SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD

Kit de RT-PCR des gènes RdRp et N du virus SARS-CoV-2 en une étape, diagnostic *in vitro*, IVD

Gènes de l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) et de la phosphoprotéine de nucléocapside (N) du virus SARS-CoV-2

REF MD04831, 96 réactions
MD04832, 4 x 96 réactions

Réservé au diagnostic* in vitro *par des professionnels

CE IVD

FR

Mode d'emploi

MD0483_IM_fr

VERSION 2401, Janvier 2023

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 de l'essai 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 5
   8.2. Exigences de manipulation et de procédure 5
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 6
10. Analyse des données 6
   10.1. Critères de validation des cycles 6
   10.2. Interprétation des résultats du test 6
11. Évaluation de performance 7
   11.1. Résultats attendus 7
   11.2. Limite de détection (LoD) - Sensibilité analytique 7
   11.3. Réactivité analytique (inclusivité) et spécificité analytique 8
   11.4. Précision 9
   11.4.1. Répétabilité 9
   11.4.2. Reproductibilité quotidienne 9
   11.4.3. Reproductibilité de lot à lot 9
   11.4.4. Reproductibilité de l'opérateur 9
   11.4.5. Reproductibilité inter-appareil 9
   11.5. Évaluation clinique 10
12. Contrôle qualité 10
13. Assistance technique 10
14. Marques déposées et avis de non-responsabilité 10
15. Explication des symboles 10
16. Déclaration de conformité 11
17. Références 12

1. Introduction

En décembre 2019, une nouvelle maladie respiratoire aiguë, appelée «Coronavirus Disease 2019» (COVID-19) pour 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 2 du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère]. 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 virus 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 virus SARS-CoV-2 est essentielle pour 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 d'organes et la mort. En l'état actuel des connaissances, une part importante des infections par le virus 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 (60 ans et plus), les fumeurs et les personnes atteintes de maladies chroniques telles que les maladies cardiaques ou pulmonaires, le cancer, le diabète et les patients dont le système immunitaire est affaibli. Il n'y a actuellement aucun traitement ni vaccin disponible contre l'infection par le virus SARS-CoV-2.

2. Usage prévu

Le SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD de NZYtech est un test moléculaire conçu pour la détection qualitative rapide des acides nucléiques du virus SARS-CoV-2 dans les prélèvements par écouvillonnage nasopharyngé ou oropharyngé des patients. Un résultat positif indiquent la présence d'ARN du virus SARS-Cov-2, mais une corrélation clinique avec les antécédents médicaux et les autres informations diagnostiques du patient est nécessaire pour déterminer son statut infectieux. Les résultats négatifs n'excluent pas l'infection par le virus SARS-CoV-2 et ne doivent pas être utilisés comme base unique pour les décisions de prise en charge des patients. L'utilisation de ce kit est réservée au personnel de laboratoire qualifié et spécifiquement formé aux techniques de la PCR en temps réel et aux diagnostics *in vitro*.

3. Principes de l'essai

Le SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD de NZYtech fournit le jeu complet de réactifs et de sondes pour détecter qualitativement le génome du virus SARS-CoV-2, via des plates-formes courantes de PCR en temps réel (voir les spécifications requises pour l'instrument dans le **Chapitre 6.**). Les gènes de l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) et de la phosphoprotéine de nucléocapside (N) du virus SARS-CoV-2 ont été précédemment identifiés comme étant des marqueurs très spécifiques. Ce kit de NZYtech cible des régions spécifiques dans les gènes RdRp et N du génome du virus SARS-CoV-2 pour fournir la sensibilité de détection la plus élevée. Les amorces et les sondes du kit SARS-CoV-2 présentent 100% d'homologie avec plus de 95% des 5M de séquences génomiques disponibles sur la base de données GISAID, à la date du mois de novembre 2021, y compris une identité complète avec les variants Delta (B.1.617.2) et Omicron (B.1.1.529). De plus, les amorces et les sondes ciblant le virus SARS-CoV-2 ne présentent aucune homologie significative avec des génomes non apparentés, ce qui rend ce test extrêmement spécifique car il n'y a pas de réactivité croisée avec les acides nucléiques des autres virus et bactéries respiratoires. 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. Le contrôle positif est constitué de fragments d'acide nucléique contenant les trois séquences cibles détectées par le kit (gènes RdRp et N du virus SARS-CoV-2, et gène RP humain). L'évolution naturelle du virus SARS-CoV-2 implique que de nouvelles informations sur les séquences seront disponibles après la conception initiale de ce kit, qui reflète les stratégies d'adaptation du virus SARS-CoV-2. Par conséquent, NZYtech examinera périodiquement les cibles génomiques du virus SARS-CoV-2 et, si nécessaire, lancera de nouvelles versions de ce kit.

La détection qualitative de l'ARN est basée sur la technologie de RT-PCR en temps réel et en une étape, car elle reste la méthode plus sensible pour effectuer une détection précise du virus SARS-CoV-2. Le principe du SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD de NZYtech, consiste en l'utilisation d'ARN viral isolé et purifié par un système d'extraction (IVD), celui-ci étant rétro transcrit (RT) en ADNc puis amplifié par PCR, en une seule réaction, à l'aide de trois jeux d'oligonucléotides/sondes hautement spécifiques basés sur le principe TaqMan®. Alternativement, les échantillons lorsqu'ils sont collectés dans un milieu de transport spécifique (voir la collecte et la préparation des échantillons à la **Chapitre 7.**) peuvent être utilisés directement dans la réaction RT-PCR après traitement thermique. En présence d'ARN viral, les sondes TaqMan® se lient spécifiquement aux régions conservées des gènes SARS-CoV-2 RdRp et N, qui sont flanquées de deux paires d'oligonucléotides également spécifiques. Un troisième ensemble d'oligonucléotides/sonde fonctionne comme un contrôle interne, détectant une séquence d'acide nucléique du gène de la RNAse P (RP) humaine, ce qui nous permet de confirmer l'efficacité du processus d'extraction du matériel biologique prélevé chez le patient. De plus, ce contrôle interne démontre que la réaction n'a pas été inhibée par des inhibiteurs de la PCR qui pourraient être présents dans les échantillons cliniques/environnementaux. Pour permettre d'identifier l'amplification des trois cibles spécifiques en une seule réaction, les sondes spécifiques du virus SARS-CoV-2 et de la RNase P humaine sont marquées différemment avec les colorants rapporteurs FAM™ et JOE™, respectivement. Notez que ce panel contient un essai duplex dans le même canal optique que FAM pour rapporter une performance cumulée des deux essais PCR pour la détection du SARS-Cov-2. De plus, 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 du jeu d'amorces/sondes utilisé pour détecter le virus SARS-CoV-2.

4. Composition du kit

Le SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD de NZYtech fournit un set complet de réactifs en quantité suffisante pour effectuer 96 réactions de RT-PCR en une seule étape.

COMPOSANTS DU KIT		VOLUME (PAR FLACON)	NOMBRE DE TUBES	
			MD04831	MD04832
SARS-CoV-2 MMix (RdRp & N)	Mélange principal NZYSupreme pour la RT-qPCR en une étape	1050 µL	1	4
SARS-CoV-2 PPMix (RdRp & N)	Mélange d'amorces/sondes pour SARS-CoV-2 (gènes RdRp et N)/RP	205 µL	1	4
SARS-CoV-2 Pos (RdRp & N)	Contrôle positif pour SARS-CoV-2 (gènes RdRp et N)/RP (1 x 10^4 copies/µL)	105 µL	1	4
NTC	No-template Control	105 µL	1	4

5. Stockage, stabilité et conditions de manipulation

Le SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, 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 reconditionnant et en stockant les composants en aliquotes de travail. Si nécessaire, les composants du kit peuvent être conditionnés en aliquots de plus petits volumes après leur décongélation.
- Le mélange d'amorces/sonde pour SARS-CoV-2(RdRp et N)/RP doit être conservé à l'abri de la lumière. En particulier, n'exposez pas le mélange principal NZYSupreme pour la RT-qPCR en une étape aux rayons directs du soleil après l'avoir mélangé avec le mélange d'amorces/de sondes.
- Veuillez contacter NZYtech si l'emballage protecteur du kit arrive endommagé.
- Faites attention à la date d'expiration indiquée sur l'emballage. NZYtech déconseille 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

- Équipement de PCR en temps réel avec détection des fluorophores FAM™ et JOE™ (à des 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, film adhésif.
- Pipettes et embouts de filtre (sans RNase/DNase).
- Gants jetables.
- Vortex et centrifugeuse.
- Eau DEPC (veuillez contacter NZYtech pour acheter le produit d'eau traitée DEPC, référence : MB43701).

7. Collecte et préparation de l'échantillon

Différents facteurs, tels que le protocole de collecte d'échantillons à partir de prélèvements respiratoires humains (écouvillons pour prélèvement nasopharyngé ou oropharyngé), le transport des échantillons, le temps de stockage et de traitement, sont essentiels pour obtenir les meilleurs résultats. Les échantillons collectés doivent être testés dès que possible. Les échantillons qui ne sont pas testés dans les 24 heures doivent être conservés entre -85 °C et -15 °C. De plus, ils doivent être transportés et stockés à basse température conformément aux réglementations de biosécurité.

- **Échantillons biologiques soumis à extraction d'acides nucléiques:** les ARN ou acides nucléiques totaux, extraits selon un protocole IVD, constituent le matériel de départ du dosage à l'aide du SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD. Veuillez-vous assurer que les échantillons d'ARN conviennent en termes de pureté, de concentration et d'intégrité des acides nucléiques. Une valeur d'environ 2 pour le rapport d'absorbance à 260 à 280 nm (A260/280) est généralement indicative d'ARN pur. L'éthanol étant un puissant inhibiteur de la PCR en temps réel, il est nécessaire d'éliminer complètement ce composant avant l'élution des acides nucléiques lors du processus d'extraction. Le kit NZYtech contient un contrôle interne qui cible l'ARN humain co-purifié avec l'ARN viral. L'ARN humain est amplifié avec l'ensemble oligonucléotide/sonde du gène RNase P (RP). L'introduction du contrôle interne est utile pour évaluer l'efficacité de l'extraction et de l'isolement de l'ARN et/ou pour détecter la présence d'inhibiteurs potentiels pendant le traitement de l'échantillon.

- **Échantillons biologiques utilisés directement dans le protocole RT-PCR:** les échantillons nasopharyngés doivent être prélevés à l'aide d'écouvillons Greiner Bio-One (référence CM-FS913) et placés directement dans le milieu de transport et de stockage VACUETTE®, Greiner Bio-One Virus Stabilization Tube One (référence 456161). Pipeter des aliquotes de 50 µL de chaque échantillon, transférer dans des plaques PCR 96 puits qui doivent être scellées et effectuer immédiatement une étape de traitement thermique à 95 °C pendant 5 minutes à l'aide d'un thermocycleur à couvercle chauffant. Alternativement, pipettez des aliquotes de 200 µL et inactivez-les dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL à l'aide d'un bloc chauffant.

8. Précautions et mises en garde

Comme dans toute procédure de test analytique, les bonnes pratiques de laboratoire sont essentielles. 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 de l'essai ou produire 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 PCR. Le protocole de RT-PCR directe a été validé exclusivement pour les échantillons nasopharyngés transportés et conservés en VACUETTE® Medium, Virus Stabilization Tube (Greiner Bio-One, référence 456161). Ainsi, le protocole de RT-PCR directe du SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD, n'a pas été validé dans les échantillons transportés et stockés dans des milieux de collecte de type « VTM/UTM » contenant du thiocyanate de guanidine comme agent d'inactivation), nous vous recommandons donc d'utiliser uniquement le milieu de transport et de stockage mentionné ci-dessus. L'utilisation d'autres moyens

de transport peut entraîner des résultats faussement négatifs. Si un autre milieu de prélèvement est utilisé, le kit doit être validé par l'utilisateur à partir d'échantillons préalablement caractérisés (positifs et négatifs).

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 effectuée 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 le scellage du kit est endommagé.
- N'intervertissez 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 différentes zones de travail.
- Le contrôle positif contient un nombre élevé de copies à amplifier. 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 le NTC fournie dans le kit.
- En cas d'utilisation du protocole direct, il est recommandé d'effectuer un second contrôle négatif avec de l'eau DEPC (référence NZYtech MB43701) qui sera ajoutée aux échantillons à tester par RT-PCR directe.
- 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 l'essai. Attention, toutes les étapes de pipetage et la préparation 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 pendant 5 secondes pour regrouper leur contenu au fond du tube et placez les tubes sur de la glace. **Nous recommandons vivement de pipeter le contrôle positif SARS-CoV-2 (gènes RdRp et N)/RP en dernier pour éviter la contamination.**

9.1. Mise en place de la réaction

1. Préparez un volume suffisant de mélange de RT-PCR pour le nombre de tests SARS-CoV-2/RNase P à effectuer avec 5% de volume supplémentaire pour compenser 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	VOLUME POUR 1 TEST (µL)	VOLUME POUR *n* TESTS (*) + 5% (µL)
SARS-CoV-2 MMix	10	*n* x 10,5
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 essai, 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 puit individuel selon l'organisation de votre plaque expérimentale pour la PCR en temps réel.
3. Pour le contrôle négatif, ajoutez 8 µL de NTC au puits de contrôle négatif à la place de l'échantillon d'ARN. Le volume final doit être de 20 µL. Si le protocole RT-PCR direct est utilisé, un deuxième contrôle négatif doit être inclus, en ajoutant 8 µL d'eau DEPC (NZYtech, référence: MB43701) à la place de l'échantillon biologique non extrait.
4. a. Pour les **échantillons biologiques extraits**, ajoutez 8 µL de chaque échantillon d'ARN aux puits de dosage SARS-CoV-2 (RdRp & N)/RNase P selon la configuration de test de la plaque. Le volume final doit être de 20 µL.

b. Pour les **échantillons biologiques non extraits**, après traitement thermique à 95 °C pendant 5 minutes, ajouter 4 µL de chaque échantillon dans les puits relatifs au test SARS-CoV-2 (RdRp &N)/RNase P, selon la configuration de test de la plaque. A chaque échantillon ajouter 4 µL d'eau DEPC pour obtenir le volume final qui devrait être de 20 µL. Ne pas dépasser un volume d'échantillon de 4 µL.

5. Pour le contrôle positif, ajouter 8 µL de SARS-CoV-2 Pos (RdRp et N) au lieu de la matrice d'ARN dans le puits de contrôle positif. Le volume final doit être de 20 µL.

6. Recouvrez et scellez la plaque avec un film adhésif avec les propriétés optiques appropriées 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 qui a été 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 pour les cycles 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*

******Selon l'équipement utilisé, sélectionnez le canal de détection approprié.*

Colorants fluorescents et canaux de détection

CIBLE	COLORANT FLUORESCENT	CANAUX DE DETECTION
SARS-CoV-2	FAM™	FAM
RNase P	JOE™	JOE, VIC ou HEX

Le SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD de NZYtech a été validé pour les systèmes de PCR en temps réel suivants : Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® StepOnePlus, Roche Life Science LightCycler 480 instrument II, Applied Biosystems® QuantStudio 6 Pro, Qiagen Rotor-Gene Q 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 des cycles

La détection de l'ARN du virus SARS-CoV-2 est réalisée en détectant deux régions génomiques cibles, qui sont toutes deux détectées dans le même canal de fluorescence (FAM). L'analyse des données est effectuée par le logiciel de l'appareil. Compte tenu des différences de performances entre les différents appareils de PCR en temps réel, les seuils pour les deux signaux de fluorescence (FAM™ et JOE™) sont déterminés automatiquement par le logiciel avec des ajustements manuels si cela s'avère nécessaire. 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 eu les résultats escomptés, selon les critères suivants :

Contrôle positif : les courbes d'amplification de FAM™ (gènes RdRp et N de SARS-CoV-2) et JOE™ (RP) sont positives. Le contrôle positif devrait s'amplifier à un Ct < 30, à la fois dans les canaux FAM et JOE. Le non-respect de ce critère de contrôle qualité indique clairement que l'expérience a été compromise.

Contrôle négatif (aucune réaction avec des copies cibles) : 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. Nous recommandons d'effectuer une décontamination des zones de travail du laboratoire ainsi que les équipements et matériel associé. Effectuez à nouveau le test en suivant les bonnes pratiques de la RT-PCR avec un tout nouveau kit scellé.

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, l'essai a été compromis ou mal exécuté, et il doit être considéré comme **invalide**. **Veuillez effectuer à nouveau le test.**

Si le problème persiste, contactez le fabricant.

10.2. Interprétation des résultats du test

Le virus SARS-CoV-2 est détecté si la courbe d'amplification de FAM™ affiche une forme sigmoïde avec un Ct≤35, quel que soit le résultat obtenu pour l'essai RP (JOE™).

Le virus SARS-CoV-2 n'est pas détecté si la courbe de FAM™ n'est pas positive (Ct > 35) tandis que l'essai RP (JOE™) donne une courbe sigmoïdale positive (Ct < 40).

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

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 ≤ 35)	+ (Ct < 40)	SARS-CoV-2 détecté →RÉSULTAT POSITIF
+ (Ct ≤ 35)	- (Ct >40)	SARS-CoV-2 détecté →RÉSULTAT POSITIF
- (Ct > 35)	+ (Ct < 40)	SARS-CoV-2 non détecté → RÉSULTAT NÉGATIF
- (Ct > 35)	- (Ct >40)	Test non valide. Répétez l'extraction et effectuez à nouveau le test

Remarque 1 : *NZYtech recommande de répéter l'analyse pour tous les échantillons présentant une courbe ambiguë ou atypique qui ne permet pas une interprétation claire.*

Remarque 2 : *L'interprétation des résultats doit tenir compte de la possibilité de résultats faux négatifs et faux positifs.*

- Bien que le risque de résultats faux négatifs soit réduit dû à la conception à double cible du présent test, 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 plate-forme 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 du virus SARS-CoV-2.
  - La manipulation inappropriée du contrôle positif SARS-CoV-2 Pos (RdRp et N)
  - La manipulation inappropriée du produit amplifié (plaque après l'amplification).

Les résultats négatifs n'excluent pas l'infection par le virus SARS-CoV-2 et ne doivent pas être utilisés comme base unique pour le traitement ou les autres décisions de prise en charge des patients. De plus, ce test ne peut pas exclure les maladies causées par d'autres agents pathogènes bactériens ou viraux.

11. Évaluation de performance

L'évaluation des performances du SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD de NZYtech a été réalisée sur les systèmes de PCR en temps réel Applied Biosystems® 7500 FAST, Roche Life Science LightCycler 480 instrument II, Applied Biosystems® QuantStudio 6 Pro, Qiagen Rotor-Gene Q et Bio-Rad® CFX96™, avec des tests supplémentaires effectués 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

Les graphiques d'une amplification typique, observée pour un échantillon contenant des acides nucléiques du virus SARS-CoV-2, sont présentés à la Figure 1. Les deux exemples représentent des échantillons cliniques présentant des charges moyennes (A) et élevées (B) du virus SARS-CoV-2. En cas de charges très élevées du virus SARS-CoV-2 (voir Figure 1B), la courbe du canal JOE, correspondant à l'amplification du gène RNase P humain, peut être absente ou présenter une forme atypique.

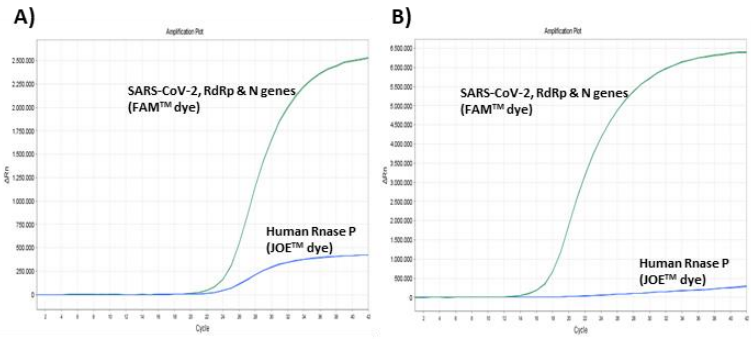

Figure 1. Détection simultanée des cibles SARS-CoV-2 (RdRp et N) et RNase-P humaine dans des échantillons cliniques positifs avec des charges moyenne (A) et élevée (B) de virus SARS-CoV-2. Courbes vertes (A et B) : détection des cibles ARN du virus SARS-CoV-2 (gènes RdRp et N) via le canal FAM ; courbes bleues (A et B) : détection du gène de la RNase P humaine via le canal JOE*. *(*VIC/HEX alternative*)

11.2. Limite de détection (LoD) - 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%. Cela a été évalué en testant les acides nucléiques du virus SARS-CoV-2 à différents nombres de copie, seuls ou enrichis en ARN extrait de prélèvements oropharyngés négatifs, en utilisant 3 différents lots de kits et en suivant les conditions de réaction de test typiques. Les tests ont été répétés pendant 4 jours, produisant 48 répétitions pour chaque concentration de virus SARS-CoV-2 testée. Ensemble, les

données ont révélé que le SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD de NZYtech détecte 0,15 copies d'ARN du virus SARS-CoV-2/µL avec une confiance ≥ 95%. Ainsi, la limite de détection (LoD) provisoire a été fixée à 0,15 copie/µL ou 150 copies/ml. La LoD provisoire a été confirmée par 2 opérateurs différents utilisant 3 lots de kit dans une expérience avec un total de 48 répétitions de matrice provenant de l'écouvillon oropharyngé négatif enrichi indépendamment. La capacité du SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD de NZYtech à détecter le virus à différentes charges virales (de 5 x 10^6 à 5 copies par réaction) est présentée dans la Figure 2.

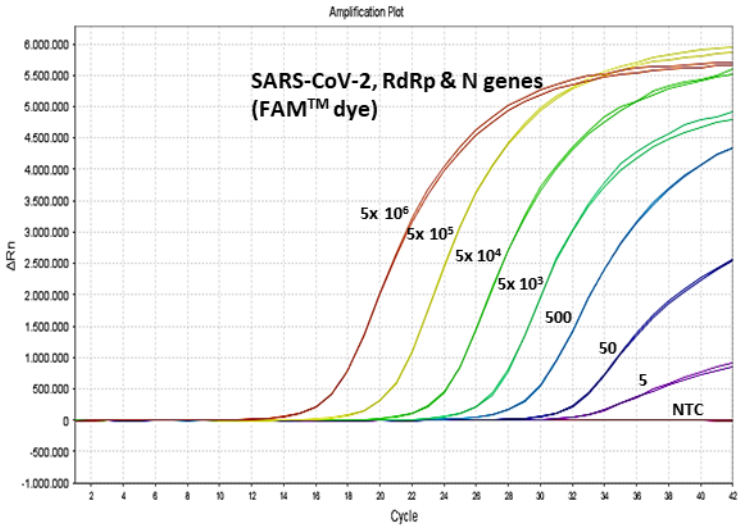

Figure 2. Sensibilité du SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD. Courbes d'amplification (nombre de cycles *en fonction de* la fluorescence - ΔRN) de dilutions en série à 1:10 de l'ARNv du SARS-CoV-2, de 5 x 10^6 copies à 5 copies par réaction via le canal FAM. NTC: « No Template Control » (contrôle négatif).

Pour les échantillons n'ayant pas fait l'objet d'un protocole d'extraction d'acides nucléiques préalable et simplement prélevés dans le milieu de collecte susvisé, la sensibilité analytique a été, dans un premier temps, évaluée en comparant les valeurs de Ct d'échantillons cliniques soumis ou non au procédé d'extraction. Ainsi, l'ARN de 50 échantillons cliniques préalablement confirmés positifs a été extrait et utilisé pour la détection du SARS-CoV-2 par comparaison avec le test effectué directement avec l'échantillon non extrait, uniquement dans le milieu de culture. Sur le total de 50 échantillons cliniques positifs testés (avec le protocole direct ou soumis à une extraction préalable) le Ct minimum observé était de 16,1 et le Ct maximum était de 34,9. Les résultats ont indiqué que pour la détection du SARS-CoV-2, la différence moyenne de Cts entre les deux procédures était de 0,1. Cette proximité des valeurs suggère que la LoD ne change pas que l'échantillon ait été soumis ou non à un protocole d'extraction d'ARN préalable. Ainsi, la LoD du kit lorsqu'il est détecté sans extraction préalable des acides nucléiques a été réévaluée et confirmée par deux opérateurs différents dans un test de 48 tests. Les résultats ont confirmé que le kit détecte 0,15 copies/µL d'ARN viral du SARS-CoV-2 avec une confiance ≥ 95% lorsqu'il est utilisé dans le format de test direct.

11.3. Réactivité analytique (inclusivité) et spécificité analytique

L'inclusivité et la réactivité croisée ont été évaluées par une analyse *in silico* de sondes et d'amorces d'oligonucléotides contre des agents pathogènes liés au SARS-CoV-2 et des agents pathogènes normaux qui provoquent une infection avec des symptômes similaires, respectivement. Lors de l'analyse *in silico*, la conception de l'essai s'est avérée détecter toutes les souches du virus SARS-CoV-2 et n'a montré aucune réactivité avec les espèces non-SARS-CoV-2.

Une analyse *in vitro* de la réactivité croisée (exclusivité) a été réalisée pour confirmer que le SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD (MD0483) ne réagit pas avec d'autres organismes de la flore humaine et pathogènes que l'on peut rencontrer dans l'échantillon clinique.

Cette étude a été réalisée en utilisant trois panels commerciaux de pathogènes respiratoires provenant de ZeptoMetrix Multimarker Controls (#MDZ001), NATtrol™ Respiratory Pathogen Panel-1 (#NATRPP-1) and NATtrol™ RP Controls, (#NATRPC-NNS). Ces panels qui comprennent des sondages d'échantillons sont représentatifs des véritables échantillons cliniques humains, y compris la grippe A H3N2 (Brisbane/10/07), la grippe A H1N1 (NY02/2009), le Rhinovirus de type 1A, l'Adenovirus de type 3; Parainfluenza Type 1, Parainfluenza Type 2, Parainfluenza Type 3, Parainfluenza Type 4, Metapneumovirus (Peru 6-2003), *Chlamydophila pneumoniae* (CWL-029), *Mycoplasma pneumoniae* (M-129), Coxsackievirus (Type A1), Grippe A H1N1 (A/New Cal/20/99), Influenza A H1N1 (A/Singapore/63/04), Grippe B (B/Florida/02/06), Virus respiratoire syncytial A, Virus respiratoire syncytial B (CH93 (18)-18), Coronavirus (HKU-1 recombinant), Coronavirus (OC43), Coronavirus (NL63), Coronavirus (229E), *Bordetella. pertussis* (A639), *Bordetella pertussis* (A747), *Bordetella holmesii* (F061), *Legionella pneumophila* (Philadelphia) et Bocavirus humain. De plus, d'autres microbes communs des voies orales et respiratoires, 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,* ont également été testés. Aucun des organismes testés n'a interféré avec les performances du SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD en générant un résultat faussement positif ou un signal non spécifique.

L'impact de 17 substances potentiellement interférentes a été évalué dans des tests consistant en des échantillons nasopharyngés négatifs enrichis d'échantillons positifs pour le SARS-CoV-2 à ~3x LoD. Des substances potentiellement interférentes ont été ajoutées aux échantillons artificiels à des concentrations représentant les niveaux les plus élevés attendus dans les échantillons de patients respiratoires humains sur la base des données de la littérature. Tous les tests ont été effectués en quintuple et les résultats ont été comparés aux données obtenues avec un test de contrôle qui ne contenait pas d'interférents. Aux concentrations testées, les résultats ont révélé qu'aucune des molécules testées

n'affectait la sensibilité de la détection. Le tableau ci-dessous résume les données recueillies dans le cadre de ces expériences. Toutes les expériences ont été réalisées sur l'instrument de PCR en temps réel Applied Biosystems® 7500 FAST.

INTERFÉRENT POTENTIEL	INGRÉDIENT ACTIF	CONCENTRATION FINALE DE L'ÉCHANTILLON	INTERFÉRENCE OUI (O) OU NON (N)
Eau de mer isotonique (Rhinomer)	NaCl	15% v/v	N
Spray pour la gorge, anesthésique oral et analgésique (Strepfen)	Flurbiprofène	5% v/v	N
Solution de lavage nasal (spray antiallergique – Vibrocil)	Propionate de fluticasone	5% v/v	N
Corticostéröides nasaux en spray (Nasomet)	Furoate de mométasone	5% v/v	N
Corticostéröides nasaux en spray (Pulmicort)	Budesonide	5% v/v	N
Antimicrobien, systémique (Trobex)	Tobramycine	10 µg/mL	N
Analgésique, anti-inflammatoire et antiseptique buccal (Pyralvex)	Extrait de rhubarbe, acide salicylique	5% v/v	N
Topique oralpharyngé, antifongique et antibactérien (Daktarin)	Miconazole	5 mg/mL	N
Bain de bouche solution antiseptique (Eludril Gé)	Gluconate de clorhexidine, Chlorobutanol hémihydraté	5% v/v	N
Antitussif, sirop (Codipront)	Codéine, citrate de phényltoloxamine	5% v/v	N
Sang total (humain)	-	4% v/v	N
Médicament antiviral (Tamiflu)	Oseltamivir	7,5 mg/mL	N
Mucolytique (Mucosolvan)	Clorhydrate d'ambroxol	5% v/v	N
Solution de gouttes nasales (Nasarox)	Clorhydrate d'oxymétazoline	10% v/v	N
Antibiotique, pommade nasale (Bactroban)	Mupirocine	5 mg/mL	N
Salive (humaine)	-	25% v/v	N
Éthanol absolu	Alcool	5% v/v	N

11.4. Précision

La précision de l'essai du SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD de NZYtech a été déterminée par en testant répétitivement des acides nucléiques du virus SARS-CoV-2 représentant deux niveaux de charge virale, 5 (1,67 x LoD) et 150 (50x LoD) copies par réaction (0,25 et 0,75 copie/µL), seuls ou enrichis en ARN extrait à partir prélèvements oropharyngés négatifs, en utilisant 3 lots de kits différents et en suivant les conditions de réaction de test typiques. La précision a été évaluée en mesurant le Cq moyen, le coefficient de variation (en %) et le % de détection des répétitions, comme décrit ci-dessous pour chaque cas. Les données sont reprises dans le tableau présenté à la page suivante.

11.4.1. Répétabilité

La répétabilité a été évaluée par un seul opérateur en analysant 36 répétitions de chaque échantillon (5 et 150 copies par réaction), soit un nombre final de 72 tests effectués.

11.4.2. Reproductibilité quotidienne

La reproductibilité quotidienne a été évaluée en analysant 72 répétitions de chaque échantillon (5 et 150 copies par réaction), pendant 4 jours avec 18 répétitions de chaque concentration par jour (144 essais au total ont été effectués).

11.4.3. Reproductibilité de lot à lot

La reproductibilité entre les lots a été évaluée par un seul opérateur par l'analyse de 144 répétitions de chaque échantillon (5 et 150 copies par réaction) en utilisant 3 lots de kits différents avec 48 répétitions par lot.

11.4.4. Reproductibilité de l'opérateur

La reproductibilité de l'opérateur a été évaluée en testant 72 répétitions de chaque échantillon (5 et 150 copies par réaction), par 4 opérateurs différents, avec 36 répétitions par opérateur.

11.4.5. Reproductibilité inter-appareil

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

Précision du SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD

VARIABLE TESTEE		SARS-CoV-2 (COPIES/REACTION)	
		5	150
REPETABILITE	n	36	36
	Cq moyen	31,72	26,30
	Coefficient de variation (%)	1,94	1,60
	% de détection des répétitions	100	100
REPRODUCTIBILITE QUOTIDIENNE	n	72	72
	Cq moyen	31,42	26,13
	Coefficient de variation (%)	1,50	1,55
	% de détection des répétitions	100	100

REPRODUCTIBILITE DE LOT A LOT	n	144	144
	Cq moyen	31,49	26,24
	Coefficient de variation (%)	1,61	1,46
	% de détection des répétitions	100	100
REPRODUCTIBILITE DE L'OPERATEUR	n	72	72
	Cq moyen	31,45	26,21
	Coefficient de variation (%)	1,41	1,61
	% de détection des répétitions	100	100
REPRODUCTIBILITE INTER-APPAREIL	n	72	72
	Cq moyen	31,81	26,46
	Coefficient de variation (%)	1,61	1,35
	% de détection des répétitions	100	100

11.5. Évaluation clinique

L'évaluation des performances du SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD de NZYtech, a été réalisée à partir d'échantillons extraits d'écouvillons nasopharyngés et a été réalisée dans trois laboratoires de test externes. Au total, 340 échantillons cliniques négatifs et 386 échantillons cliniques positifs ont été testés. Les résultats ont révélé une concordance de 100% pour les échantillons positifs et négatifs analysés. L'évaluation des performances du SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD de NZYtech, a également été réalisée à partir d'échantillons d'écouvillons nasopharyngés non soumis à un protocole d'extraction d'acide nucléique préalable. Au total, 104 échantillons cliniques négatifs et 51 échantillons cliniques positifs ont été testés. Les résultats ont révélé une concordance de 100% pour les échantillons positifs et négatifs analysés.

12. Contrôle qualité

Tous les composants du SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD de NZYtech sont testés en suivant les protocoles décrits ci-dessus. Le système de PCR triplex en temps réel permet la détection des cibles décrites pour l'identification de l'ARNm du virus SARS-CoV-2 (gènes RdRp et N) et de l'ARNm humain (gène de la RNase P, RP). 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/des sondes respectifs.

13. Assistance technique

Pour obtenir une assistance technique, veuillez contacter notre équipe d'assistance technique dédiée par téléphone au +351 (0) 21 364 35 14 ou par e-mail à 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	Σ	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, RdRp and N target genes, IVD

Numéro de catalogue : MD04831/MD04832

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

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