

## MANUEL D'UTILISATION

# Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants

Cat. N° BIOTK125 - 500 réactions

**Criblage des variants 20I/501Y.V1 (anglais), 20H/501Y.V2 (sud-africain) et 20J/501Y.V3 (brésilien) du SARS-CoV-2 par RT-PCR en temps réel (qRT-PCR) avec contrôle positif interne (IPC) exogène**

### HUMAIN

#### Types de prélèvements

- Ecouvillonnage naso-pharyngé profond (ENP) ou oral

#### Extractions des acides nucléiques (AN) recommandées par BioSella

- Billes magnétiques (ex: BioSella – BioExtract® SuperBall® Cat. N° BES384, BioSella – BioExtract® Premium Mag Cat. N° BEPM96, BEPM1K, BEPM5K)
- Colonnes de silice (ex : BioSella – BioExtract® Column Cat. N° BEC050 ou BEC250)

*Pour le Diagnostic in vitro*





## RENSEIGNEMENTS ADMINISTRATIFS

### **Nom et adresse du responsable de la mise sur le marché et du fabricant :**

BioSellal, Bâtiment B, 27 chemin des Peupliers, 69570 Dardilly, France  
Tél.: +33 (0)4.26.78.47.60 Fax +33 (0)4.78.44.10.68

### **Lieu de fabrication, de contrôle et de conditionnement :**

BioSellal, Bâtiment B, 27 chemin des Peupliers, 69570 Dardilly, France

## GESTION DES DOCUMENTS

Le Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants dispose de deux manuels techniques :

- Un manuel d'extraction commun aux Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants, Bio-T Kit® TriStar Covid-19 et Bio-T Kit® 4Plex Covid & Flu, détaillant pour chaque type de prélèvement les méthodes d'extractions proposées ou validées par BioSellal.
- Un manuel d'utilisation du Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants, détaillant les différentes étapes de préparation de la qRT-PCR.

Les dernières versions en vigueur de chacun des deux documents figurent dans le certificat d'analyse (CA) fourni avec le Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants.

En plus de ces 2 manuels, le manuel de vérification des performances du Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants est disponible sur demande, contacter BioSellal (contact@biosellal.com).

## Etiquettes du kit

**HUMAN**

Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants

REF BIOTK125

▽ 500 tests

LOT UKN501Y-RDE03

02/2022

<-16°C

CE For *in vitro* diagnostic IVD

**bioseal**

27 chemin des peupliers 69570 Dardilly, France  
 ☎ +33 4 26 78 47 60 ✉ contact@bioseal.com  
 www.bioseal.com

Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants

**A**

Master Mix

REF BIOTK125

▽ 500 tests

LOT UKN501Y-RDE03

02/2022

<-16°C

**bioseal**

Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants

**B**

IPC

EXTRACTION

REF BIOTK125

▽ 500 tests

LOT UKN501Y-RDE03

02/2022

<-16°C

**bioseal**

Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants

**C**

H<sub>2</sub>O & EPC

+ NA

REF BIOTK125

▽ 500 tests

LOT UKN501Y-RDE03

02/2022

<-16°C

**bioseal**

Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants

**EPC**

REF EPCUKN501Y-A

LOT UKN501Y-RDE01

02/2022

<-16°C

+ NA

**bioseal**

Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants

BIOTK125

**Master Mix**

REF MMUKN501Y-A

LOT UKN501Y-RDE03

02/2022

Mix

<-16°C

▽ 500

**bioseal**

**IPC**

REF IPCTRISTAR-B

LOT IPCTRISCOV-20210226

02/2023

<-16°C

EXTRACTION

▽ 500

**bioseal**

## GESTION DES REVISIONS

BioSella indique les modifications apportées à ce document en les surlignant selon les règles présentées dans le tableau ci-dessous :

Gestion des révisions			
Type de modification Couleur de Surlignage	Modifications mineures	Modifications majeures 1	Modifications majeures 2
Impact sur la révision/version	Changement de la date de révision du document Pas de changement de version	Changement de la date de révision du document <b>+ changement de version</b>	Changement de la date de révision du document <b>+ changement de version</b>
Impact sur l'adoption de la méthode autorisée	Aucun <i>(sauf en cas d'adoption de nouvelle matrice)</i>	Aucun	<b>Nouvelle adoption nécessaire</b>
Exemples de modifications	Corrections : typographique, grammaticale ou de mise en forme	Changement de référence d'un EPC	Modification de la recette du Master Mix
	Ajout de nouvelles matrices pour l'extraction	Changement de référence d'un IPC exogène	Modification du protocole d'extraction validé
	Ajout d'informations donnant plus de détails ou alternative à un protocole		
	Ajout/Suppression d'informations optionnelles		

## PRESENTATION

### Recommandations pour le prélèvement, l'envoi et la conservation des échantillons

Le Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants est un kit de seconde intention permettant le criblage des variants 20I/501Y.V1 (anglais), 20H/501Y.V2 (sud-africain) et 20J/501Y.V3 (brésilien) du SARS-CoV-2 à partir d'acides nucléiques préalablement extraits et statué pour le SARS-CoV-2 à l'aide d'un kit de screening tel que le Bio-T kit® TriStar Covid-19.

Aussi, pour les modalités de prélèvement, d'envoi et de conservation des échantillons se référer aux manuels d'utilisation du Bio-T kit® TriStar Covid-19.

### Description du Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants

Le **Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants** (Cat. N° BIOTK125) contient un **Master Mix RT-PCR one-step prêt à l'emploi**, permettant de **détecter dans le même puits réactionnel**, la présence :

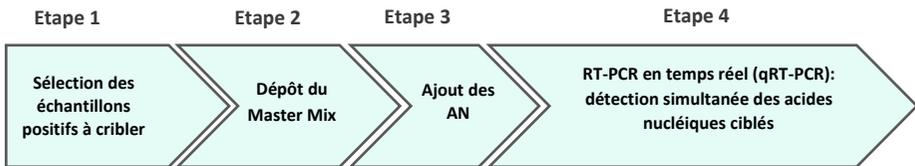
- **Du gène E des virus du genre Sarbecovirus, incluant le SARS-CoV-2** grâce à un marquage TEXAS RED,
- **De la mutation N501Y du gène S** (commune aux variants 20I/501Y.V1 (anglais), 20H/501Y.V2 (sud-africain) et 20J/501Y.V3 (brésilien) du SARS-CoV-2) grâce à un marquage VIC,
- **De la délétion Δ69-70 du gène S** spécifique du variant 20I/501Y.V1 (anglais) ou du variant ΔFVI-spike (découvert au Danemark chez le vison) grâce à un marquage 6-FAM,
- **D'un contrôle positif interne exogène IPC**, grâce à un marquage Cy5. Il permet de valider la bonne conservation de l'acide nucléique (absence de dégradation) ainsi que l'absence d'inhibition de la réaction d'amplification. Pour rappel, l'IPC exogène est à ajouter lors de l'extraction des acides nucléiques en amont du kit de screening (tel que le Bio-T kit® TriStar Covid-19). A défaut, il peut également être ajouté dans le MasterMix.

## MODALITES DE GESTION DU RISQUE RELATIF A L'UTILISATION DU KIT ET D'ELIMINATION DES REACTIFS

La mise en œuvre du protocole de RT-PCR associé au Bio-T Kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants ne génère aucun risque pour le manipulateur et l'environnement. Toutefois, il est recommandé d'éviter tout contact entre les réactifs et la peau. En cas de contact, laver abondamment à l'eau puis contacter un médecin.

Il est à noter que la mise en œuvre des protocoles d'extraction associés au Bio-T® kit SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants génère un risque chimique et biologique pour le manipulateur et l'environnement. Se référer à la notice d'extraction du Bio-T Kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants ainsi qu'aux fiches de données de sécurité des produits utilisés pour plus d'informations.

### Description des étapes à suivre de l'échantillon jusqu'au résultat de qRT-PCR



Manuel d'utilisation du Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants		
Master Mix prêt à l'emploi MMUKN501Y-A	Echantillons NC/NCS Témoin positif de processus EPC (EPCUKN501Y-B)	Détecteurs : FAM/VIC/TEXAS RED/Cy5 Référence passive : <b>Aucune</b> Programme : UK & N501Y Variants en ramping Standard

## Contenu du kit et conditions de conservation

Tableau 1. Descriptif du contenu du kit				
Description	Référence	Volume /tube	Présentation	Conservation
<b>Master Mix (MM)</b> Prêt à l'emploi	MMUKN501Y-A	7500 µl	tube bouchon gris Sachet A	≤-16°C à l'abri de la lumière, Zone « MIX »
<b>Internal Positive Control (IPC) exogène</b> Contrôle d'amplification exogène	IPCTRISTAR-B	2500 µl	tube bouchon gris Sachet B	≤-16°C Zone « Extraction »
<b>External Positive Control (EPC)</b> Contrôle positif d'amplification du SARS-CoV-2, incluant la mutation N501Y et la délétion Δ69-70 du gène S	EPCUKN501Y-B	200 µl	tube bouchon rouge Sachet C	≤-16°C Zone « Ajout d'acides nucléiques »
<b>Eau</b> RNase/DNase free	Aqua-A	1 ml	tube bouchon bleu Sachet C	5°C ± 3 ou ≤-16°C Zone « Ajout d'acides nucléiques »

Les réactifs du kit sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le sachet, sous réserve du bon respect des conditions de conservation.

## Liste des consommables et réactifs non fournis dans le kit

Tableau 2. Consommables et réactifs non fournis dans le kit			
Consommable / Réactif	Description	Fournisseur	Cat. N°
Tampon ATL	Tampon de Lyse	BioSellal	ATL19076
BioExtract® Column	Kit d'extraction ADN/ARN format colonne (50)	BioSellal	BEC050
BioExtract® Column	Kit d'extraction ADN/ARN format colonne (250)	BioSellal	BEC250
BioExtract® SuperBall®	Kit d'extraction ADN/ARN format billes magnétiques (4 x 96)	BioSellal	BES384
BioExtract® Premium Mag	Kit d'extraction ADN/ARN format billes magnétiques	96	BEPM96
		1 000	BEPM1K
		5 000	BEPM5K

Pour les consommables liés au thermocycleur, se reporter au manuel d'utilisation de l'appareil.

## Liste des réactifs de vérification des performances

Pour les adoptions de qRT-PCR, les ARN transcrits du *gène E* et du *gène S* muté SARS-CoV-2 (titrés en nombre de copies/RT-PCR) utilisés par BioSellal pour la validation sont requis.

BioSellal commercialise ces réactifs sous les références suivantes :

Tableau 3. Réactifs en option*			
Réactif	Description	Fournisseur	Cat. N°
ARN SARS-CoV-2 <i>gène E</i>	ARN <i>gène E</i> SARS-CoV-2 quantifié	BioSellal	cARN-ESARS-001
ARN SARS-CoV-2 <i>gène S</i> muté	ARN <i>gène S</i> muté quantifié	BioSellal	cARN-UKSARS-001

\*Ces réactifs sont disponibles uniquement sur demande, contacter BioSellal (contact@biosellal.com).

## Principales précautions à appliquer

- Porter les équipements de protection individuelle appropriés (*a minima* : blouse, gants jetables, voire lunettes de protection, masque FFP3 selon les risques infectieux...).
- Travailler dans des zones dédiées et séparées afin d'éviter toute contamination : « Extraction » (stockage des échantillons non extraits, zone avec matériel d'extraction), « MIX » (stockage des Master Mix prêts à l'emploi, préparation de plaques qPCR), « Ajout d'AN » (stockage et addition des acides nucléiques extraits et des contrôles dans la plaque qPCR), « PCR » (zone finale, contenant le(s) thermocycleur(s)).
- Utiliser des équipements dédiés pour chaque zone de travail (gants, blouse, pipettes, vortex ...).
- Décongeler tous les réactifs stockés à  $\leq -16^{\circ}\text{C}$  avant utilisation.
- Vortexer et centrifuger brièvement (centrifugeuse de paillasse) tous les réactifs juste avant utilisation.
- **Les Master-Mix pour RT-PCR one-step sont plus fragiles que les Master-Mix pour PCR. Afin de garantir le maintien de leurs performances, il est obligatoire de décongeler les tubes extemporanément avant leur utilisation, de bien les vortexer juste avant emploi, de les conserver à  $5^{\circ}\text{C} \pm 3$  lors du dépôt et de les recongeler aussitôt après.**
- Utiliser des pointes à filtre.
- Il est recommandé de ne pas excéder 3 cycles de congélation-décongélation des réactifs, des échantillons, des lysats, et des acides nucléiques extraits. Suivant votre utilisation, nous vous préconisons de faire des fractions aliquotes de volume adéquat.
- **Le génome du SARS-CoV-2 est à ARN. Travailler avec de l'ARN étant plus exigeant que de travailler avec de l'ADN (instabilité de l'ARN et omniprésence des RNases), il est recommandé d'appliquer par défaut les précautions liées à l'utilisation de l'ARN:**
  - o Toujours porter des gants et les changer fréquemment notamment après tout contact avec la peau, les paillasses ou le matériel.
  - o Traiter toutes les surfaces et les équipements avec des agents d'inactivation des RNases (disponibles dans le commerce).
  - o Après avoir mis des gants et décontaminé le matériel, minimiser les contacts avec les surfaces et les équipements pour éviter la réintroduction des RNases.
  - o Utiliser des consommables « RNases free ».
  - o Il est recommandé de conserver les ARN réfrigérés pendant la manipulation puis de les congeler dès que possible de préférence à  $\leq -65^{\circ}\text{C}$  ou à défaut à  $\leq -16^{\circ}\text{C}$ .
  - o Ouvrir et refermer individuellement les tubes au fur et à mesure et limiter les durées d'ouverture afin d'éviter le contact avec les RNases présentes dans l'environnement (peau, poussières, surfaces de travail...).

# CRIBLAGE DES VARIANTS 20I/501Y.V1, 20H/501Y.V2 et 20J/501Y.V3 DU SARS-CoV-2 PAR qRT-PCR AVEC LE KIT BIOTK125

## Procédure globale à suivre

### 1) Etablir un plan de plaque définissant la position de chaque échantillon et incluant les contrôles décrits ci-dessous :

- **Contrôle négatif de processus (NCS)** : l'eau (ou PBS) remplace l'échantillon depuis le stade initial d'extraction voire de prétraitement.  
Ce contrôle est obligatoire pour chaque série d'extraction. Il est cependant optionnel pour le Bio-T Kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants puisque l'absence de contamination lors de l'extraction a été vérifiée lors de l'étape de screening.
- **Contrôle négatif d'amplification (NC)** : 5 µl d'eau RNase/DNase free remplace les 5 µl d'extrait d'acides nucléiques au moment du dépôt sur la plaque qRT-PCR. Le tube Aqua-A (bouchon **bleu**) fourni peut être utilisé.  
Ce contrôle est obligatoire en absence de dépôt du NCS.
- **Contrôle positif d'amplification (EPC)** : il s'agit d'ADN synthétique (tube **EPCUKN501Y-B**, bouchon **rouge**), contenant les séquences cibles spécifiques du SARS-CoV-2 incluant la mutation N501Y et la délétion Δ69-70 du *gène S*.  
Ce contrôle est obligatoire sauf en cas d'utilisation d'un témoin positif de processus.

**⚠ ATTENTION :** *En raison de la grande sensibilité de la technique de RT-PCR en temps réel, de bonnes pratiques de laboratoire sont essentielles à la bonne réalisation de ce test. Aussi, il faut veiller à ce que les réactifs ne soient pas contaminés. Pour cela, il est recommandé notamment d'ouvrir et de manipuler le contrôle positif (EPC) dans une zone délimitée, éloignée des autres composants et de prendre les précautions nécessaires pour éviter toute contamination croisée avec des échantillons lors du dépôt sur la plaque. Les contrôles négatifs NC et NCS permettent d'assurer respectivement l'absence de contamination du Master Mix et du process global incluant l'extraction. En cas de positivité de ces contrôles, se reporter au tableau page 13.*

- Si disponible, **Témoin positif de processus « sentinelle », MRI**, un échantillon POSITIF inactivé pour les trois cibles d'intérêt faiblement chargé, est extrait en même temps que les échantillons en un ou plusieurs exemplaires (selon le nombre d'échantillons analysés). Après qRT-PCR, les valeurs de Ct de ce témoin d'extraction seront reportées et suivies dans le temps sur une carte de contrôle. Le fait d'obtenir, après extraction et qRT-PCR, des valeurs de Ct attendues pour les deux valences avec ce témoin positif valide l'ensemble de la méthode. Dans ce cas, l'utilisation de l'EPC livré avec ce kit n'est plus obligatoire.

## 2) Préparation de la plaque

### Dans la zone réservée au « MIX »

1. Après décongélation, vortex et brève centrifugation, **transférer 15 µl de Master Mix MMUKN501Y-A** (tube bouchon **gris**) dans chaque puits d'intérêt (échantillons et contrôles).

⚠ Les Master-Mix pour RT-PCR one-step sont plus fragiles que les Master-Mix pour PCR. Afin de garantir le maintien de leurs performances, il est obligatoire de décongeler les tubes extemporanément avant leur utilisation, de bien les vortexer juste avant emploi, de les conserver à 5°C ± 3 lors du dépôt et de les recongeler aussitôt après.

### Dans la zone dédiée à l'ajout des acides nucléiques

2. **Ajouter 5 µl d'acides nucléiques extraits (ou NC, MRI ou EPC: tube EPCUKN501Y-B, bouchon rouge)** par puits d'intérêt, en veillant à les déposer bien au fond du puits, au contact du Master Mix et en évitant de faire des bulles.

*Note* : dans le cas où l'IPC exogène n'aurait pas été ajouté lors de l'extraction des échantillons, il est possible de l'ajouter au moment de la préparation de la plaque qRT-PCR.

- **Ajouter 1 µl d'IPC (bouchon gris) en plus des acides nucléiques extraits**

- Ou ajouter directement l'IPC (1 µl par réaction) dans un aliquote de Master Mix avant de déposer 16 µl de ce mélange dans chaque puits d'intérêt et d'y ajouter 5 µl d'acides nucléiques extraits.

Le volume réactionnel sera porté à 21 µl final, sans impacter les performances de la qRT-PCR.

3. Filmer la plaque avec le film optique ou fermer les tubes avec les capuchons optiques adaptés.

### Dans la pièce dédiée à l'amplification PCR

4. **Paramétrer le thermocycleur** (voir Tableau 4, Tableau 5, Tableau 6)
5. Il est recommandé de **centrifuger la plaque avant de la positionner dans le thermocycleur**, ceci permettra d'éviter la présence de gouttes sur les parois, d'éliminer au maximum les bulles et de placer les acides nucléiques au contact du Master Mix.
6. Démarrer le programme. Durée de run approximative de 90 min.

## 3) Paramètres de réglage du thermocycleur

Ce kit a été développé sur AriaMx™ (Agilent Technologies, ramping Fast par défaut) et confirmé sur ABI PRISM® 7500 Fast (Applied Biosystems) en ramping standard et sur QuantStudio 5 Real Time PCR system (Applied Biosystems). Il est compatible avec tous les thermocycleurs possédant à *minima* les canaux de lectures 6-FAM, VIC, TEXAS RED et Cy5. Pour plus d'information, contacter notre support technique.

Tableau 4. Configuration du thermocycleur		
	ABI PRISM® 7500 Fast / QuantStudio 5	AriaMx™
<b>Mode</b>	Quantitation – Standard curve	Quantitative PCR, Fluorescence Probe
<b>Ramping</b>	Ramping Standard	Ramping Fast par défaut
<b>Référence passive</b>	<b>AUCUNE</b>	<b>AUCUNE</b>

Tableau 5. Paramètres de réglage du thermocycleur			
Cible	DéTECTEURS		Volume final / puits
	Reporter	Quencher	
<b>Gène E du SARS-CoV-2</b>	TEXAS RED †	NFQ-MGB ou None*	<b>20 µl</b>  = 15 µl Master Mix + 5 µl d'acides nucléiques ou contrôles†
<b>Mutation N501Y du gène S</b>	VIC	NFQ-MGB ou None*	
<b>Délétion SΔ69-70 du gène S</b>	FAM	NFQ-MGB ou None*	
<b>IPC exogène</b>	Cy5	NFQ-MGB ou None*	
à attribuer aux échantillons et contrôles†			

\* Choix variable suivant le modèle de thermocycleur, si besoin contacter le Support Technique de BioSellaal (tech@biosellaal.com)

† Les contrôles sont les NC (eau), NCS (eau extraite), le témoin de processus et EPC.

‡ : selon le modèle du thermocycleur, sélectionner le canal ROX.

Tableau 6. Paramétrage du PROGRAMME UK & N501Y Variants		
Ramping Standard		
Cycles	Temps	Température
1 cycle	20 min	50°C
1 cycle	5 min	95°C
40 cycles	10 sec	95°C
	45 sec + acquisition des données	<b>63°C</b>

## INTERPRETATION DES RESULTATS

Afin d'analyser et d'interpréter les signaux obtenus après qRT-PCR, il est nécessaire de placer la ligne seuil ou « threshold ». Elle doit être positionnée soigneusement afin d'obtenir le résultat le plus reproductible possible entre les différentes manipulations. Pour cela, on utilise un ensemble cohérent de signaux positifs, *a minima* le témoin positif (EPC), et on place la ligne seuil au-dessus du bruit de fond et dans la zone exponentielle d'amplification.

Le cycle seuil, nommé « Ct » ou « Cq » en fonction des thermocycleurs, correspond à l'intersection entre les courbes d'amplification et la ligne seuil. Il permet la mesure relative de la concentration de la cible dans la réaction de RT-PCR lorsqu'un extrait calibré est analysé dans la même série.

La série de qRT-PCR est validée si les contrôles (EPC, MRI, NCS ou NC) fournissent des résultats valides, puis le résultat de chaque échantillon peut être interprété.

# Principaux cas de figures

## Lecture des Contrôles

Tableau 7. Différents scénarios de résultats concernant les contrôles					
	Gènes / Mutations / Délétions			Cibles	Interprétation
	Gène E (TEXAS RED)	Mutation N501Y (VIC)	Délétion SΔ69-70 (FAM)	IPC exogène (Cy5)	
<b>NCS</b> Contrôle Négatif de processus <b>FACULTATIF</b>	Neg	Neg	Neg	Pos <sup>‡</sup>	<b>Validé</b>
	Au moins une des trois valences <b>Pos</b>			Pos <sup>‡</sup>	Contamination avec un échantillon positif lors de l'extraction ou de la préparation de la plaque. Dans ce cas, il est conseillé de renouveler l'extraction des échantillons en y incluant de nouveaux NCS en plus grand nombre puis de renouveler le test de RT-PCR. Si la contamination persiste elle peut venir soit d'une contamination environnementale de vos locaux, soit du Master Mix. La dernière éventualité peut être évaluée en déposant de 24 à 48 points de NC sans autres échantillons ou contrôle sur une plaque de RT-PCR. En cas de positivité de ce test, jeter le tube de Master Mix.
	Neg	Neg	Neg	Neg	Oubli d'ajout de l'IPC exogène ? Extraction défectueuse
<b>NC</b> Contrôle Négatif d'amplification <i>OBLIGATOIRE EN ABSENCE DU NCS</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	<b>Validé</b>
	Au moins une des quatre valences <b>Pos</b>				Contamination avec un échantillon négatif/positif lors de la préparation de la plaque ou contamination du Master Mix. Afin de vérifier cette hypothèse, il est conseillé de déposer 24 à 48 points de NC sans autres échantillons ou contrôle sur une plaque de RT-PCR. En cas de positivité de ce test, jeter le tube de Master Mix.
<b>EPC</b> Contrôle Positif d'amplification du SARS-CoV-2 incluant la mutation N501Y et la délétion SΔ69-70 <b>OBLIGATOIRE</b> <i>EN ABSENCE DU TEMOIN POSITIF DE PROCESSUS</i>	Pos*	Pos*	Pos*	Neg	<b>Validé</b>
	Neg	Neg	Neg	Neg	Problème lors de la qRT-PCR: Erreur de Master Mix ? Oubli de l'EPC ?
	Pos*	Pos*	Pos*	Pos	Contamination lors de la préparation de la plaque par un échantillon.
<b>Témoin positif de processus MRI</b> <b>RECOMMANDE</b> <i>SI DISPONIBLE</i>	Pos <sup>†</sup>	Pos <sup>†</sup>	Pos <sup>†</sup>	Pos <sup>‡</sup>	<b>Validé</b>
	Neg	Neg	Neg	Neg	Problème lors de la qRT-PCR: Erreur de Master Mix ? Oubli d'ajout des acides nucléiques ou dépôt non au contact du Master Mix lors de la préparation de la plaque ? Dérive du processus : extraction et/ou qRT-PCR ? Dégradation de l'échantillon contrôle ?
	Neg	Neg	Neg	Pos <sup>‡</sup>	Dégradation de l'échantillon contrôle ? Dérive du processus : extraction (si ajout de l'IPC dans la qRT-PCR)

\* La valeur de Ct obtenue doit être conforme à la valeur donnée sur le certificat d'analyse (CA).<sup>†</sup> La valeur de Ct doit être comprise dans les limites de la carte de contrôle. <sup>‡</sup> La valeur de Ct obtenue dépend du thermocycleur, de la matrice analysée et des méthodes d'extraction utilisées. La valeur d'IPC déposée directement dans le MasterMix est indiquée sur le certificat d'analyse du lot. Des valeurs d'IPC, obtenues à partir des différentes matrices avec les méthodes proposées par BioSella, sont disponibles sur demande. BioSella recommande au laboratoire de déterminer sa propre valeur maximum de l'IPC tolérée en fonction de sa méthode d'extraction et de son thermocycleur.

## Lecture des Echantillons extraits

Tableau 8. Différents types de résultats pouvant être obtenus pour les échantillons				
Cibles				Interprétation
Gène E (TEXAS RED)	Mutation N501Y (VIC)	Délétion SA69-70 (FAM)	IPC exogène (Cy5)	
Neg	Neg	Neg		<b>Négatif ou Non détecté</b> Erreur de sélection de l'échantillon ? Dégradation de l'échantillon (si ajout de l'IPC dans la qRT-PCR) ?
Pos	Neg	Neg		<b>Détection du génome d'une souche de SARS-CoV-2 non muté N501Y et non délété SA69-70.</b> Détection d'une souche autre que 20I/501Y.V1 (anglais), 20H/501Y.V2 (sud-africain) et 20J/501Y.V3 (brésilien)
Pos	Pos	Neg	Pos*	<b>Détection du génome d'une souche de SARS-CoV-2 muté N501Y et non délété SA69-70.</b> Mutation évocatrice des variants 20H/501Y.V2 (sud-africain) et 20J/501Y.V3 (brésilien)
Pos	Pos	Pos		<b>Détection du génome d'une souche de SARS-CoV-2 muté N501Y et délété SA69-70.</b> Détection du variant 20I/501Y.V1 (anglais)
Pos	Neg	Pos		<b>Détection du génome d'une souche de SARS-CoV-2 délété SA69-70.</b> Résultat évocateur du variant ΔFVI-spike (Danois)
Pos	Pos	Pos		<b>Détection du génome d'une souche de SARS-CoV-2 muté N501Y et délété SA69-70.</b> Détection du variant 20I/501Y.V1 (anglais) Pas de quantification possible. Problème lors de l'ajout de l'IPC exogène ? Présence d'inhibiteurs <sup>1</sup> ? Compétition avec la cible ? Dégradation de l'échantillon ?
Pos ou Neg		Pos	Neg ou Ct>35	<b>Détection du génome d'une souche de SARS-CoV-2 délété SA69-70.</b> Résultat évocateur du variant 20I/501Y.V1 (anglais) ou ΔFVI-spike (Danois). Présence d'inhibiteurs <sup>1</sup> ? Compétition avec la cible ? Dégradation de l'échantillon ?
Pos ou Neg		Neg		<b>Ininterprétable = analyse à refaire</b> Oubli d'addition des acides nucléiques extraits ou dépôt non au contact du Master Mix lors de la préparation de la plaque ? Présence d'inhibiteurs <sup>1</sup> ? Dégradation des acides nucléiques dans l'échantillon ?

\* La valeur de Ct obtenue dépend du thermocycleur, de la matrice analysée et des méthodes d'extraction utilisées. La valeur d'IPC déposé directement dans le MasterMix est indiquée sur le certificat d'analyse du lot. Des valeurs d'IPC, obtenues à partir des différentes matrices avec les méthodes proposées par BioSella sont disponibles sur demande. BioSella recommande au laboratoire de déterminer sa propre valeur maximum de l'IPC tolérée en fonction de sa méthode d'extraction et de son thermocycleur. † En cas de suspicion d'inhibition, 1) Répéter la qRT-PCR en prédiluant les acides nucléiques extraits au 1/10 voire au 1/100 dans de l'eau DNase/RNase free ou 2) Reprendre l'analyse depuis l'extraction.

# PERFORMANCES DU BIO-T KIT® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants

## Caractérisation de la qRT-PCR

### 1) Vérification de la spécificité analytique

#### *In silico*

La spécificité analytique *in silico* a été vérifiée par l'analyse des séquences de l'ensemble des séquences du SARS-CoV-2, disponibles dans les banques de données publiques (GenBank, NCBI) et la réalisation d'alignements à l'aide du logiciel MegAlign Pro (DNASTar® Lasergene®).

La spécificité *in silico* a été confirmée par alignement à l'aide de l'outil en ligne BLAST.

#### Inclusivité expérimentale

Le Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y variants permet d'identifier les mutations N501Y et la délétion Δ69-70 du gène S évocatrices des variants 20I/501Y.V1, 20H/501Y.V2 et 20J/501Y.V3 du SARS-CoV-2. Le système de détection d'amorces et sondes permettant la détection du gène E (TEXAS RED) choisi par BioSella est issu du protocole publié par l'Organisation Mondiale de la Santé datant du 17 janvier 2020. Aussi, la spécificité analytique pour cette cible est garantie par les publications initiales. Pour plus d'information, n'hésitez pas à contacter le support technique de BioSella. La spécificité analytique pour les systèmes d'amorces et sondes permettant la détection de la mutation N501Y et de la délétion Δ69-70 du gène S a été vérifiée sur des souches de virus entier inactivé fournies par le Centre National de Référence (CNR) des virus des infections respiratoires dont la grippe. Le statut de chaque souche a été confirmé par séquençage par le CNR :

- Souche virale inactivée SARS-CoV-2 **Clade 20C** : souche de référence ne présentant pas les mutation N501Y et délétion Δ69-70 du gène S.
- Souche virale inactivée SARS-CoV-2 lineage **20I.501Y.V1** : variant Anglais présentant la mutation N501Y et la délétion Δ69-70 du gène S.
- Souche virale inactivée SARS-CoV-2 lineage **20H/501Y.V2** : variant Sud-Africain présentant la mutation N501Y du gène S.

Données obtenues pour les différentes souches de SARS-CoV-2 testés :

Souche	Résultat			Statut Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants
	Gène E	Mutation N501Y	Délétion Δ69-70	
SARS-CoV-2 Clade 20C	DéTECTÉ	Non DÉTECTÉ	Non DÉTECTÉ	Non Variant
SARS-CoV-2 lineage 20H/501Y.V2	DéTECTÉ	DéTECTÉ	Non DÉTECTÉ	Variant Sud-Africain/Brésilien
SARS-CoV-2 lineage 20I.501Y.V1	DéTECTÉ	DéTECTÉ	DéTECTÉ	Variant Anglais

## Exclusivité expérimentale

L'exclusivité expérimentale a été vérifiée sur des virus, bactéries ou parasites présents dans les mêmes niches écologiques ou conduisant à des pathologies ou signes cliniques similaires à ceux liés à la présence du SARS-CoV-2 disponibles dans l'échantillonnage de BioSella.

### Données brutes obtenues pour les virus, bactéries et parasites testés

Souche	Résultat		
	Gène E	Mutation N501Y	Délétion SΔ69-70
Influenzavirus type A A/California/07/2009NYMC X-179A	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Influenza A virus (H3N2) strain A/Virginia/ATCC6/2012	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Influenza A virus (H3N2) A/Aichi/2/68	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Influenza B virus, Strain B/Taiwan/2/62	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
novel influenza a H1N1 (MBC082)	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human coronavirus 229E	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human coronavirus OC43	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human coronavirus NL63	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human coronavirus HKU1	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i> CM-1	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Enterovirus 68	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Enterovirus 71	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Enterovirus Echovirus 4	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Haemophilus influenzae	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human Adenovirus 1	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human Adenovirus 2	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human Adenovirus 3	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human Adenovirus 4	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human Adenovirus 5	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human Adenovirus 7	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human parainfluenza 2	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
<i>Bordetella holmesii</i> (MBC092)	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
<i>Bordetella parapertussis</i> (MBC007)	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
<i>Legionella pneumophila</i> (MBC031)	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
<i>Moraxella catarrhalis</i> (MBC117)	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (MBC035)	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Parainfluenza 3 (MBC039)	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Parainfluenza 4 a (MBC050)	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Rhinovirus (MBC091)	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Respiratory Syncytial Virus (Subtype A) (MBC041)	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Respiratory Syncytial Virus (Subtype B) (MBC083)	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human Respiratory Syncytial Virus, Strain Long	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human Respiratory Syncytial Virus, 9320	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human Respiratory Syncytial Virus, ATCC-2012-11	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human Respiratory Syncytial Virus, A2	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté

⇒ La spécificité analytique du Bio-T Kit® SARS CoV-2 UK & N501Y Variants a été confirmée expérimentalement sur l'ensemble des souches testées.

## 2) Détermination de la sensibilité analytique : LD<sub>RT-PCR</sub>

La limite de détection de la qRT-PCR (LD<sub>RT-PCR</sub>) correspond au nombre minimal de copies d'acides nucléiques cible détecté par le système dans 95 % des cas.

Elle a été déterminée expérimentalement pour chaque gène ciblé, en utilisant les ARN transcrits du gène *E* et du gène *S* muté présentant la mutation N501Y et la délétion SΔ69-70 du gène *S* du SARS-CoV-2, quantifiés par fluorimétrie en nombre de copies de séquence cible par qRT-PCR (nombre de copies dans 5 µl).

Le Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants est un quadruplex permettant la détection des mutations N501Y et de la délétion Δ69-70 du gène *S* évocatrices des variants 20I/501Y.V1, 20H/501Y.V2 et 20J/501Y.V3 du SARS-CoV-2. Les gènes cibles sont présents à raison d'une copie chacun par génome viral. Aussi, BioSella a déterminé les LD<sub>RT-PCR</sub> lorsque chaque cible est présente avec un ratio équimolaire (1 copie de gène *E* + 1 copies de gène *S* muté présentant la mutation N501Y et la délétion SΔ69-70).

Une première approche par des dilutions sériées de 10 en 10 a permis d'estimer la LD<sub>RT-PCR</sub> entre 10 et 100 copies d'ARN par RT-PCR pour le gène *E* du SARS-CoV-2 et entre 1 et 100 d'ARN par RT-PCR pour le gène *S* muté présentant la mutation N501Y et la délétion SΔ69-70 du SARS-CoV-2. Des gammes de raison 2 sont réalisées de 80 à 2,5 copies par RT-PCR pour chaque cible afin d'encadrer sur 6 dilutions la valeur estimée de la LD<sub>RT-PCR</sub>.

### Plan d'expérience

Nombre de dilutions	Nombre de répliques par dilution et par série	Nombre de séries indépendantes
6	8	3

### Données obtenues pour la valence gène *E* du SARS-CoV-2 :

Nombre de copies /RT-PCR*	Nombre de répliques détectées			Nombre de répliques détectées	Fréquence de détection
	Série 1	Série 2	Série 3		
80	8/8	8/8	8/8	24/24	100 %
40	8/8	8/8	8/8	24/24	100 %
20	5/8	3/8	6/8	14/24	58 %
10	5/8	2/8	3/8	10/24	42 %
5	2/8	1/8	1/8	3/24	13 %
2,5	1/8	0/8	0/8	1/24	4 %

\*L'ARN transcrit du gène *S* muté est également présent en ratio équimolaire (par exemple 10 copies de gène *E* + 10 copies de gène *S* muté)

⇒ **L'approche expérimentale indique que la LD<sub>RT-PCR</sub> à 95 % pour le gène *E* (dernière dilution donnant au minimum 23 résultats positifs / 24) est de 40 copies/RT-PCR.**

Données obtenues pour la valence mutation N501Y du gène S du SARS-CoV-2 :

Nombre de copies /RT-PCR*	Nombre de répliques détectées			Nombre de répliques détectées	Fréquence de détection
	Série 1	Série 2	Série 3		
80	8/8	8/8	8/8	24/24	100 %
40	8/8	8/8	8/8	24/24	100 %
20	8/8	8/8	8/8	24/24	100 %
<b>10</b>	<b>7/8</b>	<b>8/8</b>	<b>8/8</b>	<b>23/24</b>	<b>96 %</b>
5	7/8	8/8	7/8	22/24	91 %
2,5	5/8	3/8	2/8	10/24	42 %

\*L'ARN transcrit du gène E est également présent en ratio équimolaire (par exemple 10 copies de gène E + 10 copies de gène S muté)

⇒ L'approche expérimentale indique que la LD<sub>RT-PCR</sub> à 95 % pour la mutation N501Y du gène S (dernière dilution donnant au minimum 23 résultats positifs / 24) est de 10 copies/RT-PCR.

Données obtenues pour la valence délétion SΔ69-70 du gène S du SARS-CoV-2 :

Nombre de copies /RT-PCR*	Nombre de répliques détectées			Nombre de répliques détectées	Fréquence de détection
	Série 1	Série 2	Série 3		
80	8/8	8/8	8/8	24/24	100 %
40	8/8	8/8	8/8	24/24	100 %
20	8/8	8/8	8/8	24/24	100 %
<b>10</b>	<b>7/8</b>	<b>8/8</b>	<b>8/8</b>	<b>23/24</b>	<b>96 %</b>
5	6/8	8/8	7/8	21/24	88 %
2,5	5/8	3/8	4/8	12/24	50 %

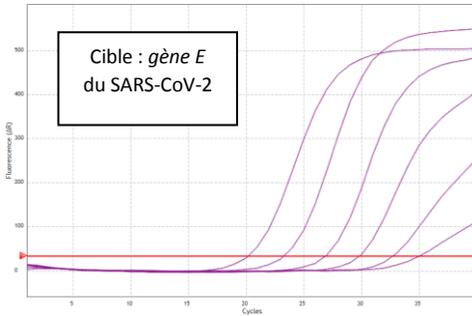
\*L'ARN transcrit du gène E est également présent en ratio équimolaire (par exemple 10 copies de gène E + 10 copies de gène S muté)

⇒ L'approche expérimentale indique que la LD<sub>RT-PCR</sub> à 95 % pour la délétion SΔ69-70 (dernière dilution donnant au minimum 23 résultats positifs / 24) est de 10 copies/RT-PCR.

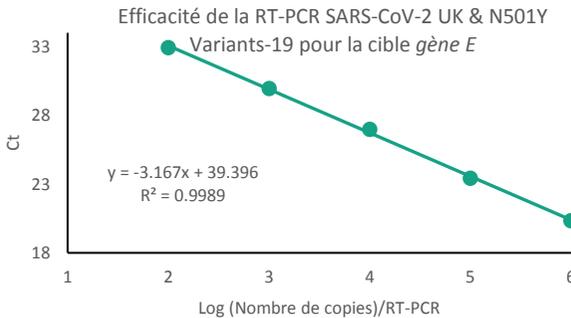
### 3) Efficacité

Les efficacités de chaque qRT-PCR ciblant les gènes du SARS-CoV-2 ont été déterminées à partir de dilutions en série de 10 en 10 des ARN transcrits du SARS-CoV-2 quantifiés par fluorimétrie en nombre de copies de séquence cible par RT-PCR (copies dans 5 µl).

Comme précédemment, l'efficacité a été évaluée lorsque chaque cible est présente avec un ratio équimolaire (1 copie de gène E + 1 copies de gène S muté par exemple).

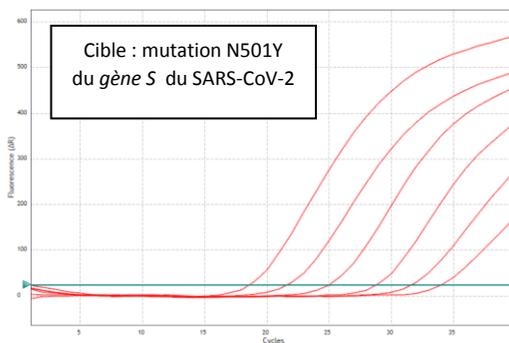


copies/RT-PCR	Ct
$1 \times 10^6$	20,34
$1 \times 10^5$	23,63
$1 \times 10^4$	27,07
$1 \times 10^3$	29,89
$1 \times 10^2$	32,92

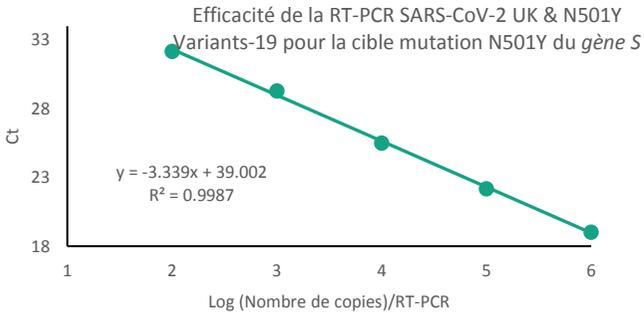


L'efficacité déduite de la pente de la droite est de :  $E = (10 - 1 / \text{pente} - 1) \times 100 = 106,9\%$

⇒ L'efficacité du Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants est de 106,9% pour le gène E du SARS-CoV-2.

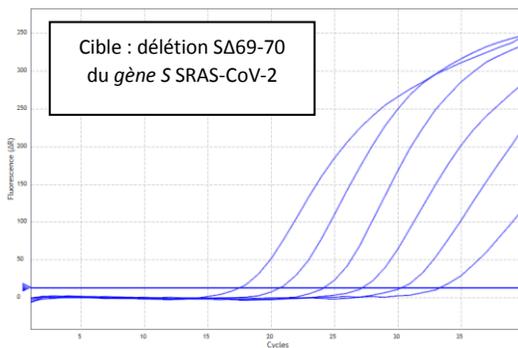


copies/RT-PCR	Ct
$1 \times 10^6$	19,04
$1 \times 10^5$	22,20
$1 \times 10^4$	25,51
$1 \times 10^3$	29,29
$1 \times 10^2$	32,19



L'efficacité déduite de la pente de la droite est de :  $E = (10^{-1}/\text{pente} - 1) \times 100 = 99,3 \%$

⇒ L'efficacité du Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants est de 99,3% pour la mutation N501Y du gène S du SARS-CoV-2.



copies/RT-PCR	Ct
$1 \times 10^6$	20,98
$1 \times 10^5$	24,42
$1 \times 10^4$	27,41
$1 \times 10^3$	30,55
$1 \times 10^2$	33,61

L'efficacité déduite de la pente de la droite est de :  $E = (10^{-1}/\text{pente} - 1) \times 100 = 108,2 \%$

⇒ L'efficacité du Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants est de 108,2% pour la délétion SΔ69-70 du gène S SARS-CoV-2.

#### 4) Répétabilité de la RT-PCR

La répétabilité de la qRT-PCR a été déterminée à partir de dilutions des ARN transcrits du SARS-CoV-2 afin d'obtenir trois niveaux de positivité. Une série indépendante de qRT-PCR a été réalisée en déposant les 3 dilutions en duplicat en suivant le protocole du Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants décrit page 13 (programme UK & N501Y Variants). Le coefficient de variation (CV) de répétabilité des valeurs de Ct a ensuite été déterminé en divisant les écart types par la moyenne selon la formule :

$$CV_{\text{répétabilité}} = \frac{Sr}{M} * 100$$

Où Sr correspond aux écart types de répétabilité, et M à la moyenne générale des valeurs de la série.

Comme précédemment, la répétabilité a été évaluée lorsque chaque cible est présente avec un ratio équimolaire (1 copie de *gène E* + 1 copies de *gène S* muté par exemple).

Données obtenues pour la valence *gène E* du SARS-CoV-2:

	Répétabilité (Ct)			CV% Répétabilité
Positif Fort	23,69	23,75	23,44	0,70
Positif Moyen	29,84	29,88	29,95	0,19
Positif Faible	33,21	33,00	32,92	0,45

⇒ Le coefficient de variation de répétabilité par niveau varie de 0,19 à 0,70% pour la valence *gène E* du SARS-CoV-2.

Données obtenues pour la valence mutation N501Y du *gène S* du SARS-CoV-2:

	Répétabilité (Ct)			CV% Répétabilité
Positif Fort	22,08	22,05	22,20	0,36
Positif Moyen	28,37	28,91	29,29	1,60
Positif Faible	31,57	31,04	32,19	1,82

⇒ Le coefficient de variation de répétabilité par niveau varie de 0,36 à 1,82% pour la valence mutation N501Y du *gène S* du SARS-CoV-2.

Données obtenues pour la valence délétion ΔA69-70 du *gène S* du SARS-CoV-2:

	Répétabilité (Ct)			CV% Répétabilité
Positif Fort	24,42	24,38	24,06	0,81
Positif Moyen	30,55	29,69	30,39	1,51
Positif Faible	33,61	33,40	32,89	1,11

⇒ Le coefficient de variation de répétabilité par niveau varie de 0,81 à 1,51% pour la valence délétion ΔA69-70 du *gène S* du SARS-CoV-2.

## 5) Fidélité intermédiaire de la RT-PCR

La fidélité intermédiaire de la qRT-PCR a été déterminée à partir des ARN du SARS-CoV-2 transcrits afin d'obtenir trois niveaux de positivité.

Trois séries indépendantes ont été réalisées sur deux thermocycleurs, par deux manipulateurs, en déposant pour chaque série les 3 dilutions en triplicat en suivant le protocole du Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants décrit page 13 (programme UK & N501Y Variant). A l'issue de ces trois séries, le coefficient de variation (CV) de fidélité intermédiaires des valeurs de Ct peut être déterminé, sous réserve de positionner la ligne seuil selon des critères communs. La formule de calcul utilisée est :

$$CV_{\text{fidélité intermédiaire}} = \frac{Sr}{M} * 100$$

Où Sr correspond aux écarttypes de fidélité intermédiaire, et M à la moyenne générale des valeurs des trois séries.

Comme précédemment, la fidélité intermédiaire a été évaluée lorsque chaque cible est présente avec un ratio équimolaire (1 copie de *gène E* + 1 copies de *gène S* muté par exemple).

Données obtenues pour la valence *gène E* du SARS-CoV-2:

	Fidélité Intermédiaire (Ct)			CV%
	Ct série 1	Ct série 2	Ct série 3	Fidélité intermédiaire
Positif Fort	23,33	23,48	24,14	1,81
Positif Moyen	27,56	27,70	27,93	0,67
Positif Faible	30,08	31,83	31,78	3,18

⇒ Le coefficient de variation de fidélité intermédiaire par niveau varie de 0,67 à 3,18% pour la valence *gène E* du SARS-CoV-2.

Données obtenues pour la valence mutation N501Y du *gène S* SARS-CoV-2:

	Fidélité Intermédiaire (Ct)			CV%
	Ct série 1	Ct série 2	Ct série 3	Fidélité intermédiaire
Positif Fort	24,36	24,48	24,56	0,41
Positif Moyen	27,24	28,38	31,16	2,12
Positif Faible	30,38	31,16	31,63	2,03

⇒ Le coefficient de variation de fidélité intermédiaire par niveau varie de 0,41 à 2,12% pour la valence mutation N501Y du *gène S* du SARS-CoV-2.

Données obtenues pour la valence délétion Δ69-70 du *gène S* du SARS-CoV-2:

	Fidélité Intermédiaire (Ct)			CV%
	Ct série 1	Ct série 2	Ct série 3	Fidélité intermédiaire
Positif Fort	23,56	23,96	23,84	0,85
Positif Moyen	26,33	28,07	27,37	3,21
Positif Faible	29,75	30,76	30,83	1,99

⇒ Le coefficient de variation de fidélité intermédiaire par niveau varie de 0,85 à 3,21% pour la valence délétion Δ69-70 du *gène S* du SARS-CoV-2.

## 6) Robustesse de la qRT-PCR

La robustesse de la qRT-PCR a été évaluée en analysant le niveau 3 x LD<sub>RT-PCR</sub>, sur six répliques par série et en faisant varier les paramètres critiques de la qRT-PCR utilisés par rapport aux conditions de référence décrit page 13.

Variation des paramètres critiques	
Conditions de référence	5 µl d'acide nucléiques 15 µl de Master Mix Hybridation-Elongation des amorces à 63°C et pendant 45 secondes
pour un volume de 15 µl de Master Mix, variation de ± 10% du volume d'ARN	4.5 µl et 5.5 µl
pour un volume de 15 µl de Master Mix, variation de ± 10% de la durée de l'étape d'hybridation et d'élongation des amorces	40 et 50 secondes

### Données brutes des tests de robustesse :

		AriaMx™ (Agilent Technologies)				
		Conditions de référence	15 µl MM 4.5 µl AN	15 µl MM 5.5 µl AN	15 µl MM 40 sec.	15 µl MM 50 sec.
Valence gène E du SARS-CoV-2	Réplique 1	33,06	32,87	33,33	34,74	34,45
	Réplique 2	33,86	33,38	34,10	35,62	31,91
	Réplique 3	33,61	33,58	32,98	36,02	32,56
	Réplique 4	35,27	33,60	33,25	33,38	32,50
	Réplique 5	34,12	32,82	33,81	33,81	33,92
	Réplique 6	34,34	33,29	33,76	33,16	33,20
Valence mutation N501Y du gène S du SARS-CoV-2	Réplique 1	32,57	33,30	33,65	33,74	33,98
	Réplique 2	34,64	33,83	34,61	33,99	33,67
	Réplique 3	31,95	32,00	35,14	35,00	32,27
	Réplique 4	35,27	33,96	32,27	32,74	30,62
	Réplique 5	33,84	34,52	33,03	32,04	32,64
	Réplique 6	33,89	34,70	34,02	33,99	33,71
Valence délétion SA69-70 du gène S du SARS-CoV-2	Réplique 1	32,53	32,71	34,51	33,55	34,32
	Réplique 2	34,63	31,99	34,96	34,15	32,99
	Réplique 3	31,16	31,74	34,81	33,97	32,18
	Réplique 4	35,75	33,24	32,29	32,37	30,96
	Réplique 5	33,64	35,08	32,79	31,98	32,82
	Réplique 6	33,75	35,32	33,63	34,57	33,59

Les variations de ± 10% du volume d'acides nucléiques et de ± 10% de la durée d'élongation des amorces n'ont pas affecté la sensibilité analytique de la qRT-PCR puisque les six répliques de chacune des trois valences du niveau 3 x LD<sub>RT-PCR</sub> ont fourni un signal Détecté dans 100% des cas.

⇒ **La robustesse du Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants est vérifiée pour les trois valences pour l'utilisation de 15 µl de Master-Mix pour des variations du volume d'acide nucléiques et de la durée de l'étape d'hybridation des amorces et de leur élongation.**

## 7) Confirmation des performances de la qRT-PCR sur d'autres thermocycleurs

Nous avons confirmé les caractéristiques du Bio-T kit® SRAS-CoV-2 UK & N501Y Variants sur 3 thermocycleurs :

- AriaMx™ (Agilent Technologies, ramping Fast par défaut)
- ABI PRISM® 7500 Fast (Applied Biosystems) en ramping standard
- QuantStudio™ 5 Real Time PCR system (Applied Biosystems) en ramping standard

Ces trois thermocycleurs ont été choisis car ils représentent deux marques particulièrement présentes dans les laboratoires d'analyses possédant des systèmes dits ouverts. Ils possèdent une répartition différente des blocs Peltier ainsi que deux méthodes de lecture de la fluorescence différentes (ABI PRISM® 7500 Fast Applied BioSystems, 4 blocs Peltier, caméra CCD avec effet de bord ; AriaMx™ Agilent Technologies et QuantStudio™ 5 Real Time PCR System Applied Technologies, 6 blocs Peltier, lecture par ligne). Le Bio-T kit® Tristar SRAS-CoV-2 UK & N501Y Variants est utilisable sur tout autre thermocycleur possédant *a minima* les canaux de lecture 6-FAM, VIC, TEXAS-RED et Cy5. Dans tous les cas, BioSella recommande au laboratoire utilisateur de vérifier les performances du test sur leurs appareils en vérifiant la détectabilité d'un niveau équivalent à  $3 \times LD_{RT-PCR}$  afin de qualifier leur thermocycleur temps-réel non seulement sur la partie thermique (couverture de l'ensemble des blocs Peltier qui fonctionnent indépendamment), mais également sur la partie optique. Se référer au manuel de vérification des performances du Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants pour plus d'informations.

Pour ce test, le programme utilisé est celui décrit page 13 : programme UK & N501Y Variants.

Pour cela, les ARN de chaque cible du SARS-CoV-2 ont été dilués afin d'atteindre une quantité correspondant à  $3 \times LD_{RT-PCR}$  par réaction, soit  $3 \times LD_{RT-PCR}$  dans 5 µl. Cette quantité est déposée, après dépôt préalable de 15 µl de Master Mix, au minimum en 3 répliques et au moins une réplique par bloc Peltier. Les puits utilisés pour ces confirmations de performances sont ceux correspondants aux positions du bloc thermique vérifiées lors du raccordement métrologique des températures. Comme précédemment, chaque cible est présente avec un ratio équimolaire (1 copie de *gène E* + 1 copie de *gène S* muté par exemple).

### Critères de performances requis pour l'adoption de la qRT-PCR :

Etape	Plan d'expérience			Résultat attendus
	Nombre de niveaux de dilutions*	Nombre de répliques	Nombre de série/ thermocycleur	
<b>Limite de détection LD<sub>RT-PCR</sub></b>	1 = 3 x LD <sub>RT-PCR</sub> soit 120 copies/RT-PCR pour la cible <b>gène E</b>	4 pour l'ABI PRISM® 7500 Fast		<b>100% des résultats positifs</b>
	1 = 3 x LD <sub>RT-PCR</sub> soit 30 copies/RT-PCR pour la cible <b>Mutation N501Y du gène S</b>	6 pour l'AriaMx™	1	
	1 = 3 x LD <sub>RT-PCR</sub> soit 30 copies/RT-PCR pour la cible <b>délétion Δ69-70 du gène S</b>	6 pour le QuantStudio™ 5		

Données obtenues : Fréquence de détection

Critère mesuré	Cible	Nombre de copies / RT-PCR*	QuantStudio 5 en ramping Standard		AriaMx™ (ramping Fast par défaut)		ABI PRISM® 7500 Fast en ramping Standard	
			Nombre de répliques détectées	Fréquence de détection	Nombre de répliques détectées	Fréquence de détection	Nombre de répliques détectées	Fréquence de détection
Limite de détection 3 x LD <sub>RT-PCR</sub>	Gène E du SARS-CoV-2	120	6	100%	6	100%	4	100%
	Mutation N501Y du gène S du SARS-CoV-2	30	6	100%	6	100%	4	100%
	Délétion SA69-70 du gène S du SARS-CoV-2	30	6	100%	6	100%	4	100%

\*L'autre cible est également présente en ratio équimolaire (par exemple 15 copies de gène E + 15 copies de gène S muté)

Les valeurs de 3 x LD<sub>RT-PCR</sub> (= 120 copies/RT-PCR pour la cible gène E et 30 copies/RT-PCR pour les cibles mutations N501Y et délétion SA69-70 du gène S) sont confirmées pour les thermocycleurs ABI PRISM® 7500 Fast en ramping standard, AriaMx™, QuantStudio™ 5 Real Time PCR System.

# Caractérisation de méthode complète pour la matrice de type écouvillon naso-pharyngé profond ou oral

## 1) Limite de détection de la méthode complète

La limite de détection méthode associant l'extraction BioExtract® Premium Mag et le Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants a été déterminée sur des dilutions en série de virus entiers inactivés titrés fournis par le Centre National de Référence (CNR) des virus des infections respiratoires dont la grippe. La LD<sub>METHODE</sub> a été effectuée sur 3 souches de virus inactivées :

- Souche virale inactivée SARS-CoV-2 **Clade 20C** : souche de référence ne présentant pas les mutation N501Y et délétion Δ69-70 du *gène S*.
- Souche virale inactivée SARS-CoV-2 lineage **20I.501Y.V1** : variant Anglais présentant la mutation N501Y et la délétion Δ69-70 du *gène S*.
- Souche virale inactivée SARS-CoV-2 lineage **20H/501Y.V2** : variant Sud-Africain présentant la mutation N501Y du *gène S*.

Une approche de la LD<sub>METHODE</sub> a été effectuée sur 3 concentrations avec 5 réplicats par concentration. La concentration la plus faible avec un taux de détection de 100 % a été sélectionnée pour confirmer la LD<sub>METHODE</sub> sur 20 réplicats. Les extractions ont été effectuées à l'aide du BioExtract® Premium Mag et les amplifications à l'aide du Bio-T kit® SARS CoV-2 UK & N501Y Variants (détail page 13, programme UK & N501Y Variant) sur AriaMx™.

### Résultat de l'approche de la LD<sub>METHODE</sub>

Plan d'expérience :

Nombre de dilutions	Nombre de répliques par série	Nombre de séries indépendantes
3	5	1

Données brutes (valeurs de Ct) de l'approche de la LD<sub>METHODE</sub> pour la souche de référence Clade 20C :

Niveau de positivité		BioExtract® Premium Mag				
		réplique	Ct <i>gène E</i>	Ct Mutation N501Y	Ct Délétion SΔ69-70	Ct IPC
1,66.10 <sup>4</sup> copies/ml d'éluât d'écouvillon	166 copies/qRT-PCR	1	30,95	ND	ND	24,10
		2	30,71	ND	ND	24,56
		3	31,08	ND	ND	24,64
		4	30,74	ND	ND	24,59
		5	32,30	ND	ND	24,63
8,3.10 <sup>3</sup> copies/ml d'éluât d'écouvillon	83 copies/qRT-PCR	1	31,19	ND	ND	24,47
		2	30,66	ND	ND	24,56
		3	33,50	ND	ND	24,64
		4	31,30	ND	ND	24,59
		5	33,61	ND	ND	24,53
1,66.10 <sup>3</sup> copies/ml d'éluât d'écouvillon	42 copies/qRT-PCR	1	35,81	ND	ND	25,41
		2	34,58	ND	ND	25,07
		3	ND	ND	ND	25,26
		4	36,44	ND	ND	25,37
		5	ND	ND	ND	25,33

Données brutes (valeurs de Ct) de l'approche de la LD<sub>METHODE</sub> pour la souche 20H/501Y.V2 (Sud-Africain) :

Niveau de positivité		BioExtract® Premium Mag				
		réplique	Ct <i>gène E</i>	Ct Mutation N501Y	Ct Délétion SΔ69-70	Ct IPC
7,2.10 <sup>4</sup> copies/ml d'éluât d'écouvillon	720 copies/qRT-PCR	1	30,79	31,96	ND	28,20
		2	30,64	32,26	ND	28,29
		3	30,17	32,33	ND	28,03
		4	30,80	32,90	ND	28,34
		5	30,76	32,08	ND	28,16
7,2.10 <sup>3</sup> copies/ml d'éluât d'écouvillon	72 copies/qRT-PCR	1	34,87	35,27	ND	28,09
		2	34,71	34,06	ND	27,87
		3	ND	36,55	ND	28,50
		4	34,38	35,41	ND	28,87
		5	33,13	33,50	ND	28,61
7,2.10 <sup>2</sup> copies/ml d'éluât d'écouvillon	7,2 copies/qRT-PCR	1	ND	ND	ND	28,16
		2	39,06	ND	ND	28,43
		3	36,52	ND	ND	28,48
		4	ND	ND	ND	28,32
		5	35,00	ND	ND	28,70

Données brutes (valeurs de Ct) de l'approche de la LD<sub>METHODE</sub> pour la souche 20I.501Y.V1 (Anglais) :

Niveau de positivité		BioExtract® Premium Mag				
		réplique	Ct <i>gène E</i>	Ct Mutation N501Y	Ct Délétion SA69-70	Ct IPC
5,6.10 <sup>4</sup> copies/ml d'éluât d'écouvillon	560 copies/qRT-PCR	1	31,55	32,32	31,95	28,02
		2	30,69	32,19	31,64	28,19
		3	31,54	32,95	32,75	28,16
		4	31,04	32,68	31,84	28,35
		5	30,60	32,18	32,04	28,33
5,6.10 <sup>3</sup> copies/ml d'éluât d'écouvillon	56 copies/qRT-PCR	1	34,83	38,68	35,61	28,23
		2	33,57	ND	35,73	28,23
		3	34,64	35,97	35,77	28,30
		4	33,80	35,45	34,94	28,49
		5	36,57	33,99	34,76	28,10
5,6.10 <sup>2</sup> copies/ml d'éluât d'écouvillon	5,6 copies/qRT-PCR	1	ND	ND	ND	28,27
		2	ND	38,65	ND	28,16
		3	ND	ND	ND	28,28
		4	ND	ND	ND	28,42
		5	ND	ND	38,88	29,12

- ⇒ Pour la valence *gène E*, la LD<sub>METHODE</sub> approchée est de 8,3.10<sup>3</sup> copies/ml d'éluât d'écouvillon (83 copies/qRT-PCR) sur la souche Clade 20C, 7,2.10<sup>4</sup> copies/ml d'éluât d'écouvillon (720 copies/qRT-PCR) pour la souche 20H/501Y.V2 (Sud-Africain) et de 5,6.10<sup>3</sup> copies/ml d'éluât d'écouvillon (56 copies/qRT-PCR) pour la souche 20I.501Y.V1 (Anglais).
- ⇒ Pour la valence mutation N501Y du *gène S*, la LD<sub>METHODE</sub> approchée est de 7,2.10<sup>3</sup> copies/ml d'éluât d'écouvillon (72 copies/qRT-PCR) pour la souche 20H/501Y.V2 (Sud-Africain) et de 5,6.10<sup>4</sup> copies/ml d'éluât d'écouvillon (560 copies/qRT-PCR) pour la 20I.501Y.V1 (Anglais).
- ⇒ Pour la valence délétion SA69-70 du *gène S*, la LD<sub>METHODE</sub> approchée est de 5,6.10<sup>3</sup> copies/ml d'éluât d'écouvillon (56 copies/qRT-PCR) pour la souche 20I.501Y.V1 (Anglais).

**Résultat de La confirmation de la LD<sub>METHODE</sub>**

La confirmation de la LD<sub>METHODE</sub> a été effectué sur la souche 20I.501Y.V1 (Anglais) car ce sont les conditions les plus défavorables pour chaque valence du fait de la présence des autres cibles dans le même extrait (1 copie de *gène E* + 1 copies de *gène S* muté par exemple). La LD<sub>METHODE</sub> a également été vérifiée sur la souche Clade20C pour la valence *gène E* et sur la souche 20H/501Y.V2 (Sud-Africain) pour les valences *gène E* et mutation N501Y du *gène S*. Ces données sont disponibles sur demande.

**Plan d'expérience :**

Nombre de dilution	Nombre de répliques par série	Nombre d'opérateur	Nombre de séries indépendantes
2	20	1	1

Données brutes (valeurs de Ct) de la confirmation de la LD<sub>METHODE</sub> sur la souche 20I.501Y.V1 (Anglais) :

Niveau de positivité		BioExtract® Premium Mag				
		Réplique	Ct <i>gène E</i>	Mutation N501Y	Délétion SA69-70	Ct IPC
5,6.10 <sup>4</sup> copies/ml d'éluât d'écouvillon	560 copies/qRT-PCR	1	28,55	30,67	31,07	24,60
		2	29,11	30,93	31,41	24,74
		3	29,93	29,82	29,44	24,56
		4	28,65	30,69	30,39	24,20
		5	29,14	31,17	31,04	24,71
		6	28,97	31,00	30,87	24,74
		7	28,70	30,39	30,51	24,29
		8	29,07	31,08	30,99	24,58
		9	29,62	31,18	31,11	24,82
		10	29,71	31,84	32,17	24,46
		11	29,50	31,50	31,78	24,92
		12	29,23	31,13	30,80	24,54
		13	28,96	30,69	31,11	24,63
		14	29,36	30,55	30,47	24,40
		15	29,40	31,34	31,21	24,42
		16	29,05	31,06	30,36	24,41
		17	29,09	31,12	31,23	24,63
		18	29,08	31,05	30,58	24,72
		19	29,33	30,94	31,18	24,84
		20	29,04	31,42	31,15	24,65
5,6.10 <sup>3</sup> copies/ml d'éluât d'écouvillon	56 copies/qRT-PCR	1	31,67	33,85	33,68	25,29
		2	31,79	35,06	35,23	25,21
		3	31,57	32,90	No Cq	25,40
		4	32,11	33,93	35,99	24,89
		5	31,36	33,60	No Cq	25,20
		6	33,25	33,96	34,78	25,36
		7	33,74	34,66	33,03	24,96
		8	31,77	33,21	33,14	25,11
		9	31,86	34,98	32,62	25,11
		10	31,27	33,27	35,1	25,24
		11	33,66	34,26	33,6	25,29
		12	34,93	No Cq	No Cq	25,09
		13	31,49	33,28	34,40	25,07
		14	33,55	34,42	33,74	25,38
		15	32,23	33,78	34,17	24,96
		16	31,05	31,26	30,47	25,20
		17	31,48	34,8	34,3	25,34
		18	32,28	32,96	33,86	25,36
		19	31,75	32,38	34,64	25,04
		20	34,96	33,51	34,32	25,37

⇒ Ainsi, la LD<sub>METHODE</sub> pour le Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants est de 5,6.10<sup>3</sup> copies/ml d'éluât d'écouvillon pour la valence *gène E*, de 5,6.10<sup>4</sup> copies/ml d'éluât d'écouvillon pour les valences mutation N501Y et délétion SA69-70 du *gène S*.

## 2) Spécificité et Sensibilité diagnostiques sur échantillons de statut connu

### α. Premier panel de sensibilité et spécificité diagnostique

La spécificité et la sensibilité diagnostiques du Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y a été déterminée *in vitro* sur 82 échantillons provenant de patients préalablement statués positifs pour le SARS-CoV-2 à l'aide du Bio-T kit® TriStar Covid-19. Les données de criblage de ces échantillons positifs nous ont été transmis par deux laboratoires partenaires utilisant un kit de criblage marqué CE-IVD. Parmi eux, 4 ont été statués variant 20H/501Y.V2 (sud-africain) ou 20J/501Y.V3 (brésilien), 33 ont été statués variant 20I/501Y.V1 (anglais) et 45 ont été statués autres que les variants 20I/501Y.V1, 20H/501Y.V2, 20J/501Y.V3. Ces résultats ont été obtenus sur les trois thermocycleurs AriaMx™ (Agilent Technologies, ramping Fast par défaut), ABI PRISM® 7500 Fast (Applied Biosystems) en ramping standard et sur QuantStudio 5 Real Time PCR system (Applied Biosystems).

Les résultats sont analysés et exprimés :

Pour la spécificité diagnostique (Sp) : en pourcentage de négatifs trouvés parmi les négatifs attendus.

Pour la sensibilité diagnostique (Se) : en pourcentage de positifs trouvés parmi les positifs attendus.

		Statut connu		
		Non variants 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20J/501Y.V3	Mutation évocatrice des variants 20H/501Y.V2 ou 20J/501Y.V3	Variant 20I/501Y.V1
Résultats Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants	Non variants 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20J/501Y.V3	45	0	0
	Mutation évocatrice des variants 20H/501Y.V2 ou 20J/501Y.V3	0	4	0
	Variant 20I/501Y.V1	0	0	33
	<b>Total</b>	<b>45</b>	<b>4</b>	<b>33</b>

⇒ Sur les panels d'échantillons analysés, la spécificité diagnostique est  $Sp = 100\%$ .

⇒ Sur les panels d'échantillons analysés, la sensibilité diagnostique est  $Se = 100\%$ .

## b. Deuxième panel de sensibilité et spécificité diagnostique

Afin de compléter les données de spécificité et sensibilité diagnostique de la méthode complète du Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants, un panel de 110 échantillons positifs pour le SARS-CoV-2 et préalablement statués par séquençage du génome complet (NGS) et un panel de 131 échantillons positifs pour le SARS-CoV-2 et préalablement statués par un kit RT-PCR de criblage marqué CE-IVD, ont été analysés avec notre Bio-T Kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants associé au programme de RT-PCR en temps réel décrit page 13. BioSella remercie particulièrement le Professeur Pierre-Edouard Fournier (laboratoire de l'UMR VITROME de l'IHU – Méditerranée Infection) ainsi que les laboratoires Laborizon Centre (Chambray-lès-Tours), LBM NOVELAB Claude Bernard (Villefranche-sur-Saône) et Medilys (Lons-le-Saunier) pour leur important travail de collecte et d'analyse.

Les résultats sont analysés et exprimés :

Pour la spécificité diagnostique (Sp) : en pourcentage de négatifs trouvés parmi les négatifs attendus.

Pour la sensibilité diagnostique (Se) : en pourcentage de positifs trouvés parmi les positifs attendus.

### Résultats bruts obtenus (valeur de Ct) :

Echantillon	Statut de référence			Résultats Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y				Concordance
	Méthode	Souche	clade	Δ69/70	N501Y	Gène E	Statut	
1	NGS	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)		D	D	D	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	OK
2	NGS	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)		D	D	D	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	OK
3	NGS	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)		D	D	D	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	OK
4	NGS	Variant 20H/501Y.V2 (Sud-Africain)		ND	D	D	Variant 20H/501Y.V2 (Sud-Africain) ou 20I/501Y.V3 (Brésilien)	OK
5	NGS	Variant 20H/501Y.V2 (Sud-Africain) ou 20I/501Y.V3 (Brésilien)		ND	D	D	Variant 20H/501Y.V2 (Sud-Africain) ou 20I/501Y.V3 (Brésilien)	OK
6	NGS	Variant 20H/501Y.V2 (Sud-Africain) ou 20I/501Y.V3 (Brésilien)		ND	D	D	Variant 20H/501Y.V2 (Sud-Africain) ou 20I/501Y.V3 (Brésilien)	OK
7	NGS	Variant 20H/501Y.V2 (Sud-Africain)		ND	D	D	Variant 20H/501Y.V2 (Sud-Africain) ou 20I/501Y.V3 (Brésilien)	OK
8	NGS	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)		D	D	D	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	OK
9	NGS	Variant 20H/501Y.V2 (Sud-Africain)		ND	D	D	Variant 20H/501Y.V2 (Sud-Africain) ou 20I/501Y.V3 (Brésilien)	OK
10	NGS	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)		D	D	D	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	OK
11	NGS	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)		D	D	D	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	OK
12	NGS	Variant 20H/501Y.V2 (Sud-Africain)		ND	D	D	Variant 20H/501Y.V2 (Sud-Africain) ou 20I/501Y.V3 (Brésilien)	OK
13	NGS	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)		D	D	D	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	OK
14	NGS	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)		D	D	D	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	OK
15	NGS	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)		D	D	D	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	OK
16	NGS	Variant 20H/501Y.V2 (Sud-Africain) ou 20I/501Y.V3 (Brésilien)		ND	D	D	Variant 20H/501Y.V2 (Sud-Africain) ou 20I/501Y.V3 (Brésilien)	OK
17	NGS	Variant 20H/501Y.V2 (Sud-Africain) ou 20I/501Y.V3 (Brésilien)		ND	D	D	Variant 20H/501Y.V2 (Sud-Africain) ou 20I/501Y.V3 (Brésilien)	OK
18	NGS	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)		D	D	D	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	OK
19	NGS	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)		D	D	D	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	OK
20	NGS	Variant 20H/501Y.V2 (Sud-Africain)		ND	D	D	Variant 20H/501Y.V2 (Sud-Africain) ou 20I/501Y.V3 (Brésilien)	OK
21	NGS	Non variant 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20I/501Y.V3		ND	ND	D	Non variant 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20I/501Y.V3	OK
22	NGS	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)		D	D	D	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	OK
23	NGS	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)		D	D	D	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	OK











224	Criblage CE	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	D	D	D	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	OK
225	Criblage CE	Non variant 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20I/501Y.V3	ND	ND	D	Non variant 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20I/501Y.V3	OK
226	Criblage CE	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	D	D	D	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	OK
227	Criblage CE	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	D	D	D	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	OK
228	Criblage CE	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	ND	ND	D	Non variant 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20I/501Y.V3	PAS OK
229	Criblage CE	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	D	D	D	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	OK
230	Criblage CE	Non variant 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20I/501Y.V3	ND	ND	D	Non variant 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20I/501Y.V3	OK
231	Criblage CE	Non variant 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20I/501Y.V3	ND	ND	D	Non variant 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20I/501Y.V3	OK
232	Criblage CE	Non variant 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20I/501Y.V3	ND	ND	D	Non variant 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20I/501Y.V3	OK
233	Criblage CE	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	D	D	D	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	OK
234	Criblage CE	Non variant 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20I/501Y.V3	ND	ND	D	Non variant 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20I/501Y.V3	OK
235	Criblage CE	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	D	D	D	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	OK
236	Criblage CE	Non variant 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20I/501Y.V3	ND	ND	D	Non variant 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20I/501Y.V3	OK
237	Criblage CE	Non variant 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20I/501Y.V3	ND	ND	D	Non variant 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20I/501Y.V3	OK
238	Criblage CE	Non variant 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20I/501Y.V3	ND	ND	D	Non variant 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20I/501Y.V3	OK
239	Criblage CE	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	D	D	D	Variant 20I/501Y.V1 (anglais)	OK
240	Criblage CE	Non variant 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20I/501Y.V3	ND	ND	D	Non variant 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20I/501Y.V3	OK
241	Criblage CE	Non variant 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20I/501Y.V3	ND	ND	D	Non variant 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20I/501Y.V3	OK

Données Obtenues :

		Statut connu		
		Non variants 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20J/501Y.V3	Mutation évocatrice des variants 20H/501Y.V2 ou 20J/501Y.V3	Variant 20I/501Y.V1
Résultats Bio-T kit® SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants	Non variants 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20J/501Y.V3	109	0	3
	Mutation évocatrice des variants 20H/501Y.V2 ou 20J/501Y.V3	1	24	0
	Variant 20I/501Y.V1	1	0	101
	△FVI-Spike	0	0	1
	<b>Total</b>	<b>111</b>	<b>24</b>	<b>105</b>

⇒ Sur les panels d'échantillons analysés, la sensibilité diagnostique est:

- Se = 98 % pour les souches non variantes 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20J/501Y.V3

A noter que les 2 résultats divergeant concernent des échantillons dont le statut a été obtenu par un kit de criblage marqué CE IVD. La concordance est de 100% sur les échantillons séquencés.

- Se = 100 % pour les souches 20H/501Y.V2 ou 20J/501Y.V3
- Se = 96 % pour la souche 20I/501Y.V1

A noter que les 4 résultats divergeant concernent des échantillons dont le statut a été obtenu par un kit de criblage marqué CE IVD. La concordance est de 100% sur les échantillons séquencés.

⇒ Sur les panels d'échantillons analysés, la spécificité diagnostique est :

- Sp = 99 % pour les souches non variantes 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20J/501Y.V3
- Sp = 99.5 % pour les souches 20H/501Y.V2 ou 20J/501Y.V3
- Sp = 98 % pour la souche 20I/501Y.V1

## Conclusions

### 1) CARACTERISATION DE LA RT-PCR

<b>Inclusivité expérimentale</b>	Garantie par l'utilisation du système de détection publié par l'OMS pour le <i>gène E</i> . Vérfiée <i>in silico</i> sur l'ensemble des souches présentes en banque et expérimentalement sur des virus entiers inactivés fourni par le CNR.
<b>Exclusivité expérimentale</b>	Vérfiée sur des virus, bactéries présentes dans les mêmes niches écologiques et/ou proches génétiquement.
<b>LD<sub>RT-PCR</sub> à 95%</b>	<i>Gène E</i> du SARS-COV2 : 40 copies d'ARN transcrit par RT-PCR. Mutation N501Y du <i>gène S</i> du SARS-CoV-2: 10 copies d'ARN transcrit par RT-PCR. Déletion 69/70 du <i>gène S</i> du SARS-CoV-2: 10 copies d'ARN transcrit par RT-PCR.  <i>déterminées avec l'autre cible présente en ratio équimolaire</i>
<b>Efficacité de la qRT-PCR</b>	<i>Gène E</i> du SARS CoV-2 : 106,9% Mutation N501Y du <i>gène S</i> du SRAS-CoV-2: 99,3% Déletion Δ69-70 du <i>gène S</i> du SRAS-CoV-2: 108,2%  <i>déterminées avec l'autre cible présente en ratio équimolaire</i>
<b>Coefficient de variation de répétabilité</b>	Varie entre 0,19 et 0,70% pour la valence <i>gène E</i> Varie entre 0,36 et 1,82% pour la valence mutation N501Y du <i>gène S</i> Varie entre 0,81 et 1,51% pour la valence déletion Δ69-70 du <i>gène S</i>  <i>déterminés avec l'autre cible présente en ratio équimolaire</i>
<b>Coefficient de variation de fidélité intermédiaire</b>	Varie entre 0,67 et 3,18% pour la valence <i>gène E</i> Varie entre 0,41 et 2,12% pour la valence mutation N501Y du <i>gène S</i> Varie entre 0,85 et 3,21% pour la valence déletion Δ69-70 du <i>gène S</i>  <i>déterminés avec l'autre cible présente en ratio équimolaire</i>
<b>Robustesse</b>	Vérfiée sur le niveau 3xLD <sub>RT-PCR</sub> en faisant varier :  +/- 10% du volume d'acides nucléiques (4,5-5,5µL) +/- 10% de la durée d'hybridation/élongation (40-50 sec)
<b>Confirmation des performances de la qRT-PCR sur d'autres paramètres ou thermocycleurs.</b>	<u>Programme utilisable :</u>  - Programme UK & N501Y Variants  <u>Thermocycleurs validés :</u>  - AriaMx™ en ramping Fast par défaut - ABI PRISM® 7500 Fast en ramping Standard - QuantStudio™ 5 en ramping Standard

## 2) CARACTERISATION DE LA METHODE COMPLETE

Matrice : ENP	
<b>LD<sub>METHODE</sub></b>	<p style="text-align: center;"><i>Gène E</i> du SARS-COV2 : <math>5,6.10^3</math> copies/ml d'éluât d'écouvillon  Mutation N501Y du <i>gène S</i>: <math>5,6.10^4</math> copies/ml d'éluât d'écouvillon  Déletion 69/70 du <i>gène S</i>: <math>5,6.10^4</math> copies/ml d'éluât d'écouvillon</p>
<b>Sensibilité diagnostique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100 % sur le premier panel de sensibilité (82 échantillons)</li> <li>• Décomposé comme suit sur le second panel de sensibilité (241 échantillons) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 98 % pour les souches non variantes 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20J/501Y.V3</li> <li>- 100 % pour les souches 20H/501Y.V2 ou 20J/501Y.V3</li> <li>- 96 % pour la souche 20I/501Y.V1</li> </ul> </li> </ul>
<b>Spécificité diagnostique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100 % sur le premier panel de spécificité (82 échantillons)</li> <li>• Décomposé comme suit sur le second panel de spécificité (241 échantillons) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 99 % pour les souches non variantes 20I/501Y.V1 20H/501Y.V2, 20J/501Y.V3</li> <li>- 99.5 % pour les souches 20H/501Y.V2 ou 20J/501Y.V3</li> <li>- 98 % pour la souche 20I/501Y.V1</li> </ul> </li> </ul>

Notes :



**27 chemin des Peupliers**

**69570 Dardilly, France**

**[www.biosellal.com](http://www.biosellal.com)**

### **Support Technique**

[tech@biosellal.com](mailto:tech@biosellal.com)

+33 (0) 4 26 78 47 62

### **Renseignements et commandes**

[contact@biosellal.com](mailto:contact@biosellal.com)

+33 (0) 4 26 78 47 60