



# OSANTYS SARS-CoV-2 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 respiratoires non purifiés et purifiés

**REF** OS-COV2-100  100

**REF** OS-COV2-500  500



For *In Vitro* Diagnostic Use



2, Avenue de Rimiez  
06105 Nice - France



Laboratoire OBO

1680 Chemin de la Pierre de Feu  
13090 Aix-En-Provence



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 du Laboratoire OBO marque Osantys et de ses filiales, sauf indication contraire.

© 2022 Laboratoire OBO – marque Osantys. Tous les droits sont réservés.

### **Historique des versions**

<b># Version</b>	<b>Date</b>	<b>Résumé des révisions</b>
1.0	Mai 2021	Notice originale d'utilisation
2.0	Janvier 2022	Etude de l'impact du variant Omicron sur la détection
3.0	Mai 2022	Précisions sur les performances, impact des nouveaux variants Omicron sur la détection et mise à jour de la nomenclature des variants (30 mai 2022)
4.0	Septembre 2022	Précisions sur la conservation des échantillons biologiques et la méthode de validation Ajout de la spécificité clinique pour les prélèvements salivaires purifiés Modifications mineures

## Sommaire

<b>Usage prévu.....</b>	<b>4</b>
<b>Contexte.....</b>	<b>4</b>
<b>Principe du test .....</b>	<b>5</b>
<b>Description du Produit.....</b>	<b>6</b>
<b>Symboles .....</b>	<b>7</b>
<b>Matériel requis non fourni .....</b>	<b>8</b>
<b>Avertissements et précautions .....</b>	<b>9</b>
<b>Limitations du test.....</b>	<b>11</b>
<b>Préparation de l'équipement .....</b>	<b>12</b>
<b>Préparation des échantillons respiratoires non purifiés .....</b>	<b>12</b>
<b>Extraction d'acides nucléiques.....</b>	<b>12</b>
<b>Instructions pour la RT-qPCR .....</b>	<b>13</b>
<b>Préparation de la réaction .....</b>	<b>13</b>
<b>Programmer l'instrument de PCR en temps réel.....</b>	<b>15</b>
<b>Analyse des données.....</b>	<b>16</b>
<b>Interprétation des résultats .....</b>	<b>17</b>
<b>Contrôle de qualité .....</b>	<b>20</b>
<b>Analyse des Performances.....</b>	<b>20</b>
<b>Performance analytique.....</b>	<b>20</b>
<b>Performance clinique.....</b>	<b>34</b>
<b>Références .....</b>	<b>37</b>
<b>Contact, commandes, assistance client et support produit.....</b>	<b>37</b>
<b>Protocole En Bref .....</b>	<b>38</b>

## Usage prévu

Le kit OSANTYS SARS-CoV-2 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 des voies respiratoires supérieures tels que les écouvillons nasopharyngées (NP) et oropharyngées (OP), et la salive 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 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 respiratoires.

## 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 peut être à la fois des acides nucléiques purifiés provenant d'un échantillon des voies respiratoires supérieures, ou directement un échantillon respiratoire non purifié.

L'ARN 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 contient les composants suivants :

Nom du Réactif // Numéro du composant	Description	Quantité & Volume		Stockage	Durée de vie <sup>(1)</sup>
		100 réactions	500 réactions		
SARS-CoV-2 Primer/Probe Mix // <u>OS-COV2-100-1</u>	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 // <u>OS-COV2-100-2</u>	Réactifs pour la RT-qPCR dont la RT et la Taq Polymerase	1300 µL/tube x 1	1300 µL/tube x 5	entre -25°C et -15°C	12 mois
SARS-CoV-2 Positive Controls // <u>OS-COV2-100-3</u>	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 // <u>OS-COV2-100-4</u>	Eau sans RNase et DNase	100 µL/tube x 1	100 µL/tube x 5	entre -25°C et -15°C	12 mois

<sup>(1)</sup> 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 croisée pendant l'extraction de l'ARN et la préparation de la réaction.

## Symboles



Contient des réactifs suffisants pour <N> réactions



Utiliser par date



Dispositif médical de diagnostic *in vitro*



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

- Système d'extraction d'acides nucléiques (le cas échéant): les kits d'extraction d'ARN viral et les extracteurs automatisés disponibles dans le commerce qui ont été validés pour la récupération et la pureté de l'ARN viral dans des écouvillons NP et OP, et dans la salive peuvent être utilisés.

- Bloc chauffant pour inactiver le virus (le cas échéant).

- Solution saline ou PBS (pour diluer les échantillons salivaires)

- Milieu de transport : tous les milieux de transport validés pour la conservation du virus à partir d'un écouvillon NP ou la solution saline peuvent être utilisés pour la purification des acides nucléiques. Pour les échantillons non purifiés, n'utilisez pas de milieux inactivant le virus, ni de milieux contenant de la guanidine, ni du rouge phénol

- 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 à 56°C pendant 30 minutes est fortement recommandée si vous utilisez un échantillon non purifié comme matériel de départ. L'inactivation thermique n'affecte pas les performances de détection du kit.
- 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 des voies respiratoires supérieures 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 (ARN purifié) 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 (1 semaine maximum) avant le traitement. La congélation à -20°C peut entraîner une dégradation significative de l'ARN viral.

- 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 la manipulation des acides nucléiques extraits et des échantillons non purifiés.
  - 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.
- Les échantillons (ARN extrait ou échantillons non purifiés) peuvent être gardés à température ambiante pendant la préparation de la réaction. Il est recommandé de le garder réfrigérés (+2°C - +8°C) avant la préparation pour assurer la stabilité.
- 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 n'ont été établies que sur les échantillons des voies respiratoires supérieures tels que les prélèvements NP ou OP et la salive. Les autres types d'échantillons n'ont pas été évalués et ne doivent pas être utilisés avec ce test.
- 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 de l'ARN purifié et directement l'échantillon non purifié comme matériel de départ pour l'analyse. La qualité des échantillons et/ou de l'ARN extrait à partir d'échantillons biologiques 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. Suivre les dispositions en vigueur pour les temps de prélèvement en présence ou absences de symptômes.
- **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 pas adaptées ou non autorisées.
  - 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 chimiothérapeutiques 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 respiratoires non purifiés

Ce kit peut être utilisé directement avec des écouvillons NP et OP non purifiés collectés dans les milieux de transport suivants :

- Solution saline
  - $\Sigma$ -Virocult (MWE)
  - $\Sigma$ -VCM (MWE)
  - $\Sigma$ -Transwab (MWE)
  - DeltaSwab liquid amies (Deltalab)
  - Fecal Transwab – liquid Cary Blair (MWE)
- Ne pas utiliser de milieux inactivant, des méthodes d'inactivation chimiques ou des milieux contenant de la guanidine, ou du rouge phénol car ils inhiberaient la réaction de RT-qPCR.
  - L'inactivation du virus à la chaleur à 56 ° C pendant 30 minutes est recommandée pour des raisons de sécurité et n'affecte pas les performances de détection du kit.

### Extraction d'acides nucléiques

La performance du test dépend de la quantité et de la qualité de l'ARN purifié à partir d'échantillons humains. Le kit d'extraction d'ARN, l'extracteur et les procédures automatisés suivants ont été validés pour la récupération et la pureté de l'ARN à être utilisé avec le kit :

- **Extracteur automatisé d'acides nucléiques MGISP-NE32 et Kit d'extraction d'acides nucléiques – 32 préparations (MGI) N.** Catalogue : 100022606.
  - Suivez les instructions recommandées par le fabricant pour les écouvillons NP et OP.
  - Pour l'échantillon de salive, ajoutez 50  $\mu$ L de salive à 250  $\mu$ l de solution saline ou PBS et procédez à l'extraction de l'ARN selon les instructions du fabricant. En cas d'échantillon très visqueux, un ratio échantillon : solution saline/PBS jusqu'à 1 :10 peut être utilisé sans perte significative de performance du kit.

D'autres kits d'extraction d'ARN et extracteurs automatisés disponibles dans le commerce qui ont été validés pour la qualité et la pureté de l'ARN viral extrait à partir d'écouvillons NP et OP et dans la salive peuvent théoriquement être utilisés. Le laboratoire doit préalablement valider les étapes pré-analytiques (volume du matériel de départ et volume d'éluion des acides nucléiques).

## **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, préparer 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. Maintenir 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. Utiliser 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 x 12.5 µL
SARS-CoV-2 Primer/Probe Mix	N x 7.5 µL
<b>Volume Total</b>	<b>N x 20.0 µL</b>

7) Mélanger le mix réactionnel à l'aide de la pipette par des mouvements de flux/reflux. Ne pas vortexer.

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 puit 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) Vortexer les tubes *d'échantillons purifiés (ARN)* pendant environ 5 secondes à 2.000 rpm.

2) Centrifuger brièvement pour collecter le contenu au fond du tube.

*ou*

Acclimater les tubes *d'échantillons non purifiés* a température ambiante et vortexer les pendant environ 15 secondes à 2 000 rpm sans centrifuger après.

3) Pipeter soigneusement 5 µL de chaque échantillon dans chaque puits. Changer les pointes à filtre après chaque ajout.

- 4) Pipeter 5 µL de contrôles positifs dans le puits du contrôle positif en position H12 ou après le dernier échantillon.
- 5) Sceller les barrettes avec des barrettes des capuchons ou la plaque avec un film adhésif.
- 6) 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 / Transcription inverse :  
52°C, 5 min
- Étape 2 / Inactivation de la RT et activation de la Taq polymérase :  
95°C, 10 sec
- 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 puits.
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)

- QuantStudio 5 Dx et logiciel QuantStudio Design and Analysis Desktop Software v1.5.1 (Thermo Fisher Scientific) – validation par CNR Lyon.

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

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	+	+	+	< 40
Négatif	Contamination des réactifs et / ou de l'environnement	-	-	-	Aucun
Endogène	Échec de la procédure de lyse et d'extraction, contamination potentielle lors de l'extraction	-	-	+	< 40

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. Recommencer le test.

## Interprétation des résultats des échantillons des patients

N1	N2	RP	Interprétation des résultats <sup>a</sup>	Rapport	Actions
Ct < 40	Ct < 40	±	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 < 37	Positif pour SARS-CoV-2	Transmettre aux autorités de santé locales et au patient
			Douteux si Ct > 37	Douteux	
Ct > 40 or ND	Ct > 40 or ND	Ct < 40	SARS-CoV-2 non détecté	Non détecté	Transmettre au patient. Tester le patient pour un autre pathogène respiratoire <sup>b</sup>
-	-	-	Résultat invalide	Invalide	Répéter l'extraction et la RT-qPCR. Si le résultat est à nouveau invalide, procéder à un nouveau prélèvement sur le patient

ND = non détecté

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

<sup>b</sup> 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 < 40 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 d'extraction 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 > 40 ET le signal RP est < 40 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 < 40 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 < 40 Ct, interpréter comme suit :

▪ - Si N1 ou N2 Ct est < 37, 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 > 37, le résultat n'est pas concluant. L'échantillon doit être retesté. Si le même résultat est obtenu, rapporter le résultat non concluant et procéder à 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 ont été évaluées en comparant les performances en fonction du type d'échantillon (purifié vs. non purifié), 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 pour les échantillons purifiés et non purifiés**

Pour comparer les performances du kit en fonction du type d'échantillon (ARN purifié ou échantillon respiratoire non purifié – RT-qPCR directe), des écouvillons NP précédemment testés positifs ou négatifs avec le kit « Novel Coronavirus (2019-nCoV) Nucleic Acid Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing) - Sansure Biotech », ont été testés avec ou sans extraction d'ARN préalable.

- 84 échantillons NP positifs
- 118 échantillons NP négatifs

**Tableau 1a. Évaluation des performances du kit pour les échantillons positifs purifiés et non purifiés**

Echantillon	N1			N2			RP		
	ARN purifié	RT-qPCR directe	ΔCt	ARN purifié	RT-qPCR directe	ΔCt	ARN purifié	RT-qPCR directe	ΔCt
157*	15,04	16,70	-1,66	14,03	17,17	-3,14	25,80	26,87	-1,07
60*	15,45	17,84	-2,39	14,53	18,06	-3,53	28,21	32,25	-4,04
137*	16,17	24,88	-8,71	15,32	24,03	-8,71	26,93	30,19	-3,26
123*	16,32	19,69	-3,37	15,61	19,94	-4,33	23,75	25,31	-1,56
61*	17,31	20,76	0,78	16,53	21,10	-0,34	27,19	29,04	-1,85
80*	17,53	21,84	-4,31	16,65	21,40	-4,75	28,93	32,73	-3,80
132*	17,74	22,02	-4,28	16,74	21,94	-5,20	27,55	30,22	-2,67
134*	17,89	25,46	-7,57	17,11	25,04	-7,93	29,58	33,13	-3,55
20*	17,93	20,19	-2,26	17,18	20,57	-3,39	26,77	28,35	-1,58
22*	18,11	20,87	-2,76	17,4	21,61	-4,21	27,83	29,91	-2,08
70*	18,19	23,26	-5,07	17,08	23,95	-6,87	27,53	32,29	-4,76
133*	18,77	22,12	-3,35	17,98	22,30	-4,32	25,80	24,76	1,04
76*	19,01	23,21	-4,20	17,96	23,82	-5,86	29,73	31,64	-1,91
19*	19,09	21,16	-2,07	18,11	21,28	-3,17	27,3	29,86	-2,56
69*	19,61	22,67	-3,06	18,47	22,79	-4,32	27,86	31,90	-4,04
130*	19,81	23,31	-3,50	19,11	23,82	-4,71	26,06	27,14	-1,08
144*	19,84	23,64	-3,80	19,25	23,72	-4,47	27,67	31,37	-3,70
56*	20,06	22,76	-2,70	19,47	23,30	-3,83	27,03	30,10	-3,07
26*	20,19	21,99	-1,80	19,51	22,52	-3,01	29,83	32,17	-2,34
128*	20,78	25,37	-4,59	20,24	25,11	-4,87	28,08	32,10	-4,02
94*	21,56	26,81	-5,25	20,61	26,23	-5,62	28,70	32,19	-3,49
4*	21,65	25,75	-4,10	21,29	26,1	-4,81	29,28	31,86	-2,58
63*	21,65	22,36	-0,71	20,84	23,62	-2,78	27,59	30,32	-2,73
16*	21,89	25,74	-3,85	21,3	25,63	-4,33	28,61	30,78	-2,17
142*	21,95	26,00	-4,05	21,03	25,88	-4,85	26,23	28,56	-2,33
140*	22,09	24,01	-1,92	21,40	24,16	-2,76	26,68	28,85	-2,17
122*	22,22	24,88	-2,66	21,89	25,14	-3,25	27,76	30,15	-2,39
152*	22,48	24,24	-1,76	22,30	24,88	-2,58	30,01	32,45	-2,44
149*	22,60	26,78	-4,18	21,76	26,43	-4,67	29,66	33,33	-3,67
155*	23,08	24,78	-1,70	22,65	25,51	-2,86	28,03	30,58	-2,55
150*	23,14	27,00	-3,86	22,28	26,88	-4,60	23,57	24,86	-1,29
85*	23,20	27,71	-4,51	22,67	27,98	-5,31	29,03	31,81	-2,78
12*	23,55	26,54	-2,99	23,83	27,11	-3,28	26,18	26,85	-0,67
112*	23,74	26,44	-2,70	22,92	26,21	-3,29	28,06	30,96	-2,90
131*	23,83	31,80	-7,97	23,09	31,51	-8,42	25,03	28,31	-3,28
88*	23,86	27,75	-3,89	22,88	28,31	-5,43	26,99	32,30	-5,31
120*	23,91	28,70	-4,79	23,25	27,53	-4,28	27,64	30,79	-3,15
23*	23,94	25,32	-1,38	23,24	25,66	-2,42	29	31,41	-2,41
127*	24,87	29,33	-4,46	24,60	29,13	-4,53	26,56	28,53	-1,97

Echantillon	N1			N2			RP		
	ARN purifié	RT-qPCR directe	ΔCt	ARN purifié	RT-qPCR directe	ΔCt	ARN purifié	RT-qPCR directe	ΔCt
64*	24,93	26,07	-1,14	24,81	30,75	-5,94	30,3	30,97	-0,67
110*	25,12	30,17	-5,05	24,19	30,02	-5,83	26,67	28,53	-1,86
147*	25,77	33,37	-7,60	24,98	33,08	-8,10	27,72	30,57	-2,85
108*	26,16	27,81	-1,65	24,69	26,86	-2,17	28,68	30,83	-2,15
10033*	26,20	27,95	-1,75	25,57	28,01	-2,44	27,12	30,84	-3,72
111*	26,46	32,00	-5,54	35,72	31,86	3,86	26,41	30,43	-4,02
62*	26,58	27,6	-1,02	25,97	27,59	-1,62	25,49	31,75	-6,26
139*	26,62	29,69	-3,07	25,87	28,51	-2,64	28,58	31,73	-3,15
121*	26,77	29,64	-2,87	25,66	28,88	-3,22	27,13	30,44	-3,31
117*	27,16	29,13	-1,97	26,47	28,81	-2,34	25,41	29,20	-3,79
2*	27,31	30,77	-3,46	26,78	30,96	-4,18	28,63	32,56	-3,93
138*	27,38	31,11	-3,73	26,82	29,96	-3,14	30,07	33,39	-3,32
146*	28,33	30,11	-1,78	27,66	29,85	-2,19	27,09	29,15	-2,06
151*	28,76	33,41	-4,65	27,80	33,08	-5,28	29,01	31,76	-2,75
125*	28,81	32,79	-3,98	28,03	32,15	-4,12	27,83	30,40	-2,57
136*	28,86	31,44	-2,58	28,19	31,08	-2,89	29,61	31,73	-2,12
154*	29,23	32,78	-3,55	28,14	31,91	-3,77	24,3	26,32	-2,02
153*	29,38	35,78	-6,40	28,42	35,12	-6,70	26,99	30,74	-3,75
74*	29,75	32,89	-3,14	29,01	34,19	-5,18	25,73	25,77	-0,04
96*	30,06	36,60	-6,54	29,16	35,93	-6,77	27,68	30,48	-2,80
148*	30,75	ND	-	29,95	37,87	-7,92	29,89	35,58	-5,69
25*	31,04	33,18	-2,14	29,99	31,75	-1,76	29,34	31,36	-2,02
1*	31,13	34,23	-3,10	30,55	34,33	-3,78	28,7	30,89	-2,19
48*	31,20	34,04	-2,84	30,70	33,86	-3,16	29,65	31,31	-1,66
8*	31,2	33,74	-2,54	30,02	33,53	-3,51	30,22	33,06	-2,84
10*	31,41	35,39	-3,98	30,98	34,8	-3,82	27,72	29,46	-1,74
156*	31,73	34,08	-2,35	30,9	34,71	-3,81	28,53	32,35	-3,82
89*	31,89	ND	-	31,30	ND	-	26,00	31,23	-5,23
105*	31,91	34,48	-2,57	31,55	36,32	-4,77	23,65	24,54	-0,89
145*	31,93	35,49	-3,56	31,01	33,18	-2,17	28,52	32,43	-3,91
124*	32,03	34,13	-2,10	31,5	34,07	-2,57	25,57	29,79	-4,22
143*	32,17	35,76	-3,59	31,76	36,83	-5,07	25,26	27,70	-2,44
103*	32,86	33,49	-0,63	32,21	32,93	-0,72	26,42	27,76	-1,34
55*	32,99	34,21	-1,22	32,08	34,02	-1,94	25,57	27,85	-2,28
54*	33,01	36,71	-3,70	31,94	35,91	-3,97	28,71	31,74	-3,03
129*	33,29	ND	-	32,32	ND	-	27,06	30,25	-3,19
67*	33,47	34,58	-1,11	32,74	34,53	-1,79	26,81	26,76	0,05
104*	33,85	32,75	1,10	28,91	32,45	-3,54	27,70	29,89	-2,19
126*	35,79	ND	-	35,32	ND	-	28,85	31,26	-2,41
97*	36,40	36,70	-0,30	35,68	36,73	-1,05	27,62	30,93	-3,31
107*	38,11	38,12	-0,01	35,69	41,09	-5,40	32,90	35,75	-2,85
92*	38,16	ND	-	36,62	ND	-	25,89	27,79	-1,90

Echantillon	N1			N2			RP		
	ARN purifié	RT-qPCR directe	$\Delta$ Ct	ARN purifié	RT-qPCR directe	$\Delta$ Ct	ARN purifié	RT-qPCR directe	$\Delta$ Ct
51*	ND	ND	-	38,20	ND	-	28,76	30,48	-1,72
141*	ND	ND	-	ND	37,80	-	31,53	33,42	-1,89
135*	ND	ND	-	37,38	ND	-	27,85	32,46	-4,61
<b><math>\Delta</math>Ct moyen</b>			<b>-3,20</b>				<b>-3,98</b>		

\*Echantillons conservés congelés à -20°C pendant plus de 10 jours. Une dégradation peut s'être produite.

ND = non détecté

Un  $\Delta$ Ct variable est observé entre les échantillons purifiés et non purifiés, indépendamment de la charge virale. Pour Ct > 35, l'extraction d'ARN a augmenté la possibilité de détection du SARS-CoV-2.

**Table 1b. Évaluation des performances du kit pour les échantillons négatifs purifiés et non purifiés**

Résultats	ARN purifié	RT-qPCR directe
Négatifs/ Négatifs attendus	115/118	116/118
Positifs*/ Négatifs attendus	3/118	2/118

*Echantillon	N1		N2		RP	
	ARN purifié	RT-qPCR directe	ARN purifié	RT-qPCR directe	ARN purifié	RT-qPCR directe
20023	35,77	ND	35,77	ND	30,52	33,60
20024	33,92	37,93	34,09	36,30	26,67	31,67
10162	37,21	ND	35,64	ND	29,65	32,50
10030	ND	ND	ND	37,94	26,48	29,73

### **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 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. L'ARN purifié à partir d'un écouvillon NP positif validé a été dilué en série au 1/10 dans un milieu de transport validé, puis traité utilisant la procédure du kit pour les échantillons non purifiés. 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 2. Détermination de la LoD des écouvillons NP non purifiés collectés dans la solution saline**

Cibles	N1				N2			
Concentration ARN <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0.0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0.0</sup>	10 <sup>-1</sup>
Positifs/Total	8/8	8/8	8/8	7/8	8/8	8/8	8/8	7/8
Ct moyen <sup>2</sup>	34,95	37,4	37,03	37,05	34,75	37,74	36,14	37,23
Déviations standard (Ct)	0,329	0,732	0,881	0,680	0,694	1,832	0,676	1,217

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

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

**Tableau 3. Détermination de la LoD des écouvillons NP non purifiés collectés dans le milieu *Fecal Transwab – liquide Cary Blair (MWE)***

Cibles	N1				N2			
Concentration ARN <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0.0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0.0</sup>	10 <sup>-1</sup>
Positifs/Total	8/8	8/8	6/8	3/8	8/8	8/8	2/8	1/8
Ct moyen <sup>2</sup>	33,91	36,44	38,15	38,99	34,23	38,65	45,29	49
Déviations standard (Ct)	0,491	0,825	0,972	0,199	0,535	2,197	7,41	-

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

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

**Tableau 4. Détermination de la LoD des écouvillons NP non purifiés collectés dans le milieu  $\Sigma$ -Virocult (MWE)**

Cibles	N1				N2			
Concentration ARN <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0.0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0.0</sup>	10 <sup>-1</sup>
Positifs/Total	8/8	8/8	3/8	0/8	8/8	8/8	8/8	2/8
Ct moyen <sup>2</sup>	33,83	36,35	38,01	ND	33,58	36,06	37,61	37,09
Déviations standard (Ct)	0,394	0,769	0,241	0	0,423	0,554	0,299	0,539

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

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



**Tableau 5. Détermination de la LoD des écouvillons NP non purifiés collectés dans le milieu DeltaSwab liquid amies (Deltalab)**

Cibles	N1				N2			
Concentration ARN <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0.0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0.0</sup>	10 <sup>-1</sup>
Positifs/Total	8/8	8/8	6/8	4/8	8/8	8/8	8/8	5/8
Ct moyen <sup>2</sup>	35,22	37,63	37,22	37,65	34,42	35,62	37,34	37,84
Déviati on standard (Ct)	0,612	0,972	0,455	0,693	0,591	1,959	0,698	0,576

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

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

**Tableau 6. Détermination de la LoD des écouvillons NP non purifiés collectés dans le milieu Σ-VCM (MWE)**

Cibles	N1				N2			
Concentration ARN <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0.0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0.0</sup>	10 <sup>-1</sup>
Positifs/Total	8/8	5/8	1/8	0/8	8/8	6/8	2/8	0/8
Ct moyen <sup>2</sup>	35,17	37,22	38,41	ND	34,56	37,29	37,99	ND
Déviati on standard (Ct)	0,462	0,816	-	-	0,308	0,763	0,096	-

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

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

**Tableau 7. Détermination de la LoD des écouvillons NP non purifiés collectés dans le milieu in Σ-Transwab (MWE)**

Cibles	N1				N2			
Concentration ARN <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0.0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0.0</sup>	10 <sup>-1</sup>
Positifs/Total	8/8	5/8	6/8	0/8	8/8	6/8	6/8	1/8
Ct moyen <sup>2</sup>	35,07	37,79	40,18	ND	34,74	38,97	41,53	ND
Déviati on standard (Ct)	0,345	1,419	2,715	-	0,563	3,379	3,874	-

La concentration est exprimée en copies d'ARN / réaction

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

2. L'ARN purifié à partir d'écouvillons NP positifs validés a été dilué en série au 1/10 dans de l'eau exempte de DNase / RNase, puis traité utilisant la procédure du kit pour les échantillons purifiés. 2 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 8. Détermination de la LoD des écouvillons NP purifiés**

Echantillon	Concentration ARN <sup>1</sup>	N1		N2		RP	
		Ct moyen <sup>2</sup>	Ct Dev. Std.	Ct moyen <sup>2</sup>	Ct Dev. Std.	Ct moyen <sup>2</sup>	Ct Dev. Std.
9B	10 <sup>6</sup>	20,84	0,019	20,65	0,167	33,02	0,215
	10 <sup>5</sup>	24,43	0,102	24,42	0,076	36,84	0,011
	10 <sup>4</sup>	27,94	0,000	28,00	0,011	38,93	0,000
	10 <sup>3</sup>	31,66	0,255	31,62	0,034	ND	-
	10 <sup>2</sup>	34,67	0,035	34,28	0,263	ND	-
	10 <sup>1</sup>	38,13	0,000	37,75	0,000	ND	-
	10 <sup>0</sup>	ND	-	ND	-	ND	-
	10 <sup>-1</sup>	ND	-	ND	-	ND	-
9WT	10 <sup>3</sup>	31,62	0,316	30,81	0,056	32,86	0,136
	10 <sup>2</sup>	34,85	0,352	34,52	0,227	36,57	0,729
	10 <sup>1</sup>	36,77	0,098	37,11	0,500	36,88	0,000
	10 <sup>0</sup>	ND	-	ND	-	ND	-
2A	10 <sup>3</sup>	30,85	0,146	31,01	0,118	35,42	0,418
	10 <sup>2</sup>	35,20	0,395	35,00	0,220	39,06	0,459
	10 <sup>1</sup>	38,04	0,149	37,19	0,112	38,12	-
	10 <sup>0</sup>	ND	-	ND	-	ND	-
12A	10 <sup>4</sup>	29,10	0,166	29,02	0,138	34,64	0,031
	10 <sup>3</sup>	32,82	0,093	32,83	0,021	37,09	-
	10 <sup>2</sup>	36,01	0,343	35,94	0,396	ND	-
	10 <sup>1</sup>	ND	-	ND	-	ND	-
18A	10 <sup>3</sup>	31,89	0,050	31,77	0,015	33,96	0,091
	10 <sup>2</sup>	35,50	0,209	35,14	0,479	37,97	1,637
	10 <sup>1</sup>	ND	-	38,01	-	ND	-
	10 <sup>0</sup>	ND	-	ND	-	ND	-
1B	10 <sup>1</sup>	37,40	-	36,47	-	30,97	1,816
	10 <sup>0</sup>	ND	-	38,05	-	33,24	0,105
	10 <sup>-1</sup>	ND	-	ND	-	36,28	0,276
	10 <sup>-2</sup>	ND	-	ND	-	ND	-

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

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

3. Les écouvillons NP et les prélèvements salivaires positifs validés et ont été dilués en série au 1/10 dans une solution saline, purifiés avec l'automate d'extraction MGISP-NE32, puis traités utilisant la procédure du kit pour les échantillons purifiés. 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 9. Détermination de la LoD des écouvillons NP dilués dans la solution saline et purifiés avec l'extracteur automatisé MGISP-NE32**

Cibles	N1				N2				20A
Concentration ARN <sup>1</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0</sup>	
Positifs/Total	8/8	8/8	8/8	2/8	8/8	8/8	8/8	5/8	
Ct moyen <sup>2</sup>	29,25	32,26	36,50	37,50	28,75	31,72	35,21	37,42	
Déviations standard (Ct)	0,160	0,214	1,005	0,640	0,209	0,143	0,538	0,472	
Cibles	N1				N2				7B
Concentration ARN <sup>1</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0</sup>	
Positifs/Total	8/8	8/8	7/8	1/8	8/8	8/8	8/8	3/8	
Ct moyen <sup>2</sup>	29,74	32,90	35,90	37,13	28,73	31,89	34,95	37,17	
Déviations standard (Ct)	0,097	0,318	0,322	-	0,078	0,279	0,635	0,412	

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

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

**Tableau 10. Détermination de la LoD des prélèvements salivaires dilués dans la solution saline et purifiés avec l'extracteur automatisé MGISP-NE32**

Cibles	N1					N2					131/20
Concentration ARN <sup>1</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0</sup>	
Positifs/Total	8/8	8/8	8/8	8/8	3/8	8/8	8/8	8/8	8/8	4/8	
Ct moyen <sup>2</sup>	26,76	28,25	32,95	37,05	37,35	25,84	27,58	32,09	35,76	36,70	
Déviations standard (Ct)	0,055	0,045	0,196	0,829	0,616	0,054	0,067	0,152	0,854	0,493	

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

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

Cibles	N1					N2					1
Concentration ARN <sup>1</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0</sup>	
Positifs/Total	8/8	8/8	8/8	4/8	0/8	8/8	8/8	8/8	7/8	0/8	
Ct moyen <sup>2</sup>	29,92	33,87	36,70	41,04	ND	26,04	29,92	32,85	35,93	ND	
Déviati on standard (Ct)	0,113	0,223	0,792	1,982	-	0,047	0,057	0,287	0,732	-	

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

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

Cibles	N1					N2					3
Concentration ARN <sup>1</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0</sup>	
Positifs/Total	8/8	8/8	8/8	1/8	0/8	8/8	8/8	8/8	3/8	0/8	
Ct moyen <sup>2</sup>	28,98	32,48	35,71	36,47	ND	28,28	31,64	34,78	36,71	ND	
Déviati on standard (Ct)	0,051	0,0224	0,768	-	-	0,065	0,138	0,480	0,083	-	

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

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

4. Le contrôle positif SARS-CoV-2 a été dilué en série au 1/10 dans un pool de matrices négatives, purifié avec l'extracteur automatisé MGISP-NE32, puis traité utilisant la procédure du kit pour les échantillons purifiés. 8 réplicats ont été réalisés pour chaque dilution. 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 11. Détermination de la LoD du contrôle positif SARS-CoV-2 dans une matrice NP purifié avec l'extracteur automatisé MGISP-NE32**

Cibles	N1				N2				Contrôle positif SARS-CoV-2
Concentration ARN <sup>1</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0</sup>	
Positifs/Total	8/8	8/8	8/8	0/8	8/8	8/8	8/8	0/8	
Ct moyen <sup>2</sup>	30,82	33,85	36,89	0,00	29,97	33,21	36,49	0,00	
Déviati on standard (Ct)	0,226	0,281	0,795	0,000	0,174	0,325	0,888	0,000	

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

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

5. Le virus SARS-CoV-2 purifié et quantifié a été dilué en série au 1/10 dans un pool de matrices salivaires ou NP négatives, purifié avec l'extracteur automatisé MGISP-NE32, puis traité utilisant la procédure du kit pour les échantillons purifiés. 8 réplicats 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 12a. Détermination de la LoD du virus SARS-CoV-2 dans la salive purifiée avec l'extracteur automatisé MGISP-NE32**

Cibles	N1				N2				SARS-CoV-2 virus purifié
Copies virus/ml salive (copies/réaction)	200.000 (10 <sup>3</sup> )	20.000 (10 <sup>2</sup> )	2.000 (10 <sup>1</sup> )	200 (10 <sup>0</sup> )	200.000 (10 <sup>3</sup> )	20.000 (10 <sup>2</sup> )	2.000 (10 <sup>1</sup> )	200 (10 <sup>0</sup> )	
Positifs/Total	8/8	8/8	7/8	3/8	8/8	8/8	8/8	3/8	
Ct moyen <sup>1</sup>	30.48	33.88	36.65	38.56	29.55	33.10	36.09	36.56	
Déviations standard (Ct)	0.148	0.313	0.802	4.711	0.148	0.401	0.691	1.005	

<sup>1</sup> Ct moyen calculés pour les résultats positifs de chaque dilution

**Tableau 12b. Détermination de la LoD du virus SARS-CoV-2 dans une matrice NP purifié avec l'extracteur automatisé MGISP-NE32**

Cibles	N1				N2				SARS-CoV-2 virus purifié
Copies virus/ml saline-NP (copies/réaction)	200.000 (10 <sup>3</sup> )	20.000 (10 <sup>2</sup> )	2.000 (10 <sup>1</sup> )	200 (10 <sup>0</sup> )	200.000 (10 <sup>3</sup> )	20.000 (10 <sup>2</sup> )	2.000 (10 <sup>1</sup> )	200 (10 <sup>0</sup> )	
Positifs/Total	8/8	8/8	8/8	3/8	8/8	8/8	8/8	6/8	
Ct moyen <sup>1</sup>	28.57	31.81	35.73	37.57	27.66	30.90	35.19	38.16	
Déviations standard (Ct)	0.090	0.161	0.350	0.398	0.102	0.125	0.819	1.175	

<sup>1</sup> Ct moyen calculés pour les résultats positifs de chaque dilution

En conclusion:

La sensibilité analytique est de 2 copies/μL pour les prélèvements NP.

La sensibilité analytique est de 2 copies/μL 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 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. 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 13. 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 Alpha, V1/S.501Y.V1 ; Beta, V2/S.501Y.V2 ; Gamma, V3/S.501Y.V3 ; Delta, 21A, 21I, 21J ; Epsilon, 21C ; Kappa, 21B 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 des variants Omicron (BA.1, BA.2, BA.4, BA.5, BA.2.12.1) 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<sup>ème</sup> base en 5' de la sonde N1 n'impacte pas la détection de la cible N1, comme montré par Yanxia Bei *et al.* (5). Les variant Omicron peuvent être détectés par ce test, excluant tout résultat faux négatif.

En plus de l'analyse *in silico*, les échantillons positifs pour les variants validés Alpha, Beta, Gamma, Delta et Omicron ont été testés avec ce test avec la souche sauvage (WT). Les données démontrent que les résultats attendus ont été obtenus.

**Tableau 14. Détection des variantes du SARS CoV-2**

Cible	N1					N2				
	WT	Alpha	Beta & Gamma	Delta	Omicron	WT	Alpha	Beta & Gamma	Delta	Omicron
Positifs/Totale	10/10	20/20	10/10	19/19	16/16	10/10	20/20	10/10	19/19	16/16

### **Test de spécificité / exclusivité : analyse in silico**

Les analyses BLASTn des amorces et sondes du kit OSANTYS SARS-CoV-2 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 pour démontrer la spécificité et l'exclusivité analytiques.

Des études ont été réalisées avec des acides nucléiques extraits à l'aide de l'automate d'extraction MGISP-NE32. Les données démontrent que les résultats attendus sont obtenus.

**Tableau 15. Spécificité/Exclusivité du kit OSANTYS SARS-CoV-2**

Pathogène respiratoire	Origine	N1	N2	RP
Human coronavirus 229E	Culture virale	ND	ND	25.31
Human coronavirus OC43	Culture virale	ND	ND	24.90
Human coronavirus NL63	Culture virale	ND	ND	33.96
MERS-coronavirus	Virus purifié*	ND	ND	31.59
SARS-coronavirus	Virus purifié*	ND	ND	29.82
Influenza A (H1N1)	Virus purifié*	ND	ND	31.58

\*mêlé avec une matrice génomique pour mimer l'échantillon biologique ND = non détecté

### Études sur les substances endogènes interférentes

Pour évaluer les substances interférentes dans les échantillons non purifiés et purifiés, des écouvillons NP négatifs pour le SARS-CoV-2 ont été ajoutés avec le contrôle positif SARS-CoV-2 à la concentration de 2.000 copies/ $\mu$ l, un pool de prélèvements salivaires 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 16 (a/b), et testés en triplicat (à l'exception du sang testé en duplicat pour les écouvillons NP), avec ou sans extraction préalable des acides nucléiques. Aucun résultat faussement négatif a été observé pour l'une quelconque des substances aux concentrations testées.

Des écouvillons NP et des prélèvements salivaires négatifs pour le SARS-CoV-2 ont été ajoutés de substances potentiellement interférentes à la concentration indiquée dans le tableau 16 (a/b). Chaque substance a été testée en triplicat, (à l'exception du sang testé en duplicat pour les écouvillons NP) avec ou sans extraction préalable des acides nucléiques. Aucun résultat faussement positif a été observé pour l'une quelconque des substances aux concentrations testées.

**Tableau 16a. Analyse des substances endogènes interférentes dans des écouvillons NP**

Substance Interférente	Concentration Finale dans l'échantillon	Accord avec les résultats attendus			
		Écouvillon NP positif non purifié	Écouvillon NP positif purifié	Écouvillon NP négatif non purifié	Écouvillon NP négatif purifié
Aucune	N/A	3/3	3/3	3/3	3/3
Sang (humain)	1% v/v	2/2	2/2	2/2	2/2
Corticostéroïde Nasal — Dymista™	5 $\mu$ g/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

**Tableau 16b. Analyse des substances endogènes interférentes dans des prélèvements salivaires**

Substance Interférente	Concentration Finale dans l'échantillon	Accord avec les résultats attendus	
		Prélèvement salivaire positif purifié	Prélèvement salivaire négatif purifié
Aucune	N/A	3/3	3/3
Sang (humain)	1% v/v	3/3	3/3

Corticostéroïde Nasal — Dymista™	5 µg/mL	3/3	3/3
Anesthésique et analgésique oral pour les maux de gorge — Xylocaïne 5%	1% w/v	3/3	3/3
Oseltamivir phosphate - Tamiflu	33 µg/mL	3/3	3/3
Antibiotique, nasal pommade — Mupirocine 2%	5 µg/mL	3/3	3/3
Antibactérien, systémique— Tobramycine - Nebcine	0.6 mg/mL	3/3	3/3
Sérum physiologique (0.9%)	10% v/v	3/3	3/3

### **Performance clinique**

Une étude d'évaluation clinique a été réalisée pour évaluer les performances du kit OSANTYS SARS-CoV-2 utilisant des écouvillons NP et prélèvements salivaires préalablement testés positifs ou négatifs, avec ou sans extraction préalable des acides nucléiques.

Au total, *169 prélèvements positifs* ont été testés :

- 32 écouvillons NP préalablement testés positifs avec le « Bosphore SARS-CoV-2/Flu/RSV Panel Kit (Anatolia geneworks) » à partir d'ARN purifié
- 97 écouvillons NP préalablement testés positifs en RT-qPCR directe avec le « Novel Coronavirus (2019-nCoV) Nucleic Acid Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing) – Sansure Biotech » et le kit « Detection Expert SARS-CoV-2 – Genestore »
- 40 prélèvements salivaires préalablement testés positifs avec le « Bosphore SARS-CoV-2/Flu/RSV Panel Kit (Anatolia geneworks) » à partir d'ARN purifié

En plus des prélèvements positifs, *168 prélèvements négatifs* ont été testés :

- 10 écouvillons NP préalablement testés négatifs avec le « Bosphore SARS-CoV-2/Flu/RSV Panel Kit (Anatolia geneworks) » à partir d'ARN purifié

- 134 écouvillons NP préalablement testés négatifs en RT-qPCR directe avec le « Novel Coronavirus (2019-nCoV) Nucleic Acid Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing) – Sansure Biotech » et le kit « Detection Expert SARS-CoV-2 – Genestore »
- 24 prélèvements salivaires préalablement testés négatifs avec le « Bosphore SARS-CoV-2/Flu/RSV Panel Kit (Anatolia geneworks) » à partir d'ARN purifié ou en RT-qPCR directe avec le « Novel Coronavirus (2019-nCoV) Nucleic Acid Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing) – Sansure Biotech »

**Tableau 17. Evaluation clinique des prélèvements NP testés à partir d'ARN purifié (RT-qPCR)**

Résultats	RT-qPCR
Positifs/Totale	32/32
Négatifs/Totale	10/10
Inconcluants/Totale	0/42
Invalides/Totale	0/42

La sensibilité clinique du test OSANTYS SARS-CoV-2 RT-qPCR KIT sur prélèvement NP purifié est de 100 %.

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

**Tableau 18. Evaluation clinique des prélèvements NP testés à partir d'échantillons non purifiés (RT-qPCR DIRECTE)**

Résultats	RT-qPCR DIRECTE
Positifs/Totale	94*/97
Négatifs/Totale	133**/134
Inconcluants/Totale	0/231
Invalides/Totale	0/231

\* Méthode de référence: Ct N2 > 34 pour 3 échantillons. 6 ou plus jours de conservation à -20°C pour les échantillons non détectés.

\*\* Ct N1 = 37,93 and Ct N2 = 36,3 à pour l'échantillon détecté positif (résultat confirmé par RT-qPCR sur ARN purifié).

La sensibilité clinique du test OSANTYS SARS-CoV-2 RT-qPCR KIT sur prélèvement NP non purifié est de 96,9%.

La spécificité clinique du test OSANTYS SARS-CoV-2 RT-qPCR KIT sur prélèvement NP non purifié est de 99,2%.

**Tableau 19. Evaluation clinique des prélèvements salivaires testés à partir d'ARN purifié (RT-qPCR)**

Résultats	(RT-qPCR)
Positifs/Totale	40/40
Négatifs/Totale	23*/24
Inconcluants/Totale	0/64
Invalides/Totale	0/64

\*Ct N1 = 40,37 and Ct N2 = 35 pour l'échantillon détecté positif (Méthode de référence en RT-PCR directe)

La sensibilité clinique du test OSANTYS SARS-CoV-2 RT-qPCR KIT sur prélèvements salivaires est de 100%. L'intervalle de confiance à 95% est de (0.91 - 1.0).

La spécificité clinique du test OSANTYS SARS-CoV-2 RT-qPCR KIT sur prélèvements salivaires purifiés est de 95,8%.

## 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. John P Abraham *et al.*, Using heat to kill SARS-CoV-2. *Rev Med Virol.* 2020 Sep;30(5):e2115.

## Contact, commandes, assistance client et support produit

Pour obtenir de la documentation et des informations supplémentaires sur ce kit, visitez :

[www.osantys.com](http://www.osantys.com)

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

Pour les commandes, envoyez un e-mail à : [orders@osantys.com](mailto:orders@osantys.com)

## Protocole En Bref

1. Décongeler les réactifs à température ambiante
2. Centrifuger brièvement les tubes des réactifs avant utilisation
3. 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
<b>Volume Total</b>	<b>N x 20.0 µL</b>

4. Ajouter 5 µL de chaque échantillon (ARN purifié ou échantillon non purifié), 5 µL de contrôle négatif et 5 µL de contrôles positifs.
5. Centrifuger brièvement
6. Préparer le programme suivant :
  - Etape 1 : 52°C, 5 min
  - Etape 2 : 95°C, 10 sec
  - Etape 3 : 95°C, 5 sec  
63.1°C, 30 sec (+ lecture fluorescence)
7. Sélectionner les fluorochromes :

} 45 cycles

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

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