

A l'attention des responsables de laboratoires, des directeurs des établissements de santé et des correspondants de vigilance

## Avis de Sécurité

Dénomination	Référence
Allplex™ 2019-nCoV Assay	RP10243X

Les Ulis,  
Le 25 août 2020,  
N/ref. 20/AQ025

Madame, Monsieur,

Nous vous informons qu'un avis de sécurité a été déclenché par un de nos fournisseurs : la société Seegene.

D'après nos dossiers, vous êtes clients de la référence indiquée dans l'avis de sécurité numéro FSN-20200720-RP10243X.

Nous vous laissons lire attentivement le document et nous associons à ce courrier la fiche technique v3.11 en vigueur à partir de ce jour. **Merci de bien vous rapporter à l'avis de sécurité pour l'interprétation des résultats,**

Nous vous remercions d'accuser réception de cette information en nous retournant l'annexe A associé à ce courrier,

Cordialement,

Cathie Marsais

Vice-présidente des opérations réglementaires et administratives

**ANNEXE A**

**Accusé de réception du courrier 20/AQ025**

Dénomination	Référence
Allplex™ 2019-nCoV Assay	RP10243X

**Numéro de client :**

**Etablissement :**

**Titre / fonction :**

**Email de contact :**

Je soussigné(e) \_\_\_\_\_, atteste de la bonne réception de l'information présentée ci-dessus.

**Date :**

**Signature :**

**Merci de retourner ce formulaire à [covid19@eurobio-scientific.com](mailto:covid19@eurobio-scientific.com)**

Date: 14.08.2020

**Notification Urgente de sécurité pour le dispositif**  
**Allplex™ 2019-nCoV Assay**

A l'attention des professionnels de santé :

Coordonnées du représentant local (nom, e-mail, téléphone, adresse, etc.) *
---

Nom du représentant local : Eurobio Scientific SA, Contact de la personne: Denis Fortier, e-mail: d.fortier@eurobio-scientific.com, Téléphone: +33 60 30 60 575, Adresse: 7 Avenue de Scandinavie Zone de Courtaboeuf 91940 - LES ULIS FRANCE
---

**Notification Urgente de sécurité pour le dispositif**  
**Allplex™ 2019-nCoV Assay**  
**Détection de la faible positivité du gène N**

<b>1. Information sur le dispositif concerné*</b>	
1	1. Type (s) de dispositif *
.	Réactif de PCR en temps réel
1	2. Nom (s) commercial
.	Allplex 2019-nCoV Assay
1	3. Identification unique du dispositif (UDI-DI)
.	10243
1	4. Objectif clinique principal du ou des dispositifs *
.	Le test Allplex™ 2019-nCoV est un test de RT-PCR en temps réel de diagnostic in vitro (IVD) destiné à la détection qualitative de l'acide nucléique du SRAS-CoV-2 dans une aspiration nasopharyngée, un écouvillon nasopharyngé, un lavage bronchoalvéolaire, un écouvillon oropharyngé (gorge), et les expectorations, d'individus présentant des signes et des symptômes du COVID-19.
1	5. Référence du dispositif / Numéro(s) de catalogue*
.	RP10243X
1	6. Version du logiciel
.	N/A
1	7. Numéro de lot incriminé
.	RP4520F97, RP4520GA2
1	8. Dispositif associé
.	N/A

<b>2 Raison de la mesure corrective de sécurité sur site (FSCA)*</b>	
2	1. Description du problème rencontré*
.	Plusieurs faibles positifs du gène N sont détectées à la fin de l'amplification PCR. Le retest des échantillons montre des négatifs après l'amplification PCR.
2	2. Danger donnant lieu à une FSCA
.	En cas de résultats erronés, faux positifs, cela peut conduire à des mesures d'isolement inadéquates du patient et / ou à un arrêt de prise en charge retardé.
2	3. Probabilité de rencontre du problème
.	Probabilité : Improbable (Peu probable mais possible) (Nombre de produit présentant le risque (p)/Nombre de ventes de produits par année : 1/10,000 p < 1/1,000, niveau 2)
2	4. Risque prévu pour le patient/les utilisateurs
.	Niveau acceptable
2	5. Renseignements supplémentaires pour aider à caractériser le problème
.	N/A
2	6. Contexte de la situation
.	Les numéros de lot RP4520F97 et RP4520GA2 du produit Allplex 2019-nCoV Assay (référence commerciale RP10243X) ont été remis en cause en France concernant leur résultat de gène N seul positif avec un Ct > 37. Pour une analyse rapide des causes de la situation, nous avons testé sur un lot spécifique et suspect ainsi que sur tous les lots fabriqués et que Seegene détient dans leur zone de stockage. Bien que la cause première ne soit pas claire de notre point de vue pour le moment, nous prenons des mesures correctives et préventives décrites dans FSCA.
2	7. Autres renseignements pertinents pour les mesures de sécurité (FSCA)



<b>4. Informations générales*</b>		
4.	1. Type d'avis de sécurité*	Nouveau
4.	2. Pour la mise à jour de l'avis de sécurité : référence et la date de l'avis de sécurité précédent	N/A
4.	3. Pour la mise à jour de l'avis de sécurité, les nouveaux renseignements sont :	
	N/A	
4.	4. Des conseils ou des renseignements supplémentaires sont-ils déjà prévus dans le suivi de l'avis de sécurité?*	No
4	5. Si l'on s'attend à ce que l'avis fasse un retour, quels sont les autres conseils qui devraient se être donnés :	
	N/A	
4	6. Echéance prévu pour le suivi de l'avis de sécurité	N/A
4.	7. Information du fabricant (Pour connaître les coordonnées du représentant local, consultez la page 1 de l'avis de sécurité.)	
	a. Nom de la société	Seegene Inc.
	b. Adresse	Taewon Bldg., 91, Ogeum-Ro, Songpa-Gu, Seoul
	c. Site internet	www.seegene.com
4.	8. L'autorité compétente (réglementaire) de votre pays est informée de cette communication aux clients.*	
4.	9. List des pièces jointes et annexes :	[Avis] Recommandation de re-tester avec le réactif Allplex TM 2019-nCoV en cas de détection d'un gene N seul positif (Ct>37)
4.	10. Nom/Fonction	Jingu Gang / responsable AQ

<b>Transmission de l'avis de sécurité</b>	
	<p>Cet avis doit être transmis à toutes les personnes devant être au courant au sein de la société ou à toute société ou lieu où les dispositifs potentiellement touchés ont été transférés. (Le cas échéant)</p> <p>Veillez transmettre cet avis à d'autres sociétés sur lesquelles cette action a un impact. (Le cas échéant)</p> <p>Veillez vous tenir au courant de cet avis et des mesures qui en découlent dans un délai approprié pour assurer l'efficacité des mesures correctives.</p> <p>Veillez signaler tout incident lié au dispositif au fabricant, au distributeur ou au représentant local, ainsi qu'à l'autorité compétente nationale, le cas échéant, car cela</p>

fournit des informations importantes au suivi... *
--

Remarque : Les champs indiqués par \* sont jugés nécessaires pour tous les avis de sécurité.  
Les autres sont facultatifs.

Destiné aux professionnels uniquement

# Allplex™ 2019-nCoV Assay

REF RP10243X  $\Sigma_{100}$

REF RP10244Y  $\Sigma_{50}$

A utiliser avec 1. CFX96™ Real-time PCR System (Bio-Rad)  
2. CFX96™ Dx System (Bio-Rad)



Pour un diagnostic *in vitro*, utilisez uniquement



Seegene Inc.,  
Taewon Bldg., 91 Ogeum-ro, Songpa-gu, Séoul, République de Corée 05548



Medical Technology Promedt Consulting GmbH  
Altenhofstrasse 80, D-66386 St.Ingbert, Allemagne

Non disponible aux USA

**AVERTISSEMENT**

- Destiné au diagnostic *in vitro* uniquement.
- La fiabilité des résultats dépend des procédures adéquates de collecte, de stockage, de transport et de traitement des échantillons.
- **Ce test a été validé pour les types d'échantillons suivants : crachat, prélèvement rhinopharyngé, écouvillonnage de la gorge et du nasopharynx, et lavage bronchoalvéolaire.**
- **Pour les échantillons d'écouvillonnage, ESWAB, eNAT, UTM et MSwab sont validés avec Allplex™ 2019-nCoV Assay.**
- Ce test n'a pas été validé pour d'autres types d'échantillons.
- **Conserver les échantillons d'ARN à ≤ -70°C jusqu'à utilisation et les conserver sur de la glace pendant l'utilisation.**
- La sensibilité du test peut diminuer si les échantillons sont congelés/décongelés à plusieurs reprises ou sont stockés pendant une période plus longue.
- Le flux de travail dans un laboratoire doit se dérouler de manière unidirectionnelle.
- Porter des gants jetables et les changer avant d'entrer dans des zones différentes. Changer immédiatement de gants en cas de contamination ou les traiter avec un réactif de décontamination de l'ADN.
- Les fournitures et l'équipement doivent être dédiés aux zones de travail et ne doivent pas être déplacés d'une zone à l'autre.
- Ne pas pipeter à la bouche.
- Ne pas manger, boire ou fumer dans les zones de travail de laboratoire. Porter des gants jetables non poudrés, des blouses de laboratoire et des équipements de protection des yeux lors de la manipulation des échantillons et des réactifs. Se laver soigneusement les mains après avoir manipulé des échantillons et des réactifs de test.
- Éviter la contamination des réactifs lors du retrait des aliquotes des tubes de réactifs. L'utilisation de pointes de pipette jetables stérilisées et résistantes aux aérosols est recommandée.
- Ne pas mélanger des réactifs de différents lots ou de différents tubes d'un même lot.
- Ne pas utiliser le produit après sa date de péremption.
- Ne jamais réutiliser les articles jetables.
- Utiliser des tubes à bouchon vissant et éviter toute éclaboussure potentielle ou contamination croisée des échantillons pendant la préparation.
- Veiller à ne pas contaminer les réactifs avec des acides nucléiques extraits, des produits de PCR et des contrôles positifs. Pour éviter la contamination des réactifs, l'utilisation de pointes à filtre est recommandée.
- Utiliser des zones de travail séparées et distinctes pour chaque essai.
- Pour éviter la contamination des zones de travail par des produits amplifiés, ouvrir les tubes ou bandelettes de réaction de PCR uniquement dans les zones de travail désignées après l'amplification.
- Stocker les matériaux positifs séparément des réactifs du kit.
- Les procédures de sécurité en laboratoire (voir les documents sur la biosécurité dans les laboratoires microbiologiques et biomédicaux et les documents du CLSI) doivent être suivies lors de la manipulation des échantillons. Nettoyer et désinfecter soigneusement toutes les surfaces de travail avec de l'hypochlorite de sodium à 0.5 % (dans de l'eau déionisée ou distillée). Les composants du produit (y compris les résidus et l'emballage) peuvent être considérés comme des déchets de laboratoire. Éliminer les réactifs non utilisés et les déchets conformément aux réglementations fédérales, nationales et locales applicables.
- La date de péremption est de 8 mois à compter de la date de fabrication à ≤ -20 °C. Veuillez vous référer à l'étiquette pour la date de péremption finale.
- Seegene NIMBUS et Seegene STARlet sont les mêmes équipements que le Microlab NIMBUS IVD et Microlab STARlet IVD, bien que les fabricants soient différents. Étant donné qu'aucune modification matérielle n'a été apportée sur les appareils, les résultats des tests seront les mêmes.
- Le nom de marque « CFX96™ Real-time PCR Detection System-IVD » a été changé à « CFX96™ Dx System ». Étant donné qu'aucune modification matérielle n'a été apportée sur les systèmes, les mêmes résultats devraient être obtenus avec les deux systèmes.
- « CFX Manager™ Dx Software v3.1 » est une version mise à niveau de « CFX Manager™ Software-IVD v1.6 ». Le logiciel mis à niveau inclut des améliorations du menu « Run (Exécuter) ». Ces améliorations n'ont aucune incidence sur les résultats de l'analyse des données ; par conséquent, les résultats seront les mêmes.
- Ce kit est un test qualitatif *in vitro* pour la détection simple ou multiple de 3 types de gènes (le gène E, le gène RdRP, et le gène N).

## Utilisation prévue

Allplex™ 2019-nCoV Assay est un test RT-PCR en temps réel de diagnostic *in vitro* (IVD) destiné à une détection qualitative de l'acide nucléique de SARS-CoV-2 dans le prélèvement rhinopharyngé, l'écouvillonnage nasopharyngé, le lavage bronchoalvéolaire, l'écouvillonnage oro-pharyngé (gorge), et le crachat d'individus présentant des signes et des symptômes du COVID-19. Pour les échantillons d'écouvillonnage, ESwab, eNAT, UTM et MSwab sont validés.

## PRINCIPES ET PRÉSENTATION DE LA PROCÉDURE

### 1. Pré-configuration pour l'analyse des données

- Allplex™ 2019-nCoV Assay est un test de réaction en chaîne par polymérase avec transcription inverse (RT-PCR) en temps réel. L'ensemble(s) d'amorces et de sondes du 2019-nCoV est conçu pour détecter l'ARN du 2019-nCoV dans les échantillons respiratoires pendant la phase aiguë de l'infection. Allplex™ 2019-nCoV Assay est un test qualitatif *in vitro* test pour la détection simple ou multiple de 3 types de gènes (le gène E, le gène RdRP, et le gène N), avec un contrôle interne (IC).
- L'acide nucléique est isolé et purifié de l'échantillon. L'acide nucléique purifié est transcrit en mode inverse en utilisant un tampon en une étape 5X en temps réel/une enzyme en une étape en temps réel dans l'ADNc qui est ensuite amplifié dans un CFX96™ Real-Time PCR Detection System / CFX96™ Dx System. Au cours du processus, la sonde s'hybride à une séquence cible spécifique située entre les amorces directe et inverse. Pendant la phase d'extension du cycle de PCR, l'activité nucléase 5' de la Taq polymérase dégrade la sonde, provoquant la séparation du colorant indicateur du colorant diluant, générant un signal fluorescent. À chaque cycle, des molécules de colorant indicateur supplémentaires sont clivées de leurs sondes respectives, augmentant l'intensité de la fluorescence. L'intensité de la fluorescence est vérifiée à chaque cycle de PCR par le CFX96™ Real-Time PCR Detection System/ CFX96™ Dx System. Le résultat de l'amplification est rapporté par l'analyse 'Seegene viewer'. Le 'Seegene viewer' indique si les données exportées sont détectées en 2019-nCoV, présomptives positives ou négatives pour une récupération facile des résultats par l'utilisateur.
- Dans la PCR, l'efficacité de l'amplification est souvent réduite par les inhibiteurs présents dans les échantillons cliniques. Par conséquent, le IC est ajouté dans le produit en tant que contrôle exogène du processus entier pour contrôler l'extraction des acides nucléiques et pour vérifier une éventuelle inhibition de la PCR-RT. Le IC est co-amplifié avec les acides nucléiques cibles présents dans l'échantillon clinique.

### 2. Aperçu sur la procédure

Prélèvement rhinopharyngé, écouvillonnage du nasopharynx,  
lavage bronchoalvéolaire, écouvillonnage oro-pharyngé (gorge) et crachat



Extraction de l'acide

ARN viral



PCR-RT en temps réel et en une étape en  
utilisant Allplex™ 2019-nCoV Assay

Analyse des résultats

## INFORMATIONS GÉNÉRALES

Les coronavirus sont un groupe de virus à ARN qui peuvent provoquer des maladies chez les animaux ou les humains. Chez l'homme, ces virus sont connus pour provoquer des infections des voies respiratoires. L'épidémie de maladie respiratoire causée par un nouveau coronavirus a été identifiée pour la première fois dans la ville de Wuhan, en Chine, en décembre 2019. Ces virus ont été nommés « coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2) ». L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a déclaré que l'épidémie était une urgence de santé publique de portée internationale le 30 janvier et une pandémie le 11 mars. Le SRAS-CoV-2 peut se propager par des gouttelettes respiratoires entre des personnes lors d'un contact étroit. Les symptômes les plus courants du SRAS-CoV-2 sont la fièvre, la toux, l'écoulement nasal et le mal de gorge.

## RÉACTIFS

- Les réactifs dans un kit sont suffisants pour 100 réactions.  
Informations de commande (REF RP10243X)

Allplex™ 2019-nCoV Assay			
Symbole	Contenu	Volume	Description
<b>PRIMER</b>	2019-nCoV MOM	500 µL	Mélange MuDT Oligo (MOM) : - Réactif d'amplification et de détection
<b>ENZYME</b>	Real-time One-step Enzyme	200 µL	Mélange d'enzymes pour PCR-RT en une étape
<b>BUFFER</b>	5X Real-time One-step Buffer	500 µL	Tampon pour PCR-RT en une étape - Tampon contenant du dNTP
<b>CONTROL +</b>	2019-nCoV PC	80 µL	Contrôle positif (PC) pour le contrôle PCR : - Mélange d'agents pathogènes et de clones IC
<b>CONTROL IC</b>	RP-V IC	1,000 µL	Contrôle interne exogène (IC)
<b>WATER</b>	RNase-free Water	1,000 µL	Qualité ultra-pure, grade PCR
	Manuel de l'utilisateur		

- Les réactifs dans un kit sont suffisants pour 50 réactions.  
Informations de commande (REF RP10244Y)

Allplex™ 2019-nCoV Assay			
Symbole	Contenu	Volume	Description
<b>PRIMER</b>	2019-nCoV MOM	250 µL	Mélange MuDT Oligo (MOM) : - réactif d'amplification et de détection
<b>ENZYME</b>	Real-time One-step Enzyme	100 µL	Mélange d'enzymes pour PCR-RT en une étape
<b>BUFFER</b>	5X Real-time One-step Buffer	250 µL	Tampon pour PCR-RT en une étape - Tampon contenant du dNTP
<b>CONTROL +</b>	2019-nCoV PC	40 µL	Contrôle positif (PC) pour le contrôle PCR : - Mélange d'agents pathogènes et de clones IC
<b>CONTROL IC</b>	RP-V IC	500 µL	Contrôle interne exogène (IC)
<b>WATER</b>	RNase-free Water	1,000 µL	Qualité ultra-pure, grade PCR
	Manuel de l'utilisateur		

## Stabilité du kit

- La date de péremption est de 8 mois à compter de la date de fabrication à ≤ -20 °C. Veuillez vous référer à l'étiquette pour la date de péremption finale.
- Ce produit peut être utilisé 30 jours après l'ouverture de l'emballage et congelé et décongelé à plusieurs reprises jusqu'à 7 fois.

## Manipulation et stockage des échantillons

- Les échantillons peuvent être conservés à une température de 4 °C jusqu'à 72 heures après la collecte. Si un retard d'extraction est prévu, conserver les échantillons à une température ≤ -70 °C.
- Les acides nucléiques extraits doivent être stockés à ≤ -70 °C.

## MATÉRIEL REQUIS NON FOURNI

- Des gants non poudrés jetables (latex ou nitrile)
  - Pipettes (réglable) et embouts stériles de pipettes
  - 1.5 mL de microtubes à centrifuger
  - Système d'extraction de l'acide nucléique (voir Extraction de l'acide nucléique)
  - Plan de travail propre
  - Machine à glaçons
  - Centrifugeuse de bureau
  - Agitateur vortex
  - CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
  - CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
  - Bandes 8 tubes à basse section de 0.2 mL sans Capuchons (couleur blanche, Réf. Cat. TLS0851, Bio-Rad)
  - Bandes optiques de 8 tubes à capuchons (Réf. Cat. TCS0803, Bio-Rad)
  - Hard-Shell® PCR plates (plaques) 96-well (alvéole), profilé bas, paroi mince, à jupe, WHT/WHT (Réf. Cat. HSP9655, Bio-Rad)
  - Hard-Shell® PCR plates (plaques) 96-well (alvéole), profilé bas, paroi mince, à jupe, WHT/WHT, à Barcoded (Réf. Cat. HSP9955, Bio-Rad)
  - Joint thermique transparent permanent (Réf. Cat. 1814035, Bio-Rad)\*
  - Étanchéité de la plaque PX1 PCR (étanchéité-auto, Réf. Cat. 181-4000, Bio-Rad)\*
  - Bandelette 8 tubes 0.1 ml UE, LP, W, extra robuste (Réf. cat. B72719, BIOplastics)
  - Bandelette 8 bouchons optiques large surface UE (Réf. cat. B57801, BIOplastics)
  - 96x Plaque 0.1 ml, LP, W, PLEIN, plaque à 96 puits (Réf. cat. B70679, BIOplastics)
  - Feuille de scellage optique Opti-Seal (Réf. cat. 157300, BIOplastics)
- \* Veuillez à utiliser ensemble le joint anti-chaueur et le joint de plaque cités ci-dessus.

## INFORMATIONS DE COMMANDE

Réf. cat.	Produit	Taille
<b>Gamme Allplex™</b>		
RP10243X	Allplex™ 2019-nCoV Assay	100 rxns*
RP10244Y	Allplex™ 2019-nCoV Assay	50 rxns*
* Pour une utilisation avec Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS et Seegene STARlet uniquement.		
<b>Produit accessoire</b>		
606CS01P	ENAT PM 2ML PERNASAL APPLICATOR	50 tests
SG1701	Ribo_spin vRD (Viral RNA/DNA Extraction Kit)	50 preps
<b>Système automatisé d'extraction</b>		
65415-02	Microlab NIMBUS IVD	EA
173000-075	Microlab STARlet IVD	EA
65415-03	Seegene NIMBUS	EA
67930-03	Seegene STARlet	EA
744300.4.UC384	STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit	384T/1 boîte
SGprep32-180701	SGprep32	EA
EX00003P	STARMag 96 UniPlate	96T/1 boîte
EX00004T	STARMag 96 UniTube	96T/1 boîte
SG71100	SEEPREP32	EA
EX00009P	STARMag 96 ProPrep (Plate Type)	96T/1 boîte
EX00009T	STARMag 96 ProPrep (Tube Type)	96T/1 boîte

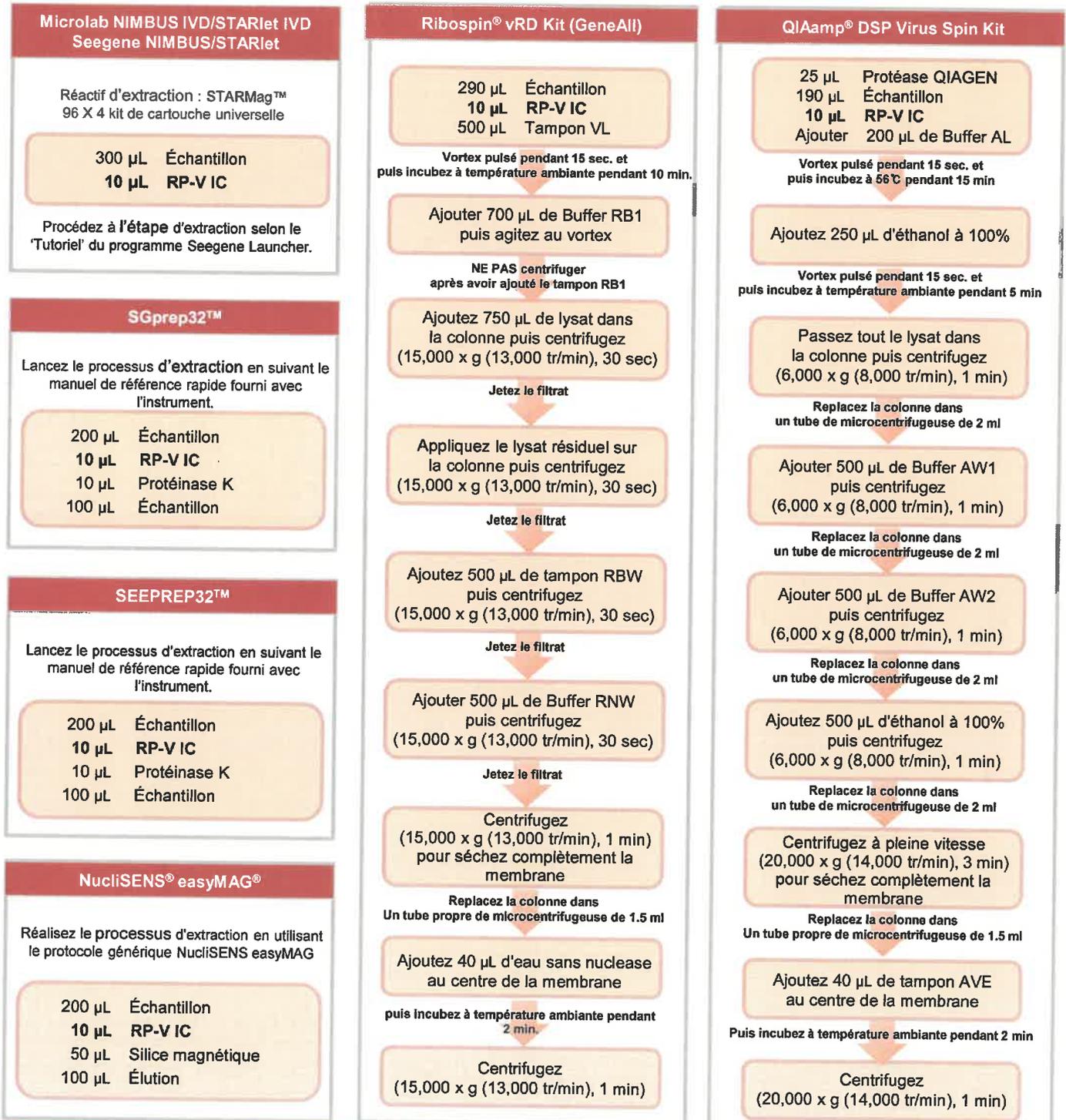
## Extraction de l'acide nucléique

**REMARQUE :** 10 µL de RP-V IC doit être ajoutés à chaque échantillon avant l'extraction de l'acide nucléique.

**REMARQUE :** Agitez au vortex l'échantillon avant utilisation. Si l'échantillon est toujours visqueux, abaissez sa température. Sinon, ajoutez une solution appropriée de PBS ou une solution saline et agitez au vortex. Pour le crachat, diluez le PBS d'un volume double pour le spécimen et agitez au vortex pour obtenir une homogénéisation.

**REMARQUE :** Après extraction, conservez les échantillons d'ARN à ≤ -20 °C jusqu'à utilisation et conservez-les sur de la glace pendant l'utilisation.

**REMARQUE :** Si le RP-V IC n'est pas ajouté pendant l'extraction, l'échantillon négatif est interprété comme « non valide ».



\*Pour une utilisation avec 1. Microlab NIMBUS IVD et Microlab STARlet IVD  
2. Seegene NIMBUS et Seegene STARlet

## Amplification et détection (CFX96™, Bio-Rad)

### 1. Préparation pour PCR en temps réel

**REMARQUE :** Centrifugez tous les réactifs stockés à  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  après les avoir complètement décongelés.

**REMARQUE :** L'amplification des témoins positifs et les échantillons cliniques nécessitent une attention particulière afin d'éviter la contamination par transfert.

**REMARQUE :** La configuration de PCR peut être exécuté sur Microlab NIMBUS/STARlet IVD.

Contactez Seegene pour obtenir le fichier de la méthode et du protocole NIMBUS/STARlet

- ① Préparez les réactifs suivants dans un tube stérile étiqueté de 1.5 mL. Déposez tous les réactifs sur de la glace.

Mastermix RT-PCR en une étape pour plusieurs réactions (unité :  $\mu\text{L}$ )

Nombre de réactions	1	2	3	4	5
2019-nCoV MOM	5	10	15	20	25
Eau sans RNase	5	10	15	20	25
5X tampon à une étape en temps réel	5	10	15	20	25
Enzyme à une étape en temps réel	2	4	6	8	10

- ② Mélangez en inversant le tube 5 fois ou avec un vortex rapide et en centrifugeant pendant quelques instants.
- ③ Aliquotez 17  $\mu\text{L}$  du One-step RT-PCR Mastermix dans les tubes de PCR\*
- ④ Ajoutez 8  $\mu\text{L}$  d'acide nucléique de chaque échantillon, le 2019-nCoV PC et la NC (eau sans RNase) dans le tube contenant l'aliquot du Onestep RT-PCR Mastermix.
- ⑤ Fermez le bouchon et centrifugez rapidement les tubes de PCR.
- ⑥ Vérifiez que le liquide contenant tous les composants de PCR soit présent au fond de chaque tube de PCR. Dans le cas contraire, centrifugez à nouveau à une vitesse de rotation plus rapide et pour une durée plus longue.
- ⑦ Lancez immédiatement le PCR.

**REMARQUE :** Les tubes de PCR doivent être centrifugés avant de réaliser la réaction PCR. Il est nécessaire de forcer le liquide à la base et d'éliminer les bulles d'air.

**\* Tube de PCR disponible**

Bandelette 8 tubes 0.2 ml profil bas sans bouchon (coloris blanc, réf. cat. TLS0851, Bio-Rad)  
 Bandelette 8 bouchons optiques plats (Réf. cat. TCS0803, Bio-Rad)  
 Hard-Shell® PCR plates 96-well WHT/WHT (Réf. Cat. HSP9655, Bio-Rad)  
 Plaques PCR Hard-Shell® à 96-Puits, profile bas, paroi mince, à jupe, blanc/blanc  
 À code à barres (Réf. Cat. HSP9955, Bio-Rad)  
 Film de thermoscellage transparent permanent (Réf. cat. 1814035, Bio-Rad)\*  
 Scelleuse de plaques PCR PX1 (scelleuse automatique, Réf. cat. 181-4000, Bio-Rad)\*  
 Bandelette 8 tubes 0.1 ml UE, LP, W, extra robuste (Réf. cat. B72719, BIOplastics)  
 Bandelette 8 bouchons optiques large surface UE (Réf. cat. B57801, BIOplastics)  
 96x Plaque 0.1 ml, LP, W, PLEIN, plaque à 96 puits (Réf. cat. B70679, BIOplastics)  
 Feuille de scellage optique Opti-Seal (Réf. cat. 157300, BIOplastics)  
 \* Le joint anti-chaleur et le joint de plaque mentionnés ci-dessus doivent être utilisés en combinaison.

### [ Analytes ]

Fluorophore	Analyte
FAM	E gene
HEX	Contrôle interne (IC)
Cal Red 610	Gène RdRP/S
Quasar 670	N gene

### 2. Configuration de l'instrument de PCR en temps réel

- ① Configuration du protocole

- Dans le menu principal, sélectionnez File (Fichier) → New (Nouveau) → Protocol (Protocole) pour ouvrir Protocol Editor (Éditeur de protocole).
- Dans Protocol Editor (Éditeur de protocole), définissez le profil thermique comme indiqué dans le tableau ci-dessous.
- Cliquez dans la zone à coté de Sample Volume (Volume d'échantillon) pour saisir directement 25  $\mu\text{L}$ .
- Cliquez sur OK et enregistrez le protocole pour ouvrir la fenêtre Experiment Setup (Configuration de l'expérience).

Étape	Nombre de cycles	Température	Durée
1	1	50°C	20 min
2	1	95°C	15 min
3	45	94°C	15 sec
4*		58°C	30 sec
5	PASSER à l'étape 3, 44 fois de plus		

\* Lecture de la plaque à l'étape 4. La fluorescence est détectée à 58 °C.

- ② Plate Setup (Configuration de la plaque)

- Dans l'onglet Plate (Plaque) de Experiment Setup (Configuration de l'expérience), cliquez sur Create New (Créer nouvelle) pour ouvrir la fenêtre Plate Editor (Éditeur de plaque).
- Cliquez sur Select Fluorophores (Sélectionner les fluorophores) pour indiquer les fluorophores (FAM, HEX, Cal Red 610 et Quasar 670) à utiliser et cliquez sur OK.
- Sélectionnez le (s) puits souhaité (s) puis son type d'échantillon dans le menu déroulant Sample Type (Type d'échantillon).
  - Unknown (Inconnu) : échantillons cliniques
  - Negative Control (Contrôle négatif)
  - Positive Control (Contrôle positif)
- Cliquez sur les cases appropriées (FAM, HEX, Cal Red 610 et Quasar 670) pour spécifier les fluorophores à détecter dans les puits sélectionnés.
- Entrez le Sample Name (Nom d'échantillon) et appuyez sur la touche Entrée.
- Dans Settings (Paramètres) du menu principal Plate Editor (Éditeur de plaque), choisissez Plate Size (96 wells) (Taille de plaque (96 puits)) et Plate Type (BR White) (Type de plaque (BR blanc)).
- Cliquez sur OK pour enregistrer la nouvelle plaque.
- Vous revenez à la fenêtre Experiment Setup (Configuration de l'expérience).

- ③ Démarrage du cycle

- Dans l'onglet Start Run (Démarrage du cycle) de Experiment Setup (Configuration de l'expérience), cliquez sur Close Lid (Fermer le couvercle) pour fermer le couvercle de l'instrument.
- Cliquez sur Start Run (Démarrage du cycle).
- Stockez le fichier du cycle dans Mes documents ou dans un dossier désigné. Entrez le nom du fichier, cliquez sur SAVE (ENREGISTRER) et le cycle commence.

\*Pour une utilisation avec 1. Microlab NIMBUS IVD et Microlab STARlet IVD  
2. Seegene NIMBUS et Seegene STARlet

## Analyse des données (CFX96™, Bio-Rad)

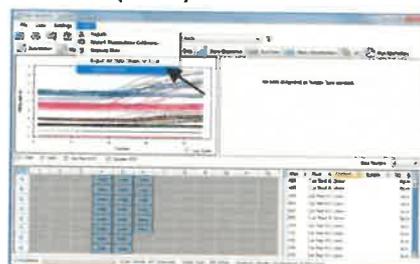
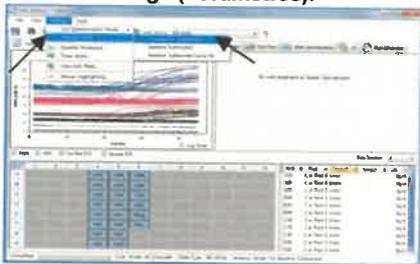
### 1. Pré-configuration pour l'analyse des données

#### A. Création de dossiers pour l'exportation de données

- ① Créez un dossier pour enregistrer les résultats de la détection de courbe d'amplification.
- ② L'endroit et le nom du dossier sont précisés par l'utilisateur, mais en cas d'utilisation de la fonction 'Seegene Export', le dossier nommé "QuantStep 4" est créé automatiquement dans l'endroit sélectionné.

#### B-1 Pré-configuration pour l'analyse des données dans le logiciel CFX Manager™ IVD v1.6

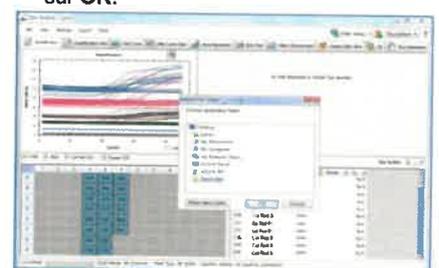
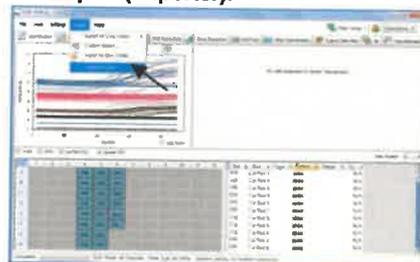
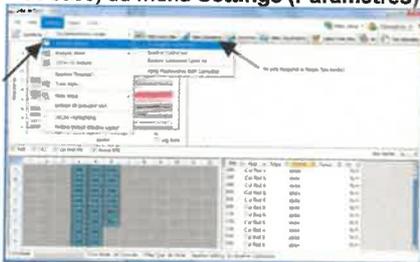
- ① Après le test, sélectionnez **No Baseline Subtraction (Aucune soustraction de ligne de base)** dans **Analysis Mode (Mode d'analyse)** du menu **Settings (Paramètres)**.
- ② Sélectionnez **Seegene Export (Exportation Seegene)** dans le menu **Tools (Outils)**.
- ③ Choisissez un emplacement pour enregistrer les données et cliquez sur **OK**.



**Remarque :** Si vous avez une requête concernant 'Seegene Export' ou le processus d'exportation des données, veuillez contacter Seegene.

#### B-2 Pré-configuration pour l'analyse des données dans le logiciel CFX Manager™ Dx v3.1

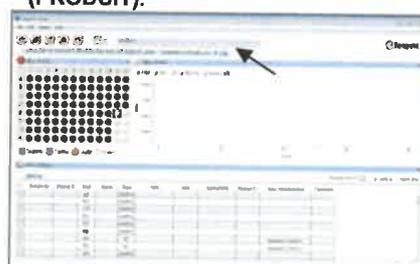
- ① Après le test, sélectionnez **No Baseline Subtraction (Aucune soustraction de ligne de base)** dans **Baseline Setting (Réglage de la ligne de base)** du menu **Settings (Paramètres)**.
- ② Sélectionnez **Seegene Export (Exportation Seegene)** dans le menu **Export (Exporter)**.
- ③ Choisissez un emplacement pour enregistrer les données et cliquez sur **OK**.



**Remarque :** Si vous avez une requête concernant 'Seegene Export' ou le processus d'exportation des données, veuillez contacter Seegene.

### 2. Configuration pour l'analyse des données dans Seegene Viewer

- ① Ouvrez le programme **Seegene Viewer** et cliquez **Open (Ouvrir)** et sélectionnez les données exportées.
- ② Après avoir ouvert le fichier de résultats, sélectionnez **"Allplex™ 2019-nCoV Assay"** à partir du menu **PRODUCT (PRODUIT)**.
- ③ Vérifiez le résultat pour chaque puits.



## Analyse des données

#### [Cut-off]

Pour toutes  
les cibles,

Valeur Ct	Résultat
≤ 40	Déecté
> 40 ou N/A	Non déecté

- Si la valeur Ct de l'IC est "> 40", effectuez un nouveau test.

\*Pour une utilisation avec 1. Microlab NIMBUS IVD et Microlab STARlet IVD  
2. Seegene NIMBUS et Seegene STARlet

[Interprétation]

Cas	IC (HEX)	E gene (FAM)	Gène RdRP/S (CalRed 610)	N gene (Quasar 670)	Auto-Interprétation	Résultats
Cas 1	+/-	+	+	+	2019-nCoV Détecté	Tous les résultats cibles sont valides. Le résultat pour l'ARN du SARS-CoV-2 est Détecté.
Cas 2	+/-	+	-	+	2019-nCoV Détecté	Tous les résultats cibles sont valides. Le résultat pour l'ARN du SARS-CoV-2 est Détecté. Des résultats cibles négatifs évoquent les éléments suivants : 1) un échantillon est à des concentrations proches ou inférieures à la limite de détection du test, 2) une mutation dans la région cible correspondante, ou 3) d'autres facteurs
Cas 3	+/-	+	+	-		
Cas 4	+/-	-	+	+		
Cas 5	+/-	-	-	+		
Cas 6	+/-	-	+	-		
Cas 7	+/-	+	-	-	préssumé positif	Tous les résultats cibles sont valides. Le résultat pour l'ARN du Sarbecovirus est détecté. Le résultat pour l'ARN du SARS-CoV est présumé Positif. Des résultats cibles négatifs évoquent les éléments suivants : 1) un échantillon est à des concentrations proches ou inférieures à la limite de détection du test, 2) une mutation dans la région cible correspondante, ou 3) d'autres facteurs. Répétez le test avec plus d'acides nucléiques (jusqu'à 13 µL) au lieu de l'eau sans RNase. En présence d'un échantillon ayant donné le même résultat lors d'un test répété, des tests de confirmation supplémentaires peuvent être effectués, dans le cas où il est nécessaire de différencier entre SARS-CoV-2 et SARS-CoV-1 ou tout autre Sarbecovirus dont on ignore actuellement s'il peut infecter l'homme, à des fins épidémiologiques ou de gestion clinique.
Cas 8	+	-	-	-	Négatif	Tous les résultats cibles sont valides. Le résultat pour l'ARN de SARS-CoV-2 est Pas détecté.
Cas 9	-	-	-	-	Non valide	Les résultats ne sont pas valides. Répétez le test. Si le résultat n'est toujours pas valide, un nouveau échantillon doit être obtenu.

Données sur les résultats

1. Sensibilité

Afin de déterminer la sensibilité de Allplex™ 2019-nCoV Assay, une dilution en série standard de transcription ARN in vitro et la matière de référence (Seracare; AccuPlex™ SARS-COV-2) a été diluée et a été analysée avec Allplex™ 2019-nCoV Assay. La limite de détection de Allplex™ 2019-nCoV Assay était de 4,167 copies/mL (100 copies/réaction d'ARN).

Remarque : L'unité LoD a été indiquée quelle que soit la méthode d'extraction utilisée, dans ce cas, la LoD pour Allplex™ 2019-nCoV Assay est de 4,167 copies/mL. Si la LoD est calculée en utilisant des copies d'ARN absolues par ARN modèle, la LoD pour Allplex™ 2019-nCoV Assay est de 100 copies/réaction.

2. Évaluation clinique

Dans l'étude d'évaluation clinique, des échantillons archivés résiduels sélectionnés de patients symptomatiques soupçonnés d'être infectés par COVID-19 ont été évalués. Les échantillons ont déjà été soumis à des tests SARS-CoV-2, puis stockés dans un laboratoire clinique en Corée du Sud avant d'être inclus dans cette étude. Un total de 300 échantillons (150 échantillons des voies respiratoires supérieures, 150 échantillons des voies respiratoires inférieures) ; 100 échantillons positifs (50 échantillons respiratoires supérieurs (écouvillonnages NP/OP en UTM), 50 échantillons de crachats) et 200 échantillons négatifs (100 échantillons respiratoires supérieurs (écouvillonnages NP/OP en UTM), 100 échantillons de crachats) ont été testés. Le but de cette étude clinique était d'évaluer la performance clinique du Allplex™ 2019-nCoV Assay de Seegene.

Pour cette étude, l'extraction a été réalisée à l'aide du STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit et de l'instrument Microlab STARlet IVD. La RT-PCR en temps réel a été réalisée en utilisant le CFX96™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad). Tous les échantillons ont été évalués avec l'Allplex™ 2019-nCoV Assay et avec un test de comparaison PCR en temps réel validé. Les amorces et les sondes du test de comparaison étaient identiques au panel de diagnostic RT-PCR en temps réel du CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV), mais utilisaient une extraction alternative et une instrumentation PCR. La LoD (limite de détection) de l'essai de comparaison a été montré équivalent à l'essai CDC et donc adéquat pour l'évaluation de la performance clinique pour l'Allplex™ 2019-nCoV Assay.

Les résultats des tests sur les échantillons des voies respiratoires supérieures, y compris les échantillons sur écouvillonnage du nasopharynx + oro-pharyngé, ont généré un pourcentage de concordance positif (PPA) : 100.00% (49/49) [95% CI : 92.75% ~ 100.00%], et un pourcentage de concordance négatif (NPA) : 93.07% (94/101) [95% CI : 85.76% ~ 96.93%]. Les résultats des tests d'échantillons des voies respiratoires inférieures (crachat) ont généré un pourcentage de concordance positif (PPA) : 100.00% (49/49) [95% CI : 92.75% ~ 100.00%], et un pourcentage de concordance négatif (NPA) : 96.84% (92/95) [95% CI : 90.39% ~ 99.18%]

### 3. Spécificité

La réactivité croisée de Allplex™ 2019-nCoV Assay a été testée en utilisant 50 matériaux et organismes standard comme indiqué ci-dessous. Des cibles spécifiques conçues pour la détection ont été identifiées par Allplex™ 2019-nCoV Assay.

N°	Organisme	Source	N° isolat	Résultat
1	human coronavirus HKU1	Isolat d'origine coréenne		Non détecté
2	human coronavirus OC43	Isolat d'origine coréenne		Non détecté
3	human coronavirus NL63	Isolat d'origine coréenne		Non détecté
4	Human Severe Acute Respiratory Syndrom, SARS	Isolat clinique		E gene détecté
5	Human Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus : MERS-CoV	Isolat clinique		Non détecté
6	human coronavirus 229E	ATCC	VR-740	Non détecté
7	influenza A virus (H1N1)	ATCC	VR-95 (H1N1)	Non détecté
8	influenza A virus (H3N2)	ATCC	VR-547	Non détecté
9	Influenza B virus	ATCC	VR-523	Non détecté
10	Human Rhinovirus 1	KBPV	VR-81	Non détecté
11	Rhinovirus 21	KBPV	VR-40	Non détecté
12	Human rhinovirus type 90	ATCC	VR-1291	Non détecté
13	Human rhinovirus type 16	ATCC	VR-283	Non détecté
14	Human rhinovirus type 42	ATCC	VR-338	Non détecté
15	Human rhinovirus type 8	ATCC	VR-488	Non détecté
16	Human rhinovirus type 14	ATCC	VR-284	Non détecté
17	Human enterovirus type 68	ATCC	VR-1826	Non détecté
18	Human enterovirus type 70	ATCC	VR-836	Non détecté
19	Human enterovirus type 71	ATCC	VR-784	Non détecté
20	Human respiratory syncytial virus A	ATCC	VR-26	Non détecté
21	Human respiratory syncytial virus B	ATCC	VR-955	Non détecté
22	Parainfluenza 1 virus	ATCC	VR-1380	Non détecté
23	Human parainfluenza virus 2	ATCC	VR-92	Non détecté
24	Human parainfluenza virus 3	ATCC	VR-93	Non détecté
25	Human parainfluenza 4 virus 4a	ATCC	VR-1378	Non détecté
26	Human parainfluenza virus 4b	ATCC	VR-1377	Non détecté
27	Human Metapneumovirus (MPV)	KBPV	VR-87	Non détecté
28	Human adenovirus 1	ATCC	VR-1	Non détecté
29	Human adenovirus 11	KBPV	VR-63	Non détecté
30	Human adenovirus 18	ATCC	VR-1095	Non détecté
31	Human adenovirus 23	ATCC	VR-1101	Non détecté
32	Human adenovirus 3	ATCC	VR-3	Non détecté
33	Human adenovirus 4	ATCC	VR-1572	Non détecté
34	Human adenovirus 8	ATCC	VR-1368	Non détecté
35	Human adenovirus type 31	ATCC	VR-1109	Non détecté
36	Human adenovirus type 40	ATCC	VR-931	Non détecté
37	Human adenovirus type 5	KBPV	VR-61	Non détecté
38	Human adenovirus type 35	ATCC	VR-718	Non détecté
39	Human Bocavirus (HBoV)	Isolat d'origine coréenne		Non détecté
40	<i>Legionella pneumophila</i> Serotype 2	ATCC	33154	Non détecté
41	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i> Serotype 4	ATCC	33156	Non détecté
42	<i>Legionella pneumophila</i> Serotype 7	ATCC	33823	Non détecté
43	<i>Legionella pneumophila</i> Serotype 10	ATCC	43283	Non détecté
44	<i>Legionella pneumophila</i> Serotype 11	ATCC	43130	Non détecté
45	<i>Legionella pneumophila</i> Serotype 12	ATCC	43290	Non détecté
46	<i>Legionella pneumophila</i> Serotype 13	ATCC	43736	Non détecté
47	<i>Legionella pneumophila</i> Serotype 14	ATCC	43703	Non détecté
48	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i> Serotype 15	ATCC	35251	Non détecté
49	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC	15293	Non détecté
50	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> M129-B7	ATCC	29342	Non détecté

## RÉSOLUTION DES PROBLÈMES

Allplex™ 2019-nCoV Assay		
OBSERVATION	CAUSES PROBABLES	SOLUTION
Aucun signal	Les fluorophores pour l'analyse des données ne sont pas conforme au protocole	Sélectionnez les fluorophores appropriés pour l'analyse des données et exportez à nouveau les données. Il n'est pas nécessaire de répéter le test dans ce cas.
	Réglage incorrect du thermocycleur en temps réel	Vérifiez les conditions de cyclage thermique et répétez le test avec les paramètres corrects.
	Stockage incorrect ou dépassement de la date d'expiration du kit de test	Veillez vérifier les conditions de stockage et la date de péremption (se reporter à l'étiquette) du kit de test et utilisez si besoin un nouveau kit.
	Échec de l'extraction des acides nucléiques	Aucun signal incluant IC indiquant la perte d'acide nucléique pendant l'extraction. Veillez à utiliser la méthode d'extraction recommandée. Si les inhibiteurs en sont la cause, extrayez à nouveau l'échantillon d'origine ou diluez l'échantillon (1/3 à 1/10) dans un tampon salin et répétez le test à partir de l'étape d'extraction.
Aucun signal de contrôle interne	Charge élevée d'acide nucléique de l'agent pathogène	Si le signal pathogène cible est observé mais pas l'IC, l'amplification de l'IC peut avoir été inhibée par un titre élevé de pathogène cible. Afin de confirmer le signal IC, veuillez diluer l'échantillon (1/3 à 1/10) dans une solution saline et répéter le test depuis l'étape d'extraction.
	Présence d'inhibiteur de PCR-RT	Veillez diluer l'échantillon (1/3 à 1/10) dans un tampon salin et répétez le test à partir de l'étape d'extraction.
Faux positif supposé ou signaux cible observés dans le Contrôle négatif	Contamination	Décontaminez toutes les surfaces et tous les instruments avec de l'hypochlorite de sodium et de l'éthanol. Utilisez uniquement des pointes à filtre tout au long de la procédure et changez les pointes entre les tubes. Répétez toute la procédure depuis l'extraction des acides nucléiques avec le nouvel ensemble de réactifs.
Faux négatif supposé ou absence de signal observé dans le Contrôle positif	Erreur de collecte de l'échantillon	Vérifiez la méthode de collecte de l'échantillon et prélevez à nouveau l'échantillon.
	Stockage incorrect de l'échantillon	Prélevez à nouveau l'échantillon et répétez l'ensemble de la procédure. Assurez-vous que l'échantillon est conservé comme recommandé.
	Erreur d'extraction des acides nucléiques	Vérifiez la procédure d'extraction des acides nucléiques ainsi que la concentration des acides nucléiques et extrayez à nouveau les acides nucléiques.
	Erreur lors de l'ajout de l'acide nucléique dans les tubes de PCR correspondants	Vérifiez le nombre d'échantillons de tubes contenant de l'acide nucléique et assurez-vous d'ajouter de l'acide nucléique dans les tubes de PCR appropriés et répétez soigneusement le test si nécessaire.
	Présence d'inhibiteur	Veillez diluer l'échantillon (1/3 à 1/10) dans un tampon salin et répétez le test à partir de l'étape d'extraction.
	Mélange de PCR incorrect	Confirmez que tous les composants sont ajoutés au mélange de PCR-RT (la sensibilité est compromise avec le pré-mélange pré-composé). Tous les réactifs doivent être homogénéisés et centrifugés avant utilisation.
Pointes dans tous les cycles de la courbe d'amplification	Bulle dans le tube de PCR	Centrifugez le tube de PCR avant le cycle.

## LÉGENDE DES SYMBOLES

Symbole	Explication
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device
	Code de lot
	Numéro du catalogue
	Utilisé en date
	Limite supérieure de température
	Mélange d'oligonucléotides pour amplification et détection
	Mélange d'enzymes
	Tampon
	RNase-free Water
	Contrôle positif (PC)
	Contrôle interne (IC)
	Consultez les instruction pour une utilisation
	Fabricant
	Date de fabrication
	Représentant habilité dans l'Union Européenne
	Attention
	Contient suffisamment pour <n> tests