

## MANUEL D'UTILISATION

# Bio-T kit<sup>®</sup> SARS-CoV-2 UK & N501Y Variants

Cat. N° BIOTK125 - 500 réactions

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

### HUMAIN

#### Types de prélèvements

- Ecouvillonnage naso-pharyngé profond (ENP) ou oral
- Prélèvements des voies respiratoires basses (Lavage broncho alvéolaire (LBA), Crachats)

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

- Billes magnétiques (ex: BioSellal – BioExtract<sup>®</sup> SuperBall<sup>®</sup> Cat. N° BES384, BioSellal – BioExtract<sup>®</sup> Premium Mag Cat. N° BEPM96, BEPM1K, BEPM2K, BEPM5K)
- Colonnes de silice (ex : BioSellal – BioExtract<sup>®</sup> Column Cat. N° BEC050 ou BEC250)

*Utilisable pour la recherche uniquement*

## GESTION DES DOCUMENTS

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

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

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

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

## GESTION DES REVISIONS

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

Gestion des révisions			
Type de modification Couleur de Surlignage	Modifications mineures	Modifications majeures 1	Modifications majeures 2
Impact sur la révision/version	Changement de la date de révision du document  Pas de changement de version	Changement de la date de révision du document  + 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

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

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

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

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

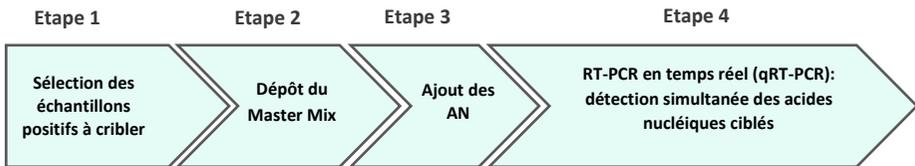
- **Du gène E des virus du genre Sarbecovirus, incluant le SRAS-CoV-2** grâce à un marquage TEXAS RED,
- **De la mutation N501Y du gène S** (commune aux variants 20I/501Y.V1 (anglais), 20H/501Y.V2 (sud-africain) et 20J/501Y.V3 (brésilien) du SRAS-CoV-2) grâce à un marquage VIC,
- **De la délétion SΔ69-70 du gène S** spécifique du variant 20I/501Y.V1 (anglais) grâce à un marquage 6-FAM.
- **D'un contrôle positif exogène IPC ARN**, grâce à un marquage Cy5. Il permet de valider la bonne conservation de l'acide nucléique (absence de dégradation) ainsi que l'absence d'inhibition de la réaction d'amplification. Pour rappel, l'IPC exogène est à ajouter lors de l'extraction des acides nucléiques en amont du kit de screening (tel que le Bio-T kit® TriStar Covid-19). A défaut, il peut également être ajouté dans le MasterMix.

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

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

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

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



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

## Contenu du kit et conditions de conservation

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

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

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

Tableau 2. Consommables et réactifs non fournis dans le kit			
Consommable / Réactif	Description	Fournisseur	Cat. N°
Tampon ATL	Tampon de Lyse	BioSellal	ATL19076
BioExtract® Column	Kit d'extraction ADN/ARN format colonne (50)	BioSellal	BEC050
BioExtract® Column	Kit d'extraction ADN/ARN format colonne (250)	BioSellal	BEC250
BioExtract® SuperBall®	Kit d'extraction ADN/ARN format billes magnétiques (4 x 96)	BioSellal	BES384
BioExtract® Premium Mag	Kit d'extraction ADN/ARN format billes magnétiques	96	BEPM96
		1 000	BEPM1K
		2 000	BEPM2K
		5 000	BEPM5K

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

## Liste des réactifs de vérification des performances

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

BioSellal commercialise ces réactifs sous les références suivantes :

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

\*Ce réactif est disponible uniquement sur demande, contacter BioSellal (contact@biosellal.com).

## Principales précautions à appliquer

- Porter les équipements de protection individuelle appropriés (*a minima* : blouse, gants jetables, voire lunettes de protection, masque FFP3 selon les risques zoonotiques...).
- Travailler dans des zones dédiées et séparées afin d'éviter toute contamination : « Extraction » (stockage des échantillons non extraits, zone avec matériel d'extraction), « MIX » (stockage des Master Mix prêts à l'emploi, préparation de plaques qPCR), « Ajout d'AN » (stockage et addition des acides nucléiques extraits et des contrôles dans la plaque qPCR), « PCR » (zone finale, contenant le(s) thermocycleur(s)).
- Utiliser des équipements dédiés pour chaque zone de travail (gants, blouse, pipettes, vortex ...).
- Décongeler tous les réactifs stockés à  $\leq -16^{\circ}\text{C}$  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 SRAS-CoV-2 est à ARN. Travailler avec de l'ARN étant plus exigeant que de travailler avec de l'ADN (instabilité de l'ARN et omniprésence des RNases), il est recommandé d'appliquer par défaut les précautions liées à l'utilisation de l'ARN:**
  - o Toujours porter des gants et les changer fréquemment notamment après tout contact avec la peau, les paillasses ou le matériel.
  - o Traiter toutes les surfaces et les équipements avec des agents d'inactivation des RNases (disponibles dans le commerce).
  - o Après avoir mis des gants et décontaminé le matériel, minimiser les contacts avec les surfaces et les équipements pour éviter la réintroduction des RNases.
  - o Utiliser des consommables « RNases free ».
  - o Il est recommandé de conserver les ARN réfrigérés pendant la manipulation puis de les congeler dès que possible de préférence à  $\leq -65^{\circ}\text{C}$  ou à défaut à  $\leq -16^{\circ}\text{C}$ .
  - o Ouvrir et refermer individuellement les tubes au fur et à mesure et limiter les durées d'ouverture afin d'éviter le contact avec les RNases présentes dans l'environnement (peau, poussières, surfaces de travail...).

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

## Procédure globale à suivre

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

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

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

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

## 2) Préparation de la plaque

### Dans la zone réservée au « MIX »

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

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

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

2. **Ajouter 5 µl d'acides nucléiques extraits (ou NC, MRI ou EPC: tube EPCUKN501Y-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.

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

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

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

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

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

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

4. **Paramétrer le thermocycleur** (voir Tableau 4, Tableau 5, Tableau 6)
5. Il est recommandé de **centrifuger la plaque avant de la positionner dans le thermocycleur**, ceci permettra d'éviter la présence de gouttes sur les parois 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 AriaMx™ (Agilent Technologies, ramping Fast par défaut) et confirmé sur ABI PRISM® 7500 Fast (Applied Biosystems) en ramping standard et sur QuantStudio 5 Real Time PCR system (Applied Biosystems). Il est compatible avec tous les thermocycleurs possédant à minima les canaux de lectures 6-FAM, VIC, TEXAS RED et Cy5. Pour plus d'information, contacter notre support technique.

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

Tableau 5. Paramètres de réglage du thermocycleur			
Cible	Détecteurs		Volume final / puits
	Reporter	Quencher	
<b>Gène E du SRAS-CoV-2</b>	TEXAS RED	NFQ-MGB ou None*	<b>20 µl</b> = 15 µl Master Mix + 5 µl d'acides nucléiques ou contrôles <sup>†</sup>
<b>Mutation N501Y du gène S</b>	VIC	NFQ-MGB ou None*	
<b>Délétion Δ69-70 du gène S</b>	FAM	NFQ-MGB ou None*	
<b>IPC exogène</b>	Cy5	NFQ-MGB ou None*	
à attribuer aux échantillons et contrôles <sup>†</sup>			

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

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

Tableau 6. Paramétrage du PROGRAMME UK & N501Y Variants		
Ramping Standard		
Cycles	Temps	Température
1 cycle	20 min	50°C
1 cycle	5 min	95°C
40 cycles	10 sec	95°C
	45 sec	<b>63°C</b>
	+ 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. Pour cela, on utilise un ensemble cohérent de signaux positifs, *a minima* le témoin positif (EPC), et on place la ligne seuil au-dessus du bruit de fond, et dans la zone exponentielle d'amplification.

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

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

# Principaux cas de figures

## Lecture des Contrôles

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

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

## Lecture des Echantillons extraits

Tableau 8. Différents types de résultats pouvant être obtenus pour les échantillons

Cibles				Interprétation
Gène E (TEXAS RED)	Mutation N501Y (VIC)	Délétion SΔ69-70 (FAM)	IPC exogène (Cy5)	
Neg	Neg	Neg	Pos*	<b>Négatif ou Non détecté</b> Erreur de sélection de l'échantillon ? Dégradation de l'échantillon (si ajout de l'IPC dans la qRT-PCR) ?
Pos	Neg	Neg		<b>Détection du génome d'une souche de SRAS-CoV-2 non muté N501Y et non délété SΔ69-70.</b> Détection d'une souche autre que 20I/501Y.V1 (anglais), 20H/501Y.V2 (sud-africain) et 20J/501Y.V3 (brésilien)
Pos	Pos	Neg		<b>Détection du génome d'une souche de SRAS-CoV-2 muté N501Y et non délété SΔ69-70.</b> Mutation évocatrice des variants 20H/501Y.V2 (sud-africain) et 20J/501Y.V3 (brésilien)
Pos	Pos	Pos		<b>Détection du génome d'une souche de SRAS-CoV-2 muté N501Y et délété SΔ69-70.</b> Détection du variant 20I/501Y.V1 (anglais)
Pos	Pos	Pos	Neg ou Ct>35	<b>Détection du génome d'une souche de SRAS-CoV-2 muté N501Y et délété SΔ69-70.</b> Détection du variant 20I/501Y.V1 (anglais) Pas de quantification possible. Problème lors de l'ajout de l'IPC exogène ? Présence d'inhibiteurs ? Compétition avec la cible ? Dégradation de l'échantillon ?
Pos ou Neg		Pos		<b>Détection du génome d'une souche de SRAS-CoV-2 délété SΔ69-70.</b> Résultat évocateur du variant 20I/501Y.V1 (anglais) Présence d'inhibiteurs ? Compétition avec la cible ? Dégradation de l'échantillon ?
Pos ou Neg				<b>Ininterprétable = analyse à refaire</b> Oubli d'addition des acides nucléiques extraits ou dépôt non au contact du Master Mix lors de la préparation de la plaque ? Présence d'inhibiteurs ? Dégradation des acides nucléiques dans l'échantillon ?

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

# PERFORMANCES DU BIO-T KIT® TRISTAR COVID-19

## Spécificité et Sensibilité diagnostiques sur échantillons de statut connu

La spécificité et la sensibilité diagnostiques du Bio-T kit® SRAS-CoV-2 UK & N501Y a été déterminée :

- *in silico* par l'analyse de l'ensemble des séquences disponibles dans les bases de données publiques (GeneBank, GISAID) et la réalisation d'alignement à l'aide du logiciel MegAlign Pro (DNASTAR® Lasergene®) ainsi qu'à l'aide de l'outil BLAST.
- *In vitro* sur 82 échantillons provenant de patients préalablement statués positif pour le SRAS-CoV-2 à l'aide du Bio-T kit® TriStar Covid-19. Les données de criblage de ces échantillons positifs nous ont été transmis par deux laboratoires partenaires utilisant une méthode de référence. Parmi eux, 4 ont été statués variant 20H/501Y.V2 (sud-africain) ou 20J/501Y.V3 (brésilien), 33 ont été statués variant 20I/501Y.V1 (anglais) et 45 ont été statués autres que les variants variant 20I/501Y.V1, 20H/501Y.V2, 20J/501Y.V3. Ces résultats ont été obtenus sur les trois thermocycleurs AriaMx™ (Agilent Technologies, ramping Fast par défaut), ABI PRISM® 7500 Fast (Applied Biosystems) en ramping standard et sur QuantStudio 5 Real Time PCR system (Applied Biosystems).

Les résultats sont analysés et exprimés :

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

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

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

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

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



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

### Support Technique

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

+33 (0) 4 26 78 47 62

### Renseignements et commandes

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

+33 (0) 4 26 78 47 60

