



Image: Plaque de test d'expérimentation sur le coronavirus.
Credit: Public Health Image Library, Centers for Disease Control and Prevention, USA.

DEVELOPPEMENT DE TESTS EN INTERNE POUR LA DETECTION MOLECULAIRE DU SARS-COV-2

TABLE DE MATIERES

Remerciements	3	Flux de Travail de Test PCR	20
Abbreviations	4	Prevenir les Contaminations Durant la PCR	22
Introduction	5	Mesures D'incertitude pour les Tests	
But et Champs D'application	6	Moleculaires de SARS-CoV-2	22
A Propos du SARS-CoV-2	6	Sources D'incertitude Pre-Analytique	22
Introduction a la PCR/RT-PCR	7	Sources D'incertitude Analytique	23
Tests Qualitatifs Contre Tests Quantitatifs	7	Assurance Qualite pour les Tests PCR	23
Methodes D'extraction de l'arn Viral	8	Indicateurs de Qualite	24
Conception du Protocole de PCR	10	Conclusion	25
Considerations en Ressources pour Developper des		References	26
Tests en Interne	10		
Exigences en Equipement pour le Developpement			
des Tests	10	Annexes	27
Aperçu Du Processus De Conception Du Test	11	Annexe 1 :	
Conception D'amorces Et Sondes	11	Selectionner les Kits D'extraction D'arn et	
Conception D'amorces	11	Systemes Automatisees	28
Conception de Sondes D'hybridization/		Annexe 2 :	
Hydrolyse	12	Equipement Minimum Requis	29
Suggestions Pour La Selection D'amorces Et		Annexe 3 :	
Sondes	13	Selectionner les Fabricants du Systeme RT-PCR	
Composants Additionnels des Reactions de Retro-		en Temps Reel	30
Transcription et de Polymerisation en Chaîne	13	Annexe 4 :	
Enzymes	14	Selectionner les Concepteurs et Synthetiseurs	
Suggestions pour la Selection D'enzymes	15	D'amorces et Sondes	31
Controles	15	Annexe 5 :	
Optimiser les Conditions Operatoires	17	Selectionner les Fournisseurs en Reactifs du	
Utiliser les Tests Développés par D'autres		Melange Reactionnel	32
Laboratoires	17	Annexe 6 :	
Validation du Protocole Developpe dar un		Pratiques de Prevention des Contaminations	33
Autre Laboratoire	18	Zone 1 : Zone de Pre-Amplification	33
Sensibilite	18	Zone 2 : Zone D'extraction D'acide Nucleique	34
Specificite	18	Zone 3 : Zone(S) D'amplification & Detection	35
Sensibilite Analytique	18	Annexe 7 :	
Specificite Analytique	19	Selectionner Le Prestataire De Tests De	
Precision	19	Competence Ou Daptitude En Diagnostic De La	
Diagnostic en Laboratoire D'analyses		Covid-19	36
Medicales	20		
Mise en Place du Laboratoire	20		
Exigences de Biosecurite	20		

REMERCIEMENTS

Ce guide a été développé par la Fondation pour les nouveaux diagnostics innovants (FIND) et la Société africaine de médecine de laboratoire (ASLM), avec un financement de UK Aid. La traduction de ce document en français a été rendue possible grâce au financement d'Unitaid.

Nous adressons nos remerciements à tous ceux qui ont contribué à l'élaboration et à la révision de ce guide :

Rédacteurs principaux : Marinus Barnard, André Trollip, Devy Emperador, Heidi Albert (FIND), Sharon Altmann et Lance Presser (MRIGlobal)

Relecteurs : Karishma Saran, Beatrice Gordis (FIND), Casey Ross (MRIGlobal), Collins Otieno, Pascale Ondo, Marguerite Massinga, Anafi Mataka (ASLM)

Mise en page : JR Papa (SFD Creative)

ABBREVIATIONS

pb	Paires de bases	PTC	Modèle de contrôle positif
BSC	Armoire de sécurité biologique	AQ	Assurance qualité
BSL	Niveau de biosécurité	CQ	Contrôle qualité
cDNA	Acide désoxyribonucléique complémentaire	QMS	Système de gestion de la qualité
COVID-19	Coronavirus disease 2019	qRT-PCR	Réaction de transcription inverse et de polymérisation en chaîne quantitative
C_q	Valeur de quantification du cycle	ARN	Acide ribonucléique
C_T	Valeur du cycle seuil	RT-PCR	Réaction de transcription inverse et de polymérisation en chaîne
ADN	Acide désoxyribonucléique	SARS-CoV-2	Syndrome respiratoire sévère aigu du Coronavirus 2
DNTP	Désoxynucléoside triphosphate	POS	Procédure Opérateur Standard
dsDNA	Double brin d'acide désoxyribonucléique	ssRNA	Brin simple d'acide ribonucléique
DTT	Dithiothréitol	TAT	Délai d'exécution
DUTP	Désoxyuridine triphosphate	Tm	Température de fusion
EQA	Evaluation externe de la qualité	UNG	Uracil-N-glycosylase
EVAg	Archive européen de virus Evag – GLOBAL	OMS	Organisation Mondiale de la Santé
gDNA	Acide désoxyribonucléique génomique		
G	Guanine		
GITC	Isothiocyanate de guanidium		
IAC	Contrôle d'amplification interne		
IQC	Contrôle de qualité interne		
ISO	Organisation Internationale pour la Normalisation		
IVD	Diagnostic <i>in vitro</i>		
KCl	Chlorure de potassium		
KPI	Indicateur de performance clé		
LDT	Test développé par le laboratoire		
LMICs	Pays à revenu faible et intermédiaire		
LoD	Limite de détection		
MgCl₂	Chlorure de magnésium		
NAAT	est d'amplification d'acide nucléique		
NEC	Contrôle négatif d'extraction		
No-RT	Pas de contrôle de reverse-transcriptase		
NTC	Pas de contrôle du modèle		
PCR	Réaction en chaîne de polymérase		
PT	Test de compétence ou d'aptitude		

INTRODUCTION

La pandémie mondiale de SARS-CoV-2 a mis en exergue les services d'analyses et de diagnostic biologique au niveau mondial. Les outils de diagnostic agressives et soutenables constituent le fondement des stratégies tester-traquer-isoler qui sont au cœur de la riposte actuelle contre le SARS-CoV-2 et qui sont essentielles pour atténuer l'impact sanitaire et économique de la pandémie.

Les stratégies efficaces de tests reposent sur des résultats obtenus dans un délai d'exécution rapide, à partir des tests de diagnostic précis et fiables. Les tests de diagnostic fournissent des informations essentielles pour la surveillance des maladies et les interventions ciblées pour les communautés qui en ont le plus besoin. Ces tests peuvent également aider les systèmes de santé faible à gérer de ressources peu abondantes telles que les lits d'hôpitaux.

Pour l'avenir, les tests efficaces étayeront le succès des futurs vaccins et traitements contre le SARS-CoV-2. Les données de diagnostic éclairent déjà les essais cliniques en cours. Une fois que les traitements ou les vaccins seront rendus disponibles, les tests de diagnostic permettront de mettre en place des stratégies de déploiement et faciliteront un accès prioritaire aux services de santé pour nos populations les plus vulnérables.

Malgré son importance largement reconnue, le diagnostic du SARS-CoV-2 a été un échec criarde dans de nombreux pays. Dans le cas d'un nouveau pathogène humain comme le SARS-CoV-2, les outils de diagnostic ne sont pas disponibles immédiatement et doivent être créés à partir de « zéro ». Cela signifie qu'il y'a un décalage entre le moment où le besoin du test est identifié et le moment où ces tests sont disponibles pour utilisation. Dans les pays à revenu faible et intermédiaire (PRFI), les défis sont considérablement plus perceptibles et couvrent toute la cascade du diagnostic. Les tests de diagnostic rapides et précis ne sont pas disponibles ; les équipements de protection individuelle et les réactifs des tests nécessaires prennent du retard, indisponibles ou inaccessibles ; et les systèmes de chaîne de froid nécessaire pour préserver l'intégrité des réactifs de diagnostic sont fragiles. Le développement de tests en interne (i.e. faits maison) pour détecter les agents pathogènes émergents est une stratégie qui aiderait à atténuer certains des défis associés à l'utilisation de kits produits ailleurs dans la région ou dans le monde.

L'organisation mondiale de la santé (OMS) recommande des tests d'amplification des acides nucléiques (TAAN) pour le diagnostic du SARS-CoV-2. Cette technologie est basée sur la détection de séquences uniques d'acides ribonucléiques (ARN) du virus à l'aide de techniques telles que la réaction de retro-transcription et de polymérisation en chaîne en temps réel (RT-PCR en temps réel). Il existe deux types de plates-formes de diagnostic pour la détection du SARS-CoV-2 :

- + **Systèmes fermés** : il s'agit de systèmes de tests propriétaires, où tous les accessoires nécessaires doivent être fournis par le fabricant du test. Les systèmes de test fermés ont des procédures normalisées et ne peuvent pas être programmés pour utiliser des accessoires de test provenant d'un autre fabricant. Les exemples incluent le système Abbott m2000 RealTime, le système BioFire® FilmArray®, les systèmes Cepheid GeneXpert® et les systèmes Roche cobas®.
- + **Systèmes ouverts** : à la différence des systèmes fermés, les systèmes ouverts peuvent prendre en compte différents types de réactifs provenant de plusieurs fabricants ou des tests développés par le laboratoire (LDT). Les normes dépendent des différents composants. Les exemples incluent les systèmes CFX de Bio-Rad, ABI 7500 DX et Rotor-Gene de Qiagen.

Le processus de développement d'un nouveau test de diagnostic moléculaire est laborieux et nécessite un investissement en temps et en ressources financières et matérielles pour son aboutissement. En ce qui concerne les systèmes fermés en particulier, les ressources disponibles pour produire et distribuer les intrants sont très limitées et lors de grandes épidémies de maladie, les fabricants de tests ne peuvent répondre qu'à une petite fraction de leur demande au niveau mondial. De ces faits, la capacité de développer et de valider des tests « en interne » permet à tout laboratoire de répondre plus rapidement aux épidémies des agents pathogènes émergents qu'il ne le serait si dépendant du développement et de l'approbation des kits commerciaux.

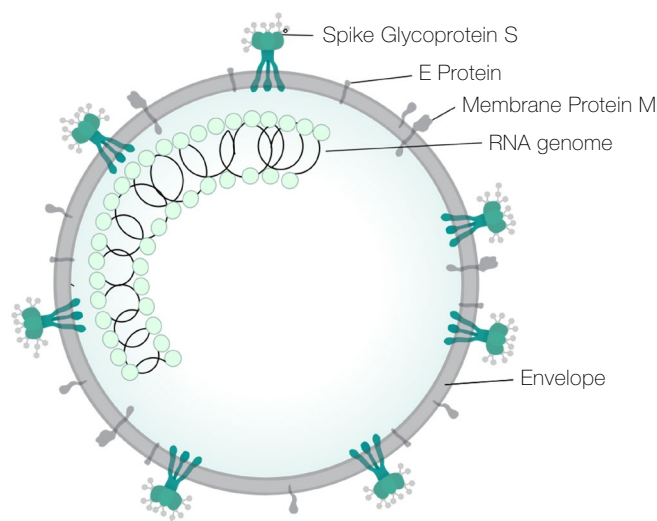
BUT ET CHAMPS D'APPLICATION

Ce document sert de guide pour le développement d'un nouveau test de RT-PCR en temps réel pour la détection du SARS-CoV-2 par des laboratoires nationaux, des laboratoires universitaires et des laboratoires privés ayant des plateformes fonctionnelles de biologie moléculaire. Les informations contenues dans ce document serviront également de feuille de route pour la création de nouveaux tests de diagnostic moléculaire pour d'autres pathogènes émergents. Tout au long du document, nous prendrons en compte les contraintes des laboratoires à ressources limitées, ainsi qu'un aperçu des exigences des bonnes pratiques de biologie moléculaire, y compris le contrôle qualité (CQ) et l'assurance qualité (AQ).

A PROPOS DU SARS-COV-2

Le SARS-CoV-2 est un virus à ARN simple brin de polarité positive, avec un segment linéaire d'ARN. C'est l'agent causal des maladies du coronavirus de 2019 (COVID-19), qui est le septième coronavirus connu et le cinquième du genre Betacoronavirus (y compris ; OC43, HKU1, SARS-CoV et MERS-CoV) à infecter les humains (1). Comme les autres coronavirus, le SARS-CoV-2 possède quatre protéines structurales, parmi lesquelles les protéines S (pointe i.e. « spike » en anglais), E (enveloppe), M (membrane) et N (nucléocapside). La protéine N enveloppe et protège le l'ARN génomique, et les protéines S, E et M forment toutes ensemble l'enveloppe virale. La protéine S est la protéine responsable pour l'attachement et la fusion du virus avec la membrane de la cellule hôte (2). L'émergence du virus dans la province chinoise de Wuhan a été signalée pour la première fois en décembre 2019 (3). L'OMS a déclaré la pandémie virale le 11 mars 2020 (4), et au moment de la rédaction de ce document, la pandémie demeure.

Figure 1: La structure du SARS-CoV-2. Tirée du [SPQR10 Binte altaf / CC BY-SA](#)



Pour les informations sûres concernant les dernières recherches sur le SARS-CoV-2, voir :

- + https://www.thelancet.com/coronavirus?dgcid=kr_pop-up_tlcoronavirus20
- + <https://www.nature.com/collections/hajgidghjb>
- + <https://www.nejm.org/coronavirus>
- + https://www.sciencemag.org/collections/coronavirus?intcmp=ghd_cov

INTRODUCTION A LA PCR/RT-PCR

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une méthode utilisée pour copier rapidement un gène ou une région spécifique du gène cible en utilisant plusieurs composants différents tels que les amorces, les désoxynucléotides triphosphates (dNTP), l'acide désoxyribonucléique thermostable (ADN) polymérase (i.e. enzyme), et le tampon de chlorure de magnésium (MgCl₂). Dans sa forme conventionnelle, la PCR comprend trois étapes :

1. Dénaturation du double brin de l'ADN en simple brin à 95°C pendant 15 à 60 secondes ;
2. Hybridation des amorces sur des régions spécifiques d'un brin simple d'ADN entre 47°C et 60°C pendant 30 à 60 secondes ; et
3. Elongation, facilitée par l'enzyme ADN polymérase, du brin simple d'ADN pour former un double brin d'ADN à 72°C pendant 30 à 180 secondes (en fonction de la réactivité, ou de la vitesse, de l'enzyme et la longueur du brin de l'acide nucléique à synthétiser).

Les températures et durées décrites ci-dessus varieront en fonction du type de polymérase utilisée et du gène cible. La PCR par retro-transcription, ou RT-PCR, est le processus de conversion de l'ARN en simple brin d'ADN complémentaire (ADNc) à l'aide de la transcriptase inverse (polymérase) et des amorces d'ADN ; l'ADNc est ensuite amplifié par PCR. Ce processus peut être utilisé pour amplifier des gènes cibles d'ARN viral, tels que les gènes cibles du SARS-CoV-2. La RT-PCR en temps réel (RT-PCR en temps réel) est une variante de la RT-PCR qui combine simultanément l'amplification RT-PCR avec la détection en temps réel de la cible du gène amplifié. Ce processus élimine le besoin de méthodes de détection chronophages telles que l'électrophorèse sur gel et permet la suivi des données en temps réel, les cycles d'amplification étant généralement observables dans le logiciel fourni. Les outils de diagnostic en temps réel peuvent être qualitatifs ou quantitatifs.

Vous recherchez les détails plus perfectionnant sur la RT-PCR en temps réel ? Découvrez cette revue édifiante sur

+ <https://geneticeducation.co.in/real-time-pcr-principle-procedure-advantages-limitations-and-applications/>

Et cette vidéo utile sur le fonctionnement de la RT-PCR en temps réel à

+ <https://www.youtube.com/watch?v=iiXisgizkxs>.

Une formation gratuite sur la réalisation de tests moléculaires du SARS-CoV-2 est disponible sur

+ <https://www.futurelearn.com/courses/laboratory-training-for-covid-19-molecular-testing/1/todo/78814>

TESTS QUALITATIFS CONTRE QUANTITATIFS

Un test de PCR qualitatif est conçu pour détecter la présence ou l'absence d'acides nucléiques cibles. Les tests de PCR quantitatifs (quantification relative ou absolue) déterminent la quantité d'acide nucléique de la cible spécifique est présente dans l'échantillon testé. Les tests utilisés pour le diagnostic de la COVID-19 sont des tests qualitatifs, tandis que les tests quantitatifs de RT-PCR (qRT-PCR) sont utilisés pour des applications plus liées à la recherche où la charge virale dans un échantillon du virus doit être déterminée.

Les tests de PCR qualitatifs sont parfois appelés PCR semi-quantitatifs car plusieurs résultats peuvent être comparés pour déterminer les échantillons contenant relativement plus de cibles d'acides nucléiques présents. Cette comparaison est basée sur le cycle d'amplification auquel le signal cible devient plus fort que le signal de fond, un point connu sous le nom de valeur du cycle seuil (CT). Par exemple, deux échantillons contenant du SARS-CoV-2 sont testés par RT-PCR en temps réel : l'échantillon 1 a une valeur CT de 24 et l'échantillon 2 a une valeur CT de 30. L'échantillon 1 a relativement plus d'acide nucléique viral que l'échantillon 2, mais la quantité absolue d'acides nucléiques viraux présents dans les deux échantillons reste inconnue.

Pour déterminer la quantité absolue d'acides nucléiques viraux présents par qRT-PCR, les échantillons sont analysés avec une concentration connue d'une série d'étalons ou standards. Ces standards sont utilisés pour établir une courbe d'étalonnage, à partir de laquelle la quantité de la séquence cible dans l'échantillon testé peut être calculée. Les tests quantitatifs ne sont pas souvent utilisés pour le diagnostic, car ils prennent plus de temps et utilisent plus de réactifs que les tests qualitatifs.

METHODES D'EXTRATION DE L'ARN VIRAL

La quantité journalière d'échantillons au laboratoire indique normalement si l'extraction manuelle d'acide nucléique est indiquée ou si un système automatisé d'extraction d'acide nucléique serait plus approprié. La plupart des laboratoires préfèrent utiliser des systèmes automatisés d'extraction d'acide nucléique s'ils sont disponibles ; Cependant, il serait utile d'avoir également une méthode manuelle comme système de secours en cas de défaillance de l'équipement automatisé d'extraction d'acide nucléique ou en cas de rupture ou pénurie des réactifs utilisés dans le système automatisé.

La plupart des dispositifs automatisés d'extraction d'acide nucléique sont volumineux et ne peuvent pas rentrer dans une hotte de biosécurité (BSC), par conséquent, la méthode utilisée pour inactiver l'échantillon contenant le virus devrait aussi être considérée lors du choix des réactifs d'extraction. Il est important que les méthodes d'inactivation et les méthodes d'extraction utilisées ne dégradent pas l'acide nucléique viral, mais elles doivent être suffisamment efficaces pour inactiver et lyser les particules virales, respectivement. Il existe plusieurs kits manuels d'extraction et de purification d'ARN viral et des systèmes automatisés d'extraction d'acide nucléique disponibles dans le monde (voir [Annexe 1](#) : Sélection des systèmes automatisés et des réactifs d'extraction d'ARN).

Le succès de la RT-PCR et de la RT-PCR en temps réel dépend de la qualité de l'ARN extrait. L'extraction d'ARN implique la lyse des particules virales pour occasionner la libération d'acide nucléique dans l'échantillon du patient. A ce stade, l'échantillon contient l'acide nucléique d'intérêt (l'ARN), l'ADN contaminant et les protéines, les complexes de nucléoprotéines et ARNases et de ce fait devrait être purifier pour la réaction de PCR. Il est essentiel que les ARNases soient inactivées et les complexes nucléoprotéiques dégradés pendant le processus d'extraction car ils détruiront l'ARN. Toutes les solutions et tous les consommables doivent être sans RNase. Les deux méthodes organiques les plus utilisées pour l'extraction de l'ARN sont soit le thiocyanate de guanidinium 4 M (GITC), soit le phénol et le dodécyl sulfate de sodium. La méthode d'extraction de l'ARN au thiocyanate de guanidinium-phénol-chloroforme est la plus utilisée pour extraire l'ARN du SARS-CoV-2 à partir d'un échantillon obtenu d'une personne sous investigation pour la COVID-19 (**tableau 1**).

Tableau 1 : Étapes de base de l'extraction de l'ARN à l'aide de méthodes organiques

Etape 1.	La lyse cellulaire & la dissolution (homogénéisation des cellules/particules pour libérer l'ARN) en utilisant respectivement des solutions tampons & la centrifugation.	La lyse cellulaire est réalisée en utilisant des tampons ou réactifs contenant des agents chaotropes tels l'isothiocyanate de guanidinium, le chlorure de guanidinium, le dodécyl sulfate de sodium (DSS), le sarcosyl, l'urée, le phénol ou le chloroforme. Des agents commerciaux tels que le TRIzol, Realter or Qiazol peuvent être utilisés pour préserver l'intégrité de l'ARN pendant la lyse.
Etape 2.	Dénaturation de l'ADN & des protéines	L'ADNase doit être utilisée pour dégrader l'ADN et la protéinase K peut être ajoutée pour faciliter la digestion des protéines. Alternativement, l'extraction organique répétée en utilisant le phénol et le chloroforme, ou la dissolution de l'échantillon dans les solutions tampons contenant des sels de guanidinium, peuvent également être utilisées pour éliminer les protéines.
	L'inactivation des ARNases	Celle-ci est réalisable en utilisant n'importe lequel des agents chaotropes mentionnés ci-dessus, tels que le phénol et le chloroforme.
Etape 3.	L'isolation de l'ARN (enlèvement/séparation des composants cellulaires)	L'ARN peut être séparé des autres composants cellulaires en ajoutant du chloroforme et en centrifugeant la solution. Cela sépare la solution en deux phases : les phases organique et aqueuse. La phase aqueuse contient de l'ARN.
Etape 4.	Précipitation	L'ARN est souvent récupéré de la phase aqueuse à l'aide d'alcool isopropylique et par centrifugation. L'ARN peut également être précipité sélectivement à partir d'ADN par l'utilisation d'acétate d'ammonium. Alternativement, le chlorure de lithium peut également être utilisé pour précipiter sélectivement l'ARN à partir de l'ADN aussi bien que des protéines.
Etape 5.	Transfert de l'ARN purifié	Stockage du culot dans l'eau dépourvue d'ARNase.

Il existe deux principaux types de technologies d'extraction d'acide nucléique qui peuvent être utilisées en lieu et place de la méthode organique décrite dans le tableau 1 :

- + **La technologie à base de membrane de silice** est une méthode d'extraction en phase solide utilisée pour purifier les acides nucléiques. L'ARN se liera aux particules de silice sous certaines conditions, tandis que d'autres molécules telles que les protéines et l'ADN n'en pourront pas. Une fois que les cellules ont été lysées et que le matériel génétique est accessible, une solution tampon et l'éthanol ou l'isopropanol sont ajoutés à l'échantillon. Cela constitue la solution contraignante (liante). Cette solution est ensuite centrifugée dans une colonne de rotation, qui force la solution de liaison au travers de la membrane du gel de silice contenu dans la colonne de rotation. Si les conditions sont telles que le pH et les concentrations en sel des solutions liantes sont optimales, l'ARN se liera au gel de silice lors du passage de la solution à travers le gel de silice.
- + Dans **la technologie des particules paramagnétiques**, l'utilisation de billes magnétiques ayant un revêtement individuel leur permettant d'avoir l'affinité pour des molécules spécifiques dans un échantillon, telles que l'ADN, l'ARN ou les protéines, permet l'isolation et la séparation des différentes particules dans un échantillon. Seul l'ARN se lie aux billes magnétiques enrobées, laissant dans la solution tous les contaminants restants.

En raison de la pénurie mondiale d'équipements de laboratoire, de réactifs et de consommables nécessaires à l'extraction de l'ARN à cause de la pandémie de SARS-CoV-2, certains laboratoires de diagnostic moléculaire ont étiré une approche alternative à l'extraction de l'ARN en faisant simplement bouillir l'échantillon (5).

CONCEPTION DU PROTOCOLE DE LA PCR

CONSIDERATIONS EN RESSOURCES MINIMALES POUR LE DEVELOPPEMENT DES TESTS EN INTERNE

La conception et la mise en œuvre d'une plateforme ouverte de RT-PCR pour le diagnostic nécessitent un certain nombre de ressources, qui comprend, mais ne se limite pas à: une électricité fiable et une capacité de stockage à froid, un équipement spécial, la capacité de produire ou de se procurer des réactifs de qualité et un système en gestion de qualité (SMQ) fonctionnel comprenant un responsable du système de gestion de la qualité ou un membre dédié parmi le personnel, et la capacité d'effectuer un suivi et une documentation au long terme de la performance des tests. Le personnel impliqué dans le processus de développement du test doit posséder une compréhension approfondie de la manière dont chaque étape et chaque composant du test est supposé réagir, ainsi que la capacité de recherche de solutions aux potentiels problèmes survenus durant la réalisation du test et l'usage de l'équipement. Avoir accès aux individus ayant la capacité d'effectuer les analyses statistiques requises pendant le processus de validation du protocole est aussi essentiel. Les rapports détaillés du processus de développement doivent être maintenus et le protocole final lui-même doit être clairement rédigé. Le protocole écrit devrait être testé par un personnel formé, capable d'effectuer les techniques moléculaires, et n'ayant pas pris part dans le processus de développement du test, afin de s'assurer que la procédure du LDT est complète et facile à suivre.

Une fois qu'un LDT a été mis au point, il doit subir une validation rigoureuse au niveau du laboratoire central ou national avant d'être envoyé dans des laboratoires régionaux ou satellites. Les conséquences de l'échec de validation peuvent être sévères – dans le cadre de la riposte au SARS-CoV-2 aux États-Unis, un réactif vital du test de CDC a été contaminé, mais cette contamination n'a été découverte qu'après l'envoi des kits à plusieurs laboratoires régionaux. L'échec de ce processus de validation a causé des retards importants dans le diagnostic au début de la pandémie. Une fois le LDT est validé au laboratoire central ou national, il sera préalablement validé dans chaque laboratoire supplémentaire où il est destiné pour usage. Les résultats de ces exercices de validation doivent être examinés par l'équipe de conception du test afin de déterminer toute nécessité de modifications supplémentaires du protocole ou de formation supplémentaire sur les autres sites.

REMARQUE : La plupart des laboratoires ne sera pas habileté à concevoir des LDTs à plateforme fermée. La plupart des systèmes à plate-forme fermée sont propriétaires, ce qui signifie que le développement des tests pour ces systèmes nécessite une collaboration directe avec le fabricant du système. Au cas où votre institution ou laboratoire est en mesure de travailler avec l'un de ces fabricants, le processus de développement sera très similaire à ce qui est décrit dans la conception de la plateforme ouverte LDT.

EXIGENCES EN EQUIPEMENTS POUR LE DEVELOPPEMENT DES TESTS

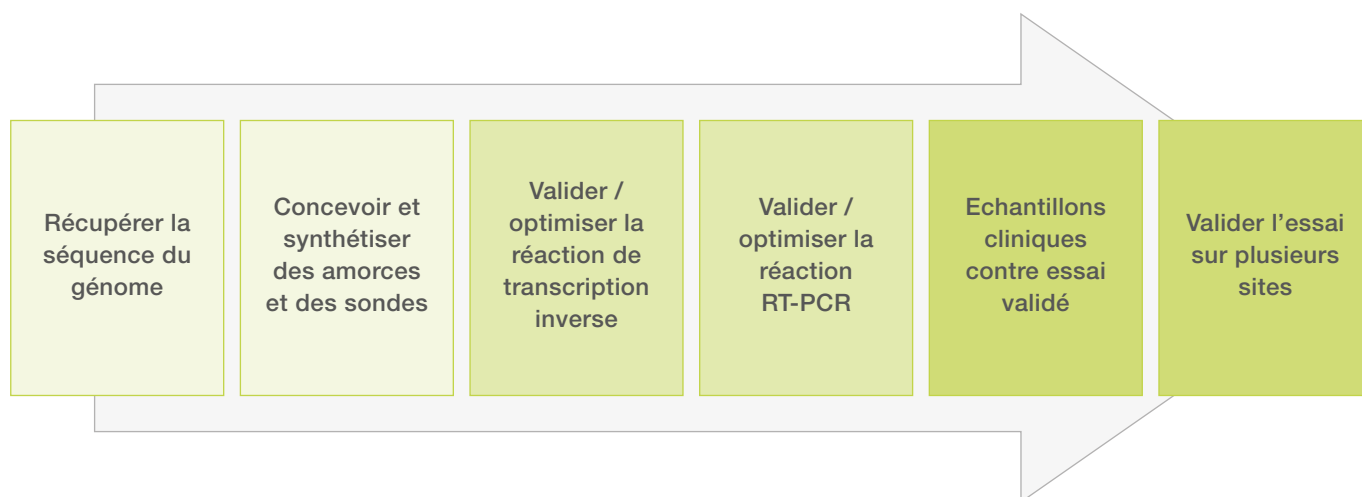
Le processus de développement et de validation de LDT nécessite une variété d'équipements spécialisés. Une liste brève des exigences minimales en matière d'équipement est fournie à [l'annexe 2 : EQUIPEMENT MINIMUM REQUIS](#)

Les systèmes de PCR en temps réel peuvent être achetés auprès de plusieurs fournisseurs. Une liste de fournisseurs potentiels est fournie à [l'annexe 3 : SELECTION DES FABRICANTS DES SYSTEMES RT-PCR EN TEMPS REEL](#). Le choix d'un système est guidé par la vitesse à laquelle le système peut atteindre les températures programmées, les exigences en maintenance et calibration, le nombre de canaux pour la détection des couleurs (ou marqueurs) en fonction de la complexité du test de PCR, le signal par cible et la sélection de couleur (ou marqueurs) pour les filtres d'un instrument spécifique. Si le test est conçu pour détecter une seule cible (par exemple SARS-CoV-2), y compris plusieurs contrôles internes, un instrument d'entrée peut être utilisé pour détecter la cible. Les laboratoires visant les exigences de l'Organisation internationale de normalisation (ISO) devraient prendre en considération l'utilisation des systèmes destinés au diagnostic clinique ou au diagnostic in vitro (DIV).

APRECU DU PROCESSUS DE CONCEPTION DES TESTS

Le processus de conception du test implique plusieurs étapes de planification, de validation et d'optimisation. Le diagramme général du processus est montré dans la **figure 2**.

Figure 2: Le processus de conception de LDT.



CONCEPTION D'AMORCES ET SONDES

CONCEPTION D'AMORCES

Il est important de s'assurer de l'amplification appropriée des régions génomiques spécifiques au virus de SARS-CoV-2 lors de la conception d'un LDT. Des séquences de SARS-CoV-2 ont été publiées (6) et les séquences d'amorces validées pour la détection de SARS-CoV-2 sont disponibles (7).

Lors de la conception d'amorces pour les LDTs, il est important de noter que le virus SARS-CoV-2 partage 95% d'homologie avec d'autres coronavirus, créant ainsi un risque élevé de réactivité croisée. Par conséquent, il est essentiel que les amorces et les sondes soient conçues pour amplifier spécifiquement l'ARN du virus SARS-CoV-2 et non pas celui des virus apparentés.

Une température de fusion (T_m) d'une amorce est, par définition, "la température à laquelle la moitié du duplex d'ADN se dissocie et devient monocaténaire, indiquant ainsi la stabilité du duplex". La plage de T_m optimale se situe entre 52°C et 58°C et est directement liée à la teneur en guanine-cytosine (GC) de l'amorce. Des précautions doivent être prises lors de la conception et de l'utilisation d'amorces avec des températures de fusion élevées (supérieures à 65°C) car celles-ci ont tendance à former des structures secondaires.

Les éléments suivants doivent être pris en compte lors de la conception des amorces :

- + Concevoir des amorces d'une longueur de 18 à 27 paires de bases (pb) et qui produiront des amplicons d'une longueur de 70 à 150 pb. La courte longueur assure une liaison facile à la matrice de l'acide nucléique pendant l'étape d'hybridation dans le cycle de PCR.
- + Éviter l'homologie dans ou entre les amorces, en particulier à l'extrémité 3' pour éviter la formation des dimères d'amorces.
- + Concevoir des amorces qui ont une teneur en GC de 40 à 60% et évitez les longs étirements (4+ répétitions) de GC ainsi que G ou C. Faire un effort pour inclure une pince GC à l'extrémité 3' de l'amorce : pour favoriser une liaison spécifique, la présence d'un nucléotide G ou C est essentielle parmi les cinq nucléotides à l'extrémité 3' de l'amorce.

- + S'assurer que les amorces ont une température de fusion comprise entre 55 et 65°C. Les T_m des deux amorces doivent être aussi proches que possible.
- + Eviter de concevoir des amorces pour des régions qui ont des structures secondaires. La complémentarité dans une amorce favorisera la formation de boucles en épingle à cheveux.
- + Vérifier les séquences des amorces sens et anti-sens pour la complémentarité en 3'. Ce phénomène pourra entraîner la formation d'une dimère d'amorces ou des dimères croisés. La formation des dimères d'amorces est possible lorsque deux amorces évoluant dans le même sens se lient à cause des interactions intermoléculaires.
- + Vérifier la spécificité de la séquence cible de l'amorce pour le pathogène en effectuant une recherche minutieuse par « BLAST » (*Basic Local Alignment Search Tool*) du nucléotide d'amorce conçu contre les séquences disponibles (8). BLAST compare les séquences de l'amorce conçue aux séquences publiées et détermine toute hybridation potentielle des amorces sélectionnées avec les séquences d'autres virus du SARS ainsi que d'autres organismes.

Des outils en ligne, tels que l'outil Primer-BLAST du Centre National d'Information de Biotechnologie des Etats Unis, permettent aux utilisateurs de concevoir leurs amorces sur la base de séquences génomiques accessibles au public. De nombreuses entreprises de synthèse d'amorces proposent également des outils de conception gratuite des amorces sur leurs sites Web. Quelques exemples de ces outils sont fournis à **l'annexe 4 : SELECTION DES CONCEPTEURS ET SYNTHETISEURS D'AMORCES ET SONDÉS**. Une fois que les amorces et les sondes sont conçues et synthétisées, leurs concentrations aussi bien que celles d'autres composants de la PCR doivent être optimisés pour garantir une efficacité optimale de l'amplification (9).

CONCEPTION DE SONDÉS D'HYBRIDATION/HYDROLYSE

Il existe de nombreuses sondes de détection de fluorescence qui peuvent être utilisées pour créer des tests RT-PCR en temps réel pour le SARS-CoV-2. Les trois qui sont couramment utilisés comprennent la détection à base de SYBR® Green, les sondes oligonucléotidiques fluorogènes à double marquage et les sondes à balise moléculaire.

SYBR® Green I, est un marqueur ou colorant fluorescent qui s'intercale, ou se lie, entre les brins d'ADNdb et peut être utilisé dans des réactions de RT-PCR en temps réel. Avec chaque cycle d'amplification, plus de colorant ou marqueur se lie, conduisant à une augmentation de la fluorescence. SYBR Green n'est pas spécifique à la séquence, ce qui rend cette méthode susceptible d'engendrer des faux positifs, en cas de formation des produits PCR non spécifiques ou des dimères d'amorces. La spécificité de l'amorce est généralement confirmée en évaluant si le produit amplifié a la correcte taille attendue et si le produit subit sa fusion à la température prévue, indiquant ainsi que le produit a la composition souhaitée. Ce processus de confirmation est appelé une analyse de la courbe de fusion.

Les sondes oligonucléotidiques fluorogènes à double marquage (par exemple, les sondes TaqMan®) ont un colorant rapporteur (i.e. « reporter ») fluorescent à leur extrémité 5' et un colorant extincteur (i.e. « quencher ») à leur extrémité 3'. Les sondes sont ajoutées au master mix en même temps que le jeu d'amorces spécifiques. Pendant la PCR, si la séquence cible est présente, la sonde s'hybride en aval sur un site de l'amorce et est clivée par l'activité nucléase 5' de l'ADN polymérase Taq pendant la polymérisation. Ce clivage libère de la sonde le rapporteur colorant et le sépare du colorant d'extinction, résultant en une fluorescence qui est détecté par l'instrument.

Les sondes à balise moléculaire utilisent la variation du processus à double marqueur décrit ci-dessus. Pour les sondes de balise moléculaire, les colorants de rapporteurs et d'extincteurs sont maintenus ensemble par une structure en épingle à cheveux dans les sondes, mais deviennent suffisamment séparés par linéarisation de la sonde après hybridation avec la matrice, permettant ainsi la détection de la fluorescence du colorant rapporteur.

Certains systèmes RT-PCR ne prennent pas en charge toutes les sondes chimiques. Avant de choisir une chimie et de concevoir vos sondes, consultez le manuel d'utilisation de votre système RT-PCR pour déterminer quelles sondes chimiques fonctionneront le plus efficacement. Si vous ne disposez pas du manuel d'utilisation, vous pouvez généralement en télécharger un sur le site Web du fabricant. Une autre considération lors de la conception d'un LDT avec plusieurs sondes et amorces est de s'assurer que les sondes absorbent et émettent la lumière à des longueurs d'onde spécifiques de la lumière, et ces longueurs d'onde chevauchent sur certaines sondes. Par conséquent, si vous ne faites pas attention à vos sélections, des faux positifs pourraient se produire et donner la "stimulation fortuite" d'une sonde.

Pour plus d'informations sur la chimie des sondes et la sélection des fluorophores, consultez les conseils fournis sur

- + <https://www.bioradiations.com/tips-to-make-fluorophore-picking-easier/>

SUGGESTIONS POUR LA SELECTION D'AMORCES ET SONDÉS

La plupart des entreprises qui produisent des amorces et des sondes pour des tests RT-PCR en temps réel ont des outils disponibles en ligne pour faciliter le processus de conception des amorces. Si vous envisagez commander des amorces et sondes d'une entreprise qui se trouve dans un autre pays, assurez-vous d'échanger avec une personne ressource de l'entreprise pour confirmer l'expédition de vos produits pourrait s'effectuer convenablement. Certaines entreprises sont en mesure de fournir leurs amorces et sondes en forme lyophilisée ou sous-forme séchée par congélation. Les produits lipophilisés doivent être considérés comme sûrs si vous avez des préoccupations que vos commandes pourraient prendre plusieurs jours pour le passage à travers la douane, ou si vous avez des doutes en rapport au maintien continu de la chaîne de froid. Quelques exemples de fournisseurs d'amorces et de sondes personnalisées sont disponibles dans [l'annexe 4 : SELECTION DES CONCEPTEURS ET SYNTHETISEURS D'AMORCES ET PROBES](#)

COMPOSANTS ADDITIONNELS DES REACTIONS DE RETRO-TRANSCRIPTASE ET DE POLYMERASE EN CHAÎNE

Le processus de RT-PCR nécessite deux jets de réactifs – un jet pour l'étape de retro-transcription et l'autre pour la PCR. Les tests de diagnostic peuvent être conçus comme soit des processus à deux étapes, dans lesquels le produit du processus de retro-transcription est ajouté aux réactifs de PCR ou les processus en une seule étape où les réactions de retro-transcription et de PCR sont effectuées dans le même tube. En plus matrice initiale de l'ARN, des composants typiques pour la réaction de retro-transcription sont présentés dans le **tableau 2** ; Les composants de base de la partie PCR du test nécessaires pour répliquer l'ADNc sont indiquées dans le **tableau 3**. Certains systèmes / enzymes PCR peuvent nécessiter l'utilisation du chlorure de magnésium (MgCl₂), d'albumine sérique de bovine, du diméthylsulfoxyde et du glycérol pour des conditions réactionnelles optimales. La plupart des fournisseurs commerciaux de transcriptase inverse et d'ADN polymérase fourniront l'enzyme avec le tampon dans lequel l'enzyme agit de façon optimale.

Tableau 2: Les composantes de la réaction de retro-transcription

Composantes	Concentration typique par réaction	Notes
Tampon	50 mM Tris HCl pH8.3 75 mM KCl 10 mM DTT 3 mM MgCl ₂	Ceci devrait être préparé à une concentration de 5x.
dNTPs	1 mM	Tous les 4 dNTPs (adénine, guanine, cytosine, and thymine triphosphates) doivent être inclus
Transcriptase inverse	1 Unité	Les concentrations optimales doivent être déterminées pendant l'optimisation.

Table 3: Les composantes de la réaction de PCR

Composantes	Concentration typique par réaction	Notes
Tampon	20 mM Tris HCl pH8.3 50 mM KCl	Ceci devrait être préparé à une concentration de 5x
dNTPs mix	0.2- 0.5 mM	Les concentrations optimales doivent être déterminées pendant l'optimisation
MgCl ₂	0.5 - 5 mM	Les concentrations optimales doivent être déterminées pendant l'optimisation
Amorce sens	0.1 - 0.5 µM	Déterminer la concentration optimale pendant l'optimisation
Amorce antisens	0.1 - 0.5 µM	Les concentrations optimales doivent être déterminées pendant l'optimisation
Sonde	0.1 - 0.5 µM	Les concentrations optimales doivent être déterminées pendant l'optimisation
ADN Polymérase	0.25 - 0.5 Unité	Les concentrations optimales doivent être déterminées pendant l'optimisation

Le mélange de composantes de la PCR dont les amorces et sondes, l'ADN polymérase, les dNTP, MgCl₂ et de tampon est appelé le master mix, et il est généralement préparé à des concentrations nécessaires pour l'utilisation, puis distribué en aliquotes dans des tubes de PCR ou des plaques de PCR à 96 puits. Les fournisseurs commerciaux des réactifs du PCR offrent des mélanges prêts à l'emploi qui incluent tous les composantes nécessaires pour la PCR, à l'exception des amorces et sondes. Ces mélanges prêts à l'emploi présentent l'avantage de pouvoir être utilisés pour mettre en place et optimiser la PCR pour la détection de tout pathogène si des amorces et des sondes spécifiques sont disponibles. Ceci réduit le risque de contamination et d'erreurs de pipetage et, surtout, permet un gain en temps.

Pour développer des tests en interne pour la détection du SARS-CoV-2 ou tout autre agent pathogène, les étapes suivantes doivent être considérées :

1. Concevoir des amorces et des sondes spécifiques au pathogène d'intérêt. Vous aurez besoin de connaître la séquence de l'agent pathogène.
2. Passer la commande aux entreprises synthétisent des oligonucléotides et demander au moins l'échelle de purification SDS-PAGE. Se rappeler d'ajouter vos modifications 5' et 3' (en attachant le fluorophore souhaité) lors de la commande.
3. Obtenir des enzymes, des tampons, des mélanges de dNTPs et du chlorure de magnésium des fournisseurs commerciaux. Vous gagnerez en temps en acquérant des mélanges prêts à l'emploi auprès de fournisseurs commerciaux tels que ceux énumérés à [l'annexe 5](#) : SELECTION DES FOURNISSEURS DE MASTER MIX.

ENZYMES

Les transcriptases inverses sont les enzymes utilisées pour fabriquer l'ADNc à partir d'ARN. L'ADN Taq polymérase, isolée à partir de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus*, est la principale enzyme utilisée dans l'amplification de l'ADN.

Lors de la sélection d'un type d'enzyme pour une méthode, le concepteur doit évaluer les différentes forces et faiblesses des ADN polymérases disponibles pour déterminer quelle polymérase individuelle, ou combinaison de polymérases, fonctionnera avec la matrice de leur acide nucléique. Les numéros de lot de tous les réactifs doivent être notés et conservés. Les réactifs doivent être distribués en aliquotes à usage unique pour éviter des épisodes excessifs de congélation-décongélation et protéger les réactifs en stock de la contamination. Ces tubes de réactifs doivent être clairement étiquetés. Tous les réactifs contenant des sondes fluorescentes doivent être protégées d'exposition à une lumière excessive pour éviter la dégradation par photo-blanchiment. Il est recommandé d'incorporer le dUTP et un inhibiteur de l'ARNase dans le master mix (mélange réactionnel) pour éviter la dégradation par l'uracile-ADN glycosylase (UNG) et pour minimiser la perte en matériel de la matrice d'ARN, respectivement.

SUGGESTIONS POUR LA SELECTION D'ENZYMES

La sélection des transcriptases inverses et des ADN polymérases devrait prendre en compte les températures de réaction auxquelles elles seront utilisées, la taille de l'ADNc ou du produit de PCR qui sera produit, la sensibilité et la précision souhaitées de la réaction et la capacité opérationnelle avec de l'ARN dégradé ou contenant des inhibiteurs. La variété des choix d'enzymes est plus élevée lors de la conception de tests à deux étapes, tandis que les transcriptases inverses et les polymérases à utiliser dans les tests à une seule étape arrivent du fournisseur typiquement pré-mélangées. Comme pour les amorces et les sondes, certains fournisseurs vendent des master mix (mélanges réactionnels) lyophilisés qui incluent la transcriptase inverse et l'ADN polymérase déjà présentes.

CONTROLES

Lors du développement d'un LDT, il est important de considérer quels contrôles seront nécessaires pour le test. Les contrôles sont utilisés pour suivre les performances de l'ensemble du processus de du test de diagnostic moléculaire. L'inclusion des contrôles appropriés permet au laborantin de s'assurer que le processus d'extraction d'ARN a été réalisé avec succès; d'identifier les instances d'inhibition possible de la PCR ; de vérifier la fonctionnalité de l'appareillage; de détecter l'introduction du matériel génomique contaminant dans le flux de travail ; et de valider les résultats du test. L'utilisation des contrôles appropriés pour chaque procédé de diagnostic est donc nécessaire pour garantir la qualité des résultats des tests. L'exemple d'un schéma de contrôle développé pour un LDT du SARS-CoV-2, y compris des informations supplémentaires sur la source des contrôles et leurs buts, est présenté dans le **tableau 4**.

Le **tableau 5** fournit des détails supplémentaires sur les contrôles et leurs buts.

Tableau 4: Exemple d'un schéma de contrôle RT-PCR en temps réel pour le SARS-CoV-2 (10)

Contrôle	Contrôles pour:	Exigences de contrôle:
NTC (Pas de matrice contrôle)	Contamination dans le master mix/ disposition de la plaque	Une par plaque de RT-PCR en temps réel; contrôle réussi
COV_Pos (Test de contrôle positif)	Processus de contrôle RT-PCR en temps réel	Une par plaque de RT-PCR en temps réel; contrôle réussi
COV_Neg (Test de contrôle négatif)	Contrôle d'extraction. Processus de RT-PCR en temps réel pour la ARNase P	Une par extraction; Contrôle réussi
ARNase P dans l'échantillon négatif (Contrôle d'amplification interne)	Confirme le processus complet pour les échantillons négatifs.	Incorporées dans tous les puits RT-PCR en temps réel; réussi lorsque l'échantillon est négatif.

Tableau 5: Sources de contrôle et interprétations

Type de contrôle	Exemple de matériel	Résultat attendu	Raisons possibles pour un résultat positif	Raisons possibles pour un résultat négatif
Extraction positive	Un échantillon connu pour sa contenance des séquences d'essai, p.ex., exprimant/contenant la cible ARN/ADN génomique	Positif	Correct	Echec du test ou de l'extraction. Toute donnée positive provenant d'autres échantillons n'est pas fiable
Test Positif (PTC)	Tout acide nucléique compatible à la conception du test de PCR qui contient la séquence cible.	Positif	Correct	Echec du test. Toute donnée positive provenant d'autres échantillons n'est pas fiable
Test négatif	Tout acide nucléique compatible à la conception du test de PCR connu pour ne pas contenir les séquences cibles.	Négatif	Le test est non-spécifique ou il y'a eu contamination t du contrôle durant la PCR ou lors de la préparation du réactif.	Correct
Aucun matrice (NTC)	Eau	Négatif	Les amorces sont auto-dimerisées, résultant en des dimères d'amorces ; ou bien il y a contamination du contrôle pendant la PCR ou lors de la préparation du réactif.	Correct
Moins enzyme RT négative (Non-RT)	Echantillon d'ARN et toutes les composantes de la réaction RT à l'exception de l'enzyme RT. Ceci devrait être effectué sur tous les échantillons pour vérifier qu'ils ne contiennent pas la contamination qui s'amplifie sous les conditions de PCR sans le concours de l'enzyme RT.	Négatif	L'échantillon contient l'ADNg. La réaction s'est contaminée lors de la mise en place. Les amorces ont formé des dimères d'amorces. Analysez suivant le NTC.	Correct
Extraction négative (NEC)	Eau	Négatif	Contamination pendant l' extraction.	Correct
Contrôle d'amplification interne (CAI)	Survient naturellement dans les échantillons du test, p. ex., 16s, Beta-Actin, RNase-P	Positif (Tous les échantillons et contrôles doivent contenir le CAI excepté le NTC)	Correct	Echec du test ou de l'extraction. Toute donnée positive provenant d'autres échantillons n'est pas fiable

REMARQUE : Les tables des pages contrôles précédentes concernent uniquement l'extraction d'acide nucléique et les contrôles positifs et négatifs du test de PCR. Toutes les activités allant du prélèvement de l'échantillon à la transmission des résultats soient soumises au CQ et à l'AQ.

Lorsque des LDT sont utilisés ou lorsqu'un kit de test ne comprend pas de modèle de contrôle positif, le matériel de contrôle positif peut être obtenu à partir de l'ADNc chez Charité à Berlin, via le Global European Virus Archive (EVAg - <https://www.european-virus-archive.com>), ou sous forme de fragments de brin simple d'ARN (ARNss) du SARS-CoV-2 chez Centre Commun de Recherche en Belgique (<https://crm.jrc.ec.europa.eu/p/EURM-019>).

OPTIMISATION DES CONDITIONS D'EXECUTION DE LA PCR

L'optimisation des conditions d'exécution de la PCR est déterminée par : 1) la concentration idéale pour chaque amorce et sonde utilisées dans le test, 2) la température d'hybridation à utiliser pour le test, et 3) l'affinage des concentrations des composantes du tampon (particulièrement lorsque plus d'une cible sera testée à la fois dans un seul tube, un processus appelé le multiplexage). Après l'effectivité de l'extraction et de l'amplification d'acide nucléique, le test devrait être validé en séparant les produits de PCR sur un gel et en corrélant les températures de fusion avec des amplicons de tailles correctes. Le contrôle sans transcriptase inverse (No-RT) nécessite également une vérification pour déterminer si une étape de digestion d'ARN doit être ajoutée à l'échantillon avant la réaction de RT-PCR.

UTILISATION DES LDTS DEVELOPES PAR D'AUTRES LABORATOIRES

Les laboratoires nationaux et les organisations non gouvernementales partagent de plus en plus leurs propres protocoles de LDT en ligne pour utilisation et adaptation par d'autres groupes. Ces protocoles fournissent des informations précieuses sur les régions du génome viral servant de cibles adéquates pour les amorces et les sondes, les conditions d'exécution de tests produisant un signal fort, la possibilité d'utiliser un master mix prêt à l'emploi, et le type d'enzymes optimal pour le test en question. Si un autre laboratoire choisit d'adopter un LDT développé par un autre laboratoire, que ce laboratoire fasse partie d'un réseau national de laboratoires ou qu'il soit situé dans un autre pays, il doit valider ce test pour confirmer sa performance dans leur laboratoire sur les souches virales présents dans leur population locale.

Exemples des protocoles LDT du SARS-CoV-2 actuellement disponibles en ligne :

- + https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c_2
- + <https://www.fda.gov/media/139743/download>
- + https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/whoinhouseassays.pdf?sfvrsn=de3a76aa_2

VALIDATION DU PROTOCOLE LDT

Les caractéristiques de performance d'un test LDT de PCR pour COVID-19 doivent être déterminées avant de rendre effectif l'usage de ces tests en diagnostic de routine au laboratoire. Ce processus s'appelle la validation du test. Les principes de validation existent pour assurer la normalisation des pratiques de laboratoire et l'exactitude des résultats des tests biocliniques et ont été définis par l'Organisation internationale de normalisation (11, 12). Les caractéristiques de performance comprennent un éventail de paramètres tels que l'exactitude, la précision, la reproductibilité, la sensibilité et la spécificité analytiques, la linéarité ainsi que et les essais des lots de tests spécifiques et les exigences variant en fonction des réglementations nationales.

Les échantillons à utiliser dans la validation sont particulièrement importants. Ceux-ci doivent être constitués d'échantillons de cycle positifs avec des valeurs connues en quantification de cycles (Cq; charges virales connues) ainsi que d'échantillons négatifs qui ont été testés sur des systèmes validés. Si possible, des échantillons représentatifs qui ont été prélevés dans différents milieux de transport (par exemple, solution saline, milieu de transport viral ou milieu de transport universel) et de différents sites anatomiques de prélèvement d'échantillons (par exemple écouvillon nasopharyngé, écouvillon oropharyngé, expectorations) doivent être soumis au même processus de validation. Les résultats obtenus à partir de ces variables permettront de tirer des conclusions sur les limites du test. Au moment de la sélection des échantillons pour la validation, les directives suivantes doivent être suivies :

- + Indépendamment de la prévalence du SARS-CoV-2, le nombre d'échantillons doit être cohérent entre les tests
- + Tous les types d'échantillons attendus pour le test doivent être inclus.
- + Les échantillons avec tous les résultats possibles (plages de CT) doivent être inclus.
- + Les contrôles et le matériel de calibration doivent être obtenus et inclus.

SENSIBILITE

La sensibilité est la capacité d'un test en cours d'évaluation (sous-jacent) à identifier véritablement les échantillons vrais positifs (tests de référence positifs). Par conséquent, la sensibilité est le nombre d'échantillons positifs qui sont directement identifiés par le test en cours d'évaluation divisé par le nombre total d'échantillons vrais positifs (par exemple ceux qui sont positifs par les tests de référence), exprimé en pourcentage : $\text{Sensibilité} = [\text{Vrais positifs} / (\text{Vrais positifs} + \text{faux négatifs})] \times 100\%$.

SPECIFICITE

La spécificité est la capacité d'un test à détecter des échantillons véritablement négatifs (tests de référence négatifs). Par conséquent, la spécificité est le nombre d'échantillons vrais négatifs identifiés par le test, divisé par le nombre total d'échantillons vrais négatifs (par exemple ceux qui sont négatifs par les tests de référence), exprimé en pourcentage : $\text{Spécificité} = [\text{Vrais négatifs} / (\text{Vrai négatifs} + \text{faux positifs})] \times 100\%$.

SENSIBILITE ANALYTIQUE

La sensibilité analytique d'un test est l'habilité de ce test à détecter de très faibles concentrations d'une substance donnée dans un échantillon biologique. Ceci est également connu sous le nom de « limite de détection » (LoD). Pour estimer la LoD, des mesures répétées sont obtenues à partir d'échantillons à faible concentration, par exemple des échantillons positifs avec des Cq connus qui ont été dilués en série. Des expériences ont montré que la LoD doit être effectuée sur plusieurs jours pour refléter la performance du test sur une gamme de conditions typiques de laboratoire, mais sans changement de lots de réactifs. La LoD doit être déterminée pour chaque type d'échantillon qui sera testé au laboratoire et pour chaque variant génétique de la cible attendue (13, 14).

SPECIFICITE ANALYTIQUE

La spécificité analytique fait référence à l'habilité d'un test à détecter uniquement la cible prévue et à s'assurer que la quantification de la cible n'est pas affectée par la réactivité croisée liée aux acides nucléiques potentiellement interférents ou aux conditions liées aux échantillons. Les études d'interférence porteront sur toute réactivité croisée et / ou interférence. Ce processus de triage consiste à tester une gamme d'échantillons avec ou sans des concentrations différentes de substances potentiellement interférentes et d'agents de réaction croisée, le choix desquelles sera déterminé par le type de test, des échantillons et de la cible prévue (12, 14).

PRECISION

La précision est la capacité d'effectuer un test de manière cohérente lorsque l'échantillon est testé plusieurs fois sur plusieurs jours en utilisant divers opérateurs et réactifs provenant de différents lots. C'est la reflet des impacts des résultats sur les variances aléatoires qui se produisent lorsque le test est effectué dans des conditions normales. Contrairement à d'autres paramètres de validation, la précision est la performance d'une mesure qualitative ; les tests sont généralement classés comme ayant une haute, moyenne ou faible précision. Les analyses visant à déterminer la précision d'un test sont effectuées en duplicata sur plusieurs jours (autour de 20 jours environ) sur au moins trois concentrations de l'échantillon (LoD, 20% au-dessus de la LoD et 20% en dessous de la LoD). Analyser les échantillons en duplicata permet d'apprécier la répétabilité ou l'imprécision intra-test (i.e. au sein de l'analyse), alors qu'effectuer des analyses sur plusieurs jours avec des opérateurs différents et des multiples lots de réactifs permet d'apprécier la reproductibilité ou l'imprécision inter-tests (i.e. d'une analyse à l'autre).

Le **tableau 6** illustre un protocole possible pour valider la sensibilité, la spécificité, la LoD et la précision d'un LDT qualitatif, en utilisant des échantillons avec une gamme de concentrations de l'ARN viral cible présent (l'analyte). Pour une discussion plus approfondie sur la procédure de réalisation des tests de validation et les analyses statistiques associées, voir (14).

Tableau 6 : Exemple de protocole pour déterminer les caractéristiques en performance des LDT. Adapté de (14)

Caractéristique en performances	Concentration testée des analytes											Commentaires	
	Basse					Moyenne			Haute				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
Sensitivité & spécificité	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	Le test consistait en 50 échantillons positifs, 100 échantillons négatifs, avec environ 30% des positifs dans la gamme basse, 30% dans la gamme moyenne et 30% dans la gamme haute de concentrations.
LoD	x	x	x	x	x								Analyser 8 à 12 répétitions à raison de 4 à 5 échantillons chacun à l'extrémité la plus basse de la concentration d'analyte pendant au moins 5 jours.
Précision		x			x						x		Préparer plusieurs aliquotes pour chacun des 3 échantillons représentant la LoD, 20% en dessous de la LoD et 20% au-dessus de la LoD et stocker à -20 ° C ou à une température en deçà ; tester les 3 échantillons en duplicata pendant 20 jours, en utilisant différents opérateurs et différents lots de réactifs.

TESTS DE DIAGNOSTIC DANS LE LABORATOIRE D'ANALYSES MEDICALES

MISE EN PLACE DU LABORATOIRE

La mise en œuvre des tests de RT-PCR en temps réel pour le SARS-CoV-2 (tant pour les tests commerciaux que ceux développés en interne) nécessite souvent l'amélioration et le renforcement du laboratoire.

EXIGENCES DE BIOSECURITE

Lors de la mise en place de nouveaux tests de diagnostic pour le SARS-CoV-2 ou tout nouveau pathogène, il est essentiel de prendre en compte les risques biologiques. Les risques biologiques incluent le potentiel d'infection d'un personnel du laboratoire (technicien de laboratoire, agent d'entretien/nettoyage, étudiant, etc.) et, en outre, la propagation potentielle du virus SARS-CoV-2 infectieux dans la communauté / l'environnement. Une évaluation des risques doit être effectuée pour déterminer les exigences appropriées d'atténuation des risques pour la sécurité du personnel du laboratoire, de la communauté et de l'environnement. L'OMS recommande que « la manipulation des échantillons de SARS-CoV-2 pour des tests moléculaires nécessiterait [niveau de sécurité biologique 2] BSN-2 ou des installations équivalentes » et que « les essais de culture du virus nécessitent au minimum des installations BSN-3 » (15). Dans un laboratoire BSN-2, l'accès doit être limité et l'entrée doit être étiquetée avec un panneau de danger biologique (de préférence en matériau résistant au feu). Le Manuel de biosécurité en laboratoire de l'OMS décrit trois éléments de la biosécurité dans les laboratoires (16). Ces composants sont :

Vous recherchez des informations supplémentaires sur la manipulation et le traitement en toute sécurité des échantillons associés au Covid-19 ? Vérifiez

+ <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/lab-biosafety-guidelines.html>

1. L'aménagement de l'installation (conception des zones de travail du laboratoire);
2. L'équipement essentiel, acquis selon les spécifications standards et avec un plan de service d'entretien/maintenance (y compris la [re-]certification) ; et
3. Les pratiques de travail (procédures de laboratoire, protection individuelle et les équipements de protection individuelle, surveillance sanitaire et médicale, formation, gestion des déchets et sécurité électrique, radiologique, des produits chimiques, de l'incendie, et de l'équipement).

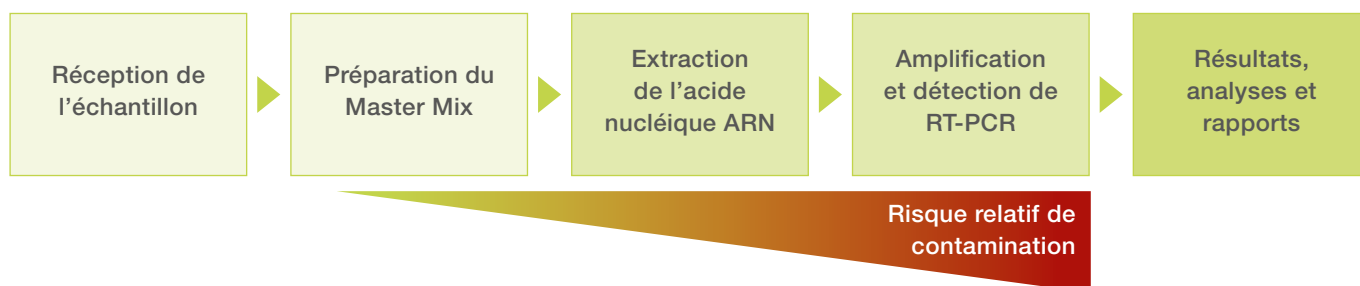
De bonnes pratiques de laboratoire et de bonnes techniques microbiologiques sont essentielles pour minimiser la génération d'aérosols infectieux et la propagation d'acides nucléiques (produits génomiques et amplicons). Si un dispositif d'extraction d'acide nucléique à plateforme ouverte est utilisé pour effectuer le processus de PCR, les échantillons doivent d'abord être inactivés à l'intérieur d'une hotte de BSN-2 avant que le processus d'extraction ne soit effectué. La zone de préparation du master mix de PCR (mélange des réactifs) et la zone d'amplification et de détection ne nécessitent que des protections BSN-1.

FLUX DE TRAVAIL POUR LES TESTS DE PCR

En plus d'une zone de réception des échantillons, le laboratoire de biologie moléculaire doit être composé d'au moins trois différentes zones dédiées à des tâches spécifiques: la zone de préparation des réactifs de PCR, la zone d'extraction d'acide nucléique et la zone d'amplification et de détection. La séparation physique entre les zones de pré-amplification (ou « zones propres ») et les zones de post-amplification (ou « zones sales ») est essentielle pour réduire les risques de contamination lors des tests.

Afin de minimiser davantage le risque de contamination des échantillons, des réactifs, des surfaces et équipements de laboratoire, les tests doivent être effectués selon un flux de travail unidirectionnel. Toute tâche « propre » se fait avant la tâche « sale », sans y retourner dans les zones propres. Le tableau ci-dessous illustre le flux du travail de diagnostic, les étapes de la procédure, les ajouts spécifiques, les matériaux requis à chaque étape du processus, et les attentes/produits spécifiques à chaque étape du processus pour le test de SARS-CoV-2 au laboratoire de biologie moléculaire. Au fur et à mesure que le flux de travail progresse dans les étapes, le risque de contamination augmente, comme illustré dans la **figure 3**.

Figure 3: Flux de travail de diagnostic moléculaire et risque relatif de contamination génomique



Un résumé du flux de travail de diagnostic est présenté dans le **tableau 7**. Un certain nombre de ressources, disponibles en ligne, fournissent des conseils supplémentaires sur la mise en place d'un nouveau laboratoire de diagnostic moléculaire (17–19).

Tableau 7: Résumé du flux de travail diagnostique du SARS-CoV-2

Phase d'analyse	Etape de la procédure	Matériel d'entrée	Matériel nécessaire	Matériel de sortie	Zone
Pré-Analytique	Prélèvement, emballage, transport et réception des échantillons au laboratoire	Un échantillon d'un patient pour l'analyse de la présence du SARS-CoV-2	<ul style="list-style-type: none"> + Un écouvillon pour prélever l'échantillon + Milieu de Transport dans un tube de prélèvement pour le transport d'échantillon à l'abri de la dégradation + Triple emballage 	Un échantillon pour l'analyse PCR	Zone de réception générale des échantillons
	Préparation du master mix de RT-PCR (mélange des réactifs)	Réactifs de PCR (sur place ou kits)	<ul style="list-style-type: none"> + Amorces et sonde (spécifiques au SARS-CoV-2) + dNTP (blocs de synthèse des acides nucléiques) + Polymérase (enzyme) + Transcriptase inverse (TI) + Tampon de PCR + Contrôle positif (spécifique au SARS-CoV-2) + Pas de matrice contrôle 	Master Mix RT-PCR (mélange des réactifs)	Pré-amplification (ultra-propre)
Analytique	Extraction d'ARN	Un échantillon pour l'analyse PCR	<ul style="list-style-type: none"> + Extraction System + Extraction Reagents including: <ul style="list-style-type: none"> - Lysis Buffer - RNA Extraction Control - Human Specimen Control - Positive Control specific to SARS-CoV-2 	Extraits d'acides nucléiques	Zone de traitement des échantillons (propre)
	Amplification et détection de la RT-PCR	Extraits d'acides nucléiques & master mix de la RT-PCR	RT- PCR instruments	Signalisation de la fluorescence indiquant la présence de 1 ^{er} ARN du SARS-CoV-2	Amplification/post-amplification (sale)
Post-analytique	Rapportage des résultats	Signalisation de la fluorescence indiquant la présence de 1 ^{er} ARN du SARS-CoV-2	Logiciel IVD de COVID-19	Rapport de résultat indiquant la présence du virus de la SARS-CoV-2	Amplification/post-amplification (sale)

PREVENIR LA CONTAMINATION EN PCR

La contamination fait référence à l'introduction erronée d'ARN viral, ou de produits d'acide nucléique préalablement amplifiés (amplicons) ou d'autres contaminants ou inhibiteurs dans l'échantillon ou le tube de réaction PCR. Quelle que soit la source du contaminant, un diagnostic incorrect est susceptible de se produire. La prévention de la contamination durant la PCR est fondamentale durant le processus de développement du test. Des exemples de bonnes pratiques de prévention de la contamination sont fournies à [l'annexe 6](#) : PRATIQUES DE PREVENTION DE LA CONTAMINATION.

MESURE D'INCERTITUDE DES TESTS MOLECULAIRES POUR LE SARS-COV-2

La capacité du test à détecter la ou les séquences cibles est entravée par divers facteurs et de ce fait les limites de chaque LDT pour la détection du SARS-CoV-2 doivent être déterminées. La nature semi-quantitative des tests de SARS-CoV-2 permet la détection des gènes spécifiques d'intérêt du SRAS-Cov2 par exemple, mais il est important de savoir quelle est la LD du test et quels facteurs pourraient potentiellement influencer la fiabilité du test nouvellement conçu ?

La charge virale dans l'échantillon détermine le nombre de cycles nécessaires avant la détection lors de la phase exponentielle de la réaction de PCR et peut être utilisée de manière déductive pour estimer la concentration ou la quantité du virus (grade de l'infection). Quel est l'impact sur l'utilité du test si l'échantillon a une ancienneté de 5 jours ou si les températures appropriées n'ont pas été maintenues pendant le transport de l'échantillon ? De telles déviations du protocole préétabli peuvent affecter négativement la précision du test. Des sources d'incertitude peuvent survenir dans les phases pré-analytique et analytique du processus de diagnostic, comme décrit ci-dessous.

SOURCES D'INCERTITUDE PRE-ANALYTIQUE

- + Prélèvement et stockage des échantillons avant les analyses biologiques
 - Le test n'a été validé que sur certains dispositifs de prélèvement et certains types de supports de transport. Par exemple, si le milieu de transport contient du thiocyanate de guanidine, les échantillons ne pourront pas être utilisés pour la procédure d'extraction d'acide nucléique est prend en compte l'hypochlorite de sodium car il y'aura production du gaz de cyanure au contact avec du thiocyanate de guanidine.
 - Les écouvillons tachés de sang inhiberont la réaction de PCR.
 - Les échantillons prélevés au moyen des outils de prélèvement inappropriés. Par exemple, il n'est pas recommandé de tester le SARS-CoV-2 à partir des échantillons prélevés avec des écouvillons d'alginate de calcium, des écouvillons à pointe de coton ou des tiges en bois.
 - Les échantillons prélevés en dehors de la phase virémique peuvent entraîner de faux négatifs, occasionnés par niveau de l'ARN viral inférieur à la LD (limite de détection) du test.
 - Échantillons rendus en retard au laboratoire ou stockés de manière incorrecte avant le test, c'est-à-dire Les échantillons datant de plus de 5 jours après le prélèvement ou qui n'ont pas été distribués en aliquotes dans des flacons cryogéniques et congelés à une température inférieure ou égale à -70°C avant le test, pourraient entraîner des faux négatifs en raison de la dégradation de l'ARN.

SOURCES D'INCERTITUDE ANALYTIQUE

Les faux négatifs peuvent résulter de :

- + Prélèvement inapproprié d'échantillons.
- + Dégradation de l'ARN
 - Dégradation de l'ARN viral durant le transport et / ou stockage.
 - Dégradation par l'ARNase si les inhibiteurs d'ARNase n'ont pas été ajoutés à l'étape de la retro-transcription.
- + L'utilisation de réactifs non-homologués pour l'extraction ou pour la PCR.
- + La présence d'inhibiteurs de la RT-PCR.
- + Mutations dans le virus de SARS-CoV-2.
- + Non-respect des procédures opérationnelles standard.
- + L'utilisation du personnel partiellement formé ou compétent.

Les faux positifs peuvent résulter de :

- + Contamination
 - Contamination croisée lors de la manipulation ou préparation des échantillons.
 - Contamination croisée entre les échantillons de patients.
 - Mélange d'échantillons.
 - Contamination de l'ARN pendant la manipulation de réactifs et/ ou composantes de la PCR si l'AmpErase UNG n'est pas utilisée.
 - L'utilisation de gants poudrés et des embouts sans filtrées.

Limites d'interprétation

- + Le logiciel utilisé pour évaluer les données peut être obsolète.

Limite de détection (LD)

- + Le test dépend de la quantité de l'échantillon initial requis (par exemple un minimum de 700 µl) ou de la quantité d'amplicon ajoutée à l'étape de détection.

Spécificité analytique

- + Un résultat négatif pour tout test de PCR n'exclut pas définitivement la possibilité d'infection.
- + Le test ne peut pas exclure des maladies causées par d'autres agents pathogènes.

ASSURANCE QUALITE POUR LES TESTS DE PCR

L'assurance de la qualité est une composante essentielle des tests de diagnostic de la COVID-19. Il est essentiel que chaque échantillon soit manipulé (du moment de prélèvement jusqu'à la réception au laboratoire), traité, amplifié et détecté, et les résultats enregistrés et rapportés conformément aux POS du laboratoire. Chacune de ces étapes est fréquemment examinée au moyen d'activités d'AQ, qui incluent:

- + Le temps de transport des échantillons est surveillé en vérifiant l'heure de prélèvement avec l'heure de réception, et la glacière, si elle est utilisée, est vérifiée pour voir si les blocs de glace sont froids
- + Les écarts concernant les échantillons et la documentation de l'échantillon sont vérifiés (à des fins de indicateurs clés de performance – ICP ou « KPI » en anglais) et résolus en temps opportun.

- + L'appareillage du laboratoire est utilisé, entretenu et calibré selon le POS du laboratoire
- + Le personnel du laboratoire est bien formé avant de manipuler les échantillons sans supervision. Les démonstrations de compétences peuvent être utilisées pour documenter la compétence
- + La récupération de l'ARN viral est surveillée par un contrôle positif bien connu dans la procédure d'extraction / de traitement de l'échantillon
- + La performance des réactifs d'extraction et de PCR est contrôlée par des tests de contrôle qualité avec des réactifs ayant une charge virale connue
- + La précision du test d'identification du virus SARS-CoV-2 est surveillée par l'usage des contrôles positifs et négatifs
- + Les maîtrises de la précision du test et de la compétence technique sont évaluées à l'aide d'échantillons enrichis dans un test de compétence (PT) et un panel d'évaluation externe de la qualité (EQA).
- + Les échantillons de contrôle de qualité interne (IQC), analysés de la même manière que échantillons inconnus, sont utilisés pour évaluer la validité des résultats analytiques. Les faux négatifs et faux positifs pour la QC des échantillons sont analysés régulièrement
- + Le nombre de résultats invalides est examiné au quotidien, enquêtés, et suivis pour la tendance des données.
- + Des processus d'action corrective sont mis en œuvre et utilisés au besoin pour déterminer la ou les causes profondes et pour garantir que les erreurs spécifiques ne se répètent pas
- + Les données et les rapports finaux sont documentés dans des formulaires ou des systèmes contrôlés et sont examinés par au moins un premier et un deuxième examinateur avant l'approbation finale et la soumission.

Les mesures mises en place pour surveiller les performances du test, ainsi que la fréquence de cette surveillance est déterminée en interne par le laboratoire lui-même (comme décrit ci-dessus) et par un prestataire accrédité de services d'EEQ jugé compétent pour fournir les panneaux PT (évaluation de compétences) externes conformément à la norme ISO 17043 (20). Quelques exemples de prestataires de PT qui peuvent fournir des panneaux SARS-CoV-2 sont inclus dans **l'annexe 7** : SELECTION DES FOURNISSEURS DE TESTS DE COMPETENCE COVID-19.

INDICATEURS DE QUALITE

Afin de contrôler la qualité du laboratoire, le laboratoire doit développer, mettre en œuvre et maintenir divers indicateurs de qualité (IQ) ou indicateurs clés de performance (KPI). Les IQ / KPI font référence au prélèvement et à l'analyse des données à chaque étape du processus de test qui peuvent servir comme un indicateur de la performance de l'ensemble du processus de test. Les KPI comprennent les éléments suivants et doivent être analysés et rapportés régulièrement, au moins une fois par mois :

- + Nombre d'échantillons testés, par type d'échantillon
- + Nombre (%) de résultats de test positifs, négatifs et invalides
- + Taux de rejet des échantillons
- + Nombre (%) d'échecs de résultats IQC
- + Performances EEQ / PT (réussite / échec ou % du score)
- + Délai d'exécution (TAT)
 - % des résultats rapportés dans les délais impartis
 - Moyenne et plage de TAT

C O N C L U S I O N

Lorsqu'un nouveau virus émerge, comme l'a fait le SARS-CoV-2 en décembre 2019, les laboratoires doivent s'appuyer sur des méthodes éprouvées pour développer des tests de diagnostic afin de répondre à leurs besoins lorsque les tests commerciaux ne sont pas disponibles. Ces LDT sont rarement parfaites à la première tentative - de nombreuses personnes passent par plusieurs cycles d'essais, des résultats erronés dues aux erreurs, de validation et de vérification, avant que de nouveaux tests de diagnostic sensibles et spécifiques puissent être mis en utilisation. Idéalement, ces tests seront exécutés selon le processus de développement et de validation, sous réserve d'une certification pour utilisation en diagnostic *in vitro* à la suite d'une évaluation indépendante par un organisme de réglementation approprié, tel que la *Food and Drug Administration* des États-Unis ou un organisme européen agréé tel que TÜV Rheinland LGA. La plupart des LDT n'évolue pas jusqu'au point d'une certification formelle pour l'utilisation ; cependant, ils doivent toujours être tenus au niveau de qualité le plus élevé possible afin d'atténuer les impacts sanitaires et économiques des maladies émergentes et d'aider à protéger nos populations les plus vulnérables.

REFERENCES

1. Wang D, Xu W, Wu G, Gao GF, Tan W. 2020. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 382:727–733. <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2001017>
2. Wu C, Liu Y, Yang Y, Zhang P, Zhong W, Wang Y, Wang Q, Xu Y, Li M, Li X, Zheng M, Chen L, Li H. 2020. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharm Sin B* 10:766–788. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102550/>
3. 2019. Undiagnosed pneumonia - China (HU): RFI. ProMED-mail. <https://promedmail.org/promed-post?id=6864153>
4. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>
5. Fomsgaard AS, Rosenstjerne MW. 2020. An alternative workflow for molecular detection of SARS-CoV-2 – escape from the NA extraction kit-shortage, Copenhagen, Denmark, March 2020. *Eurosurveillance* 25:2000398. <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.14.2000398>
6. SARS-CoV-2 Resources - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sars-cov-2/>
7. Molecular assays to diagnose COVID-19: Summary table of available protocols. <https://www.who.int/publications/m/item/molecular-assays-to-diagnose-covid-19-summary-table-of-available-protocols>
8. Nucleotide BLAST: Search nucleotide databases using a nucleotide query. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?LINK_LOC=blasthome&PAGE_TYPE=BlastSearch&PROGRAM=blastn
9. Primer validation For Optimum Assay Performance - PCR Guide | Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/assay-optimization-and-validation.html>
10. Food and Drug Administration. HDPCRTM SARS-CoV-2 Assay 2 of 28 COVID-19 Emergency Use Authorization Only-Instructions for Use HDPCRTM SARS-CoV-2 Assay. <https://www.fda.gov/media/138786/download>
11. International Organization for Standardization. 2012. ISO 15189: Medical laboratories-Requirements for quality and competence.
12. Basic Method Validation, 3rd Edition, FAQs - Westgard. <https://www.westgard.com/bmv3edfaqs.htm>
13. Armbruster DA, Pry T. 2008. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev* 29 Suppl 1:S49-52. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2556583>
14. Burd EM. 2010. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. American Society for Microbiology. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2901657/>
15. WHO. 2020. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. <https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>
16. WHO. 2004. Laboratory biosafety manual, 3rd ed. Geneva. <https://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>
17. Dieffenbach CW, Dveksler GS. 1993. Setting up a PCR laboratory. *PCR Methods Appl*. <https://genome.cshlp.org/content/3/2/S2.full.pdf+html>
18. Mifflin TE. Setting Up a PCR Laboratory. <http://www.dnalc.org/resources/BiologyAnimationLibrary.htm>
19. WHO. 2016. Establishment of PCR Laboratory in Developing Countries. India. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/249549>
20. International Organization for Standardization. 2010. ISO/IEC 17042: Conformity assessment-General requirements for proficiency testing.

ANNEXES

- Annexe 1 :** Les kits d'extraction d'ARN et les systèmes automatisés sélectionnés
- Annexe 2 :** Équipement minimum requis
- Annexe 3 :** Les fabricants de systèmes RT-PCR en temps réel sélectionnés
- Annexe 4 :** Les concepteurs et synthétiseurs d'amorces et de sondes sélectionnés
- Annexe 5 :** Les fournisseurs de Master Mix sélectionnés
- Annexe 6 :** Pratiques de Contamination-Prévention
- Annexe 7 :** Les fournisseurs de tests de compétence COVID-19 sélectionnés

CLAUSE DE NON-RESPONSABILITÉ : Les systèmes, fournisseurs, services et produits répertoriés dans ces annexes sont un petit échantillon de ressources disponibles pour l'achat et la distribution dans le monde entier. Les listes sont fournies à des fins de commodité et d'information uniquement ; Ils ne constituent pas une approbation ou une approbation des auteurs de l'un des produits, services ou opinions des entreprises ou organisations mentionnées. Des lignes supplémentaires sont fournies dans ce guide pour que les utilisateurs prennent note de tout système, fournisseur ou produit supplémentaire avec lequel ils sont familiers.

ANNEXE 1 : SELECTION DES KITS D'EXTRACTION D'ARN ET SYSTEMES AUTOMATISES

Kits d'Extraction Manuelle		
Fabricant	Exemple de kit	Site web
Beckman Coulter	RNAadvance Viral	https://www.beckman.com/reagents/genomic/rna-isolation/viral
Invitex Molecular	Invisorb Spin Virus RNA Mini Kit	https://www.invitex-molecular.com/products/infectious-diseases.html
Qiagen	QIAamp Viral RNA Mini Kit	https://www.qiagen.com/us/products/diagnostics-and-clinical-research/sample-processing/qiaamp-viral-rna-mini-kit/#orderinginformation
Roche	High Pure	https://lifescience.roche.com/en_us/search-results.html?searchTerm=high%20pure
Thermo Fisher Scientific	PureLink™ RNA Mini Kit	https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/rna-extraction/rna-types/total-rna-extraction/purelink-rna-mini-kit.html
Takara	NucleoSpin/ NucleoMag Virus	https://www.takarabio.com/products/nucleic-acid-purification/viral-dna-and-rna-purification-kits

Systèmes d'extraction automatisés		
Fabricant	Exemple de kit	Site web
bioMérieux	NUCLISENS® easyMAG®	https://www.biomerieux-usa.com/clinical/nuclisens-easymag
Perkin Elmer	Chemagi Prepito®	https://www.perkinelmer.com/product/chemagic-prepito-2022-0030
Qiagen	EZ1 Advanced XL, QIAcube, QIASymphony	https://www.qiagen.com/us/products/instruments-and-automation/nucleic-acid-purification/
Roche	MagNA Pure	https://lifescience.roche.com/en_us/brands/magnapure.html#magna-pure-systems
Thermo Fisher Scientific	KingFisher	https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/automated-purification-extraction/kingfisher-instruments.html

ANNEXE 2 : EQUIPEMENT MINIMUM REQUIS

Pré-Amplification	Extraction d'Acide Nucléique	Amplification & Détection
Micropipettes dédiées	Micropipettes dédiées	Micropipettes dédiées
Congélateur à -20 ° C	Congélateur à -20 ° C	Congélateur à -20 ° C
Station de travail PCR (boîte « air mort » ou flux laminaire) Vortex	Armoire de sécurité biologique (classe II A2, classe II B2, classe II C1 ou classe III) ou boîte à gants portable à pression négative	Armoire de biosécurité (classe II A2, classe II B2 ou classe II C1) Système PCR en temps réel
Vortex	Vortex	Système PCR en temps réel
Micro centrifugeuse	Système automatisé d'extraction d'acide nucléique ou micro centrifugeuse (couvercle de confinement d'aérosol préféré)	Thermocycleur standard (gradient de température préféré)
		Système d'électrophorèse sur gel (alimentation, chambre de marche, plateau de coulée et peignes ou gels préfabriqués)
		Micro-ondes (si vous préparez vos propres gels)
		Balance à précision (si vous préparez vos propres gels)
		Table lumineuse UV ou système d'imagerie sur gel

ANNEXE 3 :

SELECTION DES FABRICANTS DU SYSTEME RT-PCR EN TEMPS REEL

Fabricant	Exemple du système	Site web
Agilent	Mx3000P	https://www.agilent.com/en/product/real-time-pcr-(qpcr)/real-time-pcr-(qpcr)-plastics-supplies/plastics-supplies-for-mx3000p-3005p-qpcr-system/mx3000p-qpcr-system-232710
Applied Biosystems	ABI 7500/7500 Fast Dx, QuantStudio	https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-instruments.html
Bio Molecular Systems	Mic	https://biomolecularsystems.com/mic-qpcr/
Bio-Rad	CFX96	https://www.bio-rad.com/en-us/category/real-time-pcr-detection-systems?ID=059db09c-88a4-44ad-99f8-78635d8d54db
Roche	LightCycler 2.0, LightCycler 96	https://lifescience.roche.com/en_us/brands/realtime-pcr-overview.html#qpcr-instruments

ANNEXE 4 : SELECTION DES CONCEPTEURS ET SYNTHETISEURS D'AMORCES ET SONDES

Conception d'amorces seulement

Nom de la compagnie	Site web
Centre National d'Information en Biotechnologique (NCBI, United States)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/

Conception et fabrication d'amorces et sondes

Nom de la compagnie	Site web
BioCat	https://www.biocat.com/genomics/real-time-pcr-custom-probes-and-primers
Eurofins Genomics	https://www.eurofinsgenomics.eu/en/dna-rna-oligonucleotides/
Eurogentec	https://www.eurogentec.com/en/custom-manufacturing
GenScript	https://www.genscript.com/molecular-biology-service.html?src=pullmenu
IDT	https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index
OriGene	https://www.origene.com/products/gene-expression/qpcr/primer-pairs
Sigma Aldrich	https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/oligoarchitect-online.html
Thermo Fisher Scientific	https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/oligonucleotides-primers-probes-genes/applied-biosystems-custom-primers-probes.html
Tib MolBiol	https://www.tib-molbiol.com/

ANNEXE 5 : SELECTION DES FOURNISSEURS DE MASTER MIX

Nom	Site web
Bio-Rad	https://www.bio-rad.com/en-us/category/pcr-reagents-qpcr-reagents?ID=M87EKA15
GeneOn	https://www.geneon.net/products/rt-pcr-reverse-transcription/lyophilized-mastermix-for-rt-pcr-1/
Norgen Biotek	https://norgenbiotek.com/category/pcr-mastermix
Promega	https://www.promega.com/products/pcr/
Takara	https://www.takarabio.com/products/pcr/pcr-master-mixes
Techne	http://www.techne.com/product.asp?dsl=7085
Thermo Fisher Scientific	https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-reagents/one-step-real-time-rt-master-mix.html

ANNEXE 6 : PRATIQUES DE PREVENTION DE LA CONTAMINATION

ZONE 1 : ZONE DE PRE-AMPLIFICATION

Les précautions suivantes sont recommandées :

- + Les flux de travail quotidiens doivent être planifiés pour éviter la rentrée dans la zone 1 si les entrées aux zones 2 ou 3 ont été faites
- + Les échantillons ou amplicons ne peuvent absolument pas être introduits ou autorisés à entrer dans cette pièce
- + Aucun réactif sorti de cette pièce ne doit y rentrer
- + Aucun téléphone portable / ordinateur portable / effets personnels ne doivent être apportés ou utilisés dans cette pièce
- + Les pipettes et autres instruments nécessaires doivent toujours être conservés dans cette zone et utilisés exclusivement pour les activités pré-PCR
- + Chaque composante doit être mis à part avant d'utiliser un autre composant pour éviter la contamination du composant précédent avec les solutions subséquentes.
- + Si plusieurs cycles de PCR sur différentes plates-formes sont menés le même jour, tous les masters mixés (mélanges maîtres des réactifs) doivent être préparés consécutivement et pris ensemble dans la zone d'ajout de modèle (extrait d'ARN)
- + Tous les produits de nettoyage et de balayage pour cette pièce doivent être gardés dans cette pièce
- + Le personnel de nettoyage de routine du laboratoire ne devrait pas avoir accès à cette salle afin que des contaminants d'autres zones n'y soient pas introduits à l'insu.

Nettoyage hebdomadaire de la salle d'amplification

- + A la fin de chaque semaine, la salle de pré-amplification doit être soigneusement nettoyée.
- + Le nettoyage doit se faire de haut en bas, en commençant par les paillasses/surfaces de travail et en terminant avec le sol.
- + Une fois les surfaces supérieures nettoyées, le sol doit être balayé avec un balai.
- + Le sol doit être nettoyé avec de l'hypochlorite de sodium à 1%, en utilisant d'abord les restes d'eau de Javel diluée, puis en y ajoutant une solution supplémentaire de 1% d'hypochlorite de sodium si nécessaire.
- + Le matériel de nettoyage doit être lavé avec l'eau courante propre
- + Aspergez et nettoyez le sol avec de l'alcool à 70%.

Nettoyage des paillasses y compris pipettes & appareils de PCR

Méthode quotidienne :

- + Portez des vêtements de protection, masque et gants.
- + Nettoyez soigneusement les paillasses et l'appareil de PCR avant de travailler dans cette pièce.
- + Comme indiqué ci-dessus, utilisez d'abord de l'hypochlorite de sodium à 1%, suivi de l'éthanol à 70% dans un intervalle de 30 secondes.
- + Après le nettoyage, les master mix (mélanges maîtres des réactifs) doivent être préparés pour la journée.
- + Une fois les réactifs préparés, les surfaces et l'appareil de PCR doivent être à nouveau nettoyés.

ZONE 2 : ZONE D'EXTRACTION D'ACIDE NUCLEIQUE

Nettoyage hebdomadaire

- + A la fin de chaque semaine, la zone d'extraction d'acide nucléique doit être soigneusement nettoyée.
- + Le nettoyage doit se faire de haut en bas, en commençant par les paillasses/surfaces de travail et en terminant avec le sol.
- + Une fois les surfaces supérieures nettoyées, le sol doit être balayé avec un balai.
- + Le sol doit être nettoyé avec de l'hypochlorite de sodium à 1%, en utilisant d'abord l'eau de Javel diluée restante, puis avec une préparation supplémentaire d'hypochlorite de sodium à 1% si nécessaire.
- + Lavez le matériel de nettoyage avec l'eau courante.
- + Aspergez et nettoyez le sol avec de l'alcool à 70%.

Poste de sécurité microbiologique (PSM)

Méthode quotidienne :

- + Portez les vêtements de protection, masque et gants.
- + Nettoyez soigneusement le PSM avant et après chaque lot d'échantillons.
- + L'hypochlorite de sodium à 1% doit être utilisé en premier, suivi de l'éthanol à 70% après un intervalle de 30 secondes.
- + Nettoyez également le panneau vitré. Eteignez la lumière de la hotte après le nettoyage.

Méthode hebdomadaire :

- + Portez les vêtements de protection, masque et gants.
- + Préparez suffisamment de papier ou rouleau d'essuyage avec 1% d'hypochlorite de sodium et 70% d'éthanol.
- + Retirez la surface de travail interne du PSM et nettoyez-la soigneusement ainsi que tout l'intérieur du PSM avec 1% d'hypochlorite de sodium et 70% d'éthanol comme décrit ci-dessus.
- + La fenêtre vitrée de la hotte doit être nettoyée pour s'assurer que toutes les bavures et traces sur la vitre sont éliminées.
- + Remplacez la surface métallique de travail intérieure du PSM.
- + Une fois le nettoyage terminé, effectuez un test de fumée pour vous assurer que le PSM fonctionne correctement, c.-à-d. la fumée doit être « aspirée » dans les événements (mailles sur la surface inférieure) de la PSM et NON PAS s'échapper dans l'environnement extérieur.

ZONE 3 : ZONE(S) D'AMPLIFICATION & DETECTION

Nettoyage hebdomadaire de la ou des zone(s) d'amplification

- + À la fin de chaque semaine, la salle d'amplification doit être soigneusement nettoyée.
- + Le nettoyage doit se faire de haut en bas, en commençant par les paillasses ou surfaces de travail et en terminant avec le sol.
- + Une fois les surfaces supérieures nettoyées, le sol doit être balayé avec un balai.
- + Le sol doit être nettoyé avec de l'hypochlorite de sodium à 1%, en utilisant d'abord l'eau de Javel diluée restante, puis une préparation supplémentaire d'hypochlorite de sodium à 1% si nécessaire.
- + Lavez le matériel de nettoyage avec l'eau courante propre.
- + Aspergez et nettoyez le sol avec de l'alcool à 70%.
- + Les embouts, les tubes PCR et les plaques 96 puits utilisés doivent être placés dans des poubelles appropriés et passés à l'autoclave pour détruire tout amplicon contaminant.

Paillasses ou surfaces de travail y compris thermocycleur, pipettes & appareil de PCR

Méthode quotidienne :

- + Portez les vêtements de protection, masque et gants
- + Nettoyez soigneusement les paillasses et surfaces de travail et l'appareil de PCR avant que le travail de travailler dans cette pièce.
- + Comme indiqué ci-dessus, utilisez d'abord de l'hypochlorite de sodium à 1%, suivi de l'éthanol à 70% dans un intervalle de 30 secondes.
- + Ajouter soigneusement le matériel biologique dans chaque tube de réaction et placer les tubes dans le thermocycleur ou sceller la plaque à 96 puits avec un support plastique adhésif et insérer la plaque scellée dans le thermocycleur.
- + Après avoir démarré le thermocycleur, nettoyez les paillasses/surfaces de travail et l'appareil de PCR comme ci-dessus.

Thermocycleur (machine de PCR)

Méthode hebdomadaire :

- + Portez les vêtements de protection, masque et gants.
- + Nettoyez soigneusement l'extérieur du thermocycleur.
- + Utilisez d'abord de l'hypochlorite de sodium à 1% ou du Contrad®, suivi de l'éthanol à 70% dans un intervalle de 30 secondes.

ANNEXE 7 : SÉLECTION DES FOURNISSEURS DE TESTS DE COMPÉTENCE COVID-19

Nom	Site web
College of American Pathologists	https://www.cap.org/laboratory-improvement/international-laboratories/external-quality-assurance-proficiency-testing-for-international-laboratories
Instand (other coronaviruses)	https://www.instand-ev.de/en/eqas/eqa-program.html
Oneworld Accuracy	https://www.oneworldaccuracy.com/1wa/#/covid-19
Randox/ QCMD	https://www.randox.com/coronavirus-qcmd/
Thistle QA	http://www.thistle.co.za/coronavirus-proficiency-testing/