MANUEL D'UTILISATION

Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV

Cat. N° PREMDX005 - 100 réactions
Cat. N° PREMDX006 - 400 réactions

Détection du coronavirus responsable de la maladie Covid-19 (SARS-CoV-2), des Influenza A&B et des virus VRS A&B par RT-PCR en temps réel (qRT-PCR) avec contrôle positif interne (IPC) endogène

HUMAIN

Types de prélèvements

- Ecouvillonnage naso-pharyngé profond (ENP)

Extractions des acides nucléiques (AN) recommandées par BioSellal

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

Pour le diagnostic in vitro

CE

IVD

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

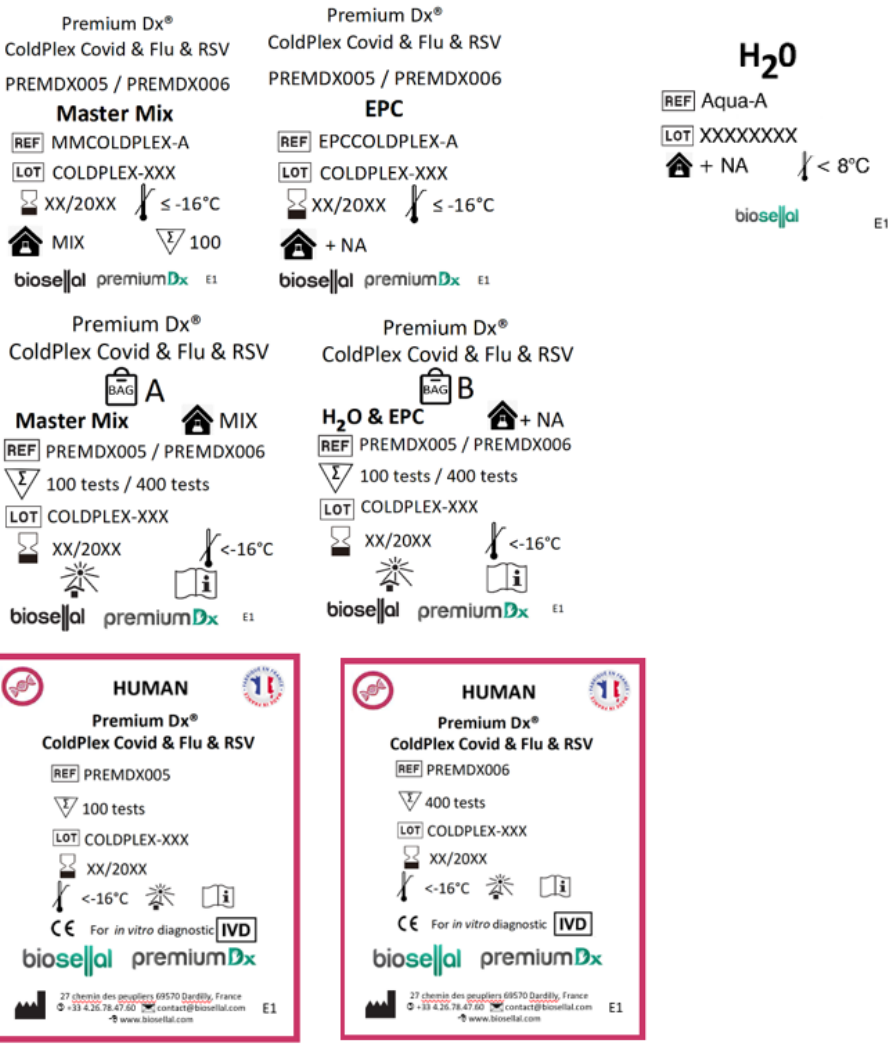
GESTION DES DOCUMENTS

Le Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV dispose de deux manuels techniques :

- Un manuel d'extraction pour les kits liés à la détection des virus respiratoires de la gamme Humain, détaillant pour chaque type de prélèvement les méthodes d'extractions validées ou proposées par BioSellal.
- Un manuel d'utilisation du Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV, 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 Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV.

Etiquettes du kit



GESTION DES REVISIONS

BioSellal 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 + changement de version**	**Changement de la date de révision du document + changement de version**
Impact sur l'adoption de la méthode autorisée	**Aucun** (sauf en cas d'adoption de nouvelle matrice)	**Aucun**	**Nouvelle adoption nécessaire**
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

La technique de RT-PCR en temps réel permet de révéler la présence de très faibles quantités de génome du pathogène. Celui-ci peut être plus ou moins rapidement dégradé selon la nature du pathogène (bactéries/parasites, virus enveloppés ou non...), la nature de son génome (ADN/ARN) et le type de prélèvement (présence de DNase/RNase). Ainsi, BioSellal recommande de suivre les préconisations suivantes pour garantir un diagnostic optimal.

Prélèvements

Conformément à l'avis n° 2020.0020/AC/SEAP du 6 mars 2020 du collège de la Haute Autorité de Santé, les prélèvements nasopharyngés sont à réaliser le cas échéant au domicile du patient par un professionnel de santé autorisé (notamment médecin, biologiste médical, infirmière diplômée d'Etat) et portant les équipements de protection individuelle recommandés.
Afin de prévenir les contaminations croisées entre échantillons pouvant conduire à un résultat faussement positif, il est important d'utiliser du matériel de prélèvement à usage unique et d'éviter un contact direct entre chaque prélèvement.

Envoi

Les prélèvements sont à adresser au laboratoire de biologie médicale dans un conditionnement en triple emballage qui permet d'identifier les échantillons à risque SARS-CoV-2, Influenza ou VRS et de sécuriser le transport conformément aux recommandations de la Société Française de Microbiologie.
Il est impératif d'effectuer l'envoi immédiatement après le prélèvement ou à défaut de le conserver à ≤-16°C. L'envoi doit se faire sous couvert du froid positif en 24h.

Conservation après réception

Les analyses doivent être effectuées à minima dans un laboratoire de sécurité biologique de niveau 2 (LSB2). Traitement des échantillons pour analyse, immédiatement après réception et conservation à 5°C ± 3 durant 5 jours maximum (pour réanalyse ultérieure si nécessaire) puis congélation à ≤ -16°C pour quelques mois et à ≤ -65°C au-delà de 1 an.

Description du Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV

Le **Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV** (Cat. N° PREMDX005/PREMDX006) contient un **Master Mix RT-PCR one-step prêt à l'emploi**, permettant de **détecter dans le même puits réactionnel,** la présence :

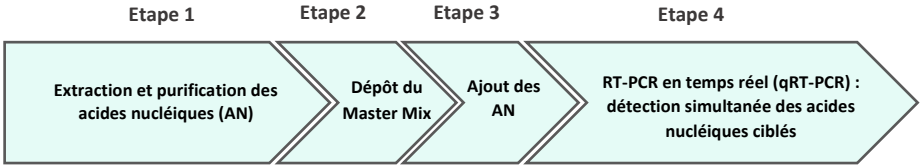
- **Des *gènes E et N* du SARS-CoV-2** grâce à un marquage 6-FAM,
- **Du *gène M* des influenza de type A et B (Influenza A&B)** grâce à un marquage Texas Red,
- **Du *gène N* des virus respiratoires syncitiaux humains de type A et de type B (VRS A&B)** grâce à un marquage VIC,
- D'un **contrôle positif endogène IPC** (RNAse P), grâce à un marquage Cy5, qui permet de confirmer la présence de cellules de l'hôte en quantité suffisante, de valider l'intégrité des acides nucléiques dans l'échantillon et la qualité de l'extraction.

Les méthodes d'extraction validées ou proposées sont décrites dans le manuel d'extraction commun aux kits de détection des virus respiratoires de la gamme HUMAIN.

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

La mise en œuvre du protocole de qRT-PCR associé au Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV 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 Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV génère un risque chimique et biologique pour le manipulateur et l'environnement. Se référer à la notice d'extraction du Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV 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'extraction de la gamme HUMAIN pour la détection des virus respiratoires		Manuel d'utilisation du Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV		
Ecouvillonnage naso-pharyngé profond (ENP)	BioExtract® SuperBall® BioExtract® Premium Mag BioExtract® Column	Master Mix prêt à l'emploi MMCOLDPLEX-A	Echantillons NC/NCS Témoin positif de processus EPC (EPCCOLDPLEX-A)	Détecteurs : FAM/TEXASRED/VIC/Cy5 Référence passive : **Aucune** Programme : COLDPLEX en ramping Standard

Contenu du kit et conditions de conservation

Tableau 1. Descriptif du contenu du kit

Description	Référence	Volume/tube		Présentation	Conservation
		PREMDX005 100 réactions	PREMDX006 400 réactions		
Master Mix (MM) Prêt à l'emploi	MMCOLDPLEX-A	1500 µl	4x1500 µl	Tube bouchon transparent Sachet A	≤-16°C à l'abri de la lumière, Zone « MIX »
External Positive Control (EPC) Contrôle positif d'amplification du SARS-CoV-2, des influenza A&B et des VRS A&B	EPCCOLDPLEX-A	200 µl		Tube bouchon rouge Sachet B	≤-16°C Zone « Ajout d'acides nucléiques »
Eau RNase/DNase free	Aqua-A	1 ml		Tube bouchon bleu Sachet B	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°**
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)	BioSellal	BEPM96
	(1 000)		BEPM1K
	(5 000)		BEPM5K

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

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 zoonotiques…).
- 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 ≤-16°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°C ± 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.
- **Les génomes des pathogènes respiratoires détectés par les kits de la gamme HUMAIN sont 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** :
    - Toujours porter des gants et les changer fréquemment notamment après tout contact avec la peau, les paillasses ou le matériel.
    - Traiter toutes les surfaces et les équipements avec des agents d'inactivation des RNases (disponibles dans le commerce).
    - Après avoir mis des gants et décontaminé le matériel, minimiser les contacts avec les surfaces et les équipements pour éviter la réintroduction des RNases.
    - Utiliser des consommables « RNases free ».
    - Il est recommandé de conserver les ARN réfrigérés pendant la manipulation puis de les congeler dès que possible de préférence à ≤-65°C ou à défaut à ≤-16°C.
    - 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…).

DETECTION DU SARS-CoV-2, DES INFLUENZA A&B ET DES VRS A&B PAR qRT-PCR AVEC LES KITS PREMDX005/PREMDX006

Procédure globale à suivre

1) **Établir un plan de plaque** en 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 voir de prétraitement.
  Ce contrôle est obligatoire pour chaque série d'extraction.

- **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 recommandé lors de la 1ère utilisation du kit ou pour vérifier l'absence de contamination du Master Mix suite à un résultat non conforme avec le NCS.

- **Contrôle positif d'amplification (EPC)** : il s'agit d'ADN synthétique (tube **EPCCOLDPLEX-A**, bouchon **rouge**), contenant les séquences cibles spécifiques du SARS-CoV-2, des influenza A&B et des VRS A&B.
  Ce contrôle est obligatoire sauf en cas d'utilisation d'un témoin positif de processus.

⚠ ATTENTION : *La manipulation du tube EPC représente un risque de contamination, il est recommandé de ne l'ouvrir et de ne le manipuler que 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.*

- Si disponible, **Témoin positif de processus « sentinelle », MRI**, un échantillon POSITIF faiblement chargé inactivé est extrait en même temps que les échantillons en un ou plusieurs exemplaires (selon le nombre d'échantillons analysés). Après qRT-PCR, la valeur de Ct de ce témoin d'extraction sera reportée et suivie dans le temps sur une carte de contrôle. Le fait d'obtenir, après extraction et qRT-PCR, une valeur de Ct attendue 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 MMCOLDPLEX-A** (tube bouchon transparent) 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 NCS, eau, MRI ou EPC** : tube **EPCCOLDPLEX-A,** 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.

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 3, Tableau 4, Tableau 5)
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 et 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 80 minutes.

3) Paramètres de réglage du thermocycleur

Ce kit a été développé sur CFX96 (Bio-Rad, ramping Standard) et confirmé sur AriaMx™ (Agilent Technologies, ramping Fast par défaut) et sur QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems, ramping Standard). 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 3. Configuration du thermocycleur			
	CFX96	**AriaMx™**	**QuantStudio™ 5**
Mode	All Channels	Quantitative PCR, Fluorescence Probe	Quantitation – Standard curve
Ramping	Ramping Standard	Ramping Fast par défaut	Ramping Standard
Référence passive	Aucune	Aucune	Aucune

Tableau 4. Paramètres de réglage du thermocycleur			
Cible	**Détecteurs**		**Volume final / puits**
	Reporter	**Quencher**	
SARS-CoV-2	FAM	NFQ-MGB ou None*	**20 µl** = 15 µl Master Mix + 5 µl d'acides nucléiques ou contrôles†
Influenza A&B	TEXAS RED	NFQ-MGB ou None*	
VRS A&B	VIC	NFQ-MGB ou None*	
IPC endogène	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 BioSellal (tech@biosellal.com)

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

Tableau 5. Paramétrage du PROGRAMME COLDPLEX		
Ramping Standard		
Cycles	Temps	Température
1 cycle	10 min	50°C
1 cycle	5 min	95°C
40 cycles	10 sec	95°C
	45 sec + acquisition des données	60°C

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, Témoin positif de processus, MRI, NCS ou NC) fournissent des résultats valides, puis le résultat de chaque échantillon peut être interprété.

Attention :

Un résultat « Négatif ou Non détecté » pour l'échantillon testé n'exclue pas l'infection par le SARS-CoV-2, les influenza type A ou B ou les VRS type A ou B, et ne doit pas être utilisé comme seule base pour les décisions de prise en charge des patients. Un résultat négatif doit être associé aux observations cliniques, aux antécédents du patient et aux informations épidémiologiques.

Un résultat « Positif ou Détecté » pour l'échantillon testé indique la présence de l'ARN d'un des pathogènes détectés par le kit, cependant, une corrélation clinique avec les antécédents du patient et d'autres informations diagnostiques sont nécessaires pour déterminer le statut d'infection du patient. En outre, un résultat « Positif ou Détecté » n'exclue pas une infection bactérienne ou une co-infection avec d'autres virus.

Principaux cas de figures

Lecture des Contrôles

Tableau 6. Différents scénarios de résultats concernant les contrôles

	Cibles				Interprétation
	SARS-CoV-2 (FAM)	Influenza A&B (TEXAS RED)	VRS A&B (VIC)	IPC endogène (CY5)	
NCS Contrôle Négatif de processus **OBLIGATOIRE**	Neg	Neg	Neg	Neg	Validé
	Au moins une des quatre valences Pos				Contamination par un échantillon 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 autre échantillon ou contrôle, sur une plaque de RT-PCR. En cas de positivité de ce test, jeter le tube de Master Mix.
NC Contrôle Négatif d'amplification **FACULTATIF**	Neg	Neg	Neg	Neg	Validé
	Au moins une des quatre valences Pos				Contamination par un échantillon 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.
EPC Contrôle Positif d'amplification incluant les séquences cibles du SARS-CoV-2, des influenza A&B et VRS A&B. **OBLIGATOIRE** *EN ABSENCE DU TEMOIN POSITIF DE PROCESSUS*	Pos*	Pos*	Pos*	Neg	Validé
	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.
Témoin positif de processus MRI **RECOMMANDE** *SI DISPONIBLE*	Positif pour la valence correspondant au témoin testé†			Pos¥	Validé
	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 ?

* La valeur de Ct obtenue doit être conforme à la valeur donnée sur le certificat d'analyse (CA). † La valeur de Ct doit être comprise dans les limites de la carte de contrôle.

¥ La valeur de Ct obtenue dépend du thermocycleur et des méthodes d'extractions utilisées. Des valeurs d'IPC, obtenues à partir des méthodes validées par BioSellal, sont disponibles sur demande. BioSellal recommande au laboratoire de déterminer sa propre valeur maximum de l'IPC tolérée en fonction de sa méthode d'extraction et de son thermocycleur.

Rappels : L'IPC endogène a pour cible un gène exprimé par les cellules humaines, il ne devrait donc pas être détecté en qRT-PCR à partir des NCS, NC et EPC. Cependant, un léger signal peut être observé pour l'IPC en raison d'une faible contamination par le manipulateur. Ce signal ne doit pas être inférieur à Ct 35.

Lecture des Echantillons extraits

Tableau 7. Différents types de résultats pouvant être obtenus pour les échantillons

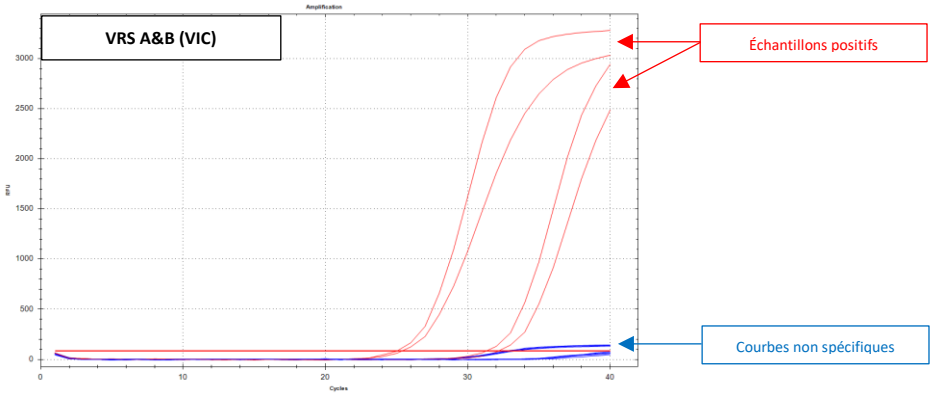
Cibles				
SARS-CoV-2 (FAM)	Influenza A&B (TEXAS RED)	VRS A&B (VIC)	IPC endogène (Cy5)	Interprétation
Neg	Neg	Neg	Pos*	Négatif ou Non détecté
Pos	Neg	Neg		Génome du SARS-CoV-2 détecté
Neg	Pos	Neg		Génome d'influenza type A ou B détecté
Neg	Neg	Pos		Génome du VRS type A ou B détecté
Au moins 2 valences positives₮				Détection des génomes des cibles positives₮
Au moins une valence positive			Neg ou Ct>35	Positif ou Détecté Absence de cellules en quantité suffisante Présence d'inhibiteurs‡ ? Compétition avec la cible ?
Neg	Neg	Neg	Neg ou Ct>35	Ininterprétable = analyse à refaire 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‡ ? Dégradation des acides nucléiques dans l'échantillon ? Problème de prélèvement : quantité de cellules insuffisante Problème lors de l'extraction ?

* La valeur de Ct obtenue dépend du thermocycleur, de la matrice analysée et des méthodes d'extractions utilisées. Des valeurs d'IPC, obtenues à partir des différentes matrices avec les méthodes validées par BioSellal, sont disponibles sur demande. BioSellal recommande au laboratoire de déterminer sa propre valeur maximum de l'IPC tolérée en fonction de sa méthode d'extraction et de son thermocycleur.

ǂ 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.

₮ : Pour la valence VRS type A et B (VIC), un signal peut être observé lorsque la valence SARS-CoV-2 (FAM) est détectée à partir d'un certain niveau de positivité. Ce signal non spécifique peut provoquer l'apparition de courbes au niveau de fluorescence très faible et à l'allure non caractéristique. BioSellal recommande donc de négativer toute courbe de la valence VIC présentant ces caractéristiques lorsqu'un signal en FAM est également observé dans le même puits.

À titre d'exemple, ce genre de courbe est présentée sur la figure ci-dessous (en bleu) en comparaison avec des courbes d'échantillons positifs avec une allure caractéristique (en rouge).



PERFORMANCES DU
PREMIUM DX® ColdPlex Covid & Flu & RSV

Caractérisation de la qRT-PCR

1) Vérification de la spécificité analytique

a. Inclusivité expérimentale

Le Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV permet de détecter le génome du SARS-CoV-2, les influenza de type A&B ainsi que les VRS de type A&B. La spécificité analytique des systèmes d'amorces et sondes a été vérifiée sur des souches de virus entiers inactivés fournies par le Centre National de Référence (CNR) des virus des infections respiratoires dont la grippe (Lyon), ainsi que sur des ARN viraux fournis par l'American Type Culture Collection (ATCC).

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

Souche	Origine	Résultats Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV		
		SARS-CoV-2	Influenza A/B	VRS A/B
SARS-CoV-2 Clade 20C	CNR	Détecté	Non détecté	Non détecté
SARS-CoV-2 lineage 20I.501Y.V1		Détecté	Non détecté	Non détecté
SARS-CoV-2 lineage 20H/501Y.V2		Détecté	Non détecté	Non détecté
SARS-CoV-2 lineage 20I/484Q		Détecté	Non détecté	Non détecté
SARS-CoV-2 lineage 20A.452R B.1.617.2		Détecté	Non détecté	Non détecté
SARS-CoV-2 lineage AY.4.2		Détecté	Non détecté	Non détecté
SARS-CoV (2003)		Détecté	Non détecté	Non détecté

Données obtenues pour les différentes souches d'Influenza A testées :

Souche	Origine	Résultats Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV		
		SARS-CoV-2	Influenza A/B	VRS A/B
Influenza A H3N2 A/Singapore/INIFMIH-16-0019/2016	CNR	Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza A H3N2 A/Hong Kong/8/68		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza A H3N2 A/Port Chalmers/1/73		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza A H3N2 A/Panama/2007/1999		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza A H3N2 A/Wisconsin/67/05		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza A H3N2 A/Brisbane/10/2007		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza A H3N2 A/Wisconsin/12/2010		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza A H3N2 A/Indiana/8/2010		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza A H3N2 A/Texas/50/2012		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza A H1N1 A/Brisbane/2/2018		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza A H1N1 A/PR/8/34		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza A H1N1 A/New Jersey/8/76		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza A H1N1 A/New Caledonia/20/1999		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza A H1N1 A/Solomon Island/3/2006		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza A H1N1 A/Brisbane/59/2007		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza A H1N1 A/California/7/2009		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza A H1N1 A/Solomon Island/3/2006		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza A H1N1 A/Brisbane/59/2007		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza A H1N1 A/California/7/2009		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza A virus strain A/HongKong/8/68	ATCC	Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza A virus (H3N2) A/Aichi/2/68		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza A virus (H1N1pdm) A/California/07/2009 NTMC X-179A		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza A virus (H3N2) strain A/Virginia/ATCC6/2012		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza A virus (H1N1) strain A/Virginia/ATCC1/2009		Non détecté	Détecté	Non détecté

Données obtenues pour les différentes souches d'Influenza B testées :

Souche	Origine	Résultats Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV		
		SARS-CoV-2	Influenza A/B	VRS A/B
Influenza B/Colorado/6/2017	CNR	Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza B/Phuket/3073/2013		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza B/Lee/40		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza B/Panama/45/90		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza B/Florida/07/2004		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza B/Hong Kong/5/72		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza B/Hong Kong/5/72		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza B/Wisconsin/01/2010		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza B/Malaysia/2506/04		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza B/Brisbane/60/2008		Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza B virus strain B/Taiwan/2/62	ATCC	Non détecté	Détecté	Non détecté
Influenza B virus strain B/Lee/40		Non détecté	Détecté	Non détecté

Données obtenues pour les différentes souches de VRS testées :

Souche	Origine	Résultats Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV		
		SARS-CoV-2	Influenza A/B	VRS A/B
VRS A 28-589A P14	CNR	Non détecté	Non détecté	Détecté
VRS B 28-591B P10		Non détecté	Non détecté	Détecté
VRS B VRSB R18-126-79 P3		Non détecté	Non détecté	Détecté
VRS A VRSA R22-106-22 P4		Non détecté	Non détecté	Détecté
VRS B VRSB R22-30-76 P3		Non détecté	Non détecté	Détecté
Respiratory Syncytial Virus (Subtype B) (MBC083)	ATCC	Non détecté	Non détecté	Détecté
Human Respiratory Syncytial Virus long strain (ATCC RSV A VR-26DQ)		Non détecté	Non détecté	Détecté
Human Respiratory Syncytial Virus strain 9320 (ATCC RSV B VR-955D)		Non détecté	Non détecté	Détecté
Human Respiratory Syncytial Virus B strain 18537 (ATCC RSV VR-1580DQ)		Non détecté	Non détecté	Détecté
Human Respiratory Syncytial Virus strain ATCC-2012-11		Non détecté	Non détecté	Détecté

b. 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, des influenza A&B ou des VRS A&B disponibles dans l'échantillothèque de BioSellal.

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

Souche	Origine	Résultats Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV		
		SARS-CoV-2	Influenza A/B	VRS A/B
Rhinovirus (MBC091)	ATCC	Non détecté	Non détecté	Non détecté
Bordetella holmesii (MBC092)		Non détecté	Non détecté	Non détecté
Bordetella parapertussis (MBC007)		Non détecté	Non détecté	Non détecté
Chlamydophila pneumoniae strain CM-1		Non détecté	Non détecté	Non détecté
Haemophilus influenzae		Non détecté	Non détecté	Non détecté
Legionella pneumophilia (MBC031)		Non détecté	Non détecté	Non détecté
Moraxella catarrhalis (MBC117)		Non détecté	Non détecté	Non détecté
Mycoplasma pneumoniae		Non détecté	Non détecté	Non détecté
Salmonella enterica subsp. Enterica serovar Enteritidis strain MZ1486		Non détecté	Non détecté	Non détecté
Human parainfluenza virus 2 strain Greer		Non détecté	Non détecté	Non détecté
Human parainfluenza virus 3		Non détecté	Non détecté	Non détecté
Human parainfluenza virus 4		Non détecté	Non détecté	Non détecté
Human coronavirus 229E		Non détecté	Non détecté	Non détecté
Human coronavirus NL63		Non détecté	Non détecté	Non détecté
MERS Coronavirus		Non détecté	Non détecté	Non détecté
Human coronavirus HKU1		Non détecté	Non détecté	Non détecté
Betacoronavirus 1 strain OC43		Non détecté	Non détecté	Non détecté
Human enterovirus 71 strain BrCr		Non détecté	Non détecté	Non détecté
Enterovirus 68 strain Fermon		Non détecté	Non détecté	Non détecté
Human adenovirus 1 strain Adenoid 71		Non détecté	Non détecté	Non détecté
Human adenovirus 2 strain Adenoid 6		Non détecté	Non détecté	Non détecté
Human adenovirus 3 strain G.B.		Non détecté	Non détecté	Non détecté
Human adenovirus 4 strain RI-67		Non détecté	Non détecté	Non détecté
Human adenovirus 5 strain Adenoid 75		Non détecté	Non détecté	Non détecté
Human adenovirus 6 strain Tonsil99		Non détecté	Non détecté	Non détecté
Human adenovirus 7 strain Gomen		Non détecté	Non détecté	Non détecté

⇨ **La spécificité analytique du Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV a été confirmée expérimentalement sur l'ensemble des souches testées.**

2) Détermination de la sensibilité analytique : $LD_{RT\text{-}PCR}$

La limite de détection de la qRT-PCR ($LD_{RT\text{-}PCR}$) correspond au nombre minimal de copies d'acides nucléiques cibles détecté par le système dans 95 % des cas.

Elle a été déterminée expérimentalement pour chaque gène ciblé en utilisant les ARN transcrits des *gènes E et N* du SARS-CoV-2, des *gènes M* des influenza de type A et B et des *gènes N* des VRS de type A et B quantifiés par fluorimétrie en nombre de copies de séquence cible par qRT-PCR (nombre de copies dans 5 µl).

Une première approche par des dilutions sériées de 10 en 10 a permis d'estimer la $LD_{RT\text{-}PCR}$ entre 1 et 10 copies pour la valence *gènes* E et *N* du SARS-CoV-2, entre 10 et 100 copies pour le *gène M* des influenza de type A&B et le *gène N* des VRS de type A&B. Des gammes de raison 2 sont réalisées de 50 à 1,6 copies/RT-PCR pour les *gènes E-N*, de 300 à 2,35 copies/RT-PCR pour influenza de type A, de 150 à 4,99 copies/RT-PCR pour influenza de type B et VRS de type A, et de 123 à 3,84 copies/RT-PCR pour VRS de type B afin d'encadrer sur 6 à 8 dilutions la valeur estimée de la $LD_{RT\text{-}PCR}$.

Plan d'expérience

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

Données obtenues pour la valence *gènes E-N* 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		
50	8/8	8/8	8/8	24/24	100 %
25	8/8	8/8	8/8	24/24	100 %
12,5	8/8	8/8	8/8	24/24	100 %
6,25	**8/8**	**8/8**	**8/8**	**24/24**	**100 %**
3,13	6/8	6/8	8/8	20/24	83%
1,6	4/8	3/8	6/8	13/24	54%

⇨ **L'approche expérimentale indique que la $LD_{RT\text{-}PCR}$ à 95% pour la valence SARS-CoV-2 (dernière dilution donnant au minimum 23/24 résultats positifs) est de 6,25 copies/RT-PCR.**

Données obtenues pour la valence influenza type A :

Nombre de copies /RT-PCR	Nombre de répliques détectées			Nombre de répliques détectées	Fréquence de détection
	Série 1	Série 2	Série 3		
300	8/8	8/8	8/8	24/24	100%
150	8/8	8/8	8/8	24/24	100%
75	**8/8**	**8/8**	**8/8**	**24/24**	**100%**
37,5	7/8	6/8	8/8	21/24	88%
18,75	7/8	6/8	7/8	20/24	83%
9,38	2/8	3/8	6/8	11/24	46%
4,69	4/8	2/8	5/8	11/24	46%
2,35	0/8	0/8	3/8	3/24	13%

⇨ **L'approche expérimentale indique que la $LD_{RT\text{-}PCR}$ à 95% pour la valence influenza type A (dernière dilution donnant au minimum 23/24 résultats positifs) est de 75 copies/RT-PCR.**

Données obtenues pour la valence influenza type B :

Nombre de copies /RT-PCR	Nombre de répliques détectées			Nombre de répliques détectées	Fréquence de détection
	Série 1	Série 2	Série 3		
150	8/8	8/8	8/8	24/24	100%
75	8/8	8/8	8/8	24/24	100%
37,5	8/8	8/8	8/8	24/24	100%
18,75	**8/8**	**8/8**	**8/8**	**24/24**	**100%**
9,38	5/8	7/8	8/8	20/24	83%
4,99	5/8	5/8	5/8	15/24	63%

⇨ **L'approche expérimentale indique que la $LD_{RT\text{-}PCR}$ à 95% pour la valence influenza type B (dernière dilution donnant au minimum 23/24 résultats positifs) est de 18,75 copies/RT-PCR.**

Données obtenues pour la valence VRS type A :

Nombre de copies /RT-PCR	Nombre de répliques détectées			Nombre de répliques détectées	Fréquence de détection
	Série 1	Série 2	Série 3		
150	8/8	8/8	8/8	24/24	100%
75	8/8	8/8	8/8	24/24	100%
37,50	**7/8**	**8/8**	**8/8**	**23/24**	**96%**
18,75	7/8	8/8	6/8	21/24	88%
9,38	4/8	6/8	6/8	16/24	67%
4,99	1/8	1/8	2/8	4/24	17%

⇨ **L'approche expérimentale indique que la $LD_{RT\text{-}PCR}$ à 95% pour la valence VRS type A (dernière dilution donnant au minimum 23/24 résultats positifs) est de 37,50 copies/RT-PCR.**

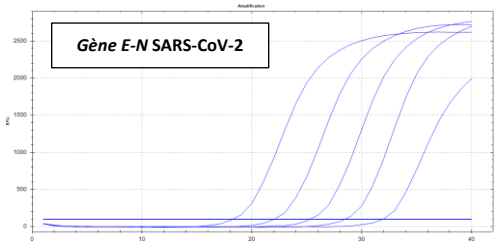
Données obtenues pour la valence VRS type B :

Nombre de copies /RT-PCR	Nombre de répliques détectées			Nombre de répliques détectées	Fréquence de détection
	Série 1	Série 2	Série 3		
123	8/8	8/8	8/8	24/24	100%
61,5	8/8	8/8	8/8	24/24	100%
30,75	8/8	8/8	8/8	24/24	100%
15,38	8/8	8/8	8/8	24/24	100%
7,69	**8/8**	**8/8**	**7/8**	**23/24**	**96%**
3,84	8/8	6/8	7/8	21/24	88%

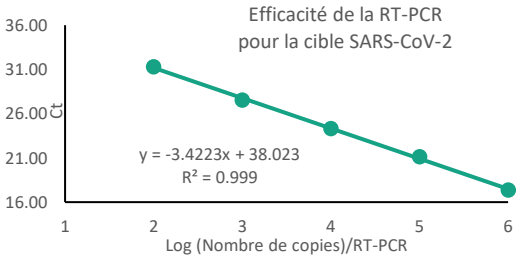
⇨ **L'approche expérimentale indique que la $LD_{RT\text{-}PCR}$ à 95% pour la valence VRS type B (dernière dilution donnant au minimum 23/24 résultats positifs) est de 7,69 copies/RT-PCR.**

3) Efficacité

Les efficacités de chaque qRT-PCR pour les différentes valences ont été déterminées à partir des dilutions en série de 10 en 10 des ARN transcrits quantifiés par fluorimétrie en nombre de copies de séquence cible par RT-PCR (copies dans 5 µL).

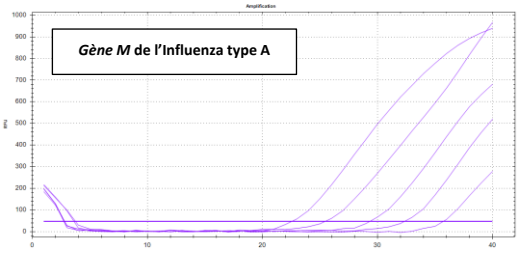


Copies/RT-PCR	Ct
1 x 10 ^{6}	17,38
1 x 10 ^{5}	21,14
1 x 10 ^{4}	24,31
1 x 10 ^{3}	27,55
1 x 10 ^{2}	31,29

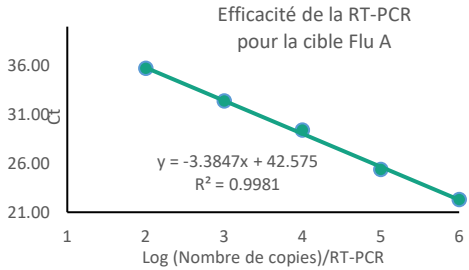


L'efficacité déduite de la pente de la droite est de : E = (10-1/pente -1) x 100 = 96,0%.

⇨ **L'efficacité du Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV est de 96,0% pour la valence SARS-CoV-2.**

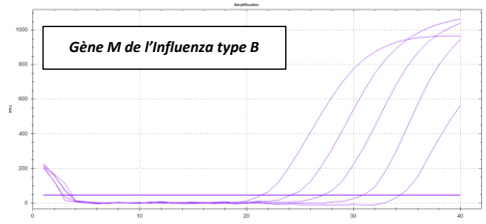


Copies/RT-PCR	Ct
1 x 10 ^{6}	22,30
1 x 10 ^{5}	25,38
1 x 10 ^{4}	29,40
1 x 10 ^{3}	32,39
1 x 10 ^{2}	35,72

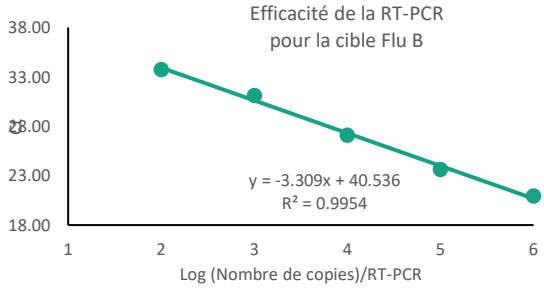


L'efficacité déduite de la pente de la droite est de : E = ($10^{-1/pente}$ -1) x 100 = 97,4%.

⇨ **L'efficacité du Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV est de 97,4% pour la valence influenza type A.**

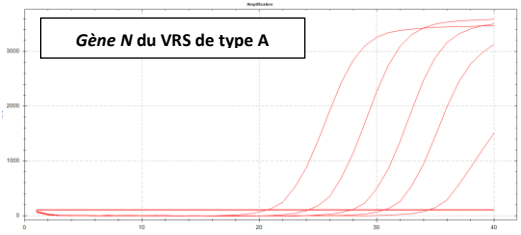


Copies/RT-PCR	Ct
1 x 10 ^{6}	20,93
1 x 10 ^{5}	23,63
1 x 10 ^{4}	27,10
1 x 10 ^{3}	31,10
1 x 10 ^{2}	33,74

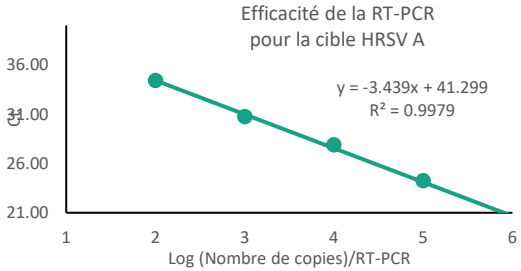


L'efficacité déduite de la pente de la droite est de : E = ($10^{-1/pente}$ -1) x 100 = 100,5%.

⇨ **L'efficacité du Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV est de 100,5% pour la valence influenza type B.**

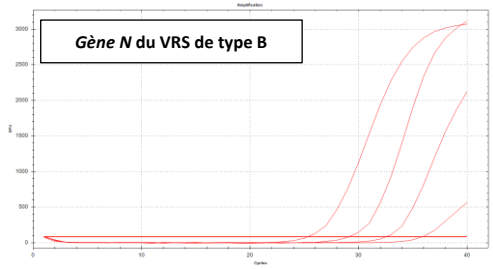


Copies/RT-PCR	Ct
1 x 10 ^{6}	20,46
1 x 10 ^{5}	24,23
1 x 10 ^{4}	27,89
1 x 10 ^{3}	30,73
1 x 10 ^{2}	34,40

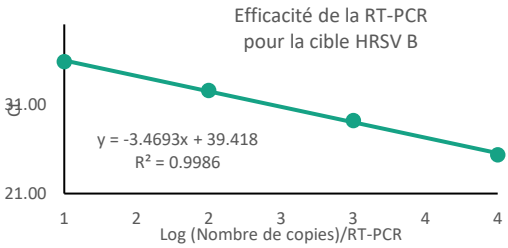


L'efficacité déduite de la pente de la droite est de : E = ($10^{-1/pente}$ -1) x 100 = 95,3%.

⇨ **L'efficacité du Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV est de 95,3% pour la valence VRS type A.**



Copies/RT-PCR	Ct
1 x 10 ^{4}	25.38
1 x 10 ^{3}	29.20
1 x 10 ^{2}	32.58
1 x 10 ^{1}	35.82



L'efficacité déduite de la pente de la droite est de : E = ($10^{-1/pente}$ -1) x 100 = 94,2%.

⇨ **L'efficacité du Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV est de 94,2% pour la valence VRS type B.**

4) Répétabilité de la RT-PCR

La répétabilité de la qRT-PCR a été déterminée à partir de dilution des ARN transcrits du SARS-CoV-2, des influenza de type A et B et des VRS de type A et B afin d'obtenir, pour chaque ARN, trois niveaux de positivité. Une série de qRT-PCR a été réalisée en déposant les 3 dilutions en triplicat en suivant le protocole du Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV décrit en page 12. 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 :

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

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

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

	Répétabilité (Ct)			Répétabilité	
				Moyenne (Ct)	CV%
Positif Fort	20,72	20,78	20,90	20,80	**0,44**
Positif Moyen	27,40	27,38	27,42	27,40	**0,07**
Positif faible	30,52	31,09	30,60	30,74	**1,00**

⇨ **Le coefficient de variation de répétabilité par niveau varie de 0,07% à 1,00% pour la valence SARS-CoV-2.**

Données obtenues pour la valence influenza type A :

	Répétabilité (Ct)			Répétabilité	
				Moyenne (Ct)	CV%
Positif Fort	20,63	20,62	20,87	20,71	**0,68**
Positif Moyen	28,02	28,14	28,02	28,06	**0,25**
Positif faible	30,78	30,95	31,32	31,02	**0,89**

⇨ **Le coefficient de variation de répétabilité par niveau varie de 0,25% à 0,89% pour la valence influenza type A.**

Données obtenues pour la valence influenza type B :

	Répétabilité (Ct)			Répétabilité	
				Moyenne (Ct)	CV%
Positif Fort	22,46	21,73	21,85	22,01	**1,78**
Positif Moyen	28,86	29,25	28,55	28,89	**1,21**
Positif faible	31,22	31,95	31,41	31,53	**1,20**

⇨ **Le coefficient de variation de répétabilité par niveau varie de 1,20% à 1,78% pour la valence influenza type B.**

Données obtenues pour la valence VRS type A :

	Répétabilité (Ct)			Répétabilité	
				Moyenne (Ct)	CV%
Positif Fort	21,00	20,97	21,39	21,12	**1,11**
Positif Moyen	27,54	27,52	27,54	27,53	**0,04**
Positif faible	30,97	31,12	30,80	30,96	**0,52**

⇨ **Le coefficient de variation de répétabilité par niveau varie de 0,04% à 1,11% pour la valence VRS type A.**

Données obtenues pour la valence VRS type B :

	Répétabilité (Ct)			Répétabilité	
				Moyenne (Ct)	CV%
Positif Fort	20,20	20,22	20,19	20,20	**0,08**
Positif Moyen	27,20	27,14	27,11	27,15	**0,17**
Positif faible	30,30	30,74	30,58	30,54	**0,73**

⇨ **Le coefficient de variation de répétabilité par niveau varie de 0,08% à 0,73% pour la valence VRS type B.**

5) Fidélité intermédiaire de la RT-PCR

La fidélité intermédiaire de la qRT-PCR a été déterminée à partir de dilution des ARN transcrits du SARS-CoV-2, des influenza de type A et B et des VRS de type A et B afin d'obtenir, pour chaque ARN, trois niveaux de positivité. Trois séries indépendantes de qRT-PCR ont été réalisées en déposant les 3 dilutions en triplicat en suivant le protocole du Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV décrit en page 12. À l'issue de ces trois séries, le coefficient de variation (CV) de fidélité intermédiaire des valeurs de Ct a été déterminé, en prenant soin 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 écart types de fidélité intermédiaire, et M à la moyenne générale des valeurs des trois séries.

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

	Fidélité intermédiaire (Ct)			CV%
	Ct série 1	Ct série 2	Ct série 3	Fidélité intermédiaire
Positif Fort	20,72	21,65	20,86	**2,38**
Positif Moyen	27,40	28,02	27,66	**1,12**
Positif Faible	30,52	31,16	32,08	**2,51**

⇨ **Le coefficient de variation de fidélité intermédiaire par niveau varie de 1,12% à 2,51% pour la valence SARS-CoV-2.**

Données obtenues pour la valence influenza type A :

	Fidélité intermédiaire (Ct)			CV%
	Ct série 1	Ct série 2	Ct série 3	Fidélité intermédiaire
Positif Fort	20,63	21,21	20,56	**1,72**
Positif Moyen	28,02	28,36	27,75	**1,09**
Positif Faible	30,78	31,28	30,40	**1,43**

⇨ **Le coefficient de variation de fidélité intermédiaire par niveau varie de 1,09% à 1,72% pour la valence influenza type A.**

Données obtenues pour la valence influenza type B :

	Fidélité intermédiaire (Ct)			CV%
	Ct série 1	Ct série 2	Ct série 3	Fidélité intermédiaire
Positif Fort	22,46	22,73	22,07	**1,48**
Positif Moyen	28,86	29,26	28,01	**2,22**
Positif Faible	31,22	32,50	31,01	**2,55**

⇨ **Le coefficient de variation de fidélité intermédiaire par niveau varie de 1,48% à 2,55% pour la valence influenza type B.**

Données obtenues pour la valence VRS type A :

	Fidélité intermédiaire (Ct)			CV%
	Ct série 1	Ct série 2	Ct série 3	Fidélité intermédiaire
Positif Fort	21,00	21,48	20,30	**2,84**
Positif Moyen	27,54	28,19	26,69	**2,74**
Positif Faible	30,97	31,06	30,22	**1,50**

⇨ **Le coefficient de variation de fidélité intermédiaire par niveau varie de 1,50% à 2,84% pour la valence VRS type A.**

Données obtenues pour la valence VRS type B :

	Fidélité intermédiaire (Ct)			CV%
	Ct série 1	Ct série 2	Ct série 3	Fidélité intermédiaire
Positif Fort	20,20	21,02	20,15	**2,39**
Positif Moyen	27,20	28,07	26,27	**3,31**
Positif Faible	30,30	31,91	29,65	**3,80**

⇨ **Le coefficient de variation de fidélité intermédiaire par niveau varie de 2,39% à 3,80% pour la valence VRS type B.**

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

Les caractéristiques du Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV ont été confirmées sur 3 thermocycleurs :

- CFX96 (Bio-Rad, ramping standard)
- AriaMx™ (Agilent Technologies, ramping Fast par défaut)
- QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems, ramping standard)

Ces trois thermocycleurs ont été choisis car ils représentent des 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 (CFX96, 1 bloc Peltier, AriaMx™ et QuantStudio™ 5, 6 blocs Peltier, lecture par ligne). Le Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV est utilisable sur tout autre thermocycleur possédant *a minima* les canaux de lecture 6-FAM, VIC, TEXAS-RED et Cy5. Dans tous les cas, BioSellal recommande au laboratoire utilisateur de vérifier les performances du test sur leurs appareils en vérifiant la détectabilité d'un niveau équivalent à $3xLD_{RT\text{-}PCR}$ 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.

Pour ce test, le programme utilisé est celui décrit page 12.
Pour cela, les ARN de chaque cible virale (SARS-CoV-2, influenza A&B, VRS A&B) ont été dilués afin d'atteindre une quantité correspondant à $3xLD_{RT\text{-}PCR}$ par réaction, soit $3xLD_{RT\text{-}PCR}$ dans 5µL. 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.

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 séries/ thermocycleur	Nombre de Thermocycleurs	
Limite de détection LD_{RT-PCR}	1 =3 x LD_{RT-PCR} soit 20 copies/RT-PCR pour la cible **SARS-CoV-2** 1 =3 x LD_{RT-PCR} soit 225 copies/RT-PCR pour la cible **influenza type A** 1 =3 x LD_{RT-PCR} soit 60 copies/RT-PCR pour la cible **influenza type B** 1 =3 x LD_{RT-PCR} soit 115 copies/RT-PCR pour la cible **VRS type A** 1 =3 x LD_{RT-PCR} soit 25 copies/RT-PCR pour la cible **VRS type B**	4 pour le CFX96 6 pour l'AriaMx™ 6 pour le QuantStudio™ 5	1	3	**100% des résultats positifs**

Données obtenues : Fréquence de détection

Critère mesuré	Cible	Nombre de copies / RT-PCR	CFX96 en ramping Standard		AriaMx™ (ramping Fast par défaut)		QuantStudio 5 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 $3xLD_{RT-PCR}$	SARS-CoV-2	20	4/4	**100%**	6/6	**100%**	6/6	**100%**
	Influenza type A	225	4/4	**100%**	6/6	**100%**	6/6	**100%**
	Influenza type B	60	4/4	**100%**	6/6	**100%**	6/6	**100%**
	VRS type A	115	4/4	**100%**	6/6	**100%**	6/6	**100%**
	VRS type B	25	4/4	**100%**	6/6	**100%**	6/6	**100%**

⇨ **Les valeurs de 3 x LD_{RT-PCR} (= 20 copies/RT-PCR pour la cible SARS-CoV-2 ; 225 copies/RT-PCR pour la cible influenza type A ; 60 copies/RT-PCR pour la cible influenza type B ; 115 copies/RT-PCR pour la cible VRS type A ; 25 copies/RT-PCR pour la cible VRS type B) sont confirmées pour les thermocycleurs CFX96, AriaMx™ et QuantStudio™ 5.**

7) Robustesse de la qRT-PCR

La robustesse de la qRT-PCR a été évaluée en analysant le niveau 3x$LD_{RT\text{-}PCR}$ sur six répliques par série et en faisant varier les paramètres critiques de la qRT-PCR utilisés par rapport aux conditions de référence décrites page 12 :

Validation des paramètres critiques	
Conditions de référence	5 µL d'acides nucléiques 15 µL de Master Mix Hybridation-Élongation des amorces à 60°C 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 ± 1°C de la température d'hybridation et d'élongation des amorces	59°C et 61°C
Pour un volume de 15 µL de Master Mix, variation de ± 5 secondes de la durée de l'étape d'hybridation et d'élongation des amorces	40 secondes et 50 secondes

		CFX96 (Bio-Rad)						
		Conditions de référence	15 µl MM 4.5 µl AN	15 µl MM 5.5 µl AN	15 µl MM 59°C	15 µl MM 61°C	15 µl MM 40 sec.	15 µl MM 50 sec.
Valence SARS-CoV-2	Réplique 1	34,46	33,67	33,25	33,44	33,00	33,06	33,67
	Réplique 2	33,59	32,89	33,69	34,97	33,85	33,12	32,79
	Réplique 3	34,04	33,23	33,78	33,45	34,22	33,56	34,05
	Réplique 4	33,58	33,06	33,81	33,31	33,05	33,32	33,93
Valence influenza type A	Réplique 1	35,64	36,02	35,61	34,52	34,43	31,37	34,01
	Réplique 2	35,23	33,95	34,97	34,77	32,06	33,30	34,89
	Réplique 3	33,91	35,4	35,52	34,98	34,45	34,06	35,44
	Réplique 4	35,51	35,86	34,45	34,25	34,45	34,31	34,23
Valence influenza type B	Réplique 1	34,07	34,19	33,82	34,15	33,82	33,45	33,25
	Réplique 2	33,63	34,52	34,14	34,07	35,00	33,71	34,18
	Réplique 3	33,24	33,59	33,47	32,58	33,81	33,02	33,33
	Réplique 4	33,58	33,84	33,74	33,06	33,89	33,91	33,47
Valence VRS type A	Réplique 1	33,10	33,79	33,33	33,53	34,02	33,36	33,03
	Réplique 2	33,15	33,35	33,11	32,61	33,37	33,00	32,81
	Réplique 3	33,21	33,52	33,70	33,33	33,20	32,86	33,17
	Réplique 4	33,26	33,19	33,49	33,48	32,95	33,04	33,16
Valence VRS type B	Réplique 1	34,69	35,15	35,52	35,35	34,22	34,34	34,41
	Réplique 2	34,81	36,90	35,21	35,43	34,52	35,27	34,77
	Réplique 3	35,21	34,41	35,43	34,64	33,78	34,41	34,15
	Réplique 4	36,33	36,45	35,51	34,18	34,14	34,46	34,05

Les variations de ± 10% du volume d'acides nucléiques, de ± 1°C de la température d'hybridation et de ± 5 secondes de la durée de leur élongation n'ont pas affecté la sensibilité analytique de la qRT-PCR puisque les quatre répliques de chacune des cinq valences du niveau 3 x $LD_{RT\text{-}PCR}$ ont fourni un signal détecté dans 100% des cas.

⇨ **La robustesse du Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV est vérifiée pour les cinq cibles pour l'utilisation de 15 µl de Master-Mix pour des variations du volume d'acides nucléiques, de la température et de la durée de l'étape d'hybridation des amorces et de leur élongation.**

8) Interférences

La présence de phénomène de compétition entre les valences a été évaluée en préparant des matrices contenant une cible au niveau 3xLD_{RT-PCR} en présence d'une autre cible à un fort niveau de positivité. Des ARN pour chaque cible ont été dilués pour atteindre le niveau de positivité souhaité puis analysé en qRT-PCR avec le PremiumDX® Colplex Covid & Flu & RSV selon le programme décrit page 12.

Données obtenues :

Cible au niveau 3xLD_{RT-PCR}	Cible fort positif	Ct SARS-CoV-2	Ct Influenza type A	Ct Influenza type B	Ct VRS type A	Ct VRS type B
SARS-CoV-2	-	**33,42**	-	-	-	-
Influenza type A	-	-	**33,94**	-	-	-
Influenza type B	-	-	-	**34,21**	-	-
VRS type A	-	-	-	-	**33,83**	-
VRS type B	-	-	-	-	-	**34,62**
SARS-CoV-2	Influenza type A	**33,39**	*23,93*	-	-	-
SARS-CoV-2	Influenza type B	**33,72**	-	*25,27*	-	-
SARS-CoV-2	VRS type A	**33,61**	-	-	*24,31*	-
SARS-CoV-2	VRS type B	**34,47**	-	-	-	*23,82*
Influenza type A	SARS-CoV-2	*24,37*	**35,60**	-	-	-
Influenza type A	VRS type A	-	**32,68**	-	*24,30*	-
Influenza type A	VRS type B	-	**34,24**	-	-	*23,97*
Influenza type B	SARS-CoV-2	*24,10*	-	**34,12**	-	-
Influenza type B	VRS type A	-	-	**32,34**	24,28	-
Influenza type B	VRS type B	-	-	**32,83**	-	*24,23*
VRS type A	SARS-CoV-2	*24,18*	-	-	**30,13***	-
VRS type A	Influenza type A	-	*23,25*	-	**33,17**	-
VRS type A	Influenza type B	-	-	*25,78*	**33,35**	-
VRS type B	SARS-CoV-2	*24,17*	-	-	-	**31,24***
VRS type B	Influenza type A	-	*23,75*	-	-	**34,04**
VRS type B	Influenza type B	-	-	*25,88*	-	**33,65**

* Pour la valence VRS type A et B (VIC), un signal peut être observé lorsque la valence SARS-CoV-2 (FAM) est détectée à partir d'un certain niveau de positivité. Ce signal non spécifique peut provoquer l'apparition de courbes au niveau de fluorescence très faible et à l'allure non caractéristique. Ici, la présence de SARS-CoV-2 en compétition avec VRS type A et VRS type B baisse la valeur du Ct observé pour les très faibles positifs. Le signal reste cependant caractéristique de la présence du VRS en faible quantité.

- ⇨ **La présence du SARS-CoV-2 à un haut niveau de positivité dégrade l'allure des courbes d'influenza de type B lorsque ce dernier est à un faible niveau de positivité. Cependant, le signal pour influenza de type B reste détecté.**
- ⇨ **Aucune autre interférence n'a été observée lors de cette étude.**

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

1) Limite de détection de la méthode complète

Le Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV (Cat. PREMDX005 / PREMDX006) permet la détection de la présence du SARS-CoV-2, des influenza de type A et B et des VRS de type A et B dans un échantillon. La $LD_{METHODE}$ a été déterminée pour chacune de ces cibles sur des dilutions en série de virus entiers inactivés titrés dans de l'éluât d'écouvillon négatif. Les souches ont été fournies par le Centre National de Référence (CNR) des virus des infections respiratoires dont la grippe :

- **SARS-CoV-2 lineage 20H/501Y.V2**
- **Souche Influenza type A H1N1 19/4/2019 A/Brisbane/2/2018**
- **Souche Influenza type B 21/06/2018 B/Colorado/6/2017**
- **Souche VRS type A 28Long 28-589A P14**
- **Souche VRS type B 28B/60 MERIEUX 28-591B P10**

Le système d'extraction d'acides nucléiques testé est le BioExtract® Premium Mag (BioSellal). Une approche de la $LD_{METHODE}$ a été effectuée sur différents niveaux de concentrations avec 5 réplicats par concentration. La concentration la plus faible avec un taux de détection de 100% a été sélectionnée pour confirmer la $LD_{METHODE}$ sur 20 réplicats. Les amplifications ont été faites à l'aide du Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV (détail du programme en page 12) sur CFX96 (Bio-Rad).

Résultat de l'approche de la $LD_{METHODE}$ pour la détection du SARS-CoV-2

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 $LD_{METHODE}$ pour la présence du SARS-CoV-2 :

Niveau de positivité		BioExtract® Premium Mag						
		Réplique	Ct SARS-CoV-2	Ct Influenza type A	Ct Influenza type B	Ct VRS type A	Ct VRS type B	Ct IPC
$7,2.10^4$ copies/ml d'éluât d'écouvillon	720 copies/qRT-PCR	1	29,62	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	29,99
		2	30,49					29,74
		3	30,84					29,97
		4	30,59					30,08
		5	30,65					29,65
$7,2.10^3$ copies/ml d'éluât d'écouvillon	72 copies/qRT-PCR	1	33,47	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	31,12
		2	33,35					31,19
		3	33,25					30,76
		4	32,97					30,51
		5	33,32					30,70
$7,2.10^2$ copies/ml d'éluât d'écouvillon	7,2 copies/qRT-PCR	1	36,86	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	30,74
		2	35,18					31,12
		3	35,13					30,97
		4	35,82					31,13
		5	35,88					31,25

N/A* : non analysé

⇨ **Pour la valence SARS-CoV-2, la $LD_{METHODE}$ approchée serait de $7,2.10^2$ copies/ml d'éluât d'écouvillon (7,2 copies/qRT-PCR). Cependant, au vu du faible niveau de Ct et de l'allure des courbes, il a été décidé de garder la concentration $7,2.10^3$ copies/ml d'éluât d'écouvillon (72 copies/qRT-PCR) pour confirmer la $LD_{METHODE}$.**

Résultat de la confirmation de la $LD_{METHODE}$ pour la détection du SARS-CoV-2

Plan d'expérience :

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

Données brutes (valeurs de Ct) de la validation de la $LD_{METHODE}$ pour la présence du SARS-CoV-2 :

Niveau de positivité		BioExtract® Premium Mag						
		Réplique	Ct SARS-CoV-2	Ct Influenza type A	Ct Influenza type B	Ct VRS type A	Ct VRS type B	Ct IPC
$7,2.10^3$ copies/ml d'éluât d'écouvillon	72 copies/qRT-PCR	1	34,21	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	32,39
		2	33,42	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	32,83
		3	32,16	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	32,41
		4	33,42	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	32,81
		5	32,96	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	31,77
		6	33,01	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	31,34
		7	33,86	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	32,88
		8	33,62	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	32,04
		9	33,33	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	32,46
		10	33,36	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	32,16
		11	32,89	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	32,03
		12	33,18	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	31,69
		13	33,49	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	32,07
		14	32,94	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	32,09
		15	33,33	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	32,30
		16	33,43	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	32,00
		17	33,63	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	31,80
		18	33,34	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	32,29
		19	32,96	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	32,37
		20	33,14	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	31,59

N/A* : non analysé

⇨ **Ainsi, la $LD_{METHODE}$ pour le Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV associé au BioExtract® Premium Mag est de $7,2.10^3$ copies/ml d'éluât d'écouvillon (72 copies/qRT-PCR) pour la valence SARS-CoV-2.**

Résultat de l'approche de la $LD_{METHODE}$ pour la détection d'influenza type A

Plan d'expérience :

Nombre de dilutions	Nombre de répliques par série	Nombre de séries indépendantes
4	5	1

Données brutes (valeurs de Ct) de l'approche de la $LD_{METHODE}$ pour la présence d'influenza type A :

Niveau de positivité		BioExtract® Premium Mag						
		Réplique	Ct SARS-CoV-2	Ct Influenza type A	Ct Influenza type B	Ct VRS type A	Ct VRS type B	Ct IPC
$1.10^{6,1}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon	$1.10^{4,1}$ TCID50/qRT-PCR	1	N/A*	30,48	N/A*	N/A*	N/A*	30,25
		2		30,28				30,03
		3		30,72				30,04
		4		30,72				29,60
		5		30,47				30,36
$5.10^{5,1}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon	$5.10^{3,1}$ TCID50/qRT-PCR	1	N/A*	32,52	N/A*	N/A*	N/A*	30,45
		2		33,02				30,31
		3		32,97				30,72
		4		32,97				30,51
		5		32,98				29,91
$1.10^{5,1}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon	$1.10^{3,1}$ TCID50/qRT-PCR	1	N/A*	32,79	N/A*	N/A*	N/A*	25,63
		2		33,29				25,35
		3		32,95				25,52
		4		32,94				25,47
		5		32,55				25,52
$1.10^{4,1}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon	$1.10^{2,1}$ TCID50/qRT-PCR	1	N/A*	N/A	N/A*	N/A*	N/A*	25,44
		2		N/A				25,41
		3		N/A				25,35
		4		N/A				25,23
		5		N/A				25,42

N/A* : non analysé

⇨ **Pour la valence influenza type A, la $LD_{METHODE}$ approchée est de $1.10^{5,1}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon ($1.10^{3,1}$ TCID50/qRT-PCR).**

Résultat de la confirmation de la $LD_{METHODE}$ pour la détection d'influenza type A

Plan d'expérience :

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

Données brutes (valeurs de Ct) de la validation de la $LD_{METHODE}$ pour la présence d'influenza type A :

Niveau de positivité		BioExtract® Premium Mag						
		réplique	Ct SARS-CoV-2	Ct Influenza type A	Ct Influenza type B	Ct VRS type A	Ct VRS type B	Ct IPC
$1.10^{5,1}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon	$1.10^{3,1}$ TCID50/qRT-PCR	1	N/A*	33,45	N/A*	N/A*	N/A*	29,79
		2	N/A*	34,01	N/A*	N/A*	N/A*	30,08
		3	N/A*	33,97	N/A*	N/A*	N/A*	30,29
		4	N/A*	34,02	N/A*	N/A*	N/A*	29,90
		5	N/A*	34,17	N/A*	N/A*	N/A*	30,16
		6	N/A*	33,70	N/A*	N/A*	N/A*	30,00
		7	N/A*	33,69	N/A*	N/A*	N/A*	30,11
		8	N/A*	33,79	N/A*	N/A*	N/A*	30,09
		9	N/A*	33,54	N/A*	N/A*	N/A*	29,77
		10	N/A*	34,03	N/A*	N/A*	N/A*	30,94
		11	N/A*	33,79	N/A*	N/A*	N/A*	29,94
		12	N/A*	33,69	N/A*	N/A*	N/A*	30,41
		13	N/A*	34,02	N/A*	N/A*	N/A*	30,25
		14	N/A*	34,26	N/A*	N/A*	N/A*	29,74
		15	N/A*	33,96	N/A*	N/A*	N/A*	30,74
		16	N/A*	33,46	N/A*	N/A*	N/A*	29,57
		17	N/A*	33,69	N/A*	N/A*	N/A*	30,30
		18	N/A*	33,60	N/A*	N/A*	N/A*	30,03
		19	N/A*	34,10	N/A*	N/A*	N/A*	30,30
		20	N/A*	34,12	N/A*	N/A*	N/A*	30,55

N/A* : non analysé

⇨ **Ainsi, la $LD_{METHODE}$ pour le Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV associé au BioExtract® Premium Mag est de $1.10^{5,1}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon ($1.10^{3,1}$ TCID50/qRT-PCR) pour la valence influenza type A.**

Résultat de l'approche de la $LD_{METHODE}$ pour la détection d'influenza type B

Plan d'expérience :

Nombre de dilutions	Nombre de répliques par série	Nombre de séries indépendantes
4	5	1

Données brutes (valeurs de Ct) de l'approche de la $LD_{METHODE}$ pour la présence d'influenza type B :

Niveau de positivité		BioExtract® Premium Mag						
		Réplique	Ct SARS-CoV-2	Ct Influenza type A	Ct Influenza type B	Ct VRS type A	Ct VRS type B	Ct IPC
$1.10^{5,2}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon	$1.10^{3.2}$ TCID50/qRT-PCR	1	N/A*	N/A*	26,38	N/A*	N/A*	29,78
		2			26,91			30,28
		3			27,01			30,29
		4			27,44			30,54
		5			27,81			30,61
$5.10^{4,2}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon	$5.10^{2.2}$ TCID50/qRT-PCR	1	N/A*	N/A*	29,12	N/A*	N/A*	30,43
		2			29,10			30,50
		3			29,31			30,37
		4			29,46			30,43
		5			29,41			30,95
$1.10^{4,2}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon	158 TCID50/qRT-PCR	1	N/A*	N/A*	31,03	N/A*	N/A*	25,43
		2			31,22			25,23
		3			31,16			25,25
		4			31,24			25,18
		5			31,93			25,36
$1.10^{3,2}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon	15,8 TCID50/qRT-PCR	1	N/A*	N/A*	34,99	N/A*	N/A*	25,35
		2			36,41			25,10
		3			N/A			25,39
		4			N/A			25,31
		5			38,61			25,17

N/A* : non analysé

⇨ **Pour la valence influenza type B, la $LD_{METHODE}$ approchée est de $1.10^{4,2}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon (158 TCID50/qRT-PCR).**

Résultat de la confirmation de la $LD_{METHODE}$ pour la détection d'influenza type B

Plan d'expérience :

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

Données brutes (valeurs de Ct) de la validation de la $LD_{METHODE}$ pour la présence d'influenza type B :

Niveau de positivité		BioExtract® Premium Mag						
		Réplique	Ct SARS-CoV-2	Ct Influenza type A	Ct Influenza type B	Ct VRS type A	Ct VRS type B	Ct IPC
$1.10^{4,2}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon	158 TCID50/qRT-PCR	1	N/A*	N/A*	30,03	N/A*	N/A*	30,25
		2	N/A*	N/A*	30,03	N/A*	N/A*	30,36
		3	N/A*	N/A*	30,21	N/A*	N/A*	30,06
		4	N/A*	N/A*	30,37	N/A*	N/A*	30,39
		5	N/A*	N/A*	30,51	N/A*	N/A*	30,33
		6	N/A*	N/A*	30,23	N/A*	N/A*	30,22
		7	N/A*	N/A*	30,39	N/A*	N/A*	30,27
		8	N/A*	N/A*	30,21	N/A*	N/A*	29,99
		9	N/A*	N/A*	29,71	N/A*	N/A*	30,23
		10	N/A*	N/A*	30,02	N/A*	N/A*	30,02
		11	N/A*	N/A*	30,18	N/A*	N/A*	30,35
		12	N/A*	N/A*	29,68	N/A*	N/A*	29,67
		13	N/A*	N/A*	30,17	N/A*	N/A*	30,21
		14	N/A*	N/A*	30,04	N/A*	N/A*	30,04
		15	N/A*	N/A*	29,92	N/A*	N/A*	29,98
		16	N/A*	N/A*	29,61	N/A*	N/A*	29,93
		17	N/A*	N/A*	29,88	N/A*	N/A*	30,28
		18	N/A*	N/A*	30,04	N/A*	N/A*	30,03
		19	N/A*	N/A*	29,99	N/A*	N/A*	30,09
		20	N/A*	N/A*	29,86	N/A*	N/A*	30,02

N/A* : non analysé

⇨ **Ainsi, la $LD_{METHODE}$ pour le Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV associé au BioExtract® Premium Mag est de $1.10^{4,2}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon (158 TCID50/qRT-PCR) pour la valence influenza type B.**

Résultat de l'approche de la $LD_{METHODE}$ pour la détection du VRS type A

Plan d'expérience :

Nombre de dilutions	Nombre de répliques par série	Nombre de séries indépendantes
4	5	1

Données brutes (valeurs de Ct) de l'approche de la $LD_{METHODE}$ pour la présence du VRS type A :

Niveau de positivité		BioExtract® Premium Mag						
		Réplique	Ct SARS-CoV-2	Ct Influenza type A	Ct Influenza type B	Ct VRS type A	Ct VRS type B	Ct IPC
$1.10^{3,62}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon	$1.10^{1,62}$ TCID50/qRT-PCR	1	N/A*	N/A*	N/A*	28,17	N/A*	25,49
		2				28,01		25,49
		3				28,08		25,37
		4				27,86		25,35
		5				27,85		25,26
$1.10^{2,62}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon	4,2 TCID50/qRT-PCR	1	N/A*	N/A*	N/A*	31,00	N/A*	25,33
		2				30,83		25,33
		3				31,27		25,49
		4				30,96		25,47
		5				30,56		25,29
$1.10^{1,62}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon	0,42 TCID50/qRT-PCR	1	N/A*	N/A*	N/A*	35,95	N/A*	25,38
		2				34,34		25,19
		3				34,18		25,23
		4				35,19		25,33
		5				33,54		25,26
$1.10^{0,62}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon	0,042 TCID50/qRT-PCR	1	N/A*	N/A*	N/A*	N/A	N/A*	25,46
		2				N/A		25,49
		3				N/A		25,30
		4				N/A		25,32
		5				N/A		25,22

N/A* : non analysé

Pour la valence VRS type A, la $LD_{METHODE}$ approchée est de $1.10^{1,62}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon (0,42 TCID50/qRT-PCR).

Résultat de la confirmation de la $LD_{METHODE}$ pour la détection du VRS type A

Plan d'expérience :

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

Données brutes (valeurs de Ct) de la validation de la $LD_{METHODE}$ pour la présence du VRS type A :

Niveau de positivité		BioExtract® Premium Mag						
		Réplique	Ct SARS-CoV-2	Ct Influenza type A	Ct Influenza type B	Ct VRS type A	Ct VRS type B	Ct IPC
$1.10^{1,62}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon	0,42 TCID50/qRT-PCR	1	N/A*	N/A*	N/A*	34,58	N/A*	25,16
		2	N/A*	N/A*	N/A*	33,91	N/A*	25,19
		3	N/A*	N/A*	N/A*	33,60	N/A*	25,30
		4	N/A*	N/A*	N/A*	33,32	N/A*	25,13
		5	N/A*	N/A*	N/A*	33,55	N/A*	25,07
		6	N/A*	N/A*	N/A*	33,56	N/A*	25,32
		7	N/A*	N/A*	N/A*	33,34	N/A*	25,11
		8	N/A*	N/A*	N/A*	34,19	N/A*	25,06
		9	N/A*	N/A*	N/A*	33,45	N/A*	25,12
		10	N/A*	N/A*	N/A*	33,77	N/A*	25,05
		11	N/A*	N/A*	N/A*	33,51	N/A*	25,12
		12	N/A*	N/A*	N/A*	34,48	N/A*	25,33
		13	N/A*	N/A*	N/A*	33,78	N/A*	24,97
		14	N/A*	N/A*	N/A*	34,10	N/A*	25,10
		15	N/A*	N/A*	N/A*	33,38	N/A*	25,41
		16	N/A*	N/A*	N/A*	33,26	N/A*	25,17
		17	N/A*	N/A*	N/A*	33,69	N/A*	25,28
		18	N/A*	N/A*	N/A*	33,30	N/A*	25,18
		19	N/A*	N/A*	N/A*	33,54	N/A*	25,04
		20	N/A*	N/A*	N/A*	34,89	N/A*	25,51

N/A* : non analysé

⇨ **Ainsi, la $LD_{METHODE}$ pour le Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV associé au BioExtract® Premium Mag est de $1.10^{1,62}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon (0,42 TCID50/qRT-PCR) pour la valence VRS type A.**

Résultat de l'approche de la $LD_{METHODE}$ pour la détection du VRS type B

Plan d'expérience :

Nombre de dilutions	Nombre de répliques par série	Nombre de séries indépendantes
4	5	1

Données brutes (valeurs de Ct) de l'approche de la $LD_{METHODE}$ pour la présence du VRS type B :

Niveau de positivité		BioExtract® Premium Mag						
		Réplique	Ct SARS-CoV-2	Ct Influenza type A	Ct Influenza type B	Ct VRS type A	Ct VRS type B	Ct IPC
$1.10^{3,62}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon	$1.10^{1,62}$ TCID50/qRT-PCR	1	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	28,99	25,78
		2					28,79	25,36
		3					28,54	25,38
		4					28,46	25,22
		5					28,50	25,24
$1.10^{2,62}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon	4,2 TCID50/qRT-PCR	1	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	32,02	25,70
		2					31,83	25,54
		3					31,61	25,38
		4					32,07	25,31
		5					30,39	25,42
$1.10^{1,62}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon	0,42 TCID50/qRT-PCR	1	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	35,16	25,34
		2					36,59	25,50
		3					34,37	25,31
		4					34,47	25,47
		5					35,40	25,46
$1.10^{0,62}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon	0,042 TCID50/qRT-PCR	1	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	N/A	25,30
		2					N/A	25,51
		3					N/A	25,54
		4					N/A	25,49
		5					N/A	25,60

N/A* : non analysé

Pour la valence VRS type B, la $LD_{METHODE}$ approchée est de $1.10^{1,62}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon (0,42 TCID50/qRT-PCR) pour la méthode d'extraction BioExtract® Premium Mag.

Résultat de la confirmation de la $LD_{METHODE}$ pour la détection du VRS type B

Plan d'expérience :

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

Données brutes (valeurs de Ct) de la validation de la $LD_{METHODE}$ pour la présence du VRS type B :

Niveau de positivité		BioExtract® Premium Mag						
		Réplique	Ct SARS-CoV-2	Ct Influenza type A	Ct Influenza type B	Ct VRS type A	Ct VRS type B	Ct IPC
$1.10^{1,62}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon	0,42 TCID50/qRT-PCR	1	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	35,64	25,27
		2	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	34,17	25,34
		3	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	35,32	25,31
		4	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	35,42	25,29
		5	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	35,63	25,18
		6	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	34,97	25,06
		7	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	35,50	25,07
		8	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	36,05	25,13
		9	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	36,56	25,15
		10	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	34,76	25,15
		11	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	35,28	25,34
		12	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	34,12	25,07
		13	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	33,69	24,99
		14	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	36,08	25,22
		15	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	35,23	24,95
		16	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	36,49	24,88
		17	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	35,69	25,02
		18	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	35,89	25,08
		19	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	35,73	25,11
		20	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	36,16	25,19

N/A* : non analysé

⇨ **Ainsi, la $LD_{METHODE}$ pour le Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV associé au BioExtract® Premium Mag est de $1.10^{1,62}$ TCID50/ml d'éluât d'écouvillon (0,42 TCID50/qRT-PCR) pour la valence VRS type B.**

2) Spécificité et Sensibilité diagnostiques sur échantillons de statut connu

La spécificité et la sensibilité diagnostiques de la méthode complète associant le Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV au kit d'extraction BioExtract® Premium Mag a été déterminée pour chacune des valences sur matrice écouvillon nasopharyngé profond.

a. Spécificité et sensibilité pour la détection du génome du SARS-CoV-2

Concernant la détection du génome du SARS-CoV-2 (résultat présence/absence), la sensibilité et la spécificité diagnostiques ont été déterminées *in vitro* sur 94 échantillons provenant de patients préalablement statués positifs et sur 94 échantillons provenant de patients préalablement statués négatifs pour le SARS-CoV-2. Ces échantillons ont été statués à l'aide du Bio-T kit® TriStar Covid-19 marqué CE-IVD. Ces résultats ont été obtenus sur CFX96.
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 pour la valence SARS-CoV-2 :

		Statut Bio-T Kit® TriStar Covid-19		
		Présence du génome du SARS-CoV-2	Absence du génome du SARS-CoV-2	Total
Résultats Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV	Présence du génome du SARS-CoV-2	94	0	94
	Absence du génome du SARS-CoV-2	0	94	94
	Total	94	94	188

- ⇨ **Sur les panels d'échantillons analysés, la sensibilité diagnostique est Se = 100 %.**
  La borne basse de l'intervalle confiance pour la sensibilité est de 90 %.
- ⇨ **Sur les panels d'échantillons analysés, la spécificité diagnostique est Sp = 100 %.**

b. Spécificité et sensibilité pour la détection du génome d'influenza type A et B

Concernant la détection du génome des influenza type A et B, la sensibilité et la spécificité diagnostiques ont été déterminées *in vitro* sur 65 échantillons provenant de patients préalablement statués positifs et sur 96 échantillons provenant de patients préalablement statués négatifs. Ces échantillons ont été statués par le Centre National de Référence (CNR) des virus des infections respiratoires dont la grippe (Lyon) par séquençage NGS. Ces résultats ont été obtenus sur CFX96.

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 pour la valence influenza type A/B :

		Statut séquençage CNR		
		Présence du génome d'influenza type A/B	Absence du génome d'influenza type A/B	Total
Résultats Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV	Présence du génome d'influenza type A/B	65	0	65
	Absence du génome d'influenza type A/B	0	96	96
	Total	65	96	161

⇨ **Sur les panels d'échantillons analysés, la sensibilité diagnostique est Se = 100 %.**
La borne basse de l'intervalle confiance pour la sensibilité est de 88 %.

⇨ **Sur les panels d'échantillons analysés, la spécificité diagnostique est Sp = 100 %.**

Remarque : il est à noter que les statuts communiqués par le CNR précisaient également le type du virus (Influenza A ou B). Les résultats de sensibilité et spécificité sont équivalents pour les deux types d'Influenza.

c. Spécificité et sensibilité pour la détection du génome du VRS type A et B

Concernant la détection du génome du VRS type A et B, la sensibilité et la spécificité diagnostiques ont été déterminées *in vitro* sur 49 échantillons provenant de patients préalablement statués positifs et sur 96 échantillons provenant de patients préalablement statués négatifs. Ces échantillons ont été statués par le Centre National de Référence (CNR) des virus des infections respiratoires dont la grippe (Lyon) par séquençage NGS. Ces résultats ont été obtenus sur CFX96.

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 pour la valence VRS type A/B :

		Statut séquençage CNR		
		Présence du génome du VRS type A	Absence du génome du VRS type A	Total
Résultats Premium Dx® ColdPlex Covid & Flu & RSV	Présence du génome du VRS type A	47	0	47
	Absence du génome du VRS type A	2	96	98
	Total	49	96	145

- ⇨ **Sur les panels d'échantillons analysés, la sensibilité diagnostique est Se = 96 %.**
  La borne basse de l'intervalle confiance pour la sensibilité est de 82 %.
- ⇨ **Sur les panels d'échantillons analysés, la spécificité diagnostique est Sp = 100 %.**

Conclusions

1) CARACTERISATION DE LA RT-PCR

Inclusivité expérimentale	Vérifiée *in silico* sur l'ensemble des souches présentes en banque et expérimentalement sur des virus entiers inactivés fourni par le CNR
Exclusivité expérimentale	Vérifiée sur des virus, bactéries présentes dans les mêmes niches écologiques et/ou proches génétiquement
LD_{RT-PCR} à 95%	*Gènes E-N* du SARS-CoV-2 : 6,25 copies d'ARN transcrit par RT-PCR *Gène M* d'influenza type A : 75 copies d'ARN transcrit par RT-PCR *Gène M* d'influenza type B : 18,75 copies d'ARN transcrit par RT-PCR *Gène N* du VRS type A : 37,50 copies d'ARN transcrit par RT-PCR *Gène N* du VRS type B : 7,69 copies d'ARN transcrit par RT-PCR
Efficacité de la qRT-PCR	*Gènes E-N* du SARS-CoV-2 : 96,0 % *Gène M* d'influenza type A : 97,4 % *Gène M* d'influenza type B : 100,5 % *Gène N* du VRS type A : 95,3 % *Gène N* du VRS type B : 94,2 %
Coefficient de variation de répétabilité	Varie entre 0,07 % et 1,00 % pour la valence *gènes E-N* du SARS-CoV-2 Varie entre 0,25 % et 0,89 % pour la valence *gène M* d'influenza type A Varie entre 1,20 % et 1,78 % pour la valence *gène M* d'influenza type B Varie entre 0,04 % et 1,11 % pour la valence *gène N* du VRS type A Varie entre 0,08 % et 0,73 % pour la valence *gène N* du VRS type B
Coefficient de variation de fidélité intermédiaire	Varie entre 1,12 % et 2,51 % pour la valence *gènes E-N* du SARS-CoV-2 Varie entre 1,09 % et 1,72 % pour la valence *gène M* d'influenza type A Varie entre 1,48 % et 2,55 % pour la valence *gène M* d'influenza type B Varie entre 1,50 % et 2,84 % pour la valence *gène N* du VRS type A Varie entre 2,39 % et 3,80 % pour la valence *gène N* du VRS type B
Confirmation des performances de la qRT-PCR sur d'autres paramètres ou thermocycleurs.	<u>Programme utilisable :</u> - Programme ColdPlex <u>Thermocycleurs validés :</u> - CFX96 en ramping Standard - AriaMx™ en ramping Fast par défaut - QuantStudio™ 5 en ramping Standard
Robustesse	Vérifiée sur le niveau $3xLD_{PCR}$ en faisant varier : +/- 10% du volume d'acide nucléiques (4,5-5,5µl) +/- 1°C de la température d'hybridation/élongation (59-61°C) +/- 5 secondes de la durée d'hybridation/élongation (40-50sec)

2) CARACTERISATION DE LA METHODE COMPLETE

Matrice : Ecouvillon Nasopharyngé Profond		
$LD_{METHODE}$		**BioExtract® Premium Mag**
	SARS-CoV-2	$7{,}2.10^{3}$ copies/mL d'éluât d'écouvillon
	Influenza type A	$1.10^{5,1}$ TCID50/mL d'éluât d'écouvillon
	Influenza type B	$1.10^{4,2}$ TCID50/mL d'éluât d'écouvillon
	VRS type A	$1.10^{1,62}$ TCID50/mL d'éluât d'écouvillon
	VRS type B	$1.10^{1,62}$ TCID50/mL d'éluât d'écouvillon
Sensibilité diagnostique	**SARS-CoV-2**	100 %
	Influenza A&B	100 %
	VRS A&B	96 %
Spécificité diagnostique	**SARS-CoV-2**	100 %
	Influenza A&B	100 %
	VRS A&B	100 %

Notes :

biosellal

www.biosellal.com

Support Technique

tech@biosellal.com +33 (0) 4 26 78 47 62

Renseignements et commandes

contact@biosellal.com +33 (0) 4 26 78 47 60

