

MANUEL D'UTILISATION

Bio-T kit[®] SARS-CoV-2 DualPlex KQR Variants

Cat. N° BIOTK129 - 100 réactions

**Criblage des mutations E484K, E484Q et L452R du gène S
du SARS-CoV-2
par RT-PCR en temps réel (qRT-PCR)**

HUMAIN

Types de prélèvements

- Ecouvillonnage naso-pharyngé profond (ENP) ou oral

Extractions des acides nucléiques (AN) recommandées par BioSellal

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

Usage diagnostique sous dérogation au marquage CE par l'ANSM

GESTION DES DOCUMENTS

Le Bio-T kit® SARS-CoV-2 DualPlex KQR Variants dispose de deux manuels techniques :

- Un manuel d'extraction de la gamme HUMAIN, détaillant pour chaque type de prélèvement les méthodes d'extractions validées ou proposées par BioSella.
- Un manuel d'utilisation du Bio-T kit® SARS-CoV-2 DualPlex KQR 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 DualPlex KQR Variants.

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 (sauf en cas d'adoption de nouvelle matrice)	Aucun	Nouvelle adoption nécessaire
Exemples de modifications	Corrections : typographique, grammaticale ou de mise en forme	Changement de référence d'un EPC	Modification de la recette du Master Mix
	Ajout de nouvelles matrices pour l'extraction	Changement de référence d'un IPC exogène	Modification du protocole d'extraction validé
	Ajout d'informations donnant plus de détails ou alternative à un protocole		
	Ajout/Suppression d'informations optionnelles		

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

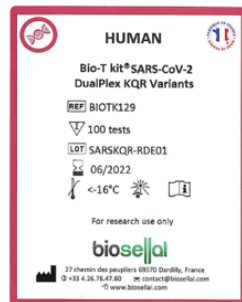
Fax +33 (0)4.78.44.10.68

Lieu de fabrication, de contrôle et de conditionnement :

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

ETIQUETTES DU KIT

Bio-T kit® SARS-CoV-2 DualPlex KQR Variants BIOTK129 Master Mix REF MMSARSCOVKQR-A LOT SARSKQR-RDE01 06/2022 ≤ -16°C Mix 100	Bio-T kit® SARS-CoV-2 DualPlex KQR Variants BIOTK129 Master Mix REF MMSARSCOVKQR-B LOT SARSKQR-RDE01 06/2022 ≤ -16°C Mix 100	Bio-T kit® SARS-CoV-2 DualPlex KQR Variants BIOTK129 EPC REF EPCSARSCOVKQR-A LOT SARSKQR-RDE01 06/2022 ≤ -16°C + NA
Bio-T kit®SARS-CoV-2 DualPlex KQR Variants Master Mix REF BIOTK129 100 tests LOT SARSKQR-RDE01 06/2022 ≤ -16°C MIX	Bio-T kit®SARS-CoV-2 DualPlex KQR Variants H₂O & EPC REF BIOTK129 100 tests LOT SARSKQR-RDE01 06/2022 ≤ -16°C + NA	



PRESENTATION

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

Le Bio-T kit® SARS-CoV-2 DualPlex KQR Variants est un kit de seconde intention permettant le criblage des mutations E484K, E484Q et L452R du *gène S* du SARS-CoV-2 à partir d'acides nucléiques préalablement extraits et statués pour le SARS-CoV-2 à l'aide d'un kit de screening tel que le Bio-T kit® TriStar Covid-19. Aussi, pour les modalités de prélèvement, d'envoi et de conservation des échantillons se référer aux manuels d'utilisation du Bio-T kit® TriStar Covid-19.

Description du Bio-T kit® SARS-CoV-2 DualPlex KQR Variants

Le Bio-T kit® SARS-CoV-2 DualPlex KQR Variants (Cat. N° BIOTK129) contient **deux** Master Mix RT-PCR one-step prêts à l'emploi, permettant de détecter les mutations E484K, E484Q et L452R du *gène S* du SARS-CoV-2 et de vérifier la positivité de l'échantillon en SARS-CoV-2.

Le Master Mix MMSARSCOVKQR-A est un triplex permettant la détection :

- Du *gène E* des virus du genre Sarbecovirus, incluant le SARS-CoV-2, grâce à un marquage Cy5 ;
- De la mutation E484K du *gène S* du SARS-CoV-2, grâce à un marquage TEXAS RED ;
- De la mutation E484Q du *gène S* du SARS-CoV-2, grâce à un marquage 6-FAM ;

Le Master Mix MMSARSCOV2-B est un duplex permettant la détection :

- De l'absence de mutation L452R (L452wt) du *gène S* 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 ;

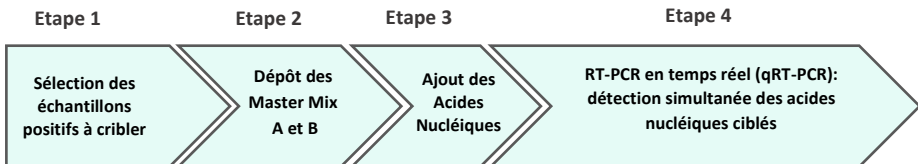
Les méthodes d'extraction proposées ou validées sont décrites dans le manuel d'extraction du Bio-T kit® SARS-CoV-2 DualPlex KQR Variants.

Modalités de gestion du risque relatif à l'utilisation du kit et d'élimination des réactifs

La mise en œuvre du protocole de RT-PCR associé au Bio-T Kit® SARS-CoV-2 DualPlex KQR 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 DualPlex KQR Variants génère un risque chimique et biologique pour le manipulateur et l'environnement. Se référer à la notice d'extraction de la gamme HUMAIN 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 DualPlex KQR Variants		
Master Mix prêt à l'emploi MMSARSCOVKQR-A MMSARSCOVKQR-B	Echantillons NC/NCS Témoin positif de processus EPC (EPCSARSCOVKQR-A)	Détecteurs : Mix A = FAM/TEXAS RED/Cy5 Mix B = FAM/VIC Référence passive : Aucune Programme : TRISTAR en ramping Standard

Contenu du kit et conditions de conservation

Tableau 1. Descriptif du contenu du kit				
Description	Référence	Volume /tube	Présentation	Conservation
Master Mix (MM) Prêts à l'emploi	MMSARSCOVKQR-A	1500 µl	tube bouchon transparent Sachet A	$\leq -16^{\circ}\text{C}$ à l'abri de la lumière, Zone « MIX »
	MMSARSCOVKQR-B	1500 µl	tube bouchon blanc Sachet A	
External Positive Control (EPC) Contrôle positif d'amplification des mutations E484K, E484Q, L452R du gène S du SARS-CoV-2, de l'absence de mutation L452R et du gène E du SARS-CoV-2	EPSCARSCOVKQR-A	200µl	tube bouchon rouge Sachet B	$\leq -16^{\circ}\text{C}$ Zone « Ajout d'acides nucléiques »
Eau RNase/DNase free	Aqua-A	1 ml	tube bouchon bleu Sachet B	$5^{\circ}\text{C} \pm 3$ ou $\leq -16^{\circ}\text{C}$ 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.

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 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 les précautions ci-dessous :**
 - 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 DES MUTATIONS E484K, E484Q, L452R DU GENE S DU SARS-CoV-2 ET DU GENE E DU SARS-CoV-2 PAR qRT-PCR AVEC LE KITS BIOTK129

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 DualPlex KQR 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 des mutations E484K, E484Q, L452R du gène S du SARS-CoV-2 et du gène E du SARS-CoV-2 (EPC)** : il s'agit d'ADN synthétique (tube **EPCSARSCOVKQR-A**, bouchon **rouge**), contenant les séquences spécifiques des cibles indiquées ci-dessus.
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 7.*

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

2) Préparation de la plaque

Dans la zone réservée au « MIX »

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

1. **Ajouter 5 µl d'acides nucléiques extraits (ou NCS, eau, MRI ou EPC: tube EPCSARSCOVKQR-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.

Chaque échantillon est à déposer une fois dans le Master Mix MMSARSCOVKQR-A puis dans le Master Mix MMSARSCOVKQR-B. Changer de cône à chaque fois.

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

Dans la pièce dédiée à l'amplification PCR

3. **Paramétrer le thermocycleur** (voir Tableau 3, Tableau 4, Tableau 5)
4. 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.
5. 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). Il est compatible avec tous les thermocycleurs possédant à minima les canaux de lectures 6-FAM, VIC, TEXAS RED et Cy5. Pour plus d'information, contacter notre support technique.

Tableau 3. Configuration du thermocycleur		
	ABI PRISM® 7500 Fast / QuantStudio 5	AriaMx™
Mode	Quantitation – Standard curve	Quantitative PCR, Fluorescence Probe
Ramping	Ramping Standard	Ramping Fast par défaut
Référence passive	AUCUNE	AUCUNE

Tableau 4. Paramètres de réglage du thermocycleur

Master Mix utilisé	Cible	DéTECTEURS		Volume final / puits
		Reporter	Quencher	
MMSARSCOVKQR-A	<i>Gène E</i>	Cy5	NFQ-MGB ou None*	20 µl
	Mutation E484K du <i>gène S</i>	TEXAS RED ‡	NFQ-MGB ou None*	= 15 µl Master Mix + 5 µl d'acides nucléiques ou contrôles†
	Mutation E484Q du <i>gène S</i>	FAM	NFQ-MGB ou None*	
MMSARSCOVKQR-B	Absence de mutation L452R du <i>gène S (L452wt)</i>	FAM	NFQ-MGB ou None*	20 µl
	Mutation L452R du <i>gène S</i>	VIC	NFQ-MGB ou None*	= 15 µl Master Mix + 5 µl d'acides nucléiques ou contrôles†
à attribuer aux échantillons et contrôles†				

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

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

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

Tableau 5. Paramétrage du PROGRAMME TRISTAR

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	60°C
	+ aCtuisition 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 « Ct » 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 sur le MMSARSCOVQR-A

Tableau 6. Différents scénarios de résultats concernant les contrôles

	Cibles SARS-CoV-2			Interprétation
	Gène E (Cy5)	Mutation E484K Gène S (TEXAS RED)	Mutation E484Q Gène S (FAM)	
NCS Contrôle Négatif de processus OBLIGATOIRE	Neg	Neg	Neg	Validé
	Au moins une des trois valences Pos			Contamination avec un échantillon négatif/positif lors de l'extraction ou de la préparation de la plaque.
NC Contrôle Négatif d'amplification FACULTATIF	Neg	Neg	Neg	Validé
	Au moins une des trois valences Pos			Contamination avec un échantillon négatif/positif lors de la préparation de la plaque ou contamination du Master Mix/eau.
EPC Contrôle positif d'amplification des mutations E484K, E484Q, L452R du gène S du SARS- CoV-2, de l'absence de mutation L452R et du gène E du SARS-CoV-2 OBLIGATOIRE <i>EN ABSENCE DU TEMOIN POSITIF DE PROCESSUS</i>	Pos*	Pos*	Pos*	Validé
	Au moins une des trois valences Neg			Problème lors de la qRT-PCR: Erreur de Master Mix ? Oubli de l'EPC ?
Témoin positif de processus MRI RECOMMANDE <i>SI DISPONIBLE</i>	Pos†	Pos†	Pos†	Validé
	Au moins une des trois valences 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.

Lecture des Contrôles sur le MMSARSCOVQR-B

Tableau 7. Différents scénarios de résultats concernant les contrôles

	Cibles SARS-CoV-2		Interprétation
	Absence de Mutation L452R Gène S (FAM)	Mutation L452R Gène S (VIC)	
NCS Contrôle Négatif de processus OBLIGATOIRE	Neg	Neg	Validé
	Au moins une des deux valences Pos		Contamination avec un échantillon négatif/positif lors de l'extraction ou de la préparation de la plaque.
NC Contrôle Négatif d'amplification FACULTATIF	Neg	Neg	Validé
	Au moins une des deux valences Pos		Contamination avec un échantillon négatif/positif lors de la préparation de la plaque ou contamination du Master Mix/eau.
EPC Contrôle positif d'amplification des mutations E484K, E484Q, L452R du gène S du SARS-CoV-2, de l'absence de mutation L452R et du gène E du SARS-CoV-2 OBLIGATOIRE <i>EN ABSENCE DU TEMOIN POSITIF DE PROCESSUS</i>	Pos*	Pos*	Validé
	Au moins une des deux valences Neg		Problème lors de la qRT-PCR: Erreur de Master Mix ? Oubli de l'EPC ?
Témoin positif de processus MRI RECOMMANDE <i>SI DISPONIBLE</i>	Pos†	Pos†	Validé
	Au moins une des deux valences Neg		Problème lors de la qRT-PCR: Erreur de Master Mix ? Oubli d'ajout des acides nucléiques ou dépôt non au contact du Master Mix lors de la préparation de la plaque ? Dérive du processus : extraction et/ou qRT-PCR ? Dégradation de l'échantillon contrôle ?

* La valeur de Ct obtenue doit être conforme à la valeur donnée sur le certificat d'analyse (CA).

† La valeur de Ct doit être comprise dans les limites de la carte de contrôle.

Lecture des Echantillons extraits sur le MMSARSCOVQR-A

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

Cibles SARS-CoV-2			Interprétation
Gène E	Mutation E484K	Mutation E484Q	
(Cy5)	Gène S (TEXAS RED)	Gène S (FAM)	
Neg	Neg	Neg	Négatif ou Non détecté Erreur de sélection de l'échantillon ? Dégradation de l'échantillon ?
Pos [†]	Neg	Neg	Détection du génome d'une souche de SARS-CoV-2 non muté E484K et E484Q
Pos [†]	Pos	Neg	Détection du génome d'une souche de SARS-CoV-2 muté E484K et non muté E484Q
Pos [†]	Neg	Pos	Détection du génome d'une souche de SARS-CoV-2 non muté E484K et muté E484Q
Pos [†]	Pos	Pos	Ininterprétable = analyse à refaire Contamination avec l'EPC ? Mélange de souche ? Accrochage non spécifique des systèmes de détection E484K et E484Q ?

† La valeur de Ct obtenue doit être similaire à celle obtenue lors du screening de première intention. Si la valeur est décalée, une inhibition peut être suspectée. Dans ce cas, 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.

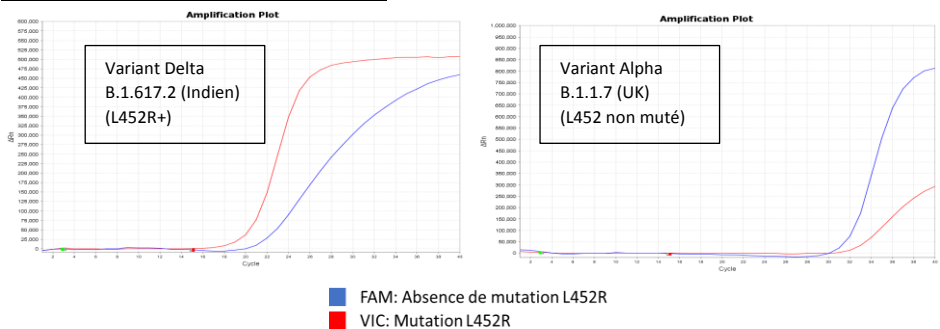
Lecture des Echantillons extraits sur le MMSARSCOVKQR-B

Le système de détection de la mutation L452R du *gène S* accroche de manière non spécifique sur les génomes non mutés L452R. De manière similaire le système de détection de l'absence de mutation L452R du *gène S* accroche de manière non spécifique sur les génomes mutés L452R. Pour ces raisons, l'analyse des résultats de ce MasterMix doit se faire en analysant les courbes par échantillons, simultanément sur les cibles FAM et VIC. Le statut de l'échantillon pour la mutation L452R (absence ou présence) est obtenu par l'identification de la courbe donnant le signal le plus précoce.

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

Cibles SARS-CoV-2		
Absence de Mutation L452R <i>Gène S</i> (FAM)	Mutation L452R <i>Gène S</i> (VIC)	Interprétation
Courbe plus précoce que la courbe VIC	Courbe plus retardée que la courbe FAM Ou Neg	Détection du génome d'une souche de SARS-CoV-2 non muté L452R
Courbe plus retardée que la courbe VIC Ou Neg	Courbe plus précoce que la courbe FAM	Détection du génome d'une souche de SARS-CoV-2 muté L452R

Exemple de courbes et lecture des résultats



PERFORMANCES DU BIO-T KIT® SARS-CoV-2

DualPlex KQR Variants

Caractérisation de la qRT-PCR

1) Vérification de la spécificité analytique

In silico

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

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

Inclusivité expérimentale

Le Bio-T kit® SARS-CoV-2 DualPlex KQR Variants permet de détecter la présence du génome du SARS-CoV-2 (Gène E) et des mutations E484K, E484Q et L452R ou l'absence de mutation L452R du gène S du SARS-CoV-2.

La spécificité analytique des systèmes d'amorces et sondes a été vérifiée sur des souches de virus entier inactivé fournies par le Centre National de Référence (CNR) des virus des infections respiratoires dont la grippe. Le statut de chaque souche a été confirmé par séquençage par le CNR :

- Souche virale inactivée SARS-CoV-2 lineage **20H/501Y.V2** : variant Beta (ou Sud-Africain) présentant la mutation E484K du gène S et l'absence de mutation L452R (L452wt)
- Souche virale inactivée SARS-CoV-2 lineage **20A.542R** (B.1.617.2) : variant delta (ou Indien) présentant la mutation L452R du gène S.

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

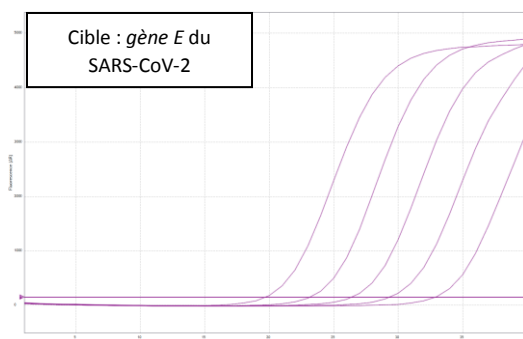
Souche	Résultats Bio-T Kit® SARS-CoV-2 DualPlex KQR Variants						
	Mix A				Mix B		
	Gène E	Mutation E484K	Mutation E484Q	Interprétation	Mutation L452R	Absence de mutation L452R (L452wt)	Interprétation
SARS-CoV-2 lineage 20H/501Y.V2 Variant Beta	Détecté	Détecté	Non Détecté	Détection du génome d'une souche de SARS-CoV-2 muté E484K et non muté E484Q	Courbe plus retardée que la courbe FAM	Courbe plus précoce que la courbe VIC	Détection du génome d'une souche de SARS-CoV-2 non muté L452R
SARS-CoV-2 lineage 20A.542R Variant Delta	Détecté	Non Détecté	Non Détecté	Détection du génome d'une souche de SARS-CoV-2 non muté E484K et E484Q	Courbe plus précoce que la courbe FAM	Courbe plus retardée que la courbe VIC	Détection du génome d'une souche de SARS-CoV-2 muté L452R

⇒ La spécificité analytique du Bio-T Kit® SARS-CoV-2 DualPlex KQR Variants a été confirmée *in silico* et expérimentalement sur l'ensemble des souches testées.

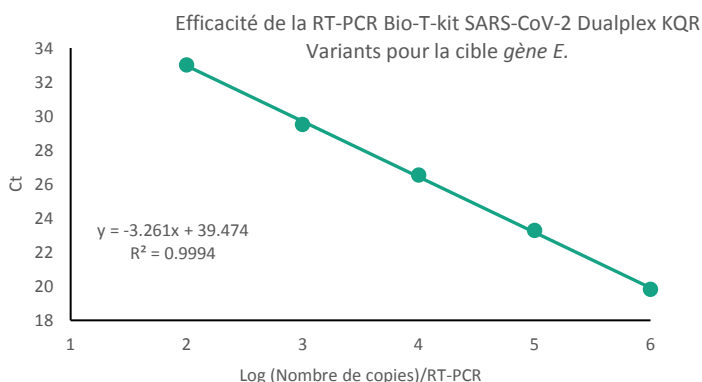
2) Efficacité

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).

Le Bio-T Kit® SARS-CoV-2 DualPlex KQR variants permet la détection du génome du SARS-CoV-2 et des mutations E484K/Q et L452R du gène S. Les gènes cibles sont présents à raison d'une copie chacun par génome viral. Aussi, BioSella a évalué l'efficacité lorsque chaque cible est présente avec un ratio équimolaire (1 copie de gène E + 1 copie de E484K + 1 copie de E484Q + 1 copie de L452R par exemple).

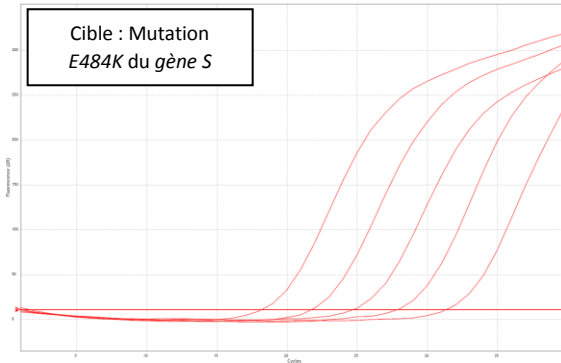


copies/RT-PCR	Ct
1×10^6	19.79
1×10^5	23.25
1×10^4	26.52
1×10^3	29.62
1×10^2	32.88

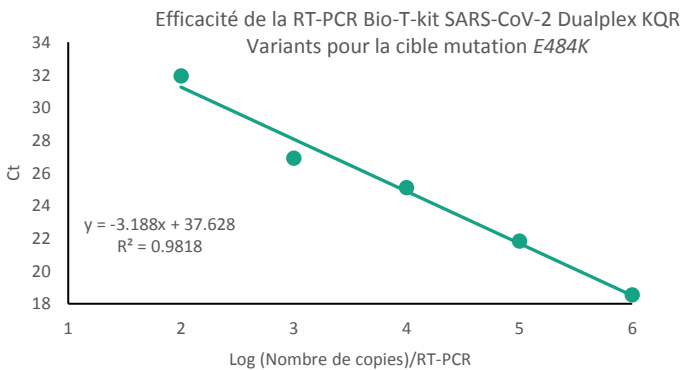


L'efficacité déduite de la pente de la droite est de : $E = (10 - 1 / \text{pente} - 1) \times 100 = 102.6 \%$

⇒ L'efficacité du Bio-T kit® SARS-CoV-2 DualPlex KQR Variants est de 102.6 % pour le gène E du SARS-CoV-2.

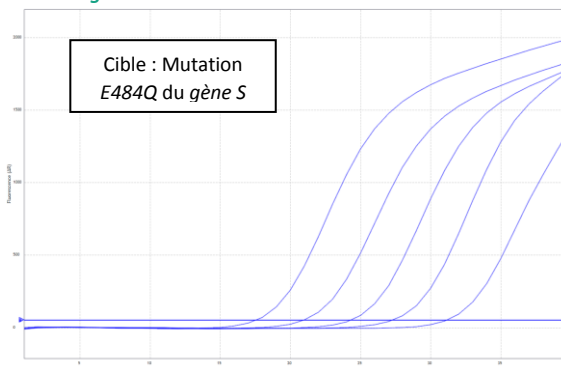


copies/RT-PCR	Ct
1×10^6	18.32
1×10^5	21.81
1×10^4	24.97
1×10^3	27.48
1×10^2	31.55

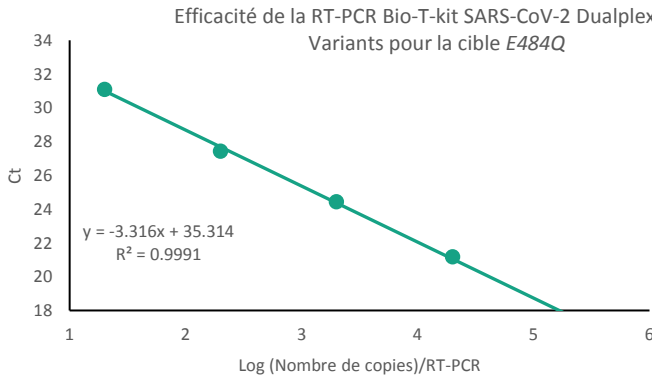


L'efficacité déduite de la pente de la droite est de : $E = (10^{-1/\text{pente}} - 1) \times 100 = 103.3 \%$

⇒ L'efficacité du Bio-T kit® SARS-CoV-2 DualPlex KQR Variants est de 103.3 % pour la mutation *E484K* du gène *S*.

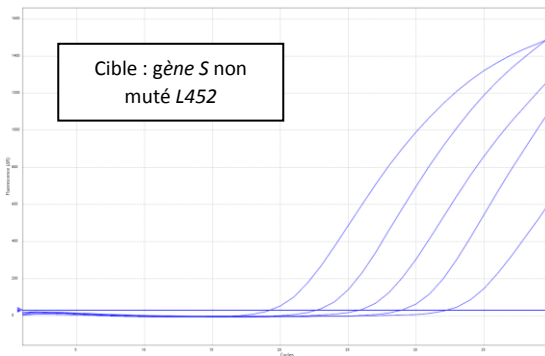


copies/RT-PCR	Ct
2×10^5	17.75
2×10^4	21.13
2×10^3	24.32
2×10^2	26.49
2×10^1	31.43

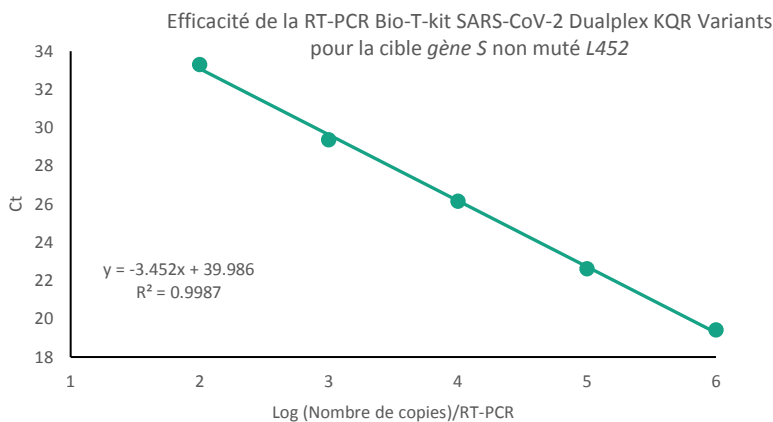


L'efficacité déduite de la pente de la droite est de : $E = (10^{-1/\text{pente}} - 1) \times 100 = 100.2 \%$

⇒ L'efficacité du Bio-T kit® SARS-CoV-2 DualPlex KQR Variants est de 100.2 % pour la mutation *E484Q* du gène *S*.

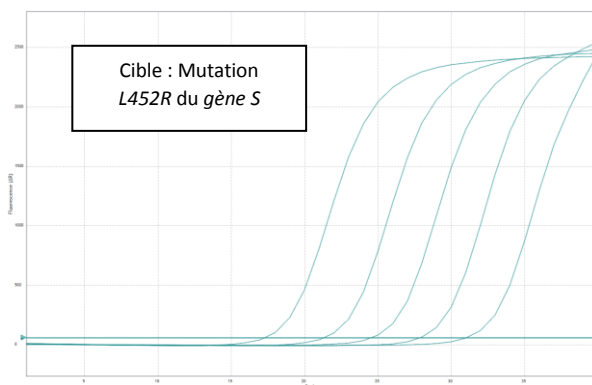


copies/RT-PCR	Ct
1×10^6	19.22
1×10^5	22.66
1×10^4	26.07
1×10^3	29.23
1×10^2	32.78

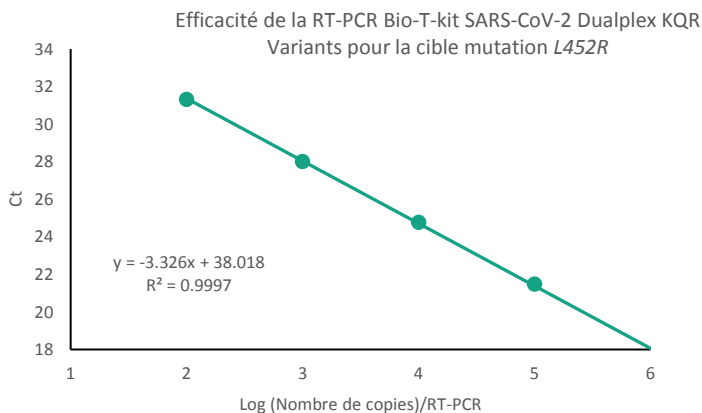


L'efficacité déduite de la pente de la droite est de : $E = (10 - 1 / \text{pente} - 1) \times 100 = 104.7 \%$

⇒ L'efficacité du Bio-T kit® SARS-CoV-2 DualPlex KQR Variants est de 104.7% pour la cible *gène S* non muté L452.



copies/RT-PCR	Ct
1×10^6	17.80
1×10^5	21.52
1×10^4	26.13
1×10^3	28.07
1×10^2	31.50



L'efficacité déduite de la pente de la droite est de : $E = (10 - 1 / \text{pente} - 1) \times 100 = 99.8 \%$

⇒ **L'efficacité du Bio-T kit® SARS-CoV-2 DualPlex KQR Variants est de 99.8 % pour la cible Mutation L452R du gène S.**

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 triplicat en suivant le protocole du Bio-T kit® SARS-CoV-2 DualPlex KQR Variants décrit page 9. 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 :

$$CV_{\text{répétabilité}} = \frac{S_r}{M} \times 100$$

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

Comme précédemment, la répétabilité a été évaluée lorsque chaque cible est présente avec un ratio équimolaire (1 copie de gène E + 1 copie de E484K + 1 copie de E484Q + 1 copie de L452R par exemple).

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

	Répétabilité (Ct)			CV% Répétabilité
Positif Fort	19.82	19.78	19.76	0.15
Positif Moyen	26.53	26.55	26.48	0.14
Positif Faible	33.01	32.74	32.9	0.41

⇒ **Le coefficient de variation de répétabilité par niveau varie de 0.15 à 0.41% pour la valence gène E du SARS-CoV-2.**

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

	Répétabilité (Ct)			CV% Répétabilité
Positif Fort	18.55	18.31	18.09	1.26
Positif Moyen	25.12	24.86	24.92	0.55
Positif Faible	31.95	31.47	31.22	1.18

⇒ Le coefficient de variation de répétabilité par niveau varie de 0,55 à 1,26% pour la valence mutation *E484K* du gène *S* du SARS-CoV-2.

Données obtenues pour la valence mutation *E484Q* du gène *S* du SARS-CoV-2 :

	Répétabilité (Ct)			CV% Répétabilité
Positif Fort	17.85	17.74	17.66	0.54
Positif Moyen	24.02	24.49	24.45	1.07
Positif Faible	31.84	31.34	31.11	1.19

⇒ Le coefficient de variation de répétabilité par niveau varie de 0.54 à 1.19% pour la valence mutation *E484Q* du gène *S* du SARS-CoV-2.

Données obtenues pour la valence gène *S* non muté *L452* du SARS-CoV-2 :

	Répétabilité (Ct)			CV% Répétabilité
Positif Fort	19.48	19.42	18.75	2.11
Positif Moyen	26.01	26.16	26.04	0.30
Positif Faible	32.46	33.31	32.56	1.42

⇒ Le coefficient de variation de répétabilité par niveau varie de 0.30 à 2.11% pour la valence gène *S* non muté *L452* du SARS-CoV-2.

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

	Répétabilité (Ct)			CV% Répétabilité
Positif Fort	17.95	17.97	17.47	1.59
Positif Moyen	28.02	28.15	28.04	0.25
Positif Faible	31.32	31.94	31.23	1.23

⇒ Le coefficient de variation de répétabilité par niveau varie de 0.25 à 1.59% pour la valence mutation *L452R* du SARS-CoV-2.

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

1) Limite de détection de la méthode complète

La limite de détection méthode associant la méthode d'extraction BioExtract® Premium Mag et le Bio-T kit® SRAS-CoV-2 DualPlex KQR Variants 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 (ou Sud-Africain) présentant la mutation E484K du *gène S* et l'absence de mutation L452R (L452wt).
- Souche virale inactivée SARS-CoV-2 lineage **20A.542R** (B.1.617.2) : variant delta (ou Indien) présentant la mutation L452R.
- En l'absence d'une souche SARS-CoV-2 possédant la mutation E484Q fournie par le CNR, de l'ARN de synthèse possédant la mutation E484Q du *gène S* a été utilisée pour doper des écouvillons nasopharyngés (ENP) négatifs par ajout dosé avant extraction d'ARN. Il est à noter que cet ARN possède également la mutation L452R mais elle n'est pas considérée ici car nous analysons cette cible avec la souche fournie par le CNR.

Pour le variant beta (Sud-Africain) et pour l'ARN de synthèse possédant la mutation E484Q du *gène S*, une approche de la LD_{METHODE} a été effectuée sur 3 concentrations avec 5 réplicats par concentration. Pour le variant delta (Indien), une approche de la LD_{METHODE} a été effectuée sur 2 concentrations avec 5 réplicats par concentration. La concentration la plus faible avec un taux de détection de 100% a été sélectionnée pour confirmer la LD_{METHODE} sur 20 réplicats.

Les amplifications ont été faites à l'aide du Bio-T kit® SRAS-CoV-2 DualPlex KQR Variants (programme Tristar) sur AriaMx™.

Résultat de l'approche de la LD_{METHODE}

Plan d'expérience pour la variant beta (Sud-Africain) et pour l'ARN de synthèse possédant la mutation E484Q du *gène S* :

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

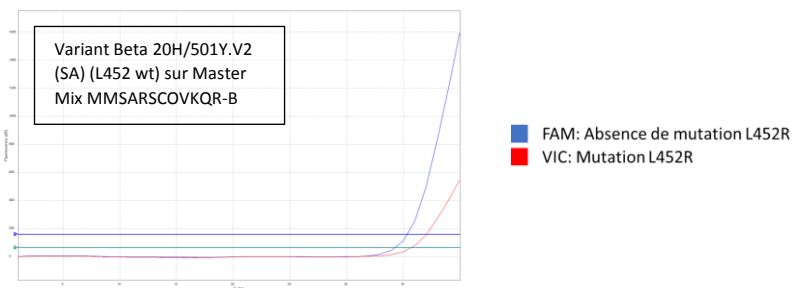
Plan d'expérience pour le variant delta (Indien) :

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} : Souche virale inactivée SARS-CoV-2 lineage 20H/501Y.V2 variant Beta (ou Sud-Africain) présentant la mutation E484K du gène S et l'absence de mutation L452R (L452wt).

Niveau de positivité		réplique	Master Mix MMSARSCOVKQR-A			Master Mix MMSARSCOVKQR-B	
			Ct			Ct	
			Gène E	Mutation E484K	Mutation E484Q	L452WT	Mutation L452R
7,2.10 ⁴ copies/ml	720 copies/qRT-PCR	1	31.19	33.8	No Ct	32.07	34.69
		2	31.45	34.52	No Ct	32.88	34.5
		3	32.14	33.77	No Ct	33.38	34.83
		4	32.42	34.64	No Ct	33.2	36.18
		5	32.13	34.14	No Ct	33.16	35.16
7,2.10 ³ copies/ml	72 copies/qRT-PCR	1	34.31	37.51	No Ct	35.61	36.91
		2	35.59	36.32	No Ct	35.33	37.82
		3	37.52	37.67	No Ct	37.02	37.89
		4	35.56	37.42	No Ct	36.32	No Ct
		5	35.05	37.56	No Ct	35.47	37.69
7,2.10 ² copies/ml	7,2 copies/qRT-PCR	1	37.54	No Ct	No Ct	36.87	39.51
		2	37.34	37.81	No Ct	38.45	No Ct
		3	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
		4	37.21	37.85	No Ct	No Ct	No Ct
		5	No Ct	38.01	No Ct	No Ct	No Ct

Pour la lecture des résultats en MMSARSCOVKQR-B (cf. rubrique Lecture des Echantillons extraits sur le MMSARSCOVKQR-B), le statut de l'échantillon est obtenu par l'analyse des courbes en simultanée en FAM et VIC. Le statut de l'échantillon pour la mutation L452R (absence ou présence) est ainsi obtenu par l'identification de la courbe donnant le signal le plus précoce. Pour cette souche, les valeurs de Ct sont plus précoces en FAM qu'en VIC, l'échantillon est donc identifié comme étant L452wt (résultat attendu).

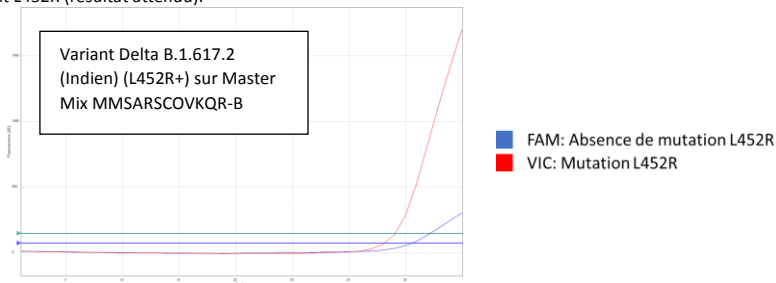


⇒ Pour la valence gène E, mutation E484K et absence de mutation L452R (L452WT) du gène S, la LD_{METHODE} approchée est de 7,2.10³ copies/ml d'éluât d'écouvillon (72 copies/qRT-PCR).

Données brutes (valeurs de Ct) de l'approche de la LD_{METHODE} : Souche virale inactivée SARS-CoV-2 lineage 20A.542R (B.1.617.2) : variant delta (ou Indien) présentant la mutation L452R.

Niveau de positivité		Master Mix MMSARSCOVKQR-A				Master Mix MMSARSCOVKQR-B	
		réplique	Ct			Ct	
			Gène E	Mutation E484K	Mutation E484Q	L452WT	Mutation L452R
5,7.10 ⁵ copies/ml d'éluât d'écouvillon	22,7.10 ³ copies/qRT-PCR	1	28.81	No Ct	No Ct	32.41	30.36
		2	28.20	No Ct	No Ct	32.76	30.79
		3	28.73	No Ct	No Ct	32.54	30.66
		4	28.61	No Ct	No Ct	32.45	30.58
		5	28.54	No Ct	No Ct	32.59	30.61
1,1.10 ⁵ copies/ml d'éluât d'écouvillon	4,5.10 ³ copies/qRT-PCR	1	31.18	No Ct	No Ct	35.37	34.05
		2	30.91	No Ct	No Ct	34.75	32.91
		3	30.56	No Ct	No Ct	34.1	32.17
		4	31.10	No Ct	No Ct	34.74	32.67
		5	31.07	No Ct	No Ct	34.68	32.62

Pour la lecture des résultats en MMSARSCOVKQR-B (cf. rubrique Lecture des Echantillons extraits sur le MMSARSCOVKQR-B), le statut de l'échantillon est obtenu par l'analyse des courbes en simultanée en FAM et VIC. Le statut de l'échantillon pour la mutation L452R (absence ou présence) est ainsi obtenu par l'identification de la courbe donnant le signal le plus précoce. Pour cette souche, les valeurs de Ct sont plus précoces en VIC qu'en FAM, l'échantillon est donc identifié comme étant L452R (résultat attendu).

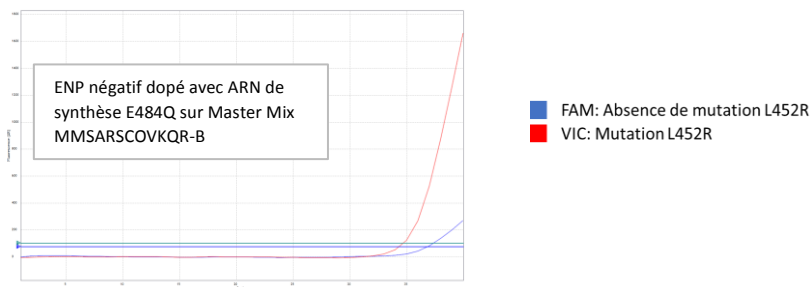


⇒ Pour la valence L542R, la LD_{METHODE} approchée est de 1,1.10⁵ copies/ml d'éluât d'écouvillon (4,5.10³ copies/qRT-PCR).

Données brutes (valeurs de Ct) de l'approche de la LD_{METHODE} : ARN de synthèse possédant la mutation E484Q du gène S

		Master Mix MMSARSCOVKQR-A				Master Mix MMSARSCOVKQR-B	
Niveau de positivité		réplique	Ct			Ct	
			Gène E	Mutation E484K	Mutation E484Q	L452WT	Mutation L452R
2,5.10 ⁶ copies/ml d'éluât	1.10 ⁵ copies/qRT-PCR	1	No Ct	No Ct	31.72	32.46	31.18
		2	No Ct	No Ct	31.19	32.59	31.64
		3	No Ct	No Ct	31.55	32.53	31.6
		4	No Ct	No Ct	31.42	32.6	31.56
		5	No Ct	No Ct	31.57	33.06	31.74
2,5.10 ⁵ copies/ml d'éluât	1.10 ⁴ copies/qRT-PCR	1	No Ct	No Ct	35.41	35.76	34.31
		2	No Ct	No Ct	35.23	36.34	35.12
		3	No Ct	No Ct	34.2	37.23	35.91
		4	No Ct	No Ct	34.8	37.88	36.66
		5	No Ct	No Ct	35.74	36.06	34.85
2,5.10 ⁴ copies/ml d'éluât	1.10 ³ copies/qRT-PCR	1	No Ct	No Ct	No Ct	38.65	37.31
		2	No Ct	No Ct	38.51	37.98	36.69
		3	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	38.58
		4	No Ct	No Ct	38.2	No Ct	No Ct
		5	No Ct	No Ct	35.96	No Ct	No Ct

Pour rappel l'ARN de synthèse utilisée contient également la mutation L452R mais ne contient pas le gène E, c'est pourquoi il est détecté en MMSARSCOVKQR-B et non détecté pour la cible gène E. Pour la lecture des résultats en MMSARSCOVKQR-B (cf. rubrique Lecture des Echantillons extraits sur le MMSARSCOVKQR-B), le statut de l'échantillon est obtenu par l'analyse des courbes en simultanée en FAM et VIC. Le statut de l'échantillon pour la mutation L452R (absence ou présence) est ainsi obtenu par l'identification de la courbe donnant le signal le plus précoce. Pour cet échantillon, les valeurs de Ct sont plus précoces en VIC qu'en FAM, l'échantillon est donc identifié comme étant L452R (résultat attendu).



⇒ Pour la valence Mutation E484Q, la LD_{METHODE} approchée est de 2,5.10⁵ copies/ml d'éluât d'écouvillon (1.10⁴ copies/qRT-PCR) pour la méthode d'extraction BioExtract® Premium Mag.

Résultat de La confirmation de la LD_{METHODE}

Plan d'expérience :

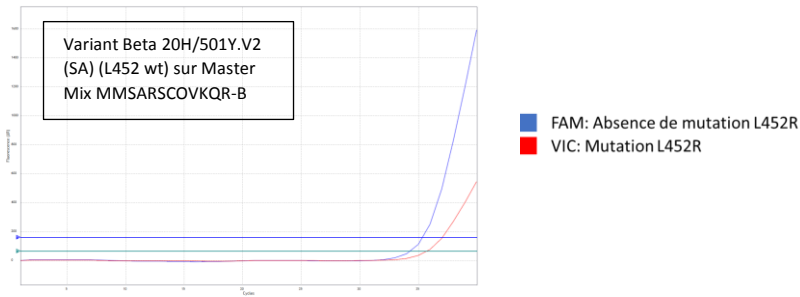
Nombre de dilution	Nombre de répliques par série	Nombre d'opérateur	Nombre de séries indépendantes
1	24	1	1

Souche virale inactivée SARS-CoV-2 lineage 20H/501Y.V2 variant Beta (ou Sud-Africain)

Niveau de positivité		Master Mix MMSARSCOVKQR-A				Master Mix MMSARSCOVKQR-B	
		réplique	Ct			Ct	
			Gène E	Mutation E484K	Mutation E484Q	L452WT	Mutation L452R
7,2.10 ³ copies/ml d'éluât d'écouvillon	72 copies/qRT-PCR	1	34.38	37.05	No Ct	34.81	35.12
		2	34.01	36.94	No Ct	35.48	35.84
		3	32.78	36.57	No Ct	34.38	34.63
		4	33.94	36.14	No Ct	36.34	36.78
		5	34.00	38.44	No Ct	36.71	37.18
		6	33.63	36.87	No Ct	35.80	36.28
		7	34.98	37.96	No Ct	34.84	35.44
		8	33.98	36.14	No Ct	35.59	36.02
		9	34.04	37.18	No Ct	35.16	35.59
		10	34.37	36.76	No Ct	35.66	36.21
		11	34.07	36.46	No Ct	35.58	36.03
		12	34.46	38.05	No Ct	35.73	36.24
		13	34.21	35.88	No Ct	35.66	36.04
		14	34.58	36.58	No Ct	35.45	35.67
		15	34.37	37.34	No Ct	36.07	36.37
		16	33.97	37.4	No Ct	35.19	35.67
		17	34.91	37.34	No Ct	35.8	36.26
		18	34.58	37.40	No Ct	37.02	37.35
		19	34.93	37.40	No Ct	35.82	36.36
		20	34.09	36.87	No Ct	35.56	36.03
		21	34.74	37.48	No Ct	35.28	35.77
		22	34.76	37.84	No Ct	35.33	35.98
		23	34.95	36.85	No Ct	35.77	36.49
		24	36.80	38.43	No Ct	37.92	38.91

Pour la lecture des résultats en MMSARSCOVKQR-B (cf. rubrique Lecture des Echantillons extraits sur le MMSARSCOVKQR-B), le statut de l'échantillon est obtenu par l'analyse des courbes en simultanée en FAM et VIC. Le statut de l'échantillon pour la mutation L452R (absence ou présence) est ainsi obtenu par l'identification de la courbe donnant le signal le plus

précoce. Pour cette souche, les valeurs de Ct sont plus précocement en FAM qu'en VIC, l'échantillon est donc identifié comme étant L452WT (résultat attendu).

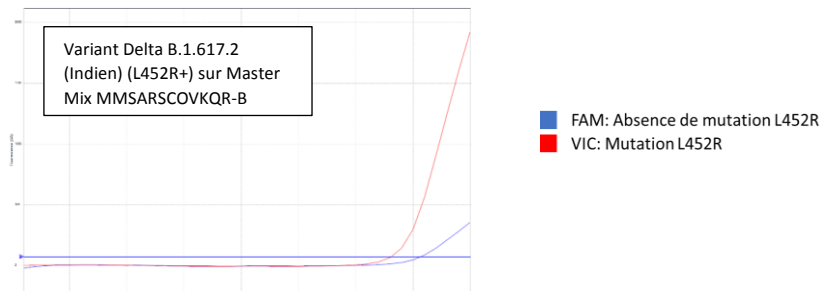


⇒ Ainsi, la LD_{METHODE} pour le Bio-T kit® SARS-CoV-2 DualPlex KQR Variants associé au BioExtract® Premium Mag est de $7,2 \cdot 10^3$ copies/ml d'éluât d'échantillon pour les valences gènes *E*, mutations E484K du gène *S* et absence de mutation L452R (L452wt).

Souche virale inactivée SARS-CoV-2 lineage 20A.542R (B.1.617.2) : variant delta (ou Indien)

Niveau de positivité		Master Mix MMSARSCOVKQR-A				Master Mix MMSARSCOVKQR-B	
		réplique	Ct			Ct	
			Gène E	Mutation E484K	Mutation E484Q	L452WT	Mutation L452R
1,1.10 ⁵ copies/ml	4,5.10 ³ copies/qRT-PCR	1	32.56	No Ct	No Ct	35.94	33.67
		2	33.5	No Ct	No Ct	36.12	33.66
		3	33.68	No Ct	No Ct	35.73	33.32
		4	33.07	No Ct	No Ct	36.32	33.93
		5	32.48	No Ct	No Ct	36.66	34.24
		6	32.28	No Ct	No Ct	36.23	33.94
		7	32.2	No Ct	No Ct	35.9	33.71
		8	32.74	No Ct	No Ct	36.31	34.05
		9	32.56	No Ct	No Ct	36.4	34.33
		10	32.11	No Ct	No Ct	35.15	32.81
		11	31.74	No Ct	No Ct	34.97	32.57
		12	32.89	No Ct	No Ct	36.03	33.84
		13	33.15	No Ct	No Ct	36.06	33.64
		14	33.16	No Ct	No Ct	35.8	33.26
		15	33.57	No Ct	No Ct	36.38	33.81
		16	32.39	No Ct	No Ct	35.68	33.33
		17	32.77	No Ct	No Ct	35.79	33.55
		18	32.93	No Ct	No Ct	35.72	33.54
		19	33.5	No Ct	No Ct	37.14	34.78
		20	32.77	No Ct	No Ct	35.7	33.39
		21	32.45	No Ct	No Ct	35.69	33.57
		22	32.38	No Ct	No Ct	36.03	33.74
		23	31.92	No Ct	No Ct	35.51	33.2
		24	33.47	No Ct	No Ct	35.84	33.75

Pour la lecture des résultats en MMSARSCOVKQR-B (cf. rubrique Lecture des Echantillons extraits sur le MMSARSCOVKQR-B), le statut de l'échantillon est obtenu par l'analyse des courbes en simultanée en FAM et VIC. Le statut de l'échantillon pour la mutation L452R (absence ou présence) est ainsi obtenu par l'identification de la courbe donnant le signal le plus précoce. Pour cette souche, les valeurs Ct sont plus précocement en VIC qu'en FAM, l'échantillon est donc identifié comme étant L452R (résultat attendu).

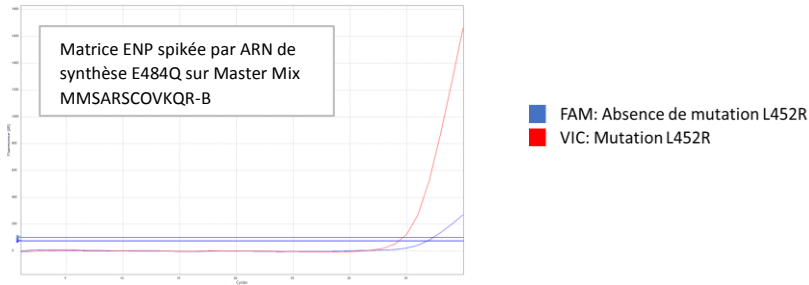


⇒ Ainsi, la LD_{METHODE} pour le Bio-T kit® SARS-CoV-2 DualPlex KQR Variants associé au BioExtract® Premium Mag est de $1,1 \cdot 10^5$ copies/ml d'éluât d'écouvillon ($4,5 \cdot 10^3$ copies/qRT-PCR) pour la valence mutation L542R.

ARN de synthèse possédant la mutation E484Q du gène S

Niveau de positivité		Master Mix MMSARSCOVKQR-A				Master Mix MMSARSCOVKQR-B	
		réplique	Ct			Ct	
			Gène E	Mutation E484K	Mutation E484Q	L452WT	Mutation L452R
2,5.10 ⁵ copies/ml d'éluât d'écouvillon	1.10 ⁴ copies/qRT- PCR	1	No Ct	No Ct	34.19	37.00	34.85
		2	No Ct	No Ct	33.42	37.10	35.00
		3	No Ct	No Ct	33.05	36.71	34.76
		4	No Ct	No Ct	33.6	38.22	36.05
		5	No Ct	No Ct	34.67	37.07	34.99
		6	No Ct	No Ct	34.02	37.22	35.24
		7	No Ct	No Ct	33.35	No Cq	37.21
		8	No Ct	No Ct	33.21	36.34	34.49
		9	No Ct	No Ct	33.95	36.99	35.01
		10	No Ct	No Ct	34.39	37.15	34.87
		11	No Ct	No Ct	33.44	36.93	34.94
		12	No Ct	No Ct	33.08	37.56	35.60
		13	No Ct	No Ct	34.22	37.68	35.48
		14	No Ct	No Ct	33.92	39.74	36.86
		15	No Ct	No Ct	33.42	37.33	35.09
		16	No Ct	No Ct	34.46	37.04	34.89
		17	No Ct	No Ct	33.46	37.20	35.03
		18	No Ct	No Ct	33.86	36.97	35.02
		19	No Ct	No Ct	33.9	38.66	36.37
		20	No Ct	No Ct	35.17	38.35	36.01
		21	No Ct	No Ct	34	36.99	35.13
		22	No Ct	No Ct	33.59	36.93	34.88
		23	No Ct	No Ct	33.71	37.68	35.73
		24	No Ct	No Ct	34.5	36.43	34.61

L'ARN de synthèse utilisé contient également la mutation L452R, c'est pourquoi il est détecté en MMSARSCOVKQR-B. Pour la lecture des résultats en MMSARSCOVKQR-B (cf. rubrique Lecture des Echantillons extraits sur le MMSARSCOVKQR-B), le statut de l'échantillon est obtenu par l'analyse des courbes en simultanée en FAM et VIC. Le statut de l'échantillon pour la mutation L452R (absence ou présence) est ainsi obtenu par l'identification de la courbe donnant le signal le plus précoce. Pour cet échantillon, les courbes (valeurs de Ct) sortent plus précocement en VIC qu'en FAM, l'échantillon est donc identifié comme étant L452R (résultat attendu).



⇒ Ainsi, la LD_{METHODE} pour le Bio-T kit® SARS-CoV-2 DualPlex KQR Variants associé au BioExtract® Premium Mag est de $2,5 \cdot 10^5$ copies/ml d'éluât d'écouvillon ($1 \cdot 10^4$ copies/qRT-PCR) pour la valence mutation E484Q.

Conclusions

Efficacité de la qRT-PCR	Gène E du SARS-CoV-2 : 102,6% Mutation E484Q du gène S du SARS-CoV-2: 100,2% Mutation E484K du gène S du SARS-CoV-2: 103,3% Absence de mutation L452R du gène S du SARS-CoV-2: 104,7% Mutation L452R du gène S du SARS-CoV-2: 99.8% <i>déterminées avec les autres cibles présentes en ratio équimolaire</i>
Coefficient de variation de répétabilité	Varie entre 0.15 et 0.41% pour la valence gène E Varie entre 0.54 et 1.19 % pour la valence mutations E484Q du gène S Varie entre 0.55 et 1.26 % pour la valence mutations E484K du gène S Varie entre 0.25 et 1.59 % pour la valence mutations L452R du gène S Varie entre 0.30 et 2.11 % pour la valence absence de mutations L452R du gène S <i>déterminées avec les autres cibles présentes en ratio équimolaire</i>
LD_{METHODE} ENP	Gène E du SARS-CoV-2 : 7,2.10³ copies/ml d'éluât d'écouvillon <i>déterminée sur la souche beta (B.1.351)</i> Mutation E484Q du gène S du SARS-CoV-2: 2,5.10⁵ copies/ml d'éluât d'écouvillon <i>déterminée par ajout dosé avant extraction d'ARN de synthèse possédant la mutation E484Q du gène S dans des ENP négatifs</i> Mutation E484K du gène S du SARS-CoV-2: 7,2.10³ copies/ml d'éluât d'écouvillon <i>déterminée sur la souche beta (B.1.351)</i> Absence de mutation L452R du gène S du SARS-CoV-2: 7,2.10³ copies/ml d'éluât d'écouvillon <i>déterminée sur la souche beta (B.1.351)</i> Mutation L452R du gène S du SARS-CoV-2: 1,1.10⁵ copies/ml d'éluât d'écouvillon <i>déterminée sur la souche delta (B.1.617.2)</i>



27 chemin des Peupliers

69570 Dardilly, France

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