation.
2. La quantité de réactifs MMX requise pour la procédure peut être calculée à l'aide du tableau suivant (tableau 4).

Tableau 4. RT-PCR Master Mix (MMX)		
REACTIFS MMX AMPIPROBE®	Volume par échantillon ou contrôle	Calcul pour la procédure d'aliquotage (n* + 40)
RT-PCR Buffer	10 µL	10 x (n + 40) µL
SARS-CoV-2 Primer/Probe Mix	2 µL	2 x (n + 40) µL
RT-PCR Enzyme Mix	1 µL	1 x (n + 40) µL

* n est le nombre d'échantillons préparés, qui comprend les 3 contrôles AMPIPROBE® SARS-CoV-2 et 1 contrôle d'extraction (EC).

3. Une fois que la quantité de chaque réactif a été déterminée, utilisez un tube de 1.5 ml pour préparer le MMX. Vortexez chaque tube (à l'exception du mélange enzymatique) pendant trois secondes, puis centrifugez-les brièvement pour éliminer tout excès des bouchons.
4. Ajoutez les réactifs MMX dans l'ordre indiqué dans le tableau ci-dessus pour la PCR. Au lieu de vortexer le mélange d'enzymes RT-PCR, il suffit de donner quelques légers coups sur le tube trois fois et de centrifuger brièvement pour éliminer l'excès du bouchon, puis d'ajouter le volume requis pour compléter le MMX. Une fois le MMX préparé, retournez le tube dix fois, centrifugez brièvement, puis placez-le sur glace ou à 2-8°C, à l'abri de la lumière directe jusqu'à ce qu'il soit nécessaire pour la configuration de la PCR.

Remarque : Le MMX préparé peut être conservé jusqu'à 20 minutes avant chargement et démarrage de l'instrument de PCR en temps réel QuantStudio® 5 d'Applied Biosystems.

5. Procédez à la configuration de l'aliquotage MMX et à l'ajout des échantillons d'ARN par la plateforme GENFLEX™.

Configuration de la plateforme GENFLEX™ pour les réactions PCR

Remarque : la plate-forme GENFLEX™ utilise le logiciel Venus, version 3.

1. Si la PCR est configurée immédiatement après extraction, n'éteignez pas la plate-forme GENFLEX™ et ne fermez pas la fenêtre Method Manager sur le bureau. Si l'instrument est hors tension, mettez l'interrupteur d'alimentation sous tension. L'interrupteur d'alimentation (interrupteur vert) est situé dans le coin inférieur gauche de l'instrument.
2. Double-cliquez sur l'icône «Method Manager» sur le bureau de l'ordinateur. Cliquez sur «Execute» à côté de l'icône COVID-19 et sélectionnez «PCR» dans la fenêtre Sélection de l'analyse d'entrée utilisateur.
3. Dans la fenêtre suivante qui s'affiche, sélectionnez «96» pour le format 96 puits pour la PCR, et cliquez sur «Continue». Sélectionnez le fichier de code-barres contenant les informations d'échantillons dans «C:\Outputfiles\SampleBarcodes». Sélectionnez le fichier de code-barres pour échantillon avec l'horodatage correct et cliquez sur «Continue». Une boîte de dialogue apparaîtra pour sélectionner si les contrôles seront utilisés durant la PCR. Sélectionnez «Yes» et cliquez sur «Continue».
4. Dans la fenêtre suivante qui s'affiche, saisissez le nombre d'échantillons pour la configuration de la PCR, comme indiqué sur la troisième ligne de la **Figure 4** et similaire au format suivi durant l'extraction. Pour une plaque entière, 92 échantillons de patients peuvent être analysés ainsi qu'un contrôle d'extraction, soit 93 échantillons. Dans ce cas, le nombre de plaques PCR à préparer serait de 1, le volume du Master Mix serait de 13 µL et la colonne de matrice d'ADN, qui est l'ARN, serait de 12 µL sur les 60 µL d'éluât total obtenu après extraction. Dans la fenêtre suivante, sélectionnez les échantillons à partir de la carte de plaque. Notez que le nombre d'échantillons sélectionnés sur la carte doit correspondre au nombre d'échantillons saisis dans la fenêtre précédente. Si le nombre d'échantillons sélectionnés sur la carte ne correspond pas au nombre d'échantillons saisis, un message d'erreur vous invite à re-sélectionner les échantillons sur la carte.

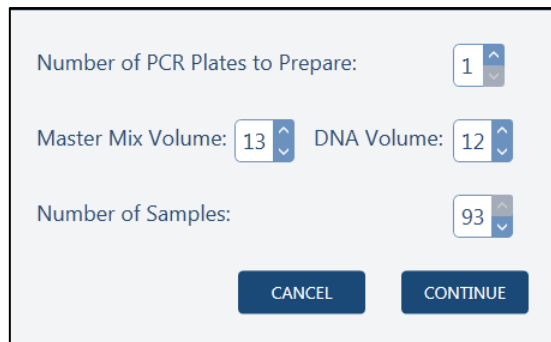


Figure 4. Fenêtre d'entrée affichant le nombre d'échantillons pour la PCR.

5. Dans la fenêtre suivante affichée, choisissez la plaque à laquelle vous souhaitez ajouter les contrôles (une seule plaque est requise pour le test COVID, le protocole standard consiste donc à sélectionner la plaque 1). Cliquez sur «Continue» et dans la fenêtre suivante affichée, sélectionnez les options de distribution multiple. Le protocole standard pour la méthode COVID est d'avoir un mélange dit «master» distribué en plusieurs fois et l'ARN en une seule distribution. Le diagramme de disposition de la plateforme montrant les emplacements des pointes à filtre, de la plaque PCR, de la plaque d'ARN et des flacons contenant les standards et les mélanges dits «master» à charger s'affiche ensuite comme illustré dans la **Figure 5**. Chargez les pointes à filtre, suivis des plaques et des standards comme indiqué dans le diagramme. Après avoir vérifié la liste, cliquez sur «Continue».

Une fenêtre pour charger et confirmer les emplacements des pointes de 300 µL apparaîtra similaire au diagramme illustré dans la **Figure 3**. La distribution multiple et la configuration de la PCR démarreront et une fenêtre affichant «AMPIPROBE PCR setup complete» indiquera la fin de la configuration. Sceller la plaque avec le film adhésif.

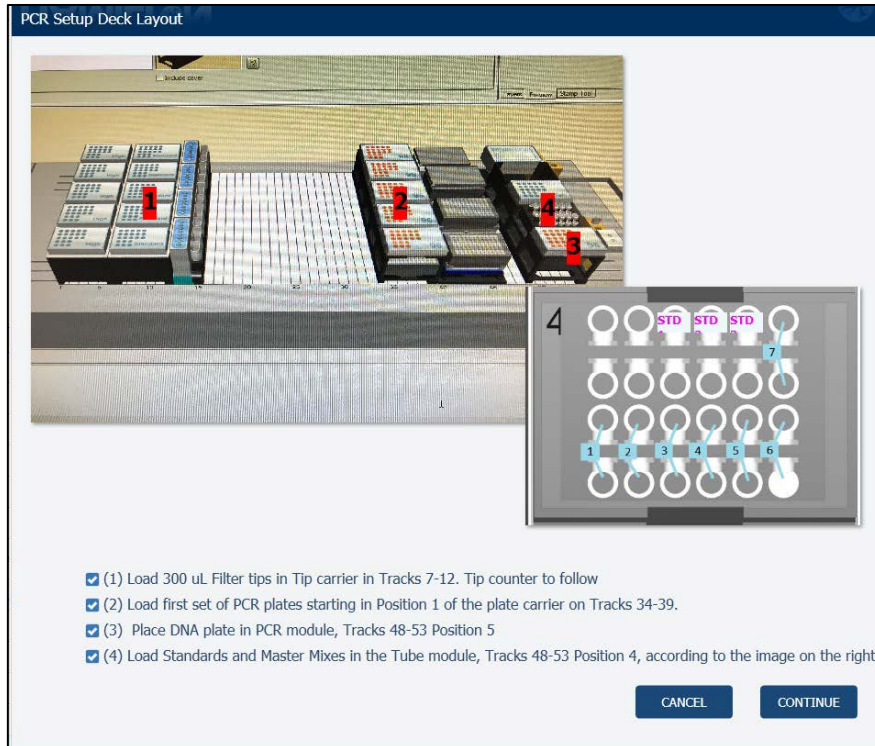


Figure 5. Diagramme pour charger les pointes, les plaques et les flacons aux emplacements spécifiés.

6. Effectuez la RT-PCR en utilisant la procédure décrite dans la section RT-PCR UTILISANT L'INSTRUMENT DE PCR EN TEMPS RÉEL QUANTSTUDIO® 5 D'APPLIED BIOSYSTEMS™.

EXTRACTION D'ARN ET PRÉPARATION DES RÉACTIONS DE RT-PCR (Méthode manuelle)

EXTRACTION D'ARN (méthode manuelle)

L'extraction manuelle peut être effectuée à partir d'un volume d'entrée d'échantillon de 350 µL à l'aide de l'AMPIXTRACT™ SARS-CoV-2 Extraction kit (RUO), ENZ-GEN225-0100.

Avant de commencer

1. Déterminez le nombre de réactions requises en fonction du nombre d'échantillons de patients à traiter et de contrôles par plaque.
2. Amenez tous les échantillons à température ambiante.
3. Préparez les solutions de travail du réactif de lavage et du réactif de lyse AMPIXTRACT™ comme décrit dans la section **RÉACTIFS ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS**.
4. Décongelez un ou plusieurs tubes de réactif **Stabilizer** et placez-le sur de la glace.
5. Diluez 30 fois le réactif Proteinase fourni dans le kit dans du tampon de dilution PK conformément au tableau suivant:

Composant	Volume par puits*
Proteinase K	2 µL
PK Dilution Buffer	58 µL
Volume total par puits	60 µL

*Incluez 10% de surplus lors de la création d'un master mix pour plusieurs puits.

6. Préparez le réactif de lyse complet selon le tableau suivant:

Composant	Volume par puits*
Lysis Buffer	900 µL
Carrier RNA	10 µL
Stabilizer	14 µL
Volume total par puits	924 µL

*Incluez 10% de surplus lors de la création d'un master mix pour plusieurs puits.

Traitez les échantillons

Remarque : *Si lors de l'aspiration du surnageant de lyse, du surnageant de lavage, ou si l'éluât entraîne l'aspiration du culot de billes, renvoyez le liquide dans son puits, remplacez la plaque sur l'aimant de la plaque et ré-aspirez soigneusement le liquide.*

1. Ajoutez 350 µL d'échantillons dans les puits d'une plaque à puits profonds (DWP).
2. Ajoutez 60 µL de protéinase diluée dans chaque puits pour digérer les échantillons. Incubez la plaque pendant 10 minutes sur un agitateur chauffant réglé à 56°C et 500 tours / minute.
3. Lysez les échantillons en ajoutant 924 µL de réactif de lyse dans chaque puits d'échantillon. Incubez la plaque pendant 15 minutes sur l'agitateur chauffant réglé à 56°C et 500 tours / minute pour une lyse efficace.
4. Vortexez les billes magnétiques et ajoutez 20 µL dans chaque puits d'échantillon. Incubez la plaque pendant 10 minutes sur l'agitateur chauffant réglé à 56 ° C et 1100 tours / minute.
5. Après incubation, placez la plaque sur un aimant de plaque pour une plaque à 96 puits (par exemple Alpaqua # A000400) pendant 3 minutes. Aspirez soigneusement le surnageant sans déloger le culot de billes et jetez le surnageant.
6. Retirez la plaque de l'aimant de plaque, puis ajoutez 950 µL de tampon de lavage (pré-mélangé avec de l'éthanol) dans chaque puits d'échantillon. Incubez la plaque pendant 2 minutes sur l'agitateur chauffant réglé à 56°C et 1300 tours / minute.
7. Lavez et séchez les billes.
 - 7.1 Placez la plaque sur l'aimant de la plaque pendant 1 minute, aspirez le surnageant et jetez-le.
 - 7.2 Retirez la plaque de l'aimant de plaque et répétez l'étape de lavage en ajoutant 950 µL de tampon de lavage (pré-mélangé avec de l'éthanol), puis incubez pendant 2 minutes sur l'agitateur chauffant réglé à 56°C et 1300 tours / minute.
 - 7.3 Placez la plaque sur l'aimant de plaque pendant 1 minute, puis aspirez et jetez le surnageant. Retirez complètement le tampon de lavage pour faciliter un séchage efficace des billes à l'étape suivante.
 - 7.4 Laissez sécher les billes en plaçant la plaque pendant 30 minutes sur l'agitateur chauffant réglé à 56°C et 500 tours / minute. Assurez-vous que les billes sont complètement sèches avant de passer à l'étape d'élution. Pour assurer une élution efficace, les billes doivent être complètement sèches.
8. Éluiez l'ARN.
 - 8.1 Ajoutez 60 µL de tampon d'élution dans chaque puits. Incubez la plaque pendant 10 minutes à 56°C tout en agitant à 1400 tours / minute pour l'élution des acides nucléiques.

- 8.2 Placez la plaque sur l'aimant de plaque pendant 1 minute. Retirez et conservez le surnageant ou l'éluât qui contient l'ARN du SARS-CoV-2.
9. Conservez l'éluât, qui contient l'ARN du SARS-CoV-2 extrait, à -80°C pour une utilisation ultérieure. Scellez la plaque immédiatement pour éviter l'évaporation avant de la transférer à -80°C.

PRÉPARATION DE LA RÉACTION RT-PCR (méthode manuelle)

La procédure décrite ci-dessous concerne l'utilisation de l'échantillon d'ARN extrait à l'aide d'un volume originel d'échantillon de 350 µL.

Avant de commencer

1. Pour éviter toute contamination, préparez les réactifs dans un poste de travail PCR ou une zone équivalente libre d'amplicons.
2. N'utilisez pas la même pipette pour les contrôles et les échantillons. Utilisez toujours des pointes à pipette avec barrière anti-aérosol.
3. Les contrôles suivants fournis dans AMPIPROBE® SARS-CoV-2 Controls, ENZ-GEN231-0004, doivent être inclus pour chaque série afin d'interpréter avec précision les résultats des patients :
 - Un contrôle positif (PC) contenant les cibles SARS-CoV-2 N1 et N2, et la cible RNase P humaine.
 - Un contrôle négatif (NC) contenant la cible RNase P humaine.
 - Un contrôle « no-template » (NTC) qui ne contient aucune cible.

En plus de ce qui précède, un **contrôle d'extraction (EC)** peut également être inclus. Le contrôle d'extraction (EC) à utiliser est un échantillon de patient négatif préalablement confirmé qui est utilisé pour chaque procédure d'extraction. Pour plus d'informations, reportez-vous à la section **Contrôle qualité**.

Préparation du Master Mix (MMX)

Le Master Mix (MMX) est préparé à l'aide des réactifs fournis dans l'AMPIPROBE® Kit de test SARS-CoV-2, ENZ-GEN230-0100.

1. La quantité de réactifs MMX requise pour la procédure peut être calculée en utilisant le tableau suivant.

Réactifs AMPIPROBE® MMX	Volume par échantillon	Calcul pour l'aliquotage (n*+ 3)
Tampon RT-PCR	10 µL	10 x (n + 3) µL
Mélange amorce/sonde SARS-CoV-2	2 µL	2 x (n + 3) µL
Mélange enzyme RT-PCR	1 µL	1 x (n + 3) µL

* n est le nombre d'échantillons préparés, qui comprend les 3 contrôles AMPIPROBE® SARS-CoV-2 et 1 contrôle d'extraction (EC).

2. Une fois que la quantité de chaque réactif a été déterminée, utilisez un tube de 1.5 mL pour préparer le MMX. Vortexez chaque réactif du kit (sauf le RT-PCR Enzyme Mix) pendant trois secondes, puis centrifugez brièvement pour recueillir le liquide au bas des tubes.
3. Ajoutez les réactifs MMX dans l'ordre indiqué dans le tableau ci-dessus pour la configuration PCR.
Remarque : NE PAS vortexer le mélange d'enzymes RT-PCR. Il suffit de feuilleter doucement le tube trois fois, puis centrifugez brièvement pour recueillir le liquide au fond du tube.

Ajoutez ensuite le volume requis du mélange d'enzymes RT-PCR pour terminer MMX. Une fois le MMX préparé, retournez le tube dix fois, centrifugez brièvement et puis placez sur de la glace ou à 2-8°C, à l'abri de la lumière directe, jusqu'à ce qu'il soit nécessaire pour la préparation de la PCR.

Remarque : le MMX préparé peut être conservé jusqu'à 20 minutes sur la glace avant le chargement et démarrage de l'instrument de PCR en temps réel.

RT-PCR AVEC L'INSTRUMENT DE PCR EN TEMPS RÉEL QUANTSTUDIO® 5 D'APPLIED BIOSYSTEMS™

La procédure décrite ci-dessous concerne la préparation et l'exécution de la RT-PCR à l'aide de l'instrument de PCR en temps réel QuantStudio® 5 d'Applied Biosystems. Pour plus d'informations sur l'instrument de PCR en temps réel QuantStudio® 5, reportez-vous au manuel de l'instrument. Si vous utilisez un instrument différent reportez-vous au manuel du fabricant, utilisant les mêmes paramètres indiqués dans le tableau 5.



Figure 6. Applied Biosystems QuantStudio® 5

Assurez-vous que le QuantStudio® 5 d'Applied Biosystems (illustré en **figure 6**) est mis sous tension en premier, suivi de l'ordinateur de l'instrument. L'interrupteur d'alimentation de l'instrument est situé à l'arrière de l'instrument. Une fois que l'instrument et l'ordinateur ont terminé leurs démarrages, ouvrez le logiciel «QuantStudio® Design and Analysis» sur le bureau. Sur l'écran tactile de l'instrument PCR, allez dans «File» → «New Experiment» → «From template» → «COVID template 2». Puis procédez comme suit :

1. Dans le menu Fichier, cliquez sur «Import Plate Setup» et sur le fichier «Plate Import». Entrez le nom du fichier avec toutes les notes pertinentes sur l'analyse (c'est-à-dire le nom et la date de la charge) dans l'onglet «Experiment Properties»; puis cliquez sur «Next».

Vérifiez que la température et les cycles correspondent aux paramètres indiqués dans le **tableau 5** ci-dessous. Cliquez sur «Next» et dans l'onglet «Advanced Setup», assurez-vous que le nombre d'échantillons sélectionnés sous l'onglet «Sample» correspond au nombre d'échantillons en cours de traitement. Assurez-vous que FAM, HEX et Cy5 sont affichés et sélectionnés comme «Targets». Le canal vert, qui est FAM, correspond à la cible SARS-CoV-2 N1, le canal jaune, qui est HEX, correspond à la cible RNase P, et le canal rouge, qui est Cy5, correspond à la cible SARS-CoV-2 N2.

Tableau 5. Cycles et températures pour l'essai SARS-CoV-2 par PCR				
Paramètre	Transcription inverse	Activation enzymatique	Amplification/détection	
Cycles	1	1	40	
Segment	1	1	1	2
Cible [°C]	50°	95°	95°	58°
Maintien [mm:ss]	30:00	02:00	00:03	00:30

- Chargez la plaque PCR contenant l'ARN et le Master Mix dans l'instrument PCR. Pour charger la plaque, touchez l'icône d'éjection du tiroir d'instrument (1) située en haut à droite, comme illustré en **Figure 7**, et placez la plaque PCR avec le mélange réactionnel dans le tiroir. Cliquez sur «Start Run» dans l'onglet «Run».



Figure 7. Ecran du QuantStudio® 5 d'Applied Biosystems.

- Cliquez sur «Start Run» pour commencer la RT-PCR.
- Une fois que l'analyse est terminée avec la procédure, les données brutes doivent être analysées, afin de déterminer les résultats pour chaque échantillon.

ANALYSE DES DONNÉES

Pour l'analyse des données et l'interprétation des résultats, vous devez utiliser le logiciel fourni avec votre instrument de RT-PCR. L'analyse des données décrite ci-dessous et l'interprétation des résultats dans la section suivante utilisent l'instrument de PCR en temps réel et logiciel QuantStudio® 5 d'Applied Biosystems. Pour plus d'informations, reportez-vous au manuel du fabricant.

Détermination de C(t)

1. L'amplification et la détection effectuées sur le QuantStudio® 5 d'Applied Biosystems seront analysées avec l'aide du logiciel pour obtenir le franchissement de seuil, C(t), pour chaque canal.
2. Pour l'analyse PCR, le canal vert correspond à la cible SARS-CoV-2 N1, le canal jaune correspond à la RNase P (RP) et le canal rouge correspond à la cible SARS-CoV-2 N2.

RÉSULTATS

Les résultats attendus pour les contrôles et leurs interprétations sont énumérés ci-dessous. Tous les contrôles doivent produire des résultats valides pour que l'expérience soit validée. Voir le **tableau 6** ci-dessous pour l'interprétation des contrôles.

Tableau 6. Interprétation des contrôles				
Contrôle	SARS-CoV-2 N1 C(t)	SARS-CoV-2 N2 C(t)	RNase P C(t)	Interprétation
Contrôle positif	<40.0	< 40.0	< 40.0	Résultat valide
Contrôle d'extraction	Négatif, C(t) non-déecté	Négatif	< 40.0	Résultat valide
Contrôle "no template" (NTC)	Négatif	Négatif	Négatif	Résultat valide

TROUBLESHOOTING

Catégorie	Commentaires et suggestions
Manipulation générale de la plateforme GENFLEX™.	Pendant l'analyse, si un message d'erreur apparaît, cliquez sur «Repeat» puis cliquez sur «Execute». Si l'erreur persiste, cliquez sur «Abort».
Précipitation dans les réactifs.	Laissez toute précipitation se dissoudre complètement avant le chargement des réactifs sur le pont de la plateforme GENFLEX™.
Les billes magnétiques ne sont pas complètement remises en suspension.	Mélangez les billes magnétiques AMPIXTRACT™ par vortex avant de transférer les billes dans les auges. Cela garantit le transfert complet des billes vers les auges et une meilleure remise en suspension des billes sur l'instrument.
Les échantillons congelés ne sont pas mélangés de manière appropriée après décongélation.	Mélangez le contenu du flacon du Stabilizer AMPIXTRACT™ avec une pipette manuelle après décongélation du produit.
Acides nucléiques dégradés.	Toutes les surfaces de travail doivent être nettoyées avec 10% d'eau de javel, suivi d'une solution d'éthanol à 70% avant de démarrer l'extraction et PCR. Utilisez des pointes de pipette filtrées sans RNase pour empêcher toute introduction de RNases lors de la préparation du Master Mix.
Lyse incomplète de l'échantillon.	Assurez-vous que le volume correct d'éthanol est ajouté au Réactif de lyse AMPIXTRACT™ avant le chargement sur l'instrument.



INFORMATIONS DE CONTACT

GLOBAL HEADQUARTERS

Enzo Life Sciences Inc.
10 Executive Boulevard
Farmingdale, NY 11735
Toll-Free: 1.800.942.0430
Phone: 631.694.7070
Fax: 631.694.7501
info-usa@enzolifesciences.com

EUROPE

Enzo Life Sciences (ELS) AG
Industriestrasse 17
CH-4415 Lausen
Switzerland
Phone: +41/0 61 926 89 89
Fax: +41/0 61 926 89 79
info-ch@enzolifesciences.com