

MANUEL D'UTILISATION

Premium Dx[®] 5Plex SARS-CoV-2 2.0

Cat. N° PREMDX003 - 500 réactions

Cat. N° PREMDX004 - 1000 réactions

Détection du coronavirus responsable du syndrome respiratoire aigu sévère ou de la maladie Covid-19 (SARS-CoV-2) et identification des mutations E484K, L452R et K417N du gène S par RT-PCR en temps réel (qRT-PCR) avec contrôle positif interne (IPC) endogène

HUMAIN

Types de prélèvements

- Ecouvillonnage naso-pharyngé profond (ENP)
- Prélèvements salivaires

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



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® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 dispose de deux manuels techniques :

- Un manuel d'extraction commun aux kits liés à la détection du SARS-CoV-2, détaillant pour chaque type de prélèvement les méthodes d'extractions validées ou proposées par BioSellal.
- Un manuel d'utilisation du Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0, 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® 5Plex SARS-CoV-2 2.0.

Etiquettes du kit

HUMAN

Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0

REF PREMDX004

▽ 1000 tests

LOT 5PLEXCOV2-01ind

🕒 01/2023

🧊 <-16°C

CE For in vitro diagnostic **IVD**

biose||al premiumDx

27 chemin des peupliers 69570 Dardilly, France
☎ +33 4.26.78.47.60 ✉ contact@biose||al.com
🌐 www.biose||al.com

HUMAN

Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0

REF PREMDX003

▽ 500 tests

LOT 5PLEXCOV2-01ind

🕒 01/2023

🧊 <-16°C

CE For in vitro diagnostic **IVD**

biose||al premiumDx

27 chemin des peupliers 69570 Dardilly, France
☎ +33 4.26.78.47.60 ✉ contact@biose||al.com
🌐 www.biose||al.com

Premium Dx®
5Plex SARS-CoV-2 2.0

BAG A

Master Mix **MIX**

REF PREMDX003 / PREMDX004

Σ 500 tests / 1000 tests

LOT 5PLEXCOV2-01ind

🕒 01/2023 **🧊** <-16°C

biose||al premiumDx

Premium Dx®
5Plex SARS-CoV-2 2.0

BAG B

H₂O & EPC **+ NA**

REF PREMDX003 / PREMDX004

Σ 500 tests / 1000 tests

LOT 5PLEXCOV2-01ind

🕒 01/2023 **🧊** <-16°C

biose||al premiumDx

Premium Dx®
5PLEX SARS-CoV-2 2.0

PREMDX003 / PREMDX004

Master Mix

REF MMS5PLEXCOV2-A

LOT 5PLEXCOV2-01ind

🕒 01/2023

🏠 Mix

🧊 ≤ -16°C **▽** 500

biose||al premiumDx

Premium Dx®
5PLEX SARS-CoV-2 2.0

PREMDX003 / PREMDX004

EPC

REF EPC5PLEXCOV2-A

LOT 5PLEXCOV2-01ind

🕒 01/2023 **🧊** ≤ -16°C

🏠 + NA **biose||al premiumDx**

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 <i>(sauf en cas d'adoption de nouvelle matrice)</i>	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 naso-pharyngés 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.

Concernant les prélèvements salivaires, conformément à l'avis du 29 septembre 2020 de la Société Française de Microbiologie (SFM) relatif à la réalisation des prélèvements salivaires pour la détection du SARS-CoV-2 par qRT-PCR dans le cadre du diagnostic/dépistage de la COVID-19 (version 2 du 21/02/2021), le dispositif de prélèvement doit être hermétiquement fermé, décontaminé avec un traitement désinfectant usuel virucide et être clairement identifié (nom, prénom, date de naissance, date et heure du recueil du 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 et de sécuriser le transport conformément aux recommandations de la Société Française de Microbiologie.

L'envoi doit se faire sous couvert du froid positif en 12h maximum pour un rendu de résultats idéalement dans les 24 heures.

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® 5Plex SARS-CoV-2 2.0

Le Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 (Cat. N° PREMDX003/PREMDX004) 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** et du **gène N** du **SARS-CoV-2** grâce à un marquage 6-FAM,
- De la mutation **L452R** du **gène S** du **SARS-CoV-2** grâce à un marquage VIC,
- De la mutation **E484K** du **gène S** du **SARS-CoV-2** grâce à un marquage Texas Red,
- De la mutation **K417N** du **gène S** du **SARS-CoV-2** grâce à un marquage Cy5,
- **D'un contrôle positif endogène IPC** (RNASE P), grâce à un marquage ATTO425 (thermocycleur AriaMX™) ou ATTO700 (thermocycleur Bio-Rad ou Roche), 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 ainsi que l'absence d'inhibition de la réaction d'amplification.

Les mutations ciblées par le Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 sont considérées comme des mutations majeures associées à un impact fonctionnel (transmissibilité, échappement aux anticorps neutralisants).

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® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 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® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 génère un risque chimique et biologique pour le manipulateur et l'environnement. Se référer à la notice d'extraction du Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 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 commun aux kits liés à la détection du SARS-CoV-2		Manuel d'utilisation du Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0		
Ecouvillonnage nasopharyngé profond (ENP) Prélèvements salivaires *	BioExtract® SuperBall® BioExtract® Premium Mag Bio Extract® Column	Master Mix prêt à l'emploi MM5PLEXCOV2-A	Echantillons NC/NCS Témoin positif de processus EPC (EPC5PLEXCOV2-A)	Détecteurs : FAM/VIC/TEXAS-RED/Cy5/ATTO425 ou FAM/VIC/TEXAS-RED/Cy5/ATTO700 Référence passive : Aucune Programme : 5PLEX 2.0 en ramping Standard

* prétraitement obligatoire

Contenu du kit et conditions de conservation

Tableau 1. Descriptif du contenu du kit

Description	Référence	Volume/tube		Présentation	Conservation
		PREMDX003 500 réactions	PREMDX004 1000 réactions		
Master Mix (MM) Prêt à l'emploi	MM5PLEXCOV2-A	7500 µl	2x7500 µl	tube bouchon gris Sachet A	≤-16°C à l'abri de la lumière, Zone « MIX »
External Positive Control (EPC) Contrôle positif d'amplification du SARS-CoV-2 incluant les mutations E484K, L452R et K417N du gène S.	EPC5PLEXCOV2-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°
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, un ARN transcrit du *gène E* du SARS-CoV-2 (titré en nombre de copies/RT-PCR) utilisé par BioSellal pour la validation est requis. BioSellal commercialise ce réactif sous la référence suivante :

Tableau 3. Réactif 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-ESRAS-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).
- 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...).

DETECTION DU SARS-CoV-2 ET IDENTIFICATION DES MUTATIONS E484K, L452R ET K417N DU GENE S PAR qRT-PCR AVEC LES KITS PREMDX003/PREMDX004

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 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 **EPC5PLEXCOV2-A**, bouchon **rouge**), contenant les séquences cibles spécifiques du SARS-CoV-2 incluant les mutations E484K, L452R et K417N 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 14.*

- 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, 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 MM5PLEXCOV2-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 NCS, eau, MRI ou EPC : tube EPC5PLEXCOV2-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 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 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 90 min.

3) Paramètres de réglage du thermocycleur

Ce kit a été développé sur QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems) en ramping standard et confirmé sur AriaMx™ (Agilent Technologies, ramping Fast par défaut) et CFX96 (Bio-Rad, ramping standard). Il est compatible avec tous les thermocycleurs possédant à minima les canaux de lectures 6-FAM, VIC, Cy5, TEXAS RED et ATTO425 ou ATTO700. Pour plus d'informations, contacter notre support technique.

Tableau 4. Configuration du thermocycleur			
	QuantStudio™ 5	AriaMx™	CFX96
Mode	Quantitation – Standard curve	Quantitative PCR, Fluorescence Probe	All Channels
Ramping	Ramping Standard	Ramping Fast par défaut	Ramping Standard
Référence passive	Aucune	Aucune	Aucune

Tableau 5. Paramètres de réglage du thermocycleur			
Cible	Détecteurs		Volume final / puits
	Reporter	Quencher	
Gènes E et N du SARS-CoV-2	FAM	NFQ-MGB ou None*	20 µl = 15 µl Master Mix + 5 µl d'acides nucléiques ou contrôles†
Mutation E484K du gène S	TEXAS RED‡	NFQ-MGB ou None*	
Mutation L452R du gène S	VIC	NFQ-MGB ou None*	
Mutation K417N du gène S	Cy5	NFQ-MGB ou None*	
IPC endogène	ATTO425 (AriaMX™) ATTO700 (CFX96)	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@biosellal.com)

† Les contrôles sont les NC (eau), MRI et EPC.

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

Tableau 6. Paramétrage du PROGRAMME 5PLEX 2.0		
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	63°C
	+ acquisition des données	

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 selon les paramètres définis dans l'**Annexe C de la norme NF U47-600-1**. 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 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 du SARS-CoV-2, 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 7. Différents scénarios de résultats concernant les contrôles

	Cibles					Interprétation
	Gènes E-N (FAM)	Mutations du gène S			IPC endogène (ATTO425 / ATTO700)	
		E484K (TEXAS RED)	L452R (VIC)	K417N (CY5)		
NCS Contrôle Négatif de processus OBLIGATOIRE	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Validé
	Au moins une des cinq 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	Neg	Validé
	Au moins une des cinq 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 du SARS-CoV-2 incluant les mutation E484K, L452R et K417N du gène S OBLIGATOIRE <i>EN ABSENCE DU TEMOIN POSITIF DE PROCESSUS</i>	Pos*	Pos*	Pos*	Pos*	Neg	Validé
	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Problème lors de la qRT-PCR: Erreur de Master Mix ? Oubli de l'EPC ?
	Pos*	Pos*	Pos*	Pos*	Pos	Contamination lors de la préparation de la plaque par un échantillon.
Témoin positif de processus MRI RECOMMANDE <i>SI DISPONIBLE</i>	Pos†	Pos†	Pos†	Pos†	Pos‡	Validé
	Neg	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).

† Les valeurs de Ct doivent être comprises dans les limites de la carte de contrôle.

‡ La valeur de Ct obtenue dépend du thermocycleur, de la matrice analysée et des méthodes d'extractions utilisées. BioSella|al 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

⇒ Identification de la présence ou de l'absence du génome du SARS-CoV-2

Le Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 (Cat. N°PREMDX003 / PREMDX004) permet la détection de la présence du génome du SARS-CoV-2 dans l'échantillon grâce au système de détection des gènes *E* et *N*. En cas de positivité pour le génome du SARS-CoV-2, le Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 permet l'identification des mutations E484K, L452R et K417N du gène *S* présentes sur certains variants du virus. Aussi, la première étape de l'analyse consiste à identifier la présence ou l'absence du génome du SARS-CoV-2 dans l'échantillon.

Tableau 8. Différents types de résultats pouvant être obtenus pour les échantillons					
Cibles					
Gènes <i>E-N</i> (<i>FAM</i>)	Mutations du gène <i>S</i>			IPC endogène (ATTO425 / ATTO700)	Interprétation
	E484K (TEXAS RED)	L452R (VIC)	K417N (Cy5)		
Neg	N/A [†]	N/A [†]	N/A [†]	Pos*	Négatif ou Non détecté
Pos	N/A [†]	N/A [†]	N/A [†]		Détection du génome du SARS-CoV-2
Pos	N/A [†]	N/A [†]	N/A [†]	Neg ou Ct>35	Détection du génome du SARS-CoV-2 Absence de cellules en quantité suffisante Présence d'inhibiteurs [‡] ? Compétition avec la cible ?
Neg	N/A [†]	N/A [†]	N/A [†]	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/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.

‡ Ces valences ne sont pas à analyser à cette étape.

⇒ Identification des mutations E484K, L452R et K417N du gène S sur le génome du SARS-CoV-2

En cas de positivité de l'échantillon pour le génome du SARS-CoV-2 (lignes 2 et 3 du tableau 8), le Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 permet l'identification des mutations E484K, L452R et K417N du gène S présentes chez certains variants du virus. Aussi, la seconde étape de l'analyse consiste à identifier la présence ou l'absence de ces mutations sur le génome du SARS-CoV-2.

Tableau 9. Différents types de résultats pouvant être obtenus pour les échantillons

Cibles					Interprétation
Gènes E-N (FAM)	Mutations du gène S			IPC	
	E484K (TEXAS RED)	L452R (VIC)	K417N (Cy5)	endogène (ATTO425 / ATTO700)	
Neg	Neg	Neg	Neg	Pos*	Négatif ou Non détecté Erreur de sélection de l'échantillon ? Dégradation de l'échantillon ?
Pos	Neg	Neg	Neg		Absence des mutations E484K, L452R ou K417N. Présence d'une souche non mutée E484K, L452R et K417N. Suspicion variant Omicron non exclue
Pos	Pos	Neg	Neg		Détection de la mutation E484K sur le génome du SARS-CoV-2 Présence d'une souche mutée E484K et non mutée L452R et K417N.
Pos	Neg	Pos	Neg		Détection de la mutation L452R sur le génome du SARS-CoV-2 Présence d'une souche mutée L452R et non mutée E484K et K417N.
Pos	Neg	Neg	Pos		Détection de la mutation K417N sur le génome du SARS-CoV-2 Présence d'une souche mutée K417N et non mutée E484K et L452R.
Pos	Au moins deux des trois valences Pos				Détection du génome du SARS-CoV-2 présentant plusieurs mutations. Présence d'une souche mutée pour les valences positives.
Pos	Neg	Neg	Neg	Neg ou Ct>35	Ininterprétable pour l'analyse des mutations = analyse à refaire. Absence de cellules en quantité suffisante Présence d'inhibiteurs ¹ ? Compétition avec la cible ?
Pos	Au moins une des trois valences Pos				Positif ou Détecté pour la valence positive Ininterprétable pour la valence négative = analyse à refaire. Problème lors de l'extraction ? Présence d'inhibiteurs ¹ ? Dégradation des acides nucléiques dans l'échantillon ? Problème de prélèvement : quantité de cellules insuffisante

* 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/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.

Statut des mutations E484K, L452R et K417N pour les variants d'intérêt

Afin d'identifier les variants d'intérêt par rapport à leurs mutations E484K, L452R et K417N, BioSella propose le tableau ci-après. En se basant sur l'avis de la SFM du 19/07/2021 et sur le suivi épidémiologique publié par l'OMS datant du 10/11/2021, la liste des différents virus surveillés avec leur dénomination y est répertoriée.

Leurs caractéristiques se font sur la base d'un séquençage du *gène S*.

Pour rappel, la dénomination internationale de la surveillance des variants du SARS-CoV-2 se divise en trois catégories :

- VOC (Virus Of Concern): variant préoccupant.
- VOI (Virus Of Interest) : variant à suivre.
- VUS (Virus Under Surveillance) : variant en cours d'évaluation.

Les variants et leurs mutations sont en constante évolution, aussi il est nécessaire de se baser sur les versions en vigueur des documents de la SFM et de Santé Publique France.

Tableau 10. Correspondance des résultats avec le Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 et les variants d'intérêt actuellement identifiés

Résultat Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0			Dénomination			Type de Variants	Première Détection
E484K	L452R	K417N	Clade	Lignées	OMS		
-	-	-	20I/501Y.V1	B.1.1.7	Alpha	VOC	Royaume-Uni
			20A/214Ins	B.1.214.2	-	VUS	Belgique, Suisse, Royaume-Uni
			20D/452Q.V1	C.37	Lambda	VOI	Pérou, Chili
			20C/484K 20C/477N	B.1.526 +E484K ou S477N	Iota	VOI	New York
				B.1.640	-	VUS	Congo
			21K	B.1.1.529	Omicron	VOC	Afrique du Sud
+	-	-	20A/484K	B.1.525	Eta	VOI	Plusieurs Pays
			20B/681H	B.1.1.318	-	VOI	USA, Grèce, Royaume-Uni
			20A/477N	B.1.177/ B.1.620	-	VUS	Europe
			20A	B.1.621	Mu	VOI	Colombie
			20C/484K 20C/477N	B.1.526 + E484K ou S477N	Iota	VOI	New York
			20I/484K 20I/484Q	B.1.1.7 + 484K/Q	Alpha + E484K/Q	VOC	Royaume-Uni
			21E/501Y	B.1.1.28.3	Thêta	VOI	Philippines
			20B/484K	B.1.28.2	Zeta	VOI	Brésil
			20I/501Y.V3	P.1	Gamma	VOC	Brésil
20A/440K	B.1/ B.1.619	-	VUS	-			
-	+	-	21A/452R	B.1.617.2	Delta	VOC	Inde
			20C/452R	B.1.427/ B.1.429	Epsilon	VOI	Californien
			20I/452R	B.1.1.7 + 452R	Alpha + L452R	VOI	UK + 452R
			20D/	C.36.3	-	VOI	Egypte
			21B/452R	B.1.617.1	Kappa	VOI	Inde
+	-	+	20H/501Y.V2	B.1.351	Beta	VOC	Afrique du Sud
-	-	+	21K	B.1.529	Omicron	VOC	Afrique du Sud
-	+	+	21A/452R	B.1.617.2	Delta	VOC	Inde
+	+	-	Aucun variant connu à ce jour				
+	+	+	Aucun variant connu à ce jour				

PERFORMANCES DU Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0

Caractérisation de la qRT-PCR

1) Vérification de la spécificité analytique

In silico

La spécificité analytique *in silico* a été vérifiée par l'analyse 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 Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 permet d'identifier les mutations E484K, L452R et K417N du *gène S*. 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. Le statut de chaque souche a été confirmé par séquençage par le CNR :

- Souche virale inactivée SARS-CoV-2 lineage **20C** : souche de référence ne présentant pas les mutations E484K, L452R et K417N du *gène S*.
- Souche virale inactivée SARS-CoV-2 lineage **20I.501Y.V1** : variant alpha ne présentant pas les mutations E484K, L452R et K417N du *gène S*.
- Souche virale inactivée SARS-CoV-2 lineage **20H/501Y.V2** : variant beta présentant les mutations E484K et K417N du *gène S* et non muté L452.
- Souche virale inactivée SARS-CoV-2 lineage **20J/501Y.V3** : variant gamma présentant la mutation E484K du *gène S*, non muté L452 et présentant la mutation K417T du *gène S*.
- Souche virale inactivée SARS-CoV-2 lineage **21A/452R** : variant delta présentant la mutation L452R du *gène S*, non muté E484 et non muté K417.
- Souche virale inactivée SARS-CoV-2 lineage **20I/484Q** : variant alpha présentant la mutation E484Q du *gène S*, non muté L452 et non muté K417.
- Souche virale inactivée SARS-CoV-2 lineage **21K** : variant omicron présentant la mutation K417N et du *gène S*, non muté E484 et non muté L452.
- Souche virale inactivée SARS-CoV-2 lineage **AY.4.2** : variant delta présentant la mutation L452R du *gène S*, non muté E484 et non muté K417.

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

Souche	Résultats Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0			
	Gènes E-N	Mutations E484K	Mutation L452R	Mutation K417N
SARS-CoV-2 lineage 20C	DéTECTÉ	Non DÉTECTÉ	Non DÉTECTÉ	Non DÉTECTÉ
SARS-CoV-2 lineage 20I.501Y.V1	DéTECTÉ	Non DÉTECTÉ	Non DÉTECTÉ	Non DÉTECTÉ
SARS-CoV-2 lineage 20H/501Y.V2	DéTECTÉ	DÉTECTÉ	Non DÉTECTÉ	DÉTECTÉ
SARS-CoV-2 lineage 20J/501Y.V3	DéTECTÉ	DÉTECTÉ	Non DÉTECTÉ	Non DÉTECTÉ
SARS-CoV-2 lineage 21A/452R	DéTECTÉ	Non DÉTECTÉ	DÉTECTÉ	Non DÉTECTÉ
SARS-CoV-2 lineage 20J/484Q	DéTECTÉ	Non DÉTECTÉ	Non DÉTECTÉ	Non DÉTECTÉ
SARS-CoV-2 lineage 21K	DéTECTÉ	Non DÉTECTÉ	Non DÉTECTÉ	DÉTECTÉ
SARS-CoV-2 lineage AY.4.2	DéTECTÉ	Non DÉTECTÉ	DÉTECTÉ	Non DÉTECTÉ

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	Résultats			
	Gènes E-N	Mutation E484K	Mutation L452R	Mutation K417N
Influenza virus type A A/California	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Influenza A A/Hong Kong/8/68	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Influenza A virus (H3N2)/Virginia	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Influenza A virus (H3N2) A/Aichi/2/68	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Influenza B virus, Strain B/Taiwan/2/62	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Influenza A virus H1N1 A/Virginia/ATCC1/2009	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Influenza B/Lee/40	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Influenza B/Massachusetts/2/2012	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human coronavirus 229E	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human coronavirus OC43	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human coronavirus NL63	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human coronavirus HKU1	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i> CM-1	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Enterovirus 68	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Enterovirus 71	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Enterovirus Echovirus 4	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Haemophilus influenzae	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human Adenovirus 1	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human Adenovirus 2	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human Adenovirus 3	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human Adenovirus 4	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human Adenovirus 5	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human Adenovirus 6	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human Adenovirus 7	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human parainfluenza 2	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
<i>Bordetella holmesii</i> (MBC092)	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
<i>Bordetella parapertussis</i> (MBC007)	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
<i>Legionella pneumophila</i> (MBC031)	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
<i>Moraxella catarrhalis</i> (MBC117)	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (MBC035)	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Parainfluenza 3 (MBC039)	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Parainfluenza 4 a (MBC050)	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Rhinovirus (MBC091)	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Respiratory Syncytial Virus (Subtype A)	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Respiratory Syncytial Virus (Subtype B)	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human Respiratory Syncytial Virus	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human Respiratory Syncytial Virus	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human Respiratory Syncytial Virus	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human Respiratory Syncytial Virus	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté
Human Respiratory Syncytial Virus	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Non Détecté

⇒ La spécificité analytique du Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 a été confirmée expérimentalement sur l'ensemble des souches testées.

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

La limite de détection de la qRT-PCR (LD_{RT-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*, *N* et du gène *S* muté présentant les mutations E484K, L452R et K417N quantifiés par fluorimétrie en nombre de copies de séquence cible par qRT-PCR (nombre de copies dans 5 µl).

Les gènes cibles sont présents à raison d'une copie chacun par génome viral. Aussi, BioSella a déterminé les LD_{RT-PCR} lorsque chaque cible est présente avec un ratio équimolaire (ex : 1 copie de gène *E* + 1 copie de gène *N* + 1 copie de gène *S* muté présentant les mutations E484K, L452R et K417N).

Une première approche par des dilutions sériées de 10 en 10 a permis d'estimer la LD_{RT-PCR} entre 10 et 100 copies pour la valence gènes *E-N* et entre 1 et 50 copies pour le gène *S* muté présentant les mutations E484K, L452R et K417N. Des gammes de raison 2 sont réalisées de 200 à 6,25 copies/RT-PCR pour les gènes *E-N* et de 30 à 0,94 copies/RT-PCR pour les mutations E484K, L452R et K417N afin d'encadrer sur 6 dilutions la valeur estimée de la LD_{RT-PCR}.

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 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		
200	8/8	8/8	8/8	24/24	100 %
100	8/8	8/8	8/8	24/24	100 %
50	8/8	8/8	8/8	24/24	100 %
25	7/8	7/8	8/8	22/24	92%
12,5	2/8	6/8	5/8	13/24	54%
6,25	2/8	3/8	1/8	6/24	25%

*Les ARN transcrits des gènes *E* et *N* sont également présents en ratio équimolaire (par exemple 10 copies de gènes *E* et *N* + 10 copies de gène *S* muté)

⇒ L'approche expérimentale indique que la LD_{RT-PCR} à 95 % pour la valence gènes *E-N* (dernière dilution donnant au minimum 23 résultats positifs / 24) est de 50 copies/RT-PCR.

Données obtenues pour la valence mutation E484K 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		
30	8/8	8/8	8/8	24/24	100 %
15	8/8	8/8	8/8	24/24	100 %
7,5	8/8	8/8	8/8	24/24	100 %
3,75	7/8	8/8	8/8	23/24	96 %
1,88	6/8	7/8	8/8	21/24	88 %
0,94	4/8	3/8	6/8	13/24	54 %

*Les ARN transcrits des gènes E et N sont également présents en ratio équimolaire (par exemple 10 copies de gènes E et N + 10 copies de gène S muté)

⇒ L'approche expérimentale indique que la LD_{RT-PCR} à 95 % pour la valence mutation E484K du gène S (dernière dilution donnant au minimum 23 résultats positifs / 24) est de 3,75 copies/RT-PCR.

Données obtenues pour la valence mutation L452R 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		
30	8/8	8/8	8/8	24/24	100 %
15	8/8	8/8	8/8	24/24	100 %
7,5	8/8	8/8	8/8	24/24	100 %
3,75	8/8	8/8	8/8	24/24	100 %
1,88	5/8	5/8	7/8	17/24	71 %
0,94	4/8	2/8	5/8	11/24	46 %

*Les ARN transcrits des gènes E et N sont également présents en ratio équimolaire (par exemple 10 copies de gènes E et N + 10 copies de gène S muté)

⇒ L'approche expérimentale indique que la LD_{RT-PCR} à 95 % pour la valence mutation L452R du gène S (dernière dilution donnant au minimum 23 résultats positifs / 24) est de 3,75 copies/RT-PCR.

Données obtenues pour la valence mutation K417N 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		
30	8/8	8/8	8/8	24/24	100 %
15	8/8	8/8	8/8	24/24	100 %
7,5	8/8	8/8	8/8	24/24	100 %
3,75	8/8	8/8	8/8	24/24	100 %
1,88	7/8	6/8	7/8	20/24	83 %
0,94	6/8	5/8	6/8	17/24	71 %

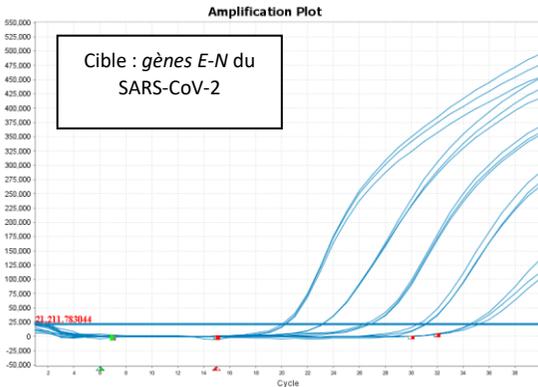
*Les ARN transcrits des gènes E et N sont également présents en ratio équimolaire (par exemple 10 copies de gènes E et N + 10 copies de gène S muté)

⇒ L'approche expérimentale indique que la LD_{RT-PCR} à 95 % pour la valence mutation K417N du gène S (dernière dilution donnant au minimum 23 résultats positifs / 24) est de 3,75 copies/RT-PCR.

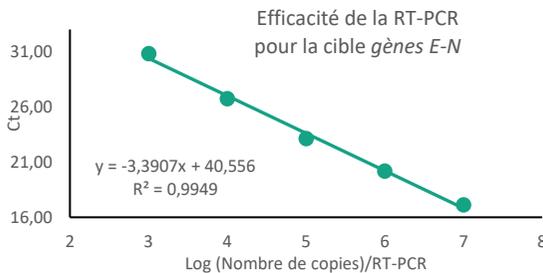
3) Efficacité

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 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 N* + 1 copie de *gène S* muté par exemple).

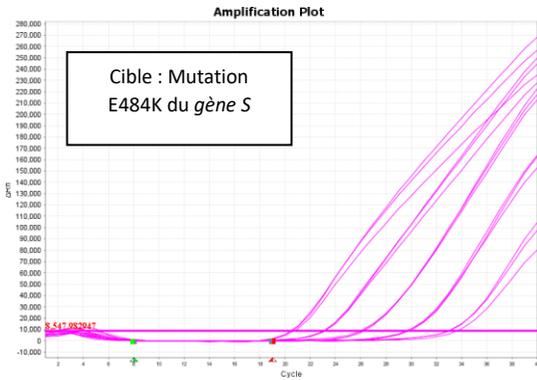


copies/RT-PCR	Ct
1×10^6	20,18
1×10^5	23,13
1×10^4	26,73
1×10^3	30,82
1×10^2	34,51

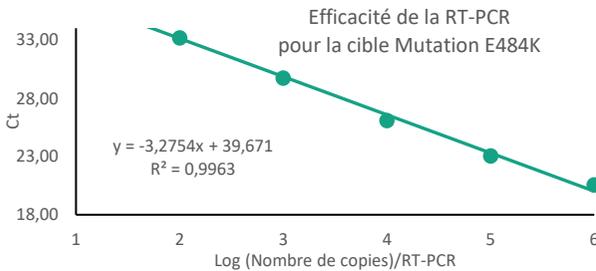


L'efficacité déduite de la pente de la droite est de : $E = (10^{-1/\text{pente}} - 1) \times 100 = 97,2 \%$.

⇒ L'efficacité du Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 est de 97,2 % pour la valence gènes E-N du SARS-CoV-2.

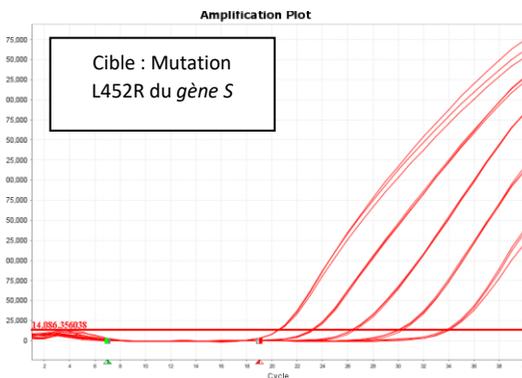


copies/RT-PCR	Ct
1×10^6	20,56
1×10^5	23,03
1×10^4	26,08
1×10^3	29,72
1×10^2	33,16

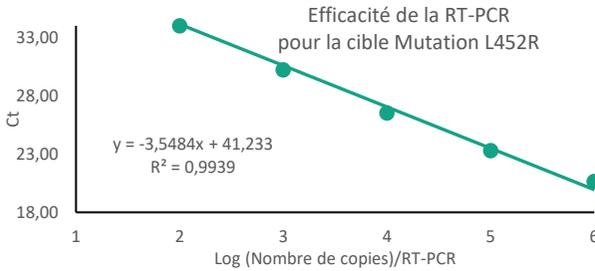


L'efficacité déduite de la pente de la droite est de : $E = (10^{-1/\text{pente}} - 1) \times 100 = 102,0 \%$.

⇒ L'efficacité du Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 est de 102 % pour la valence mutation E484K du gène S du SARS-CoV-2.

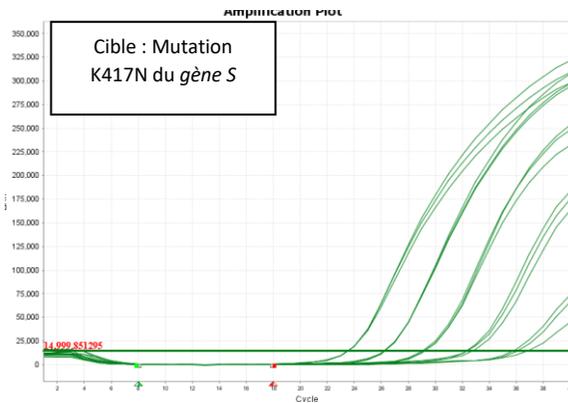


copies/RT-PCR	Ct
1×10^6	20,63
1×10^5	23,27
1×10^4	26,50
1×10^3	30,20
1×10^2	33,99

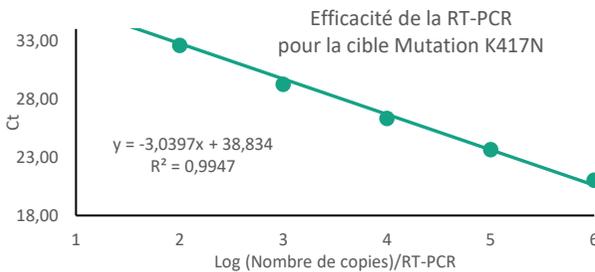


L'efficacité déduite de la pente de la droite est de : $E = (10^{-1/\text{pente}} - 1) \times 100 = 91,3 \%$.

⇒ L'efficacité du Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 est de 91,3 % pour la valence mutation L452R du gène S du SARS-CoV-2.



copies/RT-PCR	Ct
1×10^5	23,64
1×10^4	26,31
1×10^3	29,26
1×10^2	32,59
1×10^1	36,35



L'efficacité déduite de la pente de la droite est de : $E = (10^{-1/\text{pente}} - 1) \times 100 = 113,3 \%$.

⇒ L'efficacité du Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 est de 113,3 % pour la valence mutation K417N du gène S du 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 Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 décrit 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 :

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

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 des gènes E & N + 1 copie de gène S muté par exemple).

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

	Répétabilité (Ct)			CV% Répétabilité
Positif Fort	17,14	17,26	17,04	0,64
Positif Moyen	23,11	23,16	23,12	0,11
Positif Faible	30,87	30,55	31,05	0,82

⇒ Le coefficient de variation de répétabilité par niveau varie de 0,11 à 0,82% pour la valence gènes E-N du SARS-CoV-2.

Données obtenues pour la valence mutation E484K du gène S du SARS-CoV-2 :

	Répétabilité (Ct)			CV% Répétabilité
Positif Fort	21,11	20,88	20,97	0,55
Positif Moyen	26,52	26,71	26,72	0,42
Positif Faible	34,19	33,62	33,55	1,04

⇒ Le coefficient de variation de répétabilité par niveau varie de 0,42 à 1,04% pour la valence mutation E484K du gène S du SARS-CoV-2.

Données obtenues pour la valence mutation L452R du gène S du SARS-CoV-2 :

	Répétabilité (Ct)			CV% Répétabilité
Positif Fort	20,67	20,57	20,64	0,25
Positif Moyen	26,42	26,40	26,67	0,57
Positif Faible	33,83	33,99	34,14	0,46

⇒ Le coefficient de variation de répétabilité par niveau varie de 0,25 à 0,57% pour la valence mutation L452R du gène S du SARS-CoV-2.

Données obtenues pour la valence mutation K417N du gène S du SARS-CoV-2 :

	Répétabilité (Ct)			CV% Répétabilité
Positif Fort	21,14	20,96	20,99	0,46
Positif Moyen	26,25	26,33	26,35	0,20
Positif Faible	32,87	32,49	32,41	0,75

⇒ Le coefficient de variation de répétabilité par niveau varie de 0,20 à 0,75% pour la valence mutation K417N 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 transcrits du SARS-CoV-2 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 Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 décrit page 12 (programme 5Plex 2.0). A l'issue de ces trois séries, le coefficient de variation (CV) de fidélité intermédiaire 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 écart types 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 des gènes E & N + 1 copie de gène S muté par exemple).

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	17,14	16,76	16,7	1,41
Positif Moyen	23,11	23,34	25,16	4,70
Positif Faible	31,4	30,84	32,52	2,71

⇒ Le coefficient de variation de fidélité intermédiaire par niveau varie de 1,41 à 4,70% pour la valence gènes E-N du SARS-CoV-2.

Données obtenues pour la valence mutation E484K du gène S SARS-CoV-2 :

	Fidélité Intermédiaire (Ct)			CV%
	Ct série 1	Ct série 2	Ct série 3	Fidélité intermédiaire
Positif Fort	19,79	18,94	19,04	2,41
Positif Moyen	26,11	25,33	26,99	3,18
Positif Faible	32,79	32,61	34,79	3,62

⇒ Le coefficient de variation de fidélité intermédiaire par niveau varie de 2,41 à 3,62% pour la valence mutation E484K du gène S du SARS-CoV-2.

Données obtenues pour la valence mutation L452R du gène S SARS-CoV-2 :

	Fidélité Intermédiaire (Ct)			CV%
	Ct série 1	Ct série 2	Ct série 3	Fidélité intermédiaire
Positif Fort	18,97	18,53	18,43	1,54
Positif Moyen	25,29	25,13	26,91	3,82
Positif Faible	32,43	32,29	33,92	2,75

⇒ Le coefficient de variation de fidélité intermédiaire par niveau varie de 1,54 à 3,82% pour la valence mutation L452R du gène S du SARS-CoV-2.

Données obtenues pour la valence mutation K417N du gène S SARS-CoV-2 :

	Fidélité Intermédiaire (Ct)			CV%
	Ct série 1	Ct série 2	Ct série 3	Fidélité intermédiaire
Positif Fort	19,72	19,44	19,77	0,91
Positif Moyen	25,26	25,08	25,23	0,38
Positif Faible	31,36	31,82	33,38	3,29

⇒ Le coefficient de variation de fidélité intermédiaire par niveau varie de 0,38 à 3,29% pour la valence mutation K417N du gène S du SARS-CoV-2.

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

Nous avons confirmé les caractéristiques du Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 sur 3 thermocycleurs :

- QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems, ramping standard)
- AriaMx™ (Agilent Technologies, ramping Fast par défaut)
- CFX96 (Bio-Rad, 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 différents (CFX96, 1 bloc Peltier, AriaMx™ et QuantStudio™ 5, 6 blocs Peltier, lecture par ligne). Le Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 est utilisable sur tout autre thermocycleur possédant *a minima* les canaux de lecture 6-FAM, VIC, TEXAS-RED, Cy5, ATTO425 ou ATTO700. 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 $3 \times LD_{RT-PCR}$ 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.

Pour ce test, le programme utilisé est celui décrit page 12 : programme 5Plex 2.0.

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 $5 \mu\text{l}$. Cette quantité est déposée, après dépôt préalable de $15 \mu\text{l}$ 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 N* + 1 copie de *gène S* muté par exemple).

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

Etape	Plan d'expérience			Résultat attendu
	Nombre de niveaux de dilutions*	Nombre de répliques	Nombre de séries/ thermocycleur	
Limite de détection LD_{RT-PCR}	1 =3 x LD _{RT-PCR} soit 150 copies/RT-PCR pour la cible gènes E-N			100% des résultats positifs
	1 =3 x LD _{RT-PCR} soit 12 copies/RT-PCR pour la cible mutation E484K du gène S	6 pour le QuantStudio™ 5		
	1 =3 x LD _{RT-PCR} soit 12 copies/RT-PCR pour la cible mutation K417N gène S	6 pour l'AriaMx™	1	
	1 =3 x LD _{RT-PCR} soit 12 copies/RT-PCR pour la cible mutation L452R gène S	4 pour le CFX96	3	

Données obtenues : Fréquence de détection

Critère mesuré	Cible	Nombre de copies / RT-PCR*	AriaMx™ (ramping Fast par défaut)		QuantStudio 5 en ramping Standard		CFX96 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_{RT-PCR}	Gènes E-N du SARS-CoV-2	150	6	100%	6	100%	4	100%
	Mutation E484K du gène S du SARS-CoV-2	12	6	100%	6	100%	4	100%
	Mutation L452R du gène S du SARS-CoV-2	12	6	100%	6	100%	4	100%
	Mutation K417N du gène S du SARS-CoV-2	12	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 N + 15 copies de gène S muté)

⇒ Les valeurs de 3 x LD_{RT-PCR} (= 150 copies/RT-PCR pour la cible gènes E-N, 12 copies/RT-PCR pour la cible mutation E484K, 12 copies/RT-PCR pour la cible mutation L452R et 12 copies/RT-PCR pour la cible mutation K417N) sont confirmées pour les thermocycleurs QuantStudio 5, CFX96 et AriaMx™.

7) Robustesse de la qRT-PCR

La robustesse de la qRT-PCR a été évaluée en analysant le niveau 3 x LD_{RT-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 (programme 5Plex 2.0) :

Variation des paramètres critiques	
Conditions de référence	5 µl d'acides 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 ± 1°C de la température d'hybridation et d'élongation des amorces	62 et 64°C
pour un volume de 15 µl de Master Mix, variation de ± 5 sec 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 62°C	15 µl MM 64°C	15 µl MM 40 sec.	15 µl MM 50 sec.
Valence gène E-N du SARS-CoV-2	Réplique 1	33,48	34,79	34,77	33,08	37,70	33,92	32,99
	Réplique 2	34,36	34,49	34,04	32,01	38,77	34,66	33,48
	Réplique 3	35,16	34,24	34,42	32,94	39,16	33,36	33,28
	Réplique 4	34,40	33,31	34,48	32,91	36,23	33,53	33,15
	Réplique 5	34,72	34,31	34,02	32,67	34,85	33,90	32,99
	Réplique 6	33,34	34,50	34,28	33,03	36,02	34,03	32,99
Valence mutation E484K du gène S	Réplique 1	35,66	34,39	35,23	34,74	No Ct	36,14	36,38
	Réplique 2	35,62	35,15	34,55	34,73	36,70	34,50	34,78
	Réplique 3	35,23	34,55	34,86	34,91	36,39	33,86	34,71
	Réplique 4	36,29	35,39	34,11	35,24	36,66	35,13	34,56
	Réplique 5	34,97	34,71	36,18	34,68	37,93	35,08	34,36
	Réplique 6	35,25	34,36	34,81	34,51	35,64	35,00	34,34
Valence L452R du gène S	Réplique 1	34,15	33,43	33,52	33,12	37,31	34,28	34,02
	Réplique 2	35,02	34,17	33,81	32,78	36,06	33,63	33,43
	Réplique 3	33,68	34,12	33,69	33,08	35,19	33,23	33,53
	Réplique 4	33,88	33,99	32,56	33,02	35,80	33,38	33,34
	Réplique 5	34,40	33,37	34,40	32,58	35,72	33,99	32,93
	Réplique 6	33,22	33,46	34,15	32,09	34,65	33,65	32,92
Valence K417N du gène S	Réplique 1	33,76	33,00	33,16	33,56	34,61	34,31	33,69
	Réplique 2	34,73	33,11	33,34	32,95	34,11	33,15	33,28
	Réplique 3	32,83	32,54	32,95	33,14	33,91	33,42	33,81
	Réplique 4	33,94	34,23	32,84	33,64	34,25	34,14	34,18
	Réplique 5	33,42	33,45	34,27	33,22	34,61	34,03	33,38
	Réplique 6	32,83	33,43	32,98	32,98	33,90	34,48	32,84

Les variations de $\pm 10\%$ du volume d'acides nucléiques et de ± 5 secondes de la durée de leur élongation n'ont pas affecté la sensibilité analytique de la qRT-PCR puisque les six répliques de chacune des quatre valences du niveau $3 \times LD_{RT-PCR}$ ont fourni un signal détecté dans 100% des cas. **Cependant, les variations de + 1°C de la température d'hybridation des amorces peuvent altérer la sensibilité analytique pour les gènes E N, les mutations E484K et L452R.**

⇒ La robustesse du Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 est vérifiée pour les quatre valences pour l'utilisation de 15 µl de Master-Mix pour des variations du volume d'acides nucléiques et de la durée de l'étape d'hybridation des amorces et de leur élongation. Il est cependant important de maîtriser le paramètre de température et de s'assurer que celle-ci ne dépasse pas 63°C.

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

1) Limite de détection de la méthode complète

Le Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 (Cat. N°PREMDX003 / PREMDX004) permet la détection de la présence du génome du SARS-CoV-2 dans un échantillon grâce au système de détection des gènes *E* et *N*. En cas de positivité pour le génome du SARS-CoV-2, le Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 permet l'identification des mutations E484K, L452R et K417N du gène *S* présentes sur certains variants du virus.

Aussi, la LD_{METHODE} a été déterminée dans un premier temps pour la cible gènes *E-N* pour un résultat absence/présence du SARS-CoV-2 et dans un deuxième temps pour les cibles mutations E484K, L452R et K417N du gène *S* pour un criblage des mutations au sein des échantillons trouvés positifs pour la présence du SARS-CoV-2.

a. Limite de détection de la méthode complète pour la détection du SARS-CoV-2

La limite de détection méthode a été déterminée sur des dilutions en série de virus entiers inactivés titrés dans de l'éluât d'écouvillon négatif. La souche a été fournie par le Centre National de Référence (CNR) des virus des infections respiratoires dont la grippe :

- Souche virale inactivée SARS-CoV-2 lineage **20H/501Y.V2** : variant beta.

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 faite à l'aide du Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 (détail page 12, programme 5Plex 2.0) sur QuantStudio™ 5.

Résultat de l'approche de la LD_{METHODE} pour la détection du génome 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 gènes E-N	Ct Mutation E484K	Ct Mutation L452R	Ct Mutation K417N	Ct IPC
7,2.10⁴ copies/ml d'éluât d'écouvillon	720 copies/qRT-PCR	1	33,63				26,38
		2	34,53				26,69
		3	36,34	N/A*	N/A*	N/A*	25,38
		4	36,75				24,89
		5	35,99				21,64
7,2.10³ copies/ml d'éluât d'écouvillon	72 copies/qRT-PCR	1	No Ct				No Ct
		2	No Ct				29,13
		3	No Ct	N/A*	N/A*	N/A*	23,02
		4	No Ct				28,16
		5	39,13				24,33
7,2.10² copies/ml d'éluât d'écouvillon	7,2 copies/qRT-PCR	1	39,35				No Ct
		2	No Ct				26,80
		3	No Ct	N/A*	N/A*	N/A*	28,40
		4	No Ct				23,92
		5	No Ct				28,82

N/A* : non analysé

⇒ Pour la valence gènes E-N, la LD_{METHODE} approchée est de 7,2.10⁴ copies/ml d'éluât d'écouvillon (720 copies/qRT-PCR) pour la méthode d'extraction BioExtract® Premium Mag.

Résultat de la confirmation de la LD_{METHODE}

Plan d'expérience :

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

Niveau de positivité		BioExtract® Premium Mag					
		Réplique	Ct <i>gènes E-N</i>	Ct Mutation E484K	Ct Mutation L452R	Ct mutation K417N	Ct IPC
7,2.10⁴ copies/ml d'éluat d'écouvillon	720 copies/qRT- PCR	1	31,60	N/A*	N/A*	N/A*	25,86
		2	32,45	N/A*	N/A*	N/A*	27,85
		3	32,59	N/A*	N/A*	N/A*	28,30
		4	31,59	N/A*	N/A*	N/A*	28,02
		5	33,38	N/A*	N/A*	N/A*	26,26
		6	32,31	N/A*	N/A*	N/A*	27,74
		7	33,01	N/A*	N/A*	N/A*	26,02
		8	35,45	N/A*	N/A*	N/A*	27,83
		9	33,63	N/A*	N/A*	N/A*	27,04
		10	33,50	N/A*	N/A*	N/A*	28,86
		11	31,28	N/A*	N/A*	N/A*	26,29
		12	32,54	N/A*	N/A*	N/A*	27,21
		13	32,69	N/A*	N/A*	N/A*	27,19
		14	33,31	N/A*	N/A*	N/A*	28,26
		15	33,51	N/A*	N/A*	N/A*	28,31
		16	32,28	N/A*	N/A*	N/A*	27,79
		17	31,94	N/A*	N/A*	N/A*	26,95
		18	32,51	N/A*	N/A*	N/A*	28,20
		19	32,73	N/A*	N/A*	N/A*	25,50
		20	33,58	N/A*	N/A*	N/A*	26,91

N/A* : non analysé

⇒ Ainsi, la LD_{METHODE} pour le Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 associé au BioExtract® Premium Mag est de 7,2.10⁴ copies/ml d'éluat d'écouvillon (720 copies/qRT-PCR) pour la valence *gènes E-N*.

b. Limite de détection de la méthode complète pour le criblage des mutations E484K, K417N et L452R du gène S

La limite de détection méthode a été déterminée 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 :

- Souche virale inactivée SARS-CoV-2 lineage **20H/501Y.V2** : variant beta présentant les mutations E484K, K417N du gène S et non muté L452
- Souche virale inactivée SARS-CoV-2 lineage **21A.542R** : variant delta présentant la mutation L452R et non muté E484 et K417.

Le système d'extraction d'acides nucléiques testé est le BioExtract® Premium Mag (BioSella). 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 faite à l'aide du Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 (détail page 12, programme 5Plex 2.0) QuantStudio™ 5.

Résultat de l'approche de la LD_{METHODE} pour l'identification des mutations E484K, L452R et K417N

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 souche SARS-CoV-2 lineage 20H/501Y.V2 :

Niveau de positivité		BioExtract® Premium Mag					
		réplique	Ct gènes E-N2	Ct Mutation E484K	Ct Mutation L452R	Ct Mutation K417N	Ct IPC
7,2.10 ⁴ copies/ml d'éluât d'écouvillon	720 copies/qRT-PCR	1	N/A [‡]	35,05	No Ct	33,22	N/A [‡]
		2		36,72	No Ct	33,72	
		3		36,10	No Ct	32,99	
		4		36,68	No Ct	33,56	
		5		35,78	No Ct	33,20	
7,2.10 ³ copies/ml d'éluât d'écouvillon	72 copies/qRT-PCR	1	N/A [‡]	38,67	No Ct	36,45	N/A [‡]
		2		38,68	No Ct	36,82	
		3		38,53	No Ct	36,04	
		4		38,00	No Ct	36,19	
		5		36,96	No Ct	34,97	
7,2.10 ² copies/ml d'éluât d'écouvillon	7,2 copies/qRT-PCR	1	N/A [‡]	38,38	No Ct	36,69	N/A [‡]
		2		No Ct	No Ct	No Ct	
		3		No Ct	No Ct	No Ct	
		4		No Ct	No Ct	No Ct	
		5		No Ct	No Ct	No Ct	

[‡] Ces valences ne sont pas à analyser à cette étape.

- ⇒ Pour la valence mutation E484K du gène S, la LD_{METHODE} approchée est de 7,2.10³ copies/ml d'éluât d'écouvillon (72 copies/qRT-PCR) pour la méthode d'extraction BioExtract® Premium Mag.
- ⇒ Pour la valence mutation K417N du gène S, la LD_{METHODE} approchée est de 7,2.10³ copies/ml d'éluât d'écouvillon (72 copies/qRT-PCR) pour la méthode d'extraction BioExtract® Premium Mag.

Données brutes (valeurs de Ct) de l'approche de la LD_{METHODE} pour la souche SARS-CoV-2 lineage 21A/452R :

Niveau de positivité		BioExtract® Premium Mag					
		réplique	Ct gènes E-N2	Ct Mutation E484K	Ct Mutation L452R	Ct Mutation K417N	Ct IPC
5,69.10 ⁵ copies/ml d'éluât d'écouvillon	5,69.10 ³ copies/qRT-PCR	1	N/A [‡]	No Ct	33,25	No Ct	N/A [‡]
		2		No Ct	32,74	No Ct	
		3		No Ct	34,16	No Ct	
		4		No Ct	33,42	No Ct	
		5		No Ct	33,29	No Ct	
1,14.10 ⁵ copies/ml d'éluât d'écouvillon	1,14.10 ³ copies/qRT-PCR	1	N/A [‡]	No Ct	35,00	No Ct	N/A [‡]
		2		No Ct	35,82	No Ct	
		3		No Ct	35,20	No Ct	
		4		No Ct	36,07	No Ct	
		5		No Ct	37,20	No Ct	

[‡] Ces valences ne sont pas à analyser à cette étape.

- ⇒ Pour la valence mutation L452R du gène S, la LD_{METHODE} approchée est de 1,14.10⁵ copies/ml d'éluât d'écouvillon (1140 copies/qRT-PCR) pour la méthode d'extraction BioExtract® Premium Mag.

Résultat de la confirmation de la LD_{METHODE}

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 confirmation de la LD_{METHODE} pour la souche SARS-CoV-2 lineage 20H/501Y.V2 :

Niveau de positivité		BioExtract® Premium Mag					
		Réplique	Ct gène E-N	Ct Mutation E484K	Ct mutation L452R	Ct Mutation K417N	Ct IPC
7,2.10 ³ copies/ml d'éluât d'écouvillon	72 copies/qRT-PCR	1	N/A [†]	37,96	No Ct	35,47	N/A [†]
		2	N/A [†]	38,41	No Ct	37,42	N/A [†]
		3	N/A [†]	36,99	No Ct	35,44	N/A [†]
		4	N/A [†]	36,71	No Ct	35,16	N/A [†]
		5	N/A [†]	35,90	No Ct	35,13	N/A [†]
		6	N/A [†]	37,76	No Ct	36,62	N/A [†]
		7	N/A [†]	37,48	No Ct	35,32	N/A [†]
		8	N/A [†]	36,99	No Ct	35,92	N/A [†]
		9	N/A [†]	37,55	No Ct	35,23	N/A [†]
		10	N/A [†]	37,00	No Ct	35,11	N/A [†]
		11	N/A [†]	36,00	No Ct	34,82	N/A [†]
		12	N/A [†]	36,59	No Ct	35,45	N/A [†]
		13	N/A [†]	37,44	No Ct	34,78	N/A [†]
		14	N/A [†]	36,43	No Ct	35,34	N/A [†]
		15	N/A [†]	37,52	No Ct	35,18	N/A [†]
		16	N/A [†]	36,50	No Ct	34,99	N/A [†]
		17	N/A [†]	36,07	No Ct	35,68	N/A [†]
		18	N/A [†]	35,98	No Ct	35,89	N/A [†]
		19	N/A [†]	36,93	No Ct	36,38	N/A [†]
		20	N/A [†]	37,17	No Ct	34,93	N/A [†]

[†] Ces valences ne sont pas à analyser à cette étape.

⇒ La LD_{METHODE} pour le Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 associé au BioExtract® Premium Mag est de 7,2.10³ copies/ml d'éluât d'écouvillon (72 copies/qRT-PCR) pour les valences mutation E484K et mutation K417N du gène S.

Données brutes (valeurs de Ct) de la confirmation de la LD_{METHODE} pour la souche SARS-CoV-2 lineage 21A/452R :

Niveau de positivité		BioExtract® Premium Mag					
		Réplique	Ct gène E-N	Ct Mutation E484K	Ct mutation L452R	Ct Mutation K417N	Ct IPC
1,14.10⁵ copies/ml d'éluât d'écouvillon	1,14.10³ copies/qRT-PCR	1	N/A [‡]	No Ct	36,12	No Ct	N/A [‡]
		2	N/A [‡]	No Ct	36,50	No Ct	N/A [‡]
		3	N/A [‡]	No Ct	37,38	No Ct	N/A [‡]
		4	N/A [‡]	No Ct	37,31	No Ct	N/A [‡]
		5	N/A [‡]	No Ct	36,94	No Ct	N/A [‡]
		6	N/A [‡]	No Ct	37,11	No Ct	N/A [‡]
		7	N/A [‡]	No Ct	36,86	No Ct	N/A [‡]
		8	N/A [‡]	No Ct	36,55	No Ct	N/A [‡]
		9	N/A [‡]	No Ct	35,54	No Ct	N/A [‡]
		10	N/A [‡]	No Ct	34,94	No Ct	N/A [‡]
		11	N/A [‡]	No Ct	37,15	No Ct	N/A [‡]
		12	N/A [‡]	No Ct	37,26	No Ct	N/A [‡]
		13	N/A [‡]	No Ct	36,10	No Ct	N/A [‡]
		14	N/A [‡]	No Ct	37,23	No Ct	N/A [‡]
		15	N/A [‡]	No Ct	36,50	No Ct	N/A [‡]
		16	N/A [‡]	No Ct	37,87	No Ct	N/A [‡]
		17	N/A [‡]	No Ct	37,04	No Ct	N/A [‡]
		18	N/A [‡]	No Ct	37,50	No Ct	N/A [‡]
		19	N/A [‡]	No Ct	38,26	No Ct	N/A [‡]
		20	N/A [‡]	No Ct	37,65	No Ct	N/A [‡]

‡ Ces valences ne sont pas à analyser à cette étape.

⇒ Ainsi, la LD_{METHODE} pour le Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 associé au BioExtract® Premium Mag est de 1,14.10⁵ copies/ml d'éluât d'écouvillon (1140 copies/qRT-PCR) pour la valence mutation L452R du gène S.

2) Spécificité et Sensibilité diagnostiques sur échantillons de statut connu

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

La spécificité et la sensibilité diagnostiques de la méthode complète associant le **Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0** au kit d'extraction **BioExtract® Premium Mag** a été déterminée pour chacune des valences sur matrice écouvillon nasopharyngé profond.

Concernant la détection du génome du SARS-CoV-2 (résultat présence/absence), la sensibilité et spécificité diagnostique ont été déterminées *in vitro* sur 235 échantillons provenant de patients préalablement statués positifs et 93 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 QuantStudio™ 5.

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 Bio-T Kit® TriStar Covid-19		Total
		Présence du génome du SARS-CoV-2	Absence du génome du SARS-CoV-2	
Résultats Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0	Présence du génome du SARS-CoV-2	228	0	228
	Absence du génome du SARS-CoV-2	7*	93	100
	Total	235	93	328

⇒ Sur les panels d'échantillons analysés, la sensibilité diagnostique est $Se = 97\%$.

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

* : il est à noter que les 7 échantillons attendus positifs et trouvés négatifs à l'aide du Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 avaient des valeurs de Ct ≥ 32 obtenues à l'aide du Bio-T kit® TriStar Covid 19. Les extraits ont été conservés plusieurs mois à $\leq -16^\circ\text{C}$ avant d'être réanalysés à l'aide du Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0. Il est donc possible que ces extraits soient moins stables, expliquant ainsi la baisse de sensibilité observée.

b. Spécificité et sensibilité pour la détection des mutations E484K, K417N et L452R du gène S du SARS-CoV-2

La spécificité et la sensibilité diagnostiques du Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 pour la détection des mutations E484K, L452R et K417N du gène S du SARS-CoV-2 ont été déterminées *in vitro* sur un panel d'échantillons provenant de patients préalablement statués pour chaque mutation. Le statut de chaque échantillon a été obtenu par séquençage NGS.

Pour la mutation E484K du gène S, le panel se compose de 114 échantillons préalablement statués positifs et 93 échantillons préalablement statués négatifs.

Pour la mutation L452R du gène S, le panel se compose de 93 échantillons préalablement statués positifs et 114 échantillons préalablement statués négatifs.

Pour la mutation K417N du gène S, le panel se compose de 86 échantillons préalablement statués positifs et 93 échantillons préalablement statués négatifs.

Ces résultats ont été obtenus sur QuantStudio™ 5 (Applied BioSystems) et avec le système d'extraction BioExtract® Premium Mag.

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 mutation E484K :

		Statut séquençage		Total
		Présence de la mutation E484K	Absence de la mutation E484K	
Résultats Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0	Présence de la mutation E484K	109	0	109
	Absence de la mutation E484K	5*	93	98
	Total	114	93	207

⇒ Pour la mutation E484K, sur les panels d'échantillons analysés, la sensibilité diagnostique est $Se = 95,6 \%$.

⇒ Pour la mutation E484K, sur les panels d'échantillons analysés, la spécificité diagnostique est $Sp = 100 \%$.

* : il est à noter que les 5 échantillons attendus positifs pour la mutation E484K et trouvés négatifs à l'aide du Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 avaient des valeurs de Ct ≥ 32 obtenus à l'aide du Bio-T kit® FiveStar Covid 19. Les extraits ont été conservés plusieurs mois à $\leq -16^\circ\text{C}$ avant d'être réanalysés à l'aide du Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0. Il est donc possible que ces extraits soient moins stables, expliquant ainsi la baisse de sensibilité observée.

Résultats pour la mutation L452R :

		Statut Séquençage		Total
		Présence de la mutation L452R	Absence de la mutation L452R	
Résultats Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0	Présence de la mutation L452R	93	0	93
	Absence de la mutation L452R	0	114	114
	Total	93	114	207

- ⇒ Pour la mutation L452R, sur les panels d'échantillons analysés, la sensibilité diagnostique est $Se = 100 \%$.
- ⇒ Pour la mutation L452R, sur les panels d'échantillons analysés, la spécificité diagnostique est $Sp = 100 \%$.

Résultats pour la mutation K417N :

		Statut Séquençage		Total
		Présence de la mutation K417N	Absence de la mutation K417N	
Résultats Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0	Présence de la mutation K417N	84	0	84
	Absence de la mutation K417N	2*	93	95
	Total	86	93	179

- ⇒ Pour la mutation K417N, sur les panels d'échantillons analysés, la sensibilité diagnostique est $Se = 97,7 \%$.
- ⇒ Pour la mutation K417N, sur les panels d'échantillons analysés, la spécificité diagnostique est $Sp = 100 \%$.

* : il est à noter que les 2 échantillons attendus positifs pour la mutation K417N et trouvés négatifs à l'aide du Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 avaient des valeurs de Ct ≥ 32 sur la valence gènes E-N.

Caractérisation de méthode complète pour la matrice de type prélèvements salivaires

1) Limite de détection de la méthode complète

Comme pour la matrice de type écouvillon naso-pharyngé profond, la LD_{METHODE} pour la matrice de type prélèvements salivaires a été déterminée dans un premier temps pour la cible *gènes E-N* pour un résultat absence/présence du SARS-CoV-2 et dans un deuxième temps pour les cibles mutations E484K, K417N et L452R du *gène S* pour un criblage des mutations au sein des échantillons trouvés positifs pour la présence du SARS-CoV-2.

a. Limite de détection de la méthode complète pour la détection du SARS-CoV-2

La limite de détection méthode associant une méthode d'extraction et le Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 a été déterminée sur des dilutions en série de virus entiers inactivés titrés dans de l'éluât de salives négatives. Les souches ont été fournies par le Centre National de Référence (CNR) des virus des infections respiratoires dont la grippe :

- Souche virale inactivée SARS-CoV-2 **lineage 20H/501Y.V2** : variant beta présentant les mutations E484K, K417N du gène S et non muté L452
- Souche virale inactivée SARS-CoV-2 **lineage 21A.542R** : variant delta présentant la mutation L452R et non muté E484 et K417.

Le système d'extraction d'acides nucléiques testé est le BioExtract® Premium Mag (BioSella). 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 faite à l'aide du Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 (détail page 12, programme 5Plex 2.0) sur QuantStudio™ 5.

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

Plan d'expérience :

Nombre de dilutions	Nombre de répliques par série	Nombre de séries indépendantes
2	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 gènes E-N	Ct Mutation E484K	Ct Mutation L452R	Ct Mutation K417N	Ct IPC
1,14.10 ⁶ copies/ml de salive	1,14.10 ⁴ copies/qRT-PCR	1	28,12				22,84
		2	29,37				23,31
		3	30,57	N/A*	N/A*	N/A*	23,63
		4	30,73				23,79
		5	30,63				22,95
5,69.10 ⁵ copies/ml de salive	5,69.10 ³ copies/qRT-PCR	1	31,41				23,13
		2	32,55				23,86
		3	32,54	N/A*	N/A*	N/A*	23,26
		4	33,04				23,53
		5	31,84				23,79

N/A* : non analysé

⇒ Pour la valence gènes E-N, la LD_{METHODE} approchée est de 5,69.10⁵ copies/ml de salive (5,69.10³ copies/qRT-PCR).

Résultat de la confirmation de la LD_{METHODE}

Plan d'expérience :

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

Niveau de positivité		BioExtract® Premium Mag					
		Réplique	Ct gènes E-N	Ct Mutation E484K	Ct Mutation L452R	Ct mutation K417N	Ct IPC
5,69.10 ⁵ copies/ml de salive	5,69.10 ³ copies/qRT-PCR	1	30,47	N/A*	N/A*	N/A*	22,99
		2	31,59	N/A*	N/A*	N/A*	23,65
		3	30,33	N/A*	N/A*	N/A*	23,40
		4	31,08	N/A*	N/A*	N/A*	23,25
		5	30,16	N/A*	N/A*	N/A*	23,01
		6	29,73	N/A*	N/A*	N/A*	23,02
		7	30,57	N/A*	N/A*	N/A*	23,09
		8	30,26	N/A*	N/A*	N/A*	22,76
		9	31,31	N/A*	N/A*	N/A*	22,94
		10	31,14	N/A*	N/A*	N/A*	23,11
		11	30,32	N/A*	N/A*	N/A*	23,05
		12	31,36	N/A*	N/A*	N/A*	23,30
		13	29,68	N/A*	N/A*	N/A*	22,72
		14	29,94	N/A*	N/A*	N/A*	23,00
		15	30,87	N/A*	N/A*	N/A*	22,71
		16	31,29	N/A*	N/A*	N/A*	23,44
		17	31,15	N/A*	N/A*	N/A*	23,20
		18	31,08	N/A*	N/A*	N/A*	22,52
		19	30,38	N/A*	N/A*	N/A*	23,03
		20	30,89	N/A*	N/A*	N/A*	23,09

N/A* : non analysé

⇒ Ainsi, la LD_{METHODE} pour le Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 associé au BioExtract® Premium Mag est de 5,69.10⁵ copies/ml de salive (5,69.10³ copies/qRT-PCR) pour la valence gènes E-N.

b. Limite de détection de la méthode complète pour le criblage des mutations E484K, K417N et L452R du gène S

La limite de détection méthode associant une méthode d'extraction et le Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 a été déterminée sur des dilutions en série de virus entiers inactivés titrés dans de l'éluât de salives négatives. Les souches ont été fournies par le Centre National de Référence (CNR) des virus des infections respiratoires dont la grippe :

- Souche virale inactivée SARS-CoV-2 lineage **20H/501Y.V2** : variant beta présentant les mutations E484K, K417N du gène S et non muté L452
- Souche virale inactivée SARS-CoV-2 lineage **21A.542R** : variant delta présentant la mutation L452R et non muté E484 et K417.

Le système d'extraction d'acides nucléiques testé est le BioExtract® Premium Mag (BioSella). 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 faite à l'aide du Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 (détail page 12, programme 5Plex 2.0) QuantStudio™ 5.

Résultat de l'approche de la LD_{METHODE} pour l'identification des mutations E484K, L452R et K417N

Plan d'expérience :

Nombre de dilutions	Nombre de répliques par série	Nombre de séries indépendantes
2	5	1

Données brutes (valeurs de Ct) de l'approche de la LD_{METHODE} pour la souche SARS-CoV-2 lineage 20H/501Y.V2 :

Niveau de positivité		BioExtract® Premium Mag					
		réplique	Ct gènes E-N2	Ct Mutation E484K	Ct Mutation L452R	Ct Mutation K417N	Ct IPC
1,45.10 ⁶ copies/ml de salive	1,45.10 ⁴ copies/qRT-PCR	1		35,31		33,69	N/A [‡]
		2		35,40		33,42	
		3	N/A [‡]	36,76	N/A [‡]	33,09	
		4		35,58		33,93	
		5		37,17		34,09	
7,2.10 ⁵ copies/ml de salive	7,2.10 ³ copies/qRT- PCR	1		35,08		33,15	N/A [‡]
		2		35,55		32,92	
		3	N/A [‡]	37,55	N/A [‡]	33,03	
		4		35,24		33,59	
		5		35,85		33,38	

‡ Ces valences ne sont pas à analyser à cette étape.

⇒ Pour les valences mutation E484K et K417N du gène S, la LD_{METHODE} approchée est de 7,2.10⁵ copies/ml de salive (7,2.10³ copies/qRT-PCR).

Données brutes (valeurs de Ct) de l'approche de la LD_{METHODE} pour la souche SARS-CoV-2 lineage 21A/452R :

Niveau de positivité		BioExtract® Premium Mag					
		réplique	Ct gènes E-N2	Ct Mutation E484K	Ct Mutation L452R	Ct Mutation K417N	Ct IPC
1,14.10 ⁶ copies/ml de salive	1,14.10 ⁴ copies/qRT-PCR	1			32,02		N/A [‡]
		2			33,05		
		3	N/A [‡]	N/A [‡]	32,98	N/A [‡]	
		4			33,01		
		5			33,70		
5,69.10 ⁵ copies/ml de salive	5,69.10 ³ copies/qRT-PCR	1			35,03		N/A [‡]
		2			35,02		
		3	N/A [‡]	N/A [‡]	35,14	N/A [‡]	
		4			35,10		
		5			34,12		

‡ Ces valences ne sont pas à analyser à cette étape.

⇒ Pour la valence mutation L452R du gène S, la LD_{METHODE} approchée est de 5,69.10⁵ copies/ml de salive (5,69.10³ copies/qRT-PCR).

Résultat de la confirmation de la LD_{METHODE}

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 confirmation de la LD_{METHODE} pour la souche SARS-CoV-2 lineage 20H/501Y.V2 :

Niveau de positivité		BioExtract® Premium Mag					
		Réplique	Ct gène E-N	Ct Mutation E484K	Ct mutation L452R	Ct Mutation K417N	Ct IPC
7,2.10 ⁵ copies/ml de salive	7,2.10 ³ copies/qRT-PCR	1	N/A [‡]	35,15	N/A [‡]	32,91	N/A [‡]
		2	N/A [‡]	34,97	N/A [‡]	33,18	N/A [‡]
		3	N/A [‡]	35,78	N/A [‡]	32,82	N/A [‡]
		4	N/A [‡]	34,77	N/A [‡]	32,94	N/A [‡]
		5	N/A [‡]	35,25	N/A [‡]	32,22	N/A [‡]
		6	N/A [‡]	35,91	N/A [‡]	32,80	N/A [‡]
		7	N/A [‡]	34,85	N/A [‡]	32,64	N/A [‡]
		8	N/A [‡]	34,36	N/A [‡]	32,39	N/A [‡]
		9	N/A [‡]	33,61	N/A [‡]	32,07	N/A [‡]
		10	N/A [‡]	34,64	N/A [‡]	32,94	N/A [‡]
		11	N/A [‡]	34,69	N/A [‡]	33,21	N/A [‡]
		12	N/A [‡]	35,73	N/A [‡]	32,96	N/A [‡]
		13	N/A [‡]	34,42	N/A [‡]	31,94	N/A [‡]
		14	N/A [‡]	36,00	N/A [‡]	32,16	N/A [‡]
		15	N/A [‡]	33,94	N/A [‡]	32,35	N/A [‡]
		16	N/A [‡]	36,07	N/A [‡]	33,55	N/A [‡]
		17	N/A [‡]	35,57	N/A [‡]	32,62	N/A [‡]
		18	N/A [‡]	34,64	N/A [‡]	32,34	N/A [‡]
		19	N/A [‡]	34,90	N/A [‡]	32,70	N/A [‡]
		20	N/A [‡]	36,41	N/A [‡]	32,70	N/A [‡]

[‡] Ces valences ne sont pas à analyser à cette étape.

⇒ La LD_{METHODE} pour le Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 associé au BioExtract® Premium Mag est de 7,2.10⁵ copies/ml de salive (7,2.10³ copies/qRT-PCR) pour les valences mutations E484K et K417N du gène S.

Données brutes (valeurs de Ct) de la confirmation de la LD_{METHODE} pour la souche SARS-CoV-2 lineage 21A/452R :

Niveau de positivité		BioExtract® Premium Mag					
		Réplique	Ct gène E-N	Ct Mutation E484K	Ct mutation L452R	Ct Mutation K417N	Ct IPC
5,69.10 ⁵ copies/ml de salive	5,69.10 ³ copies/qRT-PCR	1	N/A [‡]	N/A [‡]	33,98	N/A [‡]	N/A [‡]
		2	N/A [‡]	N/A [‡]	34,43	N/A [‡]	N/A [‡]
		3	N/A [‡]	N/A [‡]	33,82	N/A [‡]	N/A [‡]
		4	N/A [‡]	N/A [‡]	34,08	N/A [‡]	N/A [‡]
		5	N/A [‡]	N/A [‡]	35,20	N/A [‡]	N/A [‡]
		6	N/A [‡]	N/A [‡]	33,60	N/A [‡]	N/A [‡]
		7	N/A [‡]	N/A [‡]	33,69	N/A [‡]	N/A [‡]
		8	N/A [‡]	N/A [‡]	33,49	N/A [‡]	N/A [‡]
		9	N/A [‡]	N/A [‡]	34,25	N/A [‡]	N/A [‡]
		10	N/A [‡]	N/A [‡]	34,34	N/A [‡]	N/A [‡]
		11	N/A [‡]	N/A [‡]	34,37	N/A [‡]	N/A [‡]
		12	N/A [‡]	N/A [‡]	34,04	N/A [‡]	N/A [‡]
		13	N/A [‡]	N/A [‡]	33,76	N/A [‡]	N/A [‡]
		14	N/A [‡]	N/A [‡]	33,64	N/A [‡]	N/A [‡]
		15	N/A [‡]	N/A [‡]	33,78	N/A [‡]	N/A [‡]
		16	N/A [‡]	N/A [‡]	33,62	N/A [‡]	N/A [‡]
		17	N/A [‡]	N/A [‡]	33,34	N/A [‡]	N/A [‡]
		18	N/A [‡]	N/A [‡]	34,15	N/A [‡]	N/A [‡]
		19	N/A [‡]	N/A [‡]	33,64	N/A [‡]	N/A [‡]
		20	N/A [‡]	N/A [‡]	34,11	N/A [‡]	N/A [‡]

‡ Ces valences ne sont pas à analyser à cette étape.

⇒ La LD_{METHODE} pour le Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 associé au BioExtract® Premium Mag est de 5,69.10⁵ copies/ml de salive (5,69.10³ copies/qRT-PCR) pour la valence mutation L452R du gène S.

2) Spécificité et Sensibilité diagnostiques sur échantillons de statut connu

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

La spécificité et la sensibilité diagnostiques de la méthode complète associant le **Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0** au kit d'extraction **BioExtract® Premium Mag** ont été déterminées pour chacune des valences sur salive.

Concernant la détection du génome du SARS-CoV-2 (résultat présence/absence), la sensibilité et spécificité diagnostique ont été déterminées *in vitro* sur **36** couples ENP/Salive provenant de patients préalablement statués positifs et **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 QuantStudio™ 5.

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 *gènes E et N* :

		Statut Bio-T Kit® TriStar Covid-19		Total
		Présence du génome du SARS-CoV-2	Absence du génome du SARS-CoV-2	
Résultats Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0	Présence du génome du SARS-CoV-2	34	1	35
	Absence du génome du SARS-CoV-2	2*	93	95
	Total	36	94	130

⇒ Sur les panels d'échantillons analysés, la sensibilité diagnostique est $Se = 94.44\%$.

La borne basse de l'intervalle de confiance à 95 % de l'étude de sensibilité est de 86.96%

⇒ Sur les panels d'échantillons analysés, la spécificité diagnostique est $Sp = 97.87\%$.

* : il est à noter que les 2 échantillons attendus positifs et trouvés négatifs à l'aide du Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 avaient des valeurs de Ct ≥ 32 obtenues à l'aide du Bio-T kit® TriStar Covid 19. Les extraits ont été conservés plusieurs mois à $\leq 16^\circ\text{C}$ avant d'être réanalysés à l'aide du Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0. Il est donc possible que ces extraits soient moins stables, expliquant ainsi la baisse de sensibilité observée.

b. Spécificité et sensibilité pour la détection des mutations E484K, K417N et L452R du gène S du SARS-CoV-2

En raison du manque de disponibilité d'échantillons terrains (couples ENP/Salive) positifs présentant des mutations sur le gène S, la spécificité et la sensibilité diagnostiques du Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0 pour la détection des mutations E484K, K417N et L452R du gène S du SARS-CoV-2 ont été déterminées *in vitro* sur un panel d'échantillons négatifs dopés avec des virus entiers inactivés titrés fournis par le Centre National de Référence (CNR) des virus des infections respiratoires dont la grippe. Le statut de ces souches pour les mutations E484K, K417N et L452R a été obtenu par séquençage NGS.

Le panel ainsi mis au point se compose de 10 échantillons statués positifs pour chaque mutation. Pour les mutations E484K et K417N du gène S, le panel se compose de 24 échantillons statués négatifs. Pour la mutation L452R du gène S, le panel se compose de 56 échantillons statués négatifs.

Le nombre moins important d'échantillons sur la matrice prélèvements salivaires est dû au fait que les analyses sur cette matrice sont largement minoritaires en comparaison avec la matrice de type écouvillon naso-pharyngé profond. BioSellal continue de consolider ces données en collectant des échantillons auprès des laboratoires partenaires.

Ces résultats ont été obtenus sur QuantStudio™ 5 (Applied BioSystems) et avec le système d'extraction BioExtract® Premium Mag.

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 mutation E484K :

		Statut séquençage		Total
		Présence de la mutation E484K	Absence de la mutation E484K	
Résultats Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0	Présence de la mutation E484K	10	0	10
	Absence de la mutation E484K	0	24	24
	Total	10	24	34

⇒ Pour la mutation E484K, sur les panels d'échantillons analysés, la sensibilité diagnostique est Se = 100 %.

⇒ Pour la mutation E484K, sur les panels d'échantillons analysés, la spécificité diagnostique est Sp = 100 %.

Résultats pour la mutation L452R :

		Statut Séquençage		Total
		Présence de la mutation L452R	Absence de la mutation L452R	
Résultats Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0	Présence de la mutation L452R	10	0	10
	Absence de la mutation L452R	0	56	56
	Total	10	56	66

- ⇒ Pour la mutation L452R, sur les panels d'échantillons analysés, la sensibilité diagnostique est $Se = 100\%$.
- ⇒ Pour la mutation L452R, sur les panels d'échantillons analysés, la spécificité diagnostique est $Sp = 100\%$.

Résultats pour la mutation K417N :

		Statut Séquençage		Total
		Présence de la mutation K417N	Absence de la mutation K417N	
Résultats Premium Dx® 5Plex SARS-CoV-2 2.0	Présence de la mutation K417N	10	0	10
	Absence de la mutation K417N	0	24	24
	Total	10	24	34

- ⇒ Pour la mutation K417N, sur les panels d'échantillons analysés, la sensibilité diagnostique est $Se = 100\%$.
- ⇒ Pour la mutation K417N, sur les panels d'échantillons analysés, la spécificité diagnostique est $Sp = 100\%$.

Conclusions

1) CARACTERISATION DE LA RT-PCR

Inclusivité expérimentale	Vérifiée <i>in silico</i> 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 <i>E-N</i> du SARS-CoV-2 : 50 copies d'ARN transcrit par RT-PCR. Mutation E484K du gène <i>S</i> : 3,75 copies d'ARN transcrit par RT-PCR. Mutation L452R du gène <i>S</i> : 3,75 copies d'ARN transcrit par RT-PCR. Mutation K417N du gène <i>S</i> : 3,75 copies d'ARN transcrit par RT-PCR. <i>déterminées avec les autres cibles présentes en ratio équimolaire</i>
Efficacité de la qRT-PCR	Gènes <i>E-N</i> du SARS-CoV-2 : 97,2 % Mutation E484K du gène <i>S</i> : 102,0 % Mutation L452R du gène <i>S</i> : 91,3 % Mutations K417N du gène <i>S</i> : 113,3 % <i>déterminées avec les autres cibles présentes en ratio équimolaire</i>
Coefficient de variation de répétabilité	Varie entre 0,11 % et 0,82 % pour la valence gènes <i>E-N</i> Varie entre 0,42 % et 1,04 % pour la valence mutations E484K du gène <i>S</i> Varie entre 0,25 % et 0,57 % pour la valence mutations L452R du gène <i>S</i> Varie entre 0,20 % et 0,75 % pour la valence mutations K417N du gène <i>S</i> <i>déterminées avec les autres cibles présentes en ratio équimolaire</i>
Coefficient de variation de fidélité intermédiaire	Varie entre 1,41 % et 4,70 % pour la valence gènes <i>E-N</i> Varie entre 2,41 % et 3,62 % pour la valence mutations E484K du gène <i>S</i> Varie entre 1,54 % et 3,82 % pour la valence mutations L452R du gène <i>S</i> Varie entre 0,38 % et 3,29 % pour la valence mutations K417N du gène <i>S</i> <i>déterminées avec les autres cibles présentes en ratio équimolaire</i>
Confirmation des performances de la qRT-PCR sur d'autres paramètres ou thermocycleurs.	<u>Programme utilisable :</u> - Programme 5PLEX 2.0 <u>Thermocycleurs validés :</u> - AriaMx™ en ramping Fast par défaut - CFX96 en ramping Standard - 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 (62-64°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	
	Gènes E-N	7,2.10 ⁴ copies/mL d'éluat d'écouvillon
	Mutation E484K	7,2.10 ³ copies/mL d'éluat d'écouvillon
	Mutation L452R	1,14.10 ⁵ copies/mL d'éluat d'écouvillon
	Mutation K417N	7,2.10 ³ copies/mL d'éluat d'écouvillon
Sensibilité diagnostique	Gènes E-N	97%
	Mutation E484K	96%
	Mutation L452R	100%
	Mutation K417N	98%
Spécificité diagnostique	Gènes E-N	100%
	Mutation E484K	100%
	Mutation L452R	100%
	Mutation K417N	100%

Matrice : Prélèvements salivaires		
LD _{METHODE}	BioExtract® Premium Mag	
	Gènes E-N	5,7.10 ⁵ copies/mL de salive
	Mutation E484K	7,2.10 ⁵ copies/mL de salive
	Mutation L452R	5,7.10 ⁵ copies/mL de salive
	Mutation K417N	7,2.10 ⁵ copies/mL de salive
Sensibilité diagnostique	Gènes E-N	94 %
	Mutation E484K	100%
	Mutation L452R	100%
	Mutation K417N	100%
Spécificité diagnostique	Gènes E-N	98 %
	Mutation E484K	100%
	Mutation L452R	100%
	Mutation K417N	100%



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

