

RIDA® GENE Coronavirus

REF PG6805



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Allemagne

+49 (0) 61 51 81 02-0 / +49 (0) 61 51 81 02-20 / www.r-biopharm.com



1. Application

Pour usage diagnostique *in vitro*. Le test RIDA®GENE Coronavirus, exécuté sur le dispositif de RT-PCR en temps réel LightCycler® 480 II, est un test de RT-PCR multiplexe en temps réel pour la détection qualitative directe et la différenciation des coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) et du MERS-CoV dans des frottis nasopharyngés prélevés chez des personnes présentant des signes et des symptômes d'infection respiratoire aiguë.

Le test RIDA®GENE Coronavirus est conçu pour étayer le diagnostic différentiel d'infections par les coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) et le MERS CoV chez les patients présentant des symptômes d'infection respiratoire conjointement à d'autres résultats cliniques et de laboratoire.

Des résultats négatifs n'excluent pas une infection par les coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) et le MERS et ne doivent pas être utilisés comme seule base de diagnostic.

Ce produit est destiné à un usage professionnel.

2. Résumé et explication du test

Les coronavirus appartiennent à la famille des Coronaviridae et sont des virus à ARN simple brin (sb). Du fait de leur grande variabilité génétique, les différentes espèces de virus peuvent franchir la barrière des espèces et infecter différentes espèces hôtes. Parmi les exemples de ces transmissions inter-espèces, citons les infections par le SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus), responsable de la pandémie de SRAS en 2002/2003⁽¹⁾, et le MERS-CoV (Middle-East Respiratory Syndrome Coronavirus), apparu en 2012⁽²⁾.

Le SARS-CoV provoque des symptômes de pneumonie atypique et a fait plus de 1 000 morts pendant la pandémie de 2002/2003. Il est admis que la civette et la chauve-souris en sont les hôtes réservoirs d'origine. Même si les différentes voies de transmission ne sont pas totalement établies, la transmission de l'infection se produit principalement par gouttelettes. La transmission par contact ou par voie oro-fécale ne peut être exclue.

En 2015, plus de 1 100 infections par le MERS-CoV ont été confirmées dans le monde et plus de 420 décès associés au MERS-CoV ont été enregistrés^(3,4). La majorité de ces cas ont été identifiés dans la péninsule arabique. Bien que l'hôte d'origine du MERS n'ait pas non plus été clairement identifié, il est probable que la principale source de transmission soit le dromadaire⁽⁵⁾. Après une période d'incubation de 1 à 2 semaines, des symptômes de type grippal apparaissent ; les cas graves peuvent entraîner une pneumonie et une détresse respiratoire aiguë. Outre le SARS-CoV et le MERS-CoV, les différents coronavirus pathogènes pour l'homme (HKU1, NL63, 229E, OC43) sont à l'origine d'infections respiratoires légères allant jusqu'à des syndromes respiratoires aigus sévères⁽⁶⁾. Bien que les quatre

coronavirus soient présents dans le monde entier, ils sont détectés dans différentes régions du monde à différentes périodes de l'année.

Le coronavirus humain 229E (HCoV-229E) appartient au genre Alphacoronavirus, tout comme le coronavirus humain OC43 (HCoV-OC43, genre : Betacoronavirus), qui est souvent responsable des rhumes⁽²⁾. Les autres Beta coronavirus sont le SARS-CoV, le MERS-CoV et le Coronavirus HKU1. Ce dernier a été diagnostiqué en 2005 en Chine, chez un patient hospitalisé pour syndrome respiratoire aigu et pneumonie⁽⁷⁾.

Les infections par le coronavirus humain NL63 (HCoV-NL63) sont similaires à celles des infections par le virus parainfluenza. Ce virus a été découvert pour la première fois en 2003 aux Pays-Bas, chez un enfant atteint de bronchiolite. Depuis, il a été détecté dans le monde entier chez de jeunes enfants et des patients immunodéprimés atteints de syndrome respiratoire aigu⁽⁸⁾.

3. Principe du test

RIDA®GENE Coronavirus est un test de RT-PCR multiplexe en temps réel pour la détection qualitative directe et la différenciation de l'ARN des coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) et du MERS-CoV. Après isolement de l'ARN, en présence de fragments génétiques propres aux coronavirus et au MERS-CoV (ORF1), ceux-ci sont amplifiés. Les séquences cibles amplifiées sont détectées à l'aide de sondes d'hydrolyse qui sont marquées avec un extincteur à une extrémité et avec un colorant fluorescent indicateur (fluorophore) à l'autre extrémité. Les sondes s'hybrident avec l'amplicon en présence d'une séquence cible. Pendant l'extension, la **Tag-Polymerase** sépare l'indicateur de l'extincteur. L'indicateur émet un signal fluorescent qui est détecté par l'unité optique d'un dispositif de PCR en temps réel. Le signal fluorescent augmente avec la quantité d'amplicons formés. Le test RIDA®GENE Coronavirus contient un **Internal Control RNA** (ICR) pour contrôler la préparation de l'échantillon et/ou toute éventuelle inhibition de la PCR.

4. Contenu du paquet

Tableau 1 :Contenu du paquet (les réactifs fournis dans le kit permettent de réaliser 100 déterminations.)

| Code du kit | Réactif | Quantité | | Couleur du couvercle |
|-------------|----------------------|----------|---------|-----------------------------|
| 1 | Reaction Mix | 2 × | 700 µl | Jaune, prêt à l'emploi |
| 2 | PP Mix | 1 × | 770 µl | Vert clair, prêt à l'emploi |
| 3 | Enzyme Mix | 1 × | 80 µl | Rouge, prêt à l'emploi |
| R | Internal Control RNA | 2 × | 1800 µl | Brun, prêt à l'emploi |
| N | PCR Water | 1 × | 500 µl | Blanc, prêt à l'emploi |
| P | Positive Control | 1 × | 100 µl | Bleu, prêt à l'emploi |

5. Instructions de conservation

- Respecter les consignes de manipulation figurant dans le tableau 2 et stocker le kit directement après utilisation conformément aux instructions.
- Tous les réactifs doivent être conservés à -20 °C et à l'abri de la lumière. S'ils ne sont pas ouverts, ils peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Tous les réactifs doivent être soigneusement décongelés avant leur utilisation (par ex., dans un réfrigérateur entre +2 et +8 °C).
- Il est possible de congeler/décongeler les produits jusqu'à 15 fois sans altérer la propriété du test (au besoin, créer des aliquotes après la première décongélation et recongeler immédiatement les réactifs).
- Refroidir correctement tous les réactifs pendant la préparation de la PCR (+2 à +8 °C).

Tableau 2 :Conditions de stockage et informations

| | Température de conservation | Durée maximale de stockage |
|------------|-----------------------------|---|
| Non ouvert | -20 °C | Utilisable jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette |
| Ouvert | -20 °C | 15 cycles de congélation-décongélation |

6. Réactifs requis, mais non fournis

6.1 Contenu du paquet

Les réactifs suivants sont nécessaires pour réaliser les tests

RIDA®GENE Coronavirus :

| Réactifs |
|----------------------------|
| Eau de PCR (sans nucléase) |

6.2 Matériel nécessaire

L'équipement suivant est nécessaire pour réaliser les tests

RIDA®GENE Coronavirus :

| Matériel |
|--|
| Plateforme d'extraction : Maxwell® RSC (Promega) |
| Instrument de PCR en temps réel : LightCycler® 480 II (Roche) |
| Kit RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) |
| Consommables de PCR en temps réel (plaques (profil bas, puits blancs, support transparent), récipient de réaction, feuilles) |
| Centrifugeuse avec rotor pour plaques |
| Agitateur-mélangeur vortex |
| Pipettes (0,5 à 20 µl, 20 à 200 µl, 100 à 1 000 µl) |
| Pointes pour pipette dotées de filtres |
| Gants jetables non poudrés |

Pour toute question concernant l'utilisation d'équipements pour le traitement automatisé, veuillez contacter R-Biopharm AG à l'adresse automation@r-biopharm.de.

7. Mesures de précaution

Exclusivement réservé au diagnostic *in vitro*.

Ce test doit uniquement être réalisé par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux.

Le mode d'emploi du test doit être respecté à la lettre.

Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec les plaies et les membranes muqueuses.

Lors de la manipulation des réactifs et des échantillons, porter un équipement de protection individuelle (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue du test.

Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons sont manipulés. Des pièces séparées, des vêtements spéciaux et des instruments pour l'extraction, la préparation de la PCR et la PCR doivent être utilisés pour éviter la contamination croisée et les résultats faux positifs.

Évitez de contaminer les échantillons et les composants du kit avec des microbes et des nucléases (DNase/RNase).

Les échantillons cliniques doivent être considérés comme du matériel potentiellement infectieux, de même que tous les réactifs et le matériel exposés à des échantillons potentiellement infectieux, et doivent être éliminés comme il se doit. Les composants (Reaction Mix, PP Mix Enzyme Mix, Internal Control RNA, Positive Control, PCR Water) d'un lot de kit ne doivent pas être échangés ni mélangés avec les composants d'un autre lot.

Ne pas utiliser le kit après sa date de péremption. Après utilisation, les utilisateurs sont responsables de la mise au rebut appropriée de tous les réactifs et matériaux. Pour la mise au rebut, respecter les règlements nationaux.

Les matières dangereuses sont signalées conformément aux dispositions d'étiquetage obligatoires. Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS).

8. Prélèvement et conservation des échantillons

8.1 Préparation de l'ARN à partir de frottis nasopharyngés

Un kit d'extraction d'acides nucléiques disponible dans le commerce (par ex., RIDA® Xtract [R-Biopharm]) ou un système d'extraction d'acides nucléiques (par ex., Maxwell® RSC [Promega]) est recommandé pour la préparation de l'ARN à partir de frottis. Faites attention aux informations fournies par le fabricant.

Le test RIDA®GENE Coronavirus comprend un Internal Control RNA qui indique une éventuelle inhibition de la PCR, vérifie l'intégrité des réactifs et confirme la réussite de l'extraction d'acides nucléiques. Le Internal Control RNA peut être utilisé uniquement comme un contrôle de l'inhibition ou comme un contrôle du processus (contrôle de l'inhibition et de l'extraction).

Si le **Internal Control RNA** est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition pour l'amplification, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange maître (voir Tableau 3).

Si le **Internal Control RNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition pour l'amplification, il convient d'en utiliser 20 µl pendant l'extraction. Dans la mesure du possible, il est recommandé d'ajouter le **Internal Control RNA** au mélange spécimen-tampon de lyse, et non directement à l'échantillon. Il est recommandé de pipeter 1 µl de **Internal Control RNA** par réaction au mélange pour la PCR pour le contrôle négatif et le contrôle positif.

9. Réalisation du test

9.1 Préparation du mélange maître

Calculer le nombre total de réactions (échantillons et réactions de contrôle) nécessaires à la PCR. Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus à chaque exécution du test.

Il est recommandé d'ajouter 10 % de volume de mélange maître de plus afin de compenser la perte au pipetage (voir Tableaux 3 et 4). Décongeler, mélanger au vortex (sauf pour le mélange enzymatique) et centrifuger brièvement avant d'utiliser le **Reaction Mix**, le **Enzyme Mix**, le **Positive Control**, le **PCR Water** et le **Internal Control ARN**. Les réactifs doivent toujours être refroidis de manière appropriée pendant les étapes de travail (+2 à +8 °C).

Tableau 3 : Exemple de calcul et de préparation du mélange maître pour 10 réactions (ICR pour extraction et contrôle de l'inhibition)

| Code du kit | Composants du mélange maître | Quantité par réaction | 10 réactions (plus 10 %) |
|-------------|------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| 1 | Reaction Mix | 12,5 µl | 137,5 µl |
| 2 | PP-Mix | 6,9 µl | 75,9 µl |
| 3 | Enzyme-Mix | 0,7 µl | 7,7 µl |
| | Total | 20,1 µl | 221,1 µl |

Mélanger le mélange maître, puis centrifuger brièvement.

Tableau 4 : Exemple de calcul et de production du mélange maître pour 10 réactions (ICD uniquement comme contrôle de l'inhibition)

| Code du kit | Composants du mélange maître | Quantité par réaction | 10 réactions (plus 10 %) |
|-------------|------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| 1 | Reaction Mix | 12,5 µl | 137,5 µl |
| 2 | PP-Mix | 6,9 µl | 75,9 µl |
| 3 | Enzyme-Mix | 0,7 µl | 7,7 µl |
| R | Internal Control RNA | 1,0 µl | 11 µl |
| | Total | 21,1 µl | 232,0 µl |

Mélanger le mélange maître, puis centrifuger brièvement.

9.2 Préparation du mélange pour la PCR

Pipeter 20 µl du mélange maître dans chaque flacon de réaction (flacon/plaque).

Contrôle négatif : Pipeter 5 µl de PCR Water dans le mélange maître correspondant.

Remarque : Si le Internal Control RNA est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition, il convient d'en ajouter 1 µl, à l'aide d'une pipette, au mélange de contrôle négatif pour la PCR.

Échantillons : Ajouter 5 µl d'éluat à chaque mélange maître pré-pipeté.

Contrôle positif : Ajouter 5 µl de Positive Control au mélange maître pré-pipeté.

Remarque : Si le Internal Control RNA est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition, il convient d'en ajouter 1 µl à chaque mélange de contrôle positif pour la PCR.

Fermer hermétiquement les flacons ou les plaques de réaction, les centrifuger brièvement à faible vitesse et les transférer vers un dispositif de PCR en temps réel. Démarrer la PCR selon la configuration de l'instrument de PCR (voir Tableaux 5 et 6).

9.3 Configuration de l'instrument de PCR

9.3.1 Profil universel de RT-PCR en temps réel

Tableau 5 : Profil universel de RT-PCR en temps réel pour LightCycler® 480 II

| | |
|--|-----------------------|
| <u>Transcription inverse</u> | 10 min, 58 °C |
| Dénaturation initiale | 1 min, 95 °C |
| Cycles | 45 cycles |
| <u>PCR</u> Dénaturation | 10 s, 95 °C |
| Hybridation/Extension | 15 s, 60 °C |
| Vitesse de transition/ vitesse de montée de température | Durée de conservation |

Remarque : L'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

Remarque : Le profil universel de PCR en temps réel peut également être utilisé pour les tests d'ADN si les tests RIDA®GENE DNA et RIDA®GENE RNA de PCR en temps réel sont combinés en une seule analyse.

9.4 Réglage du canal de détection

Tableau 6 : Sélection des canaux de détection adéquats

| Instrument de PCR en temps réel | Détection | Canal de détection | Commentaire |
|---------------------------------|--------------------------------------|--------------------|--|
| Roche LightCycler® 480 II | Coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) | 465/510 | Le kit de compensation de couleur RIDA®GENE est nécessaire |
| | ICR | 533/580 | |
| | MERS-CoV | 618/660 | |

10. Contrôle qualité

Les échantillons sont évalués à l'aide du logiciel d'analyse du dispositif de PCR en temps réel, conformément aux instructions du fabricant. Le contrôle négatif et le contrôle positif doivent afficher les résultats corrects (voir tableau 7).

Le contrôle positif **Positive Control** est disponible à une concentration de 10^3 copies/ μ l. Chaque analyse par PCR utilise une quantité totale de 5×10^3 copies.

Tableau 7 : Pour être valide, une exécution de PCR doit remplir les conditions suivantes :

| Échantillon | Résultat | Ct ICR | Gène Ct cible |
|------------------|----------|---------|-------------------------------------|
| Contrôle positif | Positif | SO *1 | Voir Certificat d'assurance qualité |
| Contrôle négatif | Négatif | Ct > 20 | 0 |

**1 Aucune valeur de Ct n'est requise pour obtenir un résultat positif de l'ICR pour le contrôle positif.*

Si le contrôle positif n'est pas dans la plage de Ct spécifiée, mais que le contrôle négatif est valide, toutes les réactions doivent être de nouveau analysées, y compris les contrôles.

Si le contrôle négatif n'est pas négatif, mais que le contrôle positif est valide, toutes les réactions doivent être de nouveau analysées, y compris les contrôles.

Si les valeurs spécifiées ne sont pas obtenues, vérifier les points suivants avant de renouveler le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Capacité de fonctionnement de l'équipement utilisé
- Réalisation correcte du test

Si les conditions ne sont toujours pas satisfaites après avoir recommencé le test, consulter le fabricant ou un distributeur R-Biopharm local.

11. Interprétation des résultats

Tableau 8 : Interprétation des résultats

| Détection | | | Résultat |
|--------------------------------------|----------|-------------------|--|
| Coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) | MERS-CoV | ICR | |
| positif | négatif | positif / négatif | Coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) détectables |
| négatif | positif | positif / négatif | MERS-CoV détectable |
| positif | positif | positif / négatif | Coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) et MERS-CoV détectables |
| négatif | négatif | positif | Négatif (les gènes cibles ne sont pas détectables) |
| négatif | négatif | négatif | Non valide |

Un échantillon est positif si l'ARN de l'échantillon et le **Internal Control RNA** présentent une amplification dans le système de détection.

Un échantillon est également considéré positif si l'ARN de l'échantillon présente une amplification, mais que le **Internal Control RNA** ne présente pas d'amplification dans le système de détection. La détection du **Internal Control RNA** n'est pas indispensable dans ce cas, car des concentrations élevées d'amplicons peuvent provoquer un signal faible ou absent du **Internal Control RNA**.

Un échantillon est estimé négatif si l'ARN de l'échantillon ne présente aucune amplification, mais en présente une pour le **Internal Control RNA** dans le système de détection. La détection du **Internal Control RNA** permet d'exclure toute inhibition de la réaction PCR.

Un échantillon est non valide si l'ARN de l'échantillon et le **Internal Control RNA** ne présentent aucune amplification dans le système de détection. Des inhibiteurs de la PCR sont présents dans l'échantillon ou une erreur est survenue pendant le processus d'extraction. L'échantillon extrait doit être dilué selon un rapport 1:10 avec de l'eau de PCR et de nouveau amplifié, ou il convient d'améliorer l'isolation et la purification de l'échantillon.

12. Limites de la méthode

1. Le test RIDA[®]GENE Coronavirus détecte l'ARN des coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) et l'ARN du MERS-CoV à partir de frottis nasopharyngés humains non traités. Ce test ne permet pas d'établir de rapport entre la valeur de Ct mesurée et la gravité des symptômes cliniques. Les résultats obtenus doivent toujours être interprétés au regard des symptômes cliniques dans leur ensemble.
2. Le diagnostic ne doit pas reposer uniquement sur le résultat du test de biologie moléculaire. Il doit toujours tenir compte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
3. Ce test est destiné uniquement aux frottis nasopharyngés humains non traités.
4. Un échantillonnage, transport, stockage et traitement incorrects du spécimen ou une charge pathogène inférieure à la sensibilité analytique du test peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
5. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut donner lieu à des résultats faux négatifs ou non valides.
6. À l'instar de tous les tests de diagnostic *in vitro* basés sur la PCR, des concentrations extrêmement faibles des séquences cibles sous la limite de détection (LDD 95 %) peuvent être détectées, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
7. Des mutations ou polymorphismes au niveau du site de liaison de l'amorce ou de la sonde peuvent empêcher la détection de nouveaux variants ou de variants inconnus et entraîner des résultats faux négatifs avec le test RIDA[®]GENE Coronavirus.
8. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Un résultat positif indique que le gène cible correspondant (ORF1) est présent.
9. Ce test est destiné à être réalisé conformément à la réglementation UE et aux Bonnes pratiques de laboratoire (BPL). L'utilisateur doit suivre avec précision les instructions du fabricant lors de l'exécution du test.

13. Performances

13.1 Sensibilité analytique

Le test de RT-PCR multiplexe en temps réel RIDA®GENE Coronavirus a une limite de détection de ≥ 50 copies d'ARN/réaction pour les coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) et le MERS-CoV (Fig. 1, Fig. 2).

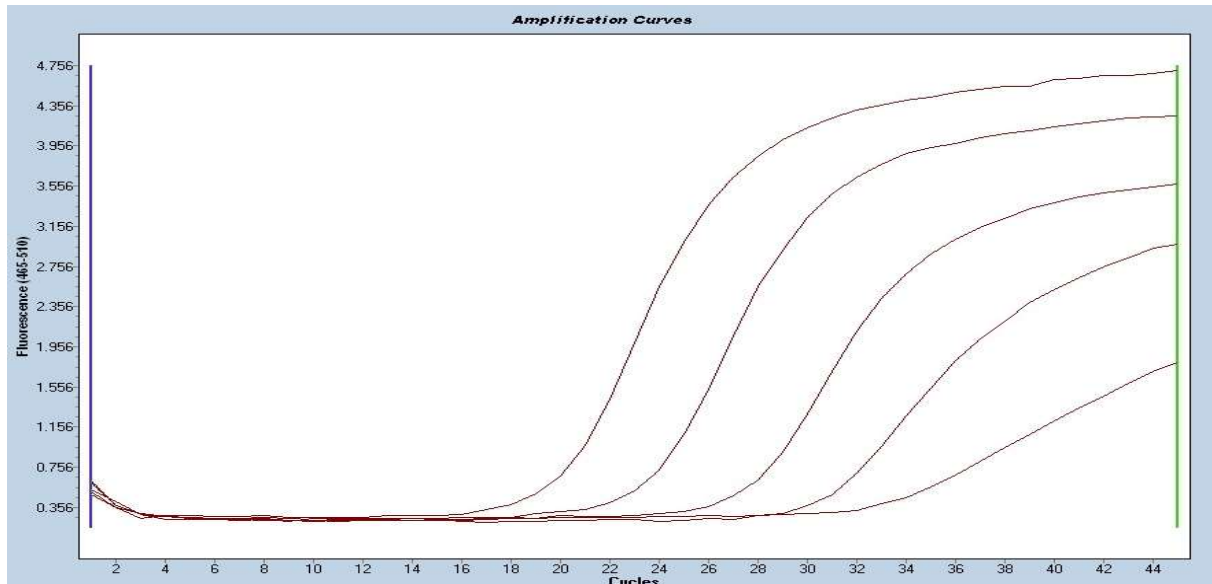


Figure 1 : Série de dilutions pour les coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) (10^5 à 10^1 copies d'ARN/ μ l) avec le LightCycler® 480 II

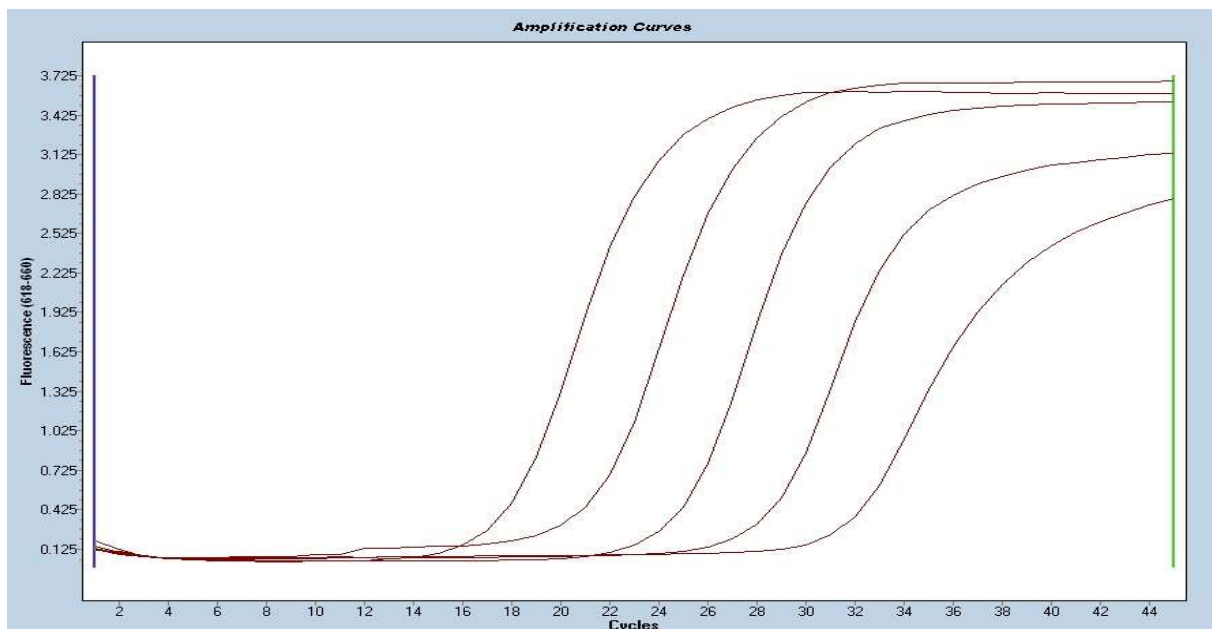


Figure 2 : Série de dilution MERS (10^5 - 10^1 copies d'ARN/ μ l) avec le LightCycler® 480 II

La limite de détection de l'ensemble du processus dépend de la matrice de l'échantillon, de l'extraction de l'ARN et de la teneur en ARN.

13.2 Spécificité analytique

La RT-PCR en temps réel du test RIDA®GENE Coronavirus est spécifique aux coronavirus. Aucune réactivité croisée avec les espèces suivantes n'a été détectée (voir tableau 9) :

Tableau 9 : Organismes présentant une possibilité de réaction croisée

| Organisme | Résultats du test | |
|---|--------------------------------------|----------|
| | Coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) | MERS-CoV |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> souche 5377 | négatif | négatif |
| Adénovirus | négatif | négatif |
| Adénovirus 1, humain, souche Adénoïde 71 | négatif | négatif |
| Adénovirus 7, humain, souche Gomen | négatif | négatif |
| Adénovirus 40, humain, souche Dugan | négatif | négatif |
| Adénovirus 41, humain, souche Tak | négatif | négatif |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | négatif | négatif |
| <i>Arcobacter butzleri</i> | négatif | négatif |
| Astrovirus | négatif | négatif |
| <i>Bacillus cereus</i> | négatif | négatif |
| <i>Bacteroides fragilis</i> | négatif | négatif |
| <i>Bordetella parapertussis</i> souche 12822 | négatif | négatif |
| <i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1 | négatif | négatif |
| <i>Campylobacter coli</i> | négatif | négatif |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | négatif | négatif |
| <i>Campylobacter fetus</i> sous-esp. <i>fetus</i> | négatif | négatif |
| <i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i> | négatif | négatif |
| <i>Campylobacter upsaliensis</i> | négatif | négatif |
| <i>Candida albicans</i> | négatif | négatif |
| <i>Citrobacter freundii</i> NCTC 9750 | négatif | négatif |
| <i>Clostridium bifermentans</i> | négatif | négatif |
| <i>Clostridium difficile</i> | négatif | négatif |
| <i>Clostridium perfringens</i> | négatif | négatif |
| <i>Clostridium sporogenes</i> | négatif | négatif |
| <i>Clostridium septicum</i> | négatif | négatif |
| <i>Clostridium novyi</i> | négatif | négatif |
| <i>Clostridium sordellii</i> | négatif | négatif |
| <i>E. coli</i> (O26:H-) | négatif | négatif |

| | | |
|---|---------|---------|
| <i>E. coli</i> (O6) | négatif | négatif |
| <i>E. coli</i> (O157:H7) | négatif | négatif |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | négatif | négatif |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | négatif | négatif |
| Virus d'Epstein-Barr souche B95-8 | négatif | négatif |
| <i>Haemophilus influenzae</i> Rd | négatif | négatif |
| Virus Herpes simplex 1 souche McIntyre | négatif | négatif |
| Virus Herpes simplex 2 souche MS | négatif | négatif |
| Metapneumovirus humain | négatif | négatif |
| Coxsackievirus humain B4 | négatif | négatif |
| Cytomégalovirus humain | négatif | négatif |
| Virus parainfluenza humain 1 souche C35 | négatif | négatif |
| Virus parainfluenza humain 2 souche Greer | négatif | négatif |
| Virus parainfluenza humain 4b souche CH19503 | négatif | négatif |
| Virus parainfluenza sérotype 3 | négatif | négatif |
| Virus respiratoire syncytial humain souche Long | négatif | négatif |
| Virus respiratoire syncytial humain souche 9320 | négatif | négatif |
| Rhinovirus humain génogroupe A | négatif | négatif |
| Virus influenza, infectieux A/PR/8/34 | négatif | négatif |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> souche MGH 78578 | négatif | négatif |
| <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> | négatif | négatif |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | négatif | négatif |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i> souche FH d'Eaton Agent | négatif | négatif |
| <i>Neisseria meningitidis</i> souche FAM18 | négatif | négatif |
| <i>Proteus vulgaris</i> | négatif | négatif |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | négatif | négatif |
| Rotavirus | négatif | négatif |
| <i>Salmonella enteritidis</i> | négatif | négatif |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | négatif | négatif |
| <i>Serratia liquefaciens</i> | négatif | négatif |

| | | |
|--|---------|---------|
| <i>Shigella flexneri</i> | négatif | négatif |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | négatif | négatif |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | négatif | négatif |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> SM131 | négatif | négatif |
| <i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> R22 | négatif | négatif |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> souche NCTC 7465 | négatif | négatif |
| Virus varicelle-zona (type B) | négatif | négatif |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | négatif | négatif |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | négatif | négatif |

Substances interférentes

La présence d'inhibiteurs de la RT-PCR et de substances interférentes peut donner lieu à des résultats faux négatifs ou non valides. En conséquence, on a étudié les effets de diverses substances qui peuvent exister compte tenu de leur utilisation répandue pour les infections respiratoires, ou de leur existence répandue dans les échantillons correspondants.

Les substances susceptibles de modifier sensiblement les résultats du test ont d'abord été examinées au moyen d'un test d'interférence. Plusieurs substances ont été identifiées, qui pourraient être présentes soit en tant que résidus de l'extraction, soit en raison de leur utilisation largement répandue pour traiter les infections respiratoires (différents traitements pharmaceutiques ou médicaments sur ordonnance), soit en raison de leur présence répandue dans les échantillons de contrôle correspondants (par exemple, les mucines à la surface des muqueuses ou le sang), et initialement contrôlées à des concentrations élevées (trois fois la dose quotidienne ou simulation du cas le plus défavorable). Si une interférence possible était trouvée lors de ce test d'interférence pour une substance examinée, une relation dose-effet était établie entre la concentration de la substance en question et l'interférence.

Aucune interférence n'a été identifiée pour les autres substances figurant dans le tableau 10.

Tableau 10 : Substances potentiellement interférentes

| Substance potentiellement interférente | Concentration |
|---|---------------|
| Ciprofloxacine 500 mg (Ciprofloxacine) | 25 mg/ml |
| Ampicilline | 25 mg/ml |
| RatioAllerg 50 µg (dipropionate de bécloéthasone) | 10 % (v/v) |
| Sang humain | 2 % (v/v) |
| Erythromycine | 10 % (v/v) |
| Flutide Nasal (Propionate de Fluticasone) | 25 mg/ml |
| Robitussin (guaifénésine/dextrométhorphanne) | 10 % (v/v) |
| Chloraseptic® Sore Throat Spray (Phénol) | 10 % (v/v) |
| Mucine | 60 µg/ml |
| Chlorure de sodium | 10 % (v/v) |
| Nasivin 0,05 % (oxymétazoline) | 10 % (v/v) |
| Tobramycine | 4 µg/ml |
| Phosphate d'oseltamivir | 25 mg/ml |

13.3 Réactivité analytique

La réactivité du test de RT-PCR multiplexe en temps réel RIDA®GENE Coronavirus a été examinée avec différents sous-types du coronavirus (voir tableau 11). Les sous-types de coronavirus du panel d'échantillons ont été détectés avec le test de RT-PCR multiplexe en temps réel RIDA®GENE Coronavirus. La réactivité du sous-type HKU1 a été analysée par correspondance de séquence.

Tableau 11 : Test de la réactivité analytique

| Souche - Sous-type | Concentration | Résultat | |
|--------------------|---------------------------|----------------|----------------|
| | | Coronavirus | MERS-CoV |
| Coronavirus - HKU1 | * | positif | négatif |
| Coronavirus - OC43 | 1,5x10 ⁻¹ U/ml | positif | négatif |
| Coronavirus - NL63 | 1,2x10 ⁻¹ U/ml | positif | négatif |
| Coronavirus - 229E | 1,2x10 ⁰ U/ml | positif | négatif |
| Coronavirus - MERS | 1,0x10 ⁻⁵ U/ml | négatif | positif |










*La réactivité analytique au coronavirus HKU1 a été détectée par une analyse BLAST.

14. Historique des versions

| Numéro de version | Section et désignation |
|-------------------|--|
| 2017-09-20 | Version précédente |
| 2021-08-13 | Révision générale : 1. Application 4. Contenu du paquet 5. Instructions de conservation 6. Réactifs requis, mais non fournis 7. Mesures de précaution 8. Prélèvement et conservation des échantillons 9. Réalisation du test 10. Contrôle qualité 12. Limites de la méthode 13. Performances |
| 2022-04-19 | 6. Réactifs requis, mais non fournis (RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)) |

15. Signification des symboles

Symboles généraux

| | |
|---|-----------------------------------|
|  | Pour usage diagnostique in vitro |
|  | Respecter le manuel d'utilisation |
|  | Numéro de lot |
|  | Date de péremption |
|  | Température de conservation |
|  | Numéro d'article |
|  | Nombre de tests |
|  | Date de fabrication |
|  | Fabricant |

Symboles spécifiques au test

| | |
|----------------------|-------------------------------------|
| Reaction Mix | Mélange réactif |
| PP-Mix | Mélange amorce/échantillon |
| Enzyme-Mix | Mélange d'enzymes |
| Internal Control RNA | Contrôle de l'extraction/inhibition |
| PCR Water | Contrôle négatif |
| Positive Control | Contrôle positif |

16. Bibliographie

1. World Health Organization Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) multi-country outbreak - Update 6 http://www.who.int/csr/don/2003_03_21/en/ accessed 28.07.2015
2. To K.W. et al. From SARS coronavirus to novel animal and human coronaviruses. *J Thorac Dis* 2013; 5 (S2):S103-S108.
3. World Health Organization. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS CoV) – Saudi Arabia <http://www.who.int/csr/don/29-april-2015-mers-saudi-arabia/en/> accessed 30.07.2015
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: severe respiratory illness associated with Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)–worldwide, 2012–2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2013; 62:480–483
5. Adney DR et al. Replication and shedding of MERS-CoV in upper respiratory tract of inoculated dromedary camels. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20:1999–2005
6. US Centers for Disease Control and Prevention. MERS clinical features [cited 2015 May 30]. <http://www.cdc.gov/coronavirus/mers/clinical-features.html> accessed 30.07.2015
7. Woo PC et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* 2005;79: 884-95.
8. Van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 2004;10: 368-373.