

IVD

Notice d'utilisation (français)

1 Utilisation prévue

L'ampliCube Coronavirus Panel est un test in vitro qualitatif pour la détection spécifique de l'ARN du coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV), de l'ARN du nouveau SARS-CoV-2, du SARS-CoV et du Bat SARS-like CoV, ainsi que de l'ARN des coronavirus humains (HCoV) (NL63, OC43, 229E, HKU1) dans des expectorations, frottis, liquides de LBA (lavage bronchoalvéolaire), sécrétions trachéales ou selles d'origine humaine.

2 Domaine d'application

Le coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV) et les coronavirus humains (HCoV) des espèces NL63, OC43, 229E et HKU1 font partie de la famille des *Coronaviridae* et sont des agents pathogènes importants qui provoquent des infections respiratoires légères, voire même un syndrome respiratoire aigu sévère. Environ un tiers des affections liées à un rhume sont provoquées par des HCoV, et la diarrhée est un symptôme associé fréquent. Le MERS-CoV est responsable du syndrome respiratoire du Moyen-Orient qui se manifeste par une maladie respiratoire aiguë, d'allure grippale et d'évolution souvent sévère avec pneumonie et détresse respiratoire. Lors du diagnostic différentiel, le MERS-CoV doit en particulier être envisagé en présence d'un contact avec des personnes infectées par le MERS-CoV dans un pays de la péninsule arabe dans les 2 semaines précédant le début de la maladie.

Les coronavirus du SARS tels que SARS-CoV-2 (agent étiologique de la pandémie COVID-19) se propagent d'homme à homme principalement par des gouttelettes dans l'air expiré. Les symptômes peuvent aller de la fièvre, la toux et les troubles respiratoires à la pneumonie et au syndrome respiratoire aigu et, finalement, à la mort chez les personnes présentant des comorbidités.

L'ampliCube Coronavirus Panel est utilisé pour détecter et différencier les MERS-CoV, SARS-CoV (en particulier le SARS-CoV-2) et les HCoV.

3 Principe du test

Ce test est un système de RT-PCR Real Time (en temps réel) (RT = transcriptase inverse). Il utilise des amorces spécifiques et des sondes marquées pour la transcription de l'ARN en ADNc, l'amplification et la détection de l'ARN des MERS-CoV, SARS-CoV-2, SARS-CoV, Bat SARS-like CoV et HCoV (NL63, OC43, 229E, HKU1).

Afin de s'assurer que les acides nucléiques isolés de l'échantillon du patient ne contiennent pas de substances inhibant la RT-PCR, un contrôle interne (IC) est ajouté à l'échantillon pendant l'isolement des acides nucléiques. Ce IC est transcrit en ADNc, amplifié et détecté dans la même préparation de PCR. Ceci permet d'exclure les faux négatifs dus à une inhibition de la réaction RT-PCR. Le IC sert en même temps à prouver que les acides nucléiques ont été extraits de l'échantillon du patient.

Les sondes pour la détection spécifique des acides nucléiques spécifiques de l'agent pathogène sont marquées avec les fluorochromes émetteurs (reporter) FAM (SARS-CoV : E-Gen) et HEX (SARS-CoV-2, SARS-CoV, Bat SARS-like CoV) et ATTO Rho 12 (HCoV) et les sondes pour la détection du contrôle interne, avec ATTO 647N. Ceci permet une détection simultanée de toutes les séquences cibles dans un mélange réactionnel.

La valeur Ct (*cycle threshold*) décrit la partie de la courbe où la fluorescence augmente pour la première fois de manière exponentielle au-dessus du bruit de fond.

4 Réactifs

4.1 Contenu de l'emballage

Les réactifs fournis suffisent à effectuer 50 analyses. Chaque lot de réactifs contient :

P&P MIX	150 µl de mélange amorce-échantillon pour MERS-CoV, SARS-CoV, HCoV et contrôle interne (couvercle vert)
ENZYME	600 µl de mélange d'enzymes (couvercle blanc) Contient de la transcriptase inverse et de l'ADN-polymérase. (Le composant est coloré en bleu.)
CONTROL INT	250 µl de contrôle interne (couvercle incolore)
CONTROL +	170 µl de contrôle positif (couvercle rouge)

CONTROL -	2 x 1800 µl de contrôle négatif (couvercle bleu)
INSTRU	1 notice d'utilisation

4.2 Réactifs, matériel et appareils supplémentaires requis

- En fonction du thermocycleur de PCR en temps réel utilisé, MIKROGEN fournit divers réactifs de compensation de couleur : MIKROGEN ampliCube Color Compensation (LightCycler® 480 II [Roche] réf. 50502), MIKROGEN ampliCube Color Compensation (analyseur cobas z 480 [Roche] réf. 50503) ou le kit de compensation de couleur pour le système CFX96 (Bio-Rad, réf. 50505). En cas de traitement sur le thermocycleur PCR Mic (bms), MIKROGEN fournit des matrices Mic.
- Extraction d'acide nucléique : les systèmes d'extraction nucléique suivants sont recommandés : système MagNA Pure®, kit Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche) ou kit alphaClean Mag RNA/DNA (MIKROGEN) avec traitement sur un extracteur M32, M48 ou M96 (Biocomma)
- Thermocycleur en temps réel : LightCycler® 480 II (Roche), analyseur cobas z 480 (Roche), CFX96 (Bio-Rad), QuantStudio 5 (Applied Biosystems), Mic (bms), Rotor-Gene Q (Qiagen)
- Plaques de PCR à 96 puits et films : tenir compte des recommandations du fabricant de cycleur de PCR en temps réel
- Micropipettes avec embouts jetables à filtre 10 µl, 20 µl, 100 µl et 1000 µl
- Mélangeur à vortex à haute vitesse de rotation (recommandée : 3200 t/min)
- Minicentrifugeuse
- Éventuellement centrifugeuse pour plaques
- PBS ou H₂O (niveau PCR) en cas d'utilisation d'écouvillons floqués en fibre de nylon sans milieu de transport
- Gants à usage unique, non poudrés
- Bloc réfrigérant

5 Durée de conservation et manipulation

- Avant et après utilisation, conserver les réactifs entre -25 °C et -18 °C.
- Une décongélation et une congélation répétée des composants (plus de dix fois) doivent être évitées. Un aliquotage des composants du test est recommandé après la première décongélation.
- Toujours réfrigérer correctement les réactifs pendant les étapes de travail (+2 °C à +8 °C).
- Protéger tous les composants du kit de la lumière directe du soleil tout au long de la réalisation du test.
- Avant le début du test, décongeler complètement, mélanger (vortexer brièvement) et centrifuger tous les réactifs.
- Une date de péremption est indiquée sur les emballages. Au-delà de cette date, la qualité du produit n'est plus garantie.
- Le test ne doit être réalisé que par des professionnels spécialement formés et agréés.
- En cas de modification substantielle du produit ou de non-respect des consignes par l'utilisateur, l'application peut sortir du cadre d'utilisation prévue de MIKROGEN.
- Une contamination croisée peut fausser les résultats des tests. Ajouter avec précaution les échantillons du patient et les contrôles. Veiller à ce que les mélanges réactionnels ne se répandent pas dans d'autres puits.

6 Avertissements et consignes de sécurité

- À utiliser uniquement pour le diagnostic *in vitro*.
- Tous les réactifs et matériels entrant en contact avec des échantillons potentiellement infectieux doivent être manipulés comme tels.
- Porter des gants à usage unique appropriés durant toute la procédure de test.
- Tous les réactifs et matériels entrant en contact avec des échantillons potentiellement infectieux doivent être traités avec des désinfectants appropriés ou éliminés conformément aux règles d'hygiène en vigueur. Les indications de concentration et les durées d'incubation du fabricant doivent être respectées.
- Ne jamais remplacer les réactifs ni les mélanger avec des réactifs d'autres lots, d'autres kits de PCR MIKROGEN ou avec des réactifs d'autres fabricants.

- ⚠ Avant de réaliser le test, lire l'intégralité de la notice d'utilisation et suivre scrupuleusement les instructions. Les écarts au protocole de test décrit dans la notice d'utilisation peuvent fausser les résultats.

7 Prélèvement d'échantillons et préparation des réactifs

7.1 Échantillons

Le produit de départ pour l'amplicube Coronavirus Panel est l'ARN extrait d'expectorations, de frottis, de liquide de LBA, de sécrétions trachéales ou de selles d'origine humaine. La qualité de la préparation d'acides nucléiques influence le résultat du test. Il faut s'assurer que la méthode d'extraction choisie est compatible avec la technologie PCR en temps réel.

7.1.1 Préparation des échantillons

En cas d'utilisation d'un écouvillon floqué en fibre de nylon sans milieu de transport :

1. Incuber l'écouvillon dans 0,5 ml de PBS (en cas d'extraction à l'aide du système MagNA Pure®) ou dans 0,5 ml de H₂O (en cas d'extraction à l'aide du kit *alpha*Clean Mag RNA/DNA) pendant 5 min à température ambiante.
2. Éliminer l'écouvillon et utiliser la suspension de PBS ou H₂O pour l'extraction d'acide nucléique.

7.2 Extraction des acides nucléiques

Procéder à l'extraction des acides nucléiques de l'échantillon du patient et du contrôle négatif (CN). Nous recommandons un volume d'extraction initial de 200 µl et un volume d'éluat de 50 µl ou 100 µl selon le système d'extraction. Des extractions (système MagNA Pure® [Roche] de 400 µl de produit de départ élué dans 100 µl ont montré des résultats comparables. Suivre les instructions du fabricant du kit d'extraction.

1. Décongeler le contrôle interne (IC) (couvercle incolore) et le contrôle négatif (CN) (couvercle bleu).
S'assurer que le IC et le CN sont complètement décongelés. Avant l'emploi, mélanger brièvement le IC et le CN au vortex et par centrifugation !
2. Lors de l'extraction, ajouter 5 µl de IC à chaque échantillon du patient et au CN. Le IC doit être ajouté au mélange tampon de lyse de l'échantillon et non directement aux échantillons.
3. Procéder à l'extraction des échantillons du patient et du CN. (Remarque : le CN ne peut pas être utilisé sans extraction dans la PCR !)
4. Le contrôle positif n'est pas extrait.

Le système d'extraction des acides nucléiques suivant est recommandé et a été utilisé pour l'évaluation de la performance :

Système d'extraction	Volume d'échantillon	Volume d'éluat
MagNA Pure® 24 (Roche) Total NA Isolation Kit	200 µl	50 µl
Système d'extraction d'acide nucléique M96 (biocomma) Kit <i>alpha</i> Clean Mag RNA/DNA (MIKROGEN)	200 µl	100 µl

Si l'utilisateur désire utiliser d'autres méthodes d'extraction, il lui est recommandé de contacter le fabricant afin de s'assurer de la compatibilité.

7.3 Préparation du mastermix

1. Décongeler le mélange amorce-échantillon (couvercle vert) et le mélange d'enzymes (couvercle blanc), en les protégeant de la lumière.
S'assurer que les réactifs sont complètement décongelés. Avant l'emploi, mélanger les réactifs au vortex et centrifuger brièvement !
2. Préparer le mastermix selon le schéma de pipetage suivant :

Composants	Mastermix pour 1 réaction
Mélange amorce-échantillon	3 µl
Mélange d'enzymes	12 µl
Volume total	15 µl

3. Mélanger le mastermix complet au vortex et centrifuger brièvement.
4. Utiliser 15 µl de mastermix pour chaque réaction de PCR.


7.4 Préparation de la réaction de RT-PCR


1. Décongeler le contrôle positif (PC) (couvercle rouge).
S'assurer que les réactifs sont complètement décongelés. Avant l'emploi, mélanger les réactifs au vortex et centrifuger brièvement !

Composants	1 réaction
Mastermix de 7.3	15 µl
Éluat d'échantillon ou éluat de CN ou de CP	10 µl

2. Pipeter 10 µl de chaque éluat d'échantillon dans 15 µl de mastermix.
3. Pipeter 10 µl de contrôle positif (non préparé) dans 15 µl de mastermix.
4. Pipeter 10 µl d'éluat du contrôle négatif dans 15 µl de mastermix.

Chaque test doit contenir un contrôle positif et un contrôle négatif ! Fermer la plaque PCR avec un film adhésif optique ou fermer le tube avec le couvercle prévu.

 **Les plaques PCR ou les tubes doivent être passés au vortex pendant au moins 5 secondes à vitesse maximale, puis centrifugés brièvement.**

 **Les tubes à réaction PCR pour le cycleur de PCR Mic doivent être passés au vortex à vitesse maximale pendant au moins 10 secondes.**

8 Programmation du thermocycleur en temps réel

L'amplicube Coronavirus Panel a été évalué sur le système LightCycler® 480 Instrument II (Roche) et validé sur les analyseurs cobas z 480 (Roche), CFX96 (Bio-Rad), QuantStudio 5 (Applied Biosystems), Mic (bms) et Rotor-Gene Q (Qiagen).

8.1 Réglage des canaux de détection

LightCycler® 480 II (Roche)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS-like CoV	HCoV	Contrôle interne (IC)
Couleur	vert	jaune	orange	rouge
Fluorochrome émetteur	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Stimulation	465 nm	533 nm	533 nm	618 nm
Émission	510 nm	580 nm	610 nm	660 nm

Avec le LightCycler® 480 Instrument II (Roche), il est nécessaire d'exécuter auparavant une compensation de couleur (réf. 50502) avec le kit mis à disposition par MIKROGEN.

Analyseur cobas z 480 (Roche)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS-like CoV	HCoV	Contrôle interne (IC)
Couleur	vert	jaune	orange	rouge
Fluorochrome émetteur	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Stimulation	465 nm	540 nm	540 nm	610 nm
Émission	510 nm	580 nm	610 nm	670 nm

Avec l'analyseur cobas z 480 (Roche), il est nécessaire d'exécuter auparavant une compensation de couleur (réf. 50503) avec le kit mis à disposition par MIKROGEN.

CFX96 (Bio-Rad)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Contrôle interne (IC)
Couleur	vert	jaune	orange	rouge
Fluorochrome émetteur	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Mode	Tous canaux			

L'acquisition et l'analyse des données sur le système CFX96 se fait selon la méthode *calc / data acquisition mode: all channels*. Un étalonnage du kit CFX96 (Bio-Rad) doit avoir lieu au préalable pour ATTO Rho12 et ATTO 647N. MIKROGEN fournit le kit de compensation de couleur requis (CFX96 [Bio-Rad], réf. 50505).

QuantStudio 5 (Applied Biosystems)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Contrôle interne (IC)
Couleur	vert	jaune	orange	rouge
Fluorochrome émetteur	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Stimulation	X1 / 470 nm	X2 / 520 nm	X4 / 580 nm	X5 / 640 nm
Émission	M1 / 520 nm	M2 / 558 nm	M4 / 623 nm	M5 / 682 nm
Fluorochrome suppresseur	[aucun]	[aucun]	[aucun]	[aucun]

Sous « Settings » (Paramètres), choisir 1. « Run mode » (Mode de fonctionnement) « standard » (standard), 2. « Reference dye » (Colorant de référence) « none » (aucun), 3. « Experiment type » (Type d'expérience) « custom » (personnalisé).

Mic (bms)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Contrôle interne (IC)
Couleur	vert	jaune	orange	rouge

MIKROGEN vous fournit des matrices Mic validées pour le traitement. Prière de n'utiliser que les matrices Mic MIKROGEN. Les matrices Mic MIKROGEN actuelles sont disponibles sur la page d'accueil de MIKROGEN (www.mikrogen.de) en téléchargement libre.

Rotor-Gene Q (Qiagen)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Contrôle interne (IC)
Couleur	vert	jaune	orange	rouge
Fluorochrome émetteur	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Stimulation	470 nm	530 nm	585 nm	625 nm
Émission	510 nm	555 nm	610 nm	660 nm
Récupération	5	5	5	5

8.2 Programme PCR

Transcription inverse	50 °C	8 min
Dénaturation	95 °C	3 min
Amplification	45 cycles	
• Dénaturation	95 °C	10 s
• Hybridation/Élongation	60 °C	45 s

Les informations de base sur la programmation des différents thermocycleurs en temps réel figurent dans le mode d'emploi du thermocycleur utilisé. Pour obtenir des informations spécifiques sur la programmation du thermocycleur PCR en temps réel lors de l'utilisation de l'ampliCube Coronavirus Panel, prière de contacter le fabricant.

9 Résultats

L'évaluation des données sur le LightCycler® 480 II se fait avec la méthode *Abs Quant/2nd Derivative Max*.

9.1 Validation

- Le contrôle négatif doit se situer en dessous du *Threshold*. Le contrôle interne (IC) doit présenter une courbe positive dans le contrôle négatif. Si le contrôle négatif présente une courbe positive (contamination) ou si le IC dans le contrôle négatif n'est pas valide, le test n'est pas évaluable.
- Le contrôle positif doit présenter une courbe positive. La valeur Ct du contrôle positif doit être < 33. Un contrôle positif en dehors de cette zone indique l'existence d'un problème d'amplification.
- Le contrôle interne (IC) doit présenter une courbe positive pour les échantillons négatifs. Le signal du IC d'un échantillon de patient doit être comparé avec le signal du IC dans le contrôle négatif extrait. Une différence de > +3 pour la valeur Ct du CU d'un échantillon comparativement à celle du IC du contrôle négatif ou l'absence de signal de IC dans l'échantillon peuvent indiquer l'existence d'une inhibition significative de la réaction de RT-PCR. Dans ces cas, un résultat négatif du test n'est pas valide.

9.2 Évaluation

Les données peuvent être évaluées avec le logiciel du thermocycleur PCR correspondant ou avec une solution logicielle spéciale soutenue par MIKROGEN pour l'évaluation automatisée de la PCR et l'interprétation. En cas d'utilisation d'un système LightCycler® 480 II, l'analyse peut se faire selon la méthode *Abs Quant/2nd Derivative Max* (recommandée) ou la méthode *Abs Quant/Fit Points*. Contacter MIKROGEN pour obtenir de plus amples informations et connaître les instructions correspondantes.

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Contrôle interne (IC)	
Couleur	vert	jaune	orange	rouge	
Fluorochrome émet- teur	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N	
Évaluation avec	LightCycler 480 II	465-510	533-580	533-610	618-660
	cobas z 480	465-510	540-580	540-610	610-670
	CFX96	FAM	HEX	ROX	Cy5
	QuantStudio 5	FAM	VIC	ROX	ATTO 647N
	Mic	FAM	HEX	ROX	Cy5
Rotor-Gene Q	vert	jaune	orange	rouge	

Les signaux supérieurs au *Threshold* sont évalués comme des résultats positifs. Les champs vides dans le tableau sont des résultats négatifs.

Couleur	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Contrôle interne (IC)
vert	positif	---	---	---
jaune	---	positif	---	---
orange	---	---	positif	---
rouge	---	---	---	positif*

* En cas de signaux positifs dans les canaux de détection de l'agent pathogène, le signal du contrôle interne n'est pas nécessaire pour l'interprétation du test. Une charge élevée d'agents pathogènes dans l'échantillon du patient peut entraîner un signal réduit ou manquant pour le contrôle interne.

10 Limites de la méthode et restrictions

- Les résultats du test doivent toujours être interprétés en tenant compte du tableau clinique. Le résultat doit être mis en balance avec les données cliniques pour décider du traitement approprié.
- Un résultat négatif pour le MERS-CoV, SARS-CoV-2 / SARS-CoV / Bat SARS-like CoV ou les HCoV ne permet pas d'exclure une infection par l'agent pathogène respectif.

11 Caractéristiques

11.1 Sensibilité et spécificité diagnostiques

La sensibilité et la spécificité ont été déterminées à l'aide d'échantillons définis positifs et négatifs.

Tableau 1 : Échantillons définis positifs

ampliCube Coronavirus Panel	MERS-CoV (n=4)	SARS-CoV-2 (n=126)	HCoV (n=17)
Négatif	0	3	0
Positif	4	123	17
Sensibilité [%]	100	97,62	100
CI [%] Intervalle de confiance (angl. Confidence interval)	51,01 – 100	93,23 – 99,19	81,57 – 100

Tableau 2 : Échantillons définis négatifs

ampliCube Coronavirus Panel	MERS-CoV (n=24)	SARS-CoV-2 (n=490)	HCoV (n=24)
Négatif	24	486	24
Positif	0	4	0
Spécificité [%]	100	99,18	100
CI [%] Intervalle de confiance (angl. Confidence interval)	86,20 – 100	97,92 – 99,68	86,20 – 100

11.2 Sensibilité analytique

11.2.1 Seuil de détection (LoD) en copies/PCR

Le seuil de détection (LoD) de l'ampliCube Coronavirus Panel a été déterminé avec des séries de dilution d'ADN plasmidique gBlock de concentration connue sur un système LightCycler® 480 II (Roche). Le seuil de détection à 95 % a été déterminé au moyen de l'analyse de régression probit avec le logiciel CombiStats™ version 5.0 (Conseil de l'Europe). Puis la limite de détection a été confirmée avec 20 réplicats à la LoD.

Tableau 3a : Seuil de détection (LoD) pour le MERS et les HCoV en copies/PCR

	MERS-CoV	HCoV
LoD [copies/PCR] Seuil de détection à 95 %	4,14	12,41*
CI à 95 % [copies/PCR] Intervalle de confiance (angl. Confidence interval)	2,75 – 9,43	8,93 – 22,59

* Les données se rapportent à HCoV OC43, les HCoV 229E, NL63 et HKU1 ont été de plus testés. Les seuils de détection étaient compris entre 20,54 et 89,48.

Tableau 3b : Seuil de détection (LoD) pour les SARS-CoV-2/SARS-CoV/Bat SARS-like CoV en copies/PCR

	SARS-CoV-2	SARS-CoV	Bat SARS-like CoV
LoD [copies/PCR] Seuil de détection à 95 %	2,9	6,74	6,35
CI à 95 % [copies/PCR] Intervalle de confiance (angl. Confidence interval)	1,9 – 6,4	4,12 – 14,68	4,14 – 14,43

11.2.2 Seuil de détection (LoD) du SARS-CoV-2 en unités internationales

Par ailleurs, le seuil de détection des régions cibles du SARS-CoV-2 a été déterminé avec trois séries de dilution indépendantes (chacune à 7 niveaux de dilution) selon le standard OMS (premier standard international de l'OMS pour l'ARN SARS-CoV-2 [code NIBSC: 20/146]), y compris l'extraction d'acide nucléique (kit *alpha*Clean Mag RNA/DNA sur le système M96 Biocomma) sur un thermocycleur LightCycler® 480 II System (Roche), puis à l'aide d'une analyse de régression Probit consécutive (CombiStats™, version 6.0 Software [Conseil de l'Europe]). Le seuil de détection de l'ampliCube Coronavirus Panel est indiqué en unités internationales (UI) par µl (standard OMS utilisé).

Tableau 3c : Seuil de détection (LoD) pour le SARS-CoV-2 en UI/µl (standard OMS)

	SARS-CoV-2
LoD [UI/µl] Seuil de détection à 95 %	2,72
CI à 95 % [UI/µl] Intervalle de confiance (angl. Confidence interval)	1,53 – 6,55

11.3 Spécificité analytique

La recherche BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) montre que les amorces et sondes sélectionnées de l'ampliCube Coronavirus Panel détectent spécifiquement les agents pathogènes sélectionnés. De plus, la spécificité a été déterminée en analysant l'ADN/ARN génomique d'autres bactéries et virus pathogènes chez l'homme.

Tableau 4 : Bactéries et virus testés pour démontrer la spécificité analytique de l'ampliCube Coronavirus Panel.

Bactéries	Virus
<i>Bordetella holmesii</i>	Adénovirus A
<i>Bordetella parapertussis</i>	Cytomégalovirus
<i>Bordetella pertussis</i>	Entérovirus
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Virus d'Epstein-Barr
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Influenzavirus A
	Influenzavirus B
	Virus de la rougeole
	Virus des oreillons
	Virus parainfluenza
	Virus respiratoire syncytial (VRS) A
	Rhinovirus 58 (A)

Aucun de ces échantillons n'a présenté un signal positif. Les amorces et sondes utilisées dans l'ampliCube Coronavirus Panel n'ont pas présenté de réactions croisées avec les agents pathogènes énumérés dans le tableau 4. Le contrôle interne (IC) était valide dans tous les tests.

11.4 Équivalence de différents échantillons

Le coefficient de variation (CV) de la valeur Ct entre l'eau et l'extrait de l'échantillon respectif a été déterminé après ajout d'ADN plasmidique de concentration connue.

Tableau 5 : Équivalence de différents échantillons

	MERS-CoV	SARS-CoV-2	SARS-CoV	Bat SARS-like CoV	HCoV
CV [%] (LBA, H ₂ O)	1,37	2,11	1,62	2,21	0,58
CV [%] (expectorations, H ₂ O)	2,42	2,32	1,54	3,42	1,91
CV [%] (frottis, H ₂ O)	1,51	1,28	1,47	1,50	1,08
CV [%] (selles, H ₂ O)	1,94	1,33	1,28	1,98	0,85

Le coefficient de variation (CV), basé sur la valeur Ct (*cycle threshold*) entre l'eau et les extraits d'acides nucléiques (obtenus à partir de différents échantillons), était ≤ 3,42 % pour tous les gènes cibles.






12 Bibliographie

- L.-Y. Chang et al. (2006): Lack of Association between Infection with a Novel Human Coronavirus (HCoV), HCoV-NH, and Kawasaki Disease in Taiwan. *The Journal of Infectious Diseases*, Jan. 2006, 193:283-6, 0022-1899/2006/19302-0015\$15.00
- L. Louie et al. (2006): Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus in Stool Specimens by Commercially Available Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays. *Journal of Clinical Microbiology*, Nov. 2006, Vol. 44, No. 11, p. 4193-4193, doi:10.1128/JCM.01202-06
- F. Esper et al. (2005): Evidence of a Novel Human Coronavirus That Is Associated with Respiratory Tract Disease in Infants and Young Children. *The Journal of Infectious Diseases*, Feb. 2005, 191:492-8, 0022-1899/2005/19104-0002\$15.00
- F. Esper et al. (2010): Human coronaviruses are uncommon in patients with gastrointestinal illness. *Journal of Clinical Virology*, March 2010, Vol. 48, p. 131-133, doi:10.1016/j.jcv.2010.03.007
- M. Jevšnik et al. (2013): Detection of human coronaviruses in simultaneously collected stool samples and nasopharyngeal swabs from hospitalized children with acute gastroenteritis. *Virology Journal*, 2013, 10:46, doi:10.1186/1743-422X-10-46
- I. M. Mackay et al. (2015): MERS coronavirus: diagnostics, epidemiology and transmission. *Virology Journal*, Dec. 2015, 12:222, DOI 10.1186/s12985-015-0439-5
- M. C. Nunes et al. (2014): Clinical Epidemiology of Bocavirus, Rhinovirus, Two Polyomaviruses and Four Coronaviruses in HIV-Infected and HIV-Uninfected South African Children. *Plos One*, Feb. 2014, Vol. 9, Issue 2, e86448
- L. A. Sipulwa (2016): Molecular characterization of human coronaviruses and their circulation dynamics in Kenya, 2009–2012. *Virology Journal*, 13:18, DOI 10.1186/s12985-016-0474-x
- I. Wilhelm (2003): Viruses causing gastroenteritis. *Clinical Microbiology and Infection*, April 2003, Vol. 9, No. 4, p. 247-262
- F. Wu et al. (2020): A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* (2020) DOI:10.1038/s41586-020-2008-3



11. R. Ralph et al. (2020): 2019-nCoV (Wuhan virus), a novel Coronavirus: human-to-human transmission, travel-related cases, and vaccine readiness. *J Infect Dev Ctries* 2020; 14(1):3-17
12. W. G. Carlos et al. (2020): Novel Wuhan (2019-nCoV) Coronavirus. *Am J Respir Crit Care Med* 2020 Vol. 201, P7-P8
13. S.-Q. Deng et H.-J. Peng (2020): Characteristics of and Public Health Responses to the Coronavirus Disease 2019 Outbreak in China. *J. Clin. Med.* 2020, 9, 575-584
14. Muenchhoff Maximilian, Mairhofer Helga, Nitschko Hans, Grzimek-Koschewa Natascha, Hoffmann Dieter, Berger Annemarie, Rabenau Holger, Widera Marek, Ackermann Nikolaus, Konrad Regina, Zange Sabine, Graf Alexander, Krebs Stefan, Blum Helmut, Sing Andreas, Liebl Bernhard, Wölfel Roman, Ciesek Sandra, Drosten Christian, Protzer Ulrike, Boehm Stephan, Keppler Oliver T. Multicentre comparison of quantitative PCR-based assays to detect SARS-CoV-2, Germany, March 2020. *Euro Surveill.* 2020;25(24):pii=2001057. <https://doi.org/10.2807/15607917.ES.2020.25.24.001057>
15. Ute Eberle, Clara Wimmer, Ingrid Huber, Antonie Neubauer-Juric, Giuseppe Valenza, Nikolaus Ackermann, Andreas Sing (for the Bavarian SARS-CoV-2-Public Health Laboratory Team), Comparison of nine different commercially available molecular assays for detection of SARS-CoV-2 RNA, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, Springer, published online: 29 January 2021, <https://doi.org/10.1007/s10096-021-04159-9>

Nous enverrons volontiers à l'utilisateur une bibliographie plus complète sur simple demande.

13 Description des symboles

	Contient suffisamment de réactifs pour <n> tests Nombre de tests
P&P MIX	Mélange amorce-échantillon
ENZYME	Mélange d'enzymes
CONTROL INT	Contrôle interne
CONTROL +	Contrôle positif
CONTROL -	Contrôle négatif
INSTRU	Notice d'utilisation
	Consulter la notice d'utilisation
CONT	Contenu
IND	Diagnostic <i>in vitro</i>
LOT	Numéro de lot/version
REF	Numéro de référence
	Utiliser jusqu'au Date de péremption
	Conserver entre x °C et y °C
	Fabricant

14 Informations sur le fabricant et la version

ampliCube Coronavirus Panel		Référence 50142
Notice d'utilisation valable à partir de		GAACCV004FR 2023-04
	MIKROGEN GmbH Anna-Sigmund-Str. 10 82061 Neuried Allemagne Tél. +49 89 54801-0 Fax +49 89 54801-100 E-mail mikrogen@mikrogen.de Internet www.mikrogen.de	
		



GAACCV004