


OSANTYS SARS-CoV-2 DUO RT-qPCR KIT

NOTICE D'UTILISATION

Kit de détection multiplex qualitative du SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel à partir d'échantillons salivaires et nasopharyngés non purifiés

REF OS-COV2-DUO-100  100

REF OS-COV2-DUO-500  500



Version 2.0



For *In Vitro* Diagnostic Use



61, Route de Grenoble
06200 Nice - France



Laboratoire OBO
10, Traverse de L'Aigle D'Or
13100 Aix-En-Provence - France

Le client est responsable du respect des exigences réglementaires relatives à ses procédures et à l'utilisation de l'instrument. Les informations contenues dans ce guide sont susceptibles d'être modifiées sans préavis.

AVIS DE NON-RESPONSABILITÉ : DANS LA MESURE AUTORISÉE PAR LA LOI, OSANTYS ET / OU SES AFFILIÉS NE SERONT PAS RESPONSABLES DES DOMMAGES SPÉCIAUX, ACCESSOIRES, INDIRECTS, PUNITIFS, MULTIPLES OU INDIRECTS LIÉS À OU RÉSULTANT DE CE DOCUMENT, Y COMPRIS VOTRE UTILISATION.

Informations importantes de licence : Ce produit peut être couvert par une ou plusieurs licences à usage limité. En utilisant ce produit, vous acceptez les termes et conditions de toutes les licences à usage limité applicables.

MARQUES DEPOSEES : Toutes les marques déposées sont la propriété d'Osantys et de ses filiales, sauf indication contraire.

© 2021 Osantys. Tous les droits sont réservés.

Historique des versions

# Version	Date	Résumé des révisions
1.0	Février 2022	Notice originale d'utilisation
2.0	Mai 2022	Précisions sur les performances

Sommaire

Usage prévu.....	3
Contexte.....	3
Principe du test	4
Description du Produit.....	5
Symboles	6
Matériel requis non fourni	7
Avertissements et précautions	7
Limitations du test	9
Préparation de l'équipement	10
Préparation des échantillons salivaires et nasopharyngés.....	10
Instructions pour la RT-qPCR	11
Préparation de la réaction	11
Programmer l'instrument de PCR en temps réel.....	13
Analyse des données.....	14
Interprétation des résultats	14
Contrôle de qualité	17
Analyse des Performances.....	18
Performance analytique.....	18
Performance clinique.....	31
Références.....	34
Contact, commandes, assistance client et support produit.....	34
Protocole En Bref	35

Usage prévu

Le kit OSANTYS SARS-CoV-2 DUO RT-qPCR contient des réactifs et des contrôles pour un test de RT-qPCR (transcription inverse suivi par une PCR en temps réel) destiné à la détection qualitative du génome du SARS-CoV-2 dans des échantillons salivaires et nasopharyngés d'individus suspectés d'avoir contracté la COVID-19.

Les résultats permettent l'identification de l'ARN du SARS-CoV-2. L'ARN du SARS-CoV-2 est généralement détectable dans les échantillons des voies respiratoires supérieures pendant la phase aiguë de l'infection. Des résultats positifs indiquent la présence d'ARN du SARS-CoV-2, mais n'excluent pas une infection bactérienne ou une co-infection avec d'autres virus. L'agent détecté peut ne pas être la cause définitive de la maladie. Une corrélation clinique avec les antécédents du patient et d'autres informations diagnostiques est nécessaire pour déterminer l'état d'infection du patient. Les laboratoires sont tenus de signaler tous les résultats positifs aux autorités de santé publique compétentes.

Les résultats négatifs n'empêchent pas l'infection par le SARS-CoV-2 et ne doivent pas être utilisés comme seule base pour le traitement ou d'autres décisions de prise en charge du patient. Les résultats négatifs doivent être associés aux observations cliniques, aux antécédents du patient et aux informations épidémiologiques.

Le kit est destiné à être utilisé par du personnel de laboratoire clinique qualifié et formé spécifiquement aux techniques de PCR en temps réel et aux procédures de *diagnostic in vitro*.

Remarque : Les pays suivants exigent le marquage CE-IVD : Autriche, Belgique, Bulgarie, Croatie, Chypre, Tchéquie, Danemark, Estonie, Finlande, France, Allemagne, Grèce, Hongrie, Irlande, Italie, Lettonie, Lituanie, Luxembourg, Malte, Pays-Bas, Pologne, Portugal, Roumanie, Slovaquie, Slovénie, Espagne, Suède, Royaume-Uni, Norvège, Islande, Liechtenstein, Suisse, Turquie.

Contexte

Une épidémie de pneumonie d'étiologie inconnue dans la ville de Wuhan, province du Hubei, Chine a été initialement signalée à l'OMS le 31 décembre 2019. Les autorités chinoises ont identifié un nouveau coronavirus (SARS-CoV-2), qui a entraîné des millions d'infections confirmées dans le monde chez l'homme. Des cas d'infection asymptomatique, de maladie bénigne, de maladie grave et de décès ont été signalés.

Le kit OSANTYS SARS-CoV-2 DUO RT-qPCR est un test de diagnostic moléculaire *in vitro* qui facilite la détection et le diagnostic du COVID-19 et est basé sur une technologie d'amplification d'acides

nucléiques largement utilisée. Le produit contient des amorces, des sondes marquées et du matériel de contrôle utilisés dans la RT-qPCR pour la détection qualitative *in vitro* de l'ARN du SARS-CoV-2 dans des échantillons salivaires et nasopharyngés.

Principe du test

Le test est conçu pour la détection spécifique de l'ARN du SARS-CoV-2 à l'aide de deux ensembles d'amorces et sondes ciblant deux régions du gène de la nucléocapside (N) du virus, N1 et N2. Un ensemble d'amorces et sondes supplémentaire pour détecter le gène humain de la RNase P (RP) est également utilisé pour surveiller la présence d'inhibiteurs de la PCR dans l'échantillon clinique et évaluer la qualité de l'échantillon et l'extraction de l'ARN pour éviter un résultat faux négatif.

Le matériel de départ correspond à un lysat clarifié (non purifié) obtenu après lyse thermique d'un prélèvement salivaire ou nasopharyngé.

L'ARN présent dans le lysat est d'abord retro-transcrit en ADNc et ensuite amplifié dans un processus en une étape à l'aide d'un instrument de PCR en temps réel. Dans ce processus, chaque sonde s'hybride à une séquence cible spécifique située entre les amorces sens et antisens. Pendant la phase d'extension du cycle de PCR, l'activité 5'-nucléase de la Taq polymérase dégrade la sonde, provoquant la séparation du fluorochrome du quencher, générant un signal fluorescent. A chaque cycle, des molécules supplémentaires de fluorochrome sont clivées de leur quencher respective, augmentant l'intensité de fluorescence. L'intensité de fluorescence est enregistrée à chaque cycle de PCR par l'instrument de PCR en temps réel. Les données sont analysées et interprétées par le logiciel d'analyse utilisé avec l'instrument.

Description du Produit

Le kit OSANTYS SARS-CoV-2 DUO RT-qPCR contient les composants suivants :

Nom du Réactif // Numéro du composant	Description	Quantité & Volume		Stockage	Durée de vie ⁽¹⁾
		100 réactions	500 réactions		
SARS-CoV-2 Primer/Probe Mix // OS-COV2-100-1	Mix amorces/ sondes N1, N2 et RP	750 µL/tube x 1	750 µL/tube x 5	entre -25°C et -15°C protégé de la lumière	12 mois
One-Step RT-qPCR Enzyme Master Mix 2X // OS-COV2-DUO-100-2	Réactifs pour la RT-qPCR dont la RT et la Taq Polymerase	625 µL/tube x 2	625 µL/tube x 10	entre -25°C et -15°C	12 mois
SARS-CoV-2 Positive Controls // OS-COV2-100-3	Plasmides contenant le gène N du SARS-CoV-2 et gène humain RP	26 µL/tube x 1	26 µL/tube x 5	entre -25°C et -15°C	12 mois
SARS-CoV-2 Negative Control // OS-COV2-100-4	Eau sans RNase et DNase	100 µL/tube x 1	100 µL/tube x 5	entre -25°C et -15°C	12 mois

⁽¹⁾ La durée de vie du kit est déterminée par le composant dont la durée de conservation est la plus courte.

Après 5 cycles de décongélation/congélation de l'intégralité du kit, aucune réduction des performances n'a été observée.

- SARS-CoV-2 Positive Control et RNase P Positive Control sont utilisés pour surveiller la configuration de la réaction de RT-qPCR et l'intégrité des réactifs.
- SARS-CoV-2 Negative Control est utilisé pour surveiller la contamination des réactifs et la préparation de la réaction.

Symboles



Contient des réactifs suffisants pour <N> réactions



Utiliser par date



Numéro de catalogue



Numéro de lot



Numéro de Matériel



Composants



Contenu



Numéro



Limitations de température



Fabricant



Notice d'utilisation



Note importante

Matériel requis non fourni

Préparation des échantillons :

- Solution saline pour diluer les échantillons salivaires le cas échéant
- Bain à sec (idéalement 96 puits)
- Centrifugeuse pour micro tubes à vitesse réglable

Préparation de la réaction :

- Instrument de PCR en temps réel
- Congélateurs de laboratoire entre -25 ° C et -15 ° C
- Portoirs pour micro tubes de 2 ml et plaques 96 puits
- Mélangeur Vortex
- Micro centrifugeuse pour tubes
- Centrifugeuse pour plaques 96 puits
- Micropipettes réglables monocanal (10 µL, 20 µL, 200 µL et 1000 µL)
- Micropipettes réglables multicanaux (20 µL ou 200 µL)
- Pointes de pipette à filtre stériles
- Réservoirs de pipetage jetables (catalogue VWR n ° 613-1179 ou équivalent)
- Micro tubes de 1,5 ml sans DNase / RNase
- Plaques ou tubes optiques pour PCR :
 - Plaque 96 puits de 0,1 ou 0,2 ml
 - Film optique adhésif
 - Applicateur de film adhésif

ou

- Barrettes de PCR de 0,1 ou 0,2 ml
- Barrettes des capuchons plats optiques
- Détergent / désinfectant (Surfa'Safe Premium Anios ou équivalent)
- Réactifs pour l'élimination de l'ADN et de la RNase (DNA-ExitusPlus, RNase-ExitusPlus ou équivalent)
- Gants jetables non poudrés et blouses chirurgicales

Avertissements et précautions

- Manipuler tous les échantillons et contrôles comme s'ils étaient infectieux conformément aux procédures de sécurité du laboratoire. Reportez-vous aux Directives provisoires de biosécurité en laboratoire pour la manipulation et le traitement des échantillons associés au SARS-CoV-2 <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab-biosafety-guidelines.html>.
- Le traitement des échantillons doit être effectué conformément aux réglementations nationales en matière de sécurité biologique.

- Effectuer toutes les manipulations des virus vivants dans une enceinte de sécurité biologique (PSM de classe II ou supérieure).
- L'inactivation du virus vivant par la chaleur (56°C pendant 30 minutes) n'est pas nécessaire due à la présence d'une étape de lyse thermique pendant la préparation des échantillons.
- Utiliser les dispositifs de protection individuelle (DPI) tel que (mais pas limité à) des gants, des lunettes de protection et des blouses de laboratoire lors de la manipulation des échantillons et lors de l'exécution de ce test et de la manipulation de matériel, y compris des échantillons, des réactifs, des pipettes et d'autres équipements et réactifs.
- Utiliser toujours des pointes de pipette à filtre. Les pointes utilisées doivent être stériles et exemptes de DNases et RNases.
- Utiliser des zones séparées pour la préparation des échantillons de patients et des contrôles afin d'éviter les faux positifs. Les échantillons et les réactifs doivent être manipulés sous une hotte PCR ou une hotte à flux laminaire.
- Ne pas manger, boire, fumer, appliquer des produits cosmétiques ou manipuler des lentilles de contact dans les zones où des réactifs et des échantillons humains sont manipulés.
- Les caractéristiques de performance ont été déterminées avec des échantillons salivaires et nasopharyngés provenant de patients présentant des signes et des symptômes d'infection respiratoire.
- Les modifications des réactifs de test, du protocole de test ou de l'instrumentation ne sont pas autorisées et sont en violation de la directive de diagnostic *in vitro* 98/79 / CE.
- Ne pas mélanger, ni échanger de composants provenant de lots de kits différents.
- Ne pas utiliser le kit après la date d'expiration.
- Éliminer les déchets conformément aux réglementations locales.
- Des fiches de données de sécurité sont disponibles sur demande.
- La qualité de l'échantillon et la préparation de l'échantillon peuvent influencer la qualité du test de RT-qPCR. Il est recommandé de traiter l'échantillon le plus rapidement possible après le prélèvement et de le conserver entre +2°C et +8°C avant le traitement. La congélation à -20°C peut entraîner une dégradation significative de l'ARN viral.
- Il est recommandé de procéder à la préparation de la réaction de RT-qPCR immédiatement après la lyse et en tout cas dans le délai maximum d'une heure après la lyse.
- Les lysats peuvent être gardés à température ambiante pendant la préparation de la réaction. Il est recommandé de garder les prélèvements réfrigérés (+2°C - +8°C) avant la lyse thermique pour assurer la stabilité.
- Les technologies d'amplification telles que la PCR sont sensibles à l'introduction accidentelle des produits de PCR à partir des réactions d'amplification précédentes. Des résultats incorrects peuvent survenir si l'échantillon clinique ou les réactifs utilisés dans l'étape d'amplification sont contaminés par l'introduction accidentelle d'un produit d'amplification (amplicon). Le flux de travail dans le laboratoire doit se dérouler de manière unidirectionnelle.

- Maintenir des zones séparées pour la préparation de la réaction et la manipulation des échantillons
- Changer les pointes à filtre des pipettes après chaque transfert de liquide
- Lors de la préparation des échantillons, le respect des bonnes pratiques de laboratoire est essentiel pour minimiser le risque de contamination croisée entre les échantillons et l'introduction accidentelle des nucléases dans les échantillons pendant et après la procédure d'extraction. Une technique aseptique appropriée doit toujours être utilisée lorsque vous travaillez avec des acides nucléiques.
- Maintenir un équipement séparé et dédié (par exemple, des pipettes, des micro centrifugeuses) et des consommables (par exemple, micro tubes, des pointes de pipette) pour la préparation de la réaction et des échantillons.
- Porter une blouse de laboratoire propre à manches longues et des gants jetables non poudrés (non portés auparavant) lors de la préparation de la réaction.
- Changer de gants chaque fois qu'une contamination est suspectée.
- Garder les réactifs et les tubes de réaction fermés ou couverts autant que possible.
- Les réactifs sont décongelés à température ambiante et peuvent être gardés à température ambiante pendant l'utilisation.
- Les surfaces de travail, pipettes, centrifugeuses et autres équipements doivent être nettoyés et décontaminés pour minimiser le risque de contamination par les acides nucléiques et la RNase.
- Éliminer les réactifs du kit et les échantillons humains conformément aux réglementations locales.

Limitations du test

- Ce test est destiné à être utilisé uniquement pour le diagnostic *in vitro*. Suivez les bonnes pratiques de laboratoire et toutes les précautions et les directives établies pour éviter la contamination croisée entre les échantillons.
- Les performances du kit OSANTYS SARS-CoV-2 DUO RT-qPCR n'ont été établies que sur les échantillons salivaires et nasopharyngés.
- Les échantillons doivent être collectés, transportés et stockés selon des procédures et des conditions appropriées. Une collecte, un transport ou un stockage inadéquats des échantillons peuvent affecter la capacité du test à détecter les séquences cibles.
- Ce kit utilise directement l'échantillon non purifié comme matériel de départ pour l'analyse. La qualité des échantillons est essentielle pour la qualité des résultats générés avec ce kit.
- Les résultats négatifs n'excluent pas l'infection par le SARS-CoV-2 et ne doivent pas être utilisés comme seule base pour le traitement ou d'autres décisions de prise en charge du patient. Le prélèvement de plusieurs échantillons (types d'échantillon et intervalles de temps) du même patient peut être nécessaire pour détecter le virus.

- **Des résultats faussement négatifs** peuvent résulter de :
 - Prélèvement, transport ou manipulation inappropriés d'échantillons.
 - Dégradation de l'ARN du SARS-CoV-2 pendant le transport / stockage.
 - Prélèvement d'échantillons après que l'ARN du SARS-CoV-2 ne peut plus être retrouvé dans la matrice de l'échantillon.
 - Méthodes d'extraction autres que celle indiquée dans le protocole.
 - La présence d'inhibiteurs de la RT-qPCR.
 - Nombre insuffisant d'organismes présents dans l'échantillon.
 - Mutation du virus SARS-CoV-2.
 - Non-respect des instructions d'utilisation.
- **Des résultats faussement positifs** peuvent résulter de :
 - Contamination croisée lors de la manipulation ou de la préparation des échantillons.
 - Contamination croisée entre les échantillons de patients.
 - Mélange d'échantillons.
 - Contamination par l'ARN lors de la manipulation du produit.
- Les impacts des vaccins, des thérapies antivirales, des antibiotiques, des médicaments chimio thérapeutiques ou immunosuppresseurs n'ont pas été évalués.
- Ce test ne peut exclure des maladies causées par d'autres agents pathogènes bactériens ou viraux.

Préparation de l'équipement

Nettoyer et décontaminer toutes les surfaces de travail, pipettes, centrifugeuses et autres équipements avant utilisation. Des agents de décontamination devraient être utilisés pour minimiser le risque de contamination et de dégradation des acides nucléiques.

Préparation des échantillons salivaires et nasopharyngés

Ce kit est utilisé avec des prélèvements salivaires, nasopharyngés et oropharyngés non purifiés soumis à une lyse thermique selon le protocole suivant :

1. Transférer 50 µL de chaque échantillon salivaire ou nasopharyngé dans des micro tubes de 1.5 mL.*
2. Placer les micro tubes dans un bain à sec à 99°C pendant 5 minutes. *(Ne pas dépasser les 10 minutes d'incubation à haute température pour préserver la qualité de l'échantillon).*

3. Centrifuger les micro tubes à 4000 rpm pendant 5 minutes.

Les étapes 2 et 3 doivent être réalisées juste avant la préparation de la réaction pour éviter tout risque de dégradation du lysat à température ambiante. Ne pas attendre plus d'une heure entre la lyse et la préparation de la réaction.

*Le cas échéant, les échantillons salivaires peuvent être testés purs ou dilués jusqu'au ¼ dans de la solution saline sans différence significative de la détection virale.

Ce kit peut être utilisé avec des écouvillons nasopharyngés et oropharyngés collectés dans les milieux de transport suivants :

- Solution saline
- Σ -Virocult (MWE)
- Σ -VCM (MWE)
- Σ -Transwab (MWE)
- DeltaSwab liquid amies (Deltalab)
- Fecal Transwab – liquid Cary Blair (MWE)

Instructions pour la RT-qPCR

- Charger la plaque immédiatement après la préparation. Le non-respect de cette consigne pourrait entraîner une dégradation de l'ARN.
- Pour éviter toute contamination, préparez les réactifs sous une hotte PCR dédiée ou dans une zone équivalente exempte des produits d'amplification.
- Ne pas utiliser la même pipette pour le mix réactionnel et les échantillons.
- Utiliser toujours des pointes à filtre. Maintenez un environnement sans RNase et DNase.
- Protéger le mix amorces / sondes de la lumière.
- Pour chaque série d'analyse, inclure un contrôle négatif et un contrôle positif.

Préparation de la réaction

Préparation du mix réactionnel et de la plaque d'analyse

- 1) Sous la hotte dédiée à la préparation du mix réactionnel, placer les tubes SARS-CoV-2 Primer / Probe Mix et One-Step RT-qPCR Enzyme Master Mix sur un portoir.
- 2) Décongeler les réactifs à température ambiante et conserver-les à température ambiante pendant la préparation et l'utilisation.

- 3) Vortexer doucement le tube SARS-CoV-2 Primer / Probe Mix et mélanger le tube One-Step RT-qPCR Enzyme Master Mix par inversion 5 fois.
- 4) Centrifuger brièvement les réactifs pour collecter le contenu au fond du tube.
- 5) Déterminer le nombre de réactions (N) à préparer. Inclure le mix réactionnel en excès. Utilisez le guide suivant pour déterminer N:
 - Si le nombre d'échantillons (n), contrôles compris, est compris entre 1 et 24, alors $N = n + 1$
 - Si le nombre d'échantillons (n), contrôles compris, est compris entre 25 et 48, alors $N = n + 2$
 - Si le nombre d'échantillons (n), contrôles compris, est compris entre 49 et 72, alors $N = n + 3$
 - Si le nombre d'échantillons (n), contrôles compris, est compris entre 73 et 96, alors $N = n + 4$
- 6) Pour chaque préparation, dans un micro tube de 1,5 ml, combiner les composants suivants :

Composant	Volume/Réaction
One-Step RT-qPCR Enzyme Master Mix 2X	$N \times 12.5 \mu\text{L}$
SARS-CoV-2 Primer/Probe Mix	$N \times 7.5 \mu\text{L}$
Volume Total	$N \times 20.0 \mu\text{L}$

- 7) Mélanger le mix réactionnel à l'aide de la pipette par des mouvements de flux/reflux. Ne vortexez pas.
- 8) Centrifuger brièvement pour collecter le contenu au fond du tube.
- 9) Placer les barrettes ou la plaque sur un portoir à 96 puits.
- 10) Pipeter 20 μL du mix réactionnel dans chaque puits.
- 11) Préparer la réaction du control négatif (No Template Control - NTC) : pipeter 5 μL de contrôle négatif SARS-CoV-2 dans le puits NTC en position A1 ou avant le premier échantillon. Sceller le puits du NTC avec un capuchon ou un morceau de film adhésif.
- 13) Couvrir la plaque et déplacer la vers la hotte de manipulation des échantillons.

Addition des échantillons

- 1) Pipeter soigneusement 5 μL de chaque lysat dans chaque puit. Changez les pointes à filtre après chaque ajout.

- 2) Pipeter 5 µL de contrôles positifs dans le puits du contrôle positif en position H12 ou après le dernier échantillon.
- 3) Sceller les barrettes avec des barrettes des capuchons ou la plaque avec un film adhésif.
- 4) Centrifuger brièvement les barrettes ou la plaque pendant 30 secondes.

Programmer l'instrument de PCR en temps réel

1. Créer le protocole suivant :

- Étape 1 / Dénaturation :
95°C, 30 sec
- Étape 2 / Transcription inverse :
60°C, 5 min
- Étape 3 / Réaction de PCR :
Dénaturation : 95°C, 5 sec
Hybridation / Elongation : 63,1°C, 30 sec (+ lecture de la fluorescence)
45 cycles

2. Sélectionner les fluorochromes :

Cible	Fluorochrome/ Canal
N1	FAM / bleu
N2	VIC/ vert
RP	Cy5 / rouge

3. Indiquer 25 µl comme volume réactionnel par puit.
4. Placer les barrettes ou la plaque dans le thermocycleur et démarrer l'analyse.
5. Une fois l'analyse terminée, analyser les données.

Ce kit a été validé pour une utilisation avec :

- CFX96™ Dx System (Bio-Rad) et logiciel CFX Dx Manager version 3.1 (plaques et barrettes optiques à puits blancs)
- CFX Opus 96 Dx System (Bio-Rad) et logiciel CFX Maestro Dx SE Software 2.0 (plaques et barrettes optiques à puits blancs).

Toute autre thermocycleur en temps réel avec canaux pour FAM, VIC et Cy5 et sans calibration avec ROX ou autre référence dye peuvent être utilisés avec ce kit.

Analyse des données

Reportez-vous au manuel de votre instrument de PCR en temps réel pour générer les courbes d'amplifications et les valeurs de Ct pour chaque échantillon, et définir le seuil et la ligne de base.

Interprétation des résultats

Performance attendue pour les contrôles inclus dans le kit OSANTYS SARS-CoV-2 DUO RT-qPCR

Type de Contrôle	Utilisé pour vérifier	N1	N2	RP	Valeurs de Ct attendues
Positif	Échec majeur des réactifs, y compris l'intégrité des amorces et des sondes	+	+	+	< 38
Négatif	Contamination des réactifs et / ou de l'environnement	-	-	-	< 38
Endogène	Échec de la procédure de lyse et d'extraction, contamination potentielle lors de l'extraction	-	-	+	< 38

Si l'un des contrôles ci-dessus ne présente pas les performances attendues telles que décrites, le test peut avoir été préparé et / ou exécuté de manière incorrecte, ou un dysfonctionnement du réactif ou de l'équipement peut s'être produit. Recommencez le test.

Interprétation des résultats des échantillons des patients

N1	N2	RP	Interprétation des résultats ^a	Rapport	Actions
Ct < 38	Ct < 38	±	SARS-CoV-2 détecté	Positif pour SARS-CoV-2	Transmettre aux autorités de santé locales et au patient
Si seulement une des 2 cibles est positive		±	SARS-CoV-2 détecté si Ct < 34	Positif pour SARS-CoV-2	Transmettre aux autorités de santé locales et au patient
			Douteux si Ct > 34	Douteux	
Ct > 38	Ct > 38	Ct < 38	SARS-CoV-2 non détecté	Non détecté	Transmettre au patient. Tester le patient pour un autre pathogène respiratoire ^b
ND	ND	ND	Résultat invalide	Invalide	Répéter la lyse et la RT-qPCR. Si le résultat est à nouveau invalide, procéder à un nouveau prélèvement sur le patient

ND = non détecté

^a Les laboratoires doivent rendre compte de leur résultat de diagnostic le cas échéant et conformément à leur système de notification spécifique.

^b Les types d'échantillons optimaux et le moment des pics de concentration virale lors d'infections causées par le SARS-CoV-2 n'ont pas été déterminés. Le prélèvement de plusieurs échantillons sur le même patient peut être nécessaire pour détecter le virus. La possibilité d'un résultat faussement négatif doit être particulièrement envisagée si les expositions récentes du patient ou la présentation clinique suggèrent que l'infection par le SARS-CoV-2 est possible et que les tests de diagnostic pour d'autres causes de maladie (par exemple, une autre maladie respiratoire) sont négatifs. Si une infection par le SARS-CoV-2 est toujours suspectée, un nouveau test doit être envisagé en consultation avec les autorités de santé publique.

Si un laboratoire obtient des résultats inattendus pour les contrôles de test, ou si des résultats non concluants ou non valides sont obtenus et ne peuvent pas être résolus par la réalisation d'un nouveau test, veuillez contacter Osantys pour tout renseignement.

RNase P (Contrôle endogène)

▪ Tous les échantillons cliniques doivent présenter un signal de fluorescence pour le RP < 38 Ct, indiquant la présence du gène de la RNase P humaine. Le fait de ne pas détecter la RNase P dans les échantillons cliniques peut indiquer :

- Extraction incorrecte des acides nucléiques à partir de matériel clinique entraînant une perte d'ARN et / ou une dégradation de l'ARN.
- Absence de matériel cellulaire humain suffisant en raison d'une mauvaise collecte ou d'une perte d'intégrité de l'échantillon.
- Préparation et exécution incorrectes du test.
- Dysfonctionnement du réactif ou de l'équipement.

▪ Si le test RP ne produit pas de résultat positif pour les échantillons cliniques, interpréter comme suit :

- Si les marqueurs N1 et N2 du SARS-CoV-2 sont positifs même en l'absence d'un RP positif, le résultat doit être considéré comme valide.

Il est possible que certains échantillons ne présentent pas de courbes d'amplification pour RP en raison du faible nombre de cellules dans l'échantillon clinique d'origine ou de la compétition des réactifs. Un signal RP négatif n'exclut pas la présence d'ARN du virus SARS-CoV-2 dans un échantillon clinique.

- Si N1, N2 ET RP sont négatifs pour l'échantillon, le résultat doit être considéré comme invalide pour l'échantillon.

Si un échantillon résiduel est disponible, répétez la procédure de lyse et répétez le test.

Si tous les marqueurs restent négatifs après un nouveau test, signalez les résultats comme non valides et un nouvel échantillon doit être prélevé si possible.

Marqueurs N1 and N2 du SARS-CoV-2

▪ Lorsque tous les contrôles présentent les performances attendues, un échantillon est considéré comme négatif si les deux signaux N1 ET N2 ne sont pas détectés ou Ct > 38 ET le signal RP est < 38 Ct.

▪ Lorsque tous les contrôles présentent les performances attendues, un échantillon est considéré comme positif pour le SARS-CoV-2 si les deux signaux N1 ET N2 sont < 38 Ct. Le RP peut être positif ou non comme décrit ci-dessus, mais le résultat est toujours valide.

▪ Lorsque tous les contrôles présentent les performances attendues et qu'un seul des marqueurs SARS-CoV-2 (N1 OU N2 mais pas les deux marqueurs) montre un signal < 38 Ct, interpréter comme suit :

▪ - Si N1 ou N2 Ct est < 34, un échantillon est considéré comme positif. Une mutation affectant l'autre sonde aurait pu avoir un impact sur la détection du signal.

▪ - Si N1 ou N2 Ct est > 34, le résultat n'est pas concluant. L'échantillon doit être retesté à partir d'un nouveau prélèvement.

▪ Lorsque tous les contrôles présentent les performances attendues et que les Ct pour N1, N2 ET les marqueurs RP ne sont pas détectés, le résultat est invalide. L'échantillon doit être retesté. Si l'échantillon retesté est négatif pour tous les marqueurs, le résultat est invalide et le prélèvement d'un nouvel échantillon sur le patient doit être envisagé.

Contrôle de qualité

- Les exigences de contrôle de qualité doivent être exécutées conformément aux réglementations locales ou aux exigences d'accréditation et aux procédures de contrôle de qualité standard du laboratoire de l'utilisateur. Pour plus d'informations sur les pratiques de contrôle qualité appropriées, reportez-vous au système d'accréditation de votre laboratoire gouvernemental.
- Les procédures de contrôle qualité sont destinées à surveiller les performances des réactifs et des dosages.
- Toujours inclure le contrôle négatif (NTC) et le contrôle positif dans chaque série d'amplification.
- Tous les échantillons cliniques doivent être testés pour le gène RP humain afin de contrôler la qualité et l'extraction des échantillons.

Analyse des Performances

Les performances analytiques et cliniques du kit OSANTYS SARS-CoV-2 DUO RT-qPCR ont été évaluées en comparant les performances en fonction du type d'extraction, en déterminant la limite de détection (LoD), en caractérisant la spécificité, la réactivité croisée et les substances interférentes, comme décrit dans les sections suivantes.

Performance analytique

Évaluation des performances du kit sur prélèvements salivaires

Pour évaluer les performances du kit, des échantillons salivaires précédemment testés positifs ou négatifs avec le kit OSANTYS SARS-CoV-2 à partir d'ARN purifié, ont été testés après lyse thermique.

- 59 échantillons salivaires positifs
- 46 échantillons salivaires négatifs

Tableau 1a. Évaluation des performances du kit sur prélèvements salivaires

Résultats	Osantys SARS-CoV-2 DUO RT-qPCR Kit	Osantys SARS-CoV-2 RT-qPCR Kit
Positifs/ Positifs attendus	58*/59	59/59
Négatifs/ Négatifs attendus	46/46	46/46

*Méthode de référence : N1 = 40.37, N2 = 35

Sensibilité analytique du test Osantys SARS-CoV-2 DUO RT-qPCR Kit sur prélèvements salivaires : 98.3%

Spécificité analytique du test Osantys SARS-CoV-2 DUO RT-qPCR Kit sur prélèvements salivaires : 100%

Évaluation des performances du kit sur prélèvements nasopharyngés

Pour évaluer les performances du kit, des échantillons nasopharyngés précédemment testés positifs ou négatifs avec le kit OSANTYS SARS-CoV-2 à partir des prélèvements non purifiés, ont été testés après lyse thermique.

- 152 échantillons nasopharyngés positifs
- 35 échantillons nasopharyngés négatifs

Tableau 2a. Évaluation des performances du kit sur prélèvements nasopharyngés

Résultats	OSANTYS SARS-CoV-2 DUO RT-qPCR Kit	OSANTYS SARS-CoV-2 RT-qPCR Kit
Positifs/ Positifs attendus	136*/152	152/152
Négatifs/ Négatifs attendus	35/35	35/35
Positifs*/ Négatifs attendus	0/35	0/35

*Tous les échantillons testés négatifs avec le kit OSANTYS SARS-CoV-2 DUO montrent un Ct proche de la limite de détection avec la méthode de référence.

Sensibilité analytique du test Osantys SARS-CoV-2 DUO RT-qPCR Kit sur prélèvements NP : 89,5%.

Spécificité analytique du test Osantys SARS-CoV-2 DUO RT-qPCR Kit sur prélèvements NP : 100%.

Un ΔCt variable est observé entre les 2 kits, indépendamment de la charge virale. Les 2 kits ont 2 typologies de cibles différentes : le kit SARS-CoV-2 RT-qPCR cible l'ARN viral libre, le kit SARS-CoV-2 DUO RT-qPCR cible le virus extra- et intra-cellulaire. La quantité relative des 2 cibles peut être différente dans chaque échantillon, comme montré dans les tableaux 2b et 2c.

Tableau 2b. Evaluation de l'ARN libre, du virus extra- et intra-cellulaire dans les échantillons NP (exprimé en Ct).

NP Echantillon	N1			N2			RP		
	Virus extracellulaire	Virus intracellulaire	ARN libre extracellulaire	Virus extracellulaire	Virus intracellulaire	ARN libre extracellulaire	Virus extracellulaire	Virus intracellulaire	ARN libre extracellulaire
3048	19.05	21.97	16.59	30.72	35.18	25.32	31.10	33.56	30.84
3028	23.62	25.08	21.18	35.16	35.68	29.13	32.00	31.97	31.09
3013	23.75	19.90	19.32	34.80	33.15	25.07	25.87	27.10	26.18
71	21.61	25.81	22.42	23.13	27.22	22.74	29.64	30.66	30.21
13A	27.9	31.09	27.89	28.91	31.2	27.8	28.9	30.77	28.7
15A	20.02	22.94	18.54	21.67	24.36	18.72	30.64	30.23	29.42
10A	28.89	28.23	23.79	30.07	29.6	23.89	30.69	32.41	29.51
5WT	32.81	31.35	28.8	33.91	32.93	28.67	31.58	32.8	29.89
9WT	39.51	33.75	32.7	35.02	34.13	32.02	29.04	31.31	28.65
4B	33.73	27.49	23.78	32.77	28.3	23.62	28.5	30.39	27.09

Tableau 2c. Evaluation du virus extra- et intra-cellulaire dans les échantillons salivaires (exprimé en Ct).

<i>Salive</i>	N1		N2		RP	
Echantillon	Virus extracellulaire	Virus intracellulaire	Virus extracellulaire	Virus intracellulaire	Virus extracellulaire	Virus intracellulaire
16P	20.84	21.44	22.86	23.04	25.83	28.28
7P	33.16	34.60	32.01	33.01	28.37	30.35
40P	28.94	31.12	28.93	31.31	28.27	29.99
6P	27.56	28.15	28.92	29.43	28.68	30.69
33P	28.19	29.75	28.57	29.73	29.29	28.9
25P	28.78	30.8	28.07	29.95	24.28	26.55
8P	24.72	26.35	25.87	27.3	26.77	28.91
14P	26.92	26.4	27.77	27.29	26.73	28.8
11P	31.5	32.09	30.91	31.56	29.06	29.94
15P	32.29	30.1	31.61	30.33	29.28	29.32

Evaluation de la corrélation prélèvement nasopharyngé/prélèvement salivaire

19 patients ont été prélevés simultanément en prélèvements salivaires (11 positifs et 8 négatifs) et prélèvements nasopharyngés (8 positifs et 11 négatifs).

Le kit utilisé pour réaliser le test sur les prélèvements NP est le OSANTYS SARS-CoV-2 RT-qPCR KIT (Réf : OS-COV2-100).

En prenant tout positif à l'un ou l'autre de ces tests comme vrai positif, la sensibilité clinique du test OSANTYS SARS-CoV-2 DUO RT-qPCR KIT sur prélèvement salivaire par comparaison au prélèvement nasopharyngé concomitant est de 100%. L'intervalle de confiance à 95% est de (0.83 - 1.0).

Limite de détection (LoD)

L'étude de la LoD a établi la concentration du SARS-CoV-2 la plus basse pouvant être détectée par le kit OSANTYS SARS-CoV-2 DUO RT-qPCR dans un type d'échantillon défini au moins dans 95% des cas. La LoD a été déterminée avec des études des dilutions en série au 1/10.

1. 10 prélèvements salivaires positifs validés et 10 prélèvements nasopharyngés positifs validés ont été dilués en série au 1/10 dans un pool de matrices salivaires ou nasopharyngées négatives, puis traités utilisant la procédure du kit. 8 réplicats ont été réalisés pour chaque dilution. Le contrôle positif SARS-CoV-2 quantifié a été utilisé pour déterminer le nombre de copies virales. La LoD est indiquée dans la case jaune.

Tableau 3a. Détermination de la LoD dans dix prélèvements salivaires

Cibles	N1					N2					2P
Concentration ARN ¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	
Positifs/Total	8/8	8/8	8/8	8/8	2/8	8/8	8/8	8/8	3/8	0/8	
Ct moyen ²	28.68	31.00	32.43	33.81	34.22	28.74	30.69	33.60	34.58	ND	
Déviati on standard (Ct)	0.273	0.287	0.255	0.781	0.883	0.209	0.530	0.946	0.256	-	

Cibles	N1					N2					14P
Concentration ARN ¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	
Positifs/Total	8/8	8/8	8/8	5/8	2/8	8/8	8/8	1/8	0/8	0/8	
Ct moyen ²	29.90	31.69	33.21	34.34	34.99	29.86	31.66	34.72	ND	ND	
Déviati on standard (Ct)	0.385	0.309	0.445	0.582	0.019	0.303	0.857	-	-	-	

Cibles	N1					N2					32P
Concentration ARN ¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	
Positifs/Total	8/8	8/8	8/8	2/8	0/8	8/8	8/8	5/8	1/8	0/8	
Ct moyen ²	29.91	31.98	34.27	36.24	ND	29.98	32.18	34.72	35.27	ND	
Déviati on standard (Ct)	0.116	0.269	0.346	0.066	-	0.084	1.254	0.434	-	-	

Cibles	N1					N2					25P
Concentration ARN ¹	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁰	10 ⁻¹	
Positifs/Total	8/8	8/8	3/8	0/8	0/8	8/8	6/8	0/8	0/8	0/8	
Ct moyen ²	32.07	33.63	35.30	ND	ND	31.76	33.67	ND	ND	ND	
Déviati on standard (Ct)	0.174	0.491	0.658	-	-	1.205	1.178	-	-	-	

Cibles	N1					N2					6P
Concentration ARN ¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	
Positifs/Total	8/8	8/8	7/8	6/8	0/8	8/8	8/8	7/8	1/8	0/8	
Ct moyen ²	30.59	31.77	33.78	34.67	ND	30.43	32.15	34.83	35.23	ND	
Déviati on standard (Ct)	0.107	0.235	0.358	0.192	-	0.221	1.370	0.377	-	-	

Cibles	N1					N2					26P
Concentration ARN ¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	
Positifs/Total	8/8	8/8	8/8	8/8	3/8	8/8	8/8	3/8	0/8	0/8	
Ct moyen ²	28.32	31.10	33.17	34.35	35.07	28.89	31.14	34.26	ND	ND	
Déviati on standard (Ct)	0.296	0.877	0.455	0.485	-	0.189	1.408	0.358	-	-	

Cibles	N1					N2					15P
Concentration ARN ¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	
Positifs/Total	8/8	8/8	8/8	1/8	2/8	8/8	8/8	2/8	0/8	0/8	
Ct moyen ²	30.36	32.40	34.44	34.94	35.08	29.96	32.57	35.09	ND	ND	
Déviati on standard (Ct)	0.246	0.400	0.270	-	0.007	0.136	1.047	0.078	-	-	

Cibles	N1					N2					16P
Concentration ARN ¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	
Positifs/Total	8/8	8/8	8/8	5/8	0/8	8/8	8/8	4/8	0/8	0/8	
Ct moyen ²	30.35	32.74	34.80	35.31	ND	30.63	32.88	35.88	ND	ND	
Déviati on standard (Ct)	0.226	0.207	0.556	0.662	-	0.104	0.879	1.166	-	-	

Cibles	N1					N2					8P
Concentration ARN ¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	
Positifs/Total	8/8	8/8	7/8	0/8	0/8	8/8	8/8	4/8	0/8	0/8	
Ct moyen ²	29,31	32,46	34,00	ND	ND	28,80	32,31	34,41	ND	ND	
Déviati on standard (Ct)	0,183	0,230	0,378	-	-	0,083	0,824	0,695	-	-	

Cibles	N1					N2					34P
Concentration ARN ¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	
Positifs/Total	8/8	8/8	8/8	2/8	0/8	8/8	8/8	6/8	4/8	0/8	
Ct moyen ²	30.39	32.65	35.02	36.25	ND	30.58	32.03	35.02	36.65	ND	
Déviations standard (Ct)	0.224	0.242	0.870	0.683	-	0.230	0.224	0.870	0.979	-	

¹ La concentration est exprimée en copies d'ARN / réaction.

² Ct moyen calculé pour les résultats positifs de chaque dilution. ND = non détecté

Tableau 3b. Détermination de la LoD dans dix prélèvements nasopharyngés

Cibles	N1				N2				10WT
Concentration ARN ¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	
Positifs/Total	8/8	8/8	8/8	2/8	8/8	8/8	2/8	0/8	
Ct moyen ²	31.13	34.05	36.50	41.94	31.85	34.39	35.57	ND	
Déviations standard (Ct)	0.196	0.293	0.474	2.837	0.238	0.586	0.069	-	

Cibles	N1					N2					32
Concentration ARN ¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	
Positifs/Total	8/8	8/8	8/8	6/8	0/8	8/8	8/8	8/8	0/8	0/8	
Ct moyen ²	30.07	31.95	34.33	36.33	ND	31.64	32.91	34.78	ND	ND	
Déviations standard (Ct)	0.115	0.294	0.607	0.712	-	0.134	0.430	0.313	-	-	

Cibles	N1					N2					173
Concentration ARN ¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	
Positifs/Total	8/8	8/8	8/8	1/8	0/8	8/8	8/8	7/8	0/8	0/8	
Ct moyen ²	30.66	32.60	34.98	35.76	ND	32.19	33.48	37.20	ND	ND	
Déviations standard (Ct)	0.132	0.320	0.449	-	-	0.310	0.328	3.193	-	-	

Cibles	N1					N2					150
Concentration ARN ¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	
Positifs/Total	8/8	8/8	8/8	0/8	0/8	8/8	8/8	4/8	0/8	0/8	
Ct moyen ²	30.37	32.41	34.41	ND	ND	31.48	33.06	35.01	ND	ND	
Déviati on standard (Ct)	0.404	0.383	0.660	-	-	0.461	0.608	1.275	-	-	

Cibles	N1					N2					37
Concentration ARN ¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	
Positifs/Total	8/8	8/8	8/8	3/8	0/8	8/8	8/8	6/8	3/8	0/8	
Ct moyen ²	30.20	32.58	35.34	36.44	ND	31.90	34.10	35.87	35.89	ND	
Déviati on standard (Ct)	0.104	0.286	0.536	0.709	-	0.199	0.454	0.518	0.887	-	

Cibles	N1					N2					10A
Concentration ARN ¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	
Positifs/Total	8/8	8/8	8/8	3/8	0/8	8/8	8/8	6/8	1/8	1/8	
Ct moyen ²	29.87	32.76	34.77	36.28	ND	30.94	33.35	34.84	34.31	35.48	
Déviati on standard (Ct)	0.122	0.144	0.787	0.448	-	0.122	0.404	0.689	-	-	

Cibles	N1				N2				4106
Concentration ARN ¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	
Positifs/Total	8/8	8/8	5/8	1/8	8/8	8/8	1/8	2/8	
Ct moyen ²	32.25	33.74	35.87	36.87	33.43	34.45	35.13	35.28	
Déviati on standard (Ct)	0.319	0.432	0.680	-	0.465	0.435	-	0.629	

Cibles	N1					N2					141
Concentration ARN ¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁰	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	
Positifs/Total	8/8	8/8	5/8	0/8	0/8	8/8	7/8	1/8	0/8	0/8	
Ct moyen ²	30.87	33.79	35.55	ND	ND	31.87	33.78	36.97	ND	ND	
Déviati on standard (Ct)	0.264	0.250	1.281	-	-	0.221	0.431	-	-	-	

Cibles	N1				N2				2A
Concentration ARN ¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	
Positifs/Total	8/8	8/8	6/8	0/8	8/8	7/8	3/8	0/8	
Ct moyen ²	31.11	34.14	36.71	ND	31.69	34.00	35.90	ND	
Déviations standard (Ct)	0.305	0.595	0.653	-	0.248	0.419	0.415	-	

Cibles	N1				N2				4WT
Concentration ARN ¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	
Positifs/Total	8/8	8/8	6/8	0/8	8/8	6/8	2/8	0/8	
Ct moyen ²	31.53	34.67	37.05	ND	32.32	34.78	35.68	ND	
Déviations standard (Ct)	0.269	0.300	1.024	-	0.303	0.530	0.155	-	

¹ La concentration est exprimée en copies d'ARN / réaction

² Ct moyen calculés pour les résultats positifs de chaque dilution. ND = non détecté

2. Le virus SARS-CoV-2 purifié et quantifié a été dilué en série au 1/10 dans un pool de matrices salivaires ou nasopharyngées négatives, puis traité utilisant la procédure du kit. 8 replicats ont été réalisés pour chaque dilution. La LoD est indiquée dans la case jaune. Le nombre de copies/réaction est estimé avec une efficacité d'extraction de 100%.

Tableau 4. Détermination de la LoD du virus SARS-CoV-2 dans un pool de matrices salivaires et nasopharyngées négatives

Salive	N1						N2					
Copies virus/ml salive (copies/réaction)	200.000 (1000)	100.000 (500)	20.000 (100)	10.000 (50)	2.000 (10)	200 (1)	200.000 (1000)	100.000 (500)	20.000 (100)	10.000 (50)	2.000 (10)	200 (1)
Positifs/Total	8/8	8/8	8/8	7/8	3/8	1/8	8/8	8/8	8/8	6/8	4/8	1/8
Ct moyen ¹	27.63	28.86	33.27	33.57	35.00	36.02	27.37	28.61	32.88	34.78	36.07	36.12
Déviations standard (Ct)	0.032	0.101	0.791	0.681	0.671	-	0.105	0.081	1.432	0.742	0.522	-

NP	N1						N2					
Copies virus/ml matrice NP (copies/réaction)	200.000 (1000)	100.000 (500)	20.000 (100)	10.000 (50)	2.000 (10)	200 (1)	200.000 (1000)	100.000 (500)	20.000 (100)	10.000 (50)	2.000 (10)	200 (1)
Positifs/Total	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	3/8	8/8	8/8	8/8	8/8	4/8	0/8
Ct moyen ¹	28.04	29.09	32.67	34.04	36.78	37.15	28.27	29.27	32.67	33.91	35.45	ND
Déviations standard (Ct)	0.262	0.143	0.206	0.380	0.973	1.695	0.277	0.158	0.151	0.207	1.098	-

¹ Ct moyen calculés pour les résultats positifs de chaque dilution. ND = non détecté

3. Le contrôle positif SARS-CoV-2 et le virus SARS-CoV-2 purifié et quantifié ont été dilués en série au 1/10 dans un pool de matrices salivaires ou nasopharyngées négatives, puis traités utilisant la procédure du kit. 2 réplicats ont été réalisés pour chaque dilution pour déterminer la gamme étalon. Le contrôle positif quantifié SARS-CoV-2 a été utilisé pour déterminer le nombre de copies virales. La LoD est indiquée dans la case jaune.

Tableau 5. Détermination de la LoD du contrôle positif SARS-CoV-2 et du virus purifié et quantifié SARS-CoV-2 dans un pool de matrices salivaires et nasopharyngées négatives

Salive	Concentration ARN ¹	N1		N2		RP	
		Ct moyen ²	Ct Dev Std.	Ct moyen ²	Ct Dev. Std.	Ct moyen ²	Ct Dev. Std.
Contrôle positif SARS-CoV-2	10 ⁵	23,28	0,998	23,13	0,962	28,31	1,064
	10 ⁴	27,35	0,425	26,70	0,240	29,00	0,339
	10 ³	29,75	0,066	28,80	0,022	28,90	0,010
	10 ²	31,53	1,788	29,93	1,384	27,73	2,422
	10 ¹	34,22	0,551	33,66	1,974	29,02	0,076
	10 ⁰	ND	-	35,15	-	29,21	0,393
	10 ⁻¹	ND	-	ND	-	29,42	0,095
Virus SARS-CoV-2	10 ³	27,74	0,129	27,42	0,182	28,15	0,086
	10 ²	32,75	0,039	32,23	0,314	28,40	0,375
	10 ¹	35,26	-	ND	-	29,13	0,010
	10 ⁰	35,52	-	ND	-	28,29	0,101
	10 ⁻¹	ND	-	ND	-	29,45	0,140

NP	Concentration ARN ¹	N1		N2		RP	
		Ct moyen ²	Ct Dev Std.	Ct moyen ²	Ct Dev. Std.	Ct moyen ²	Ct Dev. Std.
Contrôle positif SARS-CoV-2	10 ⁵	24.21	0.147	24.44	0.105	29.34	0.198
	10 ⁴	27.17	0.110	27.23	0.008	29.52	0.007
	10 ³	30.45	0.066	30.06	0.153	29.88	0.032
	10 ²	33.08	0.002	32.29	0.050	29.78	0.087
	10 ¹	34.72	-	33.54	-	29.79	0.026
	10 ⁰	ND	-	ND	-	29.87	0.074
	10 ⁻¹	ND	-	ND	-	29.86	0.116
Virus SARS-CoV-2	10 ³	27.92	0.210	28.33	0.189	29.67	0.025
	10 ²	32.55	0.123	32.79	0.139	29.75	0.079
	10 ¹	35.28	0.423	35.43	-	29.72	0.028
	10 ⁰	36.21	-	ND	-	29.79	0.055
	10 ⁻¹	ND	-	ND	-	29.85	0.205

¹ La concentration est exprimée en copies d'ARN / réaction

² Ct moyen calculés pour les résultats positifs de chaque dilution. ND = non détecté

Conclusion : la LoD est comprise entre 1 et 100 copies/réaction (0,2 et 20 copies/ μ L) en fonction de l'échantillon testé. Cette variabilité est justifiée par l'utilisation d'un lysat (échantillon non purifié) comme matériel de départ.

Ces différentes études permettent de déterminer une sensibilité analytique de:

- 2 copies/ μ L pour les prélèvements NP.
- 2 copies/ μ L pour les prélèvements d'origines salivaires

Réactivité (inclusivité)

Analyse in silico des séquences d'amorces et de sondes

Les séquences des amorces et des sondes du kit OSANTYS SARS-CoV-2 DUO RT-qPCR ont été évaluées par rapport à 31 623 séquences disponibles dans la base de données de l'Initiative mondiale sur le partage de toutes les données sur la grippe (GISAID, <https://www.gisaid.org>) au 20 juin 2020, pour démontrer les prévisions inclusivité du kit OSANTYS SARS-CoV-2 DUO RT-qPCR. Les mésappariements nucléotidiques dans les régions amorce / sonde avec des fréquences > 0,1% sont indiqués ci-dessous. À l'exception d'un mésappariement d'un nucléotide avec une fréquence > 1% (2,00%) à la troisième position de la sonde N1, la fréquence de tous les mésappariements était <1%, indiquant que la prévalence des mésappariements était sporadique. Une seule séquence (0,0032%) avait deux mésappariements de nucléotides dans la sonde N1, et une autre séquence d'un isolat différent (0,0032%) avait deux mésappariements de nucléotides dans l'amorce inverse N1. Aucune séquence ne s'est avérée avoir plus d'un mésappariement dans une quelconque région d'amorce / sonde N2. Le risque que ces mésappariements se traduisent par une perte de réactivité importante entraînant un résultat faux négatif est extrêmement faible du fait de la conception des amorces et des sondes,

avec des températures de fusion > 65°C et avec une température d'hybridation à 63,1 ° C pouvant tolérer jusqu'à deux inadéquations.

Tableau 6. Analyse *in silico* de l'inclusivité sur 31.623 séquences génomiques disponibles dans la base des données GISAID le 20 Juin 2020

Amorce/Sonde	Sonde N1	Amorce antisens N1		Sonde N2
Position (5'>3')	3	15	21	13
Mésappariement	C>T	G>T	T>C	C>T
No. Mésappariement	632	34	71	46
Fréquence Mésappariement (%)	2.00	0.11	0.22	0.15

Analyse *in silico* et *in vitro* des variants du SARS-CoV-2

L'analyse de la séquence du gène N des variants B1.1.7 (Alpha, Royaume-Uni - UK), B.1.351 (Beta, Afrique du Sud - SA), P.1 (Gamma, Brésil -B), B.1.617.2 (Delta, Inde), B.1.427/ B.1.429 (Epsilon, Californie) and B.1.167.1 (Kappa, Inde) a révélé que les ensembles d'amorces et sondes N1 et N2 ne se trouvent pas dans les régions affectées par les mutations, ainsi ils peuvent être détectés par ce test, excluant tout résultat faux négatif.

L'analyse de la séquence du gène N du variant Omicron (B1.1.529, Afrique du Sud) a révélé que l'ensemble d'amorces et sonde N2 ne se trouve pas dans les régions affectées par les mutations. La mutation présente sur la 3^{ème} base en 5' de la sonde N1 n'impacte pas la détection de la cible N1, comme montré par Yanxia Bei *et al.* (5). Le variant Omicron (B1.1.529) peut être détecté par ce test, excluant tout résultat faux négatif.

En plus de l'analyse *in silico*, des échantillons salivaires et nasopharyngés positifs validés pour les variants Delta et Omicron ont été testés. Pour les variants Beta et Gamma, des échantillons nasopharyngés positifs validés ont été testés. Les données démontrent que les résultats attendus ont été obtenus.

Tableau 7. Détection des variants du SARS CoV-2

Cible	N1			N2		
Variant	Beta & Gamma	Delta	Omicron	Beta & Gamma	Delta	Omicron
Positifs/Total	10/10	59/59 S 19/19 NP	2/2 S 15/15 NP	10/10	59/59 S 19/19 NP	2/2 S 15/15 NP

Test de spécificité / exclusivité : analyse in silico

Les analyses BLASTn des amorces et sondes du kit OSANTYS SARS-CoV-2 DUO RT-qPCR ont été effectuées contre des séquences nucléotidiques du domaine public. Les paramètres de recherche dans la base de données étaient les suivants :

- 1) La collection de nucléotides comprend les séquences GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + RefSeq, mais exclut EST, STS, GSS, WGS, TSA, les séquences couvertes de brevet ainsi que les séquences HTGS de phase 0, 1 et 2 et les séquences de plus de 100 Mo.
- 2) La base de données n'est pas redondante. Des séquences identiques ont été fusionnées en une seule, tout en préservant les informations d'accès, de GI, de titre et de taxonomie pour chaque séquence.
- 3) La base de données a été mise à jour le 10/03/2019.
- 4) Les paramètres de recherche s'ajustent automatiquement pour les séquences courtes et le seuil attendu est de 1000.
- 5) Les scores d'appariements et mésappariements sont respectivement de 1 et -3.
- 6) La pénalité pour créer et prolonger un espace dans un alignement est de 5 et 2 respectivement.

Ensemble amorces/sonde N1

La séquence de la sonde N1 a montré une homologie de séquence élevée avec le génome du coronavirus du SARS et du coronavirus SARS-like de la chauve-souris. Cependant, les amorces sens et antisens N1 n'ont montré aucune homologie de séquence avec le génome du coronavirus du SARS et du coronavirus SARS-like de la chauve-souris. En combinant les amorces et la sonde, il n'y a pas d'homologies significatives avec le génome humain, d'autres coronavirus ou la microflore humaine qui permettraient de prédire des résultats potentiels faux positifs de RT-qPCR.

Ensemble amorces/sonde N2

La séquence de l'amorce sens N2 a montré une homologie de séquence élevée avec les SARS-like du chauve-souris. Les séquences de l'amorce antisens N2 et de la sonde N2 n'ont montré aucune

homologie significative avec le génome humain, d'autres coronavirus ou la microflore humaine. En combinant les amorces et la sonde, il n'y a pas de prédiction des résultats potentiels faux positifs de RT-qPCR.

En résumé, les ensembles d'amorces et sondes N1 et N2 conçus pour la détection spécifique du SARS-CoV-2, n'ont montré aucune homologie combinée significative avec le génome humain, d'autres coronavirus ou la microflore humaine qui prédiraient des résultats potentiels faux positifs de RT-qPCR.

En plus de l'analyse *in silico*, les génomes des plusieurs organismes ont été extraits et testés en triplicat avec le kit OSANTYS SARS-CoV-2 DUO RT-qPCR pour démontrer la spécificité et l'exclusivité analytiques. Les études ont été réalisées avec des acides nucléiques extraits par lyse thermique. Les données démontrent que les résultats attendus sont obtenus.

Tableau 8 Spécificité/Exclusivité du kit OSANTYS SARS-CoV-2 DUO RT-qPCR

Pathogène respiratoire	Origine	N1	N2
Human coronavirus 229E	Culture virale	ND	ND
Human coronavirus OC43	Culture virale	ND	ND
Human coronavirus NL63	Culture virale	ND	ND
MERS-coronavirus	Virus purifié*	ND	ND
SARS-coronavirus	Virus purifié*	ND	ND
Influenza A (H1N1)	Virus purifié*	ND	ND

*mélangé avec une matrice salivaire ou nasopharyngée négative pour mimer l'échantillon biologique

Études sur les substances endogènes interférentes

Pour évaluer les substances interférentes dans les échantillons salivaires et nasopharyngés, un pool de prélèvements salivaires ou nasopharyngés négatifs ont été ajoutés avec le virus SARS-CoV-2 purifié et quantifié à la concentration de 100.000 copies/ml, et des substances potentiellement interférentes à la concentration indiquée dans le tableau 9, et testés en triplicat. Aucun résultat faussement négatif a été observé pour l'une quelconque des substances aux concentrations testées.

Tableau 9. Analyse des substances endogènes interférentes dans des prélèvements salivaires et nasopharyngés

Substance Interférente	Concentration Finale dans l'échantillon	Accord avec les résultats attendus			
		Prélèvement salivaire positif	Prélèvement salivaire négatif	Prélèvement NP positif	Prélèvement NP négatif
Aucune	N/A	3/3	3/3	3/3	3/3
Sang (humain)	1% v/v	3/3	3/3	3/3	3/3
Corticostéroïde Nasal — Dymista™	5 µg/mL	3/3	3/3	3/3	3/3
Anesthésique et analgésique oral pour les maux de gorge — Xylocaïne 5%	1% w/v	3/3	3/3	3/3	3/3
Oseltamivir phosphate - Tamiflu	33 µg/mL	3/3	3/3	3/3	3/3
Antibiotique, nasal pommade — Mupirocine 2%	5 µg/mL	3/3	3/3	3/3	3/3
Antibactérien, systémique— Tobramycine - Nebcine	0.6 mg/mL	3/3	3/3	3/3	3/3
Sérum physiologique (0.9%)	10% v/v	3/3	3/3	3/3	3/3

Performance clinique

Une étude d'évaluation clinique a été réalisée pour évaluer les performances du kit OSANTYS SARS-CoV-2 DUO RT-qPCR utilisant des prélèvements salivaires et nasopharyngés préalablement testés positifs ou négatifs.

- 60 prélèvements salivaires préalablement testés positifs avec le « Bosphore SARS-CoV-2/Flu/RSV Panel Kit (Anatolia geneworks) » à partir d'ARN purifié.
 - 76 prélèvements nasopharyngés préalablement testés positifs avec le Kit OSANTYS SARS-CoV-2 RT-qPCR.
 - 33 prélèvements nasopharyngés préalablement testés positifs avec le « Bosphore SARS-CoV-2/Flu/RSV Panel Kit (Anatolia geneworks) » à partir d'ARN purifié.
 - 42 prélèvements nasopharyngés préalablement testés positifs avec le « Novel Coronavirus (2019-nCoV) Nucleic Acid Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing) – Sansure Biotech.
-
- 32 prélèvements salivaires préalablement testés négatifs avec le « Bosphore SARS-CoV-2/Flu/RSV Panel Kit (Anatolia geneworks) » à partir d'ARN purifié.
 - 14 prélèvements salivaires préalablement testés négatifs en lyse directe avec le « Novel Coronavirus (2019-nCoV) Nucleic Acid Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing) – Sansure Biotech ».
 - 11 prélèvements nasopharyngés préalablement testés négatifs avec le Kit OSANTYS SARS-CoV-2 RT-qPCR.
 - 10 prélèvements nasopharyngés préalablement testés négatifs avec le « Bosphore SARS-CoV-2/Flu/RSV Panel Kit (Anatolia geneworks) » à partir d'ARN purifié.

Tableau 10a. Evaluation clinique des prélèvements salivaires

Résultats	
Positifs/Total	59*/60
Négatifs/Total	46/46
Inconcluants/Total	0/106
Invalides/Total	0/106

* Méthode de référence: N1 Ct =35.58, N2 Ct =34.26 pour l'échantillon non détecté

Tableau 10b. Evaluation clinique des prélèvements nasopharyngés

Résultats	
Positifs/Total	135**/151
Négatifs/Total	21/21
Inconcluants/Total	0/172
Invalides/Total	0/172

**Les échantillons testés négatifs avec le kit OSANTYS SARS-CoV-2 DUO montrent un Ct proche de la limite de détection

Conclusion :

La spécificité clinique du test OSANTYS SARS-CoV-2 DUO RT-qPCR KIT sur prélèvement NP et salivaires est de 100 %.

La sensibilité clinique du test OSANTYS SARS-CoV-2 DUO RT-qPCR KIT sur prélèvement salivaires est de 98,3 %.

La sensibilité clinique du test OSANTYS SARS-CoV-2 DUO RT-qPCR KIT sur prélèvement NP est de 89,4 %.

Références

1. Ballew, H. C., *et al.* "Basic Laboratory Methods in Virology," DHHS, Public Health Service 1975 (Revised 1981), Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia 30333.
2. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), "Collection, Transport, Preparation and Storage of Specimens for Molecular Methods: Proposed Guideline," MM13-A .
3. Lieber, M., *et al.* "A Continuous Tumor Cell Line from a Human Lung Carcinoma with Properties of Type II Alveolar Epithelial Cells." *International Journal of Cancer* 1976, 17(1), 62-70.
4. CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel. CDC-006-00019, Revision: 05.
5. Yanxia Bei, *et al.*, The Omicron variant mutation at position 28,311 in the SARS-CoV-2 N gene does not perturb CDC N1 target detection. medRxiv 2021.12.16.21267734.
6. Ibrahim N, *et al.* Screening for SARS-CoV-2 by RT-PCR: Saliva or nasopharyngeal swab? Rapid review and meta-analysis. PLoS One. 2021 Jun 10;16(6):e0253007. doi: 10.1371/journal.pone.0253007
7. Pijuan-Galito S., *et al.*, Saliva for COVID-19 Testing: Simple but Useless or an Undervalued Resource? *Front.Virol.*, 15 December 2021.

Contact, commandes, assistance client et support produit

Pour obtenir de la documentation et des informations supplémentaires sur ce kit, visitez : www.osantys.com

Pour le support technique et sur le produit, envoyez un e-mail à : contact@osantys.com

Pour les commandes, envoyez un e-mail à : orders@osantys.com

Protocole En Bref

1. Transférer 50 µL de chaque échantillon salivaire ou nasopharyngés dans des micro tubes de 1.5 mL
2. Placer les micro tubes dans un bain à sec à 99°C pendant 5 minutes
3. Centrifuger les micro tubes à 4000 rpm pendant 5 minutes
4. Décongeler les réactifs à température ambiante
5. Centrifuger brièvement les tubes des réactifs avant utilisation
6. Préparer les barrettes ou la plaque de la manière suivante :

Composant	Volume/Réaction
One-Step RT-qPCR Enzyme Master Mix 2X	N x 12.5 µL
SARS-CoV-2 Primer/Probe Mix	N x 7.5 µL
Volume Total	N x 20.0 µL

7. Ajouter 5 µL de chaque échantillon (lysats), 5 µL de contrôle négatif et 5 µL de contrôles positifs.
8. Centrifuger brièvement
9. Préparer le programme suivant :
 - Etape 1 : 95°C, 30 sec
 - Etape 2 : 60°C, 5 min
 - Etape 3 : 95°C, 5 sec
63.1°C, 30 sec (+ lecture fluorescence)

} 45 cycles

10. Sélectionner les fluorochromes :

Cible	Fluorochrome/Canal
N1	FAM / bleu
N2	VIC/ vert
RP	Cy5 / rouge

11. Indiquer 25 µl comme volume de réaction par puits
12. Placer les barrettes ou la plaque dans le thermocycleur et démarrer l'analyse.
13. Une fois l'analyse terminée, analyser les données en suivant le manuel d'utilisation de l'instrument de PCR en temps réel.