



RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT

**Détection qualitative de l'ARN du SARS-CoV-2 et des mutations
K417N, L452R et E484K par RT-qPCR fluorescente multiplex**

Référence catalogue : KSCV96AB69

Notice d'utilisation : KSCV96AB69.NU

Révision : 02 du 2023-01-26



UTILISATION PRÉVUE : DIAGNOSTIC *IN VITRO*



205 rue des frères Lumière
69970 CHAPONNAY
FRANCE
+33 (0)4 37 57 00 54
contact@appolonbiotech.com
www.appolonbiotech.fr

Table des matières

I.	Nom du produit.....	3
II.	Utilisation prévue du produit.....	3
III.	Description du produit	4
IV.	Matériel requis non fourni dans le kit	5
IV.1.	Matériel de prélèvement et de transport viral	5
IV.2.	Equipements de laboratoire et réactifs	5
IV.3.	Systèmes d'extraction d'ARN.....	5
IV.4.	Systèmes de PCR en temps réel	5
V.	Principe du test.....	6
V.1.	Types d'échantillons	7
V.2.	Modalités de prélèvement.....	7
VI.	Précautions d'emploi	8
VI.1.	Précautions générales	8
VI.2.	Précautions particulières pour la biologie moléculaire	8
VI.3.	Préparation, transport et conservation des échantillons	8
VII.	Protocole	9
VII.1.	Protocole d'extraction de l'ARN du SARS-CoV-2	9
VII.2.	Protocole d'amplification en temps réel	9
VIII.	Analyse des résultats	11
VIII.1.	Canaux de lecture de fluorescence.....	12
VIII.2.	Validation des contrôles	12
VIII.3.	Interprétation des résultats	13
IX.	Limites.....	14
X.	Performances analytiques	15
X.1.	Spécificité analytique.....	15
X.2.	Sensibilité analytique.....	21
XI.	Performances cliniques.....	22
XI.1.	Performances cliniques sur les prélèvements nasopharyngés.....	22
XI.2.	Performances cliniques sur les prélèvements salivaires	23
XI.3.	Performances cliniques sur les prélèvements séquencés.....	24
XII.	Résolution des problèmes	25
XII.1.	Problèmes d'amplification.....	25
XII.2.	Problèmes de contamination.....	26
XII.3.	Echantillons inhibés	26
XIII.	Symboles et logos utilisés	26

I. Nom du produit

RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT (Appolon Biotech, KSCV96AB69).
Détection qualitative de l'ARN du SARS-CoV-2 et des mutations K417N, L452R et E484K par RT-qPCR fluorescente multiplex.

II. Utilisation prévue du produit

RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT (Appolon Biotech, KSCV96AB69) permet le diagnostic en 1^{ère} et/ou en 2^{ème} intention du SARS-CoV-2, tout en permettant une détermination de variants (Bêta, Delta/Kappa et Omicron) : il détecte simultanément les gènes **ORF1ab** et **N** du SARS-CoV-2 ainsi que les mutations **K417N**, **L452R** et **E484K** du gène S codant la protéine Spike, par RT-qPCR multiplex, sur prélèvements nasopharyngés et salivaires de patients.

RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT (Appolon Biotech, KSCV96AB69) contient :

- Une solution enzymatique permettant, en 1 heure et 30 minutes, la réalisation de la réaction de transcription inverse (reverse transcription / RT) et d'amplification PCR en temps réel.
- Un contrôle positif constitué de virus inactivés (SARS-CoV-2 variant Delta et Bêta) et d'ARN de lignée cellulaire humaine. Il est utilisé pour valider les étapes d'extraction, de RT et de PCR.
- Un contrôle négatif (ARN de lignée cellulaire humaine qualifiée sans présence de SARS-CoV-2 ou d'autres agents pathogènes). Il est utilisé pour valider les étapes d'extraction, de RT et de PCR.

RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT (Appolon Biotech, KSCV96AB69) est optimisé et validé pour le diagnostic du SARS-CoV-2 en 1^{ère} et/ou en 2^{ème} intention. Il permet la détection des gènes ORF1ab/N de la souche initiale (Wuhan-Hu-1/2019) et des variants alpha (B.1.1.7), Bêta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2), Kappa (B.1.617.1) et Omicron (BA.1, BA.2) (**Tableau 1**), sur prélèvements nasopharyngés et salivaires de patients présentant des signes et des symptômes évocateurs d'une infection par le SARS-CoV-2 (par exemple, fièvre et / ou symptômes d'une maladie respiratoire aiguë), de patients ayant eu un contact avec un individu ayant contracté le virus, de patients susceptibles d'être infectés suite à leur présence dans un rassemblement ou un « cluster », ou devant faire l'objet d'une campagne de dépistage mise en œuvre par les autorités de santé, et les patients s'apprêtant à effectuer, ou ayant effectué un déplacement hors métropole ou à l'étranger.

Tableau 1 : Variants détectés par la trousse diagnostique *RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT (Appolon Biotech, KSCV96AB69)*.

Gène : mutation	Alpha B.1.1.7	Bêta B.1.351	Gamma P.1	Delta B.1.617.2	Kappa B.1.617.1	Omicron BA.1, BA.2
ORF1ab/N	+	+	+	+	+	+
S : K417N		+				+
S : L452R				+	+	
S : E484K		+	+			

La prise en charge médicale du patient doit être associée aux observations cliniques et aux données biologiques, aux antécédents du patient et aux informations épidémiologiques disponibles par ailleurs. Des résultats positifs ne peuvent en aucun cas exclure une infection bactérienne ou une co-infection par des virus autres que le SARS-CoV-2. Les résultats négatifs n'excluent pas une infection par le SARS-CoV-2. Ils ne doivent pas être utilisés comme seule base de décision dans la prise en charge des patients.

RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT (Appolon Biotech, KSCV96AB69) est destiné aux personnels des laboratoires de biologie médicale dûment formés et habilités aux procédures de bonnes pratiques de diagnostic de laboratoire. Il est exclusivement réservé aux laboratoires de biologie médicale dotés d'une structure conforme aux recommandations de l'Agence

Régionale de Santé avec un personnel qualifié et formé aux techniques de biologie moléculaire, en particulier la PCR en temps réel. Les laboratoires sont tenus de déclarer tous les résultats aux autorités de santé compétentes.

RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT (Appolon Biotech, KSCV96AB69) est marqué CE-IVD selon la Directive Européenne 98/79/CE et respecte les exigences de la norme ISO 13485.

III. Description du produit

La trousse diagnostique *RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT* (Appolon Biotech, KSCV96AB69) permet la détection simultanée des gènes ORF1ab / N et des mutations du gène S (K417N, L452R et E484K) du SARS-CoV-2 permettant le criblage de différents variants, dont les variants Bêta (B.1.351), Delta (B.1.617.2) / Kappa (B.1.617.1) et Omicron (BA.1, BA.2). Un signal spécifique indépendant, provenant de l'amplification d'un ARNm humain de contrôle de l'échantillon (RNase P) permet de démontrer le bon déroulement des différentes étapes techniques depuis le traitement des échantillons jusqu'au rendu des résultats (extraction d'ARN, transcription inverse et PCR). La trousse diagnostique *RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT* (Appolon Biotech, KSCV96AB69) permet la réalisation de 96 tests. Elle est constituée de tubes de couleurs de bouchon différentes. Sont inclus dans la boîte (**Tableau 2**) :

- Mix RT-qPCR : 1 tube à bouchon translucide.
- Contrôle positif : 1 tube à bouchon rouge.
- Contrôle négatif : 1 tube à bouchon bleu.
-

Tableau 2 : Composition de la trousse diagnostique *RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT* (Appolon Biotech, KSCV96AB69).

Nom du composant	Composition	Quantité	Volume par tube	Cibles (Fluorescence)	Stockage	Conservation
Mix RT-qPCR	Mélange réactionnel de RT-qPCR : <ul style="list-style-type: none"> • Amorces et sondes spécifiques du gène N, ORF1ab du SARS-COV-2 et des mutations K417N, L452R et E484K • Amorces et sonde spécifiques pour l'ARNm du gène RNase P humaine • Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, MgCl₂, dNTPs, UDG... • Enzymes (reverse transcriptase et ADN polymérase thermo-résistante). 	1 tube (96 tests) Bouchon Translucide	1500 µL	ORF1ab/N (Cy5.5) K417N (HEX) L452R (FAM)	-25 °C / -15 °C	12 mois
Contrôle Positif	2 variants du virus SARS-Cov-2, inactivés et quantifiés (bêta et delta) et cellules d'une lignée humaine qualifiée sans présence de SARS-CoV-2 ou autres agents pathogènes.	1 tube Bouchon Rouge	150 µL	E484K (ROX)		
Contrôle Négatif	Cellules d'une lignée humaine qualifiée sans présence de SARS-CoV-2 ou autres agents pathogènes, dans une solution d'inactivation virale et de préservation.	1 tube Bouchon Bleu	150 µL	RNase P (Cy5)		

IV. Matériel requis non fourni dans le kit

IV.1. Matériel de prélèvement et de transport viral

- Matériel de recueil des prélèvements nasopharyngés :
 - Ecouvillons secs stériles.
 - Milieu de transport et d'inactivation virale (Appolon Biotech, MTL02-AB69).
- Matériel de recueil des prélèvements salivaires :
 - Kits de prélèvement salivaire avec tube de collecte et entonnoir de recueil stériles.
 - Pipette de prélèvement et tube contenant un tampon inactivateur prêt à l'emploi.



RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT (Appolon Biotech, KSCV96AB69) est conseillé en utilisation avec le **milieu de transport viral MTL** (Appolon Biotech, MTL02-AB69). Pour tout autre milieu de transport, se référer aux recommandations du fournisseur.

IV.2. Equipements de laboratoire et réactifs

Tout matériel classique de laboratoire de biologie moléculaire, comprenant de manière non exhaustive :

- Congélateur -20°C .
- Réfrigérateur $+4^{\circ}\text{C}$.
- Gants jetables non poudrés.
- Blouse de laboratoire.
- Centrifugeuse de paillasse à plaque et/ou pour microtubes de 1,5 mL et 2,0 mL.
- Vortex de paillasse.
- Micropipettes ajustables P10, P20, P200, P1000.
- Embouts stériles à filtre pour 10 μL , 20 μL , 200 μL , 1000 μL .
- Microtubes Eppendorf 1,5 mL ou équivalent.
- Barrettes ou plaques PCR temps réel 96 positions 0,2 mL.
- Films optiques spécifiques pour la PCR (ou bouchons optiques s'il s'agit de barrettes).
- Poste de Sécurité Microbiologique (PSM) pour manipulation des pathogènes de classe I ou II.
- Hotte biologique.
- Portoir froid ou glace pilée.
- Eau de qualité biologie moléculaire (dépourvue d'activités nucléasiques).
- Si utilisation du système d'extraction d'ARN par billes magnétiques Genolution NX-48S : kit d'extraction Genolution, VN143.
- Produits de décontamination ADN-ARN.

IV.3. Systèmes d'extraction d'ARN

RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT (Appolon Biotech, KSCV96AB69) peut être utilisé à partir de prélèvements (nasopharyngés ou salivaires) collectés et transportés en milieu de transport viral MTL (Appolon Biotech, MTL02-AB69), permettant l'extraction de l'ARN viral. Alternativement, un système d'extraction d'acides nucléiques peut être utilisé avant la réalisation du test : nous recommandons alors l'utilisation d'une extraction par billes magnétiques (Genolution, NX 48S).



L'utilisateur doit s'assurer que le système d'extraction d'acide nucléique utilisé est compatible avec la technologie RT-qPCR en temps réel en se référant aux recommandations d'utilisation du fournisseur retenu.

IV.4. Systèmes de PCR en temps réel

RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT (Appolon Biotech, KSCV96AB69) est validé pour une utilisation avec les systèmes de PCR en temps réel suivants :

- Line-Gene 9600 Plus Real-time PCR Detection System.

- CFX96 Touch™ real time PCR.



Pour tout autre système, veuillez suivre les recommandations d'utilisation du fournisseur retenu et effectuer une validation technique préalable.

V. Principe du test

RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT (Appolon Biotech, KSCV96AB69) est basé sur l'amplification de régions spécifiques du génome SARS-CoV-2, correspondant aux gènes ORF1ab, N et S (Bêta (B.1.351), Delta (B.1.617.2) / Kappa (B.1.617.1) et Omicron (BA.1, BA.2)). La réaction est basée sur la propriété 5' exonucléasique de la *Taq* polymérase et sa capacité à dégrader les sondes d'hydrolyse incluses dans le mélange réactionnel. Il s'en suit une libération d'une fluorescence spécifique pouvant être lue par des capteurs optiques du thermocycleur permettant un suivi en temps réel de l'amplification de la et/ou des cibles recherchées.

Pour la réalisation du test, tous les composants nécessaires sont inclus dans la trousse diagnostique *RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT* (Appolon Biotech, KSCV96AB69) :

- **Mix RT-qPCR**

La solution réactionnelle est constituée de 6 couples d'amorces et de 6 sondes TaqMan™. Cinq sont spécifiques des régions génomiques du SARS-CoV-2 : ORF1ab/N et S (mutations K417N, L452R et E484K). Les sondes d'hydrolyse (TaqMan™) sont marquées à leurs extrémités 5' par les fluorochromes Cy5.5 (gènes ORF1ab et N), HEX (K417N), FAM (L452R) et ROX (E484K). Un sixième couple d'amorces et une sonde d'hydrolyse (TaqMan™), marquée avec le fluorochrome Cy5 à son extrémité 5' sont utilisés dans le kit comme contrôle interne de RT-qPCR permettant la détection de l'ARNm du gène de la RNase P humaine (**Figure 1**). Ce contrôle interne est amplifié dans chaque échantillon y compris dans le contrôle positif et le contrôle négatif (fournis dans le kit) afin de valider le processus d'extraction des acides nucléiques ou de lyse, d'évaluer le statut d'inhibition de l'échantillon et de valider les étapes de transcription inverse / PCR (RT-PCR).

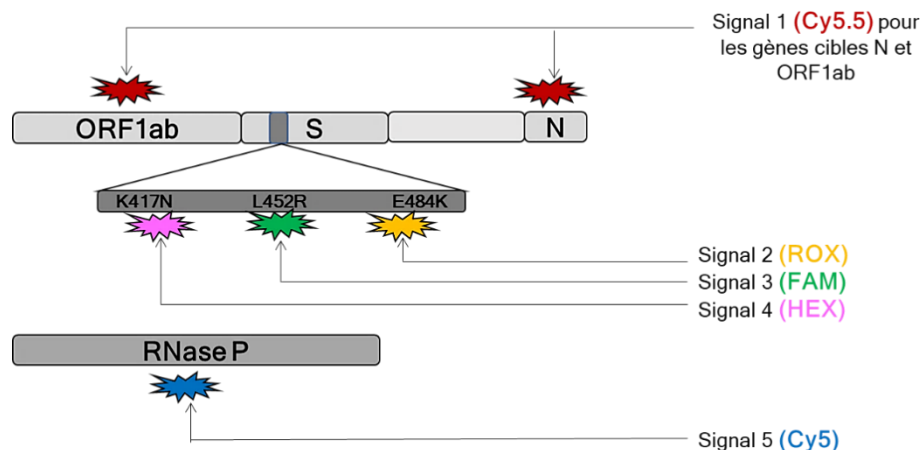


Figure 1 : Principe général de fonctionnement de la trousse diagnostique *RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT* (Appolon BIOTECK : KSCV96AB69).

- **Contrôle positif**

Le contrôle positif permet la validation de la RT-qPCR par la détection conjointe des gènes ORF1ab et N du SARS-CoV-2, de chacune des mutations testées (K417N, L452R, E484K) ainsi que de l'ARNm du gène de la RNase P (contrôle endogène RT-PCR). Il est constitué de 2 variants inactivés du virus SARS-Cov-2 et de cellules de lignée humaine :

- Variant Bêta (B.1.351), avec gènes ORF1ab, N et S du SARS-CoV-2 et les mutations K417N et E484K du gène S codant la protéine Spike.

- Variant Delta (B.1.617.2), avec gènes ORF1ab, N et S du SARS-CoV-2 et la mutation L452R du gène S codant la protéine Spike.
- Lignée cellulaire humaine qualifiée sans présence de SARS-CoV-2 ou autres agents pathogènes, dans une solution d'inactivation virale et de préservation, comprenant l'ARNm du gène de ménage RNase P.

- **Contrôle négatif**

Le contrôle négatif est constitué d'une lignée cellulaire humaine, contenant le gène de la RNase P humaine, qualifiée sans présence de SARS-CoV-2 ou d'autres agents pathogènes. Ce contrôle est placé dans une solution d'inactivation virale et de préservation des acides nucléiques.

NB : Les contrôles positif et négatif permettent l'évaluation de l'efficacité de la préparation de l'échantillon, le bon déroulement du processus technique et l'absence d'inhibiteurs dans la réaction de RT-qPCR.

V.1. Types d'échantillons

Les types d'échantillons pouvant être analysés sont :

- Des prélèvements nasopharyngés.
- Des prélèvements salivaires.

Les prélèvements peuvent être réalisés notamment sur des patients :

- Présentant des signes ou les symptômes évocateurs d'une infection par le SARS-CoV-2 (fièvre et/ou symptômes d'une maladie respiratoire aiguë),
- Etant cas contact d'un individu ayant contracté le virus,
- Issus de « clusters » connus de SARS-CoV-2,
- Faisant l'objet de campagnes de dépistage mises en œuvre par les autorités de santé,
- S'apprêtant à effectuer, ou ayant effectué un déplacement à l'étranger ou hors métropole.

V.2. Modalités de prélèvement



Il convient de se reporter aux recommandations des autorités de santé compétentes ainsi que celles du fournisseur du dispositif de prélèvement retenu.

- **Prélèvement nasopharyngé**

- 1- Etiqueter l'identité du patient sur le tube (code barre...).
- 2- Immerger l'écouvillon dans le milieu de transport viral MTL (Appolon Bioteck, MTL02-AB69) immédiatement après réalisation du prélèvement nasopharyngé.
- 3- Tourner l'écouvillon afin de relarguer le matériel biologique dans le tube de prélèvement MTL.
- 4- Retirer l'écouvillon du tube.
- 5- Jeter l'écouvillon dans une poubelle spécifique pour les matières biologiques dangereuses.
- 6- Fermer soigneusement le tube avec le bouchon dédié.

- **Prélèvement salivaire**

- 1- Etiqueter l'identité du patient sur le tube (code barre...).
- 2- Recueillir le crachat salivaire à l'aide du kit de prélèvement salivaire retenu.
- 3- Transférer 100 µL de prélèvement salivaire dans du milieu de transport viral MTL (Appolon Bioteck, MTL02-AB69).
- 4- Fermer soigneusement le tube avec le bouchon dédié.

VI. Précautions d'emploi

VI.1. Précautions générales

- Eviter tout contact entre les réactifs de *RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT* (Appolon Biotech, KSCV96AB69) et la peau. En cas de contact avec la peau, laver immédiatement et abondamment à l'eau.
- Préparer les échantillons sous un poste de sécurité microbiologique (PSM).
- Les réactifs non utilisés de *RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT* (Appolon Biotech, KSCV96AB69) peuvent être considérés comme non dangereux et éliminés selon les procédures usuelles du laboratoire.
- Tout produit contaminé ou échantillon infectieux doit être éliminé selon les réglementations en vigueur (procédures d'élimination des DASRI).
- Ne pas utiliser les réactifs de *RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT* (Appolon Biotech, KSCV96AB69) après la date de péremption indiquée.

VI.2. Précautions particulières pour la biologie moléculaire

Les procédures d'amplification nécessitent des aménagements particuliers et un personnel qualifié pour éviter les contaminations croisées et la propagation de matériel génétique amplifié.

Les différentes étapes de la procédure doivent se faire dans des pièces séparées pour éviter tout risque de contamination. Le passage d'une zone à l'autre doit se faire de manière unidirectionnelle depuis la zone de prélèvement vers la zone de préparation des réactifs, puis vers la zone d'amplification PCR.



Important :

- Les blouses, pipettes et autres petits matériels de laboratoire doivent être dédiés pour chaque zone de travail.
- Ne jamais échanger le matériel d'une zone vers une autre au risque de contaminer le laboratoire.
- Ne jamais introduire un produit amplifié dans les pièces de préparation des réactifs ou des échantillons.
- Ne pas substituer de réactifs entre lots différents.
- Ne pas substituer de réactifs avec ceux d'autres fabricants.
- Ne pas utiliser les réactifs si ceux-ci sont réceptionnés décongelés ou dans un emballage altéré.
- Eviter des cycles répétés de congélation/décongélation des réactifs.
- Les réactifs doivent être entièrement décongelés en utilisant un bloc froid (+4°C) avant leur utilisation.
- La décongélation est totale en 15 min. Garder les réactifs sur le bloc froid pendant toute la manipulation.
- Porter des gants jetables.

VI.3. Préparation, transport et conservation des échantillons



Important :

- Des conditions d'échantillonnage, de traitement de l'échantillon, de transport et de conservation inappropriées peuvent conduire à des résultats erronés.
- Les prélèvements doivent être réalisés selon les instructions du laboratoire.
- Le transport des prélèvements doit être effectué dans le respect des réglementations en vigueur.
- Si les échantillons sont transportés dans un milieu de transport autre que le MTL (Appolon Biotech MTL02-AB69), nous vous recommandons de suivre les recommandations du fournisseur en respectant les consignes pour les applications de biologie moléculaire.

- Les performances de la trousse diagnostique *RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT* (Appolon Bioteck, KSCV96AB69) ont été prouvées sur prélèvements nasopharyngés (écouvillon nasopharyngé) et sur prélèvements salivaires (crachat salivaire ou prélèvement recueilli sur pipettes) collectés sur le milieu de transport MTL (Appolon Bioteck, MTL02-AB69) et suivi ou non d'une extraction par billes magnétiques (Genolution, NX-48S).

Le milieu MTL permet la collecte, l'inactivation, la lyse membranaire virale et la préservation des acides nucléiques viraux pendant le transport à +4°C.

Les conditions recommandées de conservation des échantillons après prélèvement sont les suivantes :

- 7 jours à +4°C
- 6 mois à -20°C (avec un maximum de 3 cycles de congélation / décongélation).

VII. Protocole

VII.1. Protocole d'extraction de l'ARN du SARS-CoV-2

VII.1.1. Extraction par lyse chimique en milieu de transport MTL (Appolon Bioteck, MTL02-AB69)

Avant le prélèvement, reporter les identifiants du patient sur le tube de transport MTL (Appolon Bioteck, MTL02-AB69) et suivre les indications suivantes :

Prélèvements nasopharyngés collectés sur écouvillons :

1. Déposer l'écouvillon dans un tube de milieu de transport MTL (Appolon Bioteck, MTL02-AB69) sans toucher les bords.
2. Relarguer le matériel biologique prélevé dans le tube de prélèvement.
3. Retirer l'écouvillon du tube, sans toucher les parois de celui-ci.
4. Jeter l'écouvillon dans une poubelle spécifique pour les matières biologiques dangereuses.
5. Fermer soigneusement le tube avec le bouchon dédié.
6. Agiter le prélèvement dans son milieu de transport MTL au vortex pendant 1 minute.
7. Laisser reposer le tube, sans agitation, pendant 5 minutes et répéter 2 fois cette opération.

Prélèvements salivaires :

1. Déposer 100 µL de salive dans un tube de milieu de transport MTL (Appolon Bioteck, MTL02-AB69) sans toucher les bords de celui-ci.
2. Fermer soigneusement le tube avec le bouchon dédié.
3. Agiter le prélèvement dans son milieu de transport MTL au vortex pendant 1 minute.
4. Laisser reposer le tube, sans agitation, pendant 5 minutes et répéter 2 fois cette opération.

VII.1.2. Extraction nucléique par billes magnétiques



L'extraction des ARN à partir des échantillons nasopharyngés et salivaires peut être réalisée par un système automatisé à billes magnétiques ou équivalent. Ce kit a été validé pour usage avec extraction par billes magnétiques avec l'automate NX-48S (Genolution). Pour tout autre automate, il est recommandé de suivre les préconisations mentionnées dans les notices d'utilisation des dispositifs et systèmes d'extraction retenus.

VII.2. Protocole d'amplification en temps réel



Important :

- Pour éviter toute contamination, préparez les réactifs dans un poste de travail dédié à la RT-PCR.
- N'utilisez pas la même pipette pour les contrôles et les échantillons biologiques / ARN extraits.

- Utilisez toujours des pointes de pipette stériles anti-aérosols à filtre.
- Maintenez un environnement sans RNases.
- Protégez les tests de la lumière.
- Une fois la plaque PCR scellée par un film adhésif, placer celle-ci immédiatement dans le système de PCR en temps réel.

Pour chaque plaque RT-qPCR, inclure les contrôles suivants dans les séries de tests :

- Le contrôle positif (bouchon rouge) inclus dans la trousse diagnostique *RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT* (Appolon Biotech, KSCV96AB69), à raison de 5 µL par réaction.
- Le contrôle négatif (bouchon bleu) inclus dans la trousse diagnostique *RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT* (Appolon Biotech, KSCV96AB69), à raison de 5 µL par réaction.
- Un contrôle d'absence de contamination sans aucune matrice nucléique (No Template Control (NTC) : eau de qualité biologie moléculaire qualifiée exempte d'ADN, d'ARN, de DNases et RNases).

1. Etablir une feuille de route technique (plan de plaque) spécifiant l'identité des patients.
2. Décongeler les réactifs et pour chaque série RT-qPCR, prévoir le nombre de réactions comme suit :
 - 1 réaction pour chaque échantillon (patient) à tester.
 - 1 réaction pour le contrôle positif.
 - 1 réaction pour le contrôle négatif.
 - 1 réaction pour le contrôle négatif d'amplification PCR (NTC, constitué d'eau de qualité biologie moléculaire qualifiée exempte d'ADN, d'ARN, de DNases et RNases).
3. Réaliser les mélanges réactionnels suivant, indiqués également **Tableau 3** :
 - a. Distribuer 15 µL du mix d'amplification dans chaque puits de PCR suivant le nombre de patients et de contrôles.
 - b. Ajouter 5 µL de chaque ARN extrait, suivant le plan de plaque.
 - c. Déposer 5 µL de contrôle positif (bouchon Rouge) dans le puits contrôle positif.
 - d. Déposer 5 µL du contrôle négatif (bouchon Bleu) dans le puits contrôle négatif.
 - e. Déposer 5 µL d'eau de qualité biologie moléculaire qualifiée exempte d'ADN, d'ARN, de DNases et RNases (contrôle négatif de PCR : NTC).
 - f. Sceller la plaque avec un film adhésif optique.
 - g. Centrifuger légèrement la plaque.
 - h. Lancer le profil thermique d'amplification (**Tableau 4**) avec lecture des canaux de fluorescence Cy5, Cy5.5, FAM, HEX et ROX (**Tableau 5**).

Tableau 3 : Volumes à distribuer par puits de RT-qPCR.

Produit	Volume/puits échantillon (patient)	Volume /puits Contrôle négatif	Volume /puits Contrôle positif	Volume /puits Contrôle négatif de PCR (NTC)
Mix RT-qPCR – <i>bouchon translucide</i>	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL
ARN extrait de l'échantillon à tester	5 µL	-	-	-
Contrôle positif <i>bouchon rouge</i>	-	-	5 µL	-
Contrôle négatif <i>bouchon bleu</i>	-	5µL	-	-
Eau de qualité biologie moléculaire	-	-	-	5 µL
Volume total de réaction	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

Tableau 4 : Programme de RT-qPCR.

Etapes	Temps	Température	Cycles	Acquisition de fluorescence
Transcription inverse (RT)	10 minutes	50°C	1	Non applicable
Activation de la <i>Taq</i> polymérase	2 minutes	95°C	1	Non applicable
Amplification	15 secondes	95°C	40	Cy5 Cy5.5 FAM HEX ROX
	45 secondes	57°C		

Tableau 5 : Canaux de lecture de fluorescence et cibles associées.

Canal de lecture	Cible associée
Cy5	RNase P humaine
Cy5.5	ORF1ab / N (SARS-CoV-2)
HEX	K417N (gène S, SARS-CoV-2)
FAM	L452R (gène S, SARS-CoV-2)
ROX	E484K (gène S, SARS-CoV-2)

VIII. Analyse des résultats

Pour tout test analysé par la trousse diagnostique *RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT* (Appolon Bioteck, KSCV96AB69), les courbes d'amplification doivent être examinées soigneusement. Si le seuil de détection automatique (threshold) semble mal réglé (trop bas par exemple), il peut être nécessaire d'appliquer un seuil de détection manuel (relever le seuil par exemple).



Un signal est considéré positif s'il présente un Ct \leq 35 et une allure d'amplification sigmoïdale : ceci est indiqué par « + » dans les tableaux suivants.

A contrario, un signal est considéré négatif (indiqué « - » dans les tableaux suivants) si ces 2 conditions ne sont pas remplies.

VIII.1. Canaux de lecture de fluorescence

Les sondes utilisées dans la trousse diagnostique *RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT* (Appolon Biotech, KSCV96AB69) permettent :

- La détection des gènes ORF1ab et N du SARS-CoV-2 par le canal de lecture Cy5.5,
- La détection des mutations K417N, L452R et E484K par les canaux HEX, FAM et ROX, respectivement,
- La détection de l'ARNm du gène RNase P humaine (contrôle endogène) par le canal Cy5.

La **figure 2** montre un exemple de profil d'amplification de chacun des gènes cibles testés.

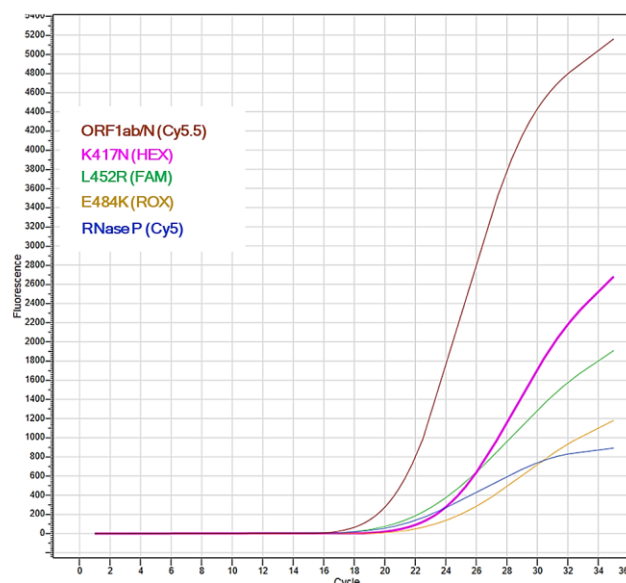


Figure 2 : Détection simultanée des cibles SARS-CoV-2 (ORF1ab et N), des mutations (K417N, L452R et E484K) et de l'ARNm de la RNase P humaine telle qu'obtenue à partir du contrôle positif fourni.

VIII.2. Validation des contrôles

Pour tous les patients analysés par la trousse diagnostique *RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT* (Appolon Biotech, KSCV96AB69), les courbes d'amplification des contrôles positifs et négatifs inclus dans le kit doivent être impérativement intégrées dans le flux des analyses et examinés soigneusement avant le rendu des résultats patients. Un signal est considéré positif s'il implique d'abord une allure sigmoïdale et un Ct \leq 35. Ainsi, la réaction de PCR est considérée validée lorsque les critères reportés dans le **Tableau 6** sont respectés.

Tableau 6 : Critères de validation d'une série RT-qPCR.

	Cy5.5 (ORF1ab/N)	HEX (K417N)	FAM (L452R)	ROX (E484K)	Cy5 (RNase P)	Statut de l'analyse
Contrôle positif	+	+	+	+	+/-	Extraction et RT-qPCR validée
Contrôle négatif	-	-	-	-	+	
Contrôle négatif de PCR (NTC)	-	-	-	-	-	Aucune contamination détectée

VIII.3. Interprétation des résultats

Chaque échantillon doit être analysé individuellement. L'absence d'inhibition pour chaque échantillon est vérifiée par la présence d'une courbe d'amplification dans le canal Cy5 correspondant au contrôle endogène (gène de la RNase P). Le résultat type est résumé sur la **figure 3**.

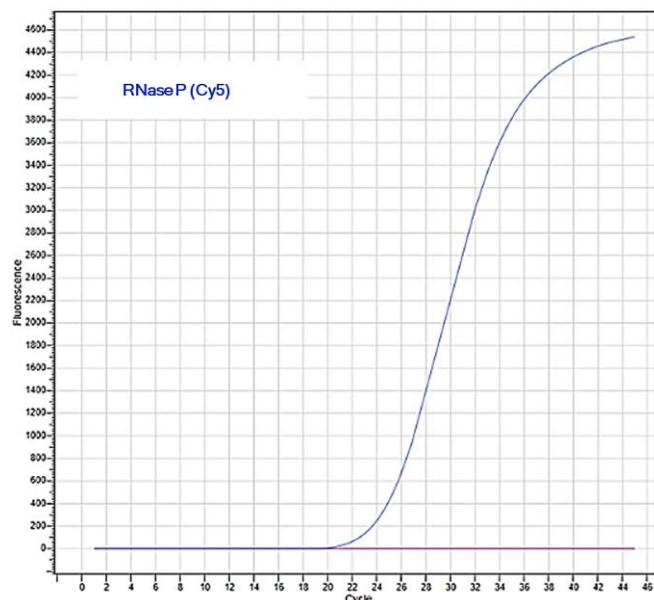


Figure 3 : Profil d'amplification dans le canal 650 nm (Cy5) correspondant au contrôle endogène (gène de la RNase P).

Le biologiste doit analyser les courbes d'amplification pour chaque cible du SARS-CoV-2 testée avant de rendre les résultats. Le **tableau 7** résume les cas de figure des résultats du kit.

Tableau 7 : Interprétation des résultats de la RT-qPCR pour l'échantillon analysé avec *RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT (Appolon Biotech, KSCV96AB69)*.

ORF1ab/N Cy5.5	K417N HEX	L452R FAM	E484K ROX	RNaseP Cy5	Résultat	Conclusion
+	-	+	-	+	Présence de la mutation L452R	Présence du variant Delta ou Kappa
+	+	-	-	+	Présence de la mutation K417N	Présence du variant Omicron
+	+	-	+	+	Présence des mutations K417N et E484K	Présence du variant Bêta
+	-	-	-	+	Présence des gènes ORF1ab et N	POSITIF SARS-Cov-2
-	-	-	-	+	Aucun gène SARS-CoV-2 recherché n'est détecté	NEGATIF SARS-CoV-2

VIII.3.1. Résultat positif

Un patient est considéré positif lorsqu'un des profils de RT-qPCR suivant est observé (**Figure 4**) :

1. Patient SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1/2019) : présence des courbes d'amplification Cy5.5 (ORF1ab / N) et Cy5 (RNase P) avec Ct≤35 : **patient SARS-CoV-2 POSITIF**
2. **Patient POSITIF variant Omicron** : présence des courbes d'amplification Cy5.5 (ORF1ab / N), HEX (**K417N**) et Cy5 (RNase P) avec Ct≤35 (**Figure 4A**).

3. **Patient POSITIF variant Bêta** : présence des courbes d'amplification Cy5.5 (ORF1ab / N), HEX (K417N), ROX (E484K) et Cy5 (RNase P) avec $Ct \leq 35$ (**Figure 4B**).
4. **Patient POSITIF variant Delta / Kappa** : présence des courbes d'amplification Cy5.5 (ORF1ab / N), FAM (L452R) et Cy5 (RNase P) avec $Ct \leq 35$ (**Figure 4C / 4D**).

NB : Dans certains cas la fluorescence dans le canal Cy5 peut être absente alors que les courbes d'amplification dans un des autres canaux sont présentes, le résultat doit être rendu positif.

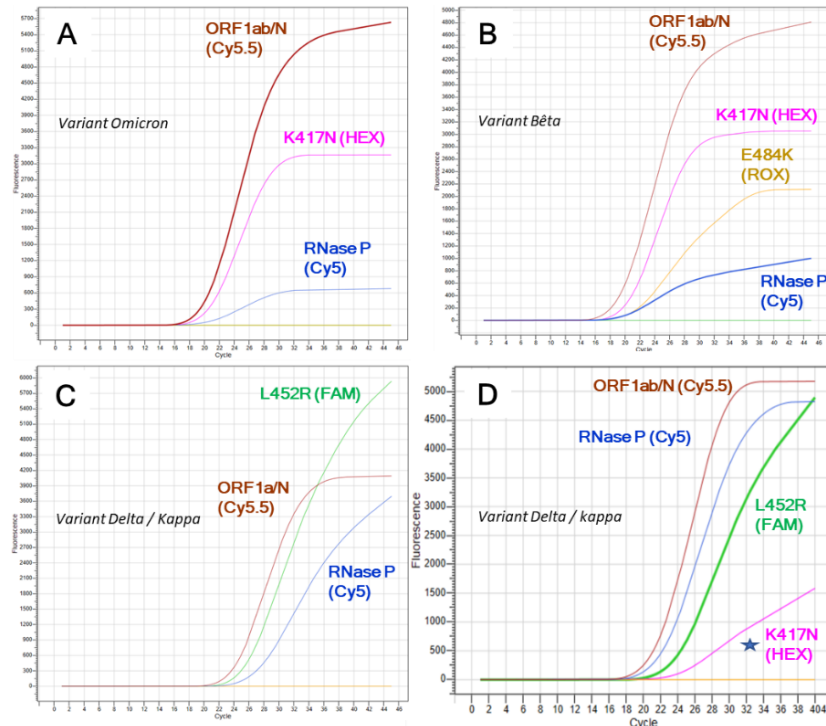


Figure 4 : Exemples de profil d'amplification obtenus avec des échantillons positifs présentant les mutations (A : Omicron, B : Bêta, C et D : Delta / Kappa). Dans certains cas, en présence du variant Delta / Kappa (mutation L452R) détecté en très forte intensité, un signal non spécifique peut apparaître en HEX (D) : Ce signal ★ ne doit pas être pris en compte dans le rendu de résultat.

VIII.3.2. Résultat négatif

Un patient est considéré négatif lorsque seule la courbe d'amplification dans le canal Cy5 (RNase P) est détectée avec une valeur de $Ct \leq 40$.

VIII.3.3. Résultat douteux

En l'absence de courbe d'amplification dans le canal Cy5.5 (ORF1ab et N), un résultat est douteux si on détecte la présence d'une courbe d'amplification des autres cibles recherchées. Dans ce cas, il est recommandé de refaire l'analyse. Si les résultats restent identiques, le patient doit être considéré comme positif pour SARS-CoV-2 pour le variant considéré.

VIII.3.4. Résultat invalide

Aucune courbe d'amplification dans l'ensemble des canaux n'est détectée.

IX. Limites

- L'utilisation de la trousse diagnostique *RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT* (Appolon Biotech, KSCV96AB69) est réservée au personnel dûment formé aux procédures et techniques de biologie moléculaire.

- Le non-respect des instructions mentionnées dans ce manuel d'utilisation peut conduire à des résultats erronés.
- Les performances de *RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT* (Appolon Bioteck, KSCV96AB69) ont été établies sur prélèvements salivaires et nasopharyngés dans un milieu de transport et de lyse MTL (Appolon Bioteck, MTL02-AB69). Les échantillons doivent être collectés, transportés et conservés selon les procédures et conditions appropriées. A défaut, la capacité du kit à détecter les séquences cibles d'intérêt peut être affectée.
- L'extraction et l'amplification des acides nucléiques doivent être réalisées en utilisant le matériel et les méthodes listées dans ce manuel d'utilisation. Pour tout autre matériel non cité dans ce manuel, nous recommandons d'évaluer son efficacité par une procédure de validation interne du laboratoire.

Des résultats faux négatifs peuvent provenir de :

- Non-respect des procédures de recueil des prélèvements,
- Non-respect des conditions de transport ou de conservation des échantillons,
- Présence d'inhibiteurs de PCR,
- Utilisation de réactifs non autorisés ou périmés,
- Utilisation de réactifs non conservés dans les conditions spécifiées dans le manuel d'utilisation,
- Présence de nouvelles mutations dans le génome du virus SARS-CoV-2 non répertoriées à ce jour,
- Non-respect des instructions d'utilisation du kit.

Des résultats faux positifs peuvent provenir de :

- Contaminations croisées entre échantillons durant la manipulation des échantillons,
- Erreurs d'étiquetage,
- Contamination avec le contrôle positif lors de sa manipulation.

Un résultat négatif n'empêche pas une infection subséquente par le virus SARS-CoV-2 et ne doit pas constituer la base unique de décision de prise en charge du patient. Un résultat négatif doit être combiné avec les observations cliniques, l'historique du patient, le contexte épidémiologique.

X. Performances analytiques

X.1. Spécificité analytique

X.1.1. Inclusivité

Afin de vérifier la spécificité des amorces et des sondes, une analyse *in silico* de recherche d'homologie de séquences (Blast N) est effectuée en comparant les amorces et les sondes aux génomes originaux déposés sur la base de données GISAID. Les résultats sont exposés dans le **tableau 8** et montrent une homologie de séquence de 100% quelque soit la souche du SARS-CoV-2 considérée, pour au moins un des deux marqueurs conservés (gènes Orf1ab et N). Toute homologie inférieure à 100% ne concerne qu'un des 2 marqueurs conservés dont le(s) mésappariement(s) n'impacte pas la détection d'un patient positif SARS-CoV-2.

Tableau 8 : Evaluation *in silico* de l'inclusivité des couples d'amorces et sondes des gènes cibles N et ORF1ab du SARS-CoV-2, et des mutations cibles K417N, L452R et E484K. (suite page suivante)

Gènes Amorces et sondes	Gène Cible N			Gène Cible ORF1ab		
	Sens	Antisens	Sonde	Sens	Antisens	Sonde
ID Variant (database GISAID)	Pourcentage d'identité (%)					
hCoV-19/Wuhan/Hu-1/2019 EPI_ISL_402125 WUHAN	22/22 (100%)	22/22 (100%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/England/C210000873/2020 EPI_ISL_846588 B.1.1.7 ALPHA	22/22 (100%)	22/22 (100%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/France/ARA-210015597301/2021 EPI_ISL_1406533 B.1.1.7-ALPHA	22/22 (100%)	21/22 (95%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/South - EPI_ISL_660609 B.1.351 BETA	21/22 (95%)	21/22 (95%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/France/ARA-0001078/2021 EPI_ISL_1190781 B.1.1.351 BETA	21/22 (95%)	22/22 (100%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/Japan/IC-0562/2021 EPI_ISL_792681 Gamma GR/501Y.V3	22/22 (100%)	21/22 (95%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/France/ARA-0011076/2021 EPI_ISL_925031 P1-GAMMA	22/22 (100%)	22/22 (100%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/Switzerland/GE-32931080/2021 EPI_ISL_864699 C16 DELTA	22/22 (100%)	22/22 (100%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/India/MH-ICMR-MCL_5715_5771/2020 EPI_ISL_3473623 B.1.617.2 DELTA	22/22 (100%)	22/22 (100%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/France/ARA-CFD210044293601/2021 EPI_ISL_3432335 B.1.1.617.2 DELTA	22/22 (100%)	22/22 (100%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/France/PAC-IHU-29249-Nova1M/2021 EPI_ISL_4393324 A.21 DELTA	22/22 (100%)	22/22 (100%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/France/PAC-IHU-10104/2021 EPI_ISL_5032149 A.27 DELTA	22/22 (100%)	22/22 (100%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/India/GJ-INSACOG-GBRC2187/2020 EPI_ISL_3717677 B.1.1.617.1 KAPPA	22/22 (100%)	22/22 (100%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/France/ARA-HCL021224452901/2021 EPI_ISL_8121710 B.1.1.529OMICRON	22/22 (100%)	22/22 (100%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/England/ALDP-2F86D33/2021 EPI_ISL_8166781 B.1.1.529OMICRON	22/22 (100%)	22/22 (100%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/Germany/SH-ChVir26566_61/2021 EPI_ISL_8152515 B.1.1.529OMICRON	22/22 (100%)	22/22 (100%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/Belgium/CHUNamur13894259/2021 EPI_ISL_8189646 B.1.1.529OMICRON	22/22 (100%)	22/22 (100%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/France/ARA-CFD210070385801/2021 EPI_ISL_7780903 BA.1OMICRON	22/22 (100%)	22/22 (100%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/England/ALDP-2F86D33/2021 EPI_ISL_8166781 B.1.1.529OMICRON	22/22 (100%)	22/22 (100%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/Germany/SH-ChVir26566_61/2021 EPI_ISL_8152515 BA.1GERMANY	22/22 (100%)	22/22 (100%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/USA/OH-CDC-STM-0000013-D09/2021 EPI_ISL_884777 B.1.1	22/22 (100%)	22/22 (100%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/England/PHEC-U307UFCD/2021 EPI_ISL_3776866 A.23.1	22/22 (100%)	22/22 (100%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/Scotland/GCVR-16FD61/2020 EPI_ISL_632246 A2.3	22/22 (100%)	22/22 (100%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/France/ARA-210015587201/2021 EPI_ISL_1406608 Q.7	20/22 (91%)	21/22 (95%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/Belgium/ULG-11353/2021 EPI_ISL_872085 B.1.221CLADE G	22/22 (100%)	22/22 (100%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/Australia/NSW1447/2021 EPI_ISL_812521 B.1.517.1	21/22 (95%)	21/22 (95%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/England/QEUH-1002AD0/2021 EPI_ISL_863493 B.1.177.54	22/22 (100%)	22/22 (100%)	23/24 (96%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/France/IDF_PSL_541/2020 EPI_ISL_1015028 B.1.1.1	22/22 (100%)	22/22 (100%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)
hCoV-19/England/ALDP-1496C6E/2021 EPI_ISL_1486041 B.1.1.318	19/22 (86%)	22/22 (100%)	24/24 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)	28/28 (100%)

Tableau 8 (suite) : Evaluation *in silico* de l'inclusivité des couples d'amorces et sondes des gènes cibles N et ORF1ab du SARS-CoV-2, et des mutations cibles K417N, L452R et E484K.

Gènes	Mutation K417N			Mutation L452R		
	Sens	Antisens	Sonde	Sens	Antisens	Sonde
Amorces et sondes	Pourcentage d'identité (%)					
ID Variant (database GISAID)	Pourcentage d'identité (%)					
hCoV-19/Wuhan/Hu-1/2019 EPI_ISL_402125 WUHAN	22/22 (100%)	24/25 (96%)	23/23 (100%)	19/19 (100%)	23/23 (100%)	20/21 (95%)
hCoV-19/England/C210000873/2020 EPI_ISL_846588 B.1.1.7 ALPHA	22/22 (100%)	24/25 (96%)	23/23 (100%)	19/19 (100%)	23/23 (100%)	20/21 (95%)
hCoV-19/France/ARA-210015597301/2021 EPI_ISL_1406533 B.1.1.7-ALPHA	22/22 (100%)	24/25 (96%)	23/23 (100%)	19/19 (100%)	23/23 (100%)	20/21 (95%)
hCoV-19/South - EPI_ISL_660609 B.1.351 BETA	22/22 (100%)	25/25(100%)	23/23 (100%)	19/19 (100%)	23/23 (100%)	20/21 (95%)
hCoV-19/France/ARA-0001078/2021 EPI_ISL_1190781 B.1.1.351 BETA	22/22 (100%)	25/25(100%)	23/23 (100%)	19/19 (100%)	23/23 (100%)	20/21 (95%)
hCoV-19/Japan/IC-0562/2021 EPI_ISL_792681 Gamma GR/501Y.V3	22/22 (100%)	24/25 (96%)	23/23 (100%)	19/19 (100%)	23/23 (100%)	20/21 (95%)
hCoV-19/France/ARA-0011076/2021 EPI_ISL_925031 P1-GAMMA	22/22 (100%)	24/25 (96%)	23/23 (100%)	19/19 (100%)	23/23 (100%)	20/21 (95%)
hCoV-19/Switzerland/GE-32931080/2021 EPI_ISL_864699 C16 DELTA	22/22 (100%)	24/25 (96%)	23/23 (100%)	19/19 (100%)	23/23 (100%)	20/21 (95%)
hCoV-19/India/MH-ICMR-MCL_5715_5771/2020 EPI_ISL_3473623 B.1.617.2 DELTA	22/22 (100%)	24/25 (96%)	23/23 (100%)	19/19 (100%)	23/23 (100%)	20/21 (95%)
hCoV-19/France/ARA-CFD210044293601/2021 EPI_ISL_3432335 B.1.1.617.2 DELTA	22/22 (100%)	24/25 (96%)	23/23 (100%)	19/19 (100%)	23/23 (100%)	20/21 (95%)
hCoV-19/France/PAC-IHU-29249-Nova1M/2021 EPI_ISL_4393324 A.21 DELTA	22/22 (100%)	24/25 (96%)	23/23 (100%)	19/19 (100%)	23/23 (100%)	20/21 (95%)
hCoV-19/France/PAC-IHU-10104/2021 EPI_ISL_5032149 A.27 DELTA	22/22 (100%)	24/25 (96%)	23/23 (100%)	19/19 (100%)	23/23 (100%)	20/21 (95%)
hCoV-19/India/GJ-INSACOG-GBRC2187/2020 EPI_ISL_3717677 B.1.1.617.1 KAPPA	22/22 (100%)	24/25 (96%)	23/23 (100%)	19/19 (100%)	23/23 (100%)	20/21 (95%)
hCoV-19/France/ARA-HCL021224452901/2021 EPI_ISL_8121710 B.1.1.529 OMICRON	Aucune donnée de séquence			Aucune donnée de séquence		
hCoV-19/England/ALDP-2F86D33/2021 EPI_ISL_8166781 B.1.1.529 OMICRON	Aucune donnée de séquence			Aucune donnée de séquence		
hCoV-19/Germany/SH-ChVir26566_61/2021 EPI_ISL_8152515 B.1.1.529 OMICRON	22/22 (100%)	25/25(100%)	23/23 (100%)	19/19 (100%)	23/23 (100%)	20/21 (95%)
hCoV-19/Belgium/CHUNamur13894259/2021 EPI_ISL_8189646 B.1.1.529 OMICRON	22/22 (100%)	25/25(100%)	23/23 (100%)	19/19 (100%)	23/23 (100%)	20/21 (95%)
hCoV-19/France/ARA-CFD210070385801/2021 EPI_ISL_7780903 BA.1 OMICRON	22/22 (100%)	25/25(100%)	23/23 (100%)	19/19 (100%)	23/23 (100%)	20/21 (95%)
hCoV-19/England/ALDP-2F86D33/2021 EPI_ISL_8166781 B.1.1.529 OMICRON	22/22 (100%)	25/25(100%)	23/23 (100%)	Aucune donnée de séquence		
hCoV-19/Germany/SH-ChVir26566_61/2021 EPI_ISL_8152515 BA.1 GERMANY	22/22 (100%)	25/25(100%)	23/23 (100%)	19/19 (100%)	19/19 (100%)	19/19 (100%)
hCoV-19/USA/OH-CDC-STM-0000013-D09/2021 EPI_ISL_884777 B.1.1	22/22 (100%)	24/25 (96%)	23/23 (100%)	19/19 (100%)	19/19 (100%)	19/19 (100%)
hCoV-19/England/PHEC-U307UFCD/2021 EPI_ISL_3776866 A.23.1	22/22 (100%)	24/25 (96%)	23/23 (100%)	19/19 (100%)	19/19 (100%)	19/19 (100%)
hCoV-19/Scotland/GCVR-16FD61/2020 EPI_ISL_632246 A2.3	22/22 (100%)	24/25 (96%)	23/23 (100%)	19/19 (100%)	19/19 (100%)	19/19 (100%)
hCoV-19/France/ARA-210015587201/2021 EPI_ISL_1406608 Q.7	22/22 (100%)	24/25 (96%)	23/23 (100%)	19/19 (100%)	19/19 (100%)	19/19 (100%)
hCoV-19/Belgium/ULG-11353/2021 EPI_ISL_872085 B.1.221 CLADE G	22/22 (100%)	24/25 (96%)	23/23 (100%)	19/19 (100%)	19/19 (100%)	19/19 (100%)
hCoV-19/Australia/NSW1447/2021 EPI_ISL_812521 B.1.517.1	22/22 (100%)	24/25 (96%)	23/23 (100%)	19/19 (100%)	19/19 (100%)	19/19 (100%)
hCoV-19/England/QEUAH-1002AD0/2021 EPI_ISL_863493 B.1.177.54	22/22 (100%)	24/25 (96%)	23/23 (100%)	19/19 (100%)	19/19 (100%)	19/19 (100%)
hCoV-19/France/IDF_PSL_541/2020 EPI_ISL_1015028 B.1.1.1	22/22 (100%)	24/25 (96%)	23/23 (100%)	19/19 (100%)	19/19 (100%)	19/19 (100%)
hCoV-19/England/ALDP-1496C6E/2021 EPI_ISL_1486041 B.1.1.318	22/22 (100%)	24/25 (96%)	23/23 (100%)	19/19 (100%)	19/19 (100%)	19/19 (100%)

Tableau 8 (suite) : Evaluation *in silico* de l'inclusivité des couples d'amorces et sondes des gènes cibles N et ORF1ab du SARS-CoV-2, et des mutations cibles K417N, L452R et E484K.

Gènes	Mutation E484K		
	Sens	Antisens	Sonde
Amorces et sondes			
ID Variant (database GISAID)	Pourcentage d'identité (%)		
hCoV-19/Wuhan/Hu-1/2019 EPI_ISL_402125 WUHAN	17/17 (100%)	22/22 (100%)	14/15 (93%)
hCoV-19/England/C210000873/2020 EPI_ISL_846588 B.1.1.7 ALPHA	17/17 (100%)	22/22 (100%)	14/15 (93%)
hCoV-19/France/ARA-210015597301/2021 EPI_ISL_1406533 B.1.1.7-ALPHA	17/17 (100%)	22/22 (100%)	14/15 (93%)
hCoV-19/South - EPI_ISL_660609 B.1.351 BETA	17/17 (100%)	22/22 (100%)	15/15 (100%)
hCoV-19/France/ARA-0001078/2021 EPI_ISL_1190781 B.1.1.351 BETA	17/17 (100%)	22/22 (100%)	15/15 (100%)
hCoV-19/Japan/IC-0562/2021 EPI_ISL_792681 Gamma GR/501Y.V3	17/17 (100%)	22/22 (100%)	15/15 (100%)
hCoV-19/France/ARA-0011076/2021 EPI_ISL_925031 P1-GAMMA	17/17 (100%)	22/22 (100%)	15/15 (100%)
hCoV-19/Switzerland/GE-32931080/2021 EPI_ISL_864699 C16 DELTA	17/17 (100%)	22/22 (100%)	14/15 (93%)
hCoV-19/India/MH-ICMR-MCL_5715_5771/2020 EPI_ISL_3473623 B.1.617.2 DELTA	15/17 (88%)	22/22 (100%)	14/15 (93%)
hCoV-19/France/ARA-CFD210044293601/2021 EPI_ISL_3432335 B.1.1.617.2 DELTA	15/17 (88%)	22/22 (100%)	14/15 (93%)
hCoV-19/France/PAC-IHU-29249-Nova1M/2021 EPI_ISL_4393324 A.21 DELTA	17/17 (100%)	22/22 (100%)	14/15 (93%)
hCoV-19/France/PAC-IHU-10104/2021 EPI_ISL_5032149 A.27 DELTA	17/17 (100%)	22/22 (100%)	14/15 (93%)
hCoV-19/India/GJ-INSACOG-GBRC2187/2020 EPI_ISL_3717677 B.1.1.617.1 KAPPA	17/17 (100%)	22/22 (100%)	14/15 (93%)
hCoV-19/France/ARA-HCL021224452901/2021 EPI_ISL_8121710 B.1.1.529OMICRON	15/17 (88%)	20/22 (91%)	13/15 (87%)
hCoV-19/England/ALDP-2F86D33/2021 EPI_ISL_8166781 B.1.1.529OMICRON	15/17 (88%)	20/22 (91%)	13/15 (87%)
hCoV-19/Germany/SH-ChVir26566_61/2021 EPI_ISL_8152515 B.1.1.529OMICRON	15/17 (88%)	20/22 (91%)	13/15 (87%)
hCoV-19/Belgium/CHUNamur13894259/2021 EPI_ISL_8189646 B.1.1.529OMICRON	15/17 (88%)	20/22 (91%)	13/15 (87%)
hCoV-19/France/ARA-CFD210070385801/2021 EPI_ISL_7780903 BA.1OMICRON	15/17 (88%)	20/22 (91%)	13/15 (87%)
hCoV-19/England/ALDP-2F86D33/2021 EPI_ISL_8166781 B.1.1.529OMICRON	15/17 (88%)	20/22 (91%)	13/15 (87%)
hCoV-19/Germany/SH-ChVir26566_61/2021 EPI_ISL_8152515 BA.1GERMANY	15/17 (88%)	20/22 (91%)	13/15 (87%)
hCoV-19/USA/OH-CDC-STM-0000013-D09/2021 EPI_ISL_884777 B.1.1	17/17 (100%)	22/22 (100%)	14/15 (93%)
hCoV-19/England/PHEC-U307UFCD/2021 EPI_ISL_3776866 A.23.1	17/17 (100%)	22/22 (100%)	14/15 (93%)
hCoV-19/Scotland/GCVR-16FD61/2020 EPI_ISL_632246 A2.3	17/17 (100%)	22/22 (100%)	14/15 (93%)
hCoV-19/France/ARA-210015587201/2021 EPI_ISL_1406608 Q.7	17/17 (100%)	22/22 (100%)	14/15 (93%)
hCoV-19/Belgium/ULG-11353/2021 EPI_ISL_872085 B.1.221CLADE G	17/17 (100%)	22/22 (100%)	14/15 (93%)
hCoV-19/Australia/NSW1447/2021 EPI_ISL_812521 B.1.517.1	17/17 (100%)	22/22 (100%)	14/15 (93%)
hCoV-19/England/QEUH-1002AD0/2021 EPI_ISL_863493 B.1.177.54	17/17 (100%)	22/22 (100%)	14/15 (93%)
hCoV-19/France/IDF_PSL_541/2020 EPI_ISL_1015028 B.1.1.1	17/17 (100%)	22/22 (100%)	14/15 (93%)
hCoV-19/England/ALDP-1496C6E/2021 EPI_ISL_1486041 B.1.1.318	17/17 (100%)	22/22 (100%)	15/15 (100%)

X.1.2. Exclusivité – Réactions croisées *in silico*

La spécificité des amorces et sondes de *RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT* (Appolon Biotech, KSCV96AB69) est testée sur un panel de séquences génomiques de 48 souches (bactériennes, virales et fongiques). Ces séquences génomiques ont été obtenues depuis la base de données Genbank du NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) et analysées à l'aide du logiciel *Geneious Prime 2022*. Les résultats de ces analyses sont présentés **Tableau 9** (oligonucléotides pour gènes conservés ORF1ab et N) et **Tableau 10** (oligonucléotides pour mutations K417N, L452R et E484K) sur les pages suivantes.

En résumé, en dehors d'autres coronavirus, aucun autre organisme étudié ne présente de risque d'éventuelle amplification *in silico* dans les conditions d'utilisation de *RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT* (Appolon Biotech, KSCV96AB69).

Tableau 9 : Evaluation *in silico* de réactions croisées potentielles des couples d'amorces et sondes des gènes cibles ORF1ab et N du SARS-CoV-2.

Organisme (génom)	Gène Cible N			Gène Cible ORF1ab		
	Sens	Antisens	Sonde	Sens	Antisens	Sonde
SARS coronavirus BJ01 (AY278488)	19/21 (90%)	14/19 (74%)	27/28 (96%)	20/22 (91%)	20/22 (91%)	18/24 (75%)
SARS coronavirus ZJ01 (AY297028.1)	19/21 (90%)	14/19 (74%)	27/28 (96%)	20/22 (91%)	20/22 (91%)	18/24 (75%)
SARS coronavirus TW1 (AY291451.1)	19/21 (90%)	14/19 (74%)	27/28 (96%)	20/22 (91%)	20/22 (91%)	18/24 (75%)
SARS coronavirus CUHK-L2 (AH013657.2)	19/21 (90%)	14/19 (74%)	27/28 (96%)	20/22 (91%)	20/22 (91%)	18/24 (75%)
SARS coronavirus Urbani (AY278741.1)	19/21 (90%)	14/19 (74%)	27/28 (96%)	20/22 (91%)	20/22 (91%)	18/24 (75%)
SARS coronavirus HKU-39849 (AY278491.2)	19/21 (90%)	14/19 (74%)	27/28 (96%)	20/22 (91%)	20/22 (91%)	18/24 (75%)
SARS coronavirus Tor2 (NC_004718.3)	19/21 (90%)	14/19 (74%)	27/28 (96%)	20/22 (91%)	20/22 (91%)	18/24 (75%)
Human coronavirus OC43 (taxid :31631)	11/21 (43%)	(0%)	(0%)	11/22 (50%)	(0%)	(0%)
Human coronavirus NL63 (taxid :277944)	9/21 (42%)	(0%)	16/28 (57%)	13/22 (59%)	(0%)	(0%)
Human coronavirus 229E (taxid :11137)	12/21 (57%)	(0%)	16/28 (57%)	(0%)	(0%)	(0%)
Human coronavirus HKU1 (taxid :290028)	9/21 (42%)	(0%)	16/28 (57%)	(0%)	(0%)	(0%)
MERS-CoV (taxid :1335626)	13/21 (62%)	10/19 (53%)	16/28 (57%)	11/22 (50%)	(0%)	12/24 (50%)
H1N1 subtype (taxid :114727)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
H3N2 subtype (taxid :119210)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Influenza B virus (taxid :11520)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Influenza C virus (taxid :11552)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
RSV (taxid :12331)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
HBoV4-NI (taxid :1511883)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
HPIV1 (taxid :12730)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
HPIV2 (taxid :1979160)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
HPIV3 (taxid :11216)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
HPIV4 (taxid :1979161)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
HMPV (taxid :162145)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Human enterovirus (taxid :1193974)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Human adenovirus sp. (taxid :1907210)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Human adenovirus 71 (taxid :1643649)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Human metapneumovirus (taxid :162145)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Human respirovirus 1 (taxid :12730)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Human respirovirus 3 (taxid :11216)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Human rubulavirus 2 (taxid :1979160)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Human rubulavirus 4 (taxid :1979161)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Rhinovirus (taxid :12059)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
<i>Chlamydia pneumoniae</i> (taxid :83558)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
<i>Haemophilus influenzae</i> (taxid :727)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (taxid :1313)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
<i>Streptococcus pyogenes</i> (taxid :1314)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
<i>Bordetella pertussis</i> (taxid :520)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (taxid :2104)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (taxid :42068)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
<i>Candida albicans</i> (ASM225980v1)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NC_002516)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (AR886665)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
<i>Streptococcus salivarius</i> (GQ857551)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)

Tableau 10 : Evaluation *in silico* de réactions croisées potentielles des couples d'amorces et sondes des mutations cibles K417N, L452R et E484K.

Organisme (génomé)	Mutation K417N			Mutation L452R			Mutation E484K		
	Sens	Antisens	Sonde	Sens	Antisens	Sonde	Sens	Antisens	Sonde
SARS coronavirus BJ01 (AY278488)	28/30 (93%)	(0%)	28/30 (93%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
SARS coronavirus ZJ01 (AY297028.1)	28/30 (93%)	(0%)	28/30 (93%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
SARS coronavirus TW1 (AY291451.1)	28/30 (93%)	(0%)	28/30 (93%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
SARS coronavirus CUHK-L2 (AH013657.2)	28/30 (93%)	(0%)	28/30 (93%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
SARS coronavirus Urbani (AY278741.1)	28/30 (93%)	(0%)	28/30 (93%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
SARS coronavirus HKU-39849 (AY278491.2)	28/30 (93%)	(0%)	28/30 (93%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
SARS coronavirus Tor2 (NC_004718.3)	28/30 (93%)	(0%)	28/30 (93%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Human coronavirus OC43 (taxid :31631)	14/30 (46%)	11/23 (43%)	14/30 (46%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Human coronavirus NL63 (taxid :277944)	12/30 (40%)	11/23 (43%)	12/30 (40%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Human coronavirus 229E (taxid :11137)	11/30 (36%)	11/23 (43%)	11/30 (36%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Human coronavirus HKU1 (taxid :290028)	11/30 (36%)	11/23 (43%)	11/30 (36%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
MERS-CoV (taxid :1335626)	11/30 (36%)	(0%)	11/30 (36%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
H1N1 subtype (taxid :114727)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
H3N2 subtype (taxid :119210)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Influenza B virus (taxid :11520)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Influenza C virus (taxid :11552)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
RSV (taxid :12331)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
HBoV4-NI (taxid :1511883)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
HPIV1 (taxid :12730)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
HPIV2 (taxid :1979160)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
HPIV3 (taxid :11216)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
HPIV4 (taxid :1979161)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
HMPV (taxid :162145)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Human enterovirus (taxid :1193974)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Human adenovirus sp. (taxid :1907210)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Human adenovirus 71 (taxid :1643649)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Human metapneumovirus (taxid :162145)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Human respirovirus 1 (taxid :12730)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Human respirovirus 3 (taxid :11216)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Human rubulavirus 2 (taxid :1979160)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Human rubulavirus 4 (taxid :1979161)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Rhinovirus (taxid :12059)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
<i>Chlamydia pneumoniae</i> (taxid :83558)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
<i>Haemophilus influenzae</i> (taxid :727)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (taxid :1313)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
<i>Streptococcus pyogenes</i> (taxid :1314)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
<i>Bordetella pertussis</i> (taxid :520)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (taxid :2104)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (taxid :42068)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
<i>Candida albicans</i> (ASM225980v1)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NC_002516)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (AR886665)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
<i>Streptococcus salivarius</i> (GQ857551)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)

X.1.3. Spécificité diagnostique

Une analyse d'exclusivité et de réaction croisée des amorces et des sondes utilisées dans la trousse est réalisée par RT-qPCR (Appolon Biotech, KSCV96AB69) sur un panel de souches virales, bactériennes et fongiques en 3 répliquas par panel testé (**Tableau 11**).

Tableau 11 : Résultats RT-qPCR des tests d'exclusivité/réaction croisée avec les amorces et les sondes utilisées (ND : Non détecté).

Organisme	Source	Concentration cp/ml	Gène ORF1ab/N	Mutation K417N	Mutation L452R	Mutation E484K
Human coronavirus 229E	Vircell Amplirun total respiratory viral panel (MBTC020)	29000	ND	ND	ND	ND
Adenovirus 4		50000	ND	ND	ND	ND
Influenza A H3N2		29000	ND	ND	ND	ND
Novel Influenza virus A H1N1		41000	ND	ND	ND	ND
Influenza B virus		27000	ND	ND	ND	ND
Parainfluenza 1		50000	ND	ND	ND	ND
Parainfluenza 2		33000	ND	ND	ND	ND
Parainfluenza 3		42000	ND	ND	ND	ND
RSV A		29000	ND	ND	ND	ND
RSV B		38000	ND	ND	ND	ND
<i>Bordetella pertussis</i>	Amplirun total stypical bacterial pneumonia control (MBTC022-R)	37000	ND	ND	ND	ND
<i>Chlamydomphila psittaci</i>		20000	ND	ND	ND	ND
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>		40000	ND	ND	ND	ND
<i>Coxiella burnetii</i>		35000	ND	ND	ND	ND
<i>Legionella pneumophila</i>		33000	ND	ND	ND	ND
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		35000	ND	ND	ND	ND
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MBTC013	50000	ND	ND	ND	ND
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	DSMZ 20566	1,6x10 ⁹	ND	ND	ND	ND
<i>Streptococcus pyogenes</i>	DSMZ 20565	6,2x10 ⁸	ND	ND	ND	ND
<i>Candida albicans</i>	DSMZ 3454	Inconnue	ND	ND	ND	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSMZ 22644	1,4x10 ⁸	ND	ND	ND	ND
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	DSMZ 20044	3,9x10 ⁸	ND	ND	ND	ND

Aucune réaction croisée avec des séquences de pathogènes autres que celles recherchées par le RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT (Appolon Bioteck, KSCV96AB69).

X.2. Sensibilité analytique

La concentration la plus faible détectée à un intervalle de confiance de 95% est considérée comme la limite de détection (LoD) du *RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT* (Appolon Bioteck, KSCV96AB69). La limite de détection est estimée sur 4 répliques (dilutions allant de 10⁵ à 10² copies des différents variants du SARS-CoV-2 inactivés et quantifiés, dilués dans des échantillons de patients connus négatifs pour la Covid-19). Ces essais sont effectués, pour chacune des cibles recherchées, sur les matrices suivantes :

- Prélèvements nasopharyngés, et
 - o Extraction nucléique par billes magnétiques (Genolution, NX-48S Viral NA kit), ou
 - o Extraction des ARN par lyse chimique en milieu MTL (Appolon Bioteck, MTL02-AB69)
- Prélèvements salivaires, et
 - o Extraction nucléique par billes magnétiques (Genolution NX-48S Viral NA kit), ou
 - o Extraction des ARN par lyse chimique en milieu MTL (Appolon Bioteck, MTL02-AB69)

Les limites de détection selon la nature de l'échantillon et le type d'extraction sont résumées dans le **tableau 12**.

Tableau 12 : LoD de RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT (Appolon Bioteck, KSCV96AB69) selon la nature du prélèvement et le type d'extraction.

Nature du prélèvement	Type d'extraction	Cible	LoD (Nb copies / réaction)
Nasopharyngé	Extraction nucléique par billes magnétiques	ORF1ab / N	100
		K417N	100
		L452R	100
		E484K	100
	Extraction par lyse chimique	ORF1ab / N	100
		K417N	100
		L452R	100
		E484K	100
Salivaire	Extraction nucléique par billes magnétiques	ORF1ab / N	100
		K417N	100
		L452R	100
		E484K	100
	Extraction par lyse chimique	ORF1ab / N	100
		K417N	100
		L452R	100
		E484K	100

XI. Performances cliniques

Les performances cliniques du RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT d'Appolon Bioteck (KSCV96AB69) ont été établies sur des échantillons patients caractérisés par des laboratoires français d'analyse médicale avec un kit RT-PCR SARS-CoV-2 marqué CE autre que celui d'Appolon Bioteck.

XI.1. Performances cliniques sur les prélèvements nasopharyngés

L'évaluation clinique de la trousse diagnostique *RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT* (Appolon Bioteck, KSCV96AB69) est réalisée sur des échantillons nasopharyngés avec extraction des acides nucléiques par billes magnétiques (Genolution NX-48SViral NA kit) et par lyse chimique (MTL ; Appolon Bioteck, MTL02-AB69) de patients testés dans deux laboratoires français.

L'étude s'est portée sur **117** prélèvements nasopharyngés **positifs** et **92 négatifs** pour le SARS-CoV-2 et ses variants Omicron (K417N) et Delta (L452R) avec extraction par billes magnétiques, et sur **117 positifs** et **92 négatifs** pour le SARS-CoV-2 et ses variants Omicron (K417N) et Delta (L452R) pour les échantillons traités par lyse chimique. Les échantillons cliniques obtenus sont testés pour générer les valeurs prédictives positive (VPP) et négative (VPN), la sensibilité et la spécificité du *RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT* (Appolon Bioteck, KSCV96AB69).

La synthèse des résultats de performance clinique sur les prélèvements nasopharyngés est indiquée dans le **tableau 13**.

Tableau 13 : Synthèse des résultats des performances cliniques de RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT (Appolon Biotech, KSCV96AB69) sur prélèvements nasopharyngés.

	Statistique	Valeur	95% IC
Extraction des acides nucléiques	Sensibilité n=117	100%	96.90% à 100%
	Spécificité n=92	100%	96.07% à 100%
	Valeur prédictive positives (VPP)	100%	
	Valeur prédictive négative (VPN)	100%	
	Précision	100%	98.25% à 100%
Lyse chimique	Sensibilité n=117	100%	96.90% à 100%
	Spécificité n=92	100%	96.07% à 100%
	Valeur prédictive positive (VPP)	100%	
	Valeur prédictive négative (VPN)	100%	
	Précision	100%	98.25% à 100%

XI.2. Performances cliniques sur les prélèvements salivaires

L'évaluation clinique de la trousse diagnostique *RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT* (Appolon Biotech, KSCV96AB69) est réalisée sur des échantillons salivaires avec extraction des acides nucléiques par billes magnétiques (Genolution NX-48SViral NA kit) et par lyse chimique (MTL ; Appolon Biotech, MTL02-AB69) de patients testés dans deux laboratoires français.

L'étude s'est portée sur **100** prélèvements salivaires **positifs** et **91 négatifs** pour le SARS-CoV-2 et ses variants Omicron (K417N) et Delta (L452R) pour les échantillons salivaires avec extraction par billes magnétiques, et sur **100** prélèvements salivaires **positifs** et **91 négatifs** pour le SARS-CoV-2 et ses variants Omicron (K417N) et Delta (L452R) pour les échantillons traités par lyse chimique.

Les échantillons cliniques obtenus ont été testés pour générer les valeurs prédictives positive (VPP) et négative (VPN), la sensibilité et la spécificité de *RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT* (Appolon Biotech, KSCV96AB69), par comparaison avec des prélèvements nasopharyngés concomitants.

La synthèse des résultats de performance clinique sur les prélèvements salivaires est indiquée dans le **tableau 14**.

Tableau 14 : Synthèse des résultats des performances cliniques de RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT (Appolon Biotech, KSCV96AB69) sur prélèvements salivaires.

	Statistique	Valeur	95% IC
Extraction des acides nucléiques	Sensibilité n=100	100%	96.38% à 100%
	Spécificité n=91	100%	96.03% à 100%
	Valeur prédictive positive (VPP)	100%	
	Valeur prédictive négative (VPN)	100%	
	Précision	100%	98.09% à 100%
Lyse chimique	Sensibilité n=100	100%	96.38% à 100%
	Spécificité n=91	100%	96.03% à 100%
	Valeur prédictive positive (VPP)	100%	
	Valeur prédictive négative (VPN)	100%	
	Précision	100%	98.09% à 100%

XI.3. Performances cliniques sur les prélèvements séquencés

Les performances cliniques ont été évaluées sur des prélèvements dont les cibles du génome SARS-CoV-2 sont séquencées. Ces prélèvements correspondent uniquement à des prélèvements nasopharyngés (impossibilité d'obtenir des prélèvements salivaires séquencés).

Les résultats sont donnés dans le **tableau 15** pour des échantillons nasopharyngés avec extraction des acides nucléiques respectivement par billes magnétiques (Genolution NX-48SViral NA kit) et par lyse chimique (MTL ; Appolon Bioteck, MTL02-AB69).

Tableau 15 : Résultats de l'étude clinique de RT-qPCR SARS-CoV-2 DETECTION AND VARIANTS TYPING KIT (Appolon Bioteck, KSCV96AB69) sur prélèvements nasopharyngés séquencés, avec extraction nucléique par billes magnétiques et par lyse chimique.

Échantillon ID	Référence échantillons testés	Type d'échantillon (résultat séquençage)	Résultat APPOLON Bioteck	Résultat laboratoire de référence
IC-200	A06003631393	21J Delta	Positif L452R	Concordance
IC-201	c17gn0050295	21J Delta	Positif L452R	Concordance
IC-203	f06000031521	21J Delta	Positif L452R	Concordance
IC-204	M79gn0040172	21J Delta	Positif L452R	Concordance
IC-205	c17gn0060489	21J Delta	Positif L452R	Concordance
IC-206	19290050477	21J Delta	Positif L452R	Concordance
IC-207	f12000034098	21J Delta	Positif L452R	Concordance
IC-208	c17gn0050127	21J Delta	Positif L452R	Concordance
IC-210	l52gn0101982	21J Delta	Positif L452R	Concordance
IC-211	14290031309	21J Delta	Positif L452R	Concordance
IC-212	A16gn0040044	21K (Omicron)	Positif K417N	Concordance
IC-213	f10000039722	21K (Omicron)	Positif K417N	Concordance
IC-214	l58gn0100158	21K (Omicron)	Positif K417N	Concordance
IC-215	l49gn0101203	21K (Omicron)	Positif K417N	Concordance
IC-216	l49gn0101250	21K (Omicron)	Positif K417N	Concordance
IC-217	l52gn0072606	21K (Omicron)	Positif K417N	Concordance
IC-219	l58gn0100266	21K (Omicron)	Positif K417N	Concordance
IC-220	l73gn0101397	21L (Omicron)	Positif K417N	Concordance
IC-222	l72gn0101141	21K (Omicron)	Positif K417N	Concordance
IC-223	56290100391	21K (Omicron)	Positif K417N	Concordance

XII. Résolution des problèmes

XII.1. Problèmes d'amplification

Causes possibles	Solutions
Altération du mix d'amplification	<ul style="list-style-type: none"> • Eviter les cycles de congélation / décongélation. • Vérifier que le mix d'amplification a été recongelé à -20°C immédiatement après usage. • Utiliser un bloc froid (+4°C) lors de la distribution du master mix PCR et des échantillons. • Les enzymes RT et Taq polymérase sont sensibles aux variations de température. Ne pas laisser à température ambiante. • Vérifier les dates de péremption du lot utilisé.
Non-respect des conditions de prélèvement, transport et conservation de l'échantillon	<ul style="list-style-type: none"> • Suivre les instructions concernant la préparation, le transport et la conservation des échantillons. • Vérifier le délai entre le recueil de l'échantillon et son analyse par RT-PCR.
Problème pendant l'extraction des acides nucléiques	<ul style="list-style-type: none"> • Vérifier que les échantillons sont homogénéisés avant prélèvement pour l'étape d'extraction. • Vérifier le protocole et le matériel utilisé pour réaliser l'extraction des échantillons. • Toujours réaliser une maintenance préventive des automates d'extraction suivant les recommandations du constructeur.
Erreur de distribution des réactifs ou de l'échantillon	<ul style="list-style-type: none"> • Réaliser un plan de plaque pour sécuriser les transferts. • Vérifier la calibration des pipettes, qui doivent faire l'objet d'un contrôle métrologique régulier. • S'assurer que la solution d'amplification, les témoins et les échantillons sont bien homogénéisés avant leur distribution dans les puits de plaque de PCR.
Erreur de programmation du thermocycleur	<ul style="list-style-type: none"> • Vérifier tous les paramètres de programmation du thermocycleur (canal et mode de détection, nombre de cycles, température, temps, volume réactionnel, ...).
Problème d'amplification	<ul style="list-style-type: none"> • Vérifier les performances du bloc Peltier suivant les recommandations du fabricant. • Effectuer une maintenance préventive sur les appareils de PCR en temps réel suivant les recommandations du fabricant. • Vérifier que la plaque PCR est bien scellée avec le film optique. • Vérifier que le consommable plastique utilisé est bien celui recommandé pour l'instrument utilisé (plaque demi-jupe, tubes/ plaque low profile, ...).
Erreur d'analyse des résultats	<ul style="list-style-type: none"> • Vérifier l'ajustement de la ligne de seuil (threshold). • Analyser les courbes d'amplification pour chaque cible et pour chaque patient. • Vérifier l'intensité de fluorescence des courbes d'amplification.
Erreur d'interprétation des résultats	<ul style="list-style-type: none"> • Vérifier que les critères de validation du run sont atteints comme indiqué dans le manuel. • Vérifier que le thermocycleur utilisé est compatible et fait partie des thermocycleurs validés avec le kit. • Comparer les résultats du contrôle d'extraction de l'échantillon avec ceux du témoin négatif d'extraction. Diluer l'échantillon si nécessaire.













XII.2. Problèmes de contamination

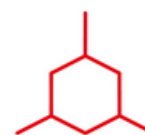
Causes possibles	Solutions
Contamination durant l'expérimentation	<ul style="list-style-type: none"> Décontaminer tout le petit matériel de laboratoire à l'aide de produits adaptés à l'élimination d'acides nucléiques. Changer les produits utilisés (eau, réactif de PCR...)
Erreur de distribution des réactifs ou de l'échantillon	<ul style="list-style-type: none"> Réaliser un plan de plaque pour sécuriser les transferts. Vérifier la calibration des pipettes, qui doivent faire l'objet d'un contrôle métrologique régulier. S'assurer que les mix d'amplification, les témoins et les échantillons sont bien homogénéisés avant le dispatch dans les micro-tubes d'amplification.
Erreur d'analyse des résultats	<ul style="list-style-type: none"> Vérifier l'ajustement de la ligne de seuil (threshold).

XII.3. Echantillons inhibés

Causes possibles	Solutions
Problème durant l'extraction	<ul style="list-style-type: none"> Vérifier que les échantillons sont bien homogénéisés avant le prélèvement pour l'extraction des acides nucléiques. Contrôler le matériel et les solutions utilisées pour l'extraction. Refaire l'extraction. Toujours effectuer une maintenance préventive sur les automates d'extraction conformément aux recommandations du fabricant.

XIII. Symboles et logos utilisés

	Utilisation <i>in vitro</i> seulement		Ne pas réutiliser
	Date d'expiration		Lire les instructions avant utilisation
	Danger, se référer aux instructions annexes		Craint l'humidité
	Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé		A conservé à l'abri de la lumière
	Date de fabrication		Numéro de lot
	Fabricant		Le produit respecte les exigences européennes



APPOLON
BIOTECK



205 rue des frères Lumière
69970 CHAPONNAY
FRANCE
+33 (0)4 37 57 00 54
contact@appolonbiotech.com
www.appolonbiotech.fr