

COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD

Kit RT-qPCR Multiplex en une étape COVID-19, Grippe A/B,
VRS (IVD)

REF

MD04901, 96 réactions
MD04902, 4 x 96 réactions
MD04903, 2 x barrettes de 8 puits, profil haut

Pour un usage professionnel de diagnostic in vitro uniquement



FR

Mode d'emploi

MD0490_IM_fr

VERSION 2401, janvier 2024



Sommaire

1. Introduction	3
2. Utilisation prévue.....	3
3. Principes du test.....	3
4. Composition du kit.....	4
5. Conditions de stockage, de stabilité et de manipulation.....	4
6. Matériels et instruments requis mais non fournis.....	4
7. Prélèvement et préparation des échantillons	5
8. Précautions et mises en garde	5
8.1. Informations relatives à la sécurité.....	5
8.2. Exigences en matière de manipulation et de procédure.....	5
9. Procédure de test.....	5
9.1. Configuration de la réaction	6
9.2. Programmation de l'instrument de PCR en temps réel.....	6
10. Analyse des données.....	7
10.1. Critères de validation du test.....	7
10.2. Interprétation des résultats des tests.....	7
11. Évaluation des performances	8
11.1. Résultats attendus	8
11.2. Limite de détection (LD) - Sensibilité analytique	8
11.3. Réactivité analytique (inclusivité) et spécificité analytique.....	9
11.4. Précision.....	10
11.4.1. Répétabilité.....	10
11.4.2. Reproductibilité quotidienne	10
11.4.3. Reproductibilité lot à lot	10
11.4.4. Reproductibilité de l'opérateur	10
11.4.5. Reproductibilité inter-instruments	10
11.5. Évaluation clinique.....	12
12. Contrôle qualité	12
13. Assistance technique	12
14. Marques déposées et avis de non-responsabilité	12
15. Explication des symboles	13
16. Déclaration de conformité.....	14
17. Références	15

1. Introduction

La pandémie actuelle de coronavirus (COVID-19), identifiée pour la première fois en Chine et qui s'est propagée rapidement dans la plupart des pays, a provoqué une morbidité et une mortalité d'une ampleur sans précédent dans le monde, ce qui a entraîné des crises sanitaires mondiales et une mise à l'épreuve des ressources sanitaires. L'agent responsable du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2, *par l'acronyme en anglais*) est un nouveau *Bétacoronavirus* présentant une similitude phylogénétique avec le SARS-CoV. La grippe saisonnière est une infection virale contagieuse des voies respiratoires qui constitue une cause majeure de morbidité, de mortalité et de charge pour les services de santé dans le monde. Toutefois, son taux de létalité est beaucoup plus faible que celui de la COVID-19. Les types A et B de la grippe (Influenza) sont les types dominants de virus grippaux en circulation, la plupart des épidémies de grippe étant liées au type A. La transmission zoonotique de la grippe aviaire ou porcine directement à l'homme, ainsi que la transmission de virus réassorti ont provoqué des pandémies humaines intermittentes notables au cours des dernières décennies. Les infections par le virus de l'influenza de type B sont généralement limitées à l'homme et provoquent moins fréquemment des épidémies. Le virus respiratoire syncytial humain (RSV, *par l'acronyme en anglais*) est le pathogène respiratoire viral pédiatrique le plus important au monde. Le RSV est un pneumovirus de la famille des paramyxovirus. Cet agent ubiquitaire extrêmement infectieux apparaît chaque année lors d'épidémies saisonnières et presque toutes les personnes sont infectées au moins une fois au cours des deux premières années de leur vie. Le RSV est responsable d'une morbidité et d'une mortalité considérables et il n'existe pas de vaccin approuvé ni de traitement antiviral efficace. Un diagnostic et un isolement rapides sont nécessaires pour éviter la transmission nosocomiale et administrer un traitement approprié.

Les infections respiratoires peuvent « agir en synergie », ce qui signifie que les interactions potentielles entre le SARS-CoV-2 et d'autres virus respiratoires pourraient accroître la gravité de la maladie. Tous ces virus sont très contagieux et se transmettent par contact, par les gouttelettes respiratoires (toux et éternuements) et par contamination des surfaces. La COVID-19 peut être cliniquement confondue avec une pneumonie causée par RSV ou par le virus de la grippe et la co-infection peut entraîner un mauvais pronostic. Par ailleurs, la circulation plus large d'autres virus respiratoires pourra exercer des pressions de sélection sur le SARS-CoV-2 et pourrait conduire à l'émergence de nouveaux variants plus préoccupants. Une action est donc indispensable pour empêcher un « triple mélange mortel » de COVID-19, de grippe et de RSV. Les infections par la COVID-19, la grippe et le RSV sont souvent difficiles à différencier sur la base des seuls symptômes et chacun de ces virus est très contagieux. Alors que la saison de la grippe va commencer, il serait intéressant de tester les maladies respiratoires courantes, en plus du COVID-19.

La détection précoce des virus du SARS-CoV-2, du RSV et de l'influenza de type A et B est essentielle pour administrer un traitement rapide aux patients atteints de maladies respiratoires et pour réduire ainsi la propagation des infections. Les tests combinés pour la COVID-19, RSV et la grippe seront bénéfiques, car un seul échantillon pourrait être utilisé pour dépister les trois infections chez des patients présentant des symptômes similaires, ce qui apporterait une solution pour gérer les patients souffrant d'un syndrome grippal.

2. Utilisation prévue

Le COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, de NZYtech est un test moléculaire conçu pour une détection qualitative rapide des agents responsables de la COVID-19, du RSV (sous-types A et B) et de l'influenza (types A et B) dans des échantillons biologiques humains. Toutefois, ce kit ne distingue pas l'influenza de type A de l'influenza de type B, car ils sont tous deux détectés dans le même canal de fluorescence FAM™. De plus, d'autres *bétacoronavirus* ou d'autres virus de la grippe, par exemple le virus influenza de type C, ne sont pas détectés par ce kit. Ce test est destiné à être utilisé comme dépistage primaire du SARS-CoV-2, de la grippe A/B et du RSV, en association avec des facteurs de risque cliniques et épidémiologiques. Un résultat positif indique la présence d'ARN viral du SARS-CoV-2 et/ou de l'influenza A/B et/ou du RSV, bien qu'une corrélation clinique avec les antécédents du patient et d'autres informations diagnostiques soit nécessaire pour déterminer son statut d'infection. Les résultats négatifs n'excluent pas l'infection et, par conséquent, les résultats du test ne doivent pas être utilisés comme une base unique pour les décisions relatives à la prise en charge du patient. Ce kit est destiné à être utilisé par un personnel de laboratoire qualifié, spécifiquement formé aux techniques de PCR en temps réel et aux diagnostics *in vitro*.

3. Principes du test

Le COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, de NZYtech fournit un ensemble complet de réactifs et de sondes pour détecter qualitativement les génomes du SARS-CoV-2 et/ou de l'influenza et/ou du RSV, via des plateformes PCR en temps réel communes (voir les spécifications des instruments requis à la **section 6**). Le SARS-CoV-2 est identifié par la détection de cibles RT-qPCR situées dans les gènes RdRp et N, tandis que le RSV (sous-types A et B) est identifié par la détection de cibles situées dans le gène L. En revanche, les virus de l'influenza de type A et de type B sont détectés par l'amplification de cibles situées dans les gènes M1 et NS2, respectivement. Le COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, de NZYtech a été conçu pour obtenir le profil de détection le plus large possible tout en restant spécifique aux génomes du SARS-CoV-2, du RSV et de l'influenza de type A et B. Il fournit un ensemble complet de réactifs et de sondes pour détecter les quatre génomes viraux, incluant un contrôle interne efficace pour confirmer l'extraction efficace de l'ARN de l'échantillon et l'absence d'inhibiteurs de PCR, entre autres. Ce kit cible des régions hautement conservées des génomes du SARS-CoV-2, du RSV (sous-types A et B) et de l'influenza de type A et B, grâce à un ensemble de sondes/amorces hautement optimisé. Par ailleurs, les amorces et les sondes ne présentent pas d'homologie significative avec des génomes non apparentés, ce qui rend ce test extrêmement spécifique. De plus, aucune réactivité croisée avec des organismes que l'on peut trouver dans les voies respiratoires n'est observée. L'évolution naturelle des virus détectés par ce kit implique que de nouvelles informations sur les séquences seront disponibles jour après jour, reflétant des stratégies d'adaptation virale bien connues. Ainsi, NZYtech revoit régulièrement les cibles génomiques virales et, si nécessaire, lance de nouvelles versions de ce kit. La RT-qPCR en temps réel en une étape est la méthode la plus rapide et la plus fiable pour effectuer une détection précise des ARN viraux du SARS-CoV-2, de l'influenza de type A et B et du RSV. Le COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, de NZYtech est un test multiplex détectant le SARS-CoV-2, l'influenza de type A, l'influenza de type B, le RSV et les acides nucléiques humains (agissant comme un contrôle positif interne). L'ARN extrait et purifié est retranscrit en ADNc, puis amplifié dans une seule réaction à l'aide de six ensembles d'amorces/sondes extrêmement spécifiques, à savoir ceux qui détectent l'ARN polymérase (RdRp) dépendante de l'ARN du SARS-CoV-2 et les gènes de la phosphoprotéine (N) de la nucléocapside, les gènes spécifiques de la matrice (M1) et la protéine non-structurale 2 (NS2) de l'influenza de type A et B, le gène L du RSV et le gène de la ribonucléase P humaine (RNase P, RP). Le kit exploite le principe dit de TaqMan®. Au cours de ce processus, les sondes s'hybrident spécifiquement à leurs gènes cibles et, lors de l'amplification de l'ADNc, par l'intermédiaire de deux amorces flanquantes, elles sont soumises à une dégradation qui entraîne la séparation du colorant rapporteur du quencher, ce qui provoque une augmentation de la

fluorescence. La détection du contrôle interne (le gène de la RNase P humaine) valide l'efficacité du processus d'extraction ainsi que l'absence d'inhibiteurs de PCR potentiellement présents dans les échantillons biologiques humains. Pour permettre l'identification de l'amplification des six cibles spécifiques dans une seule réaction, SARS-CoV-2, influenza A/B, RSV et RNase P humaine, les sondes spécifiques sont marquées différemment, notamment avec des colorants rapporteurs Texas Red®, FAM™, HEX™ et Cy5™, respectivement. Il convient de souligner que ce panel contient un test duplex dans les canaux Texas Red® (gènes cibles spécifiques du SARS-CoV-2 RdRp et N) et FAM™ (gènes cibles spécifiques de l'influenza de type A et de type B). Cela permet de rendre compte d'une performance additive des tests pour la détection du SARS-CoV-2, mais empêche de distinguer les infections par l'influenza de type A/B. De plus, ce test n'est pas conçu pour différencier les sous-types du virus de l'influenza de type A, ni les souches du virus de l'influenza de type B ou les sous-groupes de RSV. Si la différenciation de souches spécifiques du virus de l'influenza et de sous-types du RSV est nécessaire, des tests supplémentaires seront requis. De plus, les six ensembles d'amorces/sondes sont fournis à des concentrations optimisées garantissant que l'amplification des acides nucléiques moins abondants n'est pas compromise lorsque d'autres cibles virales sont présentes à des concentrations plus élevées.

4. Composition du kit

Le COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, de NZYtech fournit un ensemble complet de réactifs suffisants pour effectuer des réactions RT-qPCR en une seule étape. Le kit est disponible sous un format tube : référence MD04901 pour 96 réactions et référence MD04902 pour 4x 96 réactions.

COMPOSANT DU KIT		VOLUME (PAR FLACON)	NOMBRE DE TUBES		COULEUR BOUCHON
			MD04901	MD04902	
COVID-19, Flu A/B, RSV MMix	NZYSupreme Multiplex One-step RT-qPCR Probe Master Mix (2x)	1050 µL	1	4	Neutre
COVID-19, Flu A/B, RSV PPMix	Mélange amorce & sonde COVID-19, Influenza A/B, RSV (10x)	205 µL	1	4	Marron
COVID-19, Flu A/B, RSV POS 1	Contrôle positif 1 COVID-19, Influenza A/B, RSV	105 µL	1	4	Rouge
COVID-19, Flu A/B, RSV POS 2	Contrôle positif 2 COVID-19, Influenza A/B, RSV	105 µL	1	4	Rouge
NTC	Contrôle no-template (eau exempte de RNase/DNase)	105 µL	1	4	Neutre

En alternative, le COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, de NZYtech est disponible dans un format de barrettes de 8 puits, avec une solution prête à l'emploi qui comprend un mélange principal et un mix sonde-amorce, pour réaliser 16 réactions RT-qPCR (2 barrettes de 8 puits, profil haut), simplifiant et rationalisant le processus de test.

COMPOSANT DU KIT		VOLUME (PAR FLACON)	NOMBRE DE TUBES/BARRETTES	COULEUR BOUCHON
			MD04903	
COVID-19, FLU A/B, RSV MIX	Mélange prêt à l'emploi NZYSupreme Multiplex On e-Step RT-qPCR Master Mix et mélange amorce & sonde	Barrettes 8 puits x 12 µL par puits	2	Neutre
COVID-19, FLU A/B, RSV POS 1	Contrôle positif 1 COVID-19, Influenza A/B, RSV	20 µL	1	Rouge
COVID-19, FLU A/B, RSV POS 2	Contrôle positif 2 COVID-19, Influenza A/B, RSV	20 µL	1	Rouge
NTC	Contrôle No-template (RNase/DNase free water)	20 µL	1	Neutre
BOUCHONS BARRETTES 8-PUITS	-	-	2	Neutre

5. Conditions de stockage, de stabilité et de manipulation

Le COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, de NZYtech est expédié réfrigéré. Tous les composants doivent être immédiatement stockés entre -85 °C et -15 °C dès leur réception. Lorsqu'ils sont utilisés, les composants du kit doivent être remis au congélateur rapidement après utilisation afin de minimiser le temps passé à température ambiante.

- Réduire au minimum le nombre de cycles de congélation-décongélation en conservant des aliquotes de travail. Si nécessaire, les composants du kit peuvent être aliquotés en plus petits volumes après décongélation.
- Le mélange sonde et amorce COVID-19, influenza A/B, RSV (10x) doit être conservé à l'abri de la lumière. En particulier, n'exposez pas le COVID-19, Flu A/B, RSV MMix à la lumière directe du soleil après l'avoir combiné avec le COVID-19, Flu A/B, RSV PPMix. Le Mix COVID-19, Grippe A/B, RSV inclus au format barrettes 8 puits (kit référence MD04903), doit également être conservé à l'abri de la lumière.
- Si l'emballage qui protège le kit est endommagé, veuillez contacter NZYtech.
- Faites attention à la date de péremption indiquée sur l'emballage. NZYtech ne recommande pas d'utiliser le kit après la date de péremption. À cette date, le kit doit être jeté en suivant les instructions d'élimination présentées à la **section 8.2**.

6. Matériels et instruments requis mais non fournis

- Instrument PCR en temps réel qui détecte fluorescence Texas Red®, FAM™, HEX™/VIC™ et Cy5™ (à des longueurs d'onde d'émission de 615, 520, 556 and 670 nm, respectivement). Voir à la **section 11** les modèles d'instruments pour lesquels le kit a été validé.
- Équipement et consommables pour isoler l'ARN viral à partir d'échantillons respiratoires.

- Matériel plastique qPCR exempt de RNase/DNase : Tubes PCR, barrettes, bouchons, plaques à 96 puits, films adhésifs. (nécessaire uniquement pour les références MD04901 et MD04902).
- Pipettes et embouts filtrants (sans RNase/DNase).
- Gants jetables.
- Vortex et centrifugeuse.

7. Prélèvement et préparation des échantillons

Le COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, de NZYtech, IVD a été validé pour les échantillons d'écouvillon oro-nasopharyngé. Différents facteurs, tels que le protocole de prélèvement d'échantillons à partir d'échantillons respiratoires humains (écouvillons oro-nasopharyngés), le transport, le stockage et le temps de traitement des échantillons, sont essentiels pour obtenir des résultats optimaux. Les échantillons prélevés doivent être testés dès que possible. Les échantillons doivent être transportés et stockés à basse température, conformément aux règlements relatifs à la biosécurité. L'ARN ou les acides nucléiques totaux extraits selon un protocole *in vitro* CE constituent le matériel de départ du COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, de NZYtech. Assurez-vous que les échantillons d'ARN sont appropriés en matière de pureté, de concentration et d'intégrité des acides nucléiques. Un rapport $A_{260/280}$ d'environ 2 est généralement accepté pour un ARN pur. L'éthanol étant un puissant inhibiteur de PCR, il est nécessaire de l'éliminer avant l'éluion de l'acide nucléique lors de l'extraction. Le kit NZYtech comprend une réaction de contrôle interne d'extraction de l'ARN qui cible l'ARN humain, lequel est co-purifié avec l'ARN viral. L'ARN humain est amplifié avec l'ensemble d'amorces/sondes RNase P (RP), ce qui est utile pour vérifier l'efficacité de l'isolement de l'ARN et/ou la présence d'inhibiteurs pendant le traitement de l'échantillon.

8. Précautions et mises en garde

Comme pour toute procédure de test analytique, les bonnes pratiques de laboratoire sont essentielles. Suivez attentivement les procédures et les directives figurant dans ce manuel pour vous assurer que le test est effectué correctement. Tout non-respect de ces procédures et directives peut entraîner l'échec du test ou des résultats erronés. En raison de la grande sensibilité du kit, il convient de veiller tout particulièrement à ce que les réactifs et les mélanges d'amplification PCR ne soient pas contaminés.

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 Internet de NZYtech (www.nzytech.com). Ce kit de détection ne doit être utilisé que par du personnel formé aux procédures techniques et de sécurité et dans des laboratoires dûment équipés. Les directives internationales et nationales sur la biosécurité en laboratoire doivent être respectées en toutes circonstances.

8.2. Exigences en matière de manipulation et de procédure

- Réservé à un usage professionnel de diagnostic *in vitro*.
- 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 de lots de production différents.
- Aucun réactif d'autres fabricants ne doit être utilisé avec les réactifs de ce kit de test.
- Des pipettes et des récipients en plastique jetables sans DNase/RNase doivent être utilisés dans toutes les procédures.
- Utilisez des embouts filtrants 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.
- Les contrôles positifs contiennent des modèles à nombre de copies élevé ; ils doivent être ouverts et traités à l'écart des échantillons de test et des composants du kit pour éviter toute contamination croisée.
- Utilisez toujours l'eau fournie dans le kit (NTC - No-template Control/Eau sans DNase)
- À la fin de chaque test, nettoyez les surfaces de travail et l'équipement avec un dissolvant d'ADN/ARN.
- Après amplification, manipulez les plaques avec précaution et jetez-les immédiatement après la fin des tests ; les plaques doivent toujours être jetées dans un conteneur à risque biologique approprié après utilisation.
- Les échantillons biologiques doivent être manipulés comme s'ils étaient infectieux en suivant les précautions de biosécurité appropriées.
- Les résidus de produits chimiques et de préparations sont généralement considérés comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchets est réglementée par des lois et règlements nationaux et régionaux.
- Tous les résultats doivent être interprétés par un professionnel de santé en prenant en compte les antécédents médicaux et les symptômes cliniques du patient.
- Un résultat négatif à un test PCR n'exclut pas de manière concluante la possibilité d'une infection.
- Respectez les bonnes pratiques de laboratoire, portez des vêtements de protection, portez en permanence des gants jetables non poudrés et utilisez des lunettes de protection et un masque. Ne pas manger, boire ou fumer 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 des plaques expérimentales doivent être effectuées sur des refroidisseurs de paille ou sur de la glace. Après avoir ajouté les réactifs sur la plaque, passez immédiatement au protocole RT-qPCR en une étape. Une incubation prolongée des mélanges réactionnels à température ambiante peut entraîner des artefacts de PCR réduisant la sensibilité de la détection. Avant l'expérience, commencez à remuer doucement les tubes de réaction fournis, centrifugez pendant 5 secondes pour collecter le contenu au fond du tube et mettre les tubes sur de la glace. **Nous recommandons fortement de pipeter les contrôles positifs 1 et 2 de COVID-19, grippe A/B, RSV en dernier pour éviter les contaminations croisées.**

9.1. Configuration de la réaction

Pour les références MD04901 et MD0492 - tubes

1. Préparez un mélange RT-qPCR suffisant pour le nombre de tests à réaliser avec un volume supplémentaire de 5 % pour les pertes par pipetage. Procéder selon le tableau ci-dessous précisant les volumes pour 1 et n tests (où n correspond au nombre total de réactions). Stockez les volumes restants conformément à la section 5.

COMPOSANT	1 TEST VOLUME (µL)	n TESTS (*) VOLUME + 5% (µL)
COVID-19, FLU A/B, RSV MMIX (**)	10	n x 10,5
COVID-19, FLU A/B, RSV 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 et ajoutez-en trois supplémentaires pour le contrôle négatif et les deux contrôles positifs, respectivement.

** Veuillez noter qu'un précipité au fond du tube du master mix peut être observé, notamment après plusieurs cycles de congélation/dégel. Pour garantir des performances optimales, veuillez vous assurer que tous les composants sont décongelés et remis en suspension avant utilisation. Dans ce cas, ne faites pas tourner le master mix avant de pipeter.

2. Pipetez 12 µL du mélange RT-qPCR dans des puits individuels, selon la configuration de votre plaque expérimentale de PCR en temps réel.
3. Passez à l'étape 8 pour procéder à la configuration des contrôles et des échantillons biologiques.

Pour la référence MD04903 – barrettes de 8 puits

4. Déterminez le nombre de réactions nécessaires pour le test, comptez le nombre d'échantillons et ajoutez trois réactions supplémentaires : une pour le contrôle négatif et les deux contrôles positifs, respectivement. Remettez dans un sac toutes les barrettes de 8 puits inutilisées, à l'abri de la lumière, et conservez-les conformément à la section 5 pour une utilisation future.
5. Assurez-vous que les barrettes de 8 puits sont complètement décongelées.
6. Centrifugez brièvement les barrettes de 8 puits pour assurer l'homogénéité. Chaque puits individuel comprend déjà 12 µL de COVID-19, Flu A/B, RSV Mix, un mélange prêt à l'emploi comprenant NZYSupreme Multiplex One-step RT-qPCR Master Mix et le mélange sonde & amorce, garantissant des proportions cohérentes.
7. Passez à l'étape 8. pour la configuration des contrôles et des échantillons biologiques.

Contrôles et échantillons

8. Pour le contrôle négatif, ajoutez 8 µL de NTC au lieu de la matrice d'ARN dans le puits de contrôle négatif. Le volume final doit être de 20 µL.
9. Pour les échantillons biologiques, ajoutez 8 µL de chaque échantillon d'ARN dans les puits d'échantillon, selon la configuration de votre plaque expérimentale/barrettes de 8 puits. Le volume final dans chaque puits doit être de 20 µL.
10. Pour les deux contrôles positifs, ajoutez 8 µL de COVID-19, Flu A/B, RSV POS 1 (détecte les gènes SARS-CoV-2 ORF1ab, Influenza B NS2, RSV L et RP humain) et 8 µL de COVID-19, Flu A/B, RSV POS 2 (SARS-CoV-2 N, Influenza A M1, RSV L et gènes RP humains) au lieu de la matrice d'ARN dans les puits de contrôle positif. Le volume final doit être de 20 µL.
11. Pour les références de kit MD04901 et MD04902, recouvrez et scellez la plaque avec un film adhésif optique ou des capuchons appropriés. Pour le kit référence MD04903, recouvrez les barrettes de 8 puits avec les capuchons de barrettes de 8 puits supplémentaires fournis avec ce format de kit.
12. Placez la plaque de réaction/les barrettes de 8 puits[‡] dans l'instrument PCR en temps réel et exécutez le protocole RT-qPCR conformément à la section ci-dessous.

‡ Veuillez noter que les barrettes de 8 puits haut profil sont exclusivement compatibles avec les thermocycleurs à blocs de 0,2 ml.

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

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

Paramètres suggérés pour l'exécution de la RT-qPCR

CYCLES	TEMPERATURE	DUREE	ÉTAPE
1	50 °C	10 min	Rétrotranscription
1	95 °C	3 min	Activation de la polymérase
40	95 °C	5 s	Dénaturation
	60 °C	30 s	Hybridation/élongation *

* Les données fluorogéniques doivent être collectées au cours de cette étape par les canaux Texas Red, FAM, VIC/HEX et Cy5.

Colorants fluorescents et canaux de détection

CIBLES	COLORANT FLUORESCENT	CANAU DE DETECTION
COVID-19 (SARS-CoV-2)	Texas Red®	Texas Red/JUN
Grippe A/B (Influenza A/Influenza B)	FAM™	FAM
RSV	HEX™	VIC/HEX ou JOE
RNase P	Cy5™	Cy5

Le références MD04901 et MD04902 du kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR, IVD, de NZYtech, ont été validées pour les systèmes de PCR en temps réel suivants : Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5, Roche Life Science LightCycler® 96 System et Bio-Rad® CFX Opus.

Le kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR, IVD, de NZYtech, référence MD04903 a été validé pour les systèmes de PCR en temps réel suivants : Applied Biosystems® 7500 et Bioer LineGene Mini S.

Si un autre équipement est utilisé, le kit doit être validé par l'utilisateur à l'aide d'échantillons caractérisés précédemment (positifs et négatifs).

10. Analyse des données

10.1. Critères de validation du test

L'analyse des données est effectuée par le logiciel de l'instrument. Compte tenu des différences de performance entre les différents instruments de PCR en temps réel, les seuils des quatre signaux de fluorescence (Texas Red, FAM, VIC/HEX et Cy5) sont déterminés automatiquement par le logiciel, avec des ajustements manuels si nécessaire. Avant d'analyser les résultats des échantillons, nous recommandons de vérifier si le test PCR en temps réel est valide. Ainsi, pour chaque plaque, confirmez si les résultats des contrôles positifs et négatifs sont ceux attendus, selon les critères suivants :

Contrôles positifs : l'amplification des courbes FAM (influenza B dans le contrôle 1 et influenza A dans le contrôle 2), Texas Red (gène ORF1ab du SARS-CoV-2 dans le contrôle 1 et gène N dans le contrôle 2), VIC/HEX (gène L du RSV) et Cy5 (gène RP) est positive. Les contrôles positifs doivent s'amplifier à Cts < 32, dans les quatre canaux. Le fait de ne pas satisfaire à ce critère de contrôle de qualité est une forte indication que le test a été compromis.

Contrôle négatif (pas de réaction de la matrice) : aucune amplification n'est détectée. Si le contrôle négatif présente des courbes d'amplification (Texas Red, FAM; VIC/HEX et Cy5) de forme sigmoïdale, l'échantillon peut avoir été contaminé. Répétez le test en suivant les bonnes pratiques de RT-qPCR.

Si les contrôles sont conformes aux attentes, le test est **valide**. Procédez à l'interprétation des résultats des échantillons testés.

Si l'un des contrôles ne présente pas les résultats attendus, le test a été compromis ou exécuté de manière incorrecte et doit être considéré comme **non valide**.

Veillez refaire le test

Si le problème persiste, contactez le fabricant

10.2. Interprétation des résultats des tests

Le COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, de NZYtech utilise les valeurs seuil Ct suivantes pour les cibles du test pour l'interprétation des résultats :

VALEUR CT	INTERPRETATION DES RESULTATS
Amplification Ct ≤ 35	Détecté (+) → POSITIF
Pas d'amplification Ct > 35	Non détecté (-) → NÉGATIF

Le SARS-CoV-2 est détecté si la courbe d'amplification Texas Red présente une forme sigmoïdale avec Ct ≤ 35, quel que soit le résultat obtenu pour le test RNase P (Cy5).

L'influenza A et/ou l'influenza B sont détectées si la courbe d'amplification FAM présente une forme sigmoïdale avec Ct ≤ 35, quel que soit le résultat obtenu pour le test RNase P (Cy5).

Le RSV est détecté si la courbe d'amplification VIC/HEX présente une forme sigmoïdale avec Ct ≤ 35, quel que soit le résultat obtenu pour le test RNase P (Cy5).

Le SARS-CoV-2, l'influenza A et/ou l'influenza B et le RSV ne sont pas détectés si les courbes Texas Red, FAM et VIC/HEX ne s'amplifient pas ou s'amplifient avec Ct > 35, tandis que le test RNase P (Cy5) présente une courbe sigmoïde positive (Ct ≤ 40).

Le test est non valide si les tests SARS-CoV-2, influenza A/B, RSV et RNase P sont 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 générale des courbes d'amplification ; **seules les courbes d'amplification sigmoïdales indiquent une véritable amplification**).

SARS-COV-2 (TEXAS RED)	INFLUENZA A/B (FAM)	RSV (VIC/HEX)	RP (CYS)	INTERPRETATION DES RESULTATS
+	-	-	+/-*	SARS-CoV-2 détecté → POSITIF
-	+	-	+/-*	Influenza A/B détecté → POSITIF
-	-	+	+/-*	RSV → POSITIF
+	+	-	+/-*	SARS-CoV-2 et Influenza A/B détectés → POSITIF
+	-	+	+/-*	SARS-CoV-2 et RSV détectés → POSITIF
-	+	+	+/-*	Influenza A/B et RSV détectés → POSITIF
+	+	+	+/-*	SARS-CoV-2, Influenza A/B, RSV détectés → POSITIF
-	-	-	+	SARS-CoV-2, Influenza A/B et RSV non détectés → NEGATIF
-	-	-	-	Test non valide, répéter l'extraction

* La détection du contrôle interne sur le canal Cy5 n'est pas nécessaire pour obtenir des résultats positifs sur les canaux de détection Texas Red, FAM ou HEX. Une concentration/charge élevée d'ARN viral détectable dans l'échantillon peut conduire à un signal de contrôle interne réduit ou absent.

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

- Bien que le risque de résultats faux négatifs soit atténué grâce à la conception à double cible du présent test, des résultats faux négatifs peuvent être causés par :
 - Prélèvement, manipulation et/ou stockage inappropriés des échantillons.
 - Échantillon prélevé en dehors de la phase virémique/symptomatique.
 - Dégradation de l'échantillon.
 - Présence d'inhibiteurs de RT-qPCR.
 - Mutations du génome des virus.
 - Non-respect des procédures du présent manuel.
 - Utilisation de kits de réception ou de plateformes PCR en temps réel non validés.
- Les résultats faux positifs peuvent être causés par :
 - Manipulation inadaptée d'échantillons contenant une forte concentration d'ARN viral. La méthode RT-qPCR étant très sensible aux contaminations croisées, il est important de prendre des précautions particulières lors de l'isolement de l'ARN.
 - Manipulation inadaptée de contrôles positifs.
 - Manipulation inadaptée du produit amplifié (plaque post-amplification).

Un résultat négatif n'exclut pas une infection et le résultat du test ne doit pas être utilisé comme seule base pour le traitement ou d'autres décisions de prise en charge du patient. Par ailleurs, ce test ne permet pas d'exclure les maladies provoquées par d'autres agents pathogènes bactériens ou viraux.

11. Évaluation des performances

Les performances de ce kit ont été validées pour les instruments indiqués à la section 9.2 ci-dessus. Si un autre équipement est utilisé, le kit doit être validé par l'utilisateur en utilisant des échantillons précédemment caractérisés (positifs et négatifs).

11.1. Résultats attendus

Les courbes d'amplification typiques observées pour les échantillons cliniques négatifs (figure 1A) ou les échantillons de patients infectés par le SARS-CoV-2 (figure 1B), la co-infection par le SARS-CoV-2 et l'influenza A/B (C) et la co-infection par le SARS-CoV-2, l'influenza A/B et le RSV (D), sont présentés à la figure 1.

11.2. Limite de détection (LD) - Sensibilité analytique

La sensibilité analytique a été définie comme la plus faible concentration d'analyte pouvant être détectée de manière fiable, avec un niveau de confiance de 95%. Elle a été évaluée en testant les acides nucléiques du SARS-CoV-2, du RSV, de l'influenza A et de l'influenza B à différents nombres de copies, enrichis en ARN extrait d'écouvillons oro-nasopharyngés négatifs, en utilisant 3 lots différents de kits dans des conditions de test de réaction typiques. Les tests ont été répétés pendant 4 jours, produisant 48 répétitions pour chaque concentration testée. Ensemble, les données ont démontré que le COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, de NZYtech détecte 0,25 copies/μL de SARS-CoV-2, 0,375 copies/μL d'Influenza A, 0,375 copies/μL d'Influenza B et 0,375 copies/μL de RSV, avec une confiance ≥ 95%.

Ainsi, la limite de détection (LD) préliminaire a été déterminée comme étant de 0,25 copie/μL ou 250 copies/mL pour le SARS-CoV-2, 0,375 copie/μL ou 375 copies/mL pour le RSV, 0,375 copie/μL ou 375 copies/mL pour l'influenza A et 0,375 copie/μL ou 375 copies/mL pour l'influenza B. La limite de détection préliminaire a été confirmée par deux opérateurs différents à l'aide de trois lots de kits dans le cadre d'une expérience totalisant 48 répétitions d'échantillons d'écouvillons oropharyngés (OPS) et d'écouvillons nasopharyngés (NPS) négatifs, artificiellement enrichis de diverses concentrations de virus (inactivés) provenant du SARS-CoV-2, de l'influenza A, de l'influenza B, du RSV A ou du RSV B. Des échantillons groupés de NPS ou d'OPS ont été enrichis de diverses concentrations de virus provenant des souches suivantes : virus du SARS-CoV-2 (isolat du variant Omicron), virus de l'influenza A : souche A/Michigan/45/2015 (H1N1) pdm09), souche A/Singapour/ INFMH-16-0019/2016 (H3N2), virus de l'influenza B souche B/Colorado/06/2017 (souche Vitoria) et souche B/Phuket/3073/2013 (souche Yamagata), RSV A et RSV B (souche CH93

(18)-18), à plusieurs concentrations et traités avec le COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, de NZYtech. La LoD du kit référence MDO4903 a été confirmée par deux opérateurs différents, en utilisant trois lots de kits. Cette expérience comprenait un total de 48 répétitions d'échantillons OPS/NPS négatifs artificiels regroupés, enrichis de diverses concentrations de virus du SARS-CoV-2, de la grippe A, de la grippe B, du RSV A ou du RSV B.

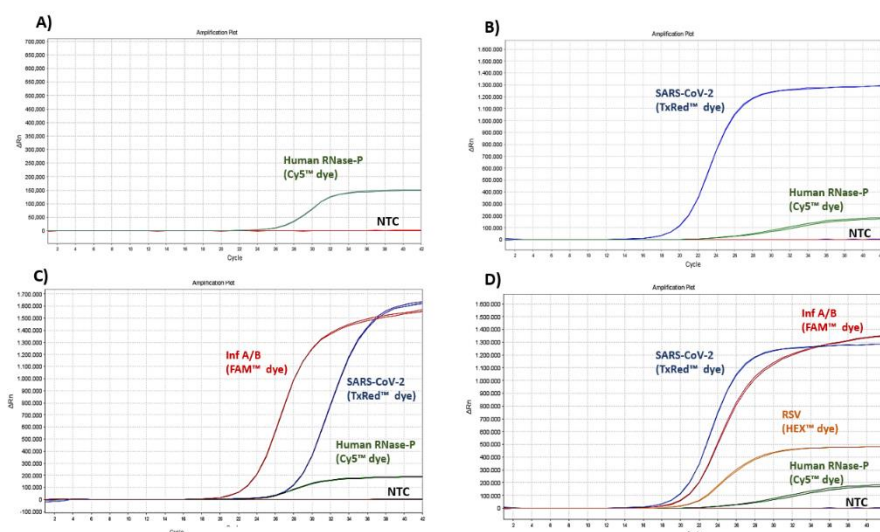


Figure 1. Détection des cibles du SARS-CoV-2, de l'Influenza A/B, du RSV et de la RNase-P humaine à partir d'échantillons cliniques négatifs (A) ou d'échantillons cliniques infectés par le SARS-CoV-2 (B), la co-infection par le SARS-CoV-2 et l'Influenza A/B (C) et la co-infection par le SARS-CoV-2, l'Influenza A/B et le RSV (D). La courbe bleue représente la détection des cibles de l'ARNv du SARS-CoV-2 par le canal Texas Red/JUN. La courbe rouge représente la détection des cibles Influenza A et/ou Influenza B par le canal FAM. La courbe orange représente la détection du gène L du RSV par le canal VIC/HEX/JOE. Et la courbe verte représente la détection du gène de la RNase P humaine par le canal Cy5.

La sensibilité analytique du COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, de NZYtech dans le contexte d'un scénario de co-infection (interférence compétitive) a été évaluée en réalisant une série d'expériences de dilution en série à l'aide d'échantillons de co-infection fictive pour chacune des cibles virales. Pour créer les échantillons de co-infection fictive, on a ajouté à la courbe standard de SARS-CoV-2 exactement 10^3 copies d'acides nucléiques de RSV, 10^3 copies d'acides nucléiques d'Influenza A et 10^3 copies d'acides nucléiques d'Influenza B. Par ailleurs, 10^3 copies de SARS-CoV-2 et 10^3 copies de RSV ont été ajoutées aux courbes standard de l'Influenza A et de l'Influenza B, individuellement. Enfin, 10^3 copies de SARS-CoV-2, 10^3 copies d'Influenza A et 10^3 copies d'acides nucléiques d'Influenza B ont été ajoutées à la courbe standard RSV. Des échantillons quadruples de trois lots du kit (soit un total de 12 répétitions par dilution) ont été testés avec le COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, de NZYtech, afin de déterminer la sensibilité du test lorsque plusieurs cibles virales sont présentes dans un échantillon. Les données ont révélé que la LD du SARS-CoV-2 n'était pas modifiée en cas de co-infection. Cependant, la LD du RSV est passée à 0,75 copies/ μ L ou 750 copies/mL et celle de l'Influenza B à 1,25 copies/ μ L ou 1250 copies/mL en cas de co-infection. Pour l'influenza A, la LD est passée à 2,5 copies/ μ L ou 2500 copies/mL en cas de co-infection.

11.3. Réactivité analytique (inclusivité) et spécificité analytique

L'inclusivité et la réactivité croisée ont été évaluées par une analyse *in silico* des sondes et des amorces oligonucléotidiques contre des agents pathogènes liés au SARS-CoV-2, à l'influenza A et à l'influenza B, au RSV et à des agents pathogènes normaux qui provoquent une infection avec des symptômes similaires, respectivement. L'analyse *in silico* a révélé que la conception du test permettait de détecter toutes les souches virales du SARS-CoV-2, de l'influenza A et de l'influenza B, ainsi que du RSV, et ne montrait aucune réactivité avec les espèces non apparentées. En plus de l'analyse *in silico*, le COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD a été réalisé sur les acides nucléiques de microbes courants des voies buccales et respiratoires, notamment *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 agents pathogènes testés par le COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, n'a généré de signal d'amplification détectable.

L'impact de 17 substances potentiellement interférentes a été évalué dans des tests consistant en des échantillons nasopharyngés négatifs enrichis par des échantillons positifs au SARS-CoV-2 à environ 3x LD. 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 scientifique. Tous les tests ont été réalisés en triplicata en utilisant trois lots de kits et les résultats ont été comparés aux données obtenues avec un test de contrôle ne contenant 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 avec l'instrument Applied Biosystems™ 7500 FAST Real-time PCR (utilisé avec le logiciel 7500 v2.3).

INTERFÉRENT POTENTIEL	INGRÉDIENT ACTIF	CONCENTRATION FINALE DE L'ÉCHANTILLON	INTERFÉRENCE OUI (O) OU NON (N)				
			SARS-CoV-2	INFLUENZA A	INFLUENZA B	RSV A	RSV B
Eau de mer isotonique (Rhinomer)	NaCl	15% v/v	N	N	N	N	N
Spray pour la gorge, anesthésique oral et analgésique (Streptfen)	Flurbiprofène	5% v/v	N	N	N	N	N
Solution de lavage nasal (spray antiallergique – Vibrocil)	Propionate de fluticasone	5% v/v	N	N	N	N	N
Corticostéroïdes nasaux en spray (Nasomet)	Furoate de mométasone	5% v/v	N	N	N	N	N
Corticostéroïdes nasaux en spray (Pulmicort)	Budesonide	5% v/v	N	N	N	N	N
Antimicrobien, systémique (Trobex)	Tobramycine	10 µg/mL	N	N	N	N	N
Analgésique, anti-inflammatoire et antiseptique buccal (Pyravex)	Extrait de rhubarbe, acide salicylique	5% v/v	N	N	N	N	N
Topique oropharyngé, antifongique et antibactérien (Daktarin)	Miconazole	5 mg/mL	N	N	N	N	N
Bain de bouche solution antiseptique (Eludril Gé)	Gluconate de chlorhexidine, Chlorobutanol hémihydraté	5% v/v	N	N	N	N	N
Antitussif, sirop (Codipront)	Codéine, citrate de phényltolexamine	5% v/v	N	N	N	N	N
Sang total (humain)	-	4% v/v	N	N	N	N	N
Médicament antiviral (Tamiflu)	Osetamivir	7,5 mg/mL	N	N	N	N	N
Mucolytique (Mucosolvan)	Clorhydrate d'ambroxol	5% v/v	N	N	N	N	N
Solution de gouttes nasales (Nasarox)	Clorhydrate d'oxymétazoline	10% v/v	N	N	N	N	N
Antibiotique, pommade nasale (Bactroban)	Mupirocine	5 mg/mL	N	N	N	N	N
Salive (humaine)	-	25% v/v	N	N	N	N	N
Éthanol absolu	Alcool	5% v/v	N	N	N	N	N

11.4. Précision

La précision de test du COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, de NZYtech a été déterminée par l'analyse répétée d'échantillons positifs représentant deux niveaux de charge virale, 3x LD et 30x LD copies par réaction, enrichis en ARN extrait d'échantillons oropharyngés négatifs, en utilisant 3 lots de kits différents et en suivant les conditions de réaction typiques des tests. La précision a été évaluée en mesurant le Cq moyen, le coefficient de variation et le % de détection des répétitions, comme décrit ci-dessous pour chaque cas. Les données sont reprises dans les trois tableaux (un pour chaque cible) présentés ci-dessous.

11.4.1. Répétabilité

La répétabilité a été évaluée par un opérateur en analysant 12 répétitions de chaque échantillon (3x LD et 30x LD copies par réaction), ce qui représente un nombre final de 24 tests effectués par cible.

11.4.2. Reproductibilité quotidienne

La reproductibilité quotidienne a été évaluée par un opérateur en analysant 48 répétitions de chaque échantillon (3x LD et 30x LD copies par réaction), pendant 4 jours, avec 12 répétitions de chaque concentration par jour (soit un total de 96 tests par cible réalisés).

11.4.3. Reproductibilité lot à lot

La reproductibilité entre les lots a été évaluée par un opérateur via l'analyse de 84 répétitions de chaque échantillon (3x LD et 30x LD copies par réaction) en utilisant 3 lots de kits différents avec 28 répétitions par lot.

11.4.4. Reproductibilité de l'opérateur

La reproductibilité de l'opérateur a été évaluée en testant 24 répétitions de chaque échantillon (3x LD et 30x LD copies par réaction), par quatre opérateurs différents, avec 6 répétitions par opérateur et par charge virale, soit un total de 36 répétitions par opérateur, incluant les 3 cibles du kit.

11.4.5. Reproductibilité inter-instruments

La reproductibilité inter-instruments des références du kit MD04901 et MD04902 a été mesurée par un opérateur en testant 24 répétitions de chaque échantillon (3x LoD et 30x LoD copies par réaction), dans deux instruments qPCR différents (Applied Biosystems™ 7500 FAST, Applied Biosystems™ QuantStudio 5), sur un total de 48 tests par échantillon. De plus, la reproductibilité inter-instruments de la référence MD04903 du kit a également été évaluée par un opérateur en testant 24 répétitions de chaque échantillon (3x LoD et 30x LoD copies par réaction), dans deux instruments qPCR différents (Applied Biosystems™ 7500 et Bioer LineGene Mini S.), sur un total de 48 tests par échantillon.

Précision du COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, de NZYtech, dans la détection de la cible SARS-CoV-2.

VARIABLE		SARS-CoV-2 (COPIES/REACTION)	
		3X LD	30X LD
REPETABILITE	n	12	12
	Cq moyen	33,84	30,75
	Coefficient de variation (%)	0,61	0,19
	% de détection des répétitions	100	100
REPRODUCTIBILITE QUOTIDIENNE	n	48	48
	Cq moyen	33,79	30,66
	Coefficient de variation (%)	2,02	1,62
	% de détection des répétitions	100	100
REPRODUCTIBILITE LOT A LOT	n	84	84
	Cq moyen	33,82	30,59
	Coefficient de variation (%)	1,96	1,60
	% de détection des répétitions	100	100
REPRODUCTIBILITE DE L'OPERATEUR	n	24	24
	Cq moyen	33,86	30,73
	Coefficient de variation (%)	1,26	1,13
	% de détection des répétitions	100	100
REPRODUCTIBILITE INTER-INSTRUMENT	n	48	48
	Cq moyen	33,75	30,80
	Coefficient de variation (%)	2,25	2,62
	% de détection des répétitions	100	100

Précision du COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, de NZYtech, dans la détection de la cible Influenza A.

VARIABLE		INFLUENZA A (COPIES/REACTION)	
		3x LD	30x LD
REPETABILITE	n	12	12
	Cq moyen	34,39	31,26
	Coefficient de variation (%)	3,31	1,05
	% de détection des répétitions	100	100
REPRODUCTIBILITE QUOTIDIENNE	n	48	48
	Cq moyen	34,30	30,92
	Coefficient de variation (%)	2,90	1,52
	% de détection des répétitions	100	100
REPRODUCTIBILITE LOT A LOT	n	84	84
	Cq moyen	34,28	30,76
	Coefficient de variation (%)	2,55	1,88
	% de détection des répétitions	100	100
REPRODUCTIBILITE DE L'OPERATEUR	n	24	24
	Cq moyen	34,14	30,97
	Coefficient de variation (%)	1,43	0,57
	% de détection des répétitions	100	100
REPRODUCTIBILITE INTER-INSTRUMENT	n	48	48
	Cq moyen	33,82	30,28
	Coefficient de variation (%)	3,39	3,09
	% de détection des répétitions	100	100

Précision du COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, de NZYtech, dans la détection de la cible Influenza B.

VARIABLE		INFLUENZA B (COPIES/REACTION)	
		3X LD	30X LD
REPETABILITE	n	12	12
	Cq moyen	33,87	30,63
	Coefficient de variation (%)	1,85	1,19
	% de détection des répétitions	100	100
REPRODUCTIBILITE QUOTIDIENNE	n	48	48
	Cq moyen	33,75	30,23
	Coefficient de variation (%)	2,10	2,56
	% de détection des répétitions	100	100
REPRODUCTIBILITE LOT A LOT	n	84	84
	Cq moyen	33,73	30,23
	Coefficient de variation (%)	1,99	2,00
	% de détection des répétitions	100	100
REPRODUCTIBILITE DE L'OPERATEUR	n	24	24
	Cq moyen	33,70	30,34
	Coefficient de variation (%)	1,51	0,65
	% de détection des répétitions	100	100
REPRODUCTIBILITE INTER-INSTRUMENT	n	48	48
	Cq moyen	33,59	30,01
	Coefficient de variation (%)	2,86	2,46
	% de détection des répétitions	100	100

Précision du COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD de NZYtech, dans la détection de la cible RSV.

VARIABLE		RSV (COPIES/REACTION)	
		3X LD	30X LD
REPETABILITE	n	12	12
	Cq moyen	33,66	30,126
	Coefficient de variation (%)	1,00	0,84
	% de détection des répétitions	100	100
REPRODUCTIBILITE QUOTIDIENNE	n	48	48
	Cq moyen	33,24	30,05
	Coefficient de variation (%)	2,55	0,84
	% de détection des répétitions	100	100
REPRODUCTIBILITE LOT A LOT	n	84	84
	Cq moyen	33,50	30,26
	Coefficient de variation (%)	2,16	1,23
	% de détection des répétitions	100	100
REPRODUCTIBILITE DE L'OPERATEUR	n	24	24
	Cq moyen	33,32	30,18
	Coefficient de variation (%)	2,85	1,33
	% de détection des répétitions	100	100
INTER-INSTRUMENT REPRODUCTIBILITE	n	48	48
	Cq moyen	32,67	29,83
	Coefficient de variation (%)	2,97	2,14
	% de détection des répétitions	100	100

11.5. Évaluation clinique

La performance du COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, de NZYtech a été évaluée avec des prélèvements d'écouillons oro-nasopharyngés, par un laboratoire de diagnostic moléculaire. Au total, 1516 échantillons cliniques ont été testés : 850 échantillons négatifs ; 293 échantillons cliniques positifs au SARS-CoV-2 (de mai 2021 à juin 2022, cette période couvre différentes vagues du SARS-CoV-2) ; 123 échantillons cliniques positifs à l'influenza A (41 pour AH1, 41 pour AH1N1 pdm, 41 pour AH3) ; 82 échantillons cliniques positifs à l'influenza B (41 pour la souche Vitoria et 41 pour la souche Yamagata) ; 168 échantillons positifs au RSV (88 pour le sous-type A et 88 pour le sous-type B). Les données ont révélé une concordance de 99% pour tous les échantillons positifs et négatifs testés. En outre, une comparaison des performances cliniques du kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR, IVD, de NZYtech, référence MD04901 et référence MD04903, a également été réalisée. Les données ont révélé que 100 % des accords de sensibilité clinique (PPA) et 100 % de spécificité clinique (NPA) ont été obtenus pour tous les échantillons positifs et négatifs testés, respectivement.

12. Contrôle qualité

Tous les composants du COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, de NZYtech sont testés selon les protocoles décrits ci-dessus. Le système hexaplex de PCR en temps réel permet la détection des cibles décrites pour l'identification de l'ARN viral du SARS-CoV-2 (gènes RdRp et N), de l'ARN viral de l'influenza A/B (gènes M1 et NS2, respectivement), de l'ARN viral du RSV (gène L) ainsi que de la RNase P humaine (gène RP). Des amplifications positives sont observées pour les gènes cibles, le contrôle positif et les contrôles internes via les canaux Texas Red, FAM, HEX/VIC et Cy5, selon les colorants rapporteurs respectifs de l'ensemble amorces/sondes.












13. Assistance technique

Pour tout besoin d'assistance technique, veuillez contacter notre équipe d'assistance technique dédiée par téléphone, au +351 (0) 21 364 35 14, ou par e-mail à l'adresse info@nzytech.com.

14. Marques déposées et avis de non-responsabilité

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

15. Explication des symboles

	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>		Consulter le mode d'emploi
	Numéro de catalogue		Fabricant
	Code du lot		Péremption
	Limites de température		Suffisant pour
	Contrôle positif		Conserver à l'écart de la lumière du soleil (mélange amorce/sonde)
	Contrôle négatif		

16. Déclaration de conformité

Nom du produit : COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD

Numéro de catalogue : MD04901, MD04902 et MD04903

Utilisation prévue : Détection qualitative du SARS-CoV-2, de l'influenza A et de l'influenza B, et du RSV

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

Directrice technique

17. Références

Swets MC, Russell CD, Harrison EM, Docherty AB, Lone N, Girvan M, Hardwick HE ; ISARIC4C Investigators, Visser LG, Openshaw PJM, Groeneveld GH, Semple MG, Baillie JK (2022). Co-infection du SRAS-CoV-2 avec les virus de la grippe, le virus respiratoire syncytial ou des adénovirus. *Lancet* 399(10334):1463-1464. doi : 10.1016/S0140-6736(22)00383-X.

Gomez GB, Mahé C, Chaves SS (2021). Effets incertains de la pandémie sur les virus respiratoires. *Science* 372:1043-1044.

Hansen CL, Chaves SS, Demont C, Viboud C.J (2022). Mortalité associée à la grippe et au virus respiratoire syncytial aux États-Unis, 1999-2018. *AMA Netw Open*. 5(2):e220527. doi : 10.1001/jamanetworkopen.2022.0527.

Dhanasekaran, V., Sullivan, S., Edwards, K.M. et al. (2022). La grippe saisonnière humaine sous COVID-19 et les conséquences potentielles de l'élimination de la souche grippale. *Nat Commun* 13, 1721 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29402-5>.

Chotpitayasunondh T, Fischer TK, Heraud JM, Hurt AC, Monto AS, Osterhaus A, Shu Y, Tam J (2021). Influenza et COVID-19 : que signifie la coexistence ? *Influenza et autres virus respiratoires*. 15 : 407-412

OMS : Prise en charge clinique de l'infection respiratoire aiguë sévère (IRAS) en cas de suspicion de COVID-19. 13 mars 2020. Disponible en ligne à l'adresse suivante :

<https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/clinical-management-of-novel-cov.pdf>

OMS : Q&R : Grippe et COVID-19 – Similitudes et différences. 30 septembre 2021. Disponible en ligne à l'adresse suivante :

<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>.



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