<u>Trousse de dépistage du SRAS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel à l'aide d'une sonde fluorescente</u>

Notice d'utilisation (V9)

(MFG030018, 50 réactions/trousse)

Pour usage diagnostique in vitro

Sur prescription uniquement

Révisé le Mars 8, 2023



BGI Europe A/S (« BGI »), Ole Maaløes Vej 3, DK-2200 Copenhagen N, Denmark

Installation de fabrication: BGI Biotechnology (Wuhan) Co., Ltd

Adresse de l'installation : Building B2, Zone B/C/D, Wuhan National Bioindustry Base,

NO.666 Gaoxin Avenue, East Lake High-tech Development Zone, Wuhan

Pour information, veuillez communiquer avec : BGI Europe A/S

0045-80300800 / 0045-70260806

Table des matières

Table des matières	2
Usage prévu	3
Sommaire et explications	4
Principes et procédure	5
Matériel fourni	6
Matériel et équipement requis non fournis	7
Avertissements et précautions	8
Conservation, manipulation et stabilité du réactif	10
Prélèvement, conservation et transfert des échantillons	11
Procédures de laboratoire	12
Exécution d'un test et analyse des données	13
Contrôle de la qualité et interprétation des résultats	36
Limites d'utilisation	39
Performances	41
Symboles utilisés par le fabricant	54
Références	55
Coordonnées and soutien technique	56
Historique des modifications	57

Usage prévu

La trousse de dépistage du SRAS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel à l'aide d'une sonde fluorescente est un test diagnostique in vitro réalisé par le procédé d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) avec transcription inverse en temps réel (rRT-PCR) pour la détection qualitative des acides nucléiques du SRAS-CoV-2 dans des prélèvements oropharyngés, des prélèvements nasopharyngés, des prélèvements nasaux antérieurs, des prélèvements nasaux à micornet, le liquide de lavage nasal, les aspirations nasales et le liquide de lavage bronchoalvéolaire (BALF) provenant de personnes soupçonnées d'être atteintes de la COVID-19 par leur prestataire de soins de santé.

Les résultats d'analyse permettent d'identifier l'ARN du SRAS-CoV-2, laquelle est généralement détectable dans les échantillons prélevés dans les voies respiratoires lors de la phase aiguë de l'infection. Un résultat positif indique la présence de l'ARN du SRAS-CoV-2; afin de déterminer l'état infectieux du patient, il est nécessaire d'effectuer une corrélation clinique avec ses antécédents médicaux et d'autres informations diagnostiques. Ce résultat n'exclut pas une infection bactérienne ou une co-infection par d'autres virus. L'agent détecté peut ne pas être la cause certaine de la maladie. Les laboratoires sont tenus de signaler tous les résultats positifs aux autorités de santé publique compétentes.

Un résultat négatif n'exclut pas une infection par le SRAS-CoV-2 et ne doit pas constituer la seule base sur laquelle sont fondées les décisions de prise en charge du patient. Ce résultat doit être considéré en combinaison avec les observations cliniques, les antécédents médicaux du patient et les données épidémiologiques.

La trousse de dépistage du SRAS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel à l'aide d'une sonde fluorescente est censée être utilisée par du personnel de laboratoire clinique compétent et formé aux techniques de la PCR en temps réel et aux techniques diagnostiques in vitro.

Sommaire et explications

La COVID-19 s'est répandue dans le monde entier. Un nouveau coronavirus (SRAS-CoV-2) a été identifié comme l'agent pathogène. Des cas d'infection asymptomatique, d'affection bénigne et d'affection grave et certains décès ont été signalés.

La trousse de dépistage du SRAS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel à l'aide d'une sonde fluorescente permet de réaliser un test diagnostique moléculaire in vitro qui facilite la détection et le diagnostic du SRAS-CoV-2. Elle repose sur la technologie d'amplification des acides nucléiques largement utilisée. Elle contient des oligonucléotides amorces, des sondes oligonucléotidiques marquées et du matériel de contrôle utilisés dans la technique RT-PCR en temps réel pour la détection qualitative in vitro de l'ARN du SRAS-CoV-2 dans les échantillons prélevés dans les voies respiratoires.

Principes et procédure

La trousse de dépistage du SRAS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel à l'aide d'une sonde fluorescente repose sur la technique d'amplification en chaîne par polymérase avec transcription inverse en temps réel (rRT-PCR). Les ensembles amorces-sondes sont conçus pour détecter l'ARN du SRAS-CoV-2 dans des prélèvements oropharyngés et le liquide de lavage bronchoalvéolaire (BALF) ainsi que dans les prélèvements nasopharyngés, les prélèvements nasaux antérieurs, les prélèvements nasaux à mi-cornet, le liquide de lavage nasal et les aspirations nasales provenant de patients soupçonnés d'être atteints de la COVID-19 par leur prestataire de soins de santé.

Pour mettre au point la trousse, on a séquencé et comparé le génome entier du SRAS-CoV-2 avec d'autres gènes de coronavirus connus afin de sélectionner avec précision une région cible dans la région ORF1ab du génome du SRAS-CoV-2. En outre, le gène domestique humain de la β-actine a été élaboré comme gène cible pour le contrôle interne.

Matériel fourni

Contenu de la trousse de dépistage du SRAS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel à l'aide d'une sonde fluorescente

Article (50 tests/trousse)	Quantité par fiole	Nombre de fioles
Mélange réactionnel SRAS-CoV-2	1 ml/fiole	1 fiole
Mélange d'enzymes SRAS-CoV-2	80 μL/fiole	1 fiole
Contrôle positif SRAS- CoV-2	750 μL/fiole	1 fiole
Contrôle sans matrice SRAS-CoV-2	750 μL/fiole	1 fiole

Matériel et équipement requis non fournis

- Système PCR en temps réel 7500 d'Applied Biosystems^{MC} avec logiciel v2.0.5
 - Autre matériel acceptable : Système PCR en temps réel rapide 7500 d'ABI avec logiciel v2.0.6, système LightCycler^{MD} 480 de Roche avec logiciel v1.5.0, ou système PCR en temps réel QuantStudio 5 avec logiciel v1.5.1
- Mini-trousse d'extraction d'ARN virale QIAamp (cat. n° 52904 ou 52906)
 - O Autre matériel acceptable : trousse d'extraction d'acide nucléique MGIEasy (cat. nº 1000020261or 1000020471)
 - o Matériel facultatif : Système automatisé de préparation d'échantillons à haut débit MGISP-960RS, logiciel v1.2
- Agitateur vortex
- Microcentrifugeuse
- Micropipettes (2 ou 10 μL, 200 μL et 1000 μL)
- Micropipettes multicanaux (5-50 μL)
- Supports pour microtubes à centrifuger de 1,5 ml
- Blocs réfrigérants -20 °C
- Eau de qualité biologie moléculaire, exempte de nucléase
- Solution d'hypochlorite sodique 10 % (dilution 1:10 d'une eau de Javel 5,25-6,0 % commerciale)
- DNAZap^{MC} (Ambion, cat. nº AM9890) ou l'équivalent
- RNAseAWAY^{MC} (Fisher Scientific, cat. n° 21-236-21) ou l'équivalent
- Gants non poudrés et blouses chirurgicales jetables
- Embouts de pipette anti-aérosols
- Microtubes à centrifuger de 1,5 ml (exempts de DNase et RNase)
- Plaques de réaction PCR à 96 cupules de 0,2 ml (Applied Biosystems)

Avertissements et précautions

Ces consignes ne s'appliquent qu'aux tests diagnostiques in vitro.

Observer les précautions d'usage. Tous les échantillons prélevés sur des patients et les contrôles positifs doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés en conséquence.

Ne pas manger, boire, fumer, appliquer des cosmétiques ou manipuler des lentilles cornéennes dans les zones où des réactifs et des échantillons cliniques sont manipulés.

Traiter tous les échantillons comme s'ils étaient infectieux, en observant les procédures de laboratoire sécuritaires. Éliminer les substances dangereuses ou biologiquement contaminées conformément aux pratiques de votre établissement.

Prière de lire attentivement le feuillet se trouvant dans l'emballage avant d'utiliser le produit. La trousse de dépistage du SRAS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel à l'aide d'une sonde fluorescente ne doit être utilisée comme outil de diagnostic in vitro qu'en cas d'urgence et sur ordonnance seulement. Chaque étape du processus, depuis le prélèvement, la conservation et le transport des échantillons jusqu'aux tests en laboratoire, doit être effectuée conformément à la réglementation pertinente en matière de biosécurité et au système établi pour la gestion d'un laboratoire de biologie moléculaire.

Les faux positifs et les faux négatifs peuvent être causés par une mauvaise qualité de l'échantillon, par un prélèvement, un transport ou un traitement en laboratoire inadéquat ou encore par une limitation de la technologie de test. L'utilisateur doit comprendre les principes d'application de la procédure, y compris ses limites d'efficacité, avant l'utilisation du produit, afin d'éviter les erreurs possibles.

Des zones de laboratoire distinctes, réservées à l'exécution de procédures de test prédéfinies, doivent être établies comme suit : a) 1^{re} zone : préparation du réactif pour le test; b) 2^e zone : traitement de l'échantillon et des contrôles; et c) 3^e zone : réalisation de l'amplification en chaîne par polymérase (PCR).

Tout matériel employé dans une zone doit y rester; il ne doit pas être déplacé ni utilisé dans d'autres zones. Après les procédures de test, la table de travail et les fournitures de laboratoire doivent être nettoyées et désinfectées immédiatement.

Tout le contenu de la trousse est préparé et validé pour les tests prévus. Le remplacement de l'un ou l'autre des éléments de la trousse dégradera son efficacité d'analyse. Les éléments d'une trousse doivent être utilisés ensemble. Ne pas mélanger les éléments de différents lots de trousses.

Avant de commencer un test, chaque élément doit être soigneusement décongelé et brièvement centrifugé. Éviter les cycles répétés de congélation-décongélation.

Immédiatement après l'ajout du mélange réactionnel d'acide nucléique, la plaque à 96 cupules pour la PCR en temps réel doit être couverte et transférée dans la zone de traitement des échantillons.

Pour éviter toute contamination par de l'ARN exogène, les échantillons doivent être préparés dans l'ordre suivant : 1) contrôle sans matrice (négatif), 2) échantillon d'ARN, et 3) contrôle positif. De plus, des embouts de pipette filtrés doivent être employés et être remplacés après l'ajout de chaque réactif ou échantillon.

S'assurer de déposer les échantillons en les pipettant directement dans le mélange réactionnel se trouvant dans les tubes PCR. Ne pas déposer les échantillons en les pipettant à l'intérieur de la paroi des cupules de la plaque. Les plaques doivent être scellées immédiatement après l'ajout de l'échantillon.

Après l'application du protocole d'amplification, les plaques PCR doivent être placées dans un sac en plastique scellable pour être passées dans l'autoclave, puis décontaminées.

Veiller à ne pas causer la formation de mousse ou de bulles dans les tubes lors de l'aliquotage du mélange réactionnel de l'acide nucléique. Toutes les plaques PCR doivent être scellées avant leur chargement dans le thermocycleur afin d'éviter les fuites ou une contamination.

Toutes les tables de travail et les fournitures du laboratoire doivent être nettoyées et désinfectées régulièrement à l'éthanol 75 % ou à la lumière UV.

Les embouts de pipette et tubes à centrifuger utilisés pour le test doivent tous être exempts de DNase et de RNase. Une fois utilisés, ils doivent être jetés dans une poubelle contenant une solution d'hypochlorite sodique 10 % et éliminés après décontamination.

Conservation, manipulation et stabilité du réactif

La trousse de dépistage du SRAS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel à l'aide d'une sonde fluorescente doit être conservée à une température inférieure à -18 °C dans l'obscurité. Elle est stable et se conserve entre 2 et 8 °C pendant 5 jours et à -18 °C pendant 12 mois. Éviter les cycles répétés de congélation-décongélation. Ne pas congeler-décongeler la trousse plus de quatre fois. La trousse peut être transportée à -18 °C dans l'obscurité et restera stable pendant 5 jours.

Prélèvement, conservation et transfert des échantillons

Préparation de l'équipement : Nettoyer et décontaminer toutes les surfaces de travail, les pipettes, les centrifugeuses et autres équipements avant de les utiliser. Des agents de décontamination doivent être utilisés, notamment une solution d'hypochlorite sodique 10 %, de l'éthanol 70 % et du DNAZap^{MC} ou du RNase AWAY^{MD}, afin de limiter le risque de contamination par les acides nucléiques.

Un prélèvement, une conservation ou un transport inadéquat ou inapproprié des échantillons est susceptible de causer un faux résultat de test. Étant donné l'importance que revêt la qualité des échantillons, il est fortement recommandé de former le personnel sur la façon de les prélever.

Prélèvement de l'échantillon : Effectuer un prélèvement oropharyngé ou de liquide de lavage bronchoalvéolaire (BALF) sur une personne soupçonnée d'être atteinte de la COVID-19. L'échantillon doit être prélevé de manière à éviter toute contamination possible lors des étapes du prélèvement, de la conservation et du transport. Il doit être présumé contagieux et être traité conformément à la réglementation en vigueur. Prélèvements oropharyngés : retirer soigneusement l'écouvillon de l'emballage et le frotter contre les deux côtés du gosier, de la gorge et des amygdales plusieurs fois en le faisant tourner et en exerçant une certaine pression afin de recueillir autant de sécrétions que possible. Éviter de toucher la langue. Rompre la tige de l'écouvillon et mettre la tête dans la solution du tube d'échantillonnage. Visser fermement le bouchon du tube pour s'assurer qu'il n'y a pas de fuite. Des milieux de transport présentant ou non des propriétés d'inactivation des virus peuvent être utilisés. Nous recommandons l'utilisation exclusive d'écouvillons à tête en fibre synthétique et à tige en plastique. Ne pas utiliser d'écouvillons ayant une tête en alginate de calcium ou une tige en bois, car ils peuvent contenir des substances qui inactivent certains virus et inhibent le test PCR. Placer immédiatement les écouvillons dans des tubes stériles contenant de 2 à 3 ml de milieu de transport viral.

Liquide de lavage bronchoalvéolaire (BALF): Prélever 3 ml de liquide de lavage bronchoalvéolaire non traité et le déposer dans des cryotubes stériles, secs et propres et exempts de DNase et de RNase. Visser fermement le bouchon du tube pour éviter toute fuite, et sceller le tube avec une pellicule.

Conservation de l'échantillon: L'échantillon peut être testé immédiatement après son prélèvement, ou il peut être conservé entre 2 et 8 °C jusqu'à 72 heures avant le test. Si l'on prévoit un délai dans le test ou le transport, il peut être conservé à -18 °C pendant au plus une semaine ou à -70 °C pendant au plus 6 mois. Éviter les cycles répétés de congélation-décongélation.

Transport de l'échantillon : L'échantillon doit être transporté à basse température sur de la glace sèche ou un sac de glace.

Procédures de laboratoire

Traitement de l'échantillon: L'ARN doit être prélevée d'un échantillon récent afin de garantir une qualité et une quantité d'ARN adéquates. Le contrôle positif et le contrôle sans matrice (négatif) doivent être traités en même temps que l'échantillon. L'ARN doit être extraite à l'aide de la mini-trousse d'extraction d'ARN virale QIAamp (QIAGEN) ou de la trousse d'extraction d'acide nucléique MGIEasy, manuellement, ou à l'aide du système MGISP-960RS, conformément aux instructions du fabricant. Après l'extraction, l'ARN doit être utilisée immédiatement ou conservée à -70 °C pour une utilisation ultérieure. Lors de la manipulation du contrôle positif, veiller à prendre les précautions nécessaires pour éviter toute contamination de l'échantillon. Le manque de précautions pourrait entraîner un faux positif.

Préparation du réactif : Préparer tous les mélanges réactionnels dans la zone de préparation. Retirer d'abord les éléments de la trousse, sauf le mélange d'enzymes, et les décongeler complètement à température ambiante. Les passer ensuite au vortex et les centrifuger brièvement. Le mélange d'enzymes doit être conservé sur de la glace en tout temps. Calculer ensuite le nombre de réactions (N) qui seront comprises dans la trousse. Ne pas oublier de compter le contrôle sans matrice (négatif) (un tube), le contrôle positif (un tube) et chaque échantillon. Préparer les plaques à 96 cupules pour la RT-PCR en temps réel en fonction du nombre estimé de réactions (N) ainsi que les ingrédients du mélange PCR selon le dosage spécifié au tableau 1. Pipetter 20 μL de mélange PCR dans chaque cupule. Couvrir la plaque et la transférer dans la zone de traitement des échantillons. Le reste du mélange réactionnel et du mélange d'enzymes doit être immédiatement transféré dans un environnement à -18 °C.

Tableau 1. Calculs pour la préparation du réactif

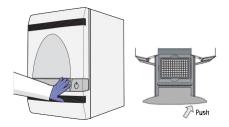
	Mélange réactionnel SRAS- CoV-2 (μL)	Mélange d'enzymes SRAS- CoV-2 (μL)
Mélange PCR (μL)	18,5 μL × nombre d'échantillons et de solutions de contrôle (N)	1,5 μL × nombre d'échantillons et de solutions de contrôle (N)

Ajout de l'échantillon : Ajouter 10 μ L d'ARN extraite de l'échantillon à la cupule contenant déjà le mélange PCR dans l'ordre suivant : le contrôle sans matrice (négatif), le ou les échantillons du patient et le contrôle positif. Sceller la plaque et la centrifuger à 2000 tr/min pendant 10 s. Placer la plaque dans le système RT-PCR en temps réel et consigner l'emplacement exact des contrôles et des échantillons. L'échantillon à bord est stable pendant \leq 4 heures à 20-25 °C après l'ajout de l'ARN de l'échantillon au mélange réactionnel.

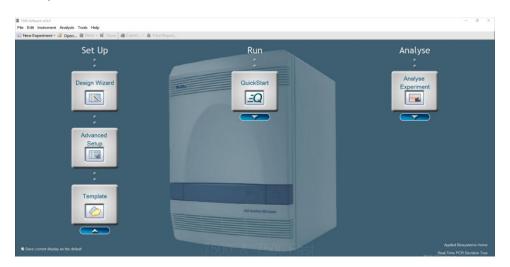
Exécution d'un test et analyse des données

1-1. Exécution d'un test à l'aide du système PCR en temps réel 7500 d'Applied Biosystems^{MC} et du système PCR en temps réel rapide 7500 d'ABI (logiciel v2.0.5 ou v2.0.6) :

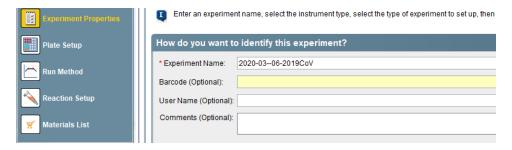
- (1) Démarrer le système PCR en temps réel 7500 d'Applied Biosystems^{MC} : Allumer d'abord l'ordinateur connecté au système PCR en temps réel 7500 d'Applied Biosystems^{MC}, puis le système.
- (2) Charger l'instrument : Appuyer sur la porte du plateau pour l'ouvrir, et déposer la plaque contenant les échantillons et les contrôles dans le porte-plaque. S'assurer que la plaque est bien assise dans le porte-plaque. Fermer la porte du plateau en exerçant une pression de biais sur le côté droit du plateau.



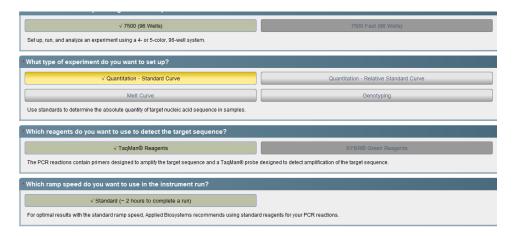
- (3) Définir les paramètres du test :
- (3.1) Double cliquer sur l'icône (7500 Software v2.0.5 ou 7500 Software v2.0.6) ou sélectionner Start > All Programs > Applied Biosystems > 7500 Software v2.0.5 (ou 7500 Software v2.0.6).



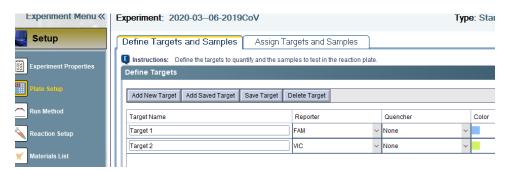
(3.2) Cliquer sur **New Experiment** pour accéder au menu **Experiment**. Dans la fenêtre **Experiment Properties**, entrer l'information associée au test; les autres champs peuvent rester vides.



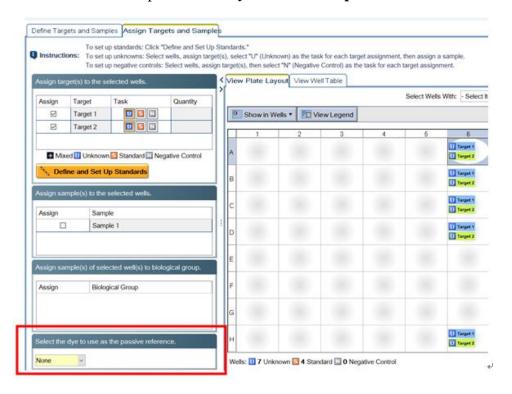
Sélectionner les boutons **7500** (**96 Wells**), **Quantitation - Standard Curve** (pour le type de test à réaliser), **TaqMan Reagents** (pour le réactif utilisé) et **Standard** (pour la montée en vitesse).



(3.3) Cliquer sur **Plate Setup**, puis, dans la fenêtre **Targets**, sous l'onglet **Define Targets and Samples**, dans les champs de la colonne **Reporter**, sélectionner **FAM** pour **Target 1** et **VIC** pour **Target 2** (voir la figure ci-après).



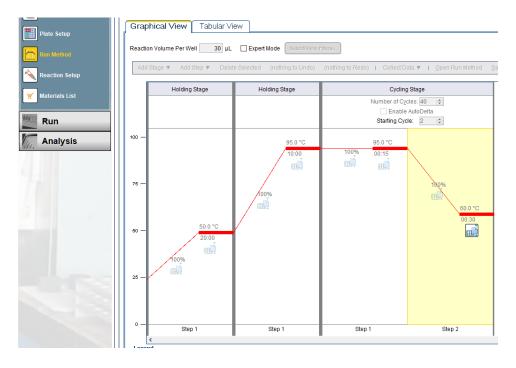
(3.4) Cliquer sur l'onglet **Assign Targets and Sample**, puis, dans la fenêtre **Samples**, entrer le nom des échantillons et des contrôles à inclure dans la cupule correspondante de la plaque de réactions. Sélectionner ensuite les réactions à définir pour les échantillons et les cibles. Sélectionner **None** dans le champ **Select the dye to use as the passive reference**.



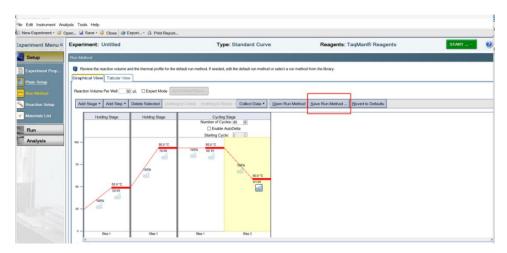
(3.5) Cliquer sur **Run Method**. Dans la fenêtre **Run Method**, sélectionner l'onglet **Graphical View** (par défaut) ou **Tabular View** pour modifier la méthode de test. S'assurer que le profil thermique présente les étapes de maintien et de cyclage illustrées ci-après. Entrer $30~\mu L$ dans le champ **Reaction Volume Per Well**. Le canal FAM (**Reporter** : **FAM**, **Quencher** : **None**) sera configuré pour la détection de l'ARN du SRAS-CoV-2 et le canal VIC/HEX (**Reporter** : **VIC/HEX**, **Quencher** : **None**), pour la détection de la référence interne (β -actine); **Reference Dye** : **None**. Configurer le protocole PCR conformément au tableau 2.

Tableau 2. Protocole PCR

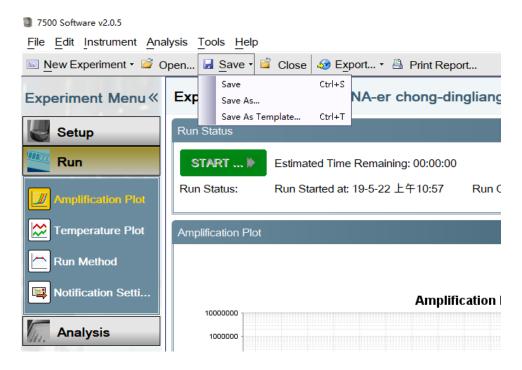
Étape	Cycle	Température	Durée	Fluorescence mesurée (O/N)
1	1	50 °C	20 minutes	N
2	1	95 °C	10 minutes	N
3	40	95 °C	15 secondes	N
		60 °C	30 secondes	O



Vous pouvez sauvegarder une méthode de test pour utilisation ultérieure en cliquant sur le bouton encadré en rouge illustré dans la figure ci-après.



(3.6) Cliquer sur **Run**. Dans la fenêtre **Run**, enregistrer les paramètres du test en sélectionner l'option **Save**. Cliquer sur **START**.

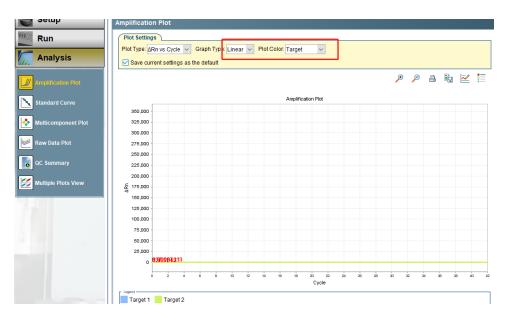


(3.7) Une fois le test terminé, retirer la plaque de l'instrument et procéder à l'analyse des données.

1-2. Analyse des données à l'aide du système PCR en temps réel 7500 d'Applied Biosystems^{MC} et du système PCR en temps réel rapide 7500 d'ABI (logiciel v2.0.5 ou v2.0.6) :

- (1) Cliquer sur **Analysis**. Dans la fenêtre **Amplification Plot**, sous l'onglet **Plot Settings** (voir la figure ci-après) :
 - a. sélectionner Δ **Rn vs Cycle** (par défaut) dans la liste déroulante **Plot Type**;
 - b. sélectionner Linear dans la liste déroulante Graph Type;
 - c. sélectionner Target dans la liste déroulante Plot Color.

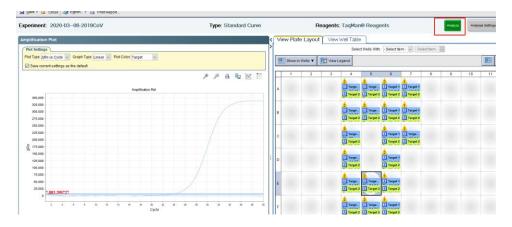
^{*}Procédure et images tirées du guide d'utilisation du système PCR en temps réel 7500 d'Applied Biosystems^{MC}.



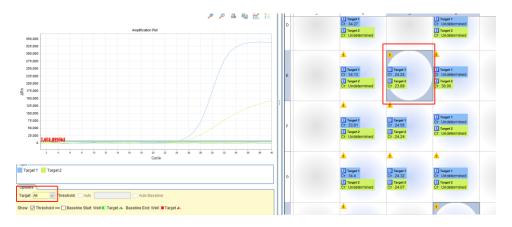
- (2) Définir le point initial au cycle 3 et le point final au cycle 15.
- (3) Définir les seuils manuellement comme suit (voir la fenêtre au bas de la figure ci-après) :
 - a. Dans la liste déroulante Target, sélectionner Target 1;
 - b. Décocher la case Auto;
 - c. Entrer le seuil à une valeur juste au-dessus de la courbe du contrôle sans matrice (bruit);
 - d. Répéter ces étapes pour Target 2.



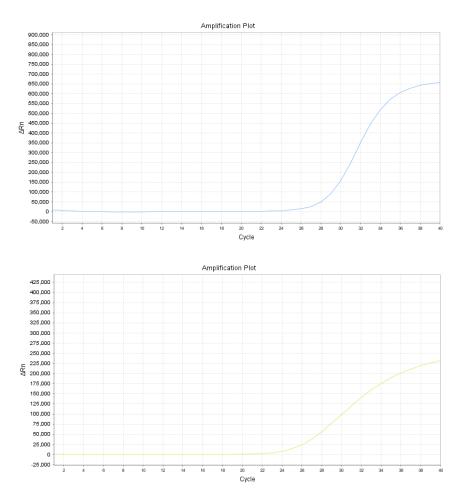
(4.3) Cliquer sur Analyze. Le logiciel analyse les données selon les paramètres définis.



Pour examiner une valeur Ct d'un échantillon, cliquer sur la cupule le contenant, comme l'illustre la figure ci-après. Dans la liste déroulante **Target**, sélectionner la cible à examiner.



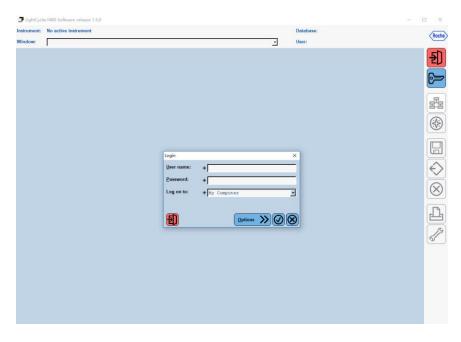
(4.4) Un exemple de courbe d'amplification d'échantillon positive est illustré ci-après (courbe pour le canal FAM SRAS-CoV-2 en bleu et courbe pour le canal de référence interne VIC en vert).



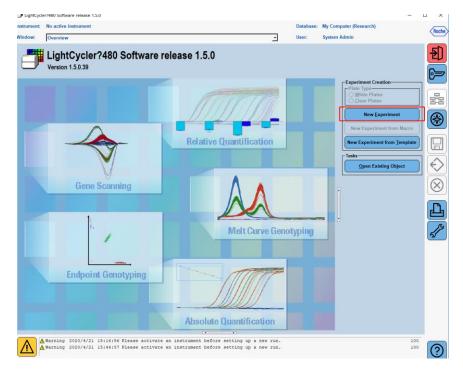
^{*}Procédure et images tirées du guide d'utilisation du système PCR en temps réel 7500 d'Applied Biosystems^{MC}.

2. Exécution d'un essai et analyse des données à l'aide du système LightCycler^{MD} 480 de Roche (logiciel v1.5.0) :

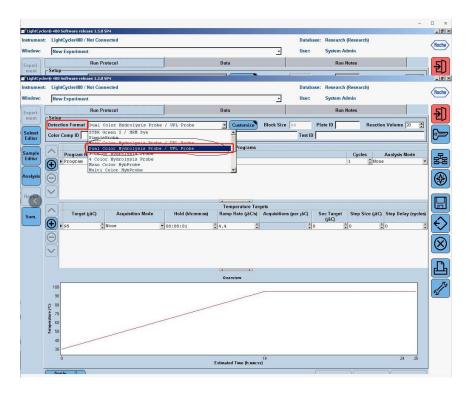
(1) Double cliquer sur l'icône du logiciel **LightCycler480** sur le bureau. À l'invite, entrer le nom d'utilisateur et le mot de passe pour lancer le logiciel (voir la capture d'écran ci-après).



(2) Cliquer sur New Experiment (voir la capture d'écran ci-après).

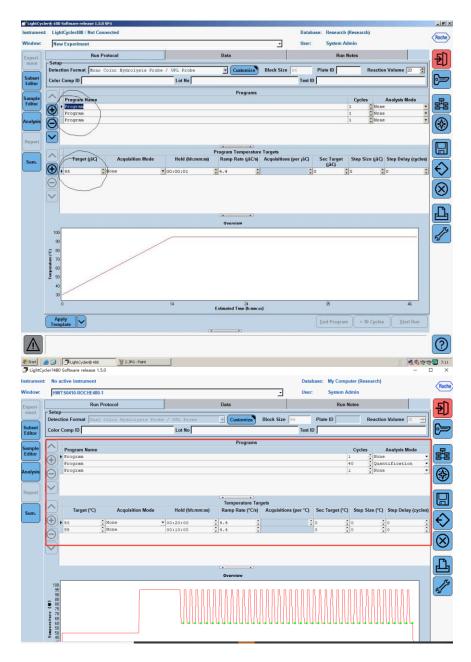


(3) Dans le menu déroulant **Detection Format**, sélectionner **DualColor Hydrolysis Probe** / **UPL Probe** (voir la capture d'écran ci-après).

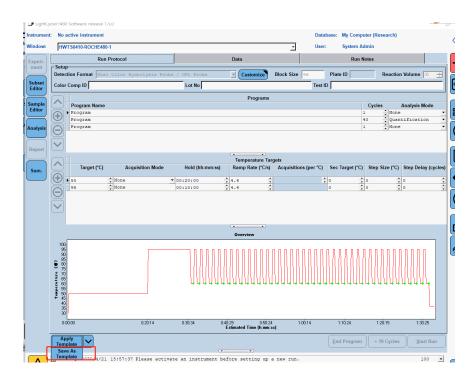


(4) Indiquer le nom de chaque programme dans la colonne **Program Name** et, dans le volet **Program Temperature Targets** situé sous le volet **Programs**, définir les paramètres de chaque programme indiqués au tableau suivant (étape, nombre de cycles, température et durée). Ajouter ou supprimer des étapes à l'aide des boutons (+) ou (-) de l'interface.

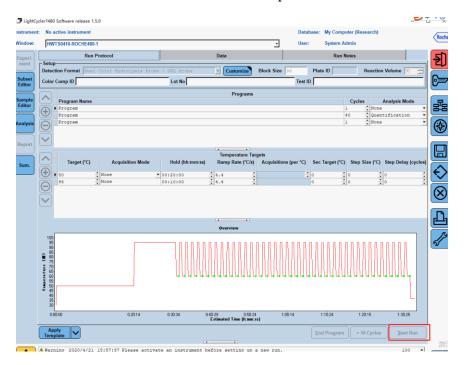
Étape	Nombre de cycles	Température	Durée	Fluorescence mesurée (O/N)
1	1	50 °C	20 minutes	N
2	1	95 °C	10 minutes	N
3	40	95 °C	15 secondes	N
		60 °C	30 secondes	0



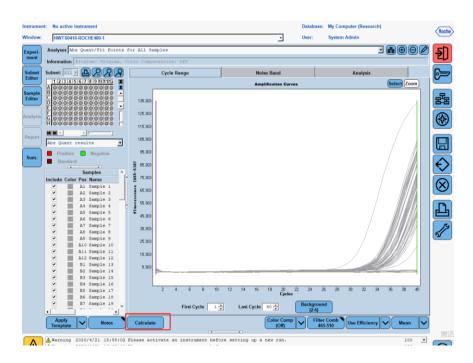
(5) Enregistrer le programme en tant que matrice en cliquant sur **Save As Template**. Afin d'utiliser la matrice pour d'autres tests, il suffit de cliquer sur **Apply Template** (voir la capture d'écran ci-après).



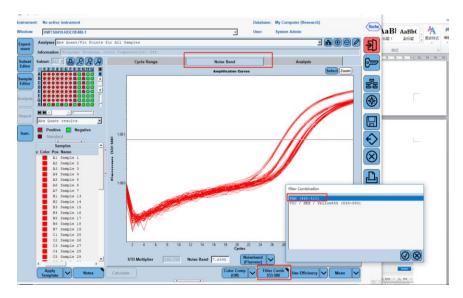
(6) Sélectionner Start Run et entrer le nom du test lorsqu'invité.



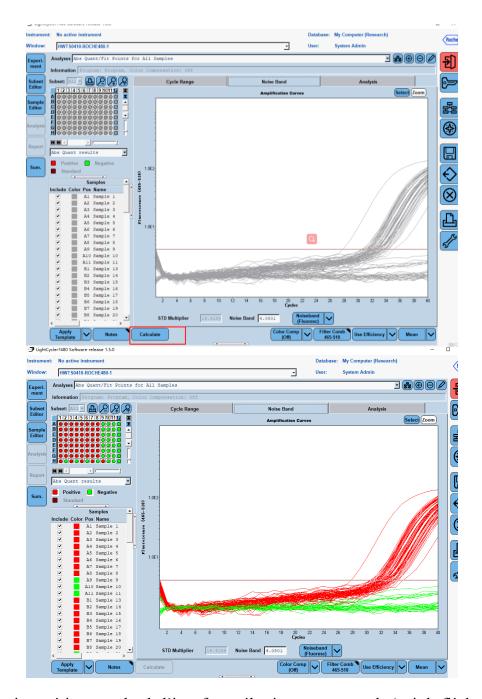
(7) Une fois le test terminé, cliquer sur **Analysis** dans le volet de gauche (voir la capture d'écran ci-dessus) pour ouvrir l'interface d'analyse, puis cliquer sur **Calculate** (voir la capture d'écran ci-après).



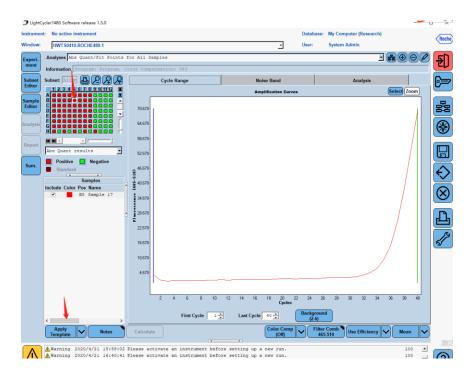
(8) Pour modifier le seuil du canal FAM ou VIC, sélectionner l'onglet **Noise Band**, puis sélectionner le canal respectif (voir la capture d'écran ci-après).



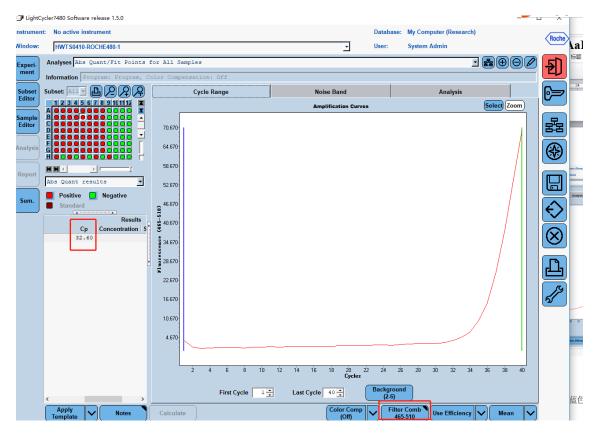
(9) Entrer le seuil à une valeur au-dessus du niveau maximal de la courbe du contrôle sans matrice (courbe de bruit aléatoire), puis cliquer sur **Calculate** pour appliquer les changements. Les résultats seront analysés et présentés comme l'illustrent les captures d'écran ci-après.



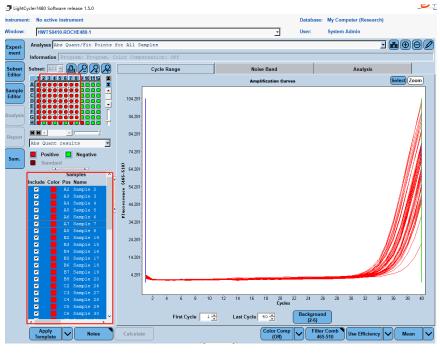
(10) Dans le coin supérieur gauche de l'interface, sélectionner une cupule (voir la flèche rouge du haut dans la capture d'écran ci-après) pour afficher la valeur Ct correspondante; déplacer la barre (indiquée par la flèche rouge du bas) vers la droite pour voir cette valeur.

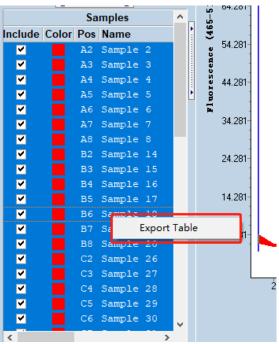


(11) Pour afficher les valeurs Ct de différents canaux, sélectionner **Filter Comb** (voir la capture d'écran ci-après).

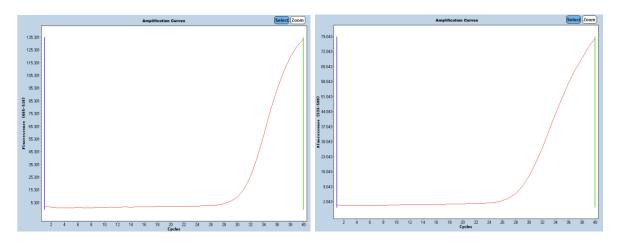


(12) Pour exporter les résultats, cliquer sur Export Table.



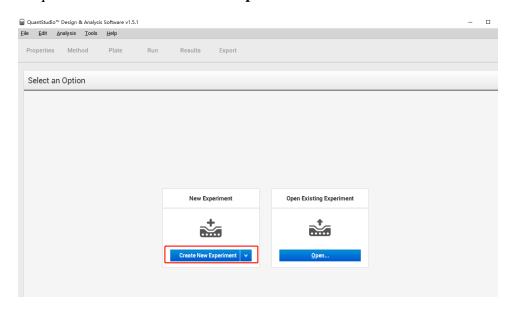


(13) Observer les valeurs Ct de la cible FAM (voir la capture d'écran de gauche ci-après) et du canal VIC (référence interne; voir la capture d'écran de droite ci-après) des échantillons et déterminer le résultat des échantillons en suivant les instructions de la notice d'utilisation de la trousse de dépistage du SRAS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel à l'aide d'une sonde fluorescente.

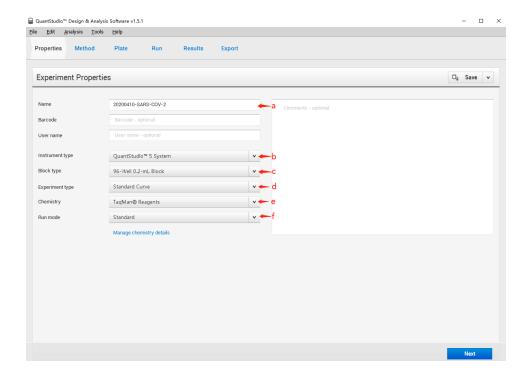


3. Exécution d'un essai et analyse des données à l'aide du système PCR en temps réel QuantStudio 5 (logiciel v1.5.1) :

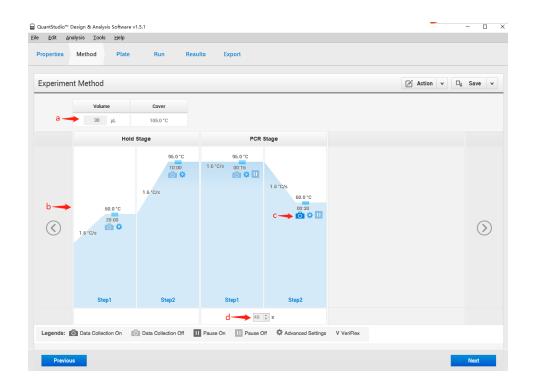
(1) Double cliquer sur **QuantStudio Design & Analysis Software** sur le bureau ou sélectionner **Start > All Program > Applied Biosystems > QuantStudio Design & Analysis Software** pour lancer le logiciel. Cliquer ensuite sur **Create New Experiment**.



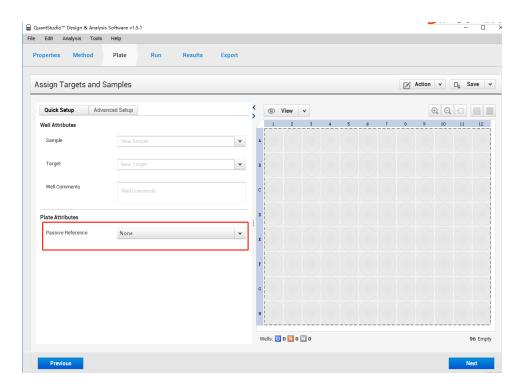
- (2) Dans le volet Experiment Properties, entrer ou sélectionner l'information suivante :
 - a. **Name**: nom du test;
 - b. Instrument type : QuantStudioTM 5 Systems;
 - c. Block type: 96-well 0.2ml Block;
 - d. Experiment type: Standard Curve;
 - e. Chemistry: TaqMan Reagents;
 - f. Run mode: Standard.



- (3) Cliquer sur **Next** pour accéder à l'interface **Method**. Configurer la méthode de test comme illustré dans la figure ci-après :
 - a. Définir le volume (**Volume**) à 30 μ L;
 - b. Configurer l'étape de maintien (**Hold Stage**) et l'étape PCR (**PCR Stage**) comme illustré;
 - c. Définir la mesure de la fluorescence à l'étape « **60,0** °C, **30 s** »; s'assurer que l'icône de **caméra** est bleue;
 - d. Entrer **40** dans le champ du nombre de cycles (**x**).

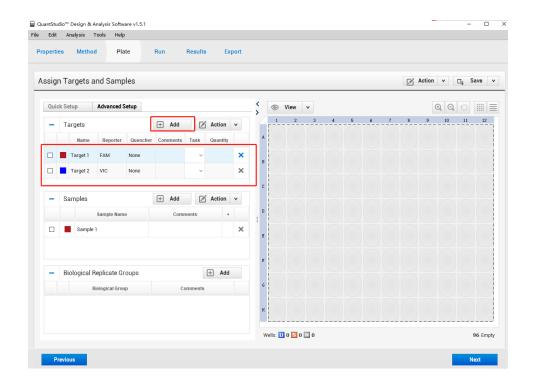


(4) Cliquer sur **Next** pour accéder à l'interface **Plate**. Double cliquer sur l'onglet **Quick Setup**, puis, dans le champ **Passive Reference**, sélectionner **None**.

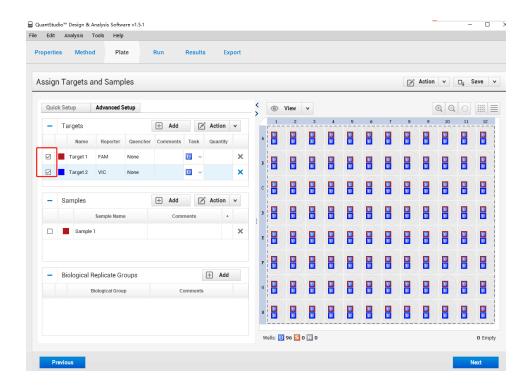


(5) Cliquer sur l'onglet Advanced Setup, puis sur Add pour définir les cibles comme suit :

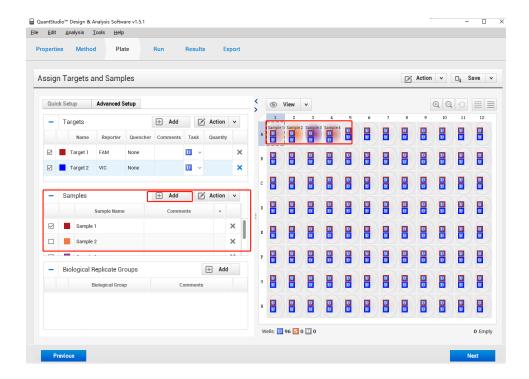
Target 1 (SRAS-CoV-2) – Reporter à FAM et Quencher à None; Target 2 (référence interne) – Reporter à VIC et Quencher à None.



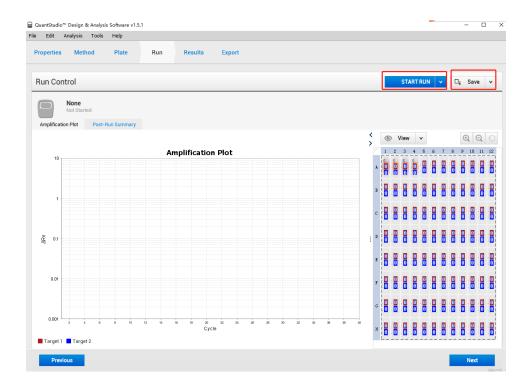
(6) Dans l'onglet **Advanced setup**, attribuer les cibles (**Targets**) et les échantillons (**Samples**). Entrer le nom de chaque échantillon dans la cupule correspondante et attribuer toutes les cibles.



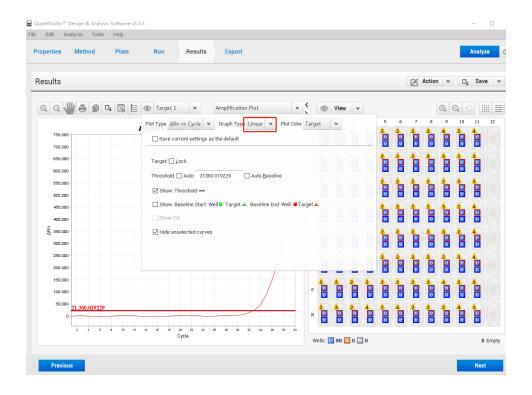
(7) Cliquer sur **Add** dans le volet **Samples** (voir la capture d'écran ci-après) et modifier les échantillons au besoin.



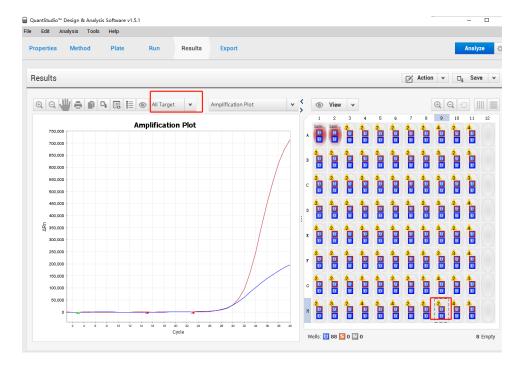
(8) Cliquer sur Next pour accéder à l'interface Run, puis sur Save et sur START RUN.



- (9) Une fois le test terminé, cliquer sur **Results** pour accéder à l'interface **Results**, puis sur **Analyze** dans le coin supérieur droit de la fenêtre pour analyser les données (voir la capture d'écran ci-après).
 - a. Cliquer sur Show Plot Setting, puis, sous l'onglet Graph Type, sélectionner Linear.
 - b. Modifier les paramètres de référence et le seuil pour chaque cible. Cliquer sur **Show Plot Setting**, sélectionner une cible, puis cocher les cases **Show: Threshold** et **Show: Baseline.** Décocher la case **Threshold:** □ **Auto** et entrer le seuil à une valeur au-dessus de la valeur maximale de la courbe du contrôle sans matrice (courbe de bruit aléatoire), puis cliquer sur **Analyze**.



(10) Observer les valeurs Ct de la cible « SRAS-CoV-2 » et de la « référence interne » des échantillons et déterminer le résultat des échantillons en suivant les instructions de la notice d'utilisation de la *trousse de dépistage du SRAS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel à l'aide d'une sonde fluorescente*. Voir la capture d'écran ci-après illustrant la courbe d'amplification pour SRAS-CoV-2 en rouge et la référence interne en bleu.



Contrôle de la qualité et interprétation des résultats

Contrôle de la qualité :

Le contrôle de la qualité doit être effectué conformément aux réglementations locales,, étatiques, provinciales ou territoriales et fédérales ou aux exigences d'agrément et aux procédures normalisées de contrôle de la qualité du laboratoire de l'utilisateur. Les procédures de contrôle de la qualité ont pour but de surveiller les performances des réactifs et des tests. Tous les contrôles positifs doivent être testés avant l'exécution des tests diagnostiques sur les échantillons pour chaque nouveau lot de trousses afin de s'assurer que tous les réactifs et les éléments de la trousse fonctionnent correctement. Un contrôle d'extraction positif doit être compris dans chaque lot de matériel d'isolation d'acide nucléique. Toujours inclure un contrôle sans matrice (négatif) et un contrôle positif dans chaque test d'amplification et de détection.

Pour le contrôle sans matrice (négatif), aucune courbe d'amplification ne doit être obtenue et les valeurs Ct doivent être de « 0 » ou indiquer « aucune donnée disponible » (no data available) sur les canaux FAM et VIC/HEX. Pour le contrôle positif, une courbe d'amplification sigmoïde doit être obtenue sur les canaux FAM et VIC/HEX et les valeurs Ct sur les canaux FAM et VIC/HEX ne doivent pas être supérieures à 37 et à 35, respectivement. La courbe d'amplification pour l'échantillon testé doit avoir une forme sigmoïde avec une valeur Ct d'au plus 35 sur le canal VIC/HEX. De plus, chacune des exigences relatives au contrôle sans matrice (négatif), au contrôle positif et à la référence interne susmentionnées doit être satisfaite en un seul test sur l'échantillon. Si ce n'est pas le cas, le test est déclaré invalide. Le tableau 3 présente de l'information détaillée pour permettre l'interprétation des résultats du contrôle de la qualité.

Tableau 3. Interprétation des résultats du contrôle de la qualité

Paramètres de contrôle de la qualité	Observation – canal VIC	Observation – canal FAM	Interprétation	
Contrôle sans matrice	Aucune amplification	Aucune amplification	Suggist progédor à	
Contrôle positif	Courbe d'amplification sigmoïde et valeur Ct < 35	Courbe d'amplification sigmoïde et valeur Ct < 37	Succès; procéder à l'analyse des échantillons.	
Contrôle sans matrice	Courbe d'amplification sigmoïde et valeur Ct < 35	Courbe d'amplification sigmoïde et valeur Ct < 37	Échec; répéter le test avant de procéder à l'analyse des échantillons.	
Contrôle positif	Aucune amplification ou valeur Ct > 35	Aucune amplification ou valeur Ct > 37	Échec; répéter le test avant de procéder à l'analyse des échantillons.	

Interprétation des résultats :

Examen et interprétation des contrôles – positif, négatif et interne :

Les contrôles de la *trousse de dépistage du SRAS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel à l'aide d'une sonde fluorescente* sont évalués à l'aide de la courbe d'amplification de l'acide nucléique et des valeurs Ct générées par le logiciel du système RT-PCR. Les valeurs seuil Ct ont été déterminées à l'aide des courbes caractéristiques de fonctionnement du récepteur des échantillons cliniques testés. La valeur Ct sur le canal FAM pour un contrôle sans matrice (négatif) valide doit être « 0 » et aucune courbe d'amplification sigmoïde ne doit être générée. L'analyse expérimentale a montré que les valeurs Ct pour des échantillons SRAS-CoV-2 positifs ne doivent pas être supérieures à 37. Par conséquent, la valeur Ct sur le canal FAM pour un contrôle positif valide ne doit pas être supérieure à 37 et aucune courbe d'amplification sigmoïde ne doit être générée. L'analyse expérimentale a montré que les valeurs Ct pour les échantillons de contrôle positif interne ne doivent pas être supérieures à 35. Ainsi, la valeur Ct sur le canal VIC/HEX pour un contrôle positif interne valide ne doit pas être supérieure à 35 et aucune courbe d'amplification sigmoïde ne doit être générée.

Examen et interprétation des résultats pour des échantillons de patient :

L'évaluation des résultats de tests cliniques sur des échantillons doit être effectuée une fois les contrôles positifs et sans matrice (négatifs) examinés et jugés valides et acceptables. Si les contrôles sont invalides, les résultats ne peuvent pas être interprétés. Par exemple, pour le contrôle sans matrice (négatif), on doit obtenir des valeurs Ct de « 0 » ou « aucune donnée disponible » (no data available) sur les canaux FAM et VIC/HEX. Pour le contrôle positif, on doit obtenir une courbe d'amplification de forme sigmoïde sur les canaux FAM et VIC/HEX et les valeurs Ct sur les canaux FAM et VIC/HEX ne doivent pas être supérieures à 37 et 35 respectivement. Pour être jugé valide, un test doit satisfaire à la fois aux exigences pour le contrôle sans matrice (négatif) et à celles pour le contrôle positif susmentionnées. Si aucune de ces exigences n'est satisfaite ou si une seule l'est, le test est jugé invalide.

Un échantillon est positif au SRAS-CoV-2 si, sur le canal FAM, une courbe d'amplification sigmoïde est générée et la valeur Ct n'est pas supérieure à 37 et que, sur le canal VIC/HEX, une courbe d'amplification sigmoïde est générée et la valeur Ct n'est pas supérieure à 35 (tableau 4, échantillon 1). L'échantillon est négatif au SRAS-CoV-2 si, sur le canal FAM, aucune courbe d'amplification sigmoïde n'est générée et la valeur Ct est « 0 » ou indique « aucune donnée disponible » (no data available) et que, sur le canal VIC/HEX, une courbe d'amplification sigmoïde est générée et la valeur Ct n'est pas supérieure à 35 (tableau 4, échantillon 2). L'échantillon doit être testé de nouveau si la courbe d'amplification sur le canal VIC/HEX présente une valeur Ct supérieure à 35, même si une courbe d'amplification sigmoïde est générée sur le canal FAM (tableau 4, échantillon 3). L'échantillon doit être testé de nouveau si la courbe d'amplification sur les canaux FAM et VIC/HEX présente une valeur Ct supérieure à 37 et 35 respectivement (tableau 4, échantillon 4).

Lors d'une reprise de test, l'échantillon peut être déclaré positif au SRAS-CoV-2 si, sur le canal FAM, une courbe d'amplification sigmoïde est générée et la valeur Ct n'est pas supérieure à 37 et que, sur le canal VIC/HEX, une courbe d'amplification sigmoïde est générée et la

valeur Ct n'est pas supérieure à 35 (tableau 4, échantillon 1). En outre, lors d'une reprise de test, l'échantillon peut être déclaré négatif au SRAS-CoV-2 si, sur le canal FAM, aucune courbe d'amplification sigmoïde n'est générée ou la valeur Ct est supérieure à 37 et que, sur le canal VIC/HEX, une courbe d'amplification sigmoïde est générée et la valeur Ct n'est pas supérieure à 35 (tableau 4, échantillon 2).

Des exemples illustrant la manière d'interpréter les résultats des tests obtenus avec la *trousse de dépistage du SRAS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel à l'aide d'une sonde fluorescente* sont fournis au tableau 4.

Tableau 4. Exemple d'interprétation des résultats de test obtenus avec la *trousse de dépistage du SRAS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel à l'aide d'une sonde fluorescente*

	Observation – canal VIC/HEX	Observation – canal FAM	Interprétation
Échantillon 1	Courbe d'amplification sigmoïde et valeur Ct < 35	Courbe d'amplification sigmoïde et valeur Ct < 37	Positif pour l'ARN du SRAS-CoV-2; amplification détectée sur les deux canaux et valeur Ct sous le seuil
Échantillon 2	Courbe d'amplification sigmoïde et valeur Ct < 35	Courbe d'amplification sigmoïde et valeur Ct > 37	Négatif pour l'ARN du SRAS-CoV-2; amplification détectée sur les deux canaux, mais valeur Ct sur le canal FAM au-dessus du seuil
Échantillon 3	Courbe d'amplification sigmoïde et valeur Ct > 35	Courbe d'amplification sigmoïde et valeur Ct < 37	Test invalide, à reprendre*; amplification détectée sur le canal FAM, mais valeur Ct sur le canal VIC au-dessus du seuil
Échantillon 4	Courbe d'amplification sigmoïde et valeur Ct > 35	Courbe d'amplification sigmoïde et valeur Ct > 37	Test invalide, à reprendre*; valeur Ct sur les canaux VIC et FAM au-dessus du seuil

^{*}Pour reprendre le test, commencer par extraire de l'ARN une autre fois sur le même échantillon. Si le test échoue encore, prélever un autre échantillon sur le patient et répéter le test.

Limites d'utilisation

L'utilisation de cette trousse est réservée au personnel ayant reçu une formation sur la procédure. Le non-respect de ces instructions peut entraîner des résultats erronés.

Les performances de la *trousse de dépistage du SRAS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel à l'aide d'une sonde fluorescente* ont été établies pour des prélèvements oropharyngés et des prélèvements de liquide de lavage bronchoalvéolaire (BALF). La trousse peut aussi être employée pour analyser des prélèvements nasopharyngés, des prélèvements nasaux (antérieurs ou à mi-cornet), le lavage nasal ou l'aspiration nasale, mais ses performances n'ont pas été établies pour ces types d'échantillons. L'analyse des prélèvements nasaux et à mi-cornet (échantillons prélevés par le patient lui-même ou par un prestataire de soins de santé) est limitée aux patients présentant des symptômes de la COVID-19.

Les échantillons doivent être prélevés, transportés et conservés selon des procédures et dans des conditions adéquates. Le prélèvement, le transport ou la conservation des échantillons de façon inadéquate peut limiter la capacité de la trousse à détecter les séquences de la cible.

L'extraction et l'amplification de l'acide nucléique des échantillons cliniques doivent être réalisées selon les méthodes spécifiées dans cette procédure. Aucune autre méthode d'extraction ou aucun autre système de traitement n'a été évalué.

Des faux négatifs peuvent se produire dans les cas suivants :

- o prélèvement incorrect de l'échantillon;
- o dégradation de l'ARN virale pendant le transport ou la conservation;
- o utilisation de réactifs d'extraction ou de test non autorisés;
- o présence d'inhibiteurs de la RT-PCR;
- o mutation du virus SRAS-CoV-2;
- o non-respect de la notice d'utilisation.

Des faux positifs peuvent se produire dans les cas suivants :

- o contamination croisée pendant la manipulation ou la préparation de l'échantillon;
- o contamination croisée entre des échantillons de patients;
- o mélange d'échantillons;
- o contamination de l'ARN pendant la manipulation du produit.

L'effet des vaccins, des médicaments antiviraux, des antibiotiques, des produits chimiothérapeutiques ou des immunosuppresseurs n'a pas été évalué.

Un résultat négatif n'exclut pas une infection par le virus SRAS-CoV-2 et ne doit pas être le seul fondement d'une décision de prise en charge d'un patient.

Un résultat positif indique la détection de l'acide nucléique du SRAS-CoV-2.

L'acide nucléique peut persister même après que le virus n'est plus viable.

Les laboratoires sont tenus de signaler tous les résultats positifs aux autorités de santé publique compétentes.

La performance de ce test a été établie sur la base de l'évaluation d'un nombre limité d'échantillons cliniques. La performance clinique n'a pas été établie avec toutes les variantes en circulation, mais on s'attend à ce qu'elle reflète les variantes prévalentes en circulation au moment et au lieu de l'évaluation clinique. Les performances au moment du test peuvent varier en fonction des variantes en circulation, y compris les nouvelles souches émergentes de SRAS-CoV-2 et leur prévalence, qui évolue avec le temps.

Performances

Limite de détection :

Les études de la limite de détection permettent de déterminer la plus faible concentration détectable de SRAS-CoV-2 à laquelle environ 95 % de tous les réplicats (vrais positifs) sont positifs. La limite de détection a été déterminée en limitant les études sur la dilution aux échantillons caractérisés.

Préparation des étalons du fabricant :

Tout d'abord, l'ARN a été extraite du pseudovirus décrit ci-dessus à l'aide de la mini-trousse d'extraction d'ARN virale QIAamp fabriquée par QIAGEN. La concentration de l'ARN extraite a été calculée à partir de la concentration en ng/μL (déterminée par la densité optique de la solution d'ARN extraite) et du poids moléculaire de l'ARN du pseudovirus. Cette concentration a également été confirmée par la méthode ddPCR. Enfin, l'ARN a été diluée pour donner 10⁴, 10³ et 10² copies/ml afin d'être utilisée comme étalon du fabricant. Remarque : La concentration du pseudovirus n'a pas été déterminée à l'aide de la *trousse de dépistage du SRAS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel à l'aide d'une sonde fluorescente*.

Limite de détection avec le pseudovirus :

La limite de détection de la *trousse de dépistage du SRAS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel à l'aide d'une sonde fluorescente* a été estimée en testant les dilutions étalons du pseudovirus décrites ci-dessus (n = 3 chacune). Le niveau cible le plus bas auquel les trois réplicats ont donné des résultats positifs était de 100 copies/ml. On a ensuite confirmé cette valeur en testant 20 réplicats à cinq concentrations différentes au-dessus et au-dessous de la limite de détection estimée (voir le tableau 5).

Tableau 5. Confirmation de la limite de détection avec le pseudovirus

Concentration estimée par la PCR numérique (copies/ml)	Nombre de résultats positifs/ nombre d'échantillons testés	Proportion de résultats positifs
500	20/20	100 %
300	20/20	100 %
150	20/20	100 %
100	20/20	100 %
75	15/20	75 %

Limite de détection avec des échantillons cliniques :

La quantité de SRAS-CoV-2 dans trois échantillons cliniques qu'on sait positifs a été estimée par la PCR numérique quantitative. Ce qu'il restait de chaque échantillon a ensuite été dilué dans une

matrice clinique négative au SRAS-CoV-2 afin d'obtenir les concentrations approximatives indiquées au tableau 6.

Tableau 6. Dilution d'échantillons cliniques pour la détermination de la limite de détection

Concentration	Facteur de dilution			
estimée par PCR numérique (copies/ml)*	Prélèvements oropharyngés (1,33 x 10 ⁴ copies/ml)	BALF 1 (1,25 x 10 ⁴ copies/ml)	BALF 2 (1,55 x 10 ⁴ copies/ml)	
500	26,5	25,1	31	
300	44,2	41,8	51,7	
150	88,3	83,5	103,4	
100	132,5	125,3	155,2	
75	176,7	167,1	206,9	

^{*}Remarque : Cette concentration pourrait ne pas refléter exactement le nombre d'équivalents génomiques présents.

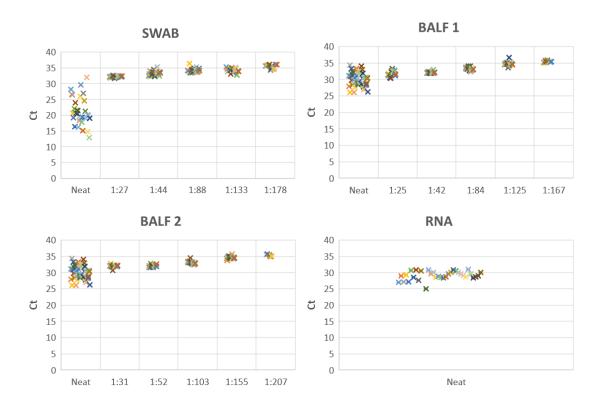
La limite de détection de la *trousse de dépistage du SRAS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel* à l'aide d'une sonde fluorescente a été évaluée en testant les dilutions de chaque échantillon clinique décrit ci-dessus (n = 20 chacune), à l'aide de la mini-trousse d'extraction d'ARN virale QIAamp et du système PCR en temps réel 7500 d'Applied Biosystems^{MC} pour l'extraction de l'ARN et la PCR. Elle a été établie comme étant la dilution la plus élevée à laquelle au moins 19 résultats sur 20 étaient positifs (c'est-à-dire ≥ 95 % positifs) (voir le tableau 7-1).

Tableau 7-1. Confirmation de la limite de détection

Échantillon	Concentration de SRAS-CoV- 2 estimée par PCR numérique (copies/ml)*	Nombre de résultats positifs/nombre d'échantillons testés	Proportion de résultats positifs
	500	20/20	100 %
Dudlènements	300	20/20	100 %
Prélèvements oropharyngés	150	19/20	95 %
oropharynges	100	18/20	90 %
	75	15/20	75 %
	500	20/20	100 %
	300	20/20	100 %
BALF 1	150	20/20	100 %
	100	20/20	100 %
	75	10/20	50 %
	500	20/20	100 %
	300	20/20	100 %
BALF 2	150	20/20	100 %
	100	19/20	95 %
	75	6/20	30 %

^{*} Remarque : Cette concentration pourrait ne pas refléter exactement le nombre d'équivalents génomiques présents.

Les diagrammes de dispersion des valeurs Ct obtenues à partir des dilutions d'échantillons positifs au SRAS-CoV-2 lors de l'étude sur la limite de détection sont présentés ci-après, ainsi que les valeurs Ct obtenues lors de tests d'échantillons non dilués dans le cadre de l'évaluation clinique.



Validation supplémentaire :

La limite de détection (150 copies/ml) pour chaque matrice clinique a été validée plus avant pour trois lots de trousses sur un système PCR (système PCR en temps réel 7500 d'Applied Biosystems^{MC}) en 20 réplicats, où au moins 19 tests ont donné un résultat positif pour chaque matrice/trousse.

Validation d'une trousse d'extraction d'ARN supplémentaire :

Les données présentées au tableau 7-2 ci-après ont été obtenues en diluant des échantillons cliniques qu'on sait positifs au SRAS-CoV-2 avec un prélèvement oropharyngé ou une matrice de liquide de lavage bronchoalvéolaire (BALF) négatif au SRAS-CoV-2, selon le cas. Les résultats démontrent que la limite de détection de la *trousse de dépistage du SRAS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel à l'aide d'une sonde fluorescente* utilisée avec la trousse d'extraction d'acide nucléique MGIEasy (manuelle) est comparable à la limite de détection obtenue pour la première trousse lorsque celle-ci est utilisée avec la mini-trousse d'extraction d'ARN virale QIAamp (manuelle). On a eu recours au système PCR en temps réel 7500 d'Applied Biosystems^{MC} pour effectuer cette validation.

Tableau 7-2. Données de validation pour une trousse d'extraction (manuelle) supplémentaire

Numéro de l'échantillon et type	Concentration de SRAS-CoV-2 (copies/ml)*	Trousse d'extraction d'acide nucléique MGIEasy (manuelle)
1 Du/12	300 (2 x LD)**	5/5
1. Prélèvement	150 (1 x LD)	5/5
oropharyngé (positif)	75 (0,5 x LD)	2/5
(positii)	37,5 (0,25 x LD)	0/5
0 D (1)	300 (2 x LD)	5/5
2. Prélèvement	150 (1 x LD)**	5/5
oropharyngé (positif)	75 (0,5 x LD)	2/5
(positii)	37,5 (0,25 x LD)	1/5
2 D (1)	300 (2 x LD)	5/5
3. Prélèvement	150 (1 x LD)**	5/5
oropharyngé (positif)	75 (0,5 x LD)	2/5
(positii)	37,5 (0,25 x LD)	0/5
	300 (3 x LD)	5/5
4. BALF	150 (1,5 x LD)	5/5
(positif)	75 (0,75 x LD)	2/5
	37,5 (0,375 x LD)	0/5
Prélèvement		
oropharyngé	0 (0 x LD)	0/5
(négatif)		
BALF	0 (0 x LD)	0/5
(négatif)	` ´	0/3

^{*} Les concentrations ont été établies par la PCR numérique. Cette concentration pourrait ne pas refléter exactement le nombre d'équivalents génomiques présents.

Validation d'une trousse d'extraction d'ARN supplémentaire à l'aide d'un système automatisé : Les données présentées au tableau 7-3 ci-après ont été obtenues en diluant des échantillons cliniques que l'on sait positifs au SRAS-CoV-2 avec un prélèvement oropharyngé ou une matrice du liquide de lavage bronchoalvéolaire (BALF) négatif au SRAS-CoV-2, selon le cas. Les résultats démontrent que la limite de détection d'une trousse de dépistage du SRAS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel à l'aide d'une sonde fluorescente utilisée avec la trousse d'extraction d'acide nucléique MGIEasy et le système de préparation d'échantillons MGISP-960RS est comparable à la limite de détection obtenue pour la première trousse lorsque celle-ci est utilisée avec la mini-trousse d'extraction d'ARN virale QIAamp (manuelle). Dans le cadre de cette validation, on a utilisé un seul système MGISP-960RS, conformément aux instructions du fabricant, pour effectuer toutes les étapes d'extraction et le système PCR en temps réel 7500 d'Applied Biosystems^{MC} pour réaliser les étapes suivantes.

^{**} La limite de détection (LD) a été déterminée à l'aide de la mini-trousse d'extraction d'ARN virale QIAamp (voir le tableau 7-1).

Tableau 7-3. Données de validation pour une trousse d'extraction supplémentaire utilisée avec le système MGISP-960RS

Numéro de l'échantillon et type	Concentration de SRAS-CoV-2 (copies/ml)*	Trousse d'extraction d'acide nucléique MGIEasy utilisée avec le MGISP-960RS
	450 (3 x LD)**	5/5
1 D (1)	300 (2 x LD)	5/5
1. Prélèvement	150 (1 x LD)	5/5
oropharyngé	100 (0,67 x LD)	5/5
(positif)	75 (0,5 x LD)	4/5
	37,5 (0,25 x LD)	1/5
	450 (3 x LD)	5/5
2. D. (1)	300 (2 x LD)	5/5
2. Prélèvement	150 (1 x LD)	5/5
oropharyngé	100 (0,67 x LD)	5/5
(positif)	75 (0,5 x LD)	5/5
	37,5 (0,25 x LD)	2/5
	450 (3 x LD)	5/5
2.7.40	300 (2 x LD)	5/5
3. Prélèvement	150 (1 x LD)	5/5
oropharyngé	100 (0,67 x LD)	5/5
(positif)	75 (0,5 x LD)	5/5
	37,5 (0,25 x LD)	2/5
	450 (3 x LD)	5/5
	300 (2 x LD)	5/5
4. Prélèvement	150 (1 x LD)	5/5
oropharyngé	100 (0,67 x LD)	5/5
(positif)	75 (0,5 x LD)	5/5
	37,5 (0,25 x LD)	2/5
	450 (3 x LD)	5/5
	300 (2 x LD)	5/5
5. Prélèvement	150 (1 x LD)	5/5
oropharyngé	100 (0,67 x LD)	5/5
(positif)	75 (0,5 x LD)	4/5
	37,5 (0,25 x LD)	1/5
	450 (4,5 x LD)	5/5
	300 (3 x LD)	5/5
6. BALF	150 (1,5 x LD)	5/5
(positif)	100 (1 x LD)	5/5
* ′	75 (0,75 x LD)	4/5
	37,5 (0,375 x LD)	2/5
	450 (4,5 x LD)	5/5
7. BALF	300 (3 x LD)	5/5
(positif)	150 (1,5 x LD)	5/5

	100 (1 x LD)	5/5
	75 (0,75 x LD)	4/5
	37,5 (0,375 x LD)	2/5
Prélèvement oropharyngé (négatif)	0 (0 x LD)	0/5
BALF (négatif)	0 (0 x LD)	0/5

^{*} Les concentrations ont été établies par la PCR numérique. Cette concentration pourrait ne pas refléter exactement le nombre d'équivalents génomiques présents.

Validation d'autres systèmes PCR :

Les données présentées au tableau 7-4 ci-après ont été obtenues en diluant des échantillons cliniques que l'on sait positifs au SRAS-CoV-2 avec un prélèvement oropharyngé ou une matrice du liquide de lavage bronchoalvéolaire (BALF) négatif au SRAS-CoV-2, selon le cas. Les résultats démontrent que la limite de détection d'une *trousse de dépistage du SRAS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel à l'aide d'une sonde fluorescente* utilisée avec (i) le système PCR en temps réel rapide 7500 d'ABI, (ii) le système LightCycler 480 de Roche ou (iii) le système PCR en temps réel QuantStudio 5 est comparable à la limite de détection obtenue pour la première trousse lorsque celle-ci est utilisée avec le système PCR en temps réel 7500 d'Applied Biosystems PCR. La mini-trousse d'extraction ARN virale QIAamp (manuelle) a été utilisée lors de l'étape d'extraction du processus de validation.

Tableau 7-4. Données de validation pour des systèmes PCR supplémentaires

Numéro de l'échantillon et type	Concentration de SRAS-CoV-2 (copies/ml)*	Système PCR en temps réel rapide 7500 d'Applied Biosystems	Système LightCycler ^{MD} 480 de Roche	Système PCR en temps réel QuantStudio 5
	300 (2 x LD)**	5/5	5/5	5/5
1. Prélèvement	150 (1 x LD)	5/5	5/5	5/5
oropharyngé (positif)	100 (0,67 x LD)	5/5	5/5	5/5
(1)	75 (0,5 x LD)	3/5	5/5	4/5
	300 (2 x LD)	5/5	5/5	5/5
2. Prélèvement	150 (1 x LD)	5/5	5/5	5/5
oropharyngé (positif)	100 (0,67 x LD)	5/5	5/5	5/5
(Positii)	75 (0,5 x LD)	2/5	5/5	3/5
	300 (2 x LD)	5/5	5/5	5/5
3. Prélèvement	150 (1 x LD)	5/5	5/5	5/5
oropharyngé (positif)	100 (0,67x LD)	5/5	5/5	5/5
(Positii)	75 (0,5x LD)	5/5	4/5	4/5
	300 (3x LD)	5/5	5/5	5/5
	150 (1,5x LD)	5/5	5/5	5/5
4. BALF	100 (1x LD)	5/5	5/5	5/5
(positif)	75 (0,75x LD)	1/5	5/5	4/5

^{**} La limite de détection (LD) a été déterminée à l'aide de la mini-trousse d'extraction d'ARN virale QIAamp (voir le tableau 7-1).

5. BALF	300 (3x LD)	5/5	5/5	5/5
	150 (1,5 x LD)	5/5	5/5	5/5
(positif)	100 (1 x LD)	5/5	5/5	5/5
	75 (0,75 x LD)	5/5	5/5	5/5
Prélèvement oropharyngé (négatif)	0 (0 x LD)	0/5	0/5	0/5

^{*} Les concentrations ont été établies par la PCR numérique. Cette concentration pourrait ne pas refléter exactement le nombre d'équivalents génomiques présents.

Réactivité/inclusivité:

Analyse *in silico*: À l'heure actuelle, il n'existe pas différents isolats du SRAS-CoV-2 pouvant servir à la validation de la réactivité et de l'inclusivité de la trousse. L'inclusivité des amorces/sondes a donc été évaluée par l'analyse BLASTn en comparant les résultats obtenus avec 284 séquences de SRAS-CoV-2 disponibles au public le 10 mars 2020. L'amorce NPC1-YF22 et la sonde NPC1-P2 présentaient une homologie de 100 % avec toutes les séquences disponibles. L'amorce NPC1-YR21 présentait un seul mésappariement avec une séquence publiée (homologie de 96 %).

Étude complémentaire réalisée avec des échantillons cliniques prélevés sur des patients : En plus de l'analyse *in silico*, dix échantillons provenant de différentes régions de Chine et confirmés comme étant positifs au SRAS-CoV-2 sur la base de critères cliniques ont été utilisés pour valider la limite inférieure de détection. La concentration de SRAS-CoV-2 dans chaque échantillon a été estimée par la méthode ddPCR. De plus, chaque échantillon a été dilué à des concentrations estimées à 5 x 10³ copies/ml et 100 copies/ml (concentration de la limite de détection) et testé dans dix réplicats afin d'évaluer la reproductibilité du test. Le coefficient de variation (CV) des valeurs Ct à une concentration de 5 x 10³ copies/ml était inférieur à 5 %. Le tableau 8 ci-après résume les résultats.

Tableau 8. Essais de réactivité et d'inclusivité

		Résultats d'essais				
		Reproductibilité			Limite de détection	
	Concentration (copies/ml)	Concentration d'échantillons dilués (copies/ml)	Taux de détection	CV	Concentration d'échantillons dilués (copies/ml)	Taux de détection
BALF 3	$1,15 \times 10^{5}$	5×10^3	100 %	0,32 %	100	100 %
BALF 4	$7,13 \times 10^4$	5×10^3	100 %	0,48 %	100	100 %
BALF 5	$9,49 \times 10^{4}$	5×10^3	100 %	0,52 %	100	100 %
BALF 6	$4,45 \times 10^{3}$	5×10^3	100 %	0,66 %	100	100 %

^{**} La limite de détection a été déterminée à l'aide de la mini-trousse d'extraction d'ARN virale QIAamp (voir le tableau 7-1).

BALF 1	$1,25 \times 10^{4}$	5×10^3	100 %	0,74 %	100	100 %
BALF 7	$5,25 \times 10^{4}$	5×10^3	100 %	0,99 %	100	100 %
Prélèv. oropharyngé 1	$1,33 \times 10^{4}$	5×10^3	100 %	0,51 %	100	90 %
Prélèv. oropharyngé 2	$6,88 \times 10^{3}$	5×10^3	100 %	0,46 %	100	100 %
BALF 2	$1,55 \times 10^{4}$	5×10^3	100 %	1,12 %	100	100 %
BALF 8	$8,89 \times 10^{4}$	5×10^3	100 %	0,87 %	100	100 %

^{*}Remarque : Cette concentration pourrait ne pas refléter exactement le nombre de copies génomiques équivalentes par ml (GEC/ml) de l'ARN virale des échantillons.

Spécificité/réactivité croisée :

Les 58 agents pathogènes répertoriés dans le tableau 9 ci-après ont été testés en milieu humide avec la *trousse de dépistage du SRAS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel à l'aide d'une sonde fluorescente* pour déterminer leur réactivité croisée. Aucun faux positif n'a été observé.

Tableau 9. Agents pathogènes testés dans l'évaluation de la réactivité croisée

Nº	Agent pathogène	Fournisseur	Concentration testée
1	Virus grippal A (H1N1) (2009)		8×10^7 copies/ml
2	Virus grippal H1N1 saisonnier		1.8×10^7 copies/ml
3	Virus grippal A (H3N2)	National Institutes for	1.2×10^7 copies/ml
4	Virus grippal A (H5N1)	Food and Drug Control (République	4.3×10^5 copies/ml
5	Virus grippal A (H7N9)	populaire de Chine)	6.2×10^5 copies/ml
6	Virus grippal B (Yamagata)		2.1×10^5 copies/ml
7	Virus grippal B (Victoria)		2.0×10^7 copies/ml
8	Virus respiratoire syncytial A		5.3×10^5 copies/ml
9	Virus respiratoire syncytial B	National Institutes for	$1,2 \times 10^6$ copies/ml
10	Virus paragrippal 1	Food and Drug Control (République	7.1×10^5 copies/ml
11	Virus paragrippal 2	populaire de Chine)	3.9×10^5 copies/ml
12	Virus paragrippal 3		1.8×10^6 copies/ml
13	Rhinovirus A	BGI Biotechnology	> 10 ⁵ copies/ml
14	Rhinovirus B	(Wuhan) Co., Ltd	> 10 ⁵ copies/ml

15	Rhinovirus C		> 10 ⁵ copies/ml
16	Adénovirus de type 1		> 10 ⁵ copies/ml
17	Adénovirus de type 2		> 10 ⁵ copies/ml
18	Adénovirus de type 3		> 10 ⁵ copies/ml
19	Adénovirus de type 4		> 10 ⁵ copies/ml
20	Adénovirus de type 5		> 10 ⁵ copies/ml
21	Adénovirus de type 7		> 10 ⁵ copies/ml
22	Adénovirus de type 55		> 10 ⁵ copies/ml
23	Entérovirus A		$2,2 \times 10^5$ copies/ml
24	Entérovirus B	National Institutes for Food and Drug	6.2×10^5 copies/ml
25	Entérovirus C	Control (République populaire de Chine)	4.2×10^5 copies/ml
26	Entérovirus D	populaire de Cilille)	3.7×10^5 copies/ml
27	Métapneumovirus humain (hMPV)	BGI Biotechnology (Wuhan) Co., Ltd	> 10 ⁵ copies/ml
28	Virus d'Epstein-Barr	National Institutes for	$1,6 \times 10^6$ copies/ml
29	Virus de la rougeole	Food and Drug Control (République	4.8×10^5 copies/ml
30	Cytomégalovirus	populaire de Chine)	5.1×10^5 copies/ml
31	Rotavirus		> 10 ⁵ copies/ml
32	Norovirus	BGI Biotechnology (Wuhan) Co., Ltd	> 10 ⁵ copies/ml
33	Virus des oreillons		> 10 ⁵ copies/ml
34	Virus de la varicelle et du zona	Beijing Union Medical College Hospital	2.7×10^5 copies/ml
35	Coronavirus humain endémique (HKU1)		$1,5 \times 10^5$ copies/ml
36	Coronavirus humain endémique (OC43)		1.1×10^5 copies/ml
37	Coronavirus humain endémique (NL63)	BGI Biotechnology	1.0×10^6 copies/ml
38	Coronavirus humain endémique (229E)	(Wuhan) Co., Ltd	3.8×10^5 copies/ml
39	Coronavirus du SRAS		1.7×10^5 copies/ml
40	Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV)		2.1×10^5 copies/ml

41	Mycoplasma pneumoniae		> 10 ⁶ CFU/ml
42	Chlamydia pneumoniae		> 10 ⁶ CFU/ml
43	Légionelle	National Institutes for Food and Drug Control (République populaire de Chine)	5,4 × 10 ⁸ CFU/ml
44	Coqueluche	BGI Biotechnology (Wuhan) Co., Ltd	> 10 ⁶ CFU/ml
45	Haemophilus influenzae		$5.0 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$
46	Staphylococcus aureus		$2.3 \times 10^9 \text{ CFU/ml}$
47	Streptococcus pneumoniae	National Institutes for Food and Drug	$1 \times 10^7 \text{CFU/ml}$
48	Streptococcus pyogenes	Control (République	$2.2 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$
49	Klebsiella pneumoniae	populaire de Chine)	$1.8 \times 10^8 \text{CFU/ml}$
50	Souche atténuée de Mycobacterium tuberculosis		$3.1 \times 10^6 \text{CFU/ml}$
51	Aspergillus fumigatus	Beijing Union Medical College Hospital	$1.9 \times 10^6 \text{CFU/ml}$
52	Candida albicans	National Institutes for Food and Drug	$4 \times 10^6 \text{CFU/ml}$
53	Candida glabrata	Control (République populaire de Chine)	$9.6 \times 10^6 \text{CFU/ml}$
54	Cryptococcus neoformans	Beijing Union Medical College Hospital	$2.3 \times 10^7 \text{CFU/ml}$
55	Métapneumovirus humain (hMPV)	BGI Biotechnology (Wuhan) Co., Ltd	> 10 ⁵ copies/ml
56	Pneumocystis jiroveci (PJP)	BGI Biotechnology (Wuhan) Co., Ltd	$2.8 \times 10^6 \text{CFU/ml}$
57	Génome humain	BGI Biotechnology (Wuhan) Co., Ltd	/
58	Staphylococcus epidermidis	Wuhan BGI Clinical Laboratory Co.,Ltd.	1.86×108CFU/mL
59	Staphylococcus salivaris	Wuhan BGI Clinical Laboratory Co.,Ltd.	2.31×107 CFU/mL

L'analyse in silico des amorces et des sondes de la trousse de dépistage du SRAS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel à l'aide d'une sonde fluorescente par rapport aux séquences de 48 agents pathogènes a montré que la trousse serait spécifique au gène cible du SRAS-CoV-2 et ne présenterait pas de réaction croisée avec ces agents pathogènes. Bien que l'une des amorces présente une homologie de séquences supérieure ou égale à 80 % avec certains agents pathogènes, tels que des espèces de bacille, Bacteroidetes et le virus grippal A, le potentiel d'amplification exponentielle a été jugé faible.

Cinq micro-organismes (coronavirus du SRAS, Adénoviridae, virus grippal A, bacille et *Bacteroidetes*) sur les 48 testés présentaient une homologie ≥ 80 % avec l'une des amorces. Des tests en milieu humide ont confirmé l'absence de réactivité croisée avec le coronavirus du SRAS, les Adénoviridae et le virus grippal A.

Pour ce qui est du bacille et de *Bacteroidetes*, on a trouvé des séquences qui présentaient une homologie ≥ 80 % avec l'une des amorces du SRAS-CoV-2, mais pas avec les autres amorces comprises dans la trousse. Une réaction croisée ou une interférence avec la trousse due à la présence de ces organismes est donc peu probable.

Une étude a été réalisée pour évaluer le risque d'interférence avec la *trousse de dépistage du SRAS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel à l'aide d'une sonde fluorescente* due à la présence de concentrations élevées d'ARNm β-actine humaine. Aucune interférence n'a été observée en présence d'une quantité de copies du produit de la transcription de contrôle interne de β-actine allant jusqu'à 1,76E+09, niveau le plus élevé testé (voir le tableau 10). La concentration moyenne d'ARN de β-actine dans les prélèvements oropharyngés a été estimée à environ 4,65E+05 copies/ml par la PCR numérique.

Tableau 10. Effet d'une concentration élevée de bêta-actine humaine sur la détection du SRAS-CoV-2

Bêta-actine humaine (copies/ml)	Pseudovirus (copies/ml)	Valeur Ct – canal FAM (virus)	Valeur Ct – canal FAM (virus) moyenne	Valeur Ct – canal VIC (bêta-actine)	Valeur Ct – canal VIC (bêta-actine) moyenne
		35,44		11,34	
		35,06		11,31	
1,76E+09	200	35,5	35,35	11,32	11,33
		35,47		11,3	
		35,29		11,37	
		33,77		14,57	
		33,46	33,46 14,44 33,3 33,49 14,48 33,24 14,48 33,68 14,57	14,44	14,51
1,76E+08	200	33,3		14,48	
		33,24		14,48	
		33,68		14,57	
		33,34		17,91	
		33,17		17,92	17,89
1,76E+07	200	33,55		17,92	
		32,67		17,88	
		33,04		17,84	
		32,92			
augung	200	33,07	33,11	/	,
aucune	200	33,23		/	/
		33,14			

	33,19			
échantillons négatifs sans virus ajouté	négatif	/	22,5	/

Performance clinique:

Une étude rétrospective a été menée sur 384 échantillons cliniques recueillis par le National Institute for Viral Disease Control and Prevention sous la surveillance du Chinese Center for Disease Control and prevention (CDC) de Chine, du CDC de Wuhan et des laboratoires cliniques de BGI à Wuhan, Tianjin et Shenzhen. Ils comprenaient des prélèvements oropharyngés et du liquide de lavage bronchoalvéolaire (BALF) (voir le tableau 11).

Tableau 11. Résumé des échantillons testés dans l'évaluation clinique, par type

	Cas		
_	positifs	négatifs	totaux
BALF	58	165	223
Prélèvement oropharyngé	34	67	101
ARN de BALF	34	26	60
Total	126	258	384

Critères de diagnostic clinique (détermination de l'état du patient) :

Critère 1. Quatorze jours avant le début de la maladie, le patient : i) a voyagé ou résidé dans des zones touchées, ii) a été en contact avec un patient présentant de la fièvre et des symptômes respiratoires, ou iii) a été exposé à un groupe de patients atteints de la COVID-19.

Critère 2. Le tableau clinique se présente comme suit : i) le patient a de la fièvre, ii) les images thoraciques du patient montrent de multiples marbrures, une consolidation ou des opacités ayant un aspect de « verre dépoli », ou iii) le patient présente une leucopénie ou une lymphopénie.

Critère 3. Le test en laboratoire des expectorations, des prélèvements oropharyngés ou des échantillons prélevés dans les voies respiratoires inférieures pour détecter le SRAS-CoV-2 donne un résultat positif. La procédure de détection du SRAS-CoV-2 en laboratoire consiste à mener une détection par RT-PCR et un séquençage viral montrant une homologie élevée avec la séquence connue du SRAS-CoV-2.

*L'état clinique d'un patient est considéré comme positif si ces trois critères sont réunis.

Sommaire des résultats :

Au total, 384 échantillons ont été prélevés et analysés dans le cadre de l'étude visant à évaluer l'efficacité de détection du SRAS-CoV-2 de la *trousse de dépistage du SRAS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel à l'aide d'une sonde fluorescente* dans des prélèvements oropharyngés, du liquide de lavage bronchoalvéolaire (BALF) et de l'ARN extraite obtenus du National Institute for Viral Disease Control and Prevention sous la surveillance du Chinese Center for Disease Control and prevention de Chine. Par rapport au diagnostic clinique de la COVID-19, la RT-PCR du SRAS-CoV-2 a montré, pour tous les échantillons, une concordance globale positive et négative de 88,1 % (intervalle de confiance [IC] à 95 % : entre 81,2 % et 92,7 %) et de 99,6 % (IC à 95 % : entre 97,8 % et 99,9 %) respectivement. Voir le tableau 12 ci-après pour un sommaire des résultats cliniques.

Tableau 12. Sommaire des résultats cliniques

BALF	Diagnostic positif	Diagnostic négatif	Total
Test positif	47	0	47
Test négatif	11	165	176
Total	58	165	223
CP (concordance positive)	81,0 %	Entre 69,1 et 89,1 %	
CN (concordance négative)	100 %	Entre 97,7 et 100 %	
Prélèvement oropharyngé	Diagnostic positif	Diagnostic négatif	Total
Test positif	31	0	31
Test négatif	3	67	70
Total	34	67	101
CP (concordance positive)	91,2 %	Entre 77,0 et 97,0 %	
CN (concordance négative)	100 %	Entre 94,6 et 100 %	
ARN	Diagnostic positif	Diagnostic négatif	Total
Test positif	33	1	34
Test négatif	1	25	26
		2.6	CO
Total	34	26	60
Ü	34	26	60
Ü	97,1 %	Entre 85,1 et 99,5 %	60

Résultats combinés	Diagnostic positif	Diagnostic négatif	Total
Test positif	111	1	112
Test négatif	15	257	272
Total	126	258	384

CP (concordance positive)	88,1 %	Entre 81,2 et 92,7 %
CN (concordance négative)	99.6 %	Entre 97 8 et 99 9 %

Symboles utilisés par le fabricant

IVD	DISPOSITIF MÉDICAL DE DIAGNOSTIC IN VITRO
	FABRICANT
	DATE DE PÉREMPTION
LOT	CODE DE LOT
~~ /	DATE DE FABRICATION
REF	NUMÉRO DE CATALOGUE
<u> </u>	MISE EN GARDE
-18°C	LIMITE SUPÉRIEURE DE TEMPÉRATURE
[]i	CONSULTER LA NOTICE D'UTILISATION
类	NE PAS EXPOSER AU SOLEIL
	GARDER AU SEC
2	NE PAS RÉUTILISER
control +	CONTRÔLE POSITIF
Σ	CONTENU SUFFISANT POUR N TESTS

Références

- 1. LU Rou-jian, ZHANG Ling-lin, TAN Wen-jie, ZHOU Wei-min, WANG Zhong, PENG Kun et RUAN Li. Development and Comparison of Real-Time and Conventional RT-PCR Assay for Detection of Human Coronavirus NL63 and HKU1[J]. CHINESE JOURNAL OF VIROLOGY, 2008(4).
- 2. NIU P, LU R, LAN J, LIU G, WANG W et TAN W. Development of Novel Multiplex Real-time RT-PCR Assays for Detection of MERS-CoV Infection[J]. CHINESE JOURNAL OF VIROLOGY, 2016(3).
- 3. CHEN Yu-jing. Development of two-panel reactions of real-time PCR for detection of 18 types/subtypes of respiratory viruses [D]. 2015

Coordonnées and soutien technique

Pour obtenir un soutien technique ou une assistance relative aux produits, veuillez communiquer avec BGI Europe A/S directement :

Ligne d'assistance téléphonique : 0045-80300800/ 0045-70260806

Site Web de l'assistance produit : https://www.bgi.com/global/molecular-genetics/2019-ncov-detection-kit/ (en anglais seulement).

Historique des modifications

Nº de version avant la modification	Sommaire des modifications	Modifié par	Date de publication
V1	 Ajout du numéro de version et du numéro de catalogue. Révision de la section concernant la conservation, la manipulation et la stabilité du réactif pour lire « Éviter les cycles répétés de congélation-décongélation. Ne pas congeler-décongeler la trousse plus de 4 fois. » au lieu de dire qu'il faut éviter de faire subir aux trousses déballées des cycles répétés de congélation-décongélation (4 fois). Ajout de précisions concernant le milieu de prélèvement des échantillons compatible et le type d'écouvillon recommandé pour les prélèvements oropharyngés. Ajout d'information sur le PJP et le MPVh. Suppression de toutes les références et de toute phraséologie propres à la réglementation du Secrétariat américain aux produits alimentaires et pharmaceutiques (FDA), y compris l'usage prévu de la trousse. Ajout du symbole du fabricant à côté de l'adresse de l'installation de fabrication et d'un tableau expliquant tous les symboles requis. 	Pan Zhang	2020-04-28
V2	1. Révision de la durée de conservation à 6 mois pour être cohérent avec les produits enregistrés auprès de la National Medical Products Administration (NMPA).	Pan Zhang	2020-05-04

	2. Suppression des sections relatives aux conditions d'autorisation pour le laboratoire et aux limites d'utilisation.		
V3	1. Ajout de la section « Limites d'utilisation » en supprimant la première phrase, laquelle précisait que l'utilisation de la trousse pour effectuer un diagnostic <i>in vitro</i> en vertu de l'arrêté d'urgence dans le cadre de la COVID-19 est réservée aux laboratoires qui mènent des analyses de grande complexité.	Xiaoyun CHEN	2020-05-09
	2. Ajout de l'information sur les installations de fabrication.3. Ajout de l'information sur les révisions, y compris la date de révision.		
	y compris la date de l'evision.		
V4	Remplacement du fabricant : BGI Genomics Co., Ltd devient BGI Europe A/S. Modification du numéro de la ligne d'assistance technique en conséquence. Correction de toutes les pages de section pour s'assurer que le saut de page est	Xiaoyun CHEN	2020-05-30
	correctement inséré.		
V5	Ajout des limites d'utilisation	Xiaoyun CHEN	2021-01-06
V6	Ajout des nouveaux résultats de l'étude de réactivité croisée.	Xiaoyun CHEN	2021-08-30
V7	Prolonger la durée de conservation du kit à 12 mois.	Xiaoyun CHEN	2022-10-20
V8	Modifications dans le page 1, le page 24 (partie 6), procédures de laboratoire, et limites d'utilisation par lettre de demande de Santé Canada le 3 mars et 8 mars, 2023.	Ali Alavian Ghavanini	2023-03-08