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

IVD

FR

Mode d'emploi

IM-002fr

VERSION 11/2021, Novembre 2021

NZYTech genes & enzymes
Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisbonne, 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 5
5. Stockage, stabilité et conditions de manipulation 5
6. Matériels et appareils requis mais non fournis 5
7. Collecte et préparation de l'échantillon 6
8. Précautions et mises en garde 6
   8.1. Informations relatives à la sécurité 6
   8.2. Exigences de manipulation et de procédure 6
9. Procédure de test 7
   9.1. Mise en place de la réaction 7
   9.2. Programmation de l'appareil de PCR en temps réel 8
10. Analyse des données 9
   10.1. Critères de validation des cycles 9
   10.2. Interprétation des résultats du test 10
11. Évaluation de performance 11
   11.1. Résultats attendus 11
   11.2. Limite de détection (LoD) - Sensibilité analytique 12
   11.3. Réactivité analytique (inclusivité) et spécificité analytique 12
   11.4. Précision 13
   11.5. Évaluation clinique 14
12. Contrôle qualité 15
13. Assistance technique 15
14. Marques déposées et avis de non-responsabilité 15
15. Explication des symboles 16
16. Déclaration de conformité 17
17. Références 18

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 du syndrome respiratoire aigu sévère 2]. Comme le coronavirus SARS (SARS-CoV) qui lui est étroitement lié, ce virus (précédemment nommé 2019-nCoV), appartient au genre *Betacoronavirus* de la famille des coronavirus. Les coronavirus sont de grands virus à ARN monocaténaire positifs, enveloppés et qui infectent les humains tout comme un grand nombre d'espèces animales. Le 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 SRAS-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 kit de RT-PCR des gènes RdRp et N du virus SARS-CoV-2 en une étape de NZYTech (diagnostic *in vitro*, IVD) 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 kit de RT-PCR des gènes RdRp et N du virus SARS-CoV-2 en une étape de NZYTech (IVD) 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 SRAS-CoV-2 pour fournir la sensibilité de détection la plus élevée. Les amorces et les sondes du kit SARS-CoV-2 ont une homologie de 100 % avec plus de 95 % des plus de 10 000 séquences génomiques disponibles dans la base de données GISAID à la date du mois de septembre 2020, et elles ne détectent pas les autres coronavirus courants. De plus, les amorces et les sondes ciblant le virus SRAS-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 SRAS-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. En utilisant le kit de RT-PCR des gènes RdRp et N du virus SARS-CoV-2 en une étape de NZYTech (IVD), l'ARN isolé et purifié avec un système d'extraction de diagnostic *in vitro* CE est rétro-transcrit (RT) en ADNc puis amplifié par PCR, en une seule réaction, en utilisant trois jeux d'amorces/de sondes très spécifiques exploitant le principe « TaqMan® ». Au cours de ce processus, les sondes s'hybrident spécifiquement à deux régions du génome du virus SRAS-CoV-2, à savoir les gènes RdRp (dans le gène codant pour la polyprotéine ORF1ab) et N, si l'échantillon provient d'un patient infecté. Un jeu d'amorces/de sondes supplémentaires sert de contrôle interne endogène pour détecter les acides nucléiques de la ribonucléase humaine P [gène RNase P (RP)] et permet d'évaluer la qualité de l'échantillon. 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 kit de RT-PCR des gènes RdRp et N du virus SARS-CoV-2 en une étape de NZYTech (IVD) 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)**	**MD04831**	**MD04832**
SARS-CoV-2 MMix (RdRp et N)	Mélange principal NZYSupreme pour la RT-qPCR en une étape	1025 µL	1	4
SARS-CoV-2 PPMix (RdRp et N)	Mélange d'amorces/sondes pour SARS-CoV-2 (gènes RdRp et N)/RP (marquées avec FAM™ et JOE™)	220 µL	1	4
SARS-CoV-2 Pos (RdRp et N)	Contrôle positif pour SARS-CoV-2 (gènes RdRp et N)/RP (1 x 10^4 copies/µL)	120 µL	1	4
SARS-CoV-2 Neg (RdRp et N)	Eau sans RNase/DNase	120 µL	1	4

5. Stockage, stabilité et conditions de manipulation

Le kit de RT-PCR des gènes RdRp et N du virus SARS-CoV-2 en une étape (IVD) est expédié réfrigéré. Tous les composants doivent être immédiatement stockés à -30°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

- Appareil de PCR en temps réel qui détecte les colorants fluorescents FAM™ et JOE™ (à des longueurs d'onde d'émission de 520 nm 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.

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 prélevés doivent être testés dès que possible. Les échantillons doivent être transportés et stockés à basse température conformément aux règlements sur la sécurité biologique. L'ARN ou les acides nucléiques totaux extraits selon un protocole de diagnostic *in vitro* CE constituent le matériau de départ du kit de RT-PCR des gènes RdRp et N du virus SARS-CoV-2 en une étape de NZYTech (IVD). Veuillez vous assurer que la qualité des échantillons d'ARN est appropriée en termes de pureté, de concentration et d'intégrité des acides nucléiques. On considère généralement qu'un rapport $A_{260/280}$ d'environ 2 correspond à l'ARN pur. Étant donné que l'éthanol est un puissant inhibiteur de la PCR en temps réel, il est nécessaire de l'éliminer complètement avant l'élution de l'acide nucléique lors de l'extraction. Le kit de NZYTech intègre une réaction de contrôle interne de l'extraction d'ARN qui cible l'ARN humain co-purifié avec l'ARN viral. L'ARN humain est amplifié avec le jeu d'amorces/de sondes spécifique au gène RNase P (RP). Ce contrôle est utile pour vérifier l'efficacité de l'isolation de l'ARN et/ou la présence d'inhibiteurs pendant le traitement des échantillons.

8. Précautions et mises en garde

Comme dans toute procédure de test analytique, 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.

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

9. Procédure de test

Veuillez lire attentivement le mode d'emploi avant d'effectuer 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 SARS-CoV-2 Neg (RdRp et N) au lieu de la matrice d'ARN dans le puits de contrôle négatif. Le volume final doit être de 20 µL.
4.Pour les échantillons biologiques, ajoutez 8 µL de chaque échantillon d'ARN dans les puits SARS-CoV-2/RNase P, selon l'organisation de votre plaque expérimentale. Le volume final dans chaque puits doit être de 20 µL.
5. Pour le contrôle positif, ajouter 8 µL de SARS-CoV-2 Pos (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	**Température**	**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. Collecter les signaux (FAM et JOE/VIC/HEX).*

Colorants fluorescents et canaux de détection

Cible	Colorant Fluorescent	Canaux de détection
SARS-CoV-2	FAM™	FAM
RNase P	JOE™	JOE, VIC ou HEX

Le kit de RT-PCR des gènes RdRp et N du virus SARS-CoV-2 en une étape de NZYTech (IVD) a été validé pour les systèmes de PCR en temps réel suivants : Applied Biosystem® 7500 FAST, Applied Biosystem® StepOnePlus, Roche Life Science LightCycler 480 instrument II, Applied Biosystem® 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/VIC/HEX. 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/VIC/HEX) de forme sigmoïde, il est possible que l'échantillon ait été contaminé. Effectuez à nouveau le test en suivant les bonnes pratiques de la RT-PCR.

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

Si l'un des contrôles ne présente pas les résultats attendus, 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 SRAS-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 SRAS-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**).

Résultat de SARS-CoV-2 SARS-CoV-2, Ct (FAM™)	**Résultat de RP** RP, Ct (JOE™)	**Interprétation des résultats**
+ (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 SRAS-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 kit RT-PCR des gènes RdRp et N du virus SARS-CoV-2 en une étape de NZYTech (IVD) a été réalisée sur les systèmes de PCR en temps réel Applied Biosystem® 7500 FAST, Roche Life Science LightCycler 480 instrument II, Applied Biosystem® 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 Biosystem® 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.

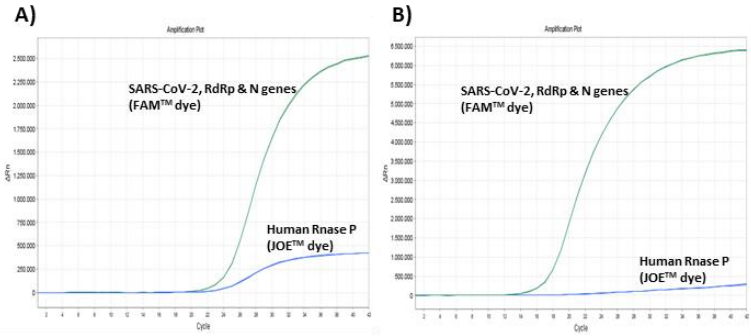

Figure 1. Détection simultanée des cibles SARS-CoV-2 (RdRp et N) et RNase-P humaine dans des échantillons cliniques positifs avec des charges moyenne (A) et élevée (B) de virus SARS-CoV-2. Courbes

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 SRAS-CoV-2 testée. Ensemble, les données ont révélé que le kit de RT-PCR des gènes RdRp et N du virus SARS-CoV-2 en une étape de NZYTech (IVD) 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 kit de RT-PCR des gènes RdRp et N du virus SARS-CoV-2 en une étape de NZYTech (IVD) à détecter le virus à différentes charges virales (de 5 x 10^6 à 5 copies par réaction) est présentée dans la Figure 2.

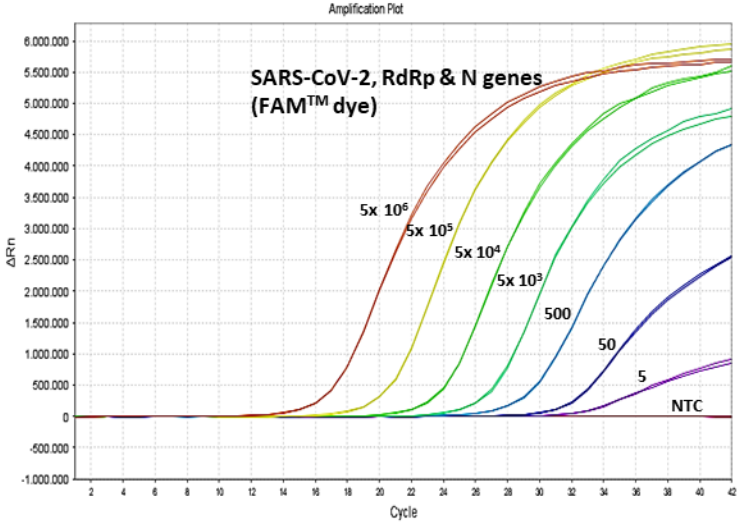

Figure 2. Sensibilité du kit de RT-PCR des gènes RdRp et N du virus SRAS-CoV-2 en une étape (IVD). Courbes d'amplification (nombre de cycles *en fonction de* la fluorescence - ΔRN) de dilutions en série à 1:10 de l'ARNv du SARS-CoV-2, de 5 x 10^6 copies à 5 copies par réaction via le canal FAM™. NTC : « No Template Control » (contrôle négatif).

11.3. Réactivité analytique (inclusivité) et spécificité analytique

Les gènes cibles du virus SARS-CoV-2 sont RdRp et N. L'inclusivité et la réactivité croisée ont été évaluées par analyse *in silico* des sondes et amorces oligonucléotidiques en présence de

pathogènes liés au SRAS-CoV-2 et de pathogènes normaux qui provoquent une infection avec des symptômes similaires, respectivement. L'analyse *in silico* a révélé que la conception de l'essai détectait toutes les souches du virus SARS-CoV-2 et que l'essai ne montrait aucune réactivité avec les espèces qui ne sont pas SARS-CoV-2. En plus de l'analyse *in silico*, la RT-PCR du virus SARS-CoV-2 a été réalisée sur les acides nucléiques des microbes courants des voies respiratoires et buccales, dont : *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* et *Streptomyces albidoflavus*. Aucun des agents pathogènes testés par le présent essai de RT-PCR du virus SARS-CoV-2 n'a produit de signal d'amplification détectable.

11.4. Précision

La précision de l'essai du kit de RT-PCR des gènes RdRp et N du virus SARS-CoV-2 en une étape de NZYTech (IVD) 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 Biosystem® 7500 et Applied Biosystem® StepOnePlus), soit 72 tests au total par échantillon.

Précision du kit de RT-PCR des gènes RdRp et N du virus SARS-CoV-2 en une étape (IVD)

Variable testée		SARS-CoV-2 (copies/réaction)	
		5	**150**
Répétabilité			
	n	36	36
	Cq moyen	31,72	26,30
	Coefficient de variation (%)	1,94	1,60
	% de détection des répétitions	100	100
Reproductibilité quotidienne			
	n	72	72
	Cq moyen	31,42	26,13
	Coefficient de variation (%)	1,50	1,55
	% de détection des répétitions	100	100
Reproductibilité de lot à lot			
	n	144	144
	Cq moyen	31,49	26,24
	Coefficient de variation (%)	1,61	1,46
	% de détection des répétitions	100	100
Reproductibilité de l'opérateur			
	n	72	72
	Cq moyen	31,45	26,21
	Coefficient de variation (%)	1,41	1,61
	% de détection des répétitions	100	100
Reproductibilité 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

Les performances du kit NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N genes (IVD), avec des échantillons d'écouvillonnage nasopharyngé collectés, ont été évaluées par deux laboratoires externes.

Au total, 180 échantillons cliniques négatifs et 180 échantillons cliniques positifs ont été testés. Les données ont révélé une concordance de 100 % pour tous les échantillons positifs et négatifs testés.

12. Contrôle qualité

Tous les composants du kit de RT-PCR des gènes RdRp et N du virus SARS-CoV-2 en une étape de NZYTech (IVD) 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 SRAS-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		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 : Kit de RT-PCR des gènes RdRp et N du virus SARS-CoV-2 en une étape, IVD

Numéro de catalogue : MD04831

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

Fabricant : NZYTech - Genes & Enzymes,

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar

Edifício E, R/C,

1649-038, Lisbonne

Portugal

Nous soussignés, NZYTech, Lda - Genes & Enzymes, déclarons par la présente que ce produit, concerné par la présente déclaration de conformité, est conforme aux normes et autres documents normatifs suivants : ISO 9001:2015, conformément aux dispositions de la Directive 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* telle qu'elle est transposée 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 Lisbonne, 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