SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD

Kit de RT-PCR pour le SARS-CoV-2 en une étape, diagnostic *in vitro*, IVD

Gène viral de l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp)

REF MD03201, 96 déterminations

Réservé au diagnostic* in vitro *par des professionnels

IVD

FR

Mode d'emploi

MD0320_IM_fr

VERSION 2401, Janvier 2024

NZYtech genes & enzymes
Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal
Tél.: +351.213643514 Fax : +351.217151168
www.nzytech.com

Sommaire

1. Introduction 3
2. Usage prévu 3
3. Principes du test 3
4. Composition du kit 3
5. Stockage, stabilité et conditions de manipulation 4
6. Matériels et appareils requis mais non fournis 4
7. Collecte et préparation de l'échantillon 4
8. Précautions et mises en garde 4
   8.1. Informations relatives à la sécurité 4
   8.2. Exigences de manipulation et de procédure 4
9. Procédure de test 5
   9.1. Mise en place de la réaction 5
   9.2. Programmation de l'appareil de PCR en temps réel 5
10. Analyse des données 6
   10.1. Critères de validation de l'essai 6
   10.2. Interprétation des résultats du test 6
11. Évaluation de performance 7
   11.1. Résultats attendus 7
   11.2. Sensibilité analytique 7
   11.3. Réactivité analytique (inclusivité) et spécificité analytique 7
   11.4. Précision 8
   11.4.1. Répétabilité 8
   11.4.2. Reproductibilité quotidienne 8
   11.4.3. Reproductibilité de lot à lot 8
   11.4.4. Reproductibilité de l'opérateur 8
   11.4.5. Reproductibilités inter-appareil et intra-laboratoire 8
   11.5. Évaluation clinique 8
12. Contrôle qualité 8
13. Assistance technique 9
14. Marques déposées et avis de non-responsabilité 9
15. Explication des symboles 9
16. Déclaration de conformité 10
17. Références 11

1. Introduction

À la fin de l'année 2019, une nouvelle maladie respiratoire aiguë, appelée « Coronavirus Disease 2019 » (COVID-19), en français « maladie du coronavirus de 2019 », a été signalée en Chine et s'est rapidement propagée dans le monde entier. L'agent causal a été identifié comme étant le « Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 » (SARS-CoV-2) [Coronavirus du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère 2]. Comme le coronavirus SARS (SARS-CoV) qui lui est étroitement lié, ce virus (précédemment nommé 2019-nCoV) appartient au genre *Betacoronavirus* de la famille des coronavirus. Les coronavirus sont de grands virus à ARN monocaténaire positifs, enveloppés et qui infectent les humains tout comme un grand nombre d'espèces animales. Le SARS-CoV-2 serait d'origine zoonotique, et il se serait probablement propagé depuis les grands marchés de fruits de mer et d'animaux par contact humain-animal dans la ville de Wuhan. Le nouveau coronavirus est très contagieux et se transmet principalement par les gouttelettes respiratoires (toux et éternuements). La détection précoce du SARS-CoV-2 est essentielle pour pouvoir fournir un traitement rapide aux patients infectés et ainsi réduire la propagation des infections. Les manifestations cliniques les plus courantes de la COVID-19 comprennent la fatigue, la fièvre et des symptômes d'affection des voies respiratoires inférieures, tels que la toux sèche et la dyspnée. La perte de l'odorat et du goût peut également se produire. Dans les situations les plus critiques, l'infection évolue vers une pneumonie sévère avec des complications potentiellement mortelles telles que le syndrome de détresse respiratoire aiguë, la défaillance des organes et la mort. En l'état actuel des connaissances, environ 80% des infections par le SARS-CoV-2 sont bénignes ou asymptomatiques. Cependant, un pourcentage de la population est plus vulnérable à la forme grave de la maladie, notamment les adultes plus âgés (50 ans et plus), les fumeurs et les personnes atteintes de maladies chroniques telles que les maladies cardiaques ou pulmonaires, le cancer, le diabète, ainsi que les patients dont le système immunitaire est affaibli.

2. Usage prévu

Le SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech est un test moléculaire conçu pour la détection qualitative rapide des acides nucléiques du virus SARS-CoV-2 dans des écouvillons nasopharyngés et oropharyngés ou des échantillons d'expectoration collectés auprès des patients. Un résultat positif indique la présence d'ARN du SARS-CoV-2, qui est la conséquence d'une infection par le nouveau coronavirus humain. L'utilisation du test est réservée au personnel de laboratoire qualifié et spécifiquement formé aux techniques de la PCR en temps réel et des diagnostics *in vitro*.

3. Principes du test

Le SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech fournit l'ensemble des réactifs et de sondes nécessaires pour détecter qualitativement le génome du SARS-CoV-2, en utilisant des plateformes courantes de PCR en temps réel (voir les spécifications requises pour l'appareil dans la **Chapitre 6**). Plus précisément, le kit détecte la présence d'une séquence d'ARN provenant du gène de SARS-CoV-2 codant pour l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp). Un contrôle interne est inclus pour confirmer l'efficacité de l'extraction de l'ARN à partir des échantillons biologiques humains, ainsi que l'absence d'inhibiteurs de la PCR, entre autres. De plus, le test utilise des contrôles externes (contrôle positif de faible titre fourni avec le kit et contrôle négatif), comme décrit ci-dessous. Les amorces et la sonde utilisées pour détecter le SARS-CoV-2 ont 100% d'homologie avec > 95% des plus de 2 500 séquences génomiques disponibles sur la base de données GISAID à la date du 29 mars 2020. De plus, les amorces et la sonde ciblant le génome du SARS-CoV-2 ne présentent aucune homologie significative avec des génomes non apparentés, ce qui rend ce test très spécifique étant donné qu'il n'y a pas de réactivité croisée avec les autres coronavirus séquencés jusqu'à présent. L'évolution naturelle du SARS-CoV-2 qui reflète les stratégies d'adaptation du virus, implique que de nouvelles informations sur les séquences seront disponibles après la conception initiale de ce kit. Par conséquent, NZYtech examinera périodiquement les cibles du SARS-CoV-2 et, si nécessaire, lancera de nouvelles versions de ce kit.

La détermination qualitative de l'ARN spécifique est basée sur la technologie de RT-PCR en temps réel en une étape, car il s'agit d'une méthode rapide et fiable pour détecter précisément la présence du SARS-CoV-2. En utilisant le SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech, l'ARN isolé et purifié en association avec un système d'extraction de diagnostic *in vitro* CE est rétro-transcrit (RT) en ADNc puis cet ADNc est amplifié par PCR, le tout en une seule réaction et en utilisant deux jeux d'amorces/de sondes très spécifiques exploitant le principe dit « TaqMan® ». Lorsque de l'ARN viral est extrait des échantillons des voies respiratoires prélevés sur un patient infecté, une sonde TaqMan® se lie spécifiquement à une région conservée du gène RdRp du SARS-CoV-2 délimitée par une paire d'amorces également spécifiques. Un jeu d'amorces/de sondes supplémentaires sert de contrôle interne pour détecter les acides nucléiques de la ribonucléase humaine P [gène RNase P (RP)], et permet de confirmer l'efficacité du processus d'extraction à partir du matériel biologique d'origine humaine. De plus, ce contrôle interne permet de démontrer que la réaction n'a pas été inhibée par des inhibiteurs de la PCR qui pourraient être présents dans les échantillons cliniques. Les deux sondes sont marquées différemment, avec les colorants rapporteurs FAM™ et JOE™, afin d'identifier et distinguer l'amplification individuelle des cibles virale et humaine, respectivement, en une seule réaction. En outre, elles sont fournies dans des concentrations optimisées pour s'assurer que l'amplification de l'ARNm humain, même lorsqu'il est présent à des concentrations très élevées, ne limite pas l'efficacité de jeu d'amorces/sondes utilisé pour détecter le SARS-CoV-2. Le SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech comprend un contrôle positif qui permet de contrôler les performances des réactions de RT-PCR. Ce contrôle correspond à une molécule d'acide nucléique synthétique portant des séquences qui sont homologues à la fois aux séquences ciblées de SARS-CoV-2 et du gène RP incluses dans ce test de détection. Le contrôle positif SARS-CoV-2/RP doit être utilisé directement avec le mélange d'amorces/sondes SARS-CoV-2/RP chaque fois qu'une nouvelle plaque d'échantillons est testée. Un résultat positif indique que les jeux d'amorces et de sondes utilisées pour détecter le gène ciblé de SARS-CoV-2 et le gène RP ont fonctionné correctement dans le mélange principal (« Master mix ») dans ce scénario expérimental particulier. Si le résultat est négatif, les résultats du test ne sont pas valides et le test doit être effectué à nouveau.

4. Composition du kit

Le SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech fournit l'ensemble des réactifs nécessaires en quantité suffisante pour effectuer 96 réactions de RT-PCR en une seule étape.

COMPOSANT DU KIT		NOMBRE DE FLACONS	VOLUME (PAR FLACON)
SARS-CoV-2 MMix	Mélange principal NZYSpeedy pour la RT-qPCR en une étape	1	1050 µL
PPMix SARS-CoV-2	Mélange d'amorces/sondes pour SARS-CoV-2/RP	1	205 µL
SARS-CoV-2 Pos	Contrôle positif pour SARS-CoV-2/RP (1 x 10^5 copies/µL)	1	105 µL
SARS-CoV-2 Neg	Eau sans RNase/DNase	1	105 µL

5. Stockage, stabilité et conditions de manipulation

Le SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD est expédié réfrigéré. Tous les composants doivent être immédiatement stockés à -85 °C to -15 °C à leur arrivée. Lors de l'utilisation, les composants du kit doivent être remis rapidement dans le congélateur après utilisation pour minimiser le temps passé à température ambiante.

- Minimisez le nombre de cycles de congélation-décongélation en stockant les composants en aliquotes de travail. Si nécessaire, les composants du kit peuvent être reconditionnés en aliquotes de plus petits volumes après leur décongélation.
- Le mélange d'amorces/sonde pour SARS-CoV-2/RP doit être conservé à l'abri de la lumière. En particulier, n'exposez pas le mélange principal NZYSpeedy pour la RT-qPCR en une étape aux rayons directs du soleil après l'avoir mélangé avec le mélange d'amorces/de sonde.
- Contactez immédiatement NZYtech si vous recevez le kit dans un emballage endommagé.
- Faites attention à la date d'expiration indiquée sur l'emballage. NZYtech ne recommande pas l'utilisation du kit après la date d'expiration. À cette date, le kit doit être jeté en suivant les instructions d'élimination du **Chapitre 8.2**.

6. Matériels et appareils requis mais non fournis

- Appareil de PCR en temps réel qui détecte les colorants fluorescents FAM™ et JOE™ (aux longueurs d'onde d'émission de 520 et 555 nm, respectivement). Consultez le **Chapitre 11** pour connaître les modèles d'appareil pour lesquels le kit a été validé.
- Équipements et consommables pour isoler l'ARN viral à partir des échantillons respiratoires.
- Articles en plastique pour la qPCR sans RNase/DNase : tubes PCR, barrettes, bouchons, plaques à 96 puits, films adhésifs.
- Pipettes et embouts de filtre (sans RNase/DNase).
- Gants jetables.
- Vortex et centrifugeuse.

7. Collecte et préparation de l'échantillon

Différents facteurs, tels que le protocole de collecte d'échantillons à partir de prélèvements respiratoires humains (écouvillons nasopharyngés ou oropharyngés, ou expectorations), le transport des échantillons, le temps de stockage et de traitement, sont essentiels pour obtenir les meilleurs résultats. Les échantillons d'expectorations doivent provenir des voies respiratoires inférieures. Les échantillons prélevés doivent être testés dès que possible. Les échantillons doivent être transportés et stockés à basse température conformément aux règlements sur la sécurité biologique. L'ARN ou les acides nucléiques totaux extraits selon un protocole de diagnostic *in vitro* CE constituent le matériau de départ du SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech. Veuillez vous assurer que les échantillons d'ARN conviennent en termes de pureté, de concentration et d'intégrité des acides nucléiques. Un rapport $A_{260/280}$ d'environ 2 est généralement accepté pour l'ARN pur. Étant donné que l'éthanol est un puissant inhibiteur de la PCR en temps réel, il est nécessaire de l'éliminer complètement avant l'élution de l'acide nucléique lors de l'extraction. Le kit de NZYtech intègre une réaction de contrôle interne de l'extraction d'ARN qui cible l'ARN humain, qui est co-purifié avec l'ARN viral. L'ARN humain est amplifié avec le jeu d'amorces/de sonde spécifiques au gène RNase P (RP). Cela est utile pour vérifier l'efficacité de l'isolement de l'ARN et/ou la présence d'inhibiteurs pendant le traitement des échantillons.

8. Précautions et mises en garde

Comme dans toute procédure de test analytique, il est essentiel de respecter les bonnes pratiques de laboratoire. Suivez attentivement les procédures et les directives fournies dans ce manuel pour vous assurer que le test est effectué correctement. Tout écart par rapport à ces procédures et directives peut entraîner l'échec du test ou des résultats erronés. En raison de la sensibilité élevée du kit, il faut faire particulièrement attention à ne pas contaminer les réactifs et les mélanges d'amplification.

8.1. Informations relatives à la sécurité

Avant d'utiliser le kit, veuillez consulter la fiche de données de sécurité (FDS) disponible sur le site Web de NZYtech (www.nzytech.com). La détection du virus SARS-CoV-2 ne doit être développée que par du personnel formé aux procédures techniques et de sécurité pertinentes dans des laboratoires équipés de manière appropriée. Les directives internationales et nationales sur la biosécurité dans les laboratoires doivent être suivies en toutes circonstances.

8.2. Exigences de manipulation et de procédure

- Réservé au diagnostic *in vitro* par des professionnels.
- N'utilisez pas ce kit après la date d'expiration.
- N'utilisez pas les composants du test si l'emballage hermétique du kit est endommagé.
- Ne mélangez pas les réactifs provenant de différents lots de production.
- Aucun réactif des autres fabricants ne doit être utilisé avec les réactifs de ce kit de test.
- Des pipettes et des articles en plastique jetables sans DNase/RNase doivent être utilisés dans toutes les procédures.
- Utilisez des embouts à filtre sans DNase/RNase tout au long du protocole pour éviter la contamination par les aérosols et les liquides.

- La préparation des échantillons, la mise en place de la réaction et l'amplification doivent être effectuées dans des zones de travail différentes.
- Le modèle de contrôle positif contient un nombre élevé de copies modèles. Il doit être ouvert et traité à l'écart des échantillons de test et des composants du kit pour éviter la contamination croisée.
- Utilisez toujours l'eau fournie dans le kit (SARS-CoV-2 Neg - eau sans RNase/DNase).
- À la fin de chaque test, nettoyez les surfaces de travail et l'équipement avec une solution éliminant l'ADN/ARN.
- Après l'amplification, manipulez les plaques avec soin et jetez-les immédiatement à la fin du test. Les plaques doivent toujours être éliminées dans un contenant pour produits biologiques contaminés approprié après utilisation.
- Les échantillons biologiques doivent être manipulés comme s'ils étaient infectieux en suivant les précautions appropriées en matière de biosécurité.
- Les résidus des produits chimiques et des préparations sont généralement considérés comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchets est réglementée par les lois et réglementations nationales et régionales.
- Tous les résultats doivent être interprétés par un professionnel de la santé en tenant compte du contexte, des antécédents médicaux et des symptômes cliniques du patient.
- Ce test ne peut pas exclure les maladies causées par d'autres agents pathogènes.
- Un résultat négatif obtenu pour un test par PCR n'exclut pas définitivement la possibilité de l'infection.
- Suivez les bonnes pratiques de laboratoire, portez des vêtements de protection, portez en permanence des gants jetables non poudrés et utilisez des lunettes et un masque. Ne mangez pas, ne buvez pas et ne fumez pas dans la zone de travail.

9. Procédure de test

Veuillez lire attentivement le mode d'emploi avant d'effectuer le test. Attention, toutes les étapes de pipetage et la mise en place de la plaque expérimentale doivent être effectuées sur de la glace. Après avoir ajouté les réactifs à la plaque, lancez immédiatement le protocole de RT-PCR en une étape. L'incubation prolongée des mélanges réactionnels à température ambiante peut entraîner des artefacts de PCR qui réduisent la sensibilité de détection. Avant l'expérience, commencez à remuer doucement les tubes de réaction fournis, centrifugez-les pendant 5 secondes pour regrouper leur contenu au fond du tube et placez les tubes sur de la glace. **Pipetez toujours le contrôle positif SARS-CoV-2/RP en dernier pour éviter les contaminations éventuelles.**

9.1. Mise en place de la réaction

1. Préparez un mélange de RT-PCR suffisant pour le nombre de tests SARS-CoV-2/RNase P à effectuer avec 5% de volume supplémentaire pour les pertes dues au pipetage. Procédez selon le tableau ci-dessous qui spécifie les volumes pour 1 et *n* tests (où *n* correspond au nombre total de réactions):

COMPOSANT	**1 TEST VOLUME (µL)**	***n* TESTS (*) VOLUME + 5% (µL)**
SARS-CoV-2 MMix	10	*n* x 10,5
PPMix SARS-CoV-2 PPMix	2	*n* x 2,1
VOLUME FINAL	**12**	***n* x 12,6**

(*) Pour calculer le nombre total de réactions nécessaires pour chaque test, comptez le nombre d'échantillons à tester et ajouter deux réactions pour les contrôles négatif et positif, respectivement.

2. Pipetez 12 µL du mélange RT-PCR dans chaque puits selon l'organisation prévue pour la plaque expérimentale de PCR en temps réel.
3. Pour le contrôle négatif, ajoutez 8 µL de SARS-CoV-2 Neg au lieu de la matrice d'ARN dans le puits de contrôle négatif. Le volume final doit être de 20 µL.
4. Pour les échantillons biologiques, ajoutez 8 µL de chaque échantillon d'ARN dans les puits SARS-CoV-2/RNase P, selon l'organisation de votre plaque expérimentale. Le volume final dans chaque puits doit être de 20 µL.
5. Pour le contrôle positif, ajouter 8 µL de SARS-CoV-2 Pos au lieu de la matrice d'ARN dans le puits de contrôle positif. Le volume final doit être de 20 µL.
6. Scellez la plaque de réaction contenant toutes les réactions avant de procéder aux étapes de RT-PCR et de détection.
7. Placez la plaque de réaction dans l'appareil de PCR en temps réel et exécutez le protocole de RT-PCR conformément à la section ci-dessous.

9.2. Programmation de l'appareil de PCR en temps réel

Le tableau ci-dessous présente un protocole standard optimisé sur un certain nombre de plateformes. Cependant, ces conditions peuvent être adaptées et validées pour convenir aux différents protocoles spécifiques à chaque machine.

Suggestion de paramètres de l'essai de RT-PCR

CYCLES	TEMPERATURE	TEMPS	ÉTAPE
1	50 °C	20 min	Rétrotranscription
1	95 °C	2 min	Activation de la polymérase
40	95 °C	5 s	Dénaturation
	60 °C	30 s	Hybridation/élongation

Colorants/détecteurs fluorescents

CIBLE	COLORANT FLUORESCENT	CANAUX DE DETECTION
Cibles : SARS-CoV-2 et RNase P	FAM™ et JOE™	FAM
Contrôles positif et négatif	FAM™ et JOE™	JOE, VIC ou HEX

Le SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech a été validé pour les systèmes de PCR en temps réel suivants : Applied Biosystems® 7500, Applied Biosystems® StepOnePlus et Bio-Rad® CFX96™. Si un autre équipement est utilisé, le kit doit être validé par l'utilisateur en utilisant des échantillons précédemment caractérisés (à la fois positifs et négatifs).

10. Analyse des données

10.1. Critères de validation de l'essai

Avant d'analyser les résultats des échantillons, nous vous recommandons de vérifier si le test PCR en temps réel est valide. Ainsi, pour chaque plaque, veuillez confirmer si les contrôles positifs et négatifs ont donné les résultats escomptés, selon les critères suivants :

Contrôle positif : l'amplification des courbes FAM™ (SARS-CoV-2) et JOE™ (RP) est positive. Le contrôle positif devrait s'amplifier avec un Ct < 25, à la fois dans les canaux FAM et JOE. Le non-respect de ce critère de contrôle qualité indique fortement que l'expérience a été compromise.

Contrôle négatif (aucune réaction de la matrice) : aucune amplification n'est détectée. Si le contrôle négatif a une ou deux courbes d'amplification (FAM™ et/ou JOE™) de forme sigmoïde, il est possible que l'échantillon ait été contaminé. Effectuez à nouveau le test en suivant les bonnes pratiques de la RT-PCR.

Si les contrôles donnent les résultats attendus, le test est **valide**. Veuillez procéder à l'interprétation des résultats pour les échantillons testés.

Si l'un des contrôles ne présente pas les résultats attendus, le test a été compromis ou mal exécuté, et il doit être considéré comme **non valide. Veuillez effectuer à nouveau le test.**

Si le problème persiste, contactez le fabricant.

10.2. Interprétation des résultats du test

Le SARS-CoV-2 est détecté si la courbe d'amplification de FAM™ présente une forme sigmoïde avec un Ct < 36, quel que soit le résultat obtenu pour le test de RP (JOE™).

Le SARS-CoV-2 n'est pas détecté si la courbe de FAM™ n'est pas positive (Ct ≥ 36) tandis que le test de RP (JOE™) donne une courbe sigmoïdale positive (Ct < 40).

Le **test n'est pas valide** si les tests de SARS-CoV-2 et RP sont tous les deux négatifs. Le test doit être répété avec de l'acide nucléique re-purifié à partir de l'échantillon testé.

Le tableau suivant résume l'interprétation des principaux résultats (évaluez la forme globale des courbes d'amplification ; **seules les courbes d'amplification sigmoïdes indiquent une véritable amplification**).

RESULTAT DE SARS-CoV-2 SARS-CoV-2, CT (FAM™)	**RESULTAT DE RP** RP, CT (JOE™)	**INTERPRETATION DES RESULTATS**
+ (Ct < 36)	**+** (Ct < 40)	SARS-CoV-2 détecté → RÉSULTAT POSITIF
+ (Ct < 36)	**-** (Ct > 40)	SARS-CoV-2 détecté → RÉSULTAT POSITIF
- (Ct ≥ 36)	**+** (Ct < 40)	SARS-CoV-2 non détecté→ RÉSULTAT NÉGATIF
- (Ct ≥ 36)	**-** (Ct > 40)	Test non valide, répétez l'extraction et effectuez à nouveau le test

Remarque : *l'interprétation des résultats doit tenir compte de la possibilité de résultats faux négatifs et faux positifs.*

- Les résultats faux négatifs peuvent être causés par :
  - La non-conformité de la collecte, de la manipulation et/ou du stockage des échantillons.
  - L'échantillon a été prélevé en dehors de la phase virémique.
  - Le non-respect des procédures de ce manuel.
  - L'utilisation d'un kit d'extraction non autorisé ou d'une plateforme de PCR en temps réel non autorisée.

- Les résultats faux positifs peuvent être causés par :
  - La manipulation inappropriée d'échantillons contenant une forte concentration d'ARN viral du SARS-CoV-2 ou de la matrice d'ARN servant de contrôle positif.
  - La manipulation inappropriée du tube SARS-CoV-2 Pos.
  - La manipulation inappropriée du produit amplifié (plaque après l'amplification).

11. Évaluation de performance

L'évaluation des performances du SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech a été réalisée sur les systèmes de PCR en temps réel Applied Biosystems® 7500 et Bio-Rad® CFX96™ avec des tests supplémentaires sur le système de PCR en temps réel Applied Biosystems® StepOnePlus. Si un autre équipement est utilisé, le kit doit être validé par l'utilisateur en utilisant des échantillons précédemment caractérisés (à la fois positifs et négatifs).

11.1. Résultats attendus

Le graphique d'une amplification typique, observé pour un échantillon clinique contenant des acides nucléiques de SARS-CoV-2, est présenté ci-dessous.

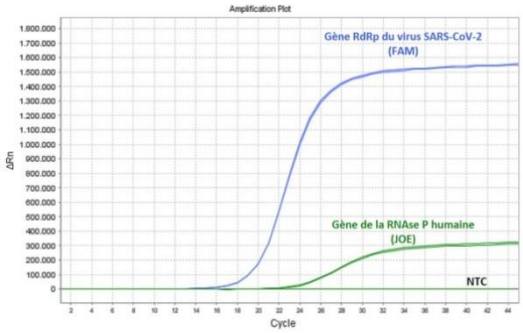

Figure 1. Détection simultanée des cibles SARS-CoV-2 et RNase-P humaine dans un échantillon clinique positif (patient infecté par le SARS-CoV-2). Courbe bleue : détection de la cible ARN du virus SARS-CoV-2 (gène RdRp) via le canal FAM ; courbe verte : détection du gène de la RNase P humaine via le canal JOE. NTC : « No Template Control » (contrôle négatif).

11.2. Sensibilité analytique

La sensibilité analytique a été définie comme étant la plus faible concentration d'analyte pouvant être détectée de manière fiable avec une confiance de 95%. Elle a été évaluée en testant les acides nucléiques de SARS-CoV-2 à différents nombres de copies (de 5 x 10^4 à 2,5 copies par réaction ; 2,5 x 10^3 à 0,125 copies/µL), seuls ou enrichis en ARN extrait à partir d'échantillons oropharyngés négatifs, en utilisant 3 différents lots de kits et en suivant les conditions de réaction de test typiques. Les tests ont été répétés 2 fois par jour pendant 5 jours, produisant ainsi 60 répétitions pour chaque concentration de SARS-CoV-2 testée. Ensemble, les données ont révélé que le SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech détecte 0,25 copies d'ARN viral de SARS-CoV-2/µL avec une confiance ≥ 95%. Ainsi, la sensibilité analytique du kit, exprimée comme la limite de détection, est de 0,25 copies/µL ou 250 copies/mL. La limite de détection du kit a été revalidée par 2 opérateurs différents en utilisant 3 lots de kits dans une expérience totalisant 48 tests, garantissant ainsi que la sensibilité analytique du kit a été maintenue dans différentes situations de test. La capacité du SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech à détecter le virus à différentes charges virales (de 5 x 10^7 à 5 copies par réaction) est représentée dans la figure ci-dessous.

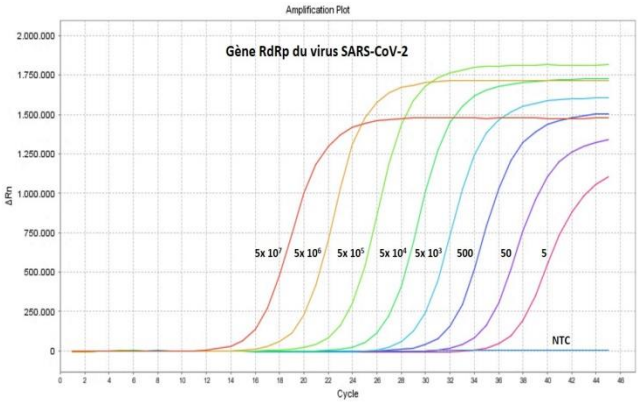

Figure 2. Sensibilité du SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD. Courbes d'amplification (nombre de cycles en fonction de la fluorescence - ΔRN) de dilutions en série à 1:10 de l'ARNv du SARS-CoV-2, de 5 x 10^7 copies à 5 copies par réaction via le canal FAM. NTC : « No Template Control » (contrôle négatif).

11.3. Réactivité analytique (inclusivité) et spécificité analytique

L'inclusivité et la réactivité croisée ont été évaluées par analyse *in silico* avec des pathogènes liés au SARS-CoV-2 et des pathogènes normaux qui provoquent une infection avec des symptômes similaires, respectivement. L'analyse *in silico* a révélé que la conception du test détectait toutes les souches du virus SARS-CoV-2 et que le test ne montrait aucune réactivité avec les espèces qui n'étaient pas SARS-CoV-2. En plus de l'analyse *in silico*, la RT-PCR du SARS-CoV-2 a été réalisée sur les acides nucléiques des microbes courants des voies respiratoires et buccales, y compris *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Dickeya dadantii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium mageritense*, *Mycobacterium smegmatis*, *Nocardia nova*, *Pseudomonas mendocina*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces albidoflavus*. Aucun des autres pathogènes testés par le test RT-PCR du SARS-CoV-2 (COVID-19) n'a produit de signal d'amplification détectable.

11.4. Précision

La précision du dosage du SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech a été déterminée par en testant répétitivement des acides nucléiques de SARS-CoV-2 représentant deux niveaux de charge virale, 5 (limite de détection) et 150 copies par réaction (0,25 et 7,5 copie/µL), seuls ou enrichis en ARN extrait à partir échantillons oropharyngés négatifs, en utilisant 3 lots de kits différents et en suivant les conditions de réaction de test typiques. La précision a été exprimée sous forme de Cq moyen, de Cq (coefficient de variation) et de % de détection des répétitions, comme décrit ci-dessous pour chaque cas. Les données sont reprises dans le tableau présenté à la fin de cette section.

11.4.1. Répétabilité

La répétabilité a été évaluée en analysant 48 répétitions de chaque échantillon (5 et 150 copies par réaction), soit un nombre final de 96 tests effectués.

11.4.2. Reproductibilité quotidienne

La reproductibilité quotidienne a été évaluée en analysant 120 répétitions de chaque échantillon (5 et 150 copies par réaction), pendant 5 jours avec 24 répétitions de chaque concentration par jour (240 tests au total).

11.4.3. Reproductibilité de lot à lot

La reproductibilité entre les lots a été évaluée en analysant 270 répétitions de chaque échantillon (5 et 150 copies par réaction) en utilisant 3 lots de kits différents avec 90 répétitions par lot.

11.4.4. Reproductibilité de l'opérateur

La reproductibilité de l'opérateur a été évaluée en testant 96 répétitions de chaque échantillon (5 et 150 copies par réaction), par 4 opérateurs différents, dans 48 tests au total.

11.4.5. Reproductibilités inter-appareil et intra-laboratoire

La reproductibilité inter-instruments a été mesurée en testant 36 répétitions de chaque échantillon (5 et 150 copies par réaction), avec 2 appareils de qPCR différents (Applied Biosystems® 7500 et Applied Biosystems® StepOnePlus), soit 72 tests au total par appareil.

Précision du SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech

VARIABLE TESTEE		SARS-CoV-2 (COPIES/REACTION)	
		5	150
REPETABILITE	n	48	48
	Cq moyen	34,61	30,82
	Coefficient de variation (%)	2,99	1,80
	% de détection des répétitions	100	100
REPRODUCTIBILITE QUOTIDIENNE	n	120	120
	Cq moyen	33,02	30,49
	Coefficient de variation (%)	4,21	4,95
	% de détection des répétitions	100	100
REPRODUCTIBILITE DE LOT A LOT	n	270	270
	Cq moyen	33,41	30,15
	Coefficient de variation (%)	4,35	4,33
	% de détection des répétitions	100	100
REPRODUCTIBILITE DE L'OPERATEUR	n	96	96
	Cq moyen	33,40	30,13
	Coefficient de variation (%)	4,76	3,73
	% de détection des répétitions	100	100
REPRODUCTIBILITE INTER-APPAREIL	n	72	72
	Cq moyen	33,44	29,98
	Coefficient de variation (%)	5,24	3,72
	% de détection des répétitions	100	100

11.5. Évaluation clinique

L'évaluation de la performance du SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech avec les échantillons cliniques respiratoires collectés a été réalisée dans deux laboratoires différents. Au total, 100 échantillons cliniques négatifs et 100 échantillons cliniques positifs ont été testés. Les données ont révélé qu'une concordance de 100% a été atteinte pour les 200 échantillons testés.

12. Contrôle qualité

Tous les composants du SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech sont testés en suivant les protocoles décrits ci-dessus. Le système PCR duplex en temps réel permet la détection des cibles décrites pour l'identification de l'ARNm du SARS-CoV-2 et de l'ARNm codant pour la RNase P (RP) humaine. Des amplifications positives sont observées pour les gènes cibles, le contrôle positif et les contrôles internes via les canaux FAM et JOE, selon les colorants rapporteurs des amorces/sonde respectifs.

13. Assistance technique

Pour obtenir une assistance technique, veuillez contacter notre équipe d'assistance technique dédiée par téléphone : +351 (0) 21 364 35 14 ou par e-mail: info@nzytech.com.

14. Marques déposées et avis de non-responsabilité

Toutes les marques déposées qui apparaissent dans ce manuel sont la propriété de leurs propriétaires respectifs.

15. Explication des symboles

IVD	Dispositif médical de diagnostic *in vitro*		Consulter le mode d'emploi
REF	Numéro de catalogue		Fabricant
LOT	Code du lot		À utiliser avant
	Limites de température		Suffisant pour
CONTROL +	Contrôle positif		Garder à l'abri des rayons du soleil (mélange d'amorce/sonde)
CONTROL –	Contrôle négatif		

16. Déclaration de conformité

Nom du produit : SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD

Numéro de catalogue : MD03201

Utilisation prévue : Détection qualitative du SARS-CoV-2.

Classification : Autre (qui ne sont pas couverts par l'annexe II ou non destiné à autodiagnostic) selon la Directive 98/79/CE.

Fabricant: NZYtech - Genes & Enzymes,

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar,

Edifício E, R/C,

1649-038, Lisboa,

Portugal

Nous, NZYtech, Lda – Genes & Enzymes, déclarons que ce produit, auquel se réfère cette déclaration de conformité, est conforme aux normes standard ISO 9001:2015 et ISO 13485:2016, conformément aux dispositions de la directive 98/79/CE et le règlement (UE) 2017/746 appliqué aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*, transposé dans les législations nationales des États membres de l'Union européenne.

Le dossier technique du produit est conservé chez NZYtech, Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal.

Joana Brás, PhD

Directeur Technique

17. Références

WHO: Clinical management of severe acute respiratory infection (SARI) when COVID-19 disease is suspected. 13 march 2020. Disponible en ligne à l'adresse : https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/clinical-management-of-novel-cov.pdf

WHO: Q&A: Influenza and COVID-19 - similarities and differences. 17 March 2020. Disponible en ligne à l'adresse : https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/q-a-similarities-and-differences-covid-19-and-influenza

Zhou, Peng; Yang, Xing-Lou; Wang, Xian-Guang; Hu, Ben; Zhang, Lei; Zhang, Wei et al. (2020): A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Dans Nature 579 (7798), pp. 270–273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.

Chhikara, B. S., Rathi, B., Singh, J., Poonam. (2020). Corona virus SARS-CoV-2 disease COVID-19: Infection, prevention and clinical advances of the prospective chemical drug therapeutics. Chem. Biol. 7(1) 63-72.

Gorbalenya, Alexander E.; Baker, Susan C.; Baric, Ralph S.; Groot, Raoul J. de; Drosten, Christian; Gulyaeva, Anastasia A. et al. (2020): Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses – a statement of the Coronavirus Study Group (14). bioRxiv 2020.02.07.937862; doi: https://doi.org/10.1101/2020.02.07.937862