Kit RT-qPCR III IVD SARS-CoV-2 5 Cibles en une étape

REF MD04911, 96 réactions
MD04912, 4 x 96 réactions

***Réservé à une utilisation professionnelle pour diagnostic* in vitro**

CE IVD

FR

Mode d'Emploi (IFU)

IM-007fr

VERSION 03/2022, septembre 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

Sommaire

1. Introduction 3

2. Usage Prévu 3

3. Principes du Test 4

4. Composition du Kit 5

5. Conservation, Stabilité et Conditions de Manipulation..... 5

6. Matériaux et Instruments Requis mais non Fournis 5

7. Collecte et Préparation des Echantillons 6

8. Précautions et Avertissements 6

8.1 Informations de Sécurité 6

8.2 Exigences relatives aux Procédures et aux Manipulations..... 7

9. Procédures de Test 7

9.1 Préparation de la Réaction 8

9.2 Programmation de l'Instrument PCR en temps réel 8

10. Analyses de Données 9

10.1 Critères de Validation du Test 9

10.2 Interprétation des Résultats du Test..... 10

11. Evaluation des Performances 12

11.1 Résultats Attendus 12

11.2 Limite de Détection (LDM) – Sensibilité Analytique 13

11.3 Inclusivité, Réactivité Croisée et Substances Interférentes..... 13

11.4 Précision 14

11.5 Evaluation Clinique 16

12. Contrôle Qualité 16

13. Assistance Technique 16

14. Marques de Commerce et Divulgation Juridique..... 16

15. Explication des Pictogrammes 17

16. Déclaration de Conformité 18

17. Bibliographie 19

1. Introduction

Le Syndrome Respiratoire Aigu Sévère CoronaVirus 2 (SARS-CoV-2), anciennement appelé 2019-nCoV, est l'agent responsable de la Maladie à Coronavirus 2019 (COVID-19) et, au même titre que le coronavirus SARS qui s'en rapproche étroitement, il appartient au genre de virus Betacoronavirus au sein de la famille des coronavirus. Les coronavirus sont de grands virus à ARN monocaténaires enveloppés qui infectent l'être humain ainsi qu'un grand nombre d'espèces animales. Le SARS-CoV-2, bien que l'on estime qu'il soit d'origine animale, est extrêmement contagieux et se transmet principalement par l'intermédiaire de gouttelettes respiratoires (toux et éternuements). La détection anticipée du SARS-CoV-2 est indispensable pour fournir un traitement rapide aux patients infectés, afin de réduire la diffusion des infections. Les manifestations cliniques les plus courantes de l'infection par le COVID-19 comprennent la fatigue, la fièvre et des symptômes d'infection des voies respiratoires inférieures, comme la toux sèche et la dyspnée. La perte d'odorat et de goût peut également survenir. Dans les situations les plus critiques, l'infection peut conduire à des pneumonies sévères et présenter de graves complications comme des syndromes respiratoires aigus, des dysfonctionnements d'organes ou encore le décès. Sur la base des informations actuellement disponibles, un grand nombre des infections observées ne présentent pas de formes sévères de la maladie ou sont asymptomatiques. Un certain pourcentage de la population est plus vulnérable aux formes graves de la maladie, notamment les personnes âgées (60 ans et plus), les fumeurs et les personnes souffrant d'une maladie chronique, comme des maladies des poumons ou du cœur, des cancers, des diabètes ou encore les patients immunodéprimés. Bien que des vaccins soient déjà disponibles aujourd'hui pour contrôler la diffusion du COVID-19, ils n'empêchent pas les infections au sein des populations vaccinées.

2. Usage Prévu

Le Kit RT-qPCR III IVD SARS-CoV-2 5 Cibles en une étape de NZYTech est un test moléculaire d'amplification en chaîne par polymérase couplé à une transcription inverse (RT-qPCR) conçu pour permettre la détection qualitative rapide des acides nucléiques du SARS-CoV-2 dans des échantillons de prélèvements nasopharyngés et oropharyngés chez des individus soupçonnant une infection à la COVID-19. Ce kit a été conçu pour permettre une détection efficace et fiable du virus SARS-CoV-2 afin de répondre à l'apparition de variants présentant des différences génétiques importantes par rapport aux virus actuellement en circulation. Le Kit RT-qPCR III IVD SARS-CoV-2 5 Cibles en une étape de NZYTech offre la possibilité de détecter 5 cibles virales en même temps. Même lorsqu'au moins une cible n'est plus viable en raison d'altérations génétiques accumulées par le virus, le diagnostic proposé par le test reste fiable. Un résultat positif indique la présence d'ARN de SARS-CoV-2, mais une corrélation clinique avec l'historique du patient et d'autres informations de diagnostic reste nécessaire pour déterminer le statut infectieux du patient. Un résultat négatif n'exclut pas une infection au SARS-CoV-2 et les décisions de prise en charge des patients ne doivent pas uniquement s'appuyer sur un tel résultat. Ce kit a été conçu pour être utilisé par un personnel de laboratoire formé, ayant reçu des instructions spécifiques relatives aux techniques PCR en temps réel et aux diagnostics *in vitro*.

3. Principes du Test

Le Kit RT-qPCR III IVD SARS-CoV-2 5 Cibles en une étape de NZYTech comprend un ensemble complet de réactifs et de sondes permettant une détection qualitative de cinq régions du génome du SARS-CoV-2, grâce à des plateformes PCR communes en temps réel (voir les spécifications requises relatives aux instruments au **Paragraphe 6**). Le kit de NZYTech cible des régions spécifiques du génome du SARS-CoV-2, notamment l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp), la phosphoprotéine de nucléocapside (N) ainsi qu'une région spécifique de la protéine-enveloppe (E), que l'on retrouve dans tous les génomes *Sarbecovirus* (notamment le virus SARS-CoV-2). Toutes les séquences cibles ont été sélectionnées pour fournir la sensibilité de détection la plus élevée possible. Les amorces et les sondes du kit SARS-CoV-2 présentent une homologie de 100% avec >95% des plus de 5 millions de séquences de génome qui étaient disponibles dans la base de données GISAID en mai 2022, en incluant l'identité complète des variants Delta (B.1.617.2) et Omicron (B.1.1.529). En outre, les amorces et les sondes ciblant le SARS-CoV-2 ne présentent pas d'homologie particulière avec des génomes non apparentés, ce qui rend ce test extrêmement spécifique. Il ne présente effectivement aucune réactivité croisée avec les acides nucléiques d'autres organismes respiratoires viraux et bactériens. Tous les contrôles internes sont prévus pour confirmer la bonne extraction de l'ARN depuis les échantillons biologiques humains, ainsi que l'absence d'inhibiteurs de la PCR, entre autres. En outre, ce test utilise trois contrôles externes (deux contrôles de réactifs à faible titrage positifs fournis avec le kit et un contrôle négatif), qui sont décrits ci-dessous. Le Contrôle Positif SARS-CoV-2 (RdRp, N & E)/RP n°1 comprend des fragments d'acide nucléique contenant trois séquences cibles du génome de SARS-CoV-2 situées dans des régions spécifiques des gènes RdRp, N et E, ainsi qu'une séquence cible située dans le gène humain RNase P (RP). Le Contrôle Positif SARS-CoV-2 (RdRp, N & E)/RP n°2 comprend des fragments d'acide nucléique situés dans les mêmes gènes que ceux indiqués pour le Contrôle Positif SARS-CoV-2 (RdRp, N & E)/RP n°1, mais il contient des séquences cibles distinctes au sein de ces gènes ainsi qu'une séquence cible située dans le gène humain RNase P (RP). L'évolution naturelle du SARS-CoV-2 implique que de nouvelles informations concernant son séquençage seront rendues disponibles après la conception initiale du présent kit, ce qui correspond aux stratégies d'adaptation du SARS-CoV-2. C'est pourquoi NZYTech réexamine régulièrement les cinq cibles génomiques SARS-CoV-2. Si nécessaire, le fabricant commercialisera de nouvelles versions de ce kit.

Le RT-qPCR en une étape reste la méthode la plus fiable et la plus sensible pour procéder à une détection précise de l'ARN du SARS-CoV-2, indicative d'une infection chez l'être humain. L'ARN virale, isolée et purifiée à partir des échantillons infectés, fait l'objet d'une rétrotranscription en ADN complémentaire (cDNA) et est ensuite amplifiée dans une réaction unique utilisant cinq ensembles d'amorces/sondes hautement spécifiques reposant sur ce que l'on appelle le principe TaqMan®. Afin de permettre l'identification de l'amplification des six cibles spécifiques d'une même réaction, les gènes RdRp, N et E du SARS-CoV-2 et les sondes RP spécifiques aux êtres humains sont marqués de manière différente, grâce aux colorants reporter HEX™, FAM™, Texas Red™ et Cy5™, respectivement. Ce kit constitue un test Hexaplex avec quatre canaux optiques différents : deux cibles situées sur le gène RdRp sont identifiées en HEX (ou en VIC ou JOE), deux cibles situées sur le gène N sont identifiées en FAM, et une cible du gène E (présente sur le *Sarbecovirus*) est identifiée en Texas Red (ou en JUN). Enfin, la cible endogène humaine est identifiée en Cy5. A noter que cet ensemble comprend quatre séquences cibles du SARS-CoV-2 qui émettent une fluorescence détectée sur deux canaux, afin d'améliorer la fiabilité et la sensibilité de la détection du SARS-CoV-2. En outre, les concentrations des amorces et des

sondes sont optimisées afin de s'assurer que l'amplification de l'ARN messager humain, même lorsqu'il est présent dans des concentrations très élevées, ne limite pas l'efficacité des ensembles d'amorces/sondes du SARS-CoV-2.

4. Composition du Kit

Le Kit RT-qPCR III IVD SARS-CoV-2 5 Cibles en une étape de NZYTech fournit un ensemble complet de réactifs et de contrôles permettant la détection qualitative du SARS-CoV-2 en une seule étape.

Eléments du Kit		**Volume (par ampoule)**	**Nombre d'ampoules**	
			MD04911	**MD04912**
SARS-CoV-2 MMix III (RdRp, N & E)	NZYSupreme Multiplex One-step RT-qPCR Probe Master Mix (2x)	1050 µL	1	4
SARS-CoV-2 PPMix III (RdRp, N & E)	SARS-CoV-2 (RdRp, N & E)/RP PPMix III (10x)	205 µL	1	4
SARS-CoV-2 POS 1 (RdRp, N & E)	Contrôle Positif SARS-CoV-2 (RdRp, N & E)/RP n°1	105 µL	1	4
SARS-CoV-2 POS 2 (RdRp, N & E)	Contrôle Positif SARS-CoV-2 (RdRp, N & E)/RP n°2	105 µL	1	4
NTC	Contrôle Négatif	105 µL	1	4

5. Conservation, Stabilité et Conditions de Manipulation

Le Kit RT-qPCR III IVD SARS-CoV-2 5 Cibles en une étape de NZYTech est réfrigéré pendant le transport. Tous les composants doivent immédiatement être conservés entre -85°C et -15°C dès leur réception. Pendant leur utilisation, les composants du kit doivent rapidement être rangés au congélateur une fois utilisés afin de réduire au minimum leur temps d'exposition à température ambiante. Suivez également les indications suivantes :

- Réduire au minimum le nombre de cycles gel-dégel en stockant les produits par aliquotes. Si nécessaire, les composants du kit peuvent être aliquotés en plus petits volumes une fois décongelés.
- Le PPMix III (RdRp, N & E) SARS-CoV-2 doit être stocké à l'abri de la lumière. Il convient, notamment, de ne pas exposer le MMix III (RdRp, N & E) SARS-CoV-2 à la lumière directe du soleil une fois combiné au PPMix III (RdRp, N & E) SARS-CoV-2.
- Si l'emballage qui protège le kit est endommagé lors de la réception, veuillez contacter NZYTech.
- Faites attention à la date d'expiration indiquée sur l'emballage. NZYTech déconseille toute utilisation du kit au-delà de la date d'expiration. A cette date, le kit doit être jeté en respectant les instructions d'élimination suivantes présentées au **Paragraphe 8.2**.

6. Matériaux et instruments requis mais non fournis

- Instrument PCR en temps réel qui détecte les colorants fluorescents FAM™, HEX™/VIC™/JOE™, Texas Red®/JUN™ et Cy5™ (à des longueurs d'onde d'émission de

520, 556, 603 et 670 nm, respectivement). Se référer au **Paragraphe 11** pour consulter les modèles d'instruments validés pour une utilisation avec le kit.

- Equipements et consommables permettant d'isoler l'ARN virale des échantillons respiratoires.
- Consommables plastiques sans RNase/DNase pour qPCR : tubes PCR, bandes, capuchons, plaques 96-puits, film adhésif.
- Pipeteurs et embouts-filtres (sans RNase/DNase).
- Gants jetables.
- Vortex et filtres centrifuges.

7. Collecte et Préparation des Échantillons

Différents facteurs, comme les protocoles de collecte d'échantillons de prélèvements respiratoires humains (prélèvements nasopharyngés et oropharyngés), le transport des échantillons, le stockage et les délais de traitement sont critiques pour obtenir des résultats optimaux. Les échantillons collectés doivent être testés le plus rapidement possible. Les échantillons doivent être transportés et conservés à basse température, conformément aux règlementations applicables en matière de biosécurité. L'ARN ou l'ensemble des acides nucléiques extraits en suivant un protocole IVD constituent le matériau de base sur lequel repose le test RT-qPCR III IVD SARS-CoV-2 5 Cibles en une étape de NZYTech. Veuillez vous assurer que les échantillons d'ARN sont adaptés en termes de pureté, de concentration et d'intégrité de l'acide nucléique. Un ratio $A_{260/280}$ de ~2 est généralement accepté en ce qui concerne l'ARN pur. L'éthanol étant un fort inhibiteur de la PCR en temps réel, il est nécessaire de l'éliminer avant l'élution de l'acide nucléique pendant l'extraction. Le kit NZYTech comprend une réaction de contrôle interne d'extraction de l'ARN qui cible l'ARN humain, co-purifié avec l'ARN viral. L'ARN humain est amplifié avec l'ensemble amorces/sonde RP. Cela permet de vérifier l'efficacité de l'isolation ARN et/ou la présence d'inhibiteurs pendant le traitement de l'échantillon.

8. Précautions et mises en garde

Comme pour toute procédure de test analytique, il est essentiel que le laboratoire applique des pratiques exemplaires. Suivez attentivement les procédures et les directives fournies par le présent manuel afin de vous assurer que le test est correctement effectué. Tout écart par rapport à ces instructions pourra entrainer l'échec du test ou des résultats erronés. En raison de la forte sensibilité du kit, il convient de faire particulièrement attention à ne pas contaminer les réactifs et les mélanges d'amplification PCR.

8.1 Informations de Sécurité

Avant d'utiliser ce kit, veuillez consulter la Fiche de Données de Sécurité (SDS) disponible sur le site web de NZYTech (www.nzytech.com). La détection du virus SARS-CoV-2 doit être uniquement réalisée par des employés compétents, formés aux procédures techniques et de sécurité applicables, dans des laboratoires correctement équipés. Les directives nationales et internationales applicables en matière de biosécurité des laboratoires doivent être respectées en toute circonstance.

8.2 Exigences relatives aux procédures et aux manipulations

- Réservé à une utilisation professionnelle pour diagnostics *in vitro*.
- Ne pas utiliser ce kit au-delà de la date d'expiration.
- Ne pas utiliser les composants du test si l'emballage du kit est endommagé.
- Ne pas échanger les réactifs entre des lots de production différents.
- Ne pas utiliser de réactifs fournis par d'autres fabricants avec les réactifs de ce kit de test.
- Toujours utiliser des consommables en plastique et des pipeteurs sans DNase/RNase dans le cadre de toute procédure.
- Utiliser des embouts-filtres sans DNase/RNase tout au long du protocole afin d'éviter toute contamination par des aérosols ou par des liquides.
- La préparation des échantillons et de la réaction, ainsi que l'amplification doivent être réalisés dans des espaces de travail différents.
- Les contrôles positifs contiennent un nombre élevé de copies de matrices ; ils doivent être ouverts et traités à l'écart des échantillons de test et des composants du kit afin d'éviter toute contamination croisée.
- Toujours utiliser des éprouvettes NTC pour préparer la réaction de contrôle négatif.
- A la fin de chaque test, nettoyez les surfaces de travail et les équipements à l'aide d'un produit d'élimination de l'ADN/ARN.
- Manipuler les plaques avec précaution suite à leur amplification et les éliminer directement après la fin du test ; les plaques doivent toujours être jetées dans un conteneur pour objets contaminés après leur utilisation.
- Les échantillons biologiques doivent être traités comme s'ils étaient infectieux, en suivant les précautions adaptées en matière de biosécurité.
- Les résidus de produits chimiques et les préparations sont généralement considérés comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchets est régulée par des lois et des normes nationales et régionales.
- Tous les résultats doivent être interprétés par un professionnel de santé en tenant compte de l'historique médical du patient et des symptômes cliniques.
- Ce test ne peut pas exclure des maladies causées par d'autres pathogènes.
- Un résultat négatif obtenu par un test PCR ne peut permettre d'exclure de manière définitive la possibilité d'une infection.
- Veuillez respecter les pratiques exemplaires du laboratoire, porter des habits de protection, toujours porter des gants non poudrés jetables, des lunettes de protection et un masque. Il est interdit de manger, de boire ou de fumer dans l'espace de travail.

9. Procédure de Test

Veuillez lire attentivement les instructions d'utilisation avant de procéder au test. N'oubliez pas que toutes les étapes de pipetage ainsi que la préparation du dispositif expérimental doivent se faire sur de la glace. Une fois les puits de la plaque remplis, lancez immédiatement le protocole RT-qPCR en une étape. L'incubation prolongée des mélanges réactionnels à température ambiante peut conduire à l'apparition d'artefacts PCR qui réduisent la sensibilité de la détection. Avant le début du test, commencez par mélanger doucement le contenu des tubes de réaction fournis, en les centrifugeant pendant 5 secondes pour collecter le contenu au fond du tube. Placez ensuite les tubes sur de la glace. **Nous recommandons fortement la réalisation des**

opérations de pipetage de SARS-CoV-2 POS 1 (RdRp, N & E) et de SARS-CoV-2 POS 2 (RdRp, N & E) en dernier, afin d'éviter toute contamination croisée.

9.1 Préparation de la Réaction

1. Préparez une quantité de mélange RT-qPCR suffisante pour le nombre de tests qui doivent être réalisés, en comptant un volume supplémentaire de 5% pour les pertes liées au pipetage. Respectez les indications du tableau suivant qui spécifient les volumes pour les tests 1 et n (*n* correspondant au nombre total de réactions) :

Composant	**Volume du test 1 (µL)**	**Volume des tests *n* (*) + 5% (µL)**
SARS-CoV-2 MMix III (RdRp, N & E) (**)	10	*n* x 10.5
SARS-CoV-2 PPMix III (RdRp, N & E)	2	*n* x 2.1
Volume Final	**12**	***n* x 12.6**

(*) Afin de calculer le nombre total de réactions nécessaires pour chaque test, comptez le nombre d'échantillons et ajoutez trois échantillons supplémentaires pour les contrôles négatifs et positifs (2), respectivement.
(**) A noter qu'il est possible d'observer un précipité au fond du tube de mélange principal, notamment au terme de plusieurs cycles de gel/dégel. Une fois le mélange principal dégelé, remettez le mélange en suspension avant son utilisation. Dans ce cas, ne faites pas tourner le mélange principal avant le pipetage.

2. Pipetez 12 µL de mélange RT-qPCR dans des puits individuels, conformément à la préparation de votre plaque expérimentale PCR en temps réel.

3. En ce qui concerne le contrôle négatif, ajoutez 8 µL de NTC au lieu de la matrice d'ARN dans le puits de contrôle négatif. Le volume final devrait atteindre 20 µL.

4. En ce qui concerne les échantillons biologiques, ajoutez 8 µL de chaque échantillon ARN dans les puits d'échantillonnage, conformément à la préparation de votre plaque expérimentale. Le volume final devrait atteindre 20 µL.

5. En ce qui concerne les deux contrôles positifs, ajoutez 8 µL du contrôle SARS-CoV-2 POS 1 (RdRp, N & E) et 8 µL du contrôle SARS-CoV-2 POS 2 (RdRp, N & E) à la place de la matrice d'ARN dans les puits de contrôle positif. Le volume final devrait atteindre 20 µL.

6. Recouvrez et scellez hermétiquement la plaque à l'aide d'un film adhésif optique adéquat, avant de procéder au protocole RT-qPCR et aux étapes de détection.

7. Placez la plaque de réaction dans l'instrument PCR en temps réel et lancez le protocole RT-qPCR en suivant les instructions du paragraphe ci-dessous.

9.2 Programmation de l'instrument PCR en temps réel

Le tableau ci-dessous présente un protocole standard optimisé relatif à l'exécution des tests SARS-CoV-2/RP à l'aide du kit RT-qPCR III IVD SARS-CoV-2 5 Cibles en une étape de NZYTech, sur les plateformes mentionnées ci-dessous.

Cycles	Température	Durée	Etape
1	50 °C	10 min	Rétrotranscription
1	95 °C	2 min	Activation de la polymérase
40	95 °C	5 s	Dénaturation
	60 °C	60 s	Recuit/Extension*

**Selon l'équipement utilisé, veuillez choisir le canal de détection correspondant. Collectez les signaux via les canaux FAM, HEX/JOE/VIC, Texas Red/JUN et Cy5.*

Colorants Fluorescents et Canaux de Détection

Cible	Colorant fluorescent	Canaux de Détection
SARS-CoV-2, gène RdRp	HEX™	HEX/VIC/JOE
SARS-CoV-2, gène N	FAM™	FAM
SARS-CoV-2, gène E	Texas Red®	Texas Red/JUN
RNase gène P	Cy5™	Cy5

Le Kit RT-qPCR III IVD SARS-CoV-2 5 Cibles en une étape de NZYTech a été validé pour les systèmes PCR en temps réel suivants : Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystem® QuantStudio 5, Roche LightCycler® 480 II et Bio-Rad® CFX96™. Pour tout autre équipement utilisé, le kit doit être validé par l'utilisateur avec des échantillons préalablement caractérisés (positifs et négatifs).

10. Analyse des Données

10.1 Critères de Validation du Test

L'ARN du SARS-CoV-2 RNA est détecté via cinq régions du génome viral, identifiées à l'aide de trois canaux fluorescents (FAM, HEX et Texas Red), et via le RP humain de contrôle dans un quatrième canal (Cy5). Les analyses de données sont effectuées par le logiciel de l'instrument. En tenant compte des écarts de performance entre les différents instruments PCR en temps réel, des seuils sont automatiquement définis par le logiciel pour les quatre signaux fluorescents (FAM, HEX, Texas Red et Cy5) et un ajustement manuel peut être effectué, si 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 que les résultats des contrôles Positifs et Négatifs sont conformes aux attentes définies, par rapport aux critères suivants :

Contrôles positifs : les courbes d'amplifications de HEX (deux cibles pour le gène SARS-CoV-2 RdRp), FAM (deux cibles pour le gène SARS-CoV-2 N), Texas Red (une cible pour le gène SARS-CoV-2 E) et Cy5 (pour le gène RP) sont positives. Les contrôles positifs doivent s'amplifier à un Ct (cycle seuil) <32, dans les quatre canaux. Si ce critère de contrôle qualité n'est pas respecté, il y a de fortes chances que l'expérience ait été compromise.

Contrôle Négatif (NTC) : aucune amplification n'est détectée. Si le contrôle négatif présente des courbes d'amplification (HEX, FAM, Texas Red et Cy5) sigmoïdes, il est possible que les échantillons aient été contaminés. Veuillez reproduire le test en suivant les pratiques exemplaires du protocole RT-qPCR.

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

Si un des contrôles ne présente pas les résultats attendus, le test a été compromis ou n'a pas été réalisé correctement. Il doit donc être considéré comme **invalide**.
Veuillez reproduire le test. *Si le problème rencontré persiste, veuillez contacter le fabricant.*

10.2 Interprétation des Résultats du Test

Le Kit RT-qPCR III IVD SARS-CoV-2 5 Cibles en une étape de NZYTech utilise les valeurs de cycles seuils (Ct) limites suivantes en ce qui concerne l'interprétation des résultats :

Valeur Ct	**Interprétation des résultats**
Ct ≤36, Amplification	**Détecté (+) → POSITIF**
Ct>36, Sans Amplification	**Non détecté (-) → NEGATIF**

Le SARS-CoV-2 est détecté si les courbes d'amplification HEX, FAM et Texas Red présentent une courbe sigmoïde avec un Ct≤36, sans tenir compte du résultat obtenu pour le test RP (Cy5).

Le SARS-CoV-2 est détecté si les courbes d'amplification HEX et FAM présentent une courbe sigmoïde avec un Ct≤36, sans tenir compte du résultat obtenu pour les tests E (Texas Red) et RP (Cy5).

Le SARS-CoV-2 est détecté si les courbes d'amplification HEX et Texas Red présentent une courbe sigmoïde avec un Ct≤36, sans tenir compte du résultat obtenu pour les tests N (FAM) et RP (Cy5).

Le SARS-CoV-2 est détecté si les courbes d'amplification FAM et Texas Red présentent une courbe sigmoïde avec un Ct≤36, sans tenir compte du résultat obtenu pour les tests RdRp (HEX) et RP (Cy5).

Le SARS-CoV-2 n'est pas détecté si les courbes d'amplification FAM, HEX et Texas Red ne sont pas positives (Ct>36) et que le test RNase P (Cy5) présente une courbe sigmoïde positive (Ct≤40).

Les résultats du test ne sont pas probants pour détecter le SARS-CoV-2 lorsqu'une seule courbe d'amplification (FAM, HEX ou Texas Red) présente une courbe sigmoïde avec un Ct≤36, et que les autres cibles SARS-CoV-2 sont négatives, sans tenir compte du résultat obtenu pour le test RP (Cy5). Le test doit être reproduit en repurifiant l'acide nucléique de l'échantillon.

Le test est invalide si les tests du SARS-CoV-2 et du RP sont tous les deux négatifs. Le test doit être reproduit en repurifiant l'acide nucléique de l'échantillon.

Le tableau suivant résume l'interprétation des principaux résultats (évaluez la forme générale des courbes d'amplification ; **seules les courbes d'amplification sigmoïdes indiquent une véritable amplification**).

SARS-CoV-2 Gène RdRp, (HEX)	**SARS-CoV-2** Gène N, (FAM)	**SARS-CoV-2** Gène E, (Texas Red)	**RP** Gène RP, (Cy5)	**Interprétation des résultats**
+	+	+	+ / - *	**SARS-CoV-2 détecté → POSITIF**
+	+	-	+ / - *	**SARS-CoV-2 détecté → POSITIF**
+	-	+	+ / - *	**SARS-CoV-2 détecté → POSITIF**
-	+	+	+ / - *	**SARS-CoV-2 détecté → POSITIF**
+	-	-	+ / - *	**SARS-CoV-2 détecté uniquement pour une cible → NON PROBANT**
-	+	-	+ / - *	**SARS-CoV-2 détecté uniquement pour une cible → NON PROBAT**
-	-	+	+ / - *	**SARS-CoV-2 détecté uniquement pour une cible → NON PROBANT**
-	-	-	+	**SARS-CoV-2 non détecté → NEGATIF**
-	-	-	-	**Tets invalide, répéter l'extraction et reproduire le test**

**Une concentration/charge élevée d'ARN virale détectable dans l'échantillon peut conduire à des signaux de contrôle réduits ou absents (RP, Cy5).*

Note : NZYTech recommande de reproduire l'analyse pour tous les échantillons présentant une courbe ambigüe ou atypique ne permettant pas une interprétation claire. L'interprétation des résultats doit prendre en compte la possibilité de faux-négatifs et de faux-positifs.

Bien que le risque de faux-négatifs soit atténué par la conception à deux cibles de ce test, les faux-négatifs peuvent être causés par :

- Une mauvaise collecte, manipulation et/ou conservation des échantillons.
- Le fait que l'échantillon soit sorti de la phase virémique.
- Le non-respect des procédures prévues par le présent manuel.
- L'utilisation d'un kit d'extraction ou d'une plateforme PCR en temps réel non autorisé(e).

Les faux-positifs peuvent être causés par :

- La mauvaise manipulation d'échantillons contenant une concentration élevée d'ARN virale du SARS-CoV-2.
- La mauvaise manipulation des contrôles SARS-CoV-2 POS 1 (RdRp, N & E) et SARS-CoV-2 POS 2 (RdRp, N & E).
- La mauvaise manipulation de produits amplifiés (plaque après amplification).

Un résultat négatif n'exclut pas une infection au SARS-CoV-2 et les décisions de traitement ou les autres décisions de prise en charge des patients ne doivent pas uniquement s'appuyer sur ce résultat. En outre, ce test ne permet pas d'exclure les maladies causées par d'autres pathogènes bactériens ou viraux.

11. Evaluation des Performances

L'évaluation des performances du Kit RT-qPCR III IVD SARS-CoV-2 5 Cibles en une étape de NZYTech a été effectuée sur les systèmes Applied Biosystem® 7500 FAST, Applied Biosystem® QuantStudio 5, Roche LightCycler® 480 II et Bio-Rad® CFX96™. Pour tout autre équipement utilisé, le kit doit être validé par l'utilisateur avec des échantillons préalablement caractérisés (positifs et négatifs).

11.1 Résultats Attendus

Les graphiques d'amplification habituellement observés pour les échantillons cliniques contenant les acides nucléiques du SARS-CoV-2 sont présentés en Figure 1. Il s'agit d'exemples d'échantillons cliniques présentant des charges élevées (Tableau A) ou moyennes (Tableau B) de SARS-CoV-2. A noter que lorsque les charges de SARS-CoV-2 sont très élevées, la courbe du canal Cy5, qui correspond au gène RNase P humain, peut être absente ou présenter une forme atypique (Figure 1A).

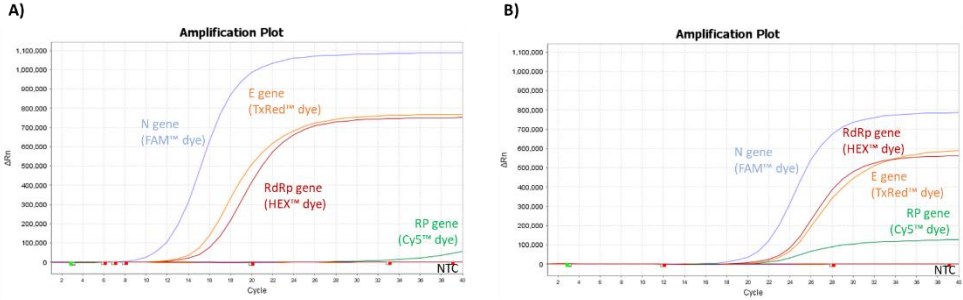

Figure 1. Détection simultanée des cibles du SARS-CoV-2 (gènes RdRp, N et E) et du gène RNase P humain dans des échantillons cliniques humains avec une charge élevée (A) et moyenne (B) de SARS-CoV-2. Courbe rouge : détection de deux cibles vARN du SARS-CoV-2 (gène RdRp) via le canal HEX ; Courbe bleue : détection de deux cibles vARN du SARS-CoV-2 (gène N) via le canal FAM ; Courbe orange : détection d'une cible vARN SARS-CoV-2 (gène E) via le canal Texas Red ; Courbe verte : détection du gène humain RNase P via le canal Cy5.

11.2 Limite de Détection (LDM) – Sensibilité Analytique

La sensibilité analytique a été définie comme étant la concentration la plus faible de la substance à analyser qui peut être détectée de manière fiable, avec un intervalle de confiance de 95%. Elle a été analysée en testant les acides nucléiques du SARS-CoV-2 avec différents nombres de copies, injectés dans l'ARN extraite d'échantillons oropharyngés négatifs à l'aide de 3 lots de kits différents et en suivant des conditions de réaction de test classiques. Les tests ont été répétés sur 3 jours, en produisant 96 sous-divisions pour chaque concentration de SARS-CoV-2 testée. Compilées, les données ont montré que le Kit RT-qPCR III IVD SARS-CoV-2 5 Cibles en une étape de NZYTech détectait 0,25 copies/µL ou 250 copies/mL de l'ARN virale du SARS-CoV-2 avec un intervalle de confiance ≥95%. La LDM estimée a été confirmée par deux opérateurs différents utilisant trois lots de kits dans le cadre d'une expérience comprenant 48 sous-divisions de la matrice des prélèvements oropharyngés négatifs, injectés de manière indépendante.

11.3 Inclusivité, réactivité croisée et substances interférentes

L'inclusivité et la réactivité croisée ont été évaluées par le biais d'une analyse *in silico* des oligonucléotides utilisés en tant qu'amorces et en tant que sondes par rapport aux acides nucléiques pathogènes liés au SARS-CoV-2 et à des pathogènes normaux causant des infections présentant des symptômes similaires, respectivement. À la suite de l'analyse *in silico*, il a été constaté que le test élaboré détectait toutes les souches virales du SARS-CoV-2 et ne présentait aucune réactivité avec des espèces virales autres que celles du SARS-CoV-2. En outre, une analyse *in vitro* de la Réactivité Croisée (Exclusivité) a également été réalisée afin de confirmer que le Kit RT-qPCR III IVD SARS-CoV-2 5 Cibles en une étape de NZYTech ne réagissait pas avec les autres microbes et pathogènes affectant les humains habituellement rencontrés dans les spécimens cliniques. Cette étude a été réalisée en utilisant un panel commercial de pathogènes respiratoires provenant de ZeptoMetrix, et notamment le Panel de Vérification Respiratoire NATtrol ™ (Respiratory Verification Panel NATtrol ™) (# NATRVP-IDI). Ce panel comprend une sélection d'échantillons représentatifs de véritables spécimens cliniques humains, notamment la grippe A H1N1 (A/New Cal/20/99), la grippe A H3N2 (Brisbane/10/07), la grippe A 2009 H1N1pdm, la grippe B (B/Florida/02/06), le métapneumovirus 8 (Pérou 6-2003), le Virus Respiratoire Syncytial A, le Rhinovirus de Type 1A, le virus Parainfluenza de Type 1, le virus Parainfluenza de Type 2, le virus Parainfluenza de Type 3, le virus Parainfluenza de Type 4, l'Adénovirus de Type 3, le Coronavirus NL63, le Coronavirus 229E, le Coronavirus OC43, le Coronavirus HKU-1, la *M. pneumoniae* M-129, la *C. pneumoniae* CWL-029 et *la coqueluche* A639. Chaque test a fait l'objet de 3 réplicats.

En outre, d'autres microbes communs à transmission orale et affectant les voies respiratoires, comme *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 été testés. Les données, collectées à l'aide de trois lots de kits différents, ont permis de confirmer qu'aucun des organismes testés n'interférait avec les performances du Kit RT-qPCR III IVD SARS-CoV-2 5 Cibles en une étape de NZYTech en générant des faux-positifs ou un signal non spécifique.

L'impact de 17 substances interférentes potentielles a été évalué par le biais de tests comprenant des échantillons nasopharyngés négatifs auxquels étaient injectés des spécimens positifs au SARS-CoV-2 à 3x LDM. Les substances interférentes potentielles ont été ajoutées aux échantillons préparés avec des concentrations représentant les niveaux les plus élevés attendus dans les prélèvements respiratoires humains, sur la base des études disponibles. Chaque test a fait l'objet de 5 réplicats et les résultats ont été comparés aux données obtenues grâce à un test de contrôle qui ne contenait aucune substance interférente. Aux niveaux de concentrations testés, les résultats ont montré qu'aucune des molécules testées n'affectait la sensibilité de la détection. Le tableau ci-dessous reprend les données collectées dans le cadre de ces tests. Ceux-ci ont tous été réalisés à l'aide de l'instrument PCR en temps réel Applied Biosystems® 7500 FAST.

Potentiel d'interférence	Ingrédient Actif	Concentration finale dans l'échantillon	Interférence Oui (Y) ou Non (N)
Eau de mer isotonique (Rhinomére)	NaCl	15% v/v	N
Spray pour la gorge, anesthésique oral et analgésique (Strepfen)	Flurbiprofène	5% v/v	N
Solution de lavage nasal (Spray Allergie - Vibrocil)	Propionate de fluticasone	5% v/v	N
Spray nasal de corticoïdes (Nasomet)	Furoate de mométasone	5% v/v	N
Spray nasal de corticoïdes (Pulmicort)	Budesonide	5% v/v	N
Antimicrobial, systemic (Trobex)	Tobramycine	10 µg/mL	N
Analgésique buccal, anti-inflammatoire et antiseptique (Pyralvex)	Extrait de Rhubard, Acide Salicylique	5% v/v	N
Sujet antifongique et antibactérien oralpharyngé (Daktarin)	Miconazole	5 mg/mL	N
Antiseptiques en bain de bouche (Eludril Gé)	Gluconate de chlorhexidine, chlorobutanol hémihydraté	5% v/v	N
Antitussif, Sirop (Codipront)	Codéine, Citrate de Phényltoloxamine	5% v/v	N
Sang total (humain)	-	4% v/v	N
Médicament antiviral (Tamiflu)	Oseltamivir	7,5 mg/mL	N
Mucolytique (Mucolsovan)	Chlorhydrate d'Ambroxol	5% v/v	N
Solution de gouttes nasales (Nasarox)	Oxymétazoline Chlorhydrate	10% v/v	N
Antibiotique, pommade nasale (Bactroban)	Mupirocine	5 mg/mL	N
Salive (humaine)	-	25% v/v	N
Éthanol absolu	Alcool	5% v/v	N

11.4 Précision

La précision des tests fournis par le Kit RT-qPCR III IVD SARS-CoV-2 5 Cibles en une étape de NZYTech a été définie en testant de manière répétée des acides nucléiques du SARS-CoV-2 représentant deux niveaux différents de charge virale, avec 15 (3x LDM) et 150 (30x LDM) copies par réaction (0,75 et 7,50 copies/µL) auxquelles était injecté de l'ARN extrait de prélèvements oropharyngés négatifs. Pour ce test, trois lots de kits différents ont été utilisés, en respectant les conditions de réaction de test habituelles. La précision a été évaluée en mesurant le Cq moyen, le coefficient de variation Cq et le % de détection des réplicats, comme indiqué ci-dessous pour chaque cas. Un résumé des données est présenté dans le tableau ci-dessous.

11.4.1. Répétabilité

La répétabilité a été évaluée par un opérateur en analysant 12 réplicats de chaque échantillon (15 et 150 copies par réaction), pour un total final de 24 tests réalisés.

11.4.2. Reproductibilité quotidienne

La reproductibilité quotidienne a été évaluée par un opérateur en analysant 36 réplicats pour chaque échantillon (15 et 150 copies par réaction), pendant 3 jours, au nombre de 12 réplicats de chaque concentration par jour (au total, 72 tests ont été réalisés).

11.4.3. Reproductibilité Inter-Lots

La reproductibilité inter-lots a été évaluée par un opérateur en analysant 36 réplicats de chaque échantillon (15 et 150 copies par réaction) à l'aide de 3 lots de kits différents, en comptant 24 réplicats par lot.

Précision du Kit RT-qPCR III IVD SARS-CoV-2 5 Cibles en une étape de NZYTech

Variable testée		Gène RdRp (Copies/Réaction)		Gène N (Copies/Réaction)		Gène E (Copies/Réaction)	
		15	150	15	150	15	150
Répétabilité							
	n	12	12	12	12	12	12
	Cq Moyen	32,40	29,07	31,67	28,46	32,89	29,28
	Coefficient de Variation (%)	1,53	1,23	1,94	1,48	2,79	2,24
	% de Détection des Réplicats	100	100	100	100	100	100
Reproductibilité Quotidienne							
	n	36	36	36	36	36	36
	Cq Moyen	32,57	29,56	31,87	28,58	31,95	30,24
	Coefficient de Variation (%)	2,31	2,58	2,51	2,76	3,48	3,22
	% de Détection des Réplicats	100	100	100	100	100	100
Reproductibilité Inter-lots							
	n	36	36	36	36	36	36
	Cq Moyen	32,55	29,39	31,77	28,42	32,13	30,03
	Coefficient de Variation (%)	2,25	2,49	2,68	2,30	3,87	3,24
	% de Détection des Réplicats	100	100	100	100	98	100
Reproductibilité Par l'Opérateur							
	n	36	36	36	36	36	36
	Cq Moyen	32,44	29,33	31,88	28,68	32,03	29,66
	Coefficient de Variation (%)	1,56	2,14	1,63	2,24	3,46	3,07
	% de Détection des Réplicats	100	100	100	100	100	100
Reproductibilité Inter-instrument							
	n	48	48	48	48	48	48
	Cq Moyen	33,10	29,96	32,08	29,00	32,90	30,55
	Coefficient de Variation (%)	1,98	1,24	2,68	2,83	4,12	3,87
	% de Détection des Réplicats	100	100	100	100	96	100

11.4.4. Reproductibilité par l'Opérateur

La reproductibilité par l'opérateur a été évaluée en testant 36 réplicats de chaque échantillon (15 et 150 copies par réaction). Ces tests ont été effectués par trois opérateurs différents, au nombre de 12 réplicats par opérateur.

11.4.5. Reproductibilité Inter-instrument

La reproductibilité inter-instrument a été évaluée par un opérateur, en testant 48 réplicats de chaque échantillon (15 et 150 copies par réaction), dans quatre instruments qPCR différents (Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5, Roche LightCycler® 96 et Bio-Rad® CFX96™), pour un total de 96 tests par échantillon.

11.5 Evaluation clinique

Les performances du kit RT-qPCR III IVD SARS-CoV-2 5 Cibles en une étape de NZYTech, avec des échantillons prélevés sur écouvillon nasopharyngé, ont été évaluées par un laboratoire externe. Au total, 501 échantillons cliniques négatifs et 150 échantillons cliniques positifs ont été testés. Les données ont révélé que 97,4 % des accords de sensibilité clinique et 100 % des accords de spécificité clinique ont été obtenus pour tous les échantillons positifs et négatifs testés.

12. Contrôle Qualité

Tous les composants du Kit RT-qPCR III IVD SARS-CoV-2 5 Cibles en une étape de NZYTech sont testés selon les protocoles décrits ci-dessus. Le système PCR en temps réel Hexaplex permet de détecter les cibles décrites pour identifier l'ARN virale du SARS-CoV-2 viral RNA (gènes RdRp, N et E) ainsi que l'ARN messager humain (gène RNase P, RP). Des amplifications positives sont observées pour les gènes cibles, les contrôles positifs et les contrôles internes via les canaux FAM, HEX, Texas Red et Cy5, selon les colorants respectifs des amorces/sondes.

13. Assistance Technique

Pour accéder aux services de l'Assistance Technique, veuillez contacter notre équipe d'Assistance Technique spécialisée par téléphone : +351 (0) 21 364 35 14 ou par courriel : info@nzytech.com.

14. Marques et mention légale

Toutes les marques mentionnées dans ce manuel sont la propriété de leurs propriétaires respectifs.

15. Explication des Pictogrammes

IVD	Diagnostic *in vitro* dispositif médical		Consulter le mode d'emploi
REF	Numéro de catalogue		Fabricant
LOT	Code Lot		A utiliser avant
	Seuil de Température		Suffisant pour
CONTROL +	Contrôle positif		Conserver à l'abri de la lumière du soleil (mélange amorce/sonde)
CONTROL –	Contrôle négatif		

16. Déclaration de Conformité

Nom du produit : Kit RT-qPCR III IVD SARS-CoV-2 5 Cibles en une étape de NZYTech

Numéro de Catalogue : MD04911 and MD04912.

Usage prévu : détection qualitative du SARS-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.

Dr. Joana Brás,

Directrice Technique

17. Bibliographie

Nathan J, Hardenbrook1 et Peijun Zhang (2022). A structural view of the SARS-CoV-2 virus and its assembly. Current Opinion in Virology. 52:123–134.

Swets MC, Russell CD, Harrison EM, Docherty AB, Lone N, Girvan M, Hardwick HE ; ISARIC4C Investigators, Visser LG, Openshaw PJM, Groeneveld GH, Semple MG, Baillie JK (2022). SARS-CoV-2 co-infection with influenza viruses, respiratory syncytial virus, or adenoviruses. Lancet 399(10334):1463-1464. doi: 10.1016/S0140-6736(22)00383-X.

Gomez GB, Mahé C, Chaves SS (2021). Uncertain effects of the pandemic on respiratory viruses. Science 372:1043-1044.

Irwin Jungreis, Rachel Sealfon et Manolis Kellis (2021). SARS-CoV-2 gene content and COVID-19 mutation impact by comparing 44 *Sarbecovirus* genomes. Nature Communications. 12:2642.

OMS : Q&A : Similitudes et différences entre la COVID-19 et la grippe. 30 septembre 2021. Disponible en ligne sur 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.

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.

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. In 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.

OMS : Prise en charge clinique de l'infection respiratoire aigüe sévère (IRAS) en cas de suspicion de maladie à coronavirus 19. 13 mars 2020. Disponible en ligne sur https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/clinical-management-of-novel-cov.pdf.

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisbonne, Portugal
Tel.:+351.213643514 Fax: +351.217151168
www.nzytech.com