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

Kit de RT-qPCR pour la COVID-19 et la grippe A/B multiplex en une étape, diagnostic *in vitro* (IVD)

REF MD04851, 96 réactions

Réservé au diagnostic* in vitro *par des professionnels

CE IVD

FR

Mode d'emploi

IM-003fr

VERSION 01/2022, décembre 2022

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

Table des matières

1. Introduction 3
2. Utilisation prévue 3
3. Principes de l'analyse 4
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 8
   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 12
   11.1. Résultats attendus 12
   11.2. Limite de détection (LoD) - Sensibilité analytique 12
   11.3. Réactivité analytique (inclusivité) et spécificité analytique 14
   11.4. Précision 15
   11.5. Évaluation clinique 17
12. Contrôle qualité 17
13. Assistance technique 18
14. Marques déposées et avis de non-responsabilité 18
15. Explication des symboles 18
16. Déclaration de conformité 19
17. Références 20

1. Introduction

La pandémie actuelle de la maladie à coronavirus 2019 (*Coronavirus Disease 2019, COVID-19*), qui a été identifiée pour la première fois en Chine et qui s'est propagée rapidement dans la plupart des pays, a causé une morbidité et une mortalité d'une ampleur inégalée dans le monde, ce qui s'est soldé par des situations sanitaires critiques et a mis les ressources de santé sous forte pression. L'agent causal, le *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2; en français: coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère), est un nouveau *bêta-coronavirus* avec une similarité phylogénétique avec le virus SARS-CoV. La grippe saisonnière est une infection virale contagieuse des voies respiratoires qui est l'une des causes principales de morbidité et de mortalité dans le monde, pesant lourdement sur les services de santé. Cependant, son taux de mortalité est bien inférieur à celui de la COVID-19. Les virus de la grippe des types A et B sont les types dominants des virus de la grippe circulants et la plupart des épidémies de grippe sont liées au type A. Les infections causées par les coronavirus et les virus de la grippe sont des maladies respiratoires hautement contagieuses transmises par contact, les gouttelettes respiratoires (toux et éternuements) et les surfaces contaminées. La COVID-19 peut être cliniquement confondue avec la pneumonie causée par les virus de la grippe et la co-infection implique un pronostic défavorable. Le chevauchement de la saison de la grippe avec la pandémie de COVID-19 complique la prise en charge clinique des patients présentant des symptômes respiratoires. La détection précoce du SRAS-CoV-2 et des virus des grippes A/B est essentielle pour fournir un traitement rapide aux patients infectés par des maladies respiratoires et ainsi réduire la propagation des infections. Le dépistage combiné de la COVID-19 et de la grippe sera bénéfique, car un seul échantillon pourrait être utilisé pour distinguer les deux infections chez les patients présentant des symptômes similaires.

2. Utilisation prévue

Le kit RT-qPCR (IVD) pour la COVID-19 et la grippe A/B multiplex en une étape *COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD)* de NZYTech, est un test moléculaire destiné à la détection qualitative rapide des agents causaux de la COVID-19 et de la grippe (A et B) dans des échantillons biologiques humains. Cependant, ce kit ne fait pas de distinction entre le virus de la grippe A et le virus de la grippe B car ils sont tous deux détectés dans le même canal de fluorescence FAM. De plus, les autres bêta-coronavirus ou virus grippaux, p. ex. le virus de la grippe C, ne sont pas détectés avec ce kit. Ce test est destiné à être utilisé comme une aide au diagnostic du SRAS-CoV-2 et du virus de la grippe en combinaison avec les facteurs de risque cliniques et épidémiologiques. Un résultat positif indiquent la présence d'ARN du SARS-Cov-2 et/ou du virus de la grippe, mais une corrélation clinique avec les antécédents médicaux du patient et les autres informations diagnostiques est nécessaire pour déterminer le statut infectieux du patient. Les résultats négatifs n'excluent pas l'infection par le SARS-CoV-2 ou le virus de la grippe. Ils ne doivent donc pas être utilisés comme seule base 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'analyse

Le kit *COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD)*de NZYTech fournit le set complet de réactifs et de sondes pour détecter qualitativement les génomes du SARS-CoV-2 et des virus de la grippe A/B, via des plates-formes courantes de PCR en temps réel (voir les spécifications requises pour l'instrument dans la **Section 6**). Le virus SARS-CoV-2 est identifié en détectant des cibles RT-qPCR situées dans les gènes RdRp et N. En revanche, les virus de la grippe A et de la grippe B sont détectés par amplification de cibles situées dans les gènes M1 et NS2, respectivement. Le kit COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD) de NZYTech est conçu pour avoir le profil de détection le plus large possible tout en restant spécifique aux génomes du SARS-CoV-2 (y compris l'identité complète des variants Delta (B.1.617.2) et Omicron (B.1.1.529)) et des virus de la grippe de types A et B. Il fournit le set complet des réactifs et des sondes pour détecter les trois génomes viraux, et comprend notamment un contrôle interne efficace pour confirmer l'extraction efficace de l'ARN des échantillons et l'absence d'inhibiteurs de la PCR. Ce kit cible les régions hautement conservées des génomes du SARS-CoV-2 et des virus de la grippe A et B, grâce à des sets d'amorces/sondes très optimisés. Les amorces et les sondes ont 100 % d'homologie avec > 95 % des plus de 10 000 séquences génomiques disponibles dans la base de données GISAID au mois de novembre 2022. De plus, les amorces et les sondes ne présentent aucune homologie significative avec des génomes non apparentés, ce qui rend ce test très spécifique. L'évolution naturelle des virus détectés par ce kit implique que de nouvelles informations sur les séquences qui reflète les stratégies d'adaptation virales bien connues, seront disponibles après la conception initiale de ce kit. Par conséquent, NZYTech examinera périodiquement les cibles génomiques virales et, si nécessaire, lancera de nouvelles versions de ce kit. La RT-qPCR en une étape en temps réel est la méthode la plus rapide et la plus fiable pour effectuer une détection précise des ARN viraux du SRAS-CoV-2 et des virus de la grippe A et B. Le kit COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD) de NZYTech est une analyse multiplex détectant le SARS-CoV-2, les virus de la grippe A et de la grippe B et des acides nucléiques humains (faisant office de contrôle positif interne). L'ARN extrait et purifié est transcrit en ADNc puis amplifié en une seule réaction à l'aide de cinq sets d'amorces/sondes très spécifiques, à savoir ceux détectant l'ARN polymérase dépendante de l'ARN (RdRp) du SRAS-CoV-2 et les gènes de la phosphoprotéine (N) de la nucléocapside, les gènes spécifiques Matrix (M1) et Nonstructural 2 (NS2) des virus de la grippe A et de la grippe B et le gène de la ribonucléase P humaine (RNase P, RP). Le kit exploite le principe TaqMan®. Pendant ce processus, les sondes s'hybrident spécifiquement à leurs gènes cibles et lors de l'amplification de l'ADN, par deux amorces flanquantes, elles sont soumises à une dégradation conduisant à la séparation du colorant rapporteur du quencher, produisant ainsi une augmentation de la fluorescence. La détection du contrôle interne (le gène de la RNase P humaine) valide l'efficacité du procédé d'extraction, ainsi que l'absence d'inhibiteurs de la PCR potentiellement présents dans les échantillons biologiques humains. Pour permettre d'identifier l'amplification des cinq cibles spécifiques en une seule réaction, les sondes spécifiques du SARS-CoV-2, des virus de la grippe A et de la grippe B et de la RNase P humaine sont marquées différemment avec les colorants rapporteurs Texas Red®, FAM™ et HEX™, respectivement. Notez que ce panel contient une analyse duplex dans les canaux Texas Red® (gènes cibles spécifiques RdRp et N de SARS-CoV-2) et FAM™ (gènes cibles spécifiques des virus de la grippe A et de la grippe B). Cela permet de rapporter une performance additive des analyses pour la détection du SRAS-CoV-2, sans permettre cependant la distinction entre les infections par la grippe A et celles par la grippe B. De plus, les cinq sets d'amorces/sondes sont fournies dans des concentrations optimisées

garantissant que l'amplification des acides nucléiques moins abondants n'est pas compromise lorsque les autres cibles virales sont présentes à des concentrations plus élevées.

4. Composition du kit

Le kit COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD) de NZYTech fournit un set de réactifs suffisants pour effectuer 96 réactions de RT-qPCR en une seule étape.

Composants du kit		**Nombre de flacons**	**Volume (par flacon)**
COVID-19/Flu MMix	Mélange principal de sondes RT-qPCR multiplex en une étape NZY (2x)	1	1050 µL
COVID-19/Flu Primer Mix	Mélange d'amorces spécifiques à la COVID-19 et aux grippes A/B (20x)	1	103 µL
COVID-19/Flu Probe Mix	Mélange de sondes spécifiques à la COVID-19 et aux grippes A/B (20x)	1	103 µL
COVID-19/Flu Pos 1	Contrôle positif 1 spécifique à la COVID-19 et aux grippes A/B (gènes ORF1ab de SARS-CoV-2, NS2 du virus de la grippe B et RP humain)	1	105 µL
COVID-19/Flu Pos 2	Contrôle positif 2 spécifique à la COVID-19 et aux grippes A/B (gènes N de SARS-CoV-2, M1 du virus de la grippe A et RP humain)	1	105 µL
NTC	Contrôle sans matrice	1	105 µL

5. Stockage, stabilité et conditions de manipulation

Le kit COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD) est expédié réfrigéré. Tous les composants doivent être immédiatement stockés entre -85 et -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 de sondes COVID-19 & Flu A/B Probe Mix (20x) doit être conservé à l'abri de la lumière. En particulier, n'exposez pas le mélange principal NZYMultiplex One-step RT-qPCR Probe Master Mix aux rayons directs du soleil après l'avoir mélangé avec le mélange de sondes.
- Veuillez contacter NZYTech si l'emballage qui protège le kit, arrive endommagé.
- Faites attention à la date d'expiration indiquée sur l'emballage. NZYTech ne recommande pas l'utilisation du kit après la date d'expiration. À cette date, le kit doit être jeté en suivant les instructions d'élimination de la **Section 8.2**.

6. Matériels et appareils requis mais non fournis

- Appareil de PCR en temps réel qui détecte les colorants fluorescents Texas Red®, FAM™ et HEX™ (à des longueurs d'onde d'émission de 615, 520 et 556 nm, respectivement). Consultez la **section 11** pour connaître les modèles d'appareil pour lesquels le kit a été validé.

- Équipements et consommables pour isoler l'ARN viral à partir des échantillons respiratoires.
- Articles en plastique pour la qPCR sans RNase/DNase : tubes PCR, barrettes, bouchons, plaques à 96 puits, films adhésifs.
- Pipettes et embouts de filtre (sans RNase/DNase).
- Gants jetables.
- Vortex et centrifugeuse.

7. Collecte et préparation de l'échantillon

Différents facteurs, tels que le protocole de collecte d'échantillons à partir de prélèvements respiratoires humains (écouvillons pour prélèvement nasopharyngé ou oropharyngé, lavages/aspirations nasopharyngées, aspirations nasales, expectoration, liquide de rinçage oropharyngé (LROP) et lavage broncho-alvéolaire (LBA)), 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 COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD) de NZYTech. Veuillez vous assurer que les échantillons d'ARN sont appropriés en termes de pureté, de concentration et d'intégrité des acides nucléiques. Un rapport $A_{260/280}$ d'environ 2 est généralement accepté pour l'ARN pur. Étant donné que l'éthanol est un puissant inhibiteur de la PCR, il est nécessaire de l'éliminer complètement avant l'élution de l'acide nucléique lors de l'extraction. Le kit de NZYTech intègre une réaction de contrôle interne de l'extraction d'ARN qui cible l'ARN humain, qui est co-purifié avec l'ARN viral. L'ARN humain est amplifié avec le jeu d'amorces/de sondes spécifique au gène RNase P (RP). Cela 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'analyse 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 par le kit ne doit être réalisée 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.
- Ne pas utiliser ce kit après la date d'expiration.
- Ne pas utiliser les composants du test si la fermeture du kit est endommagée.
- Ne pas intervertir 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.
- Les contrôles positifs contiennent un nombre élevé de copies modèles. Ils doivent être ouverts et traités 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 (COVID/Flu Neg / eau dans 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.
- 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 pas manger, boire ou fumer dans la zone de travail.

9. Procédure de test

Veuillez lire attentivement le mode d'emploi avant d'effectuer l'analyse. Attention, toutes les étapes de pipetage et la mise en place de la plaque expérimentale doivent être effectuées sur des refroidisseurs de paillasse ou de la glace. Après avoir ajouté les réactifs à la plaque, lancez immédiatement le protocole de RT-qPCR 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 les contrôles positifs 1 et 2 spécifiques à la COVID-19 et aux grippes A/B en dernier pour éviter les contaminations.**

9.1. Mise en place de la réaction

1. Préparez un mélange de RT-qPCR suffisant pour le nombre de tests 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	**1 test Volume (µl)**	***n* tests (*) volume + 5 % (µL)**
COVID-19/Flu MMix (2x)(**)	10	*n* x 10,5
COVID-19/Flu Primer Mix (20x)	1	*n* x 1,05
COVID-19/Flu Probe Mix (20x)	1	*n* x 1,05
Volume final	**12**	***n* x 12,6**

(*) Pour calculer le nombre total de réactions nécessaires pour chaque analyse, comptez le nombre d'échantillons à tester et ajouter trois réactions ou plus pour les contrôles négatifs et deux contrôles positifs. (**) Veuillez noter qu'un précipité au fond du tube de master mix peut être constaté, en particulier après plusieurs cycles de congélation/décongélation. 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 mélange-maître avant le pipetage.

2. Pipetez 12 µL du mélange RT-qPCR dans chaque puit individuel selon la mise en place de votre plaque expérimentale pour la PCR en temps réel.
3. Pour le contrôle négatif, ajoutez 8 µL de Contrôle sans matrice (NTC) 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 COVID-19/grippe, selon la mise en place de votre plaque expérimentale. Le volume final dans chaque puits doit être de 20 µL.
5. Pour les deux contrôles positifs, ajoutez 8 µL de COVID-19/Flu Pos 1 (détecte les gènes ORF1ab du SARS-CoV-2, NS2 du virus de la grippe B et RP humain) et 8 µL de COVID-19/Flu Pos 2 (gènes N du SARS- CoV-2, M1 du virus de la grippe A et RP humain) au lieu de la matrice d'ARN dans les puits de contrôle positif. Le volume final doit être de 20 µL.
6. Recouvrez et puis scellez la plaque avec un film adhésif avec des propriétés optiques appropriées avant de procéder aux étapes de RT-qPCR et de détection.
7. Placez la plaque de réaction dans l'appareil de PCR en temps réel et exécutez le protocole de RT-qPCR conformément à la section ci-dessous.

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

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

Suggestion de paramètres des cycles de RT-PCR

Cycles	Température	Temps	Étape
1	50°C	20 min	Rétrotranscription
1	95°C	3 min	Activation de la polymérase
40	95°C	5 s	Dénaturation
	60°C	1 min	Hybridation/élongation

** Les données des signaux fluorescents doivent être collectées lors de cette étape via les canaux Texas Red/JUN, FAM™ et HEX/VIC.*

Colorants fluorescents et canaux de détection

Cibles	Colorants fluorescents
RdRp & N (SARS-CoV-2)	Texas Red®
Flu A M1 (Influenza A)	FAM™
Flu B NS2 (Influenza B)	FAM™
RNase P	HEX™/VIC®
COVID-19/Flu Pos 1	Texas Red® & FAM™ & HEX™/VIC®
COVID-19/Flu Pos 2	Texas Red® & FAM™ & HEX™/VIC®

Le kit COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD) de NZYTech a été validé pour les systèmes de PCR en temps réel suivants : Applied Biosystem® 7500 FAST, Applied Biosystem® QuantStudio 5 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

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 (Texas Red, FAM et HEX) 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 :

Contrôles positifs: l'amplification des courbes FAM (virus de la grippe B dans le Contrôle 1 et virus de la grippe A dans le Contrôle 2), Texas Red (gène ORF1ab de SARS-CoV-2 dans le Contrôle 1 et gène N de SARS-CoV-2 dans le Contrôle 2) et HEX/VIC (RNase P) est positive. Les contrôles

positifs devraient s'amplifier à des Ct<32, dans les trois canaux. Le non-respect de ce critère de contrôle qualité indique fortement que l'expérience a été compromise.

Contrôle négatif (aucune réaction de la matrice): aucune amplification n'est détectée. Si le contrôle négatif a des courbes d'amplification (Texas Red, FAM et HEX/VIC) 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-qPCR.

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'analyse a été compromise ou mal exécutée, et elle doit être considérée comme **invalide**.
Veuillez effectuer à nouveau le test.
Si le problème persiste, contactez le fabricant.

10.2. Interprétation des résultats du test

Le SRAS-CoV-2 est détecté si la courbe d'amplification de Texas Red présente une forme sigmoïde avec un Ct≤35, quel que soit le résultat obtenu pour l'analyse RNase P (HEX/VIC).

Les virus de grippe A et/ou de la grippe B sont détectés si la courbe d'amplification FAM présente une forme sigmoïde avec un Ct≤35, quel que soit le résultat obtenu pour l'analyse RNase P (HEX/VIC).

Le SARS-CoV-2 et les virus de la grippe A et/ou de la grippe B ne sont pas détectés si les courbes Texas Red et FAM ne s'amplifient pas ou s'amplifient à Ct>35, tandis que l'analyse RNase P (HEX/VIC) affiche une courbe sigmoïde positive (Ct≤40).

Le **test est invalide** si les analyses SARS-CoV-2, virus des grippes A/B et RNase P sont négatifs. Le test doit être répété avec de l'acide nucléique re-purifié 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 (Texas Red)	**Résultat des virus de la grippe A/B** (FAM)	**Résultat de la RNase P** (HEX)	**Interprétation des résultats**
+ (Ct≤35)	**- (Ct>35)**	**+ (Ct≤40)**	**SARS-CoV-2 détecté → RÉSULTAT POSITIF**
+ (Ct≤35)	**- (Ct>35)**	**- (Ct>40)**	**SARS-CoV-2 détecté → RÉSULTAT POSITIF**
- (Ct>35)	**+ (Ct≤35)**	**+ (Ct≤40)**	**Virus de la grippe A/B détectés → RÉSULTAT POSITIF**
- (Ct>35)	**+ (Ct≤35)**	**- (Ct>40)**	**Virus de la grippe A/B détectés → RÉSULTAT POSITIF**
+ (Ct≤35)	**+ (Ct≤35)**	**+ (Ct≤40)**	**SARS-CoV-2 et virus de la grippe A/B détectés → RÉSULTAT POSITIF**
+ (Ct≤35)	**+ (Ct≤35)**	**- (Ct>40)**	**SARS-CoV-2 et virus de la grippe A/B détectés → RÉSULTAT POSITIF**
- (Ct>35)	**- (Ct>35)**	**+ (Ct≤40)**	**SARS-CoV-2 et virus de la grippe A/B non détectés → RÉSULTAT NÉGATIF**
- (Ct>35)	**- (Ct>35)**	**- (Ct>40)**	**Test non valide, répétez l'extraction et le test**

Remarque 1 : NZYTech recommande de répéter l'analyse pour tous les échantillons présentant une courbe ambiguë ou atypique ne permettant 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 plateforme de PCR en temps réel non autorisée.

• Les résultats faux positifs peuvent être causés par :

- La manipulation inappropriée d'échantillons contenant une forte concentration d'ARN viral.
- La manipulation inappropriée des contrôles positifs.
- La manipulation inappropriée du produit amplifié (plaque après l'amplification).

Les résultats négatifs n'excluent pas l'infection et le résultat du test 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

Les performances de ce kit ont été validées pour les instruments spécifiés dans la section 9.2 (voir ci-dessus). 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, observés pour des échantillons cliniques négatifs (Figure 1A) ou des échantillons de patients infectés par le SARS-CoV-2 (Figure 1B), le virus de la grippe A et/ou de la grippe B (Figure 1C) sont présentés à la Figure 1.

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 de SARS-CoV-2 et des virus de la grippe A et de la grippe B 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 testée. Ensemble, les données ont révélé que le kit COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD) de NZYTech détecte 0,25 copies d'ARN viral de SARS-CoV-2/µL, 0,75 copies d'ARN du virus de la grippe A/µL et 1.25 copies d'ARN du virus de la grippe B/µL avec une confiance ≥95 %. Ainsi, la limite de détection (LoD) expérimentale a été déterminée à 0,25 copies/µL ou 250 copies/mL pour le SARS-CoV-2, 0,75 copies/µL ou 750 copies/mL pour le virus de la grippe A et 1,25 copies/µL ou 1250 copies/mL pour le virus de la grippe B. La limite de détection expérimentale a été confirmée par 2 opérateurs différents utilisant 3 lots de kits dans une expérience, avec un total de 48 répétitions de matrice d'écouvillons oropharyngés négatifs et enrichis indépendamment. La capacité du *kit COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD)* de NZYTech à détecter le virus à différentes charges virales est présentée dans la Figure 2.

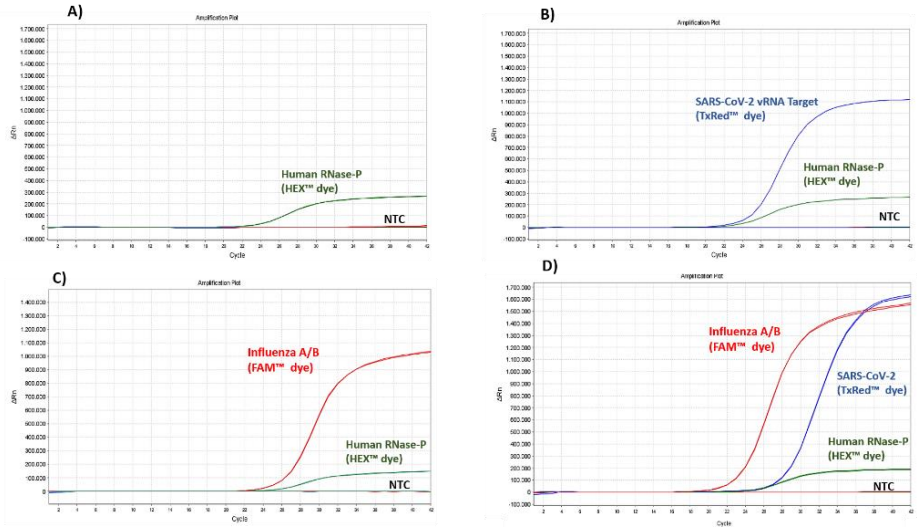


Figure 1. Détection des cibles SARS-COV-2, virus des grippes A/B et RNAse-P humaine dans des échantillons cliniques négatifs (A) ou dans des échantillons cliniques de patients infectés par SARS-CoV-2 (B), les virus de la grippe A et/ou de la grippe B (C), ou à la fois par SARS-CoV-2 et les virus des grippes A/B (D). Courbe bleue, détection des cibles ARNv du SARS-CoV-2 via le canal Texas Red®. Courbe rouge, détection des cibles du virus de la grippe A et/ou de la grippe B via le canal FAM™. Courbe verte, détection du gène de la RNase P humaine via le canal HEX™.

La sensibilité analytique du kit *COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD)* dans le contexte d'un scénario de co-infection a été évaluée en effectuant une série d'expériences de dilution en série à l'aide d'échantillons de co-infection fictifs pour chacune des deux cibles virales. Pour créer les échantillons de co-infection fictifs, exactement 10^4 copies d'acides nucléiques du virus de la grippe A et 10^4 copies d'acides nucléiques du virus de la grippe B ont été ajoutées à la courbe standard du SARS-CoV-2. Par contraste, 10^4 copies du SARS-CoV-2 ont été ajoutées aux courbes standard des virus de la grippe A et B. Des échantillons en 4 exemplaires de 3 lots de kits (soit un total de 12 répétitions par dilution) ont été testés avec le kit COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD) pour déterminer la sensibilité de l'analyse lorsque plusieurs cibles virales sont présentes dans un échantillon. Les données ont révélé que la LoD du SARS-CoV-2 et du virus de la grippe A n'était pas modifiée en cas de co-infection. Cependant, la LoD du virus de la grippe B est passée à 1,75 copies/µL ou 1750 copies/mL en cas de co-infection.

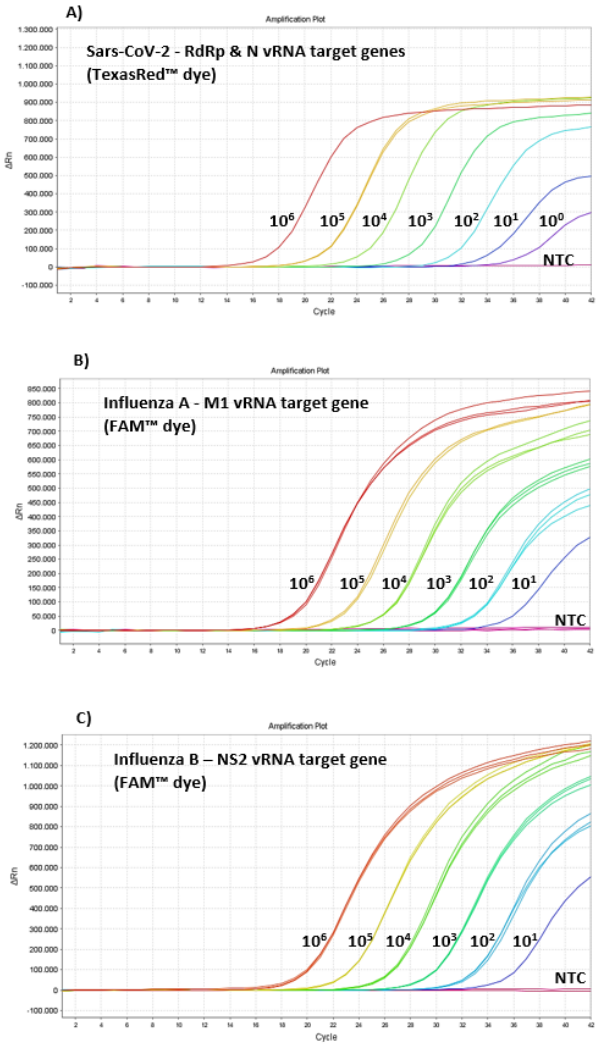


Figure 2. Sensibilité du COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD). Courbe d'amplification (nombre de cycles *en fonction de* la fluorescence - ΔRN) de dilutions en série à 1:10 des ARNv du SARS-CoV-2 (A), du virus de la grippe A (B) et du virus de la grippe B (C). NTC: *No Template Control* (contrôle négatif).

11.3. Réactivité analytique (inclusivité) et spécificité analytique

L'inclusivité et la réactivité croisée ont été évaluées par analyse *in silico* des sondes et amorces oligonucléotidiques avec des pathogènes liés au SRAS-CoV-2, au virus de la grippe A, le virus de la grippe B et des pathogènes normaux qui provoquent une infection avec des symptômes similaires, respectivement. L'analyse *in silico* a révélé que la conception de l'analyse détectait

toutes les souches du virus SARS-CoV-2, du virus de la grippe A et du virus de la grippe B, et que l'analyse ne montrait aucune réactivité avec les espèces non apparentées. En plus de l'analyse *in silico*, le kit *COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR* a été utilisé sur les acides nucléiques des microbes courants des voies respiratoires et buccales, y compris *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Dickeya dadantii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium mageritense*, *Mycobacterium smegmatis*, *Nocardia nova*, *Pseudomonas mendocina*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces albidoflavus*. Aucun des agents pathogènes testés par le kit *COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD)* n'a généré de signal d'amplification détectable.

11.4. Précision

La précision analytique du *COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD)* de NZYTech a été déterminée par en testant répétitivement des échantillons positifs représentant deux niveaux de charge virale, 200 (charge virale faible) et 2000 (charge virale moyenne) copies par réaction, 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 la moyenne de Cq, le coefficient de variation Cq 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 seul opérateur en analysant 12 répétitions de chaque échantillon (200 et 2000 copies par réaction), soit un nombre final de 24 tests effectués par cible.

11.4.2. Reproductibilité quotidienne

La reproductibilité quotidienne a été évaluée par un seul opérateur en analysant 48 répétitions de chaque échantillon (200 et 2000 copies par réaction), pendant 4 jours avec 12 répétitions de chaque concentration par jour (un total de 96 analyses par cible 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 60 répétitions de chaque échantillon (200 et 2000 copies par réaction) en utilisant 3 lots de kits différents avec 20 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 (200 et 2000 copies par réaction), par 4 opérateurs différents, avec 6 répétitions par opérateur et par charge virale, soir un total de 36 répétitions par opérateur, incluant les 3 cibles du kit.

Précision du COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD) de NZYTech, pendant la détection de la cible SARS-CoV-2.

Variable		SARS-CoV-2 (copies/réaction)	
		200	**2000**
Répétabilité	n	12	12
	Cq moyen	28,87	26,35
	Coefficient de variation (%)	0,95	1,92
	% de détection des répétitions	100	100
Reproductibilité quotidienne	n	12	12
	Cq moyen	28,87	26,35
	Coefficient de variation (%)	0,95	1,92
	% de détection des répétitions	100	100
Reproductibilité de lot à lot	n	60	60
	Cq moyen	28,86	25,97
	Coefficient de variation (%)	1,97	2,71
	% de détection des répétitions	100	100
Reproductibilité de l'opérateur	n	24	24
	Cq moyen	28,87	25,68
	Coefficient de variation (%)	2,54	2,20
	% de détection des répétitions	100	100
Reproductibilité inter-appareils	n	24	24
	Cq moyen	29,83	26,89
	Coefficient de variation (%)	3,29	2,46
	% de détection des répétitions	100	100

Précision du COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD) de NZYTech, pendant la détection de la cible virus de la grippe A.

Variable		Virus de la grippe A (copies/réaction)	
		200	**2000**
Répétabilité	n	12	12
	Cq moyen	30,47	26,46
	Coefficient de variation (%)	0,82	0,53
	% de détection des répétitions	100	100
Reproductibilité quotidienne	n	48	48
	Cq moyen	30,75	26,51
	Coefficient de variation (%)	1,39	1,13
	% de détection des répétitions	100	100
Reproductibilité de lot à lot	n	60	60
	Cq moyen	30,69	26,61
	Coefficient de variation (%)	1,35	1,13
	% de détection des répétitions	100	100
Reproductibilité de l'opérateur	n	24	24
	Cq moyen	30,79	26,61
	Coefficient de variation (%)	1,55	1,06
	% de détection des répétitions	100	100
Reproductibilité inter-appareils	n	24	24
	Cq moyen	30,00	26,07
	Coefficient de variation (%)	1,76	1,63
	% de détection des répétitions	100	100

Précision du COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD) de NZYTech, pendant la détection de la cible virus de la grippe B.

Variable		Virus de la grippe B (copies/réaction)	
		200	**2000**
Répétabilité	n	12	12
	Cq moyen	30,72	26,82
	Coefficient de variation (%)	0,81	1,08
	% de détection des répétitions	100	100
Reproductibilité quotidienne	n	48	48
	Cq moyen	30,78	26,82
	Coefficient de variation (%)	1,14	3,05
	% de détection des répétitions	100	100
Reproductibilité de lot à lot	n	60	60
	Cq moyen	30,76	26,82
	Coefficient de variation (%)	1,08	2,77
	% de détection des répétitions	100	100
Reproductibilité de l'opérateur	n	24	24
	Cq moyen	30,87	26,71
	Coefficient de variation (%)	1,11	0,73
	% de détection des répétitions	100	100
Reproductibilité inter-appareils	n	24	24
	Cq moyen	30,15	26,34
	Coefficient de variation (%)	2,01	2,04
	% de détection des répétitions	100	100

11.4.5. Reproductibilité inter-appareils

La reproductibilité inter-appareils a été mesurée en testant 36 répétitions de chaque échantillon (200 et 2000 copies par réaction), dans 2 appareils de qPCR différents (Applied Biosystem® 7500 FAST et Applied Biosystem® QuantStudio 5), soit 72 tests au total par échantillon.

11.5. Évaluation clinique

L'évaluation de la performance du COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD) de NZYTech (IVD) avec des échantillons d'écouvillonnage nasopharyngé collectés a été réalisée par un laboratoire externe. Au total, 250 échantillons cliniques ont été testés, à savoir: 72 échantillons cliniques positifs pour le virus de la grippe A (36 pour AH1 et 36 pour AH3), 58 échantillons cliniques positifs pour le virus de la grippe B, 60 échantillons cliniques positifs pour SRAS-CoV-2 et 60 échantillons cliniques négatifs. Les données ont révélé une concordance de 100 % pour tous les échantillons positifs et négatifs testées.

12. Contrôle qualité

Tous les composants du COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD) de NZYTech sont testés en suivant les protocoles décrits ci-dessus. Le système PCR pentaplex en temps réel permet la détection des cibles décrites pour l'identification de l'ARN viral du SRAS-CoV-2 (gènes RdRp et N), l'ARN viral des virus de la grippe A/B (gènes M1 et NS2 respectivement), ainsi que

l'ARNm 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™ et HEX™/VIC®, 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 de lot		À utiliser avant
	Limitation 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 : COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD.

Numéro de catalogue : MD04851.

Utilisation prévue : détection qualitative du SARS-CoV-2, du virus de la grippe A et du virus de la grippe B.

Fabricant: NZYTech - Genes & Enzymes,

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar

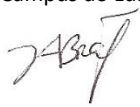
Edifício E, R/C,

1649-038, Lisbonne

Portugal

Nous soussignés, NZYTech, Lda - Genes & Enzymes, déclarons par la présente que ce produit, auquel se rapporte cette déclaration de conformité, est conforme aux normes et autres documents normatifs suivants ISO 9001:2015 et ISO 13485:2016, conformément aux dispositions de la directive 98/79/CE et du règlement (UE) 2017/746 relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro telle que 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