



Lyra[®]Direct
SARS-CoV-2 ASSAY

Pour la détection qualitative de l'ARN viral du coronavirus humain SARS-CoV-2 provenant d'échantillons nasaux, nasopharyngés et oropharyngés prélevés sur écouvillons.

Pour diagnostic *in vitro*.

R_x ONLY

Un glossaire des symboles peut être consulté sur quidel.com/glossary.

CONTENU

| | |
|---|----|
| UTILISATION PRÉVUE | 2 |
| RÉSUMÉ ET EXPLICATIONS | 3 |
| PRINCIPE DE LA PROCÉDURE | 3 |
| MATÉRIEL FOURNI | 4 |
| MATÉRIEL REQUIS NON FOURNI | 4 |
| AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS | 5 |
| STOCKAGE ET MANIPULATION DES REACTIFS DU KIT | 6 |
| Indications d'instabilité ou de détérioration des réactifs | 6 |
| PRELEVEMENT, CONSERVATION ET MANIPULATION DES ECHANTILLONS | 6 |
| CONSERVATION DES ECHANTILLONS TRAITES | 6 |
| PROCÉDURE DE DOSAGE | 6 |
| Procédure de traitement des échantillons | 6 |
| Procédure de réhydratation du Master Mix | 7 |
| Procédure d'installation RT-PCR | 7 |
| CONTRÔLE QUALITÉ | 7 |
| INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DES ÉCHANTILLONS DES PATIENTS | 8 |
| PERFORMANCES CLINIQUES | 9 |
| Étude 1 | 9 |
| Étude 2 | 10 |
| Etude 3 | 10 |
| PERFORMANCE ANALYTIQUE | 10 |
| Limite de détection | 10 |
| Étude 1 | 10 |
| Étude 2 – Étude de LDD comparative pour le Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay and the Lyra SARS-CoV-2 Assay | 11 |
| Résultats de l'étude de confirmation de la LDD | 11 |
| REACTIVITE ANALYTIQUE (INCLUSIVITE) | 13 |

| | |
|--|----|
| SPECIFICITE ANALYTIQUE REACTIVITE CROISEE) | 14 |
| SUBSTANCES INTERFERENTES | 15 |
| LIMITES | 16 |
| ASSISTANCE CLIENT ET TECHNIQUE | 16 |
| PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE | 17 |
| RÉFÉRENCES | 17 |
| ANNEXE (PROGRAMMATION ET PROTOCOLES DE TEST SPECIFIQUES DE CHAQUE THERMOCYCLEUR) | 18 |
| Instructions de programmation de l'Applied Biosystems 7500 Fast Dx | 18 |
| Procédure de test de l'Applied Biosystems 7500 Fast Dx Thermocycler | 20 |
| Instructions de programmation de l'Applied Biosystems 7500 | 21 |
| Procédure de test de l'Applied Biosystems 7500 Thermocycler Standard | 23 |
| Procédure de programmation du système Bio-Rad CFX96 Touch Thermocycler | 23 |
| Procédure de test du système Bio-Rad CFX96 Touch Thermocycler | 25 |
| Instructions de programmation pour le système Qiagen Rotor-Gene Q | 26 |
| Cycle de test avec le système Qiagen Rotor-Gene Q | 28 |
| Instructions de programmation du LightCycler 480 Instrument II de Roche | 28 |
| Créer un modèle de cycle pour le LightCycler 480 Instrument II. | 28 |
| Créer une procédure de test pour le LightCycler 480 Instrument II Assay | 30 |
| Instruction de programmation de l'instrument Roche cobas z 480 | 31 |
| Créer un modèle de cycle pour l'instrument cobas z 480 Assay. | 31 |
| Créer une procédure de test pour le cobas z 480 Assay | 32 |
| Instructions de programmation pour l'instrument Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro | 33 |
| Instructions de programmation des séries de test pour l'instrument Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro | 33 |
| Créer une procédure de test avec l'instrument Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro | 35 |
| GLOSSAIRE | 37 |



Le Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay est un test RT-PCR en temps réel destiné à la détection qualitative de l'acide nucléique du SARS-CoV-2 provenant d'échantillons nasaux (NS), nasopharyngés (NP) ou oropharyngés (OP) sur écouvillon de patients suspectés d'infection à la COVID-19 par leur prestataire de soins de santé. Le test cible la polyprotéine non structurale (pp1ab) du virus SARS-CoV-2.

Les résultats visent à identifier l'ARN du SARS-CoV-2. Le 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 ; il est nécessaire d'établir une corrélation clinique entre les antécédents du patient et d'autres informations diagnostiques afin de déterminer le statut infectieux du patient. Des résultats positifs n'excluent pas une infection bactérienne ou une co-infection par d'autres virus. Les laboratoires des États-Unis et de leurs territoires sont tenus de communiquer tous les résultats positifs aux autorités de santé publique compétentes.

Des résultats négatifs n'excluent pas une infection par le SARS-CoV-2 et ne doivent pas être l'unique base pour la prise de décisions concernant la prise en charge des patients. Des résultats négatifs doivent être associés à des observations cliniques, aux antécédents du patient et aux informations épidémiologiques.

Le Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay est réservé au personnel de laboratoire qualifié qui connaît et qui a été spécifiquement formé aux techniques de PCR en temps réel et aux procédures diagnostiques *in vitro*.

RÉSUMÉ ET EXPLICATIONS

Le SARS-CoV-2, aussi appelé virus de la COVID-19, a été identifié pour la première fois à Wuhan, dans la province de Hubei, en Chine, en décembre 2019. Ce virus, comme les nouveaux coronavirus SARS-1 et MERS, proviendrait des chauves-souris, mais le SARS-CoV-2 pourrait avoir eu un hôte intermédiaire comme les pangolins, les porcs ou les civettes.¹ Début avril 2020, l'infection humaine s'était étendue à 180 pays, affectant plus de 846 000 personnes et faisant plus de 41 400 victimes.¹ Le 11 mars, l'OMS a qualifié la situation liée au SARS-CoV-2 de pandémie.

On estime que le temps d'incubation médian est de 5,1 jours et que les symptômes apparaissent dans les 12 jours suivant l'infection.³ Les symptômes de la COVID-19 sont semblables à ceux d'autres maladies respiratoires virales et comprennent de la fièvre, de la toux et un essoufflement.⁴

Le Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay a été conçu pour détecter spécifiquement l'ARN du SARS-CoV-2.

PRINCIPE DE LA PROCÉDURE

Le test Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay détecte l'ARN viral du SARS-CoV-2 extrait de l'échantillon d'un patient au moyen d'une simple étape de traitement thermique. Une réaction RT-PCR en temps réel multiplexe est réalisée dans des conditions optimisées dans un seul tube et génère des amplicons du virus ciblé (si présent) et du contrôle (PRC) présent dans l'échantillon. Cette réaction est réalisée grâce à l'un des sept thermocycleurs : Applied Biosystems® 7500 Fast Dx, Applied Biosystems® 7500 Standard, Roche LightCycler® 480 Instrument II, Roche cobas® z 480, Qiagen Rotor-Gene® Q, Bio-Rad CFX96 Touch™, ThermoFisher QuantStudio™ 7 Pro. L'identification du virus SARS-CoV-2 se fait par l'utilisation d'amorces spécifiques à la cible et de sondes marquées par fluorescence qui s'hybrident à une région conservée de la polyprotéine non structurale du virus SARS-CoV-2.

| Étiquettes de sonde pour le test Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay | |
|---|--------------------|
| Cible | Colorant |
| Polyprotéine non structurale (pp1ab) | FAM |
| Contrôle (PRC) | Quasar® 670 ou Cy5 |

Ce qui suit est un résumé de la procédure :

- Prélèvement d'échantillons** : prélever un écouvillon nasal, nasopharyngé ou oropharyngé, au moyen des techniques standard. Ces échantillons sont transportés, conservés et traités conformément aux instructions ci-dessous.¹
- Extraction de l'acide nucléique** : extraire les acides nucléiques en ajoutant l'échantillon sur écouvillon à 400 µl du tampon et en chauffant à 95 °C pendant 10 minutes. Le témoin (PRC) se trouve dans le tampon et sert à surveiller les inhibiteurs de l'échantillon extrait, et à garantir qu'une amplification adéquate a eu lieu.
- Réhydratation du Master Mix** : réhydrater le Master Mix lyophilisé en utilisant 135 µl de solution de réhydratation. Le Master Mix contient des amorces oligonucléotidiques, des sondes marquées par un fluorophore et par un extincteur de luminescence (quencher) ciblant des régions conservées du SARS-CoV-2 ainsi que la séquence contrôle. Les sondes sont doublement marquées avec un reporter fluorescent à l'extrémité 5' et un extincteur de luminescence (quencher) à l'extrémité 3'. Le Master Mix réhydraté est suffisant pour huit réactions.
- Amplification et détection de l'acide nucléique** : ajouter 15 µl de Master Mix réhydraté dans chaque puits de la plaque (Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Applied Biosystems 7500 Standard, Roche LightCycler 480 Instrument II Roche cobas z 480, Bio-Rad CFX96 Touch, Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro) ou tube (Qiagen Rotor-Gene Q). Ajouter ensuite 5 µl d'acide nucléique extrait (échantillon avec PRC) dans le puits de la plaque ou tube. Placer la plaque ou le tube dans l'instrument approprié.

Une fois que la plaque ou les tubes à réaction sont insérés dans l'instrument, le protocole de test est lancé. Ce protocole démarre la transcription inverse de l'ARN cible et génère de l'ADN complémentaire. L'amplification des séquences cibles se produit ensuite. Le Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay est basé sur le principe chimique TaqMan® et utilise une enzyme avec activité transcriptase inverse, de l'ADN polymérase et des activités exonucléases 5'-3'. Pendant l'amplification de l'ADN, cette enzyme clive la sonde liée à la séquence d'ADN complémentaire, séparant alors le colorant de l'extincteur de luminescence (quencher) du reporter fluorescent. Cette étape entraîne une augmentation du signal de fluorescence lors de l'excitation par une source de lumière de longueur d'onde appropriée. À chaque cycle, d'autres molécules de colorant sont séparées de leurs extincteur de luminescence (quencher) ce qui augmente le signal. Si une fluorescence suffisante est obtenue, l'échantillon est considéré comme positif pour la séquence cible détectée.

MATÉRIEL FOURNI

Réf. cat. N° M124

| Kit de détection (96 réactions) – Conserver entre 2 et 8 °C | | |
|---|--|---------------------------------------|
| No | Composant | Quantité |
| ① | Solution de réhydratation directe N° de réf. M5287 | 1 flacon/kit de 1,9 ml |
| ② | Master Mix pour Lyra SARS-CoV-2 N° de réf. M5150 Contenu lyophilisé : Enzyme ADN polymérase avec activité transcriptase inverse Paires d'amorces oligonucléotidiques ; sondes oligonucléotidiques dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dUTP, dTTP) Stabilisateurs | 12 flacons/kit, 8 réactions/flacon |
| ③ | Tampon Réf. M5281 | 1 tube/kit 40 ml |
| CONTROL + | Contrôle positif contenant l'ARN synthétique du SARS-CoV-2 N° de réf. M5274 | 1 flacon/kit de 1,0 ml |
| CONTROL - | Contrôle négatif N° de réf. M5275 | 1 flacon/kit de 1,0 ml |

- Mode emploi de Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay

MATÉRIEL REQUIS NON FOURNI

- Écouvillons nasopharyngés floqués pour le recueil des échantillons NP
- Écouvillon nasal en polyester floqué ou filé pour la collecte des échantillons NS
- Écouvillon normal en polyester floqué ou filé pour la collecte des échantillons OP
- Tube de transport de l'écouvillon
- Micropipeteurs (plage comprise entre 1 et 10 µl, et 100 et 1 000 µl)
- Embouts de pipette sans aérosol
- Applied Biosystems 7500 Fast Dx, version logicielle 1.4 ou supérieure
- Applied Biosystems Standard, version logicielle 2.0.6 ou supérieure
- Roche LightCycler 480 Instrument II, version logicielle 1.5.0.39 ou supérieure
- Roche cobas z 480 Instrument, version logicielle 1.5.1.62 SP2- ou supérieure
- Qiagen Rotor-Gene Q, version logicielle 2.0.2.4 ou supérieure
- Bio-Rad CFX96 Touch, version logicielle 3.1 ou supérieure
- ThermoFisher QuantStudio 7 Pro, version logicielle 2.0 ou supérieure
- Plaque PCR de 96 puits :
 - ▶ Applied Biosystems 7500 Fast Dx : 4344906
 - ▶ Applied Biosystems Standard : N8010560
 - ▶ Roche LightCycler 480 : 04729692001, aluminium inclus
 - ▶ Bio-Rad CFX96 Touch: HSP9631, systèmes de fermeture MSB1001
 - ▶ Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro : 4483354
- Films pour plaque optique
- Rotor de 72 puits Qiagen (Réf. Cat. 9018903)
- Anneau de blocage du rotor de 72 puits (Réf. Cat. 9018904)

- Tubes et capuchons de barrettes Qiagen, 0,1 ml (250) (Réf. Cat. 981103)
- Plaque centrifuge pour plaque Applied Biosystems de 96 puits
- Bloc de chauffe à sec, capable de chauffer des tubes de 1,5 ml à 95 °C ± 1 ° pendant 10 minutes
- Tubes de microcentrifugation de 1,5 ml
- Bloc de chauffe à sec, capable de chauffer une plaque de puits de micro-titrage profonds à 95 °C ± 1 ° pendant 10 minutes (Eppendorf ThermoMixer® C, avec insert pour puits profonds, n° de réf. 5382000023, 531000002)
- Plaque de puits de micro-titrage profonds (Eppendorf 951033103 ou équivalent)

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Les réglementations locales, nationales et fédérales relatives à la notification des maladies à déclaration obligatoire sont mises à jour en continu et incluent un certain nombre d'organismes pour les enquêtes de surveillance et épidémiologiques. Les laboratoires sont responsables du respect de leurs réglementations nationales et/ou locales, et doivent consulter leurs laboratoires de santé publique locaux et/ou nationaux pour connaître les directives de soumission des échantillons cliniques et/ou des isolats.

- Pour diagnostic *in vitro*.
- Des résultats positifs indiquent la présence d'ARN du SARS-CoV-2.
- Les laboratoires situés aux États-Unis et dans ses territoires sont tenus de communiquer tous les résultats positifs aux autorités de santé publique compétentes.
- Les caractéristiques de performances de ce test ont été établies avec les types d'échantillons indiqués à la section **Utilisation prévue** uniquement. Les performances de ce test n'ont pas été évaluées avec d'autres types de prélèvements ou échantillons.
- L'utilisation des échantillons dans les milieux de transport aura un impact négatif sur la sensibilité du dosage ; ils ne doivent pas être utilisés avec le dosage.
- Ce dosage a été validé à l'aide de Applied Biosystems 7500 Fast Dx, version logicielle 1.4 ou supérieure. Veuillez contacter le support technique de Quidel avant de modifier ou de mettre à niveau cette version logicielle.
- Ce dosage a été validé à l'aide de Applied Biosystems 7500 Standard, version logicielle 2.0.6 ou supérieure. Veuillez contacter le support technique de Quidel avant de modifier ou de mettre à niveau cette version logicielle.
- Ce test a été validé à l'aide de Roche LightCycler 480 Instrument II, version logicielle 1.5.0.39. Veuillez contacter le support technique de Quidel avant de modifier ou de mettre à niveau cette version logicielle.
- Ce test a été validé à l'aide de Roche LightCycler 480 Instrument II, version logicielle 1.5.0.39 ou supérieure. Veuillez contacter le support technique de Quidel avant de modifier ou de mettre à niveau cette version logicielle.
- Ce test a été validé à l'aide de Roche cobas z 480 Instrument, version logicielle 1.5.1.62 SP2- ou supérieure. Veuillez contacter le support technique de Quidel avant de modifier ou de mettre à niveau cette version logicielle.
- Ce test a été validé à l'aide de Qiagen Rotor-Gene Q, version logicielle 2.0.2.4 ou supérieure. Veuillez contacter le support technique de Quidel avant de modifier ou de mettre à niveau cette version logicielle.
- Ce test a été validé à l'aide de Bio-Rad CFX96 Touch, version logicielle 3.1 ou supérieure. Veuillez contacter le support technique de Quidel avant de modifier ou de mettre à niveau cette version logicielle.
- Ce test a été validé à l'aide de Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro, version logicielle 2.4 ou supérieure. Veuillez contacter le support technique de Quidel avant de modifier ou de mettre à niveau cette version logicielle.
- L'utilisation de ce produit doit être limitée aux personnes formées aux techniques PCR et RT-PCR.
- Traiter tous les prélèvements/échantillons comme potentiellement infectieux. Se conformer aux précautions universelles lors de la manipulation des échantillons, de ce kit et de son contenu.
- Le prélèvement, le stockage et le transport adéquats des échantillons sont essentiels pour obtenir des résultats corrects.
- Conserver les réactifs du test comme indiqué sur l'étiquette de chacun d'entre eux.
- Porter des vêtements de protection adaptés, des gants et un dispositif de protection des yeux/du visage lors de l'utilisation de ce kit.
- Pour obtenir des résultats précis, pipetter soigneusement à l'aide d'un équipement étalonné uniquement.
- Nettoyer et désinfecter soigneusement toutes les surfaces avec une solution de javel à 10 % puis avec de l'eau de qualité moléculaire.
- Utiliser des micropipettes avec une barrière anti-aérosol ou des embouts à déplacement positif pour toutes les procédures.
- Éviter la contamination microbienne et la contamination croisée des réactifs du kit. Suivre les bonnes pratiques de laboratoire.
- Ne pas mélanger les réactifs provenant de kits portant des numéros de lot différents.
- Ne pas utiliser de réactifs d'autres fabricants avec ce kit.
- Ne pas utiliser le produit après sa date de péremption.

- Une planification appropriée du déroulement est essentielle pour minimiser le risque de contamination. Toujours planifier le déroulement des tâches de laboratoire de façon unidirectionnelle, en commençant par la pré-amplification, puis l'amplification et la détection.
- Utiliser des fournitures et un équipement dédiés dans les zones de pré-amplification et d'amplification.
- Ne pas autoriser le déplacement du personnel et des équipements entre les zones.
- Toujours tenir à l'écart les fournitures pour pré-amplification et celles employées dans le cadre de l'amplification.
- Ne pas ouvrir les tubes d'échantillons ou les plaques non-scellées après l'amplification.
- Jeter soigneusement le matériel amplifié, conformément aux lois et réglementations locales, afin de minimiser le risque de contamination par amplicons.
- Ne pas utiliser les fournitures dédiées à la préparation des réactifs ou des échantillons pour le traitement de l'acide nucléique cible.
- Pour en savoir plus sur les symboles de danger, la sécurité, la manipulation et l'élimination des composants de ce kit, se reporter à la fiche de données de sécurité (FDS) disponible sur quidel.com.

STOCKAGE ET MANIPULATION DES REACTIFS DU KIT

- Conserver le kit non-ouvert entre 2 et 8 °C jusqu'à la date de péremption indiquée à l'extérieur du conditionnement du kit.
- Le Master Mix réhydraté doit être utilisé dans les deux heures suivant la réhydratation, et le Master Mix restant doit être conservé à une température de -20 °C pendant un maximum de 24 heures.

Indications d'instabilité ou de détérioration des réactifs

Une nébulosité dans la solution de réhydratation peut indiquer une détérioration de ce réactif. Contacter le support technique de Quidel pour un remplacement.

PRELEVEMENT, CONSERVATION ET MANIPULATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons nasaux, nasopharyngés ou oropharyngés sur écouvillon doivent être prélevés et placés dans un tube de transport propre et sec. Les échantillons doivent être transportés et analysés dès que possible après le prélèvement. La stabilité des échantillons est maintenue jusqu'à 48 heures à température ambiante, ou jusqu'à 72 heures s'ils sont conservés à une température comprise entre 2 °C et 8 °C. Si les échantillons ne peuvent pas être testés dans les 72 heures suivant le prélèvement, ils doivent être congelés à une température inférieure ou égale à -70 °C. La stabilité à -70°C a été évaluée jusqu'à 8 jours après le prélèvement.

CONSERVATION DES ECHANTILLONS TRAITES

Les échantillons traités sur tampon peuvent être conservés à des températures comprises entre 2 °C et 8 °C, jusqu'à 7 jours.

PROCÉDURE DE DOSAGE

Exécuter les procédures suivantes, à une température ambiante régulée entre 20 et 25 °C.

Procédure de traitement des échantillons

1. 25 minutes avant l'étape de lyse thermique, préchauffer le bloc de chauffage à 95 °C.
2. Ajouter 400 µl de tampon au nombre de puits requis (2 pour les témoins et 1 par patient) dans une plaque de puits de micro-titrage profonds ou un tube de microcentrifugation.
3. Placer l'écouvillon dans un tube de lyse portant l'identification du patient et le faire tourner vigoureusement pendant 10 secondes pour éluer l'échantillon. Faire tourner la tête de l'écouvillon contre les parois du puits lors de son retrait. Jeter l'échantillon utilisé avec les déchets biologiques dangereux.
4. Chauffer la plaque ou les tubes à 95 ± 1 °C pendant 10 minutes :

Remarque : ne pas fermer ni couvrir la plaque pendant l'étape de chauffe.

a. Pour la plaque à puits profonds, utiliser des paramètres de rotation de 300 tr/min. ;

b. Pour les tubes, centrifuger pendant 5 secondes avant et après l'étape de chauffe

Remarque : commencer la procédure de lyse 10 minutes après avoir placé les tubes dans le bloc et avoir attendu que la température du bloc soit revenue à 95 °C.

- Retirer les échantillons traités du bloc de chauffe du tube ou de la plaque, puis laisser refroidir entre température ambiante et température réfrigérée. Cela comprend les échantillons d'une plaque de puits de micro-titrage profonds ou d'un tube de microcentrifugation. L'échantillon semblera trouble.

Remarque : les échantillons lysés peuvent être conservés à des températures comprises entre 2 °C et 8 °C, -20 °C ou -70 °C jusqu'à 7 jours.

Procédure de réhydratation du Master Mix

- Déterminer le nombre d'échantillons destinés à être testés, puis obtenir le nombre correct de flacons de Master Mix lyophilisé pour huit réactions nécessaires pour effectuer les tests.
- Retourner les réactifs non utilisés dans les conditions de stockage appropriées.
- Ouvrir soigneusement le Master Mix pour éviter de perturber les pastilles.
- Ajouter 135 µl de solution de réhydratation au Master Mix.
- Placer le flacon à température ambiante pendant 1 à 2 minutes afin de permettre la réhydratation des pastilles.
- Pipetter doucement de haut en bas à 2 ou 3 reprises en évitant la formation de bulles avant toute distribution dans le premier puits ou tube.

Remarque : le Master Mix réhydraté est suffisant pour 8 réactions.

Remarque : le Master Mix réhydraté peut être conservé à température ambiante (20 à 25 °C) pendant une durée maximale de 2 heures

Procédure d'installation RT-PCR

- Ajouter 15 µl de Master Mix réhydraté dans chaque puits ou tube.
- Pour les tubes de microcentrifugation, mélanger chaque tube au vortex pendant 10 secondes, juste avant de les ajouter à la plaque. Veiller à ce que l'ensemble du précipité soit redevenu une solution. Ajouter 5 µl d'échantillon traité (échantillon avec le témoin) dans le puits ou le tube de la plaque PCR. Il n'est pas nécessaire de mélanger les réactifs.

Remarque : utiliser un nouvel embout de micropipette avec barrière pour chaque échantillon extrait.

Remarque : le mélange au vortex et le transfert de 5 µl du tube doivent être réalisés individuellement. Le mélange au vortex des tubes avant le transfert ne peut pas être effectué par lots.

- Pour une plaque de puits de micro-titrage profonds, pipetter chaque puits de haut en bas à trois reprises pour mélanger. La pipette doit être réglée à 150 µl. Transférer immédiatement 5 µl d'échantillon traité dans la plaque ou le tube PCR.

Remarque : utiliser un nouvel embout de micropipette avec barrière pour chaque échantillon extrait.

Remarque : le mélange et le transfert de 5 µl du tube doivent être réalisés individuellement. Le mélange de tous les puits de la plaque avant le transfert ne peut pas être effectué par lots.

- Sceller la plaque ou les tubes.
- Centrifuger la plaque durant un minimum de 15 secondes. Veiller à faire descendre tout le liquide au fond des puits de la plaque et s'assurer de l'absence de bulles.
Remarque : les tubes utilisés dans le Qiagen Rotor-Gene Q n'ont pas besoin d'une étape de centrifugation avant d'être chargés dans l'instrument.
- Allumer le thermocycleur approprié.
- Insérer la plaque ou les tubes dans le thermocycleur approprié.

Remarque : se référer à l'Annexe (page 16) pour la programmation et les protocoles de test spécifiques de chaque thermocycleur.

CONTRÔLE QUALITÉ

Le test Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay comprend plusieurs contrôles destinés à vérifier les performances du test.

- Le **contrôle** (PRC) consiste en un bactériophage MS2 inactivé et stabilisé qui contient un génome d'ARN et est inclus dans le tampon. Le PRC sert à surveiller les inhibiteurs de l'échantillon et à garantir qu'une amplification adéquate a eu lieu.
- Le **contrôle positif** (contenant l'ARN du SARS-CoV-2, Réf. M5274) doit être traité comme un échantillon de patient et être inclus dans chaque cycle d'extraction et de rt-PCR. Le contrôle positif peut être plongé en plaçant un écouvillon nasopharyngé sec dans le contrôle pendant dix secondes, puis en l'agitant vigoureusement pendant 10 secondes dans le tampon aliquoté, ou 50 µl peuvent être transférés dans le tampon aliquoté.

- Le **contrôle négatif** (Réf. M5275) doit être traité comme un échantillon de patient et doit être inclus dans chaque cycle d'extraction et de RT-PCR. Le contrôle négatif peut être plongé en plaçant un écouvillon nasopharyngé sec dans le contrôle pendant dix secondes, puis en l'agitant vigoureusement pendant 10 secondes dans le tampon aliquoté, ou 50 µl peuvent être transférés dans le tampon aliquoté.
- En cas d'échec du **contrôle positif** ou **négatif**, le cycle RT-PCR est invalidé et les résultats ne doivent pas être rapportés. Le cycle RT-PCR doit être répété en premier lieu avec les contrôles et les échantillons extraits. Extraire et tester à nouveau une autre aliquote des contrôles et des échantillons ou obtenir de nouveaux échantillons, puis retester si les contrôles échouent à nouveau.

| Résultats attendus à partir des contrôles (Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Applied Biosystems 7500 Standard, Bio-Rad CFX96 Touch, Qiagen Rotor-Gene Q ou Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro) | | | | | |
|--|---|------------|-------------------------|-----|-------------------------|
| Type/nom du contrôle | Utilisé pour surveiller | SARS-CoV-2 | Valeurs Ct attendues | PRC | Valeurs Ct attendues |
| Contrôle positif | Défaillance importante du réactif, notamment l'intégrité de l'amorce et de la sonde | + | $5,0 \leq Ct \leq 30,0$ | +/- | S.O ¹ |
| Contrôle négatif | Contamination du réactif et/ou environnementale | - | Aucune détectée | + | $5,0 \leq Ct \leq 30,0$ |

¹Aucune valeur Ct n'est requise en cas de faux positif du contrôle.

| Résultats attendus pour les contrôles (Roche LightCycler 480 et Roche cobas z 480) | | | | | |
|--|---|------------|-------------------------|-----|-------------------------|
| Type/nom du contrôle | Utilisé pour surveiller | SARS-CoV-2 | Valeurs Ct attendues | PRC | Valeurs Ct attendues |
| Contrôle positif | Défaillance importante du réactif, notamment l'intégrité de l'amorce et de la sonde | + | $5,0 \leq Ct \leq 40,0$ | +/- | S.O ¹ |
| Contrôle négatif | Contamination du réactif et/ou environnementale | - | Aucune détectée | + | $5,0 \leq Ct \leq 40,0$ |

¹Aucune valeur Ct n'est requise en cas de faux positif du contrôle.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DES ÉCHANTILLONS DES PATIENTS

| Interprétation des résultats du Lyra SARS-CoV-2 Assay sur les systèmes Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Applied Biosystems 7500 Standard, Bio-Rad Cfx96, Qiagen Rotor-Gene Q, ou ThermoFisher QS-7 | | | | |
|--|--------------------------------------|---------------------------|--|---|
| Résultat du test | Détecteur : SARS-CoV-2 | Détecteur : témoin | Interprétation des résultats | Notes et orientations spéciales |
| Négatif | Aucune valeur Ct détectée | $5,0 \leq Ct \leq 30,0$ | Aucun ARN viral du SARS-CoV-2 détecté ; PRC détecté. | |
| Positif au SARS-CoV-2 | $5,0 \leq Ct \leq 30,0$ ¹ | S.O. ² | ARN viral du SARS-CoV-2 détecté. | |
| Invalide | Aucune valeur Ct détectée | Aucune valeur Ct détectée | Aucun ARN viral du SARS-CoV-2 détecté et aucun ARN du PRC détecté. | Test non valide. Tester à nouveau le même échantillon purifié. Si le test est à nouveau non valide, prélever un nouvel échantillon, puis recommencer le test. |

| Interprétation des résultats du Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay sur les systèmes Roche LightCycler 480 et Roche cobas z 480 | | | | |
|--|---------------------------|---------------------------|--|---|
| Résultat du test | Détecteur : SARS-CoV-2 | Détecteur : témoin | Interprétation des résultats | Notes et orientations spéciales |
| Négatif | Aucune valeur Ct détectée | $5,0 \leq Ct \leq 40,0$ | Aucun ARN viral du SARS-CoV-2 détecté ; PRC détecté. | |
| Positif au SARS-CoV-2 | $5,0 \leq Ct \leq 40,0^1$ | S.O ² | ARN viral du SARS-CoV-2 détecté. | |
| Invalide | Aucune valeur Ct détectée | Aucune valeur Ct détectée | Aucun ARN viral du SARS-CoV-2 détecté et aucun ARN du PRC détecté. | Test non valide. Tester à nouveau le même échantillon purifié. Si le test est à nouveau non valide, prélever un nouvel échantillon, puis recommencer le test. |

¹ Pour les échantillons générant une valeur Ct comprise entre 0 (indéterminé) et 5, effectuer des dilutions au 1/10 et 1/100 en utilisant des milieux de transport non inoculés. Extraire et tester les échantillons dilués selon les instructions ci-dessus. Interpréter les résultats selon le Tableau 5 ci-dessus. Remarque : si l'examen de la courbe d'amplification originale de l'échantillon pur ne permet pas de conclure à un résultat positif, le traitement des échantillons dilués peut être reporté. Les échantillons dilués génèrent des valeurs de Ct comprises entre 0 (Indéterminé) et 5. Pour obtenir des instructions supplémentaires, veuillez contacter un représentant Quidel au (800) 874-1517 (gratuit aux États-Unis) ou au (858) 552-1100 (en dehors des États-Unis), du lundi au vendredi, de 8h00 à 17h00, heure de l'Est.

² Aucune valeur Ct n'est requise en cas de faux positif du contrôle.

PERFORMANCES CLINIQUES

Les performances cliniques du test Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay ont été évaluées à l'aide d'une étude d'échantillons positifs entièrement artificiels en utilisant des échantillons nasopharyngés et oropharyngés sur écouvillon et une étude prospective utilisant des écouvillons nasaux appariés.

Étude 1

Trente (30) échantillons NP artificiels ont été créés en ensemençant trente (30) échantillons cliniques individuels déterminés comme négatifs au SARS-CoV-2 selon le Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay. Les échantillons ensemençés ont été ajoutés aux écouvillons (environ 50 µl), puis traités et analysés conformément à la notice du Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay. Vingt (20) échantillons ont été ensemençés avec 1x LDD (3,40e+4 cp/ml) du virus. Dix (10) échantillons supplémentaires ont été ensemençés avec 5x LDD (1,7E+5 cp/ml) du virus.

Vingt-neuf (29) échantillons artificiels sur les trente (30) étaient positifs avec le Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay. Les résultats des échantillons positifs artificiels sont présentés dans le tableau ci-dessous :

| Évaluation clinique d'échantillons d'écouvillons nasopharyngés ensemençés | | | |
|---|-----------------------------|------------------------------|-----|
| Concentration d'ARN de l'échantillon | nbre de positifs/nbre testé | Valeur Ct moyenne SARS-CoV-2 | %CV |
| Non ensemençé | 0/30 | S.O | S.O |
| 1x LDD | 19/20 | 27,06 | 6,6 |
| 5x LoD | 10/10 | 23,51 | 4,7 |

Les performances par rapport aux résultats attendus sont les suivantes :

Concordance de pourcentage positif 29/30 = 97 % (IC à 95 % : 83,3 % à 99,4 %)

Concordance de pourcentage négatif 30/30 = 100 % (IC à 95 % : 88,6 % à 100 %)

Étude 2

Quinze (15) échantillons OP artificiels ont été créés en ensemençant quinze (15) échantillons cliniques individuels déterminés comme négatifs au SARS-CoV-2 selon le Lyra SARS-CoV-2 Assay. Les échantillons ensemençés ont été ajoutés aux écouvillons (environ 50 µl), puis traités et analysés conformément à la notice du Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay. Sept (7) échantillons ont été ensemençés avec 1x LDD (3,40e+4 cp/ml), quatre (4) échantillons ont été ensemençés avec 10x LDD (3,4e+5cp/ml) et quatre (4) échantillons ont été ensemençés avec 100x LDD (3,4e+6cp/ml) du virus. Huit (8) échantillons OP négatifs supplémentaires, selon le Lyra SARS-CoV-2 Assay, ont été testés conformément à la notice du Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay.

Quinze (15) échantillons artificiels sur les quinze (15) étaient positifs avec le Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay. Les résultats des échantillons OP sont présentés dans le tableau ci-dessous :

| Évaluation clinique d'échantillons d'écouvillons nasopharyngés ensemençés | | | |
|---|-----------------------------|------------------------------|-----|
| Concentration d'ARN de l'échantillon | nbre de positifs/nbre testé | Valeur Ct moyenne SARS-CoV-2 | %CV |
| Non ensemençé | 0/8 | S.O | S.O |
| 1x LDD | 7/7 | 23,2 | 5,1 |
| 10x LDD | 4/4 | 20,1 | 0,6 |
| 100x LDD | 4/4 | 17,1 | 0,5 |

Les performances par rapport aux résultats attendus sont les suivantes :

Concordance de pourcentage positif 15/15 = 100 % (IC à 95 % : 79,6 % à 100 %)

Concordance de pourcentage négatif 8/8 = 100 % (IC à 95% : 67,6 % à 100 %)

Etude 3

Une étude prospective a été réalisée pour comparer le test 2021-0740 Icon 0295-TR-151280 à un test moléculaire autorisé pour utilisation d'urgence. Cent quatre-vingt-un (181) échantillons nasaux appariés ont été testés simultanément avec les deux dispositifs conformément aux notices respectives. Les échantillons ont été obtenus de trois endroits différents et expédiés sur des packs réfrigérés pour les tests. Les écouvillons nasaux ont été randomisés, traités et testés avec les deux dispositifs.

Trois (3) échantillons (1,7%) n'étaient pas valides dans le test Lyra Direct SARS-CoV-2 et ont été retirés d'une analyse plus approfondie. Les données pour les cent soixante-dix-huit (178) échantillons restants sont présentées dans le tableau ci-dessous.

| Comparaison du test Lyra Direct SARS-CoV-2 avec le test SARS-CoV-2 extrait de référence | | | | | | | | |
|---|-------------------------------|-----|-----|-------|-----------|---------|--------|---------|
| | Comparateur SARS-CoV-2 rt-PCR | | | | IC à 95 % | | | |
| | | POS | NÉG | Total | PPA | 96,0 % | 86,5 % | 98,9 % |
| Test Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay | POS | 48 | 0 | 48 | NPA | 100,0 % | 97,1 % | 100,0 % |
| | NÉG | 2 | 128 | 130 | VPP | 100,0 % | 92,6 % | 100,0 % |
| | Total | 50 | 128 | 178 | VPN | 98,5 % | 94,6 % | 99,6 % |

PERFORMANCE ANALYTIQUE

Limite de détection

Étude 1

La limite de détection (LD) du test Lyra SARS-CoV-2 Assay utilisait un ensemmencement de dilutions limitantes de l'ARN génomique du coronavirus 2 apparenté au SRAS (SARS-CoV-2) après irradiation gamma dans une matrice nasopharyngée négative. Chaque dilution a été ajoutée aux écouvillons (environ 50 µl), puis traitée conformément à la notice du dosage et testée sur les systèmes Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Applied Biosystems 7500 Standard, Roche LightCycler 480, Roche cobas z 480, Qiagen Rotor-Gene Q, Bio-Rad CFX96 Touch ou Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro. La sensibilité analytique (limite de détection ou LoD) est définie par la concentration la plus faible avec laquelle au moins 95 % de tous les réplicats ont été testés positifs.

Cette étude a établi la LDD pour le Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay comme indiqué ci-dessous, ce qui a été confirmé en testant 20 réplicats.

| Le test de confirmation des résultats de la LD a été réalisé sur les systèmes Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Applied Biosystems 7500 Standard, Roche LightCycler 480 et cobas z 480, Qiagen Rotor-Gene Q, Bio-Rad CFX96 Touch ou Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro | | | | | | | |
|--|-------------------------------|--------------------------------|---|---|------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| Thermocycleurs | Écouvillons NP - 7500 Fast Dx | Écouvillons NP - 7500 Standard | Écouvillons NP - LightCycler 480 ² | Écouvillons NP - cobas z 480 ² | Écouvillons NP - CFX96 Touch | Écouvillons NP - Rotor-Gene Q | Écouvillons NP - QuantStudio 7 Pro |
| Concentration ¹ | 3,40E+04 | 3,40E+04 | 3,40E+04 | 3,40E+04 | 3,40E+04 | 3,40E+04 | 6,80E+04 |
| COVID-19 | | | | | | | |
| MOY. globale | 25,85 | 28,48 | 33,87 | 33,55 | 25,10 | 26,89 | 26,47 |
| ÉCART TYPE global | 1,25 | 0,95 | 1,55 | 1,19 | 1,06 | 1,24 | 0,77 |
| %CV global | 4,8 % | 3,3 % | 4,6 % | 3,6 % | 4,2 % | 4,6 % | 2,9 % |
| Détection | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 |
| PRC | | | | | | | |
| MOY. globale | 21,69 | 20,03 | 21,96 | 23,98 | 17,85 | 19,79 | 23,20 |
| ÉCART TYPE global | 0,68 | 0,20 | 1,13 | 1,07 | 1,29 | 0,33 | 0,75 |
| %CV global | 3,1 % | 1,0 % | 5,1 % | 4,5 % | 7,2 % | 1,6 % | 3,2 % |
| Détection | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 |

¹ La concentration est présentée en copies d'ARN/ml

² Les résultats incluent 10 cycles non capturés par les autres instruments

Étude 2 – Étude de LDD comparative pour le Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay and the Lyra SARS-CoV-2 Assay

Une deuxième étude de LDD a été réalisée pour comparer la limite de détection (LDD) du Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay et du Lyra SARS-CoV-2 Assay sur le système ABI 7500 Fast Dx en utilisant des dilutions limitantes de virus SARS-CoV-2. Dans cette étude, une concentration de 1x LDD (sur la base des tests préliminaires) du virus dans une matrice NP négative a été inoculée sur un écouvillon NP. Vingt (20) réplicats des écouvillons inoculés ont été analysés directement, conformément à la notice de Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay, ou ont été ajoutés à 3,0 ml d'UTM pour analyse avec le Lyra SARS-CoV-2 Assay (quarante réplicats d'écouvillons au total). L'analyse a été réalisée à l'aide du système ABI 7500 Fast Dx.

Résultats de l'étude de confirmation de la LDD

| Dosage extrait Lyra | 1,28E+04 cp/ml | |
|---------------------|----------------|-------|
| Réplicat | SARS-CoV-2 | PRC |
| 1 | 26,03 | 18,62 |
| 2 | 24,02 | 18,41 |
| 3 | 23,58 | 18,59 |
| 4 | 24,00 | 18,48 |
| 5 | 23,70 | 18,63 |
| 6 | 25,27 | 18,71 |
| 7 | 24,70 | 19,13 |
| 8 | 24,42 | 19,19 |
| 9 | 23,99 | 19,26 |
| 10 | 26,63 | 19,21 |
| 11 | 25,29 | 19,65 |
| 12 | 24,73 | 19,84 |
| 13 | 25,28 | 19,56 |
| 14 | 25,01 | 19,56 |
| 15 | 25,66 | 19,44 |
| 16 | 26,34 | 19,57 |
| 17 | 26,23 | 19,29 |

| Dosage extrait Lyra | 1,28E+04 cp/ml | |
|---------------------|----------------|-------|
| Réplicat | SARS-CoV-2 | PRC |
| 18 | 24,12 | 19,43 |
| 19 | 25,30 | 19,24 |
| 20 | 24,40 | 19,47 |
| % détecté | 100 % | 100 % |
| Moyenne de pos | 24,93 | 19,16 |
| Écart type des pos | 0,92 | 0,44 |
| %CV | 3,7 % | 2,3 % |

| Lyra Direct Assay | 1,28E+04 cp/ml | |
|--------------------|----------------|-------|
| Réplicat | SARS-CoV-2 | PRC |
| 1 | 24,93 | 18,37 |
| 2 | 24,02 | 17,71 |
| 3 | 27,80 | 18,21 |
| 4 | 24,62 | 17,75 |
| 5 | 24,75 | 18,07 |
| 6 | 23,67 | 18,03 |
| 7 | 23,32 | 17,83 |
| 8 | 22,53 | 17,64 |
| 9 | 24,15 | 17,91 |
| 10 | 22,93 | 18,47 |
| 11 | 24,07 | 17,59 |
| 12 | 24,38 | 18,45 |
| 13 | 25,80 | 18,01 |
| 14 | 24,99 | 17,87 |
| 15 | 23,11 | 17,67 |
| 16 | 24,52 | 18,42 |
| 17 | 24,72 | 18,35 |
| 18 | 24,26 | 18,30 |
| 19 | 24,70 | 18,45 |
| 20 | 26,59 | 18,31 |
| % détecté | 100 % | 100 % |
| Moyenne de pos | 24,49 | 18,07 |
| Écart type des pos | 1,23 | 0,31 |
| %CV | 5,0 % | 1,7 % |

Sur base de cette conception d'étude, les LDD pour les 2 versions du dosage Lyra (Lyra SARS-CoV-2 Assay et Lyra Direct SARS-CoV-2) ont une LDD d'entrée de $1,28 \times 10^4$ équivalents génomiques/ml. Il convient de noter que la LDD publiée pour le Lyra SARS-CoV-2 Assay ($8,00E-01$ copies d'ARN génomique/ μ l) est exacte. La concentration finale du virus testée dans l'essai, après dilution dans 3,0 ml d'UTM et la concentration pendant le processus d'extraction, est d'environ 800 cp/ml.

REACTIVITE ANALYTIQUE (INCLUSIVITE)

L'inclusivité du test Lyra SARS-CoV-2 Assay a été établie en testant l'ARN génomique du coronavirus 2 apparenté au SRAS (SARS-CoV-2) après irradiation gamma, isolat USA-WA1/2020, via une analyse *in-silico*.

L'inclusivité du test après irradiation gamma a été établie par le biais d'une analyse *in silico* des séquences disponibles de SARS-CoV-2. En date du 22 avril 2021, un total de 1 378 013 séquences du SARS-CoV-2 étaient disponibles dans les bases de données GISAID et NCBI. Parmi celles-ci, 1 356 832 (98,46 %) incluent la région de l'amplicon (< 5 bases nucléotidiques non définies dans toute région oligonucléotidique) et présentent une homologie de 71,43 % à 100 % avec les oligonucléotides SARS-CoV-2 de Lyra Direct. Le nombre de séquences présentant une homologie de 100 % et ≥ 95 % avec l'ensemble oligo est résumé dans le tableau ci-dessous.

| Base de données | Séquences disponibles | Séquences comprenant la région de l'amplicon | Séquences 100 % homologues à l'ensemble oligo | Séquences ≥ 95 % homologues à l'ensemble oligo |
|-----------------|-----------------------|--|---|--|
| GISAID | 1 183 880 | 1 165 604 | 1 159 422 | 1 165 595 |
| NCBI | 194 133 | 191 228 | 189 505 | 191 228 |

Inclusivité du test Lyra Direct SARS-CoV-2 avec sept (7) variants publiés (Variant B.1.1.7 (VUI202012/01), Variant B.1.351 (501Y.N2), Variant P.1 (501Y.V3), Variant B.1.429+B.1.427 (452R.V1), Variant B.1.525 (484K.V3), Variant B.1.526 (NY), Variant B.1.617 [Double mutant « indien »]) a été établie par un analyse *in silico* des séquences SARS-CoV-2 disponibles. Toutes les séquences présentent une homologie de 90,48 % à 100 % avec les oligonucléotides du Lyra Direct SARS-CoV-2. Le nombre de séquences de variants présentant une homologie de 100 % et ≥ 95 % avec l'ensemble oligo est résumé dans le tableau ci-dessous.

| Base de données | Variant | Séquences disponibles | Séquences comprenant la région de l'amplicon | Séquences 100 % homologues à l'ensemble oligo | Séquences ≥ 95 % homologues à l'ensemble oligo |
|-----------------|--|-----------------------|--|---|--|
| GISAID | B.1.1.7 (VUI202012/01) | 399 189 | 395 236 | 394 338 | 395 235 |
| | Variant SA B.1.351 (501Y.N2) | 10 658 | 10 436 | 10 385 | 10 436 |
| | Variant P.1 (501Y.V3) | 4 735 | 4 696 | 4 688 | 4 696 |
| | Variant B.1.429+B.1.427 (452R.V1) | 30 306 | 30 107 | 29 981 | 30 103 |
| | Variant B.1.525 (484K.V3) | 1 882 | 1 860 | 1 853 | 1 860 |
| | Variant B.1.526 (NY) | 8 793 | 8 771 | 8 176 | 8 771 |
| | Variant B.1.617 (double mutant indien) | 862 | 850 | 843 | 850 |

52 variants B.1.1.7 ont un SNP aligné à l'extrémité 3' d'une amorce. Une séquence d'ARN représentant une séquence du variant britannique avec le SNP et une autre représentant une séquence témoin (MN908947.3) ont été commandées et testées avec le Lyra SARS-CoV-2 assay. Les deux modèles d'ARN ont donné des résultats identiques, ce qui indique que le SNP aligné à l'extrémité 3' n'interfère pas avec la détection. Ce résultat est cohérent avec les études précédentes sur les SNP alignés à l'extrémité 3' d'une amorce Lyra.

SPECIFICITE ANALYTIQUE REACTIVITE CROISEE)

La spécificité analytique du test a été établie Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay à la fois par test direct des organismes dans le test (tests « humides ») et par des analyses in-silico. Les tests humides ont utilisé 25 micro-organismes, en concentrations élevées, identifiés par la FDA comme hautement prioritaires pour l'évaluation en raison de la probabilité raisonnable qu'ils soient présents dans les échantillons des voies respiratoires supérieures. Tous les microorganismes étaient indétectables par le Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay lorsqu'ils étaient soumis à un test humide, comme illustré ci-dessous. **REMARQUE** : les amorces et sondes utilisées dans le Lyra Direct SARS-CoV-2 sont les mêmes que dans le Lyra SARS-CoV-2 Assay.

| Résultats du test de réactivité croisée | | | | |
|--|----------------------------------|------------------------------|---|------------------|
| Virus/Bactérie/Parasite | Souche | Type de source/d'échantillon | Concentration | Résultats |
| Adénovirus | Type 1 | Isolat | 1 x 10 ^{7,53} U/ml | Nég., Nég., Nég. |
| Coronavirus | 229e | Isolat | 1 x 10 ^{6,10} U/ml | Nég., Nég., Nég. |
| Coronavirus | OC43 | Isolat | 9,55 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /m | Nég., Nég., Nég. |
| Coronavirus | NL63 | Isolat | 1 x 10 ^{4,67} U/ml | Nég., Nég., Nég. |
| MERS-CoV (inactivé à la chaleur) | Florida/USA-2 Saudia Arabia 2014 | Isolat | 4,17 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /m | Nég., Nég., Nég. |
| SARS -1 | 2003-00592 | Virus inactivé | Non disponible | Nég., Nég., Nég. |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | M129 | Isolat | 3 x 10 ⁷ CCU/ml | Nég., Nég., Nég. |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | Z018 | Isolat | 3,8 x 10 ⁹ ufc/ml | Nég., Nég., Nég. |
| Influenza A H3N2 | Brisbane/10/07 | Isolat | 1 x 10 ^{5,07} U/ml | Nég., Nég., Nég. |
| Influenza A H1N1 | New Caledonia/20/99 | Isolat | 1 x 10 ^{6,66} U/ml | Nég., Nég., Nég. |
| Influenza B | Brisbane/33/08 | Isolat | 1 x 10 ^{5,15} U/ml | Nég., Nég., Nég. |
| Parainfluenza | Type 1 | Isolat | 1 x 10 ^{8,01} U/ml | Nég., Nég., Nég. |
| Parainfluenza | Type 2 | Isolat | 1 x 10 ^{6,34} U/ml | Nég., Nég., Nég. |
| Parainfluenza | Type 3 | Isolat | 8,51 x 10 ⁷ TCID ₅₀ /ml | Nég., Nég., Nég. |
| Parainfluenza | Type 4b | Isolat | 1 x 10 ^{7,53} U/ml | Nég., Nég., Nég. |
| Entérovirus | Type 68 | Isolat | 1 x 10 ^{6,5} U/ml | Nég., Nég., Nég. |
| Métapneumovirus humain | A1 (IA10-s003) | Isolat | 1 x 10 ^{5,55} U/ml | Nég., Nég., Nég. |
| Virus respiratoire syncytial | Type A (3/2015 isolat n° 3) | Isolat | 1 x 10 ^{5,62} U/ml | Nég., Nég., Nég. |
| Rhinovirus humain | S.O | Virus inactivé | Non disponible | Nég., Nég., Nég. |
| <i>Chlamydophila pneumoniae</i> | AR-39 | Isolat | 2,9 x 10 ⁷ IFU/ml | Nég., Nég., Nég. |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | Type b ; Eagan | Isolat | 7,87 x 10 ⁸ ufc/ml | Nég., Nég., Nég. |
| <i>Legionella pneumophila</i> | Philadelphia | Isolat | 6,82 x 10 ⁹ ufc/ml | Nég., Nég., Nég. |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Z022 ; 19f | Isolat | 2,26 x 10 ⁹ ufc/ml | Nég., Nég., Nég. |
| <i>Bordetella pertussis</i> | | Isolat | | Nég., Nég., Nég. |
| <i>Pneumocystis jirovecii</i> -S. cerevisiae Recombinant | W303-Pji | Isolat | 1,56 x 10 ⁸ ufc/ml | Nég., Nég., Nég. |

L'analyse in-silico s'est concentrée sur trente-deux (32) micro-organismes identifiés par la FDA comme hautement prioritaires pour l'évaluation, car il est probable qu'ils soient présents dans les échantillons des voies respiratoires supérieures.

| Organismes à réactivité croisée | | | |
|--|---------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| Organisme | Nombre total de séquences | Nombre de génomes complets | Nombre de souches WGS |
| Adénovirus | 532 | 532 | 0 |
| Coronavirus (saisonnier) | 288 | 288 | 0 |
| Entérovirus ^B | 2 708 | 2 674 | 34 |
| Virus Influenza ^{A B} | 172 455 | 21444 (+39 A/Mexico/4108/2009) | 108 |
| Virus Influenza ^{B^A B} | 53 952 | 6755 (+16 B/Florida/4/2006) | 0 |
| Virus Influenza ^{C^B} | 2 205 | S.O | S.O |
| Métapneumovirus humain | 145 | 145 | 0 |

| Organismes à réactivité croisée | | | |
|--|---------------------------|----------------------------|-----------------------|
| Organisme | Nombre total de séquences | Nombre de génomes complets | Nombre de souches WGS |
| Virus parainfluenza humain 1-4 | 439 | 439 | 0 |
| Paréchovirus humain | 124 | 124 | 0 |
| Virus respiratoire syncytial ^B | 1 275 | 1 275 | 0 |
| Rhinovirus | 214 | 214 | 0 |
| SARS-1 | 236 ^C | 232 (séquences +4 pp1ab) | 0 |
| <i>Bacillus anthracis</i> | 4 152 | 69 | 86 |
| <i>Candida albicans</i> | 1 541 | 59 | 34 |
| <i>Chlamydia pneumoniae</i> | 466 | 5 | 20 |
| <i>Chlamydia psittaci</i> | 11 179 | 23 | 45 |
| <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | 20 797 | 17 | 194 |
| <i>Coxiella burnetii</i> | 419 | 28 | 3 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | 45 267 | 61 | 692 |
| Legionella ^B | 4 843 | 98 | 65 |
| Leptospira ^B | 64 456 | 133 | 266 |
| <i>Moraxella catarrhalis</i> ^B | 8 333 | 11 | 184 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 194 | 194 | 0 |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | 808 | 51 | 45 |
| <i>Neisseria elongata</i> et <i>N. meningitidis</i> ^B | 312 050 | 116 | 1 318 |
| <i>Pneumocystis jirovecii</i> | 487 | 15 | 3 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 195 | 195 | 0 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 634 | 634 | 0 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> ^B | 61 880 | 23 | 508 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> ^B | 1 633 369 | 107 | 8 526 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> ^B | 46 153 | 201 | 1 733 |
| <i>Streptococcus salivarius</i> ^B | 9 417 | 18 | 48 |

^A Le nombre de génomes pour Influenza A et Influenza B a été atteint pour les souches qui comprenaient la totalité des 8 segments, hormis A/Mexico/4108/2009(H1N1) et B/Florida/4/2006 ; toutes les séquences géniques disponibles ont été incluses.

^B Pour l'analyse BLAST, la valeur « Max Target Seqs » était de 5 000.

^C 4 séquences cds de polyprotéines ont également été incluses.

L'analyse *in-silico* a démontré une homologie < 80 % avec tous les organismes à l'exception des suivants : trois (3) séquences d'entérovirus présentent une homologie de 80,9 % avec l'amorce anti-sens ; cependant, l'amorce sens n'a qu'une homologie de 76 % et l'alignement de la sonde présentait une homologie globale de 56 %. Les séquences de SARS-1 présentent une homologie de ≥80 % avec les deux amorces, toutefois, la dernière base aux extrémités 3' des deux amorces n'est pas conservée. Le test humide de la seule souche disponible de SARS-1 utilisant le Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay était non détectable.

SUBSTANCES INTERFERENTES

Une étude a été réalisée afin de démontrer que les substances potentiellement interférentes que l'on peut trouver dans les voies respiratoires supérieures ne présentent pas de réaction croisée ou n'interfèrent pas avec la détection de l'ARN du SARS-CoV-2 RNA dans le Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay.

Quatorze (14) substances potentiellement interférentes, dans la concentration reprise ci-dessous, ont été testées en l'absence ou en présence du SARS-CoV-2.

| Liste des substances pour l'étude d'interférence | | |
|--|---------------------|----------------------|
| Substances | Ingrédient actif | Concentration testée |
| Afrin – spray nasal | Oxymétazoline | 5 % |
| Sang (humain) | Sang | 5 % |
| Chloraseptic, Cepacol | Benzocaïne, menthol | 0,7 g/ml |
| Flonase | Fluticasone | 5 % |

| Liste des substances pour l'étude d'interférence | | |
|--|---|----------------------|
| Substances | Ingrédient actif | Concentration testée |
| Halls Relief, arôme de cerise | Menthol | 0,8 g/ml |
| Nasacort Allergie 24 heures | Triamcinolone | 5 % |
| Néosynéphrine | Chlorhydrate de phényléphrine | 5 % |
| Oséltamivir | Oséltamivir | 2,2 µg/ml |
| Protéine mucine purifiée | Protéine mucine | 2,5 mg/ml |
| Rhinocort | Budésonide (glucocorticoïde) | 5 % |
| Solution saline en spray nasal | Solution saline | 15 % |
| Tobramycine | Tobramycine | 1,25 mg/ml |
| Zanamivir | Zanamivir | 282,0 ng/ml |
| Zicam, remède contre le rhume | Galphimia glauca, Luffa operculata, Sabadilla | 5 % |

Aucune des quatorze (14) substances potentiellement interférentes testées dans l'étude n'a démontré de réactivité croisée ou d'interférence.

LIMITES

- Les échantillons dans un milieu de transport ne peuvent pas être utilisés dans ce dosage.
- Les résultats négatifs n'excluent pas une infection par le SARS-CoV-2 et ne doivent pas être le seul fondement d'une décision thérapeutique.
- Les résultats négatifs doivent être traités comme des présomptions et confirmés par un test moléculaire autorisé par la FDA qui utilise une étape de lyse chimique suivie d'une extraction en phase solide de l'acide nucléique, si nécessaire, pour la gestion clinique.
- La performance de ce test a été évaluée à l'aide d'échantillons nasopharyngés et oropharyngés. Les écouvillons nasaux et les écouvillons nasaux du cornet moyen (recueillis par le patient lui-même sous la supervision d'un soignant ou par le soignant lui-même) sont aussi considérés comme des types d'échantillons acceptables pour une utilisation avec le Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay.
- Un prélèvement, stockage ou transport inadéquat des échantillons peut entraîner des résultats faux négatifs.
- Des inhibiteurs présents dans l'échantillon et/ou des erreurs lors de la procédure de test peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
- Un professionnel de santé qualifié doit interpréter les résultats du dosage en tenant compte des antécédents médicaux, des signes et symptômes cliniques du patient et des résultats des autres tests de diagnostic.
- Des analytes cibles (séquences virales) peuvent persister *in vivo*, quelle que soit la viabilité du virus. La détection d'un ou de plusieurs analytes cibles n'implique pas que le ou les virus correspondants sont infectieux, ni qu'ils sont responsables des symptômes cliniques.
- Il existe un risque de résultats faux positifs résultant d'une contamination croisée par des organismes cibles, leurs acides nucléiques ou leur produit amplifié, ou de signaux non spécifiques dans le test.
- Il existe un risque de résultats faux négatifs en raison de la présence de variants de séquences dans la cible virale du test.
- Les performances du test n'ont pas été établies chez des patients immunodéprimés.
- La performance clinique n'a pas été établie pour tous les variants en circulation, mais elle devrait refléter les variants en circulation et prévalents au moment et à l'endroit de l'évaluation clinique. Les performances au moment du test peuvent varier en fonction des variants en circulation, notamment les nouvelles souches émergentes de SARS-CoV-2 et leur prévalence, qui évoluent dans le temps.

ASSISTANCE CLIENT ET TECHNIQUE

Si vous avez des questions concernant l'utilisation de ce produit ou pour signaler un problème au sujet du produit, veuillez contacter l'assistance technique de Quidel au 1 800 874-1517 (aux États-Unis) ou à l'adresse technicalsupport@quidel.com. Hors des États-Unis, veuillez vous adresser à votre distributeur ou directement à Quidel, dont les numéros de téléphone sont indiqués ci-après. Rendez-vous sur quidel.com pour obtenir d'autres possibilités d'assistance.

| Pays | Numéro de téléphone | Adresse e-mail |
|---|--|--|
| Europe, Moyen-Orient et Afrique | +353 (91) 412 474 (principal) 0 1800 200441 (gratuit) | emeatechnicalsupport@quidel.com |
| Autriche | +43 316 231239 | |
| Belgique | +32 (2) 793 0180 | |
| France | 0 (805) 371674 | |
| Allemagne | +49 (0) 7154 1593912 | |
| Pays-Bas | 0 800 0224198 | |
| Suisse | 0 800 554864 | |
| Royaume-Uni | 0 800 368 8248 | |
| Irlande | +353 (91) 412 474 | |
| Italie | +39 (800) 620 549 | |
| Amérique du Nord, Asie-Pacifique et Amérique latine | 858 552-1100 | technicalsupport@quidel.com |
| Canada | 437 266-1704 (principal) 888 415-8764 (gratuit) | technicalsupport@quidel.com |
| Chine | 0400 920 9366 ou +86 021 3217 8300 | chinatechnicalservice@quidel.com |

PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

Les composés colorants de ce produit sont commercialisés sous licence de BioSearch Technologies, Inc. et protégés par des brevets américains et mondiaux déposés ou en instance.

Quidel et Sofia sont des marques déposées de Quidel Corporation. Toute autre marque citée dans ce document est la propriété de son détenteur respectif et son utilisation dans le présent document n'implique aucune reconnaissance ni aucun soutien envers un quelconque produit ou service.

RÉFÉRENCES

1. Mahbubani, R., McFall-Johnsen, M., and Baker, S., Coronavirus live updates: Death toll soars past 41,400 with more than 846,000 people infected around the world. Business Insider. March 31, 2020.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Viral Culture; Approved Guidelines. CLSI document M41-A [ISBN 1562386239] Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA 2006.
3. Lauer, S.A., et. al. The incubation period of Coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application, Ann Intern Med. 2020
4. www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html

ANNEXE (PROGRAMMATION ET PROTOCOLES DE TEST SPECIFIQUES DE CHAQUE THERMOCYCLEUR)

Instructions de programmation de l'Applied Biosystems 7500 Fast Dx

Se référer au Manuel de l'utilisateur numéro 4406991 pour de plus amples informations.

1. Lancer la suite logicielle 7500 Fast Dx.
2. La fenêtre de dialogue **Quick Startup document** (Document de démarrage rapide) s'ouvre. Cliquer sur le bouton **Create New Document** (Créer un nouveau document) pour démarrer le **New Document Wizard** (Assistant Nouveau Document). Suivre chaque étape pour lancer le protocole Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay.

- a. Définir un document : la plupart des étapes suivantes doivent être paramétrées par défaut. Sinon, modifier en conséquence.

- i. Confirmer ou saisir les informations suivantes.

| | |
|---------------------------|--|
| Test : | Courbe standard (quantification absolue) |
| Récepteur : | 96 puits transparents |
| Modèle : | Document vierge |
| Mode d'exécution : | Fast 7500 |
| Opérateur : | <i>le nom de l'opérateur</i> |
| Commentaires : | SDS v1.4 |
| Nom de la plaque : | « Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay » |

- ii. Cliquer sur le bouton **Next** (Suivant).

- b. Sélectionner les détecteurs : les nouveaux détecteurs pour le SARS-CoV-2 et le contrôle (PRC) doivent être ajoutés. Pour chaque cible, cliquer sur le bouton **New Detector** (Nouveau détecteur) pour ouvrir la fenêtre contextuelle **New Detector** (Nouveau détecteur). Il est également possible d'utiliser le bouton **Create Another** (Créer un autre) dans la fenêtre contextuelle **New Detector** (Nouveau détecteur) pour les deux derniers détecteurs.

- i. Saisir les informations suivantes pour chaque détecteur.

| Name (Nom) | Colorant reporter | Colorant d'extincteur de luminescence (quencher) | Couleur |
|-------------------|--------------------------|---|----------------------------|
| SARS-CoV-2 | FAM | (none) (aucun) | (Select) (Sélectionner) |
| PCR | Cy5 | (none) (aucun) | (Select) (Sélectionner) |

- ii. Sélectionner une couleur unique pour représenter chaque détecteur.
 - iii. Mettre en surbrillance les nouveaux détecteurs et les ajouter dans la colonne **Detectors in Document (Détecteurs dans un document) en utilisant le bouton Add** (Ajouter).
 - iv. Sélectionner **(none) (aucun) dans le menu déroulant Passive Reference** (Référence passive).
 - v. Cliquer sur le bouton **Next** (Suivant).
 - vi. Sélectionner le bouton **Finish** (Terminer) sans effectuer de réglage des puits.
- c. L'assistant se ferme et le logiciel s'ouvre, puis démarre avec l'onglet **Setup** (Configuration). Cela va faire apparaître la plaque d'échantillon qui a été installée pendant le démarrage rapide. Ici, rien ne doit être modifié pour l'installation initiale.
 - d. Définir le protocole du thermocycleur : Sélectionner l'onglet **Instrument** pour configurer les durées et les températures des cycles du RT-PCR du Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay. Sous **Thermal Profile** (Profil thermique) se trouve un protocole par défaut en 2 phases. Chaque phase comporte 3 zones de texte modifiables par l'utilisateur. La valeur de la zone supérieure représente le nombre de répétitions ou de cycles pour cette phase. La valeur de la zone intermédiaire représente la température (°C), la valeur de zone inférieure représente le temps (minutes : secondes).

- i. Apporter les changements suivants au **Thermal Cycler Protocol** (Protocole du thermocycleur) par défaut :
 1. Phase 1
 - a. Répétitions : 1
 - b. Temp. : 55
 - c. Durée : 5:00
 2. Sélectionner la barre entre l'Étape 1 et l'Étape 2. Sélectionner le bouton **Add Hold** (Ajouter stationnaire) pour ajouter une autre phase.
 3. Niveau 2
 - a. Répétitions : 1
 - b. Temp. : 60
 - c. Durée : 5:00
 4. Sélectionner la barre entre l'Étape 2 et l'Étape 3. Sélectionner le bouton **Add Hold** (Ajouter stationnaire) pour ajouter un autre niveau.
 5. Niveau 3
 - a. Répétitions : 1
 - b. Temp. : 65
 - c. Durée : 5:00
 6. Niveau 4 (Niveau de dissociation en 2 phases)
 - a. Répétitions : 10
 - b. Étape 1
 - i. Temp. : 92
 - ii. Durée : 0:05
 - c. Étape 2
 - i. Temp. : 57
 - ii. Durée : 0:40
 7. Sélectionner la barre sur la droite du Niveau 4. Sélectionner le bouton **Add Cycle** (Ajouter un cycle) pour ajouter un autre niveau.
 8. Phase 5 (Phase de dissociation en 2 étapes)
 - a. Répétitions : 30
 - b. Étape 1
 - i. Temp. : 92
 - ii. Durée : 0:05
 - c. Étape 2
 - i. Temp. : 57
 - ii. Durée : 0:40
 9. Si un niveau erroné est ajouté, celui-ci peut être supprimé en appuyant sur le bouton **Delete** (Supprimer) après avoir mis en surbrillance le niveau entre les lignes verticales.

- ii. Saisir les informations suivantes sous **Settings** (Paramètres) :

| | |
|--|---------------------------------|
| Sample Volume (µl) (Volume d'échantillon) : | 20 (par défaut) |
| Mode d'exécution : | 7500 Fast (par défaut) |
| Collecte des données : | Niveau 5, étape 2 (57,0 à 0:40) |
| REMARQUE : ne pas cocher la case à côté de « Expert Mode » (Mode expert). | |

- e. Régler le seuil pour chaque analyte.
 - i. Sélectionner l'onglet **Results** (Résultats).
 - ii. Sélectionner l'onglet **Amplification Plot** (Tracé d'amplification).
 - iii. Sélectionner SARS-CoV-2 dans l'onglet Detector (DéTECTEUR) situé dans le coin supérieur droit.
 - iv. Dans le bloc **Analysis Settings** (Paramètres d'analyse), régler le **Threshold** (Seuil) sur **7.5e+004**.
 - v. Sélectionner le bouton radio **Manual Baseline** (Base de référence manuelle).
 - vi. Appuyer sur « 3 » pour démarrer, et sur « 15 » pour terminer.
 - vii. Sélectionner PRC dans l'onglet Detector (DéTECTEUR) situé dans le coin supérieur droit.
 - viii. Dans le bloc **Analysis Settings** (Paramètres d'analyse), régler le **Threshold** (Seuil) sur **1.0e+004**.
 - ix. Sélectionner le bouton radio **Manual Baseline** (Base de référence manuelle).
 - x. Appuyer sur « 3 » pour démarrer, et sur « 15 » pour terminer.

- f. Sauvegarder le nouveau protocole comme modèle pour de futures utilisations.
 - i. En haut de l'écran, cliquer sur **File** (Fichier) puis sur **Save As** (Enregistrer sous).
 - ii. **Sauvegarder dans** : D:\Applied Biosystems\7500 Fast System\Templates\
 - iii. **Nom du fichier** : « Lyra Direct SARS-CoV-2 »
 - iv. **Enregistrer sous le type** : « SDS Templates (*.sdt) »
- g. Quitter le logiciel.

Procédure de test de l'Applied Biosystems 7500 Fast Dx Thermocycler

1. Lancer la suite logicielle Applied Biosystems® 7500 Fast Dx v1.4.
2. La fenêtre de dialogue **Quick Startup document** (Document de démarrage rapide) s'ouvre.
3. Cliquer sur **Create a new document** (Créer un nouveau document).
4. Ce qui suit concerne principalement le paramétrage par défaut. Sinon, modifier en conséquence.

| | |
|---------------------------|--|
| Test : | Courbe standard (quantification absolue) |
| Réceptacle : | 96 puits transparents |
| Modèle : | Lyra Direct SARS-CoV-2 |
| Mode d'exécution : | Fast 7500 |
| Opérateur : | <i>le nom de l'opérateur</i> |
| Commentaires : | SDS v1.4 |
| Nom de la plaque : | AAMMJJ-Lyra Direct SARS-CoV-2 |

5. Installation d'une plaque d'échantillon
 - a. La procédure de configuration d'une plaque apparaît sous les onglets **Setup** (Configuration) et **Plate** (Plaque).
 - b. Sélectionner tous les puits qui contiennent un échantillon, cliquer à droite, puis sélectionner **Well Inspector** (Inspecteur de puits) dans le menu déroulant. Lorsque la fenêtre contextuelle **Well Inspector** (Inspecteur de puits) s'ouvre, sélectionner les détecteurs pour SARS-CoV-2 et PRC.
 - c. Utiliser le **Well Inspector** (Inspecteur de puits) pour saisir les noms d'échantillons. Les identifiants de patients peuvent être entrés dans la fenêtre Well Inspector (Inspecteur de puits). Il est toutefois recommandé que cela soit fait avant la remise en suspension du Master Mix lyophilisé, après l'exécution ou à l'aide de la fonction d'importation afin de minimiser la durée pendant laquelle les réactions PCR se stabiliseront à température ambiante avant de lancer le cycle.
 - d. Enregistrer le cycle sous **AAMMJJ- Lyra Direct SARS-CoV-2.sds**.
 - e. Une fenêtre s'ouvrira pour demander à l'utilisateur le « Reason for change of entry » (Motif du changement d'entrée). Saisir « **Setup** » (Configuration) et d'autres commentaires pertinents pour le cycle.
6. Démarrer la PCR
 - a. Sélectionner l'onglet **Instrument**.
 - b. Insérer la plaque PCR de 96 puits dans l'instrument.
 - c. Sous **Instrument Control** (Contrôle d'instrument), cliquer sur le bouton **Start** (Démarrer) pour démarrer le cycle.
7. Post PCR

IMPORTANT : Cliquer sur OK lorsque le cycle est terminé.

 - a. Analyser les données en cliquant sur le bouton « **Analyze** » (Analyser) dans le menu supérieur, puis enregistrer le fichier.
 - b. Enregistrer le fichier en cliquant sur **Save Document** (Enregistrer le document) dans la barre des tâches. Une fenêtre s'ouvrira pour demander à l'utilisateur le « Reason for change of entry » (Motif du changement d'entrée).
 - c. Saisir « **Data analysis post run** » (Analyse des données après le cycle) et tout autre commentaire pertinent sur le cycle.
8. Interprétation des résultats (Voir Tableau 5).

Instructions de programmation de l'Applied Biosystems 7500

Se référer au Manuel de l'utilisateur numéro 4387783, mise à jour C, pour de plus amples informations.

1. Lancer la suite logicielle ABI 7500.
2. Sélectionner le bouton **Advanced Setup** (Configuration avancée) pour ouvrir Setup (Configuration) et Experiment Properties (Propriétés du test). Suivre chaque étape pour lancer le protocole Lyra SARS-CoV-2.
 - a. Nom du test : Saisir SARS-CoV-2 comme nom du test. Laisser les champs Barcode (Code-barres), User Name (Nom d'utilisateur) et Comments (Commentaires) vides.
 - b. Définir la configuration du test : Sélectionner 7500 (96 puits), Quantitation- Standard Curve, TaqMan® Reagents et Standard (~2 heures pour terminer un cycle).
3. Dans le menu supérieur gauche, sélectionner **Plate Setup** (Configuration de la plaque).
 - a. Définir les cibles : les nouveaux détecteurs pour le SARS-CoV-2 et le contrôle (PRC) doivent être ajoutés.
 - i. Saisir les informations suivantes pour chaque détecteur.

| Name (Nom) | Colorant reporter | Colorant d'extincteur de luminescence (quencher) | Couleur |
|------------|-------------------|--|-------------------------|
| SARS-CoV-2 | FAM | (none) (aucun) | (Select) (Sélectionner) |
| PCR | Cy5 | (none) (aucun) | (Select) (Sélectionner) |

- ii. Sélectionner le bouton **Add New Target** (Ajouter une nouvelle cible) pour chaque cible.
 - iii. Dans chaque menu déroulant, sélectionner le colorant reporter, le colorant d'extincteur de luminescence (quencher) et la couleur.
 - iv. Sélectionner une couleur unique pour représenter chaque détecteur
- b. Attribuer les cibles et les échantillons : sous cet onglet situé dans le coin inférieur gauche, sélectionner **None** (Aucun) comme Passive Reference (référence passive).
4. Sélectionner **Run Method** (Méthode de cycle) dans le menu supérieur gauche.
 - a. Régler le **Reaction Volume** (Volume de réaction) par puits sur 20 µl sous **Graphical View** (Vue graphique) ou **Tabular View** (Vue tableau).
 - b. Définir le protocole du thermocycleur : Sous **Graphical View** (Vue graphique) ou **Tabular View** (Vue tableau), le profil par défaut doit être de 2 niveaux stationnaires et d'un protocole de cycle en 2 étapes. Chaque phase comporte 3 zones de texte modifiables par l'utilisateur. Le premier champ de valeur est la vitesse de montée (%) pour ce niveau, le deuxième champ de valeur est la température (°C) et le troisième champ de valeur est la durée (minutes:secondes).
 - i. Apporter les changements suivants au réglage par défaut du protocole du thermocycleur :
 1. Niveau 1 Premier **Holding Stage** (Niveau stationnaire)
 - a. Vitesse de montée : 100 %
 - b. Temp. : 55
 - c. Durée : 5:00
 2. Étape 1 Deuxième **Holding Stage** (Niveau stationnaire).
 - a. Vitesse de montée : 100 %
 - b. Temp. : 60
 - c. Durée : 5:00
 3. Mettre en surbrillance le deuxième **Holding Stage** (Niveau stationnaire) et sélectionner le bouton **Add Stage** (Ajouter un niveau). Dans le menu déroulant, sélectionner **Holding** (Stationnaire).
 4. Étape 1 **Third Holding Stage** (Troisième niveau stationnaire)
 - a. Vitesse de montée : 100 %
 - b. Temp. : 65
 - c. Durée : 5:00
 5. Premier **2-Step Cycling Stage** (Niveau de thermocyclage en 2 étapes)
 - a. Nombre de cycles : 10
 - b. Ne PAS cocher Enable Auto Delta (Désactiver Auto Delta).
 - c. Étape 1
 - i. Vitesse de montée : 100 %
 - ii. Temp. : 92
 - iii. Durée : 0:05

- d. Étape 2
 - i. Vitesse de montée : 100 %
 - ii. Temp. : 57
 - iii. Durée : 0:40
 - iv. Positionner la collecte de données sur « Off » (désactivé) en sélectionnant le bouton **Data Selection** (Collecte des données) dans le bas de l'étape.
6. Mettre en surbrillance l'étape 2, puis sélectionner le bouton **Add Stage** (Ajouter un niveau). Dans le menu déroulant, sélectionner **Cycling** (Thermocyclage).
7. Deuxième niveau de thermocyclage en **2 étapes**
 - a. Nombre de cycles : 30
 - b. Ne PAS cocher Enable Auto Delta (Désactiver Auto Delta).
 - c. Étape 1
 - i. Vitesse de montée : 100 %
 - ii. Temp. : 92
 - iii. Durée : 0:05
 - d. Étape 2
 - i. Vitesse de montée : 100 %
 - ii. Temp. : 57
 - iii. Durée : 0:40
 - iv. S'assurer que la collecte des données soit bien sur « On » (activé) pour cette étape (réglage par défaut).
8. Si un niveau erroné est ajouté, le niveau peut être supprimé en appuyant sur le bouton **Undo « Add Stage »** (Annuler « Ajouter un niveau ») immédiatement après avoir ajouté le niveau ou mettre en surbrillance le niveau entre les lignes verticales, puis sélectionner le bouton **Delete Selected (Supprimer la sélection)**.
5. Régler le seuil pour chaque analyte
 - a. Sélectionner l'onglet **Analysis** (Analyse) dans le menu supérieur gauche.
 - b. Sélectionner le bouton **Analysis Settings** (Paramètres de l'analyse) dans le coin supérieur droit.
 - c. Mettre en surbrillance SARS-CoV-2, puis désélectionner la case **Use Default Settings** (Utiliser paramètres par défaut). Désélectionner **Automatic Threshold** (Seuil automatique), puis changer le seuil sur 75 000. Désélectionner **Automatic Baseline**. Entrer 3 pour **Baseline Start Cycle** (Cycle de début de la ligne de base) et entrer 15 pour **End Cycle** (Terminer le cycle) en cliquant sur le bouton « Analysis Settings » (Paramètres de l'analyse) dans le coin supérieur droit.
 - d. Mettre en surbrillance PRC, puis désélectionner la case **Use Default Settings** (Utiliser paramètres par défaut). Désélectionner **Automatic Threshold** (Seuil automatique), puis changer le seuil sur 10 000. Désélectionner **Automatic Baseline**. Entrer 3 pour **Baseline Start Cycle** (Cycle de début de la ligne de base) et entrer 15 pour **End Cycle** (Terminer le cycle) en cliquant sur le bouton « Analysis Settings » (Paramètres de l'analyse) dans le coin supérieur droit.
 - e. Dans le bas de la case, sélectionner le bouton **Apply Analysis Settings** (Appliquer les paramètres d'analyse).

| Cible | Seuil | Début ligne de base | Fin ligne de base |
|------------|--------|---------------------|-------------------|
| SARS-CoV-2 | 75 000 | 3 | 15 |
| PRC | 10 000 | 3 | 15 |

- i. Sauvegarder le nouveau protocole comme modèle pour de futures utilisations.
 - i. Au sommet de l'écran, sélectionner le menu déroulant à côté de **Save** (Sauvegarder).
 - ii. Choisir **Save as Template** (Sauvegarder comme modèle).
 - iii. Sauvegarder dans un dossier approprié.
 - iv. **Nom du fichier** : « Lyra Direct SARS-CoV-2 »
 - v. **Sauvegarder sous le type** : « Experiment Document Template files (*.edt) ».
 - vi. Quitter le logiciel.

Procédure de test de l'Applied Biosystems 7500 Thermocycler Standard

1. Lancer la suite logicielle Applied Biosystems® 7500 Thermocycler Standard v2.06
2. La fenêtre de dialogue **Quick Startup document** (Document de démarrage rapide) s'ouvre.
3. Cliquer sur **Create a new document** (Créer un nouveau document).
4. Ce qui suit concerne principalement le paramétrage par défaut. Sinon, modifier en conséquence.

| | |
|---------------------------|--|
| Test : | Courbe standard (quantification absolue) |
| Réceptacle : | 96 puits transparents |
| Modèle : | Lyra Direct SARS-CoV-2 |
| Mode d'exécution : | 7500 Standard |
| Opérateur : | <i>le nom de l'opérateur</i> |
| Commentaires : | SDS v1.4 |
| Nom de la plaque : | AAMMJJ-Lyra Direct SARS-CoV-2 |

5. Installation d'une plaque d'échantillon
 - a. La procédure de configuration d'une plaque apparaît sous les onglets **Setup** (Configuration) et **Plate** (Plaque).
 - b. Sélectionner tous les puits qui contiennent un échantillon, cliquer à droite, puis sélectionner **Well Inspector** (Inspecteur de puits) dans le menu déroulant. Lorsque la fenêtre contextuelle **Well Inspector** (Inspecteur de puits) s'ouvre, sélectionner les détecteurs pour SARS-CoV-2 et PRC.
 - c. Utiliser le **Well Inspector** (Inspecteur de puits) pour saisir les noms d'échantillons. Les identifiants de patients peuvent être entrés dans la fenêtre Well Inspector (Inspecteur de puits). Il est toutefois recommandé que cela soit fait avant la remise en suspension du Master Mix lyophilisé, après l'exécution ou à l'aide de la fonction d'importation afin de minimiser la durée pendant laquelle les réactions PCR se stabiliseront à température ambiante avant de lancer le cycle.
 - d. Enregistrer le cycle sous **AAMMJJ-Lyra SARS-CoV-2.sds**.
 - e. Une fenêtre s'ouvrira pour demander à l'utilisateur le « Reason for change of entry » (Motif du changement d'entrée). Saisir « **Setup** » (Configuration) et d'autres commentaires pertinents pour le cycle.
6. Démarrer la PCR
 - a. Sélectionner l'onglet **Instrument**.
 - b. Insérer la plaque PCR de 96 puits dans l'instrument.
 - c. Sous **Instrument Control** (Contrôle d'instrument), cliquer sur le bouton **Start** (Démarrer) pour démarrer le cycle.
7. Post PCR

IMPORTANT : Cliquer sur OK lorsque le cycle est terminé.

 - a. Analyser les données en cliquant sur le bouton « **Analyze** » (Analyser) dans le menu supérieur, puis enregistrer le fichier.
 - b. Enregistrer le fichier en cliquant sur **Save Document** (Enregistrer le document) dans la barre des tâches. Une fenêtre s'ouvrira pour demander à l'utilisateur le « Reason for change of entry » (Motif du changement d'entrée).
 - c. Saisir « **Data analysis post run** » (Analyse des données après le cycle) et tout autre commentaire pertinent sur le cycle.
8. Interprétation des résultats (Voir Tableau 4)

Procédure de programmation du système Bio-Rad CFX96 Touch Thermocycler

Se référer au Manuel de l'utilisateur numéro 10010424, mise à jour D, pour de plus amples informations.

Instructions de programmation :

1. Lancer la suite logicielle CFX96 Touch
2. Dans la fenêtre contextuelle **Startup Wizard** (Assistant démarrage), positionner **Select instrument** (Sélectionner instrument) sur **CFX96** à partir du menu déroulant
3. Sous **Select Run Type** (Sélectionner type d'analyse), appuyer sur le bouton **User-defined** (Défini par l'utilisateur).
4. Créer un nouveau protocole de thermocyclage en sélectionnant **Create New** (Créer nouveau) à partir de la fenêtre **Run Setup** (Configuration d'analyse).
5. Apporter les modifications suivantes aux conditions de thermocyclage dans le **Protocol Editor** (Modification du protocole) :
 - a. Modifier le **Sample Volume** (Volume d'échantillon) à **20 ul**
 - b. Sous **Tools** (Outils) dans la barre d'outils située dans le coin supérieur gauche, sélectionner **Run Time Calculator** (Calculateur du temps de cycle), puis cocher **96 Wells-All Channels** (96 puits - tous les canaux).

- c. **Étape 1 (Hold) (Stationnaire)**
 - i. Répétitions : 1
 - ii. Temp. : 55C
 - iii. Durée : 5:00
 - d. **Étape 2 (Hold) (Stationnaire)**
 - i. Répétitions : 1
 - ii. Temp. : 60C
 - iii. Durée : 5:00
 - e. **Étape 3 (Hold) (Stationnaire)**
 - i. Répétitions : 1
 - ii. Temp. : 65C
 - iii. Durée : 5:00
 - iv. Retirer la lecture de plaque de ce niveau en sélectionnant le bouton **Remove Plate Read** (Retirer lecture de plaque) situé dans le bas à gauche.
 - f. **Étape 4 (Niveau d'amplification à 2 étapes)**
 - i. Mettre en surbrillance l'**étape 3**, puis aller dans le bas à gauche de la fenêtre, sélectionner **Insert Step** (Insérer étape) 2 fois au total jusqu'à atteindre l'étape 5 (s'assurer que **After** (Après) apparaît bien sélectionné dans le menu déroulant de **Insert Step**(Insérer étape) situé dans la partie supérieure gauche de la fenêtre).
 - ii. Mettre en surbrillance l'**étape 4**, puis régler comme suit :
 - 1. Temp. : 92C
 - 2. Durée : 0:05
 - iii. Mettre en surbrillance l'**étape 5**, puis régler comme suit :
 - 1. Temp. : 57C
 - 2. Durée : 0:40
 - 3. Aller dans la partie gauche de l'écran, puis sélectionner le bouton **Remove Plate Read** (Retirer lecture de plaque).
 - iv. Sélectionner l'**étape 6, GOTO step** (Aller à l'étape), puis changer en **GOTO step 4** (Aller à l'étape 4) et changer le nombre de répétitions en **9**.
 - g. **Étape 7 (Niveau d'amplification à 2 étapes)**
 - i. Après avoir mis en surbrillance l'étape 6, sélectionner le bouton **Insert Step** (Insérer étape), dans le bas à gauche de la fenêtre, 2 fois au total (jusqu'à atteindre l'étape 8).
 - ii. Mettre en surbrillance l'**étape 7**, puis régler comme suit :
 - 1. Temp. : 92C
 - 2. Durée : 0:05
 - iii. Mettre en surbrillance l'**étape 8**, puis régler comme suit :
 - 1. Temp. : 57C
 - 2. Durée : 0:40
 - 3. Dans la partie gauche de la fenêtre, sélectionner le bouton **Add Plate Read to Step** (Ajouter lecture de plaque à l'étape).
 - 4. Mettre en surbrillance l'**étape 8**, puis sélectionner le bouton **Insert GOTO** (Insérer aller à) dans la partie gauche de la fenêtre.
 - iv. Sélectionner l'**étape 9, GOTO step** (Aller à l'étape), puis changer en **GOTO step 7** (Aller à l'étape 7) et changer le nombre de répétitions en **29**.
 - h. Sauvegarder les nouvelles conditions de thermocyclage en tant que protocole pour de futures utilisations.
 - i. Dans le coin supérieur gauche de l'écran, sélectionner le bouton **Save** (Sauvegarder).
 - ii. Sauvegarder dans le dossier **ExpressLoad** (Téléchargement express).
 - iii. **Nom** du fichier : « Lyra Direct SARS-CoV-2 »
 - iv. **Sauvegarder sous le type** « Protocol File (*.prcl) ».
 - v. Sélectionner **Save** (Sauvegarder).
 - vi. Cliquer sur **Ok** dans la fenêtre de modification du protocole.
6. Définir l'installation de la plaque
- a. Dans la fenêtre **Run Setup** (Configuration d'analyse), sélectionner l'onglet **Plate** (Plaque).
 - b. Sous **Express Load** (Téléchargement express), dans le menu déroulant, sélectionner **Quick Plate 96 wells All Channels.pltd** (Plaque rapide 96 puits Tous canaux.pltd).
 - c. Sélectionner le bouton **Edit Selected** (Modification sélectionnée) pour personnaliser la configuration de la plaque.

- d. Dans la barre d'outils supérieure, sélectionner **Settings** (Paramètres). Les paramètres par défaut doivent être définis.
 - i. **Plate Size** (Taille de la plaque), sélectionner **96 Wells (96 puits)**
 - ii. **Plate Type** (Type de plaque), sélectionner **BR Clear (BR transparente)**
 - iii. **Number Convention** (Numéro de convention), sélectionner **Scientific Notation (Notation scientifique)**
 - iv. **Units** (Unités), sélectionner **Copy Number (Nombre de copies)**
- e. Laisser le **Scan Mode** (Mode balayage) réglé sur **All Channels** (Tous les canaux) au sommet de la fenêtre.
- f. Sélectionner le bouton **Select Fluorophores** (Sélectionner fluorophores) dans le coin supérieur droit de la fenêtre de modification de plaque.
 - i. Désélectionner tous les fluorophores par défaut.
 - ii. Sélectionner **FAM**, et **Cy5**, puis cliquer sur **Ok**.
- g. Dans la fenêtre de **Plate Editor** (Modification de plaque), mettre en surbrillance la totalité de la plaque, puis cocher les cases en face de tous les fluorophores : **FAM** et **Cy5**.
- h. Sélectionner le bouton **Experiment Settings** (Paramètres du test) pour définir les cibles.
 - i. Dans la partie inférieure gauche de la fenêtre **Experiment Settings** (Paramètres du test), dans la case **New** (Nouveau), taper **SARS-CoV-2**, puis sélectionner **Add**(Ajouter).
 - ii. Répéter la même procédure pour le **PRC**.
 - iii. Sélectionner **OK**.
- i. Dans la fenêtre du **Plate Editor** (Modification de plaque), à côté de **FAM** dans le menu déroulant, sous **Target Name** (Nom de la cible), sélectionner **SARS-CoV-2** et, pour **Cy5**, sélectionner **PRC**.
- j. Sauvegarder la configuration de la nouvelle plaque pour de futures utilisations.
 - i. Dans le coin supérieur gauche de l'écran, sélectionner le bouton **Save** (Sauvegarder).
 - ii. Sauvegarder dans le dossier **ExpressLoad** (Téléchargement express).
 - iii. **Nommer** le fichier « Lyra Direct SARS-CoV-2 plate ».
 - iv. **Sauvegarder sous le type** « Plate File (*.pltd) ».
 - v. Sélectionner **Save** (Sauvegarder).
 - vi. Cliquer sur **Ok** dans la fenêtre **Plate Editor** (Modification de plaque).
- k. Quitter le logiciel.

Procédure de test du système Bio-Rad CFX96 Touch Thermocycler

Instructions d'analyse :

1. Ouvrir le fichier d'exécution qui doit être analysé.
2. Dans le coin supérieur gauche, sélectionner l'onglet **Quantification** (Quantification).
3. Sur la courbe d'amplification, cocher la case en face de **Log Scale** (Échelle logarithmique).
4. Sélectionner **Settings** (Paramètres) dans la barre d'outils située dans la partie supérieure gauche de l'écran.
 - a. Pour le **Cq Determination Mode** (Mode de détermination cq), sélectionner **Single Threshold** (Seuil unique).
 - b. Sous **Baseline Setting** (Paramètres de la ligne de base), choisir **Baseline Subtracted Curve Fit** (Ajustement en soustrayant la courbe de la ligne de base).
 - c. Pour l'**Analysis Mode** (Mode d'analyse), sélectionner **Target** (Cible).
 - d. Sous **Cycles to Analyze** (Cycles à analyser), choisir 1-30, puis cliquer sur **Ok**.
 - e. Les cycles et le seuil de la ligne de base doivent être définis pour chaque cible.
 - i. S'assurer que seule la case **SARS-CoV-2** est cochée sur la courbe d'amplification.
 - ii. Aller dans **Settings** (Paramètres) dans la barre d'outils, puis sélectionner **Baseline Threshold** (Seuil de la ligne de base).
 1. Au sommet de la case, cocher **Auto Calculated** (Auto calculé) pour les **Baseline Cycles** (Cycles de la ligne de base).
 2. Pour le **Single Threshold** (Seuil unique) dans le bas de la case, sélectionner **User Defined** (Défini par l'utilisateur).
 - a. Régler sur **164**.
 - b. Sélectionner **OK**.
 - iii. **Désélectionner la case SARS-CoV-2**, puis **cocher** la case **PRC** sur la courbe d'amplification.
 - iv. Aller dans **Settings** (Paramètres) dans la barre d'outils, puis sélectionner **Baseline Threshold** (Seuil de la ligne de base).

1. Au sommet de la case, cocher **Auto Calculated** (Auto calculé) pour les **Baseline Cycles** (Cycles de la ligne de base).
2. Pour le **Single Threshold** (Seuil unique) dans le bas de la case, sélectionner **User Defined** (Défini par l'utilisateur).
 - a. Le régler sur **25**.
 - b. Sélectionner **OK**.
5. Quitter le logiciel.
6. Interprétation des résultats (Voir Tableau 5)

Instructions de programmation pour le système Qiagen Rotor-Gene Q

Se référer au Manuel de l'utilisateur numéro 1065453EN pour de plus amples informations.

Instructions de programmation :

1. Lancer la suite logicielle Rotor-Gene.
2. Dans la fenêtre contextuelle **New Run** (Nouvel cycle), sélectionner l'onglet **Advanced** (Avancé) au sommet de l'écran.
3. Sélectionner **Empty Run** (Cycle vide), puis **New** (Nouveau) dans la partie inférieure droite de la fenêtre contextuelle pour lancer l' **Advanced Run Wizard** (Assistant cycle avancé).
 - a. Sélectionner la taille de rotor appropriée dans le **Advanced Run Wizard** (Assistant cycle avancé) dans la partie supérieure gauche de l'écran.
 - b. Cocher la case disant que **Locking Ring** (Anneau de blocage) est **Attached** (Attaché), puis sélectionner **Next** (Suivant).
 - c. Laisser les sections **Operator** (Opérateur) et **Notes** (Notes) vides.
 - d. Saisir **20 ul** comme **Reaction Volume** (Volume de réaction) dans la partie inférieure gauche de l'écran.
 - e. Pour le **Sample Layout** (Disposition des échantillons), choisir **1, 2, 3...**, puis sélectionner **Next** (Suivant).
 - f. Sous **Channel Setup** (Configuration du canal), sélectionner **Create New** (Créer nouveau) pour saisir des informations pour chaque détecteur.
 - i. Sous **Name** (Nom), saisir **SARS-CoV-2**.
 - ii. **Pour Source** (Source), sélectionner 470 nm.
 - iii. **Pour Detector** (Détecteur), sélectionner 510 nm.
 - iv. Ne pas ajuster le **Gain** (Facteur d'amplification) par défaut sur 7, cela sera fait plus tard.
 - v. Sélectionner **OK**.
 - g. Répéter l'étape ci-dessus en sélectionnant **Create New** (Créer nouveau).
 - i. Sous **Name (Nom)**, saisir **PRC**.
 - ii. **Pour Source** (Source), sélectionner 625 nm.
 - iii. **Pour Detector** (Détecteur), sélectionner 660 nm.
 - iv. Ne pas ajuster le **Gain** (Facteur d'amplification) par défaut sur 7, cela sera fait plus tard.
 - v. Sélectionner **OK**.
 - h. Sélectionner le bouton **Edit Profile** (Modifier le profil) au milieu de la fenêtre pour définir un profil de thermocyclage.
 - i. Dans la fenêtre **Edit Profile** (Modifier le profil), aller dans la partie supérieure gauche de l'écran sur **New** (Nouveau) et, dans le menu déroulant, sélectionner **Cycling** (Thermocyclage). Un niveau de thermocyclage avec maintien de la température stable et trois étapes devrait apparaître.
 - ii. Modifier le niveau stationnaire pour avoir une température à **55°C** et une durée de **5:00 minutes**.
 - iii. Sélectionner le bouton **Insert After** (Insérer après) au milieu de la fenêtre contextuelle, puis sélectionner **New Hold at Temperature** (Nouveau Température Stationnaire).
 - iv. Modifier le niveau stationnaire pour avoir une température à **60°C** et une durée de **5:00 minutes**.
 - v. Sélectionner le bouton **Insert After** (Insérer après) au milieu de la fenêtre contextuelle, puis sélectionner **New Hold at Temperature** (Nouveau à température stationnaire) pour insérer un troisième niveau stationnaire.
 - vi. Modifier le troisième niveau stationnaire pour avoir une température à **65°C** et une durée de **5:00 minutes**.
 - vii. Mettre en surbrillance le premier **niveau de thermocyclage** et la modifier comme suit :
 1. Ce cycle se répète **10** fois.
 2. Sélectionner **Timed Step** (Étape définie) dans le menu déroulant au milieu à gauche de l'écran.
 3. Ne pas sélectionner **Long Range** (plage longue) ou **Touchdown** (PCR par essais) à gauche de l'écran.

4. La première étape :
 - a. **92 °C**
 - b. **5 secondes**
 - c. **Not Acquiring (pas d'acquisition)**
5. Sélectionner l'étape deux et régler comme suit :
 - a. **57 °C**
 - b. **40 secondes**
 - c. **Not Acquiring (pas d'acquisition)**
6. Mettre en surbrillance l'étape trois, puis la supprimer en sélectionnant le bouton « - » au milieu de la fenêtre.
7. Sélectionner le bouton **Insert After**(Insérer après) au milieu de la fenêtre contextuelle, puis sélectionner **New Cycling** (Nouveau thermocyclage).
- viii. Mettre en surbrillance le deuxième **niveau de thermocyclage** , puis la modifier comme suit :
 1. Ce cycle se répète **30** fois.
 2. Sélectionner **Timed Step** (Étape définie) dans le menu déroulant au milieu à gauche de l'écran.
 3. Ne pas sélectionner **Long Range** (plage longue) ou **Touchdown** (PCR par essais) à gauche de l'écran.
 4. La première étape :
 - a. **92 °C**
 - b. **5 secondes**
 - c. **Not Acquiring (pas d'acquisition)**
 5. Sélectionner l'étape deux et régler comme suit :
 - a. **57 °C**
 - b. **40 secondes**
 - c. Sélectionner **Acquiring to Cycling A** (Acquisition du thermocyclage A).
 - i. **Sous Acquiring Channels** (Canaux d'acquisition), mettre en surbrillance le nom du canal par défaut (Vert), puis sélectionner le bouton < pour le déplacer vers la liste des **Available Channels** (Canaux disponibles).
 - ii. Dans la liste des **Available Channels** (Canaux disponibles), sélectionner **SARS-CoV-2** , puis sélectionner le bouton > pour le déplacer vers la liste des **Acquiring Channels** (Canaux d'acquisition).
 - iii. Répéter l'étape ci-dessus pour le **PRC**, puis sélectionner **OK**.
 6. Mettre en surbrillance l'étape trois, puis la supprimer en sélectionnant le bouton « - » au milieu de la fenêtre.
 - ix. Dans la fenêtre **Edit Profile** (Modifier le profil), sélectionner **OK**.
 - i. Dans la fenêtre **New Run Wizard** (Assistant cycle nouveau), sélectionner **Gain Optimisation** (Optimisation de l'amplification).
 - i. Dans la fenêtre **Auto-Gain Optimisation Setup** (Configuration de l'optimisation de l'amplification automatique), sélectionner le menu déroulant sous **Channel Settings** (Paramètres du canal), puis sélectionner **SARS-CoV-2**.
 - ii. Sélectionner le bouton **Add** (Ajouter) sur la droite.
 1. Dans la fenêtre **Auto-Gain Optimisation Channel Settings**(Paramètres du canal d'optimisation de l'amplification automatique), s'assurer que la position du tube de SARS-CoV-2 est bien réglée sur **1**. Pour cela, il est nécessaire qu'un contrôle positif, contenant le SARS-CoV-2 et le PRC, soit testé avec chaque cycle de PCR et placé dans le premier tube. Si cela n'est pas fait, l'amplification pourrait être mal réglée.
 2. Laisser la **Target Sample Range** (Plage échantillon cible) et la **Acceptable Gain Range** (Plage d'amplification acceptable) réglées sur les valeurs de défaut, 5-10FI et -10 à 10 respectivement.
 3. Sélectionner **OK**.
 4. Répéter les étapes 3. j. ii. 1-3. pour le **PRC**.
 - iii. Dans la fenêtre **Auto-Gain Optimisation Setup** (Configuration de l'optimisation d'amplification automatique), cocher la case à côté de **Perform Optimisation Before 1st Acquisition (Effectuer l'optimisation avant la 1^{re} acquisition)**.
 - iv. Sélectionner **Close** (Fermer).
 - j. Dans la fenêtre **New Run Wizard** (Assistant cycle nouveau), sélectionner le bouton **Next** (Suivant).

- k. Sauvegarder le nouveau protocole comme modèle pour de futures utilisations.
 - i. Dans la partie inférieure droite de la fenêtre, sélectionner le bouton **Save Template** (Sauvegarder le modèle).
 - ii. **Sauvegarder dans** : C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates .
 - iii. **Nom du fichier** : « Lyra Direct SARS-CoV-2 »
 - iv. **Sauvegarder sous le type** : 'Template (*.ret)'
- l. Quitter le logiciel.

Cycle de test avec le système Qiagen Rotor-Gene Q

Instructions d'analyse :

1. Dans le New Run Wizard (Assistant cycle nouveau), télécharger le modèle Direct SARS-CoV-2.
2. Appuyer sur Start (Démarrage).
3. Ouvrir le fichier d'exécution qui doit être analysé.
4. Dans la barre d'outils du menu supérieur, sélectionner le bouton **Analysis** (Analyse).
 - a. Sélectionner **Quantitation**(Analyse quantitative), puis **Cycling A. SARS-CoV-2** (Thermocyclage A. SARS-CoV-2) et **Show** (Montrer).
 - b. Le seuil doit être défini pour le SARS-CoV-2.
 - i. Dans l'extrémité inférieure droite de l'écran, sous **CT Calculation** (Calcul CT), saisir **0.03** pour le SARS-CoV-2 Threshold (**Seuil pour le SARS-CoV-2**).
 - ii. Dans la case **Eliminate Cycles before** (Éliminer cycles avant), s'assurer que la valeur par défaut **1** est saisie.
 - iii. S'assurer que le graphique de l'amplification est réglé sur **Log Scale** (Échelle logarithmique) (bouton à bascule dans le bas à gauche du graphique indiquant Linear Scale (Échelle linéaire) ou Log Scale (Échelle logarithmique)).
 - c. Sélectionner **Quantitation**(Analyse quantitative), puis **Cycling A. PRC** (Thermocyclage A. PRC) et **Show** (Montrer).
 - d. Le seuil doit être défini pour le PRC.
 - i. Dans l'extrémité inférieure droite de l'écran, sous **CT Calculation** (Calcul CT), saisir **0.05** pour le PRC Threshold (**Seuil pour le PRC**).
 - ii. Dans la case **Eliminate Cycles before** (Éliminer cycles avant), s'assurer que la valeur par défaut **1** est saisie.
 - iii. S'assurer que le graphique de l'amplification est réglé sur **Log Scale** (Échelle logarithmique) (bouton à bascule dans le bas à gauche du graphique indiquant Linear Scale (Échelle linéaire) ou Log Scale (Échelle logarithmique)).
5. Interprétation des résultats (Voir Tableau 5)

Instructions de programmation du LightCycler 480 Instrument II de Roche

Se référer au Manuel de l'utilisateur numéro 05152062001 0208 pour de plus amples informations.

Créer un modèle de cycle pour le LightCycler 480 Instrument II.

1. Lancer la suite logicielle LightCycler 480.
2. Le **Detection Format** (Format de détection) doit être établi pour spécifier les canaux dans lesquels la fluorescence sera lue.
 - a. Sélectionner **Tools** (Outils) dans l'écran de démarrage, dans la partie inférieure droite de l'écran.
 - b. Sélectionner **Detection Formats** (Formats de détection), puis choisir **New** (Nouveau).
 - c. Nommer le format Lyra Direct SARS-CoV-2.
 - d. Dans la fenêtre **Filter Combination Selection** (Sélection de la combinaison de filtres), sélectionner 465-510 et 618-660.
 - e. Dans la fenêtre **Selected Filter Combination List** (Sélection de la combinaison de filtres), sous le nom, taper SARS-CoV-2 pour 465-510 et PRC pour 618-660.
 - f. Laisser les valeurs par défaut sur 1 sous Melt Factor (Facteur de fusion), Quant Factor (Facteur de quantification) et Max Integration Time (Temps d'intégration maximal).
 - g. Sélectionner **Close** (Fermer) pour sauvegarder le nouveau format de détection et revenir à l'écran de démarrage.
 - h. Pour accéder à ce **Detection Format** (Format de détection) nouvellement créé, le logiciel LightCycler 480 doit être fermé, puis relancé.
3. Après avoir fermé et relancé le logiciel, sélectionner **White Plates** (Plaques blanches) et **New Experiment**(Nouveau test) dans la fenêtre Experiment Creation (Création du test).
4. Sur l'écran suivant, sélectionner « Lyra Direct SARS-CoV-2 » dans le menu déroulant, sous **Detection Formats** (Formats de détection).

5. Saisir **20 ul** comme **Reaction Volume** (Volume de réaction) dans la partie inférieure gauche de l'écran.
6. Saisir les noms pour chacun des programmes RT-PCR.
 - a. Sous **Program Name** (Nom du programme), saisir **Niveau 1**, sous **Cycles**, saisir **1**, et dans **Analysis Mode** (Mode d'analyse), sélectionner **None** (Aucun).
 - b. Sélectionner l'icône « + » pour ajouter un programme.
 - c. Nommer le programme suivant **Niveau 2**, sous **Cycles**, saisir **1**, et dans **Analysis Mode** (Mode d'analyse), sélectionner **None** (Aucun).
 - d. Sélectionner l'icône « + » pour ajouter un programme.
 - e. Nommer le programme suivant **Niveau 3**, sous **Cycles**, saisir **1**, et dans **Analysis Mode** (Mode d'analyse), sélectionner **none** (aucun)
 - f. Sélectionner l'icône « + » pour ajouter un programme.
 - g. Nommer le programme suivant **Niveau 4**, sous **Cycles**, saisir **40**, et dans **Analysis Mode** (Mode d'analyse), sélectionner **quantifications**.
7. Régler les temps et les températures de thermocyclage RT-PCR.
 - a. Mettre en surbrillance **Niveau 1** sous **Program Name** (Nom du programme), puis modifier **Stage 1 Temperature Targets** (Cibles de température pour le niveau 1) comme suit :
 - i. **Target (Cible) (°C)**, régler sur **55**
 - ii. **Acquisition Mode (Mode d'acquisition)**, sélectionner **None (Aucun)**
 - iii. **Hold** (stationnaire) (hh:mm:ss) régler sur **5:00**
 - iv. **Ramp Rate (°C/s) (Vitesse de montée)**, sur **4,4**
 - v. **Sec Target (°C) (Cible sec.)**, **Step Size (°C) (Taille étape)**, et **Step Delay (retard étape) (cycles)** resteront sur 0 pour les niveaux 1-4.
 - b. Mettre en surbrillance **Niveau 2** sous **Program Name** (Nom du programme), puis modifier **Stage 2 Temperature Targets** (Cibles de température pour le niveau 2) comme suit :
 - i. **Target (Cible) (°C)**, régler sur **60**
 - ii. **Acquisition Mode (Mode d'acquisition)**, sélectionner **None (Aucun)**
 - iii. **Hold** (stationnaire) (hh:mm:ss) régler sur **5:00**
 - iv. **Ramp Rate (°C/s) (Vitesse de montée)**, sur **4,4**
 - c. Mettre en surbrillance **Niveau 3** sous **Program Name** (Nom du programme), puis modifier **Stage 3 Temperature Targets** (Cibles de température pour le Niveau 3) comme suit :
 - i. **Target (Cible) (°C)**, régler sur **65**
 - ii. **Acquisition Mode (Mode d'acquisition)**, sélectionner **None (Aucun)**
 - iii. **Hold** (stationnaire) (hh:mm:ss) régler sur **5:00**
 - iv. **Ramp Rate (°C/s) (Vitesse de montée)**, sur **4,4**
 - d. Mettre en surbrillance **Niveau 4** sous **Program Name** (Nom du programme), puis modifier **Stage 4 Temperature Targets** (Cibles de température pour le Niveau 4) comme suit :
 - i. La première étape :
 1. **Target (Cible) (°C)**, régler sur **92**
 2. **Acquisition Mode (Mode d'acquisition)**, sélectionner **None (Aucun)**
 3. **Hold** (stationnaire) (hh:mm:ss) régler sur **0:05**
 4. **Ramp Rate (°C/s) (Vitesse de montée)**, sur **4,4**
 - ii. Sélectionner l'icône « + » pour ajouter une nouvelle étape ou pour définir la deuxième étape :
 1. **Target (Cible) (°C)**, régler sur **57**
 2. **Acquisition Mode (Mode d'acquisition)**, sélectionner **single (Un seul)**
 3. **Hold** (stationnaire) (hh:mm:ss), réglé sur **0:40**
 4. **Ramp Rate (°C/s) (Vitesse de montée)**, sur **2,2**
8. Sauvegarder le nouveau protocole comme modèle pour de futures utilisations.
 - a. Dans le coin inférieur gauche de l'écran, sélectionner le menu déroulant à côté du bouton **Apply Template** (Appliquer modèle).
 - b. Choisir **Save as Template** (Sauvegarder comme modèle).
 - c. Sélectionner le **Templates Folder** (Dossier Modèles).
 - d. Mettre en surbrillance **Run Templates Folder** (Dossier Modèles de cycles).
 - e. Nommer le modèle de cycle Lyra Direct SARS-CoV-2, puis cliquer sur le bouton à cocher.
9. Quitter le logiciel.

Créer une procédure de test pour le LightCycler 480 Instrument II Assay.

1. Charger le modèle de cycle Lyra Direct SARS-CoV-2.
2. Appuyer sur Start (Démarrage).
3. Le modèle d'analyse ne peut être établi qu'une fois l'expérience initiale terminée et deux modèles seront établis : un pour la détection du SARS-CoV-2 et un pour la détection du PRC.
4. Sur le Lyra Direct SARS-CoV-2, sélectionner le bouton **Analysis** (Analyse) dans la barre du module.
 - a. Choisir **Abs Quant/Fit Points**.
 - b. Dans la fenêtre contextuelle **Create New Analysis** (Créer une nouvelle analyse), sélectionner le sous-ensemble prédéfini à partir du menu de **sous-ensembles**, puis sélectionner le bouton à cocher.
 - c. Cliquer sur **Background** (Arrière-plan) pour tous les analytes.
 - i. Régler **Min Offset** (Décalage min) sur 1.
 - ii. Régler **Max Offset** (Décalage max) sur 9.
 - d. Dans la partie centrale inférieure de l'écran, s'assurer que **Color Compensation** (Compensation des couleurs) est désactivé pour tous les analytes.
 - e. Changer les paramètres par défaut sur 7 pour le **First Cycle** (Premier cycle), puis confirmer le **Last Cycle** (Dernier cycle) sur 40.
5. Dans la partie centrale supérieure de l'écran, sélectionner **Noise Band** (Bande de bruit).
6. Choisir **Filter Comb** (Filtre en peigne) 465-510.
7. Dans le menu déroulant, choisir le bouton **Noise Band** (Bande sonore), puis sélectionner ce qui suit :
 - a. SARS-CoV-2 Noise Band Fluorescence (Fluorescence de la bande de bruit). Régler à 1,5.
8. Choisir **Calculate** (Calculer) dans la partie inférieure gauche de l'écran.
9. Sauvegarder le nouveau protocole d'analyse SARS-CoV-2 comme modèle pour de futures utilisations.
 - a. Dans le coin inférieur gauche de l'écran, sélectionner le menu déroulant à côté du bouton **Apply Template** (Appliquer modèle).
 - b. Choisir **Save as Template** (Sauvegarder comme modèle).
 - c. Sélectionner le **Templates Folder** (Dossier Modèles).
 - d. Mettre en surbrillance **Analysis Templates Folder** (Dossier Modèles d'analyse).
 - e. Nommer le modèle d'analyse Lyra Direct SARS-CoV-2 465-510, puis cliquer sur le bouton à cocher.
10. Revenir au cycle, puis choisir **Filter Comb** (Filtre en peigne) 618-660.
11. Dans le menu déroulant, choisir le bouton **Noise Band** (Bande sonore), puis sélectionner ce qui suit :
 - a. Bande de bruit PRC auto
12. Choisir **Calculate** (Calculer) dans la partie inférieure gauche de l'écran.
13. Sauvegarder le protocole d'analyse SARS-CoV-2 comme modèle pour de futures utilisations.
 - a. Dans le coin inférieur gauche de l'écran, sélectionner le menu déroulant à côté du bouton **Apply Template** (Appliquer modèle).
 - b. Choisir **Save as Template** (Sauvegarder comme modèle).
 - c. Sélectionner le **Templates Folder** (Dossier Modèles).
 - d. Mettre en surbrillance le **Analysis Templates Folder** (Dossier Modèles d'analyse).
 - e. Nommer le modèle d'analyse Lyra Direct SARS-CoV-2_618-660, puis cliquer sur le bouton à cocher.
14. Créer un rapport
 - a. Sélectionner l'icône **Save** (Sauvegarder) dans la barre d'action générale située dans le coin droit de l'écran.
 - b. Cela sera fait pour chaque canal analysé.
 - c. Choisir le bouton **Report** (Rapport) dans la barre du module située dans la partie gauche de l'écran.
 - d. Sélectionner les paramètres appropriés, puis appuyer sur le bouton **Generate** (Générer).
15. Pour appliquer un Modèle d'analyse aux cycles suivants
 - a. Lorsque le cycle est terminé, sélectionner le bouton **Analysis** (Analyse) dans la barre du module.
 - b. Choisir **Abs Quant/Fit Points**.
 - c. Dans la fenêtre contextuelle **Create New Analysis** (Créer une nouvelle analyse), sélectionner le sous-ensemble prédéfini à partir du menu de **sous-ensembles**, puis sélectionner le bouton à cocher.
 - d. Sélectionner le bouton **Apply Template** (Appliquer modèle) situé à l'extrémité gauche de l'écran, puis choisir le modèle d'analyse du Lyra Direct SARS-CoV-2_465-510 ou Lyra Direct SARS-CoV-2_618-660 dans le **Analysis Templates Folder** (Dossier des modèles d'analyse).
 - e. Sélectionner yes (oui) dans la fenêtre contextuelle.
16. Interprétation des résultats (Voir Tableau 5)

Instruction de programmation de l'instrument Roche cobas z 480

Se référer au Manuel de l'utilisateur version 1.1.2 pour de plus amples informations.

Créer un modèle de cycle pour l'instrument cobas z 480 Assay.

1. Lancer la suite logicielle cobas z 480.
2. Le **Detection Format** (Format de détection) doit être établi pour spécifier les canaux dans lesquels la fluorescence sera lue.
 - a. Sélectionner **Tools** (Outils) dans l'écran de démarrage, dans la partie inférieure droite de l'écran.
 - b. Sélectionner **Detection Formats** (Formats de détection), puis choisir **New** (Nouveau).
 - c. Nommer le format Lyra Direct SARS-CoV-2.
 - d. Dans la fenêtre **Filter Combination Selection** (Sélection de la combinaison de filtres), sélectionner 465-510 et 610-670.
 - e. Dans la fenêtre **Selected Filter Combination List** (Sélection de la combinaison de filtres), sous le nom, taper SARS-CoV-2 pour 465-510 et PRC pour 610-670.
 - f. Laisser les valeurs par défaut sur 1 sous Melt Factor (Facteur de fusion), Quant Factor (Facteur de quantification) et Max Integration Time (Temps d'intégration maximal).
 - g. Sélectionner **Close** (Fermer) pour sauvegarder le nouveau format de détection et revenir à l'écran de démarrage.
 - h. Pour accéder à ce **Detection Format** (Format de détection) nouvellement créé, le logiciel cobas z 480 doit être fermé, puis relancé.
3. Après avoir fermé et relancé le logiciel, sélectionner **White Plates** (Plaques blanches) et **New Experiment** (Nouveau test) dans la fenêtre Experiment Creation (Création du test).
4. Sur l'écran suivant, sélectionner « Lyra Direct SARS-CoV-2 » dans le menu déroulant, sous **Detection Formats** (Formats de détection).
5. Saisir **20 ul** comme **Reaction Volume** (Volume de réaction) dans la partie inférieure gauche de l'écran.
6. Saisir les noms pour chacun des programmes RT-PCR.
 - a. Sous **Program Name** (Nom du programme), saisir **Niveau 1**, sous **Cycles**, saisir **1**, et dans **Analysis Mode** (Mode d'analyse), sélectionner **None** (Aucun).
 - b. Sélectionner l'icône « + » pour ajouter un programme.
 - c. Nommer le programme suivant **Niveau 2**, sous **Cycles**, saisir **1**, et dans **Analysis Mode** (Mode d'analyse), sélectionner **None** (Aucun).
 - d. Sélectionner l'icône « + » pour ajouter un programme.
 - e. Nommer le programme suivant **Niveau 3**, sous **Cycles**, saisir **1**, et dans **Analysis Mode** (Mode d'analyse), sélectionner **none** (aucun).
 - f. Sélectionner l'icône « + » pour ajouter un programme.
 - g. Nommer le programme suivant **Niveau 4**, sous **Cycles**, saisir **40**, et dans **Analysis Mode** (Mode d'analyse), sélectionner **quantifications**.
7. Régler les temps et les températures de thermocyclage RT-PCR.
 - a. Mettre en surbrillance **Niveau 1** sous **Program Name** (Nom du programme), puis modifier **Stage 1 Temperature Targets** (Cibles de température pour le niveau 1) comme suit :
 - i. **Target** (Cible) (°C), régler sur **55**
 - ii. **Acquisition Mode** (Mode d'acquisition), sélectionner **None** (Aucun)
 - iii. **Hold** (stationnaire) (hh:mm:ss) régler sur **5:00**
 - iv. **Ramp Rate** (°C/s) (Vitesse de montée), sur 4,4
 - v. **Sec Target** (°C) (Cible sec.), **Step Size** (°C) (Taille étape), et **Step Delay** (retard étape) (cycles) resteront sur 0 pour les niveaux 1-4.
 - b. Mettre en surbrillance **Niveau 2** sous **Program Name** (Nom du programme), puis modifier **Stage 2 Temperature Targets** (Cibles de température pour le niveau 2) comme suit :
 - i. **Target** (Cible) (°C), régler sur **60**
 - ii. **Acquisition Mode** (Mode d'acquisition), sélectionner **None** (Aucun)
 - iii. **Hold** (stationnaire) (hh:mm:ss) régler sur **5:00**
 - iv. **Ramp Rate** (°C/s) (Vitesse de montée), sur 4,4

- c. Mettre en surbrillance **Niveau 3** sous **Program Name** (Nom du programme), puis modifier **Stage 3 Temperature Targets** (Cibles de température pour le Niveau 3) comme suit :
 - i. **Target** (Cible) (**°C**), régler sur **65**
 - ii. **Acquisition Mode** (Mode d'acquisition), sélectionner **None** (Aucun)
 - iii. **Hold** (stationnaire) (hh:mm:ss) régler sur **5:00**
 - iv. **Ramp Rate** (**°C/s**) (Vitesse de montée), sur 4,4
- d. Mettre en surbrillance **Niveau 4** sous **Program Name** (Nom du programme), puis modifier **Stage 4 Temperature Targets** (Cibles de température pour le Niveau 4) comme suit :
 - i. La première étape :
 1. **Target** (Cible) (**°C**), régler sur **92**
 2. **Acquisition Mode** (Mode d'acquisition), sélectionner **None** (Aucun)
 3. **Hold** (stationnaire) (hh:mm:ss) régler sur **0:05**
 4. **Ramp Rate** (**°C/s**) (Vitesse de montée), sur 4,4
 - ii. Sélectionner l'icône « + » pour ajouter une nouvelle étape ou pour définir la deuxième étape :
 1. **Target** (Cible) (**°C**), régler sur **57**
 2. **Acquisition Mode** (Mode d'acquisition), sélectionner **single** (Un seul)
 3. **Hold** (stationnaire) (hh:mm:ss), réglé sur **0:40**
 4. **Ramp Rate** (**°C/s**) (Vitesse de montée), sur 2,2
8. Sauvegarder le nouveau protocole comme modèle pour de futures utilisations.
 - a. Dans le coin inférieur gauche de l'écran, sélectionner le menu déroulant à côté du bouton **Apply Template** (Appliquer modèle).
 - b. Choisir **Save as Template** (Sauvegarder comme modèle).
 - c. Sélectionner le **Templates Folder** (Dossier Modèles).
 - d. Mettre en surbrillance **Run Templates Folder** (Dossier Modèles de cycles).
 - e. Nommer le modèle de cycle Lyra Direct SARS-CoV-2, puis cliquer sur le bouton à cocher.
9. Quitter le logiciel.

Créer une procédure de test pour le cobas z 480 Assay

1. Charger le modèle de cycle Lyra Direct SARS-CoV-2.
2. Appuyer sur Start (Démarrage).
3. Le modèle d'analyse ne peut être établi qu'une fois l'expérience initiale terminée et deux modèles seront établis : un pour la détection du SARS-CoV-2 et un pour la détection du PRC.
4. Sur le Lyra Direct SARS-CoV-2, sélectionner le bouton **Analysis** (Analyse) dans la barre du module.
 - a. Choisir **Abs Quant/Fit Points**.
 - b. Dans la fenêtre contextuelle **Create New Analysis** (Créer une nouvelle analyse), sélectionner le sous-ensemble prédéfini à partir du menu de **sous-ensembles**, puis sélectionner le bouton à cocher.
 - c. Cliquer sur **Background** (Arrière-plan) pour tous les analytes.
 - i. Régler **Min Offset** (Décalage min) sur 1.
 - ii. Régler **Max Offset** (Décalage max) sur 9.
 - d. Dans la partie centrale inférieure de l'écran, s'assurer que la **Color Compensation** (Compensation des couleurs) est désactivée pour tous les analytes.
 - e. Changer les paramètres par défaut sur 7 pour le **First Cycle** (Premier cycle), puis confirmer le **Last Cycle** (Dernier cycle) sur 40.
5. Dans la partie centrale supérieure de l'écran, sélectionner **Noise Band** (Bande de bruit).
6. Choisir **Filter Comb** (Filtre en peigne) 465-510.
7. Dans le menu déroulant, choisir le bouton **Noise Band** (Bande sonore), puis sélectionner ce qui suit :
 - a. SARS-CoV-2 Noise Band Fluorescence (Fluorescence de la bande de bruit). Régler à 1,5.
8. Choisir **Calculate** (Calculer) dans la partie inférieure gauche de l'écran.
9. Sauvegarder le protocole d'analyse SARS-CoV-2 comme modèle pour de futures utilisations.
 - a. Dans le coin inférieur gauche de l'écran, sélectionner le menu déroulant à côté du bouton **Apply Template** (Appliquer modèle).
 - b. Choisir **Save as Template** (Sauvegarder comme modèle).
 - c. Sélectionner le **Templates Folder** (Dossier Modèles).
 - d. Mettre en surbrillance **Analysis Templates Folder** (Dossier Modèles d'analyse).
 - e. Nommer le modèle d'analyse Lyra Direct SARS-CoV-2_465-510, puis cliquer sur le bouton à cocher.
10. Revenir au cycle, puis choisir **Filter Comb** (Filtre en peigne) 610-670.

11. Dans le menu déroulant, choisir le bouton **Noise Band** (Bande sonore), puis sélectionner ce qui suit :
 - a. Bande de bruit PRC auto
12. Choisir **Calculate**(Calculer) dans la partie inférieure gauche de l'écran.
13. Sauvegarder le protocole d'analyse SARS-CoV-2 comme modèle pour de futures utilisations.
 - a. Dans le coin inférieur gauche de l'écran, sélectionner le menu déroulant à côté du bouton **Apply Template** (Appliquer modèle).
 - b. Choisir **Save as Template** (Sauvegarder comme modèle).
 - c. Sélectionner le **Templates Folder** (Dossier Modèles).
 - d. Mettre en surbrillance **Analysis Templates Folder** (Dossier Modèles d'analyse).
 - e. Nommer le modèle d'analyse Lyra Direct SARS-CoV-2_610-670, puis cliquer sur le bouton à cocher.
14. Créer un rapport
 - a. Sélectionner l'icône **Save** (Sauvegarder) dans la barre d'action générale située dans le coin droit de l'écran.
 - b. Cela sera fait pour chaque canal analysé.
 - c. Choisir le bouton **Report** (Rapport) dans la barre du module située dans la partie gauche de l'écran.
 - d. Sélectionner les paramètres appropriés, puis appuyer sur le bouton **Generate** (Générer).
15. Pour appliquer un Modèle d'analyse aux cycles suivants
 - a. Lorsque le cycle est terminé, sélectionner le bouton **Analysis** (Analyse) dans la barre du module.
 - b. Choisir **Abs Quant/Fit Points** .
 - c. Dans la fenêtre contextuelle **Create New Analysis** (Créer une nouvelle analyse), sélectionner le sous-ensemble prédéfini à partir du menu de **sous-ensembles** , puis sélectionner le bouton à cocher.
 - d. Sélectionner le bouton **Apply Template** (Appliquer modèle) situé à l'extrémité gauche de l'écran, puis choisir le modèle d'analyse Lyra Direct SARS-CoV-2_465-510 ou Lyra Direct SARS-CoV-2_610-670 dans le **Analysis Templates Folder** (Dossier des modèles d'analyse).
 - e. Sélectionner yes (oui) dans la fenêtre contextuelle.
16. Interprétation des résultats (Voir Tableau 5)

Instructions de programmation pour l'instrument Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro

Se référer au Manuel de l'utilisateur numéro 4489822, Mise à jour A, pour de plus amples informations.

Instructions de programmation des séries de test pour l'instrument Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro

1. Ouvrir le logiciel Design and Analysis.
2. Sélectionner l'option « SET UP PLATE » (Définir la plaque).
3. Dans la barre latérale de l'écran, sélectionner les propriétés suivantes :
 - a. Instrument – QuantStudio 7 Pro
 - b. Block – 96-Well 0.2 mL (Bloc - 96 puits 0,2 ml)
 - c. Run Mode – Fast (Vitesse de cycle - Rapide)
 - d. Les champs réservés aux options d'analyses resteront vides.
4. Parmi les sélections de plaque présentes à l'écran, sélectionner le Modèle de système « Presence/Absence » et le système dirigera automatiquement l'utilisateur vers l'onglet « Run Method » (Méthode d'analyse).
5. Méthode d'analyse
 - a. Changer le Reaction Volume (Volume de réaction) sur 20,0 ul.
 - b. La température du couvercle chauffant activé restera à 105 °C.
 - c. Faire glisser la souris sur Hold Stage (niveau stationnaire) situé dans les paramètres d'analyse et des boutons +/- apparaîtront dans le bas et dans le haut du premier niveau.
 - d. Cliquer à gauche sur le bouton d'ajout droit au sommet et une liste de choix de Niveau apparaîtront. Faire défiler vers le bas et choisir Hold (Stationnaire).
 - e. Répéter les étapes précédentes de sorte que trois niveaux Hold (Stationnaire) soient présentes dans les paramètres d'analyse.
 - f. Faire glisser la souris sur le PCR Stage (Niveau PCR) et des boutons +/- apparaîtront dans le bas et dans le haut. Cliquer à gauche sur le bouton d'ajout droit au sommet et une liste de choix de Niveau apparaîtront. Faire défiler vers le bas et choisir PCR.
 - g. Revenir à la première et saisir les paramètres suivants :
 - i. Niveau 1 Hold (Stationnaire)
 1. 2,63 ramp rate (vitesse de montée)
 2. 55 °C
 3. 5 minutes

- ii. Niveau 2 Hold (Stationnaire)
 - 1. 2,63 ramp rate (vitesse de montée)
 - 2. 60 °C
 - 3. 5 minutes
 - iii. Niveau 3 Hold (Stationnaire)
 - 1. 2,63 ramp rate (vitesse de montée)
 - 2. 65 °C
 - 3. 5 minutes
 - iv. Niveau 4 PCR
 - 1. Étape 1 :
 - a. 2,63 ramp rate (vitesse de montée)
 - b. 92 °C
 - c. 5 secondes
 - 2. Étape 2 :
 - a. 2,32 ramp rate (vitesse de montée)
 - b. 57 °C
 - c. 40 secondes
 - d. Cliquer sur l'icône de la caméra sous Étape 2. Une fenêtre contextuelle apparaîtra demandant confirmation pour arrêter la collecte de données pour cette étape. Cliquer sur « OK ».
 - v. Dans le bas de Niveau 4 PCR, changer le nombre de cycles sur 10
 - vi. Phase 5 PCR
 - 1. Étape 1 :
 - a. 2,63 ramp rate (vitesse de montée)
 - b. 92 °C
 - c. 5 secondes
 - 2. Étape 2 :
 - a. 2,32 ramp rate (vitesse de montée)
 - b. 57 °C
 - c. 40 secondes
 - d. S'assurer que l'image de l'icône de la caméra soit en gras/visible pour la collecte de données pendant les 30 cycles de Phase 5, Étape 2.
 - vii. Dans le bas de Phase 5 PCR, changer le nombre de cycles sur 30.
 - h. Faire défiler vers le haut et choisir l'onglet « Plate Setup » (Configuration de la plaque) près du sommet de l'écran.
6. Configuration de la plaque
- a. Changer les Passive Reference (Références passives) en « NONE » (aucune).
 - b. Dans la partie inférieure droite de l'écran, s'assurer que l'onglet Targets (Cibles) est sélectionné, puis appuyer sur le bouton d'ajout pour ajouter « Target 1 » (Cible 1). Appuyer à nouveau pour ajouter la « Target 2 » (Cible 2).
 - c. Cliquer sur la case « Target 1 » (Cible 1), puis changer le nom pour indiquer CoV-2.
 - d. Cliquer sur la case du reporteur associé, en dessous de l'onglet Rapporteur et, à partir du menu déroulant, choisir FAM.
 - e. Cliquer sur la case « Target 2 » (Cible 2), puis changer le nom pour indiquer PRC.
 - f. Cliquer sur la case du reporteur associé, en dessous de l'onglet Rapporteur et, à partir du menu déroulant, choisir CY5.
 - g. Mettre en surbrillance le bouton « Actions » (Actions) situé dans le coin supérieur droit de l'écran, puis appuyer sur le bouton du menu déroulant. Dans le menu déroulant, choisir « Analysis Setting » (Paramètres de l'analyse).
 - h. Sous « Analysis Setting » (Paramètres de l'analyse), désactiver toutes les cibles suivantes :
 - i. Colonne « Use Default » (Utilisation par défaut)
 - ii. Colonne « Auto Threshold » (Seuil automatique)
 - iii. Colonne « Auto Baseline » (Ligne de base automatique)
 - iv. Le début et la fin de la ligne de base doivent avoir une valeur par défaut de 3 et de 15.
 - i. Sous « Threshold » (Seuil), cliquer sur la case associée à la cible CoV et saisir 40 000.
 - j. Sous « Threshold » (Seuil), cliquer sur la case associée à la cible PRC et saisir 10 000.
 - k. Cliquer sur « Save » (Sauvegarder).

- I. Revenir au bouton « Actions » (Actions), puis appuyer sur le bouton du menu déroulant, choisir « Save as » (Sauvegarder sous). Le modèle sera alors sauvegarder à l'emplacement choisi. Sauvegarder le modèle sous le nom « Lyra Direct SARS Cov-2 Assay ».

Créer une procédure de test avec l'instrument Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro.

Remarque : ces instructions ont été rédigées en partant du principe que l'utilisateur ne possède pas l'instrument QuantStudio 7 Real-Time PCR ni les logiciels ABI Design et Analysis 2.4. L'utilisateur doit ouvrir le modèle Lyra Direct SARS CoV-2 créé précédemment avec le logiciel et sauvegarder tout modèle d'analyse d'échantillon nouvellement créé sur une clé USB, puis transférer le modèle sur l'instrument.

Pour toute question de compatibilité relative au logiciel et à l'instrument, contacter le représentant Thermo Fisher/ABI QuantStudio.

1. Ouvrir le modèle précédemment généré avec le Lyra Direct SARS CoV-2 Assay.
2. Cliquer sur l'onglet de la configuration de la plaque situé près du sommet de l'écran.
3. Dans la partie droite de l'écran, s'assurer que l'onglet « Samples » (Échantillons) est en surbrillance, puis appuyer sur le bouton d'ajout pour ajouter le nombre d'échantillons à tester.
4. Cliquer sur la case « Sample 1 » (Échantillon 1) pour renommer l'échantillon. Répéter cette étape pour tous les échantillons suivants à saisir.
5. Cliquer sur le puits situé sur la carte de la plaque, puis cocher la case à côté du nom de l'échantillon dans la barre latérale droite pour associer le nom au puits.
 - a. L'utilisateur a également la possibilité de mettre en surbrillance l'emplacement du puits sur la carte de la plaque et de cliquer sur la case « Enter sample » (Saisir échantillon). Saisir l'ID de l'échantillon, puis appuyer sur la touche de tabulation pour passer au puits suivant sur la carte de la plaque. Le nom de l'échantillon sera alors automatiquement téléchargé dans la barre latérale.
6. Lorsque les noms des échantillons auront été saisis, les puits pourront être mis en surbrillance en cliquant gauche avec la souris sur le puits de départ et en faisant glisser la souris au-dessus des puits associés pour une même analyse. Les cibles sont ensuite choisies en cliquant sur les cases à côté de chaque cible dans la barre latérale.
7. Cliquer sur le bouton d'actions situé dans le coin supérieur droit de l'écran, puis choisir « Save as » (Enregistrer sous) dans le menu déroulant.
 - a. Une fenêtre contextuelle apparaîtra invitant l'utilisateur à nommer le fichier selon les informations propres à l'analyse des échantillons et à l'emplacement où le fichier doit être sauvegardé.
 - b. Sauvegarder le fichier d'analyse nouvellement nommé (.edt) sur une clé USB insérée dans l'ordinateur.
8. Brancher la clé USB dans le port situé à l'avant de l'instrument.
9. Parmi les options proposées sur l'écran de l'instrument, appuyer sur « Load Plate File » (télécharger le fichier de la plaque). L'instrument QuantStudio 7 dispose d'un écran tactile.
10. Sur l'écran « Run Queue », appuyer sur « USB drive » sur le côté droit. Les fichiers de plaque sauvegardés sur la clé USB apparaîtront alors à l'écran.
11. Appuyer sur le fichier de la plaque se rapportant à l'analyse à réaliser.
12. Une nouvelle fenêtre apparaîtra demandant l'emplacement des résultats une fois l'analyse terminée.
 - a. Appuyer sur « USB drive Connected » (Connecté au drive USB) si l'icône n'est pas déjà en surbrillance, puis appuyer sur « Done » (Effectué).
13. Centrifuger la plaque d'échantillons à 96 puits afin de s'assurer que tout le liquide se trouve bien au fond de chaque puits.
 - a. Veiller à ce que la centrifugation soit équilibrée correctement.
 - b. Retirer délicatement la plaque de la centrifugeuse en s'assurant que tout le liquide reste bien dans le fond des puits.
14. Appuyer sur l'icône de la double flèche située dans le coin supérieur droit de l'écran de l'instrument.
 - a. Le tiroir de l'instrument s'ouvre vers l'avant.
15. Placer le plateau à centrifuger dans le support pour plateau en veillant à sa bonne orientation.
 - a. Le puits A1 doit être positionné dans le coin supérieur gauche.
 - b. Le plateau semblera légèrement suspendu au-dessus du bloc à cause des deux bandes en silicone situées au-dessus et en dessous de cette plaque. Ceci est normal et le couvercle de l'instrument appuiera la plaque vers le bas une fois que le tiroir sera fermé.

16. Appuyer sur « Start Run » (Commencer l'analyse) sur l'écran de l'instrument.
 - a. Une fenêtre contextuelle apparaîtra demandant à l'utilisateur de confirmer le chargement de la plaque.
 - b. Si la plaque a été chargée, appuyer une nouvelle fois sur « Start Run » (Commencer l'analyse) ou appuyer sur « Open Drawer » (Ouvrir le tiroir) pour placer le plateau dans le bloc, puis appuyer sur « Start Run » (Commencer l'analyse).
17. Interprétation des résultats (Voir Tableau 5)



M124 – Kit Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Allemagne



Quidel Corporation
2005 East State Street, Suite 100
Athens, OH 45701 USA
quidel.com

PIM124101FR00 (06/21)

GLOSSAIRE

REF

Numéro de catalogue



Marque de conformité CE

EC REP

Représentant autorisé dans la Communauté européenne

LOT

Numéro de lot



Date limite d'utilisation



Fabricant



Limite de température



Utilisation prévue

R_x ONLY

Utilisation sur ordonnance exclusivement



Consulter le mode d'emploi de l'étiquetage électronique.



Risques biologiques

IVD

Dispositif médical de diagnostic *in vitro*



Quantité suffisante pour <n> déterminations

CONT

Compositions/Contient

CONTROL

Contrôle
