SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD

Kit II de RT-qPCR du SARS-CoV-2 en une étape, gènes RdRp et N, diagnostic in vitro (IVD)

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

REF MD04871, 96 réactions
MD04872, 4 x 96 réactions

Réservé au diagnostic* in vitro *par des professionnels

CE IVD

FR

Mode d'emploi

IM-004fr

VERSION 15/2022, 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

Tables des matières

1. Introduction 3
2. Utilisation prévue 3
3. Principes de l'analyse 3
4. Composition du kit 4
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 10
10.1. Critères de validation des cycles 10
10.2. Interprétation des résultats du test 11
11. Évaluation de la performance 12
11.1. Résultats attendus 12
11.2. Limite de détection (LoD) - Sensibilité analytique 13
11.3. Inclusivité, réactivité croisée et substances interférentes 13
11.4. Précision 15
11.5. Évaluation clinique 18
12. Contrôle qualité 18
13. Assistance technique 18
14. Marques déposées et avis de non-responsabilité 18
15. Explication des symboles 19
16. Déclaration de conformité 20
17. Références 21

1. Introduction

Le coronavirus SARS-CoV-2 (« Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2 »), précédemment nommé 2019-nCoV, est l'agent responsable de la Maladie à Coronavirus 2019 (en anglais : « Coronavirus Disease 2019 » ou COVID-19). Comme le coronavirus SRAS qui lui est étroitement apparenté, il appartient au genre *Betacoronavirus* de la famille des coronavirus. Les coronavirus sont de grands virus à ARN monocaténaire positif enveloppés et qui infectent les humains, tout comme un grand nombre d'espèces animales. Considéré comme d'origine zoonotique, le virus SRAS-CoV-2 est très contagieux et se transmet principalement par des 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, 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. Bien que des vaccins soient actuellement déjà disponibles pour lutter contre la COVID-19, ils n'empêchent pas l'infection dans les populations vaccinées.

2. Utilisation prévue

Le kit NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD est un test moléculaire utilisant la réaction de polymérisation en chaîne par transcription inverse en temps réel (RT-qPCR) et conçu pour la détection qualitative rapide des acides nucléiques du virus SARS-CoV-2 dans les prélèvements par écouvillonnage nasopharyngé ou oropharyngé de personnes suspectées d'avoir la COVID-19. Un résultat positif indiquent la présence d'ARN du 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'analyse

Le kit NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD fournit l'ensemble complet des réactifs et de sondes nécessaires pour détecter qualitativement le génome du SARS-CoV-2, via des plates-formes courantes de PCR en temps réel (voir les spécifications requises pour l'instrument dans la **Section 6**). Les gènes de l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) et de la phosphoprotéine de nucléocapside (N) du virus ont été précédemment identifiés comme des marqueurs très spécifiques du virus SARS-CoV-2. Ce kit de NZYTech cible des régions

spécifiques dans les gènes RdRp et N du génome de 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 5 millions de séquences génomiques disponibles dans la base de données GISAID au mois de novembre 2021, y compris l'identité complète des variants Delta (B.1.617.2) et Omicron (B.1.1.529). 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 virus et bactéries respiratoires. Un contrôle interne est inclus pour confirmer l'extraction efficace de l'ARN à partir d'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 (les gènes RdRp et N de SARS-CoV-2 et le gène de la RNase P humaine (RP)). 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 reflètent les stratégies d'adaptation du SRAS-CoV-2. Par conséquent, NZYTech examinera périodiquement les cibles génomiques du SARS-CoV-2 et, si nécessaire, lancera de nouvelles versions de ce kit.

La RT-qPCR en une étape reste la méthode la plus fiable et la plus sensible pour effectuer une détection précise de l'ARN du virus SRAS-CoV-2, qui indique une infection humaine. L'ARN viral isolé et purifié à partir d'échantillons infectés est rétro-transcrit en ADNc puis amplifié en une seule réaction en utilisant deux jeux d'amorces/sondes très spécifiques exploitant le principe « TaqMan® ». Au cours de ce processus, les sondes s'hybrident spécifiquement à deux régions du génome du SRAS-CoV-2, à savoir les gènes RdRp (dans le gène de la polyprotéine ORF1ab) et N. Un jeu d'amorces/de sondes supplémentaire sert de contrôle interne endogène pour détecter les acides nucléiques du gène RP humain et permet d'évaluer la qualité de l'échantillon. Pour permettre d'identifier l'amplification des trois cibles spécifiques en une seule réaction, les sondes spécifiques des gènes RdRp et N du virus SARS-CoV-2 et du gène RP humain sont marquées différemment avec les colorants rapporteurs HEX™, FAM™ and Cy5™, respectivement. Notez que ce panel contient une analyse duplex dans deux canaux optiques distincts, HEX™ (alternativement : VIC™ ou JOE™) et FAM™, pour rendre compte de la performance de l'amplifications des deux gènes du virus SARS-CoV-2. De plus, les amorces et les sondes sont fournies à 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 des jeux d'amorces/sondes utilisés pour détecter le virus SARS-CoV-2.

4. Composition du kit

Le kit NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD fournit un ensemble complet de réactifs et de contrôles pour détecter qualitativement le virus SARS-CoV-2 en une seule étape.

Composants du kit		Volume (par flacon)	Nombre de flacons	
			MD04871	MD04872
SARS-CoV-2 MMix II, ROX (RdRp & N)*	Mélange principal NZYSupreme pour la RT-qPCR en une étape, ROX*	1050 µL	1	4
SARS-CoV-2 PPMix II (RdRp & N)	Mélange II d'amorces/sondes pour SARS-CoV-2/RP (marquées par HEX™, FAM™ et Cy5™)	205 µL	1	4
SARS-CoV-2 POS (RdRp & N)	Contrôle positif pour SARS-CoV-2 (gènes RdRp et N)/RP (1 x 10^4 copies/µL)	105 µL	1	4
NTC	Contrôle du réactif d'amplification (sans matrice)	105 µL	1	4

**Bien que la plupart des appareils de PCR en temps réel mesurant le colorant ROX permettent aux utilisateurs d'effectuer des expériences et d'analyser des données sans ROX, l'inclusion de ce colorant de référence passif interne prévient les erreurs d'interprétation des données et permet de détecter et de diagnostiquer les erreurs.*

5. Stockage, stabilité et conditions de manipulation

Le kit SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, 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. Procédez également en suivant les instructions suivantes :

- Minimisez le nombre de cycles de congélation-décongélation en reconditionnant et en stockant les composants en aliquots de travail. Si nécessaire, les composants du kit peuvent être conditionnés en aliquots de plus petits volumes après leur décongélation.

- Le mélange SARS-CoV-2/RP primers/probe Mix II doit être conservé à l'abri de la lumière. En particulier, n'exposez pas le mélange SARS-CoV-2 MMix II ROX (RdRp & N) aux rayons directs du soleil après l'avoir mélangé avec le mélange d'amorces/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 FAM™, HEX™/JOE™/VIC© et Cy5™ (à des longueurs d'onde d'émission de 520, 556/ 555/554 et 670 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), 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 NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD. 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 en temps réel, il est nécessaire de l'éliminer 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 RP humain. 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 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.
- 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.
- Le contrôle positif contient un nombre élevé de copies modèles. Il doit être ouvert et traité à l'écart des échantillons de test et des composants du kit pour éviter la contamination croisée.
- Utilisez toujours le tube NTC pour préparer la réaction de contrôle sans matrice.
- 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 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 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 le contrôle positif SARS-CoV-2 POS (RdRp & N) en dernier pour éviter toute contamination croisée.**

9.1. Mise en place de la réaction

1. Préparez un mélange de RT-qPCR suffisant pour le nombre de tests SARS-CoV-2/RP 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)**
SARS-CoV-2 MMix II, ROX (RdRp & N) (**)	10	*n* x 10,5
SARS-CoV-2 PPMix II (RdRp & N)	2	*n* x 2,1
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 ajoutez deux réactions pour les contrôles négatif NTC et positif, respectivement.
(**) Veuillez noter qu'un précipité au fond du tube de mélange principal peut être observé. Une fois le mélange principal décongelé, remettez-le en suspension avant utilisation. Dans ce cas, ne faites pas tourner le mélange principal avant le pipetage.

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 sans matrice, ajoutez 8 µL de NTC au lieu de la matrice ARN dans le puits de contrôle négatif sans matrice. 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, ajoutez 8 µL de SARS-CoV-2 Pos (RdRp & N) au lieu de la matrice ARN dans le 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-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

Les tableaux ci-dessous présentent deux protocoles thermiques optimisés (standard et rapide) pour effectuer des tests SARS-CoV-2/RP à l'aide du kit SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, gènes RdRp et N, IVD, sur les plateformes mentionnées ci-dessous.

- **Protocole Standard**

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. Recueillez les signaux (FAM, HEX/JOE/VIC et Cy5).*

Le **protocole standard** pour le kit II de RT-PCR en une étape NZYTech SARS-CoV-2, des gènes RdRp et N, IVD, a été validé pour les systèmes de PCR en temps réel suivants : Applied Biosystem® 7500 FAST, Applied Biosystem® QuantStudio 5, Applied Biosystem ® QuantStudio 6 Pro et Bio-Rad® CFX96™. Si d'autres équipements sont utilisés, le kit doit être validé par l'utilisateur en utilisant des échantillons préalablement caractérisés (positifs et négatifs).

- **Protocole rapide**

Cycles	Température	Temps	Étape
1	50 °C	10 min	Rétrotranscription
1	95 °C	1 min	Activation de la polymérase
40	95 °C	5 s	Dénaturation
	60 °C	20 s	Hybridation/élongation*

**En fonction de l'équipement utilisé, sélectionnez le bon canal de détection. Collectez les signaux (FAM, HEX/JOE/VIC et Cy5).*

Le **protocole rapide** pour le kit II de RT-PCR en une étape NZYTech SARS-CoV-2, des gènes RdRp et N, IVD, a été validé pour les systèmes de PCR en temps réel suivants : Applied Biosystem® QuantStudio 5 et Bio-Rad® CFX96™. Si d'autres équipements sont utilisés, le kit doit être validé par l'utilisateur en utilisant des échantillons préalablement caractérisés (positifs et négatifs).

Les colorants fluorescents utilisés dans ce kit et leurs canaux de détection respectifs sont :

Cibles	Colorant fluorescent**	Canaux de détection
Gène RdRp de SARS-CoV-2	HEX™	JOE, VIC ou HEX
Gène N de SARS-CoV-2,	FAM™	FAM
Gène de la RNase P humaine	Cy5™	Cy5

***L'ouverture du canal ROX permettra d'utiliser ce colorant de référence passif interne pour éviter une mauvaise interprétation des données et les erreurs qui en découleraient.*

Le kit NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD a été validé pour les systèmes de PCR en temps réel suivants : Applied Biosystem® 7500 FAST, Applied Biosystem® QuantStudio 5, Applied Biosystem® QuantStudio 6 Pro 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 du génome viral, qui sont détectées dans des canaux de fluorescence différents (FAM™ et HEX™), et le gène RP humain (contrôle positif) dans un troisième canal (Cy5™). 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 trois signaux de fluorescence (FAM™, HEX™ et Cy5™) 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 HEX™ (pour le gène RdRp du virus SARS-CoV-2), FAM™ (pour le gène N du virus SARS-CoV-2) et Cy5™ (pour le gène RP humain) sont positives. Le contrôle positif devrait s'amplifier à un Ct < 30, à la fois dans les canaux FAM, HEX/JOE/VIC et Cy5. Le non-respect de ce critère de contrôle qualité indique fortement que l'expérience a été compromise.

Contrôle négatif (NTC) : aucune amplification n'est détectée. Si le contrôle négatif a une, deux ou trois courbes d'amplification (HEX™, FAM™ et/ou Cy5™) 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'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 virus SARS-CoV-2 est détecté** si les courbes d'amplification de HEX™ et FAM™ présentent une forme sigmoïde avec un Ct ≤ 36, quel que soit le résultat obtenu pour l'analyse de RP (Cy5™).
- **Le virus SARS-CoV-2 n'est pas détecté** si les courbes d'amplifications de HEX™ et FAM™ ne sont pas positives (Ct > 36) alors que l'analyse de RP (Cy5™) présente une courbe sigmoïde positive (Ct < 40).
- **Le test n'est pas concluant pour le virus SARS-CoV-2** si l'une des courbes d'amplification de HEX™ ou FAM™ ne présente pas de forme sigmoïde avec un Ct ≤ 36 alors que l'autre cible de SARS-CoV-2 est positive, quel que soit le résultat obtenu pour l'analyse de RP (Cy5™). Le test doit être répété avec de l'acide nucléique repurifié à partir de l'échantillon.

- **Le test n'est pas valide** si les analyses de SARS-CoV-2 et RP sont toutes les deux négatives. 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 Gène RdRp de SARS-CoV-2, Ct (HEX™)	**Résultat de SARS-CoV-2** Gène N de SARS-CoV-2, Ct (FAM™)	**Résultat de RP** Gène RP, Ct (Cy5™)	**Interprétation des résultats**
+ (Ct ≤ 36)	+ (Ct ≤ 36)	+/-	**Le virus SRAS-CoV-2 est détecté → RÉSULTAT POSITIF**
+ (Ct ≤ 36)	- (Ct > 36)	+/-	**Le virus SARS-CoV-2 n'est détecté qu'avec une seule cible. → RÉSULTAT NON CONCLUANT**
- (Ct > 36)	+ (Ct ≤ 36)	+/-	**Le virus SARS-CoV-2 n'est détecté qu'avec une seule cible. → RÉSULTAT NON CONCLUANT**
- (Ct > 36)	- (Ct 36)	+ (Ct < 40)	**Le virus SARS-CoV-2 n'est pas détecté → RÉSULTAT NÉGATIF**
- (Ct > 36)	- (Ct > 36)	- (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 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,
- Le prélèvement de l'échantillon 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 viral de SRAS-CoV-2,
- La manipulation inappropriée du contrôle positif SARS-CoV-2 POS (RdRp & 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 la performance

L'évaluation de la performance du kit NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD a été effectuée sur les systèmes de PCR en temps réel suivants : Applied Biosystem® 7500 FAST, Applied Biosystem® QuantStudio 5, Applied Biosystem® QuantStudio 6 Pro et Bio-Rad® CFX96™ utilisant le protocole standard décrit antérieurement. 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 des échantillons cliniques contenant des acides nucléiques du virus SARS-CoV-2, sont présentés à la Figure 1. Les cas représentent des exemples d'échantillons cliniques présentant des charges élevées (panel A) et moyennes (panel B) du virus SARS-CoV-2. Veuillez noter qu'en cas de charges très élevées du virus SARS-CoV-2, la courbe du canal JOE™, correspondant au gène RNase P humain, peut être absente ou présenter une forme atypique (Figure 1A).

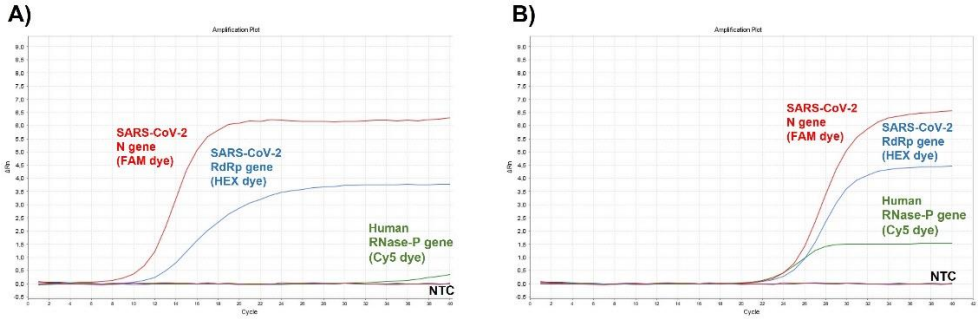

Figure 1. Détection simultanée des cibles de SARS-CoV-2 (gènes RdRp et N) et du gène de la RNase-P humaine dans des échantillons cliniques positifs avec des charges élevées (A) et moyennes (B) de virus SARS-CoV-2. Courbe rouge : détection de la cible ARNv du SARS-CoV-2 (gène N) via le canal FAM ; **courbe bleue** : détection de la cible ARNv du SARS-CoV-2 (gène RdRp) via le canal HEX (*ou alternativement VIC/JOE*) ; **courbe verte** : détection du gène de la RNase P humaine via le canal Cy5.

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 et 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 3 jours, en produisant 96 répétitions pour chaque concentration de SRAS-CoV-2 testée. Ensemble, les données ont révélé que le kit NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes (IVD) détecte 0,25 copie d'ARN viral de SARS-CoV-2/µL ou 250 copies d'ARN viral de SARS-CoV-2/mL avec une confiance ≥ 95 % quand le protocole standard est utilisé. La LoD expérimentale a été confirmée par 2 opérateurs différents utilisant 3 lots de kit dans une expérience, avec un total de 48 répétitions de matrice provenant d'écouvillons oropharyngés négatifs et enrichis indépendamment. Le même LoD a été confirmé pour le protocole rapide.

11.3. Inclusivité, réactivité croisée et substances interférentes

L'inclusivité et la réactivité croisée ont été évaluées par analyse *in silico* des sondes et amorces oligonucléotidiques avec des pathogènes liés au virus SRAS-CoV-2 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 et qu'elle ne montrait aucune réactivité avec les espèces qui ne sont pas SARS-CoV-2.

Une analyse *in vitro* de la réactivité croisée (exclusivité) a été réalisée pour confirmer que le kit NZYTech SARS-CoV-2 One-step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD ne réagit pas avec les autres microbes et agents pathogènes colonisant les humains et couramment trouvés dans les échantillons cliniques. Cette étude a été réalisée en utilisant 3 panels commerciaux de pathogènes respiratoires obtenus auprès de ZeptoMetrix, à savoir : RP Multimarker Controls

(#MDZ001), NATtrol™ Respiratory Pathogen Panel-1 (#NATRPP-1) et NATtrol™ RP Controls, (#NATRPC-NNS). Ces panels comprennent des mélanges pathogènes représentatifs de vrais échantillons cliniques humains, y compris : virus de la grippe A H3N2 (Brisbane/10/07), virus de la grippe A H1N1 (NY02/2009), rhinovirus de type 1A, adénovirus de type 3 ; virus para-influenza de type 1, virus para-influenza de type 2, virus para-influenza de type 3, virus para-influenza de type 4, métapneumovirus (Peru 6-2003), *Chlamydophila pneumoniae* (CWL-029), *Mycoplasma pneumoniae* (M-129), coxsackievirus (type A1), virus de la grippe A H1N1 (A/New Cal/20/99), virus de la grippe A H1N1 (A/Singapore/63/04), virus de la grippe B (B/Florida/02/06), virus respiratoire syncytial A, virus respiratoire syncytial B (CH93 (18)-18), coronavirus (HKU-1 recombinant), coronavirus (OC43), coronavirus (NL63), coronavirus (229E), *Bordetella pertussis* (A639), *Bordetella pertussis* (A747), *Bordetella holmesii* (F061), *Legionella pneumophila* (Philadelphia) et bocavirus humain. Tous les tests ont été exécutés en triple. En outre, d'autres microbes communs de la bouche et des voies respiratoires (y compris : *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Dickeya dadantii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium mageritense*, *Mycobacterium smegmatis*, *Nocardia nova*, *Pseudomonas mendocina*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptomyces avermitilis* et *Streptomyces albidoflavus)* ont également été testés. Les données, collectées à l'aide de trois lots de kits différents, ont confirmé qu'aucun des organismes testés ne perturbait les performances du kit NZYTech SARS-CoV-2 One-step RT-qPCR Kit II en produisant un résultat faux positif ou un signal non spécifique.

Des tests ont évalué l'impact de 17 substances potentiellement interférentes en utilisant des échantillons nasopharyngés négatifs enrichis avec des échantillons positifs pour le virus SRAS-CoV-2 à env. 3 fois la LoD. Les substances potentiellement interférentes ont ensuite été ajoutées aux échantillons artificiels à des concentrations représentant les niveaux les plus élevés attendus dans les échantillons respiratoires de patients humains d'après les données de la littérature. Tous les tests ont été répétés 5 fois et les résultats ont été comparés aux données obtenues avec un test de contrôle qui ne contenait aucune substance potentiellement interférente. Aux concentrations testées, les résultats ont révélé qu'aucune des molécules testées n'affectait la sensibilité de la détection. Le tableau ci-dessous présente les données recueillies au cours de ces expériences. Toutes les expériences ont été réalisées sur l'appareil de PCR en temps réel 7500 FAST.

Substance potentiellement interférente	Ingrédient actif	Concentration finale dans l'échantillon	Interférence Oui (O) ou non (N)
Eau de mer isotonique (Rhinomer)	NaCl	15 % v/v	N
Spray pour la gorge, anesthésique et analgésique local (Strepfen)	Flurbiprofène	5 % v/v	N
Solution de lavage nasal (spray anti-allergie : Vibrocil)	Propionate de fluticasone	5 % v/v	N
Spray nasal aux corticoïdes (Nasomet)	Furoate de mométasone	5 % v/v	N
Spray nasal aux corticoïdes (Pulmicort)	Budésonide	5 % v/v	N
Antimicrobien systémique (Trobex)	Trobamycine	600 µg/mL	N
Analgésique, anti-inflammatoire et antiseptique pour la bouche (Pyralvex)	Extrait de rhubarbe, acide salicylique	5 % v/v	N
Antifongique et antibactérien oropharyngé topique (Daktarin)	Miconazole	5 mg/mL	N
Solution antiseptique pour bain de bouche (Eludril Gé)	Gluconate de chlorhexidine, chlorobutanol hémihydraté	5 % v/v	N
Sirop antitussif (Codipront)	Codéine, citrate de phényltoloxamine	5 % v/v	N
Sang total (humain)	-	4 % v/v	N
Médicament antiviral (Tamiflu)	Oséltamivir	7,5 mg/mL	N
Mucolytique (Mucolsovan)	Chlorhydrate d'ambroxol	5 % v/v	N
Solution de gouttes nasales (Nasarox)	Chlorohydrate d'oxymétazoline	10 % v/v	N
Pommade nasale antibiotique (Bactroban)	Muciprocine	5 mg/mL	N
Salive (humaine)	-	25 % v/v	N
Éthanol absolu	Alcool	5 % v/v	N

11.4. Précision

La précision analytique du kit NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD a été déterminée en testant répétitivement des acides nucléiques de SARS-CoV-2 représentant deux niveaux de charge virale, 15 (3 x LoD) et 150 (30 x LoD) copies par réaction

(0,75 et 7,50 copies/µL), 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 résumées dans le tableau présenté à la page suivante.

11.4.1. Répétabilité

La répétabilité a été évaluée par un seul opérateur en analysant 12 répétitions de chaque échantillon (15 et 150 copies par réaction), soit un nombre final de 24 tests effectués.

11.4.2. Reproductibilité quotidienne

La reproductibilité quotidienne a été évaluée par un seul opérateur en analysant 48 répétitions de chaque échantillon (15 et 150 copies par réaction), pendant 4 jours avec 12 répétitions de chaque concentration par jour (120 analyses ont été effectuées au total).

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 (15 et 150 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 36 répétitions de chaque échantillon (15 et 150 copies par réaction), par 3 opérateurs différents, avec 12 répétitions par opérateur.

11.4.5. Reproductibilité inter-appareils

La reproductibilité inter-appareils a été mesurée par un seul opérateur en testant 36 répétitions de chaque échantillon (15 et 150 copies par réaction), dans 3 appareils de qPCR différents (Applied Biosystem® 7500 FAST, Applied Biosystem® QuantStudio 5et Bio-Rad® CFX96™ Real Time PCR Systems), soit 72 tests au total par échantillon.

Précision du kit NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD

Variable testée		Gène RdRp (copies/réaction)		Gène N (copies/réaction)	
		15	**150**	**15**	**150**
Répétabilité					
	n	12	12	12	12
	Cq moyen	31,67	28,46	31,59	28,36
	Coefficient de variation (%)	1,45	0,66	1,18	0,77
	% de détection des répétitions	100	100	100	100
Reproductibilité quotidienne					
	n	48	48	48	48
	Cq moyen	32,26	28,89	32,30	28,89
	Coefficient de variation (%)	1,73	1,23	1,73	1,33
	% de détection des répétitions	98	100	98	100
Reproductibilité de lot à lot					
	n	60	60	60	60
	Cq moyen	32,14	28,81	32,16	28,78
	Coefficient de variation (%)	1,83	1,29	1,87	1,44
	% de détection des répétitions	98	100	98	100
Reproductibilité de l'opérateur					
	n	36	36	36	36
	Cq moyen	31,59	28,37	31,71	28,47
	Coefficient de variation (%)	1,92	0,74	1,82	0,84
	% de détection des répétitions	100	100	100	100
Reproductibilité inter-appareils					
	n	36	36	36	36
	Cq moyen	31,74	28,53	32,31	29,21
	Coefficient de variation (%)	1,67	1,22	2,02	2,12
	% de détection des répétitions	100	100	100	100

11.5. Évaluation clinique

Les performances du kit NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, des gènes RdRp et N, IVD, ont été évaluées par deux laboratoires externes, utilisant le protocole standard et avec des échantillons prélevés sur écouvillon nasopharyngé. Au total, 240 échantillons cliniques négatifs et 130 échantillons cliniques positifs ont été testés. Les données ont révélé qu'une concordance de 100 % a été obtenue pour tous les échantillons positifs et négatifs testés. Le protocole rapide a également été validé avec des écouvillons nasopharyngés positifs et négatifs. Les données ont révélé qu'une concordance de 100 % a été obtenue pour tous les échantillons cliniques testés.

12. Contrôle qualité

Tous les composants du kit NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD sont testés en suivant les protocoles décrits ci-dessus. Le système PCR triplex en temps réel permet la détection des cibles décrites pour l'identification de l'ARNm du 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, HEX/JOE/VIC et Cy5, 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 : SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD

Numéro de catalogue : MD04871 et MD04872

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, NZYTech, Lda – Genes & Enzymes, déclarons en vertu des présentes que ce produit, concerné par la présente déclaration de conformité, est conforme aux normes suivantes et aux autres documents normatifs : ISO 9001:2015 et ISO 13485:2016, selon les dispositions de la Directive 98/79/CE et du Règlement (UE) 2017/746 concernant les dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*, telles que transposées dans les législations nationales des Etats Membres de l'Union Européenne.

Le dossier technique du produit est conservé et tenu à jour par NZYTech, Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisbonne, Portugal.

Joana Brás, PhD

Directrice 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