



## EurobioPlex

### *SARS-CoV-2 SNPs*

## RT-PCR EN TEMPS REEL

Pour la RT-PCR **qualitative** en temps réel

**REF**

**EBX-046**

**EBX-046-48**

**EBX-046-192**



**48/96/192 réactions**



Référence EBX-046 Version 5.00 – Juillet 2021

### **Validé sur :**

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) avec analyse sur CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)



Fiche technique

Disponible sur [www.eurobio-scientific.com](http://www.eurobio-scientific.com)

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

---

## Table des matières

\_Toc72918236

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Informations générales .....                                                                                       | 3  |
| 2. Destination du diapositif .....                                                                                    | 4  |
| 3. Symboles .....                                                                                                     | 5  |
| 4. Principe .....                                                                                                     | 6  |
| 5. Composants du kit .....                                                                                            | 7  |
| 6. Conservation et stockage .....                                                                                     | 8  |
| 7. Matériel requis non fournis .....                                                                                  | 8  |
| 8. Instrument de PCR en temps réel .....                                                                              | 8  |
| 9. Mises en garde et précautions .....                                                                                | 9  |
| 10. Protocole .....                                                                                                   | 10 |
| 11. Validation de l'expérimentation .....                                                                             | 14 |
| 12. Analyse des données et interprétation .....                                                                       | 17 |
| 13. Analyse des performances .....                                                                                    | 18 |
| 14. Analyse comparative des performances diagnostiques du kit EBX-046 <i>versus</i> kit commercial de référence ..... | 26 |
| 15. Bibliographie .....                                                                                               | 26 |
| 16. Contrôle qualité .....                                                                                            | 26 |
| 17. Elimination des déchets .....                                                                                     | 27 |
| 18. Déclaration d'incident .....                                                                                      | 27 |
| 19. Assistance technique .....                                                                                        | 27 |

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

---

## 1. Informations générales

Le virus SARS-CoV-2 est apparu fin 2019 dans la ville de Wuhan en Chine. Il appartient à la famille des *Coronaviridae* et au sous-genre *Sarbecovirus*. Son génome est constitué de 29903 bases d'acide ribonucléique (ARN). Le SARS-CoV-2 est le 7<sup>ème</sup> coronavirus identifié infectant l'humain, après les coronavirus humains (HCoV), les SARS-CoV (coronavirus causant un syndrome respiratoire aigu sévère) et les MERS-CoV (coronavirus induisant le syndrome respiratoire au Moyen-Orient).

Les séquences du SARS-CoV-2 présentent des similitudes avec celles des betacoronavirus trouvés chez les chauves-souris. Le virus SARS-CoV-2 est génétiquement distinct des autres coronavirus humains.

Le tableau clinique est variable, allant des symptômes d'un rhume, fièvre, toux, difficultés à respirer à une pneumonie, jusqu'à un syndrome respiratoire sévère qui peut être fatal. Le taux de létalité du virus est évalué entre 2 % et 3 %. Le SARS-CoV-2 est hautement contagieux avec environ 173 millions de cas recensés dans le monde début juin 2021.

Plusieurs variants et mutations du SARS-CoV-2 ont aujourd'hui un impact démontré sur la santé publique (augmentation de la transmissibilité, de la gravité de l'infection ou encore échappement immunitaire). Ils ont émergé fin 2020 dans des zones géographiques distinctes, et sont désignés comme des variants préoccupants (« *variants of concern* », ou VOC) :

- Variant nommé Alpha apparu au Royaume-Uni (UK) : lignage B.1.1.7 portant notamment la mutation N501Y.
- Variant nommé Beta apparu en Afrique du Sud (SA) : lignage B.1.351 portant notamment la mutation E484K.
- Variant nommé Gamma apparu au Brésil (BR) : lignage P.1 portant notamment la mutation E484K.
- Variant nommé Delta apparu en Inde : lignage B.1.617.2 portant notamment la mutation L452R
- Variant nommé Kappa apparu en Inde : lignage B.1.617.1 portant notamment les mutations L452R et E484Q.
- La mutation L452R se retrouve également dans d'autres lignages dont A.27 dont le foyer d'apparition est encore incertain et C.36 détecté en Egypte. Une variante L452Q appartenant au lignage C.37 a également été détectée au Pérou.

En Mai 2021, 80% des cas de Covid-19 ont été rapportés sur le variant UK B.1.1.7. Ce variant est reconnu et les vaccins actuellement sur le marché permettent de s'en protéger. Les autres cas recensés ont été rapportés aux autres variants circulant. L'intérêt du diagnostic des différents variants de la Covid-19 est donc de s'intéresser aux récentes mutations E484K, E484Q et L452R sur lesquelles les vaccins actuellement disponibles ne pourraient n'avoir que peu ou pas d'effet, puisque ce sont des mutations responsables de l'échappement immunitaire. La nouvelle stratégie d'identification des variants vise à identifier prioritairement les mutations d'échappement immunitaire, et non plus à distinguer les variants. Cette

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

---

stratégie permettra de prendre en charge plus rapidement les patients présentant des variants avec ce type de mutations.

Le kit EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs a été conçu par alignement *in silico* de toutes les séquences de SARS-CoV-2 connues à ce jour.

## 2. Destination du dispositif

Le test EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs est un test d'amplification de réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR) en temps réel qui, en un seul test, permet d'identifier la présence du SARS-CoV-2 et de distinguer les mutations E484K, E484Q et L452R de façon qualitative.

L'extrait d'ARN est le matériel de départ pour le kit EurobioPlex SARS-CoV-2. Il revient à l'utilisateur d'utiliser des méthodes d'extraction adaptées aux prélèvements testés. Le kit a été validé sur prélèvements nasopharyngés.

Le kit EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs est un dispositif médical de diagnostic *in vitro* exclusivement destiné à l'utilisation pour la détection du SARS-CoV-2 et des mutations d'intérêt. Il est utilisé à des fins de diagnostic de première intention.

Le test EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs doit être utilisé par du personnel de laboratoire d'analyse de biologie médicale qualifié. Il est à usage unique, il ne doit pas être recyclé après utilisation.

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

---

## 3. Symboles



Référence



Numéro de lot



Limite supérieure de température de conservation



Date d'expiration



Contenu suffisant pour « N » réactions



Fabricant



Produit marqué CE



Dispositif Médical de Diagnostic *in vitro*



Mode d'emploi



Usage unique



Attention

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

## 4. Principe

Le kit EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs est un test d'amplification qualitatif de l'acide ribonucléique (ARN) permettant d'analyser :

- La présence de deux cibles (RdRp1/RdRp2) de SARS-CoV-2 sur le gène RdRp, dans un même canal de lecture.
- La présence des mutations E484K, E484Q et L452R et leur distinction dans trois canaux de détection différents.
- La présence d'un gène de ménage humain servant de contrôle pour la qualité du prélèvement, pour l'extraction d'ARN et l'inhibition de RT-PCR. Ce dernier permet de déterminer de possibles variations pouvant se produire au cours des étapes d'extraction d'ARN d'échantillons biologiques et d'amplification par RT-PCR en temps réel. Il permet ainsi de s'assurer qu'un résultat négatif ne peut être dû à une mauvaise extraction d'ARN et/ou à la présence d'inhibiteurs de RT-PCR en trop grande quantité.

L'extrait d'ARN est le matériel de départ pour le kit EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs. L'ARN est extrait à partir d'un prélèvement nasopharyngé de patient.

L'ARN de SARS-CoV-2 est détecté à l'aide de sondes spécifiques pour chaque mutation ou gène marquées en FAM, HEX, Texas Red, Quasar 705. Le contrôle interne endogène est détecté à l'aide d'une sonde marquée par Cy5 (Tableau 1). Au cours de l'élongation du produit d'amplification, les sondes émettent une fluorescence spécifique suite à leur hydrolyse. La mesure de l'intensité de fluorescence en temps réel, émise et mesurée de façon individuelle par un système optique au cours de la PCR, est relative à l'accumulation des produits d'amplification.

**Tableau 1 : Détection des cibles selon les fluorophores**

| Cibles                    | Fluorophore | Excitation | Emission |
|---------------------------|-------------|------------|----------|
| E484K                     | FAM         | 495 nm     | 515 nm   |
| E484Q                     | HEX         | 535 nm     | 555 nm   |
| RdRp1/RdRp2               | Texas Red   | 585 nm     | 605 nm   |
| Contrôle interne endogène | Cy5         | 650 nm     | 670 nm   |
| L452R                     | Quasar 705  | 683 nm     | 703 nm   |

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

## Canaux équivalents recommandés sur différents instruments de PCR :

- Canal **FAM** (CFX96, QuantStudio 5, QuantStudio 6), Canal Vert (Rotor-Gene Q),
- Canal **HEX** (CFX96), Canal VIC (QuantStudio 5, QuantStudio 6), Canal Jaune (Rotor-Gene Q),
- Canal **Texas Red** (CFX96, QuantStudio 6), Canal Orange (Rotor-Gene Q), Canal Rox (QuantStudio 5),
- Canal **Cy5** (CFX96, QuantStudio 5, QuantStudio 6), Canal Rouge (Rotor-Gene Q),
- Canal **Quasar 705** (CFX96, QuantStudio 5, QuantStudio 6), Canal Pourpre (Rotor-Gene Q).

## 5. Composants du kit

Le kit de RT-PCR en temps réel Eurobioplex SARS-CoV-2 SNPs est prêt à l'emploi et contient les réactifs et les enzymes nécessaires pour la détection de ce virus (Tableau 2).

La fluorescence est émise et mesurée de façon individuelle par un système optique au cours de la PCR. La détection des fragments amplifiés est réalisée par un fluorimètre en utilisant les canaux indiqués dans le Tableau 1.

**Tableau 2 : Composants du kit**

| Couleur de Bouchon | Contenu du kit                  | 48 réactions | 96 réactions | 192 réactions | Reconstitution  |
|--------------------|---------------------------------|--------------|--------------|---------------|-----------------|
| <b>Rouge</b>       | Enzyme Taq polymerase           | 650 µL       | 1500 µL      | 2 X 1250 µL   | Prêt à l'emploi |
| <b>Marron</b>      | Enzyme Reverse transcriptase    | 15 µL        | 30 µL        | 40 µL         | Prêt à l'emploi |
| <b>Transparent</b> | Oligomix                        | 260 µL       | 600 µL       | 1000 µL       | Prêt à l'emploi |
| <b>Jaune</b>       | Contrôle Positif (CP)           | 80 µL        | 160 µL       | 320 µL        | Prêt à l'emploi |
| <b>Bleu</b>        | Eau = Contrôle Négatif (CN-H2O) | 1 mL         | 1 mL         | 1 mL          | Prêt à l'emploi |

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

---

## 6. Conservation et stockage

Tous les réactifs doivent être stockés entre -15°C et -22°C.

Tous les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du kit.



**Le kit peut être utilisé après l'ouverture initiale pour un maximum de 5 cycles de congélation et de décongélation. Au-delà, les performances du kit ne sont pas garanties.**

## 7. Matériel requis non fournis

- ◇ Hotte biologique
- ◇ Appareil de PCR temps réel
- ◇ Centrifugeuse pour microtubes
- ◇ Vortex
- ◇ Plaques / tubes pour réaction de PCR temps réel
- ◇ Micropipettes
- ◇ Embouts DNase-free et RNase-free à filtre pour micropipettes
- ◇ Microtubes stériles
- ◇ Gants (sans talc)

## 8. Instrument de PCR en temps réel

Le kit EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs a été développé et validé pour être utilisé avec les instruments de PCR en temps réel suivants :

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) avec analyse sur CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

---

## 9. Mises en garde et précautions



**Lire attentivement ces instructions avant de débiter le protocole.**

- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée par des techniciens de laboratoire d'analyse de biologie médicale.
- ◇ La réglementation de biosécurité locale et nationale en vigueur pour le dépistage du SARS-CoV-2 doit être suivie scrupuleusement en toute circonstance, notamment dans des laboratoires et avec les équipements de laboratoire en accord.
- ◇ S'assurer que les instruments ont été installés, calibrés et maintenus en accord avec les recommandations du fabricant.
- ◇ Il est de la responsabilité de l'utilisateur d'utiliser un autre équipement que ceux validés, et dans ce cas, les performances ne sont pas garanties.
- ◇ Les échantillons cliniques doivent être considérés comme du matériel potentiellement infectieux et doivent être préparés sous une hotte à flux laminaire.
- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée selon les bonnes pratiques de laboratoire.
- ◇ Ne pas utiliser ce kit après la date de péremption indiquée.
- ◇ Le kit est expédié sous carboglace, et les composants du kit doivent arriver congelés. Si un ou plus des composants arrive décongelé, ou si les tubes ont été endommagés pendant le transport, contacter Eurobio Scientific.
- ◇ Eviter les cycles de congélation / décongélation des réactifs, cela peut conduire à une baisse de la sensibilité du test.
- ◇ Une fois les réactifs décongelés, centrifuger brièvement les tubes avant leur utilisation.
- ◇ L'utilisation de glace ou d'un bloc réfrigérant est conseillée en cas de longs délais du fait par exemple d'un important nombre d'échantillons à traiter ou de fortes températures.
- ◇ Il est recommandé de définir trois zones de travail distinctes : 1) Isolation de l'ARN, 2) Préparation du mélange réactionnel, et 3) Amplification/Détection des produits amplifiés.
- ◇ Il est recommandé d'ouvrir et de manipuler le contrôle positif à l'écart des échantillons biologiques à tester et des autres composants du kit afin d'éviter les contaminations croisées.
- ◇ Porter des blouses et des gants (sans talc) distincts dans chaque zone de travail.
- ◇ Les pipettes, les réactifs et autres matériels de travail ne doivent pas circuler entre ces zones.
- ◇ Une attention particulière doit être mise en œuvre pour conserver la pureté des réactifs et des mélanges réactionnels.
- ◇ Des méthodes appropriées de préparation/extraction d'ARN pour une production d'ARN de qualité et une application de RT-PCR doivent être utilisées, notamment afin d'éviter tout risque de contamination avec les RNAses.
- ◇ Utiliser des embouts à filtre pour micropipettes, RNase-free et DNase-free.
- ◇ Ne pas pipeter avec la bouche. Ne pas manger, ni boire ou fumer dans le laboratoire.
- ◇ Eviter les aérosols.

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

## 10. Protocole

### 10.1 Collecte des échantillons

- ◇ Collecter les échantillons dans des tubes stériles.
- ◇ Il revient à l'utilisateur de maîtriser ses propres conditions de collecte, transport, conservation et extraction des échantillons pour que l'extraction d'ARN par des systèmes adaptés produise des ARN de qualité.
- ⚠ Il est recommandé que les échantillons soient extraits immédiatement, ou conservés selon les recommandations de stockage des échantillons avant extraction (Tableau 3).

**Tableau 3 : Recommandations de stockage avant utilisation**

| Recommandations de stockage maximum des échantillons avant extraction |                       |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Température ambiante                                                  | 2 h                   |
| 4°C                                                                   | 72 h                  |
| -20°C (de préférence -80°C)                                           | Stockage à long terme |

| Attention                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <ul style="list-style-type: none"><li>◇ L'utilisateur peut se référer aux recommandations émises par l'Organisation Mondiale de la Santé ou par la Haute Autorité de Santé pour la bonne conservation des échantillons</li><li>◇ Les ARN extraits doivent être stockés à -80°C.</li><li>◇ Le transport des échantillons cliniques est soumis à la réglementation locale pour le transport des agents infectieux.</li></ul> |

### 10.2 Extraction de l'ARN

Il revient aux utilisateurs de s'assurer que le système d'extraction des acides nucléiques utilisé est compatible avec la technologie de RT-PCR en temps réel. Pour le présent coffret, nous recommandons d'utiliser des méthodes d'extraction d'ARN de virus adaptés aux prélèvements respiratoires, et de se référer aux instructions du fournisseur du kit d'extraction utilisé.

Dans le kit EBX-046, le contrôle interne endogène lu sur le canal Cy5 est déjà présent dans l'échantillon clinique à extraire. Sa détection après amplification permet de vérifier la qualité du prélèvement et de l'extraction.

Les performances telles que décrites dans la partie 13 du présent document ont été obtenues avec la technique d'extraction suivante : Maelstrom 9600 (TANBead) et le kit OptiPure Viral Auto Plate (réf : W665A46).

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

---

## 10.3 Réalisation de la RT-PCR en temps réel

### Remarque générale :

- Le contrôle positif contient des concentrations élevées de matrice. Les manipulations doivent être réalisées précautionneusement pour éviter toute contamination.
- Pour contrôler le bon fonctionnement de la RT-PCR, il est nécessaire de tester le contrôle positif, ainsi que le contrôle négatif (eau fournie = CN-H<sub>2</sub>O) (voir II-2/6 du protocole de RT-PCR en temps réel).

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

Schéma de la procédure :

## 1 - PREPARATION MELANGE REACTIONNEL / MASTERMIX

| Nombre de réactions          | N+3*            |
|------------------------------|-----------------|
| Enzyme Taq polymérase        | (N+3) x 12,5 µL |
| Enzyme Reverse transcriptase | (N+3) x 0,2 µL  |
| Eau                          | (N+3) x 2,3 µL  |
| Oligomix                     | (N+3) x 5 µL    |
| Volume total Mastermix       | (N+3) x 20 µL   |



## 2 - PREPARATION DES REACTIONS

### Echantillon

20 µL de Mastermix  
+  
5 µL échantillon ARN

### Contrôle Positif

20 µL de Mastermix  
+  
5µL CP

### Contrôle Négatif

20 µL de Mastermix  
+  
5 µL Eau biologie moléculaire (CN-H<sub>2</sub>O)



## 3 – INSTRUMENT PCR EN TEMPS REEL

| Programme             | Température | Durée  | Cycle(s) |                             |
|-----------------------|-------------|--------|----------|-----------------------------|
| Reverse Transcription | 45°C        | 10 min | 1        | -                           |
| Dénaturation          | 95°C        | 3 min  | 1        | -                           |
| Amplification         | 95°C        | 15 sec | 45       | -                           |
|                       | 58°C        | 30 sec |          | Acquisition de fluorescence |

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

## 10.4 Protocole détaillé

- 1) Vérifier que les réactifs soient entièrement décongelés. Homogénéiser les tubes d'enzymes, et vortexer environ 15 secondes l'Oligomix et le CP, puis centrifuger brièvement.
- 2) Préparer les Mastermix comme ci-dessous, N étant le nombre de réactions (incluant les contrôles positif et négatif). Prévoir la quantité de Mastermix pour N+3 réactions minimum.

| Nombre de réactions          | N+3*            |
|------------------------------|-----------------|
| Enzyme Taq polymérase        | (N+3) x 12,5 µL |
| Enzyme Reverse transcriptase | (N+3) x 0,2 µL  |
| Eau                          | (N+3) x 2,3 µL  |
| Oligomix                     | (N+3) x 5 µL    |
| Volume total Mastermix       | (N+3) x 20 µL   |

\*Pour les petites séries ( $\leq 10$ ) : préparer pour N+2 est suffisant.

- 3) Homogénéiser le Mastermix préparé en 2) et centrifuger brièvement.
- 4) Distribuer 20 µL de Mastermix à l'aide d'une micropipette et d'embouts à filtre dans des tubes/puits de microplaques indépendants.
- 5) Ajouter 5 µL d'échantillon d'ARN extrait.
- 6) En parallèle réaliser les contrôles suivants :
  - Contrôle positif :
    - 20 µL de Mastermix + 5 µL de CP.
  - Contrôle négatif :
    - 20 µL de Mastermix + 5 µL d'eau fournie (CN-H2O)
- 7) Fermer immédiatement les tubes, ou plaque avec un film adhésif pour éviter toute contamination.
- 8) Centrifuger brièvement pour collecter le mélange réactionnel au fond des tubes ou des puits de microplaque.
- 9) Réaliser le programme suivant sur l'instrument de PCR temps réel.

| Programme             | Température | Durée  | Cycle(s) |                             |
|-----------------------|-------------|--------|----------|-----------------------------|
| Reverse Transcription | 45°C        | 10 min | 1        | -                           |
| Dénaturation          | 95°C        | 3 min  | 1        | -                           |
| Amplification         | 95°C        | 15 sec | 45       | -                           |
|                       | 58°C        | 30 sec |          | Acquisition de fluorescence |

**Note 1 :** Sur CFX96™ (Bio-Rad), lancer le run à partir de la version 1.6 ou postérieure, puis analyser avec la version 3.1 (voir § Validation de l'expérience). **Veillez à bien utiliser des plaques PCR blanches pour une lecture appropriée dans tous les canaux.**

**Note 2 :** Pour les appareils de la gamme Applied Biosystems, sélectionner « NONE » dans « PASSIVE REFERENCE ».

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

---

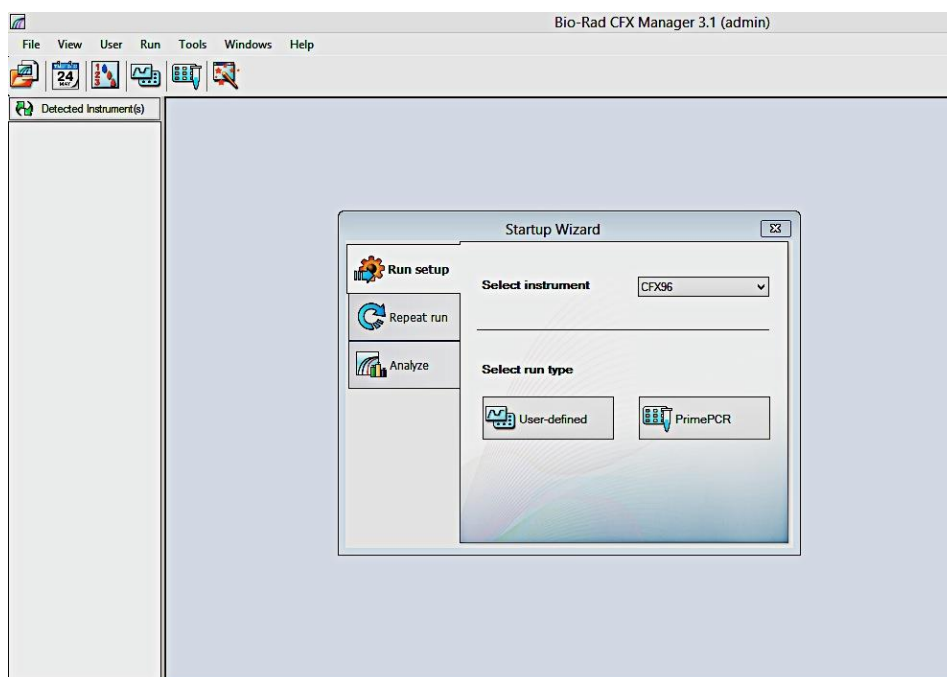
**Note 3 :** Sur QuantStudio 5® (Applied Biosystems), lancer le run à partir du logiciel QuantStudio Design & Analysis software v1.5, puis analyser avec le logiciel Design & Analysis v1.5 ou v2.5

**Note 4 :** Sur QuantStudio 6® (Applied Biosystems), lancer le run à partir du logiciel QuantStudio Real-Time PCR software v1.3, puis analyser avec le logiciel Design & Analysis v1.3 ou v2.5

## 11. Validation de l'expérimentation

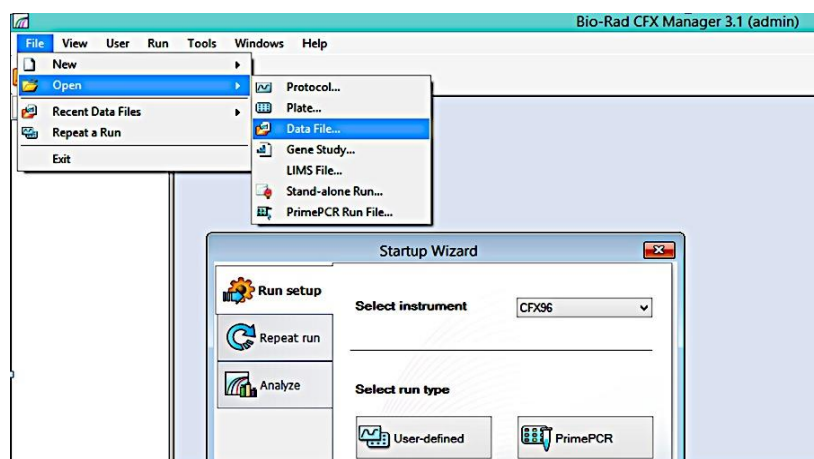
L'analyse des data post-acquisition sur un appareil de PCR CFX96 (Bio-Rad) doit être réalisée à l'aide de la version 3.1 du logiciel CFX Manager (Bio-Rad). Afin de passer sur cette version à partir d'un run lancé sur une version antérieure, veuillez suivre la procédure suivante : à la fin du run, le fichier de données avec le suffixe .pcrd doit être ouvert et traité avec la version 3.1 du CFX Manager (Bio-Rad).

Si le run a été lancé avec le logiciel CFX Manager v1.6 par exemple, pour ouvrir un fichier de data avec le logiciel CFX Manager v3.1, cliquer sur l'icône CFX Manager v3.1. L'écran d'accueil apparaît.



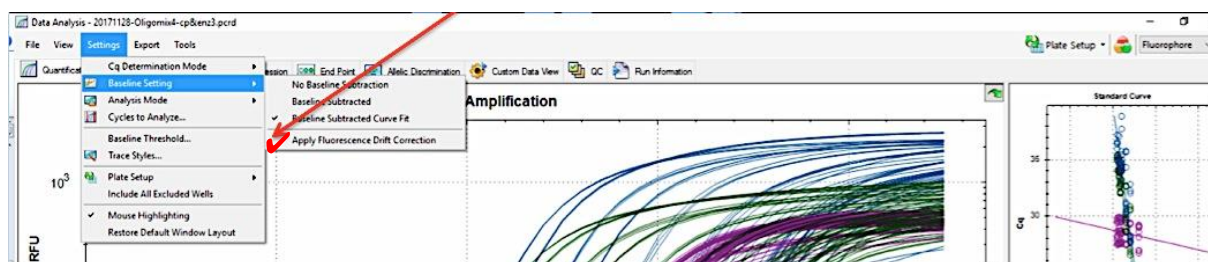
Cliquer sur « File » et sélectionner « Open » puis « Data File ».

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

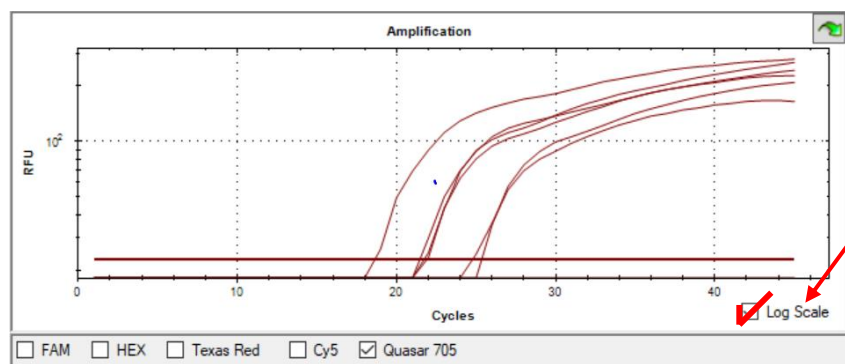


Sélectionner le fichier que vous souhaitez analyser et cliquer sur « Ouvrir ».

L'option « Drift correction » doit être appliquée dans l'onglet « Settings » comme sur l'image ci-dessous : cliquer sur l'onglet « Settings », puis sur « Baseline Setting » et sur « Apply Fluorescence Drift Correction ».

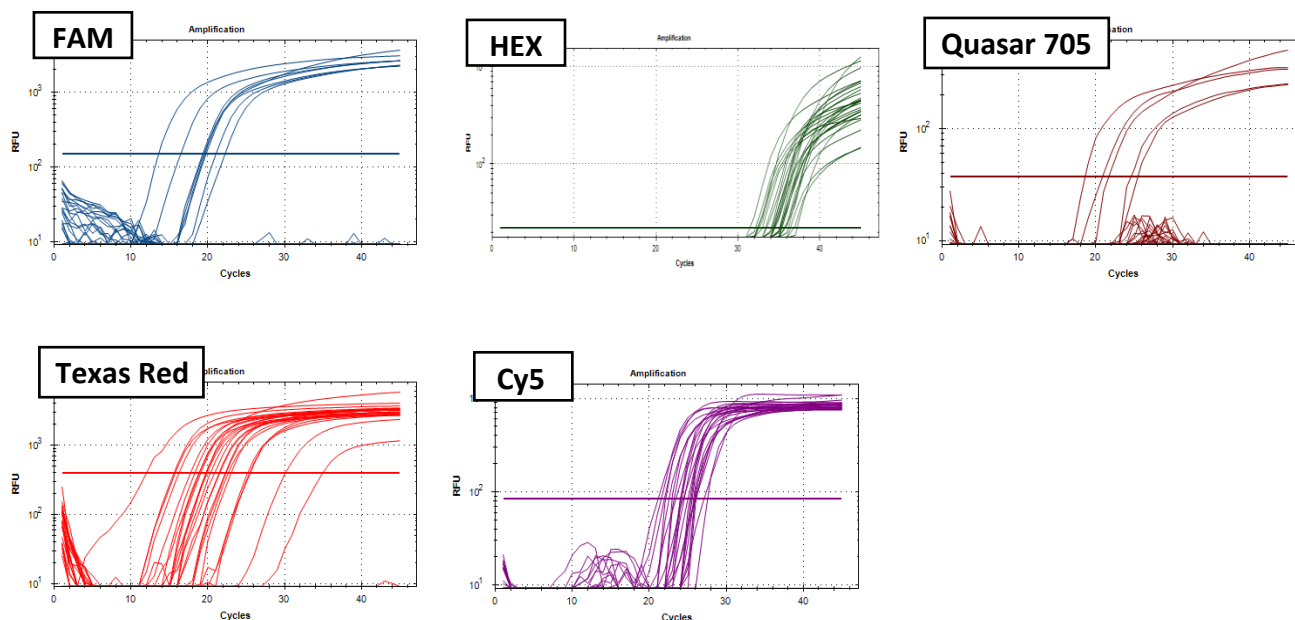


Pour optimiser l'analyse du run, cocher la case « Log Scale » pour chaque canal analysé. Ensuite, placer la barre de seuil (*threshold*) au-dessus du bruit de fond correspondant au milieu de la phase exponentielle. Les 5 canaux d'intérêt présentent des RFU très élevés et différents selon le canal considéré, l'option « Log Scale » permet ainsi une meilleure lecture et analyse du run.



# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

Une fois cette étape réalisée, l'analyse peut débuter pour les 5 canaux considérés **FAM**, **HEX**, **Texas Red**, **CY5** et **Quasar 705**.



**Pour que le dosage soit valide**, les valeurs de Ct pour les contrôles doivent être les suivantes (Tableau 4). En dehors de ces valeurs, l'expérimentation ne peut être validée.

**Tableau 4: Validation du run**

| Contrôle Positif |                  |
|------------------|------------------|
| FAM              | Ct ≤ 30          |
| HEX              | Ct ≤ 30          |
| Texas Red        | Ct ≤ 30          |
| Cy5              | Ct ≤ 30          |
| Quasar 705       | Ct ≤ 30          |
| Contrôle Négatif |                  |
| FAM              | Ct non déterminé |
| HEX              | Ct non déterminé |
| Texas Red        | Ct non déterminé |
| Cy5              | Ct non déterminé |
| Quasar 705       | Ct non déterminé |

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

## 12. Analyse des données et interprétation

Pour les échantillons cliniques, les résultats suivants sont possibles :

**\*Seuil de Ct pour échantillon : + Positif → Ct positif < 45**

Pour les cibles SARS-CoV-2 et mutations dans les échantillons :

Analyser les résultats comme suit.



**SARS-CoV-2 (Texas Red), mutation E484K (FAM), mutation E484Q (HEX), mutation L452R (Quasar 705), Contrôle interne endogène (Cy5) : Ct < 45**

Les résultats sont analysés dans les canaux **FAM, HEX, Texas Red, Quasar 705** et **Cy5** (Tableau 5).

**Tableau 5 : Détection de SARS-CoV-2 et des mutations d'intérêt**

| Signal PCR |     |                  |            |     | Validité du test                                                                         |
|------------|-----|------------------|------------|-----|------------------------------------------------------------------------------------------|
| FAM        | HEX | Texas Red        | Quasar 705 | Cy5 |                                                                                          |
| +          | -   | +/- <sup>1</sup> | -          | +/- | Positif SARS-CoV-2 et présence mutation E484K                                            |
| +          | -   | +/-              | +          | +/- | Positif SARS-CoV-2 et présence des mutations E484K et L452R                              |
| -          | +   | +/-              | -          | +/- | Positif SARS-CoV-2 et présence mutation E484Q                                            |
| -          | +   | +/-              | +          | +/- | Positif SARS-CoV-2 et présence des mutations E484Q et L452R                              |
| -          | -   | +/-              | +          | +/- | Positif SARS-CoV-2 et présence mutation L452R                                            |
| +          | +   | +/-              | -          | +/- | Positif SARS-CoV-2 et présumé positif pour mutation E484K ou mutation E484Q <sup>2</sup> |
| -          | -   | +                | -          | +/- | Positif SARS-CoV-2 sans mutations E484K, E484Q ni L452R                                  |
| -          | -   | -                | -          | +   | Négatif SARS-CoV-2                                                                       |
| -          | -   | -                | -          | -   | NI <sup>3</sup>                                                                          |

<sup>1</sup>+/- : si un signal est détecté dans l'un des canaux FAM/HEX/Quasar 705 mais pas dans le canal Texas Red, l'échantillon est considéré comme étant positif au SARS-CoV-2 puisqu'une ou plusieurs mutations d'intérêt sont révélées.

<sup>2</sup>Des tests de confirmation supplémentaires peuvent être effectués dans le cas où il est nécessaire de différencier la mutation E484K et E484Q.

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

<sup>3</sup>NI : non interprétable car inhibition de RT-PCR ou problème d'extraction. Aucune conclusion ne peut être donnée. Il est alors recommandé de réaliser un nouveau prélèvement et/ou répéter l'extraction et/ou de diluer l'échantillon 5 fois.

## **Limites d'utilisation et d'interprétation :**

- ❖ Le kit EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs est utilisé à des fins de diagnostic de première intention.
- ❖ Tous les échantillons doivent être traités comme potentiellement infectés par le SARS-CoV-2, et la réglementation locale de biosécurité doit être scrupuleusement suivie.
- ❖ L'interprétation des résultats doit prendre en compte la possibilité de faux négatifs et de faux positifs.

Les faux négatifs peuvent être dus à :

- Une collecte inadaptée des échantillons, ou un mauvais stockage,
- Des échantillons hors de la phase de virémie,
- Des conditions d'extraction inadaptées ou l'utilisation d'instruments de PCR non validés,
- Une expérimentation non respectueuse de tous les éléments de ce mode d'emploi.

Les faux positifs peuvent être dus à :

- Une contamination liée à une mauvaise manipulation d'échantillons fortement positifs, du contrôle positif, ou des produits issus de l'amplification de PCR,
  - Un non-respect de la procédure décrite dans ce mode d'emploi, notamment pour éviter toute source de contamination.
- ❖ Tout résultat doit être interprété par du personnel médical dans le contexte clinique du patient, son historique et ses symptômes.
  - ❖ Ce test n'exclut pas la présence d'autres pathogènes que le SARS-CoV-2.
  - ❖ Un résultat négatif de ce test n'exclut pas de façon absolue une possible infection au SARS-CoV-2.

## 13. Analyse des performances

### **Limite de détection/sensibilité analytique sur CP :**

SARS-CoV-2 : 5 copies/μL

Mutation E484K : 5 copies/μL

Mutation E484Q : 5 copies/μL

Mutation L452R : 10 copies/μL

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

## Limite de détection/sensibilité analytique sur un ARN synthétique SARS-CoV-2 du variant Beta (Twist Bioscience) :

SARS-CoV-2 : 1 copie/ $\mu$ L

Mutation E484K : 12,5 copies/ $\mu$ L

Mutation E484Q : N/A

Mutation L452R : N/A

NA : non applicable.

## Analyse de deux échantillons de référence fournis par le CNR des Virus des Infections Respiratoires (Hospices Civils de Lyon) provenant de surnageant de culture virale\* :

### - Variant Beta

SARS-CoV-2 :  $5.10^{e3}$  copies/ $\mu$ L

Mutation E484K :  $5.10^{e3}$  copies/ $\mu$ L

### - Variant Delta

Identifiant échantillon : hCoV-19/France/NAQ-HCL021079453301/2021

SARS-CoV-2 :  $4.10^{e4}$  copies/ $\mu$ L

Mutation L452R :  $4.10^{e4}$  copies/ $\mu$ L

\*ARN extraits à partir de cultures réalisées sur cellules VERO.

La validation des performances a porté sur :

| 114 échantillons négatifs              |                                                                                                        |
|----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 94 échantillons SARS-CoV-2 négatifs    | Caractérisés avec kit EurobioPlex EBX-041 CE-IVD                                                       |
| 20 échantillons respiratoires positifs | RSV-A/B, Parainfluenzae, Rhinovirus, Metapneumovirus, Bocavirus, CoV NL63, CoV OC43, CoV 229E, CoV KU1 |

| 128 échantillons positifs                                                                                                  |                                                                                                                         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 18 échantillons variant Alpha (lignage B.1.1.7)                                                                            | Caractérisés par séquençage                                                                                             |
| 22 échantillons variant Beta (lignage B.1.351)                                                                             | Caractérisés par séquençage                                                                                             |
| 3 échantillons porteurs de la mutation E484K                                                                               | Caractérisés par séquençage, kit EurobioPlex EBX-041 CE-IVD et Eurofins Genomics ViroBOAR Spike RT-PCR kit (SARS-CoV-2) |
| 63 échantillons SARS-CoV-2 positifs non analysés pour les mutations E484Q et L452R, et ne présentant pas la mutation E484K | Caractérisés avec kit EurobioPlex EBX-041 CE-IVD et Seegene Allplex SARS-CoV-2 Variants I Assay                         |
| 14 échantillons SARS-CoV-2 positifs porteurs de la mutation L452R <sup>1</sup>                                             | Caractérisés avec kit EurobioPlex EBX-041 CE-IVD et/ou Seegene Allplex SARS-CoV-2 Variants I ou Variants II             |

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

|                                                                               |                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| 5 échantillons SARS-CoV-2 positifs porteurs de la mutation E484Q <sup>2</sup> | Caractérisés avec kit EurobioPlex EBX-041 CE-IVD              |
| 1 échantillon SARS-CoV-2 positif porteur des mutations L452R et E484Q         | Caractérisé par séquençage et kit EurobioPlex EBX-041 CE-IVD  |
| 2 échantillons SARS-CoV-2 positifs porteurs de la mutation L452Q              | Caractérisés par séquençage et kit EurobioPlex EBX-041 CE-IVD |

<sup>1</sup>Echantillons en cours de séquençage pour la confirmation de la mutation L452R, ou déjà caractérisés par séquençage comme appartenant au variant Delta (lignage B.1.617.2), ou lignage A.27, ou lignage C.36.

<sup>2</sup>Echantillons en cours de séquençage pour la confirmation de la mutation E484Q.

Pour cette étude, l'extraction des échantillons a été réalisée sur Maelstrom 9600 (TANBead) avec le kit OptiPure Viral Auto Plate (réf : W665A46), et la RT-PCR sur CFX96 (Bio-Rad).

## Performance globale SARS-CoV-2

|                                        |                            | EBX-046 : Canal de detection du SARS-CoV-2 (Texas Red) |                     |
|----------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------|
|                                        |                            | Positifs SARS-CoV-2                                    | Négatifs SARS-CoV-2 |
| Pré-testés<br>EBX-041 ou<br>séquençage | <b>Positifs SARS-CoV-2</b> | 128                                                    | 0                   |
|                                        | <b>Négatifs SARS-CoV-2</b> | 0                                                      | 114                 |

Les échantillons positifs SARS-CoV-2 détectés par le kit EBX-046 et pré-testés avec le kit de référence EBX-041 CE-IVD présentent des Ct compris entre 9 et 37.

**Sensibilité globale :** > 99% (128/128)  
**Spécificité globale :** > 99% (114/114)  
**Concordance globale :** > 99% (242/242)

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

Echantillons négatifs pré-testés avec le kit CE-IVD EBX-041 :  
spécificité pour les mutations d'intérêt

| (-) négatif                         |       | SARS-CoV-2<br>(cibles RdRp1/RdRp2) | Mutations |       |       |
|-------------------------------------|-------|------------------------------------|-----------|-------|-------|
|                                     |       |                                    | E484K     | E484Q | L452R |
| SARS-CoV-2 négatifs                 | N=114 | - (114/114)                        |           |       |       |
| Spécificité vis-à-vis des mutations |       | 100%                               |           |       |       |

Echantillons SARS-CoV-2 positifs pré-testés avec le kit CE-IVD EBX-041 ou par séquençage :  
sensibilité pour le SARS-CoV-2 et spécificité pour les mutations d'intérêt

| N=128<br>(+) positif / (-) négatif                                          |      | SARS-CoV-2<br>(cibles RdRp1/RdRp2) | Mutations |       |       |
|-----------------------------------------------------------------------------|------|------------------------------------|-----------|-------|-------|
|                                                                             |      |                                    | E484K     | E484Q | L452R |
| Echantillons SARS-CoV-2 ne portant pas les mutations E484K, E484Q, L452R    | N=63 | + (63/63)                          | -         | -     | -     |
| Sensibilité vis-à-vis du SARS-CoV-2                                         |      | 100%                               | N/A       |       |       |
| Spécificité vis-à-vis des mutations                                         |      | N/A                                | 100%      |       |       |
| Echantillons variant Alpha ne portant pas les mutations E484K, E484Q, L452R | N=18 | + (18/18)                          | -         | -     | -     |
| Sensibilité vis-à-vis du SARS-CoV-2                                         |      | 100%                               | N/A       |       |       |
| Spécificité vis-à-vis des mutations                                         |      | N/A                                | 100%      |       |       |

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

|                                                         |      |             |             |         |           |
|---------------------------------------------------------|------|-------------|-------------|---------|-----------|
| <b>Echantillons portant la mutation E484K</b>           | N=25 | + (25/25)   | + (25/25)   | -       | -         |
| Sensibilité vis-à-vis du SARS-CoV-2                     |      | <b>100%</b> | N/A         |         |           |
| Spécificité vis-à-vis des mutations                     |      | N/A         | <b>100%</b> |         |           |
| <b>Echantillons portant la mutation L452R</b>           | N=14 | + (14/14)   | -           | -       | + (14/14) |
| Sensibilité vis-à-vis du SARS-CoV-2                     |      | <b>100%</b> | N/A         |         |           |
| Spécificité vis-à-vis des mutations                     |      | N/A         | <b>100%</b> |         |           |
| <b>Echantillons portant la mutation E484Q</b>           | N=5  | + (5/5)     | -           | + (5/5) | -         |
| Sensibilité vis-à-vis du SARS-CoV-2                     |      | <b>100%</b> | N/A         |         |           |
| Spécificité vis-à-vis des mutations                     |      | N/A         | <b>100%</b> |         |           |
| <b>Echantillon portant les mutations L452R et E484Q</b> | N=1  | + (1/1)     | -           | + (1/1) | + (1/1)   |
| Sensibilité vis-à-vis du SARS-CoV-2                     |      | <b>100%</b> | N/A         |         |           |
| Spécificité vis-à-vis des mutations                     |      | N/A         | <b>100%</b> |         |           |
| <b>Echantillons portant la mutation L452Q</b>           | N=2  | + (2/2)     | -           | -       | -         |
| Sensibilité vis-à-vis du SARS-CoV-2                     |      | <b>100%</b> | N/A         |         |           |
| Spécificité vis-à-vis des mutations                     |      | N/A         | <b>100%</b> |         |           |

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

**Sensibilité E484K :** > 99% (25/25)  
**Spécificité E484K :** > 99% (217/217)  
**Concordance E484K :** > 99% (242/242)

**Sensibilité E484Q :** > 99% (6/6)  
**Spécificité E484Q :** > 99% (236/236)  
**Concordance E484Q :** > 99% (242/242)

**Sensibilité L452R :** > 99% (15/15)  
**Spécificité L452R :** > 99% (227/227)  
*Pas de croisement avec mutation L452Q mis en évidence dans le canal Quasar 705 (L452R)*  
**Concordance L452R :** > 99% (242/242)

## Variabilité du signal sur les canaux FAM, HEX, Texas Red, Cy5 et Quasar 705

### ▪ Variabilité intra-expérience :

| Moyenne CV % |       |       |            |                           |
|--------------|-------|-------|------------|---------------------------|
| E484K        | E484Q | L452R | SARS-CoV-2 | Contrôle interne endogène |
| 1,70%        | 1,73% | 1,11% | 1,08%      | 2,03%                     |

CV: coefficient de variation

### ▪ Variabilité inter-lots :

| Moyenne CV % |       |       |            |                           |
|--------------|-------|-------|------------|---------------------------|
| E484K        | E484Q | L452R | SARS-CoV-2 | Contrôle interne endogène |
| 2,12%        | 2,00% | 4,93% | 2,90%      | 3,83%                     |

CV: coefficient de variation

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

## Spécificité diagnostique

Cette validation a porté sur :

- 44 échantillons négatifs pour tous les coronavirus connus, dont des échantillons de panels respiratoires caractérisés pour d'autres virus afin de tester les réactions croisées.
- 7 échantillons positifs pour le CoV NL63 (n=3) ou CoV OC43 (n=2) ou CoV 229E (n=1) ou CoV KU1 (n=1).

| Nombre d'échantillons | Echantillon positif pour           | Coronavirus | Statut SARS-CoV-2 EBX-046 |
|-----------------------|------------------------------------|-------------|---------------------------|
| 1                     | Adenovirus                         | Négatif     | Négatif                   |
| 2                     | RSV A ou B                         | Négatif     | Négatif                   |
| 7                     | Parainfluenzae                     | Négatif     | Négatif                   |
| 1                     | Rhinovirus                         | Négatif     | Négatif                   |
| 2                     | Metapneumovirus                    | Négatif     | Négatif                   |
| 1                     | Bocavirus                          | Négatif     | Négatif                   |
| 2                     | Legionella pneumoniae              | Négatif     | Négatif                   |
| 3                     | Mycoplasma pneumoniae              | Négatif     | Négatif                   |
| 3                     | Mycoplasma tuberculosis            | Négatif     | Négatif                   |
| 2                     | Bordetella pertussis               | Négatif     | Négatif                   |
| 1                     | Parechovirus Type 1                | Négatif     | Négatif                   |
| 1                     | Parechovirus Type 2                | Négatif     | Négatif                   |
| 1                     | Parechovirus Type 3                | Négatif     | Négatif                   |
| 1                     | Parechovirus Type 4                | Négatif     | Négatif                   |
| 1                     | Parechovirus Type 5                | Négatif     | Négatif                   |
| 1                     | Parechovirus Type 6                | Négatif     | Négatif                   |
| 3                     | Enterovirus                        | Négatif     | Négatif                   |
| 1                     | Streptococcus pyogenes             | Négatif     | Négatif                   |
| 3                     | Streptococcus pneumoniae           | Négatif     | Négatif                   |
| 2                     | Staph.epiderm/oralis/mitis/sanguis | Négatif     | Négatif                   |
| 3                     | Candida albicans                   | Négatif     | Négatif                   |
| 2                     | Pseudomonas aeruginosa             | Négatif     | Négatif                   |
| 3                     | CoV NL63                           | Positif     | Négatif                   |
| 2                     | CoV OC43                           | Positif     | Négatif                   |
| 1                     | CoV 229E                           | Positif     | Négatif                   |
| 1                     | CoV KU1                            | Positif     | Négatif                   |

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

Une analyse *in silico* a été employée et démontre la spécificité des amorces et sondes pour le SARS-CoV-2. Par exemple, sur les séquences de virus de MERS et de SARS, aucune homologie significative des amorces et des sondes SARS-CoV-2 susceptible d'amplifier ces virus n'a été trouvée.

## 14. Analyse comparative des performances diagnostiques du kit EBX-046 versus kit commercial de référence

L'analyse des performances du kit EurobioPlex EBX-046 a été menée de façon comparative avec un autre kit commercial de référence CE-IVD par un laboratoire indépendant. Le kit de référence permet de détecter la présence du virus SARS-CoV-2 et cibler les mutations N501Y et E484K, en comparaison avec notre kit EBX-046 permettant de détecter la présence du virus SARS-CoV-2 et cibler les mutations E484K, E484Q et L452R.

Pour cette étude comparative, 44 échantillons ont été testés et analysés. Un retest a été effectué sur quatre des échantillons avec les kits EurobioPlex EBX-041 CE-IVD et Seegene *Allplex SARS-CoV-2 Variants I Assay* afin de valider leur positivité au SARS-CoV-2.

|                                     | Kit EurobioPlex EBX-046            |             |       |       | Kit de référence CE-IVD       |                    |
|-------------------------------------|------------------------------------|-------------|-------|-------|-------------------------------|--------------------|
|                                     | SARS-CoV-2<br>(cibles RdRp1/RdRp2) | Mutations   |       |       | SARS-CoV-2<br>(cibles RdRp/N) | Mutations<br>E484K |
|                                     |                                    | E484K       | E484Q | L452R |                               |                    |
|                                     | + (42/44)                          | + (6/44)    | -     | -     | + (44/44)                     | + (6/44)           |
| Sensibilité vis-à-vis du SARS-CoV-2 | <b>95,45%*</b>                     | N/A         |       |       | <b>100%</b>                   | N/A                |
| Spécificité vis-à-vis des mutations | N/A                                | <b>100%</b> |       |       | N/A                           | <b>100%</b>        |

*\*Deux échantillons ont été identifiés négatifs au SARS-CoV-2. Ils présentent une charge virale très faible, sans signification clinique évidente (Ct>33,) et en limite de sensibilité qui ne remet pas en cause l'utilisation possible du kit EBX-046 en première intention. Cet avis, relatif à la RT-PCR faiblement positive et à la pertinence du prélèvement nasal, a été rendu par le Haut Conseil de la santé publique en novembre 2020 dans un communiqué officiel (<https://www.hcsp.fr/Explore.cgi/AvisRapportsDomaine?clefr=963>).*

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

---

## 15. Bibliographie

Cherian, Sarah, Varsha Potdar, Santosh Jadhav, Pragya Yadav, Nivedita Gupta, Mousmi Das, Partha Rakshit, et al. 2021. « Convergent Evolution of SARS-CoV-2 Spike Mutations, L452R, E484Q and P681R, in the Second Wave of COVID-19 in Maharashtra, India ». Preprint. Molecular Biology. <https://doi.org/10.1101/2021.04.22.440932>.

Hu, Ben, Hua Guo, Peng Zhou, et Zheng-Li Shi. 2021. « Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19 ». *Nature Reviews Microbiology* 19 (3): 141-54. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>.

Lauring, Adam S., et Emma B. Hodcroft. 2021. « Genetic Variants of SARS-CoV-2—What Do They Mean? » *JAMA* 325 (6): 529. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.27124>.

Plante, Jessica A., Brooke M. Mitchell, Kenneth S. Plante, Kari Debbink, Scott C. Weaver, et Vineet D. Menachery. 2021. « The Variant Gambit: COVID-19's next Move ». *Cell Host & Microbe* 29 (4): 508-15. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.02.020>.

Seyed Hosseini, Elahe, Narjes Riahi Kashani, Hossein Nikzad, Javid Azadbakht, Hassan Hassani Bafrani, et Hamed Haddad Kashani. 2020. « The Novel Coronavirus Disease-2019 (COVID-19): Mechanism of Action, Detection and Recent Therapeutic Strategies ». *Virology* 551 (décembre): 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.08.011>.

Srivastava, Surabhi, Sofia Banu, Priya Singh, Divya Tej Sowpati, et Rakesh K. Mishra. 2021. « SARS-CoV-2 Genomics: An Indian Perspective on Sequencing Viral Variants ». *Journal of Biosciences* 46 (1): 22. <https://doi.org/10.1007/s12038-021-00145-7>.

European Centre for Disease Prevention and Control :  
<https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern>

Haut Conseil de la Santé Publique :  
<https://www.hcsp.fr/Explore.cgi/AvisRapportsDomaine?clefr=963>

## 16. Contrôle qualité

Conformément au système de management de la qualité d'Eurobio, certifié ISO EN 13485, chaque lot de EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs est testé selon des spécifications prédéfinies afin de garantir une qualité constante des produits.

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

---

## 17. Elimination des déchets

Eliminer tous les déchets conformément à la législation sur les DASRI.

## 18. Déclaration d'incident

Tout incident grave survenu en lien avec le dispositif fait l'objet d'une notification à Eurobio Scientific et à l'autorité compétente de l'État membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

## 19. Assistance technique

Pour obtenir une assistance sur nos produits, merci de contacter notre support technique.

Le service clients d'Eurobio Scientific est joignable par voie électronique (mail), à l'adresse [adv@eurobio.fr](mailto:adv@eurobio.fr) ou par téléphone au +33 (0)1.69.07.94.77.





## EurobioPlex

*SARS-CoV-2 SNPs*

REAL-TIME RT-PCR

For **qualitative** real-time RT-PCR

**REF**

**EBX-046**

**EBX-046-48**

**EBX-046-192**



**48/96/192 reactions**



Reference EBX-046 Version 5.00 – July 2021

### **Validated on:**

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) with analysis on CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)



Instructions for use

Available on [www.eurobio-scientific.com](http://www.eurobio-scientific.com)

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

---

## Table of contents

|                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introduction.....                                                                                         | 30 |
| 2. Purpose of the system.....                                                                                | 31 |
| 3. Symbols .....                                                                                             | 32 |
| 4. Principle of detection .....                                                                              | 33 |
| 5. Content of the kit .....                                                                                  | 34 |
| 6. Storage.....                                                                                              | 35 |
| 7. Materials required not provided .....                                                                     | 35 |
| 8. Real-time PCR instrument .....                                                                            | 35 |
| 9. Cautions and note .....                                                                                   | 36 |
| 10. Procedure .....                                                                                          | 37 |
| 11. Validation of the experiment .....                                                                       | 41 |
| 12. Data analysis and interpretation .....                                                                   | 44 |
| 13. Performance analysis .....                                                                               | 45 |
| 14. Comparative analysis of the EBX-046 kit's diagnostic performance versus a commercial reference kit ..... | 52 |
| 15. Bibliography.....                                                                                        | 53 |
| 16. Quality control.....                                                                                     | 53 |
| 17. Waste disposal.....                                                                                      | 54 |
| 18. Incident report.....                                                                                     | 54 |
| 19. Technical assistance .....                                                                               | 54 |

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

---

## 1. Introduction

The SARS-CoV-2 virus emerged at the end of 2019 in the city of Wuhan in China. It is classified as a member of the Coronaviridae family and the Sarbecovirus subgroup. Its genome consists of 29903 ribonucleic acid (RNA) bases. SARS-CoV-2 is the 7th identified coronavirus infecting humans, after human coronaviruses (HCoV), SARS-CoV (coronavirus causing severe acute respiratory syndrome) and MERS-CoV (coronavirus inducing Middle East respiratory syndrome).

The sequences of SARS-CoV-2 show similarities to those of the betacoronaviruses found in bats. SARS-CoV-2 is genetically distinct from other human coronaviruses.

The clinical profile is variable, ranging from flu-like symptoms, fever, cough, difficulty breathing, to pneumonia, to a severe respiratory syndrome that can be fatal. The lethality rate of the virus is estimated to be between 2-3%. SARS-CoV-2 is highly contagious with an estimated 173 million confirmed cases worldwide since early June 2021.

Several variants and mutations of SARS-CoV-2 have demonstrated an impact on public health (increased transmissibility, severity of infection or immune escape). They emerged at the end of 2020 in distinct geographical areas and are designated as variants of concern (VOC):

- Alpha variant from the United Kingdom (UK): lineage B.1.1.7 with mutation N501Y.
- Beta variant from South Africa (SA): lineage B.1.351 with mutation E484K.
- Gamma variant from Brazil (BR): lineage P.1 with mutation E484K.
- Delta variant from India: lineage B.1.617.2 with mutation L452R.
- Kappa variant from India: lineage B.1.617.1 with the mutations L452R and E484Q.
- The L452R mutation is also found in other lineages, including A.27, the origin of which is unclear, and C.36, detected in Egypt. An L452Q variation of lineage C.37 has also been detected in Peru.

In May 2021, 80% of Covid-19 infections were reported with the UK B.1.1.7 variant. This variant is recognised and the current vaccines on the market provide protection against it. The other registered cases were related to the other circulating variants. The interest in the diagnosis of the distinct Covid-19 variants is therefore to focus on the recent E484K, E484Q and L452R mutations for which currently available vaccines may have limited or no effect, being mutations responsible for immune escape. The new variant identification strategy aims to identify immune escape mutations as a priority, rather than distinguishing variants. This strategy will enable patients with variants with this type of mutation to be treated more quickly.

The EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs kit was designed by aligning in silico all the SARS-CoV-2 sequences known to date.

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

---

## 2. Purpose of the system

The EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs is a real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) assay that, in a single test, identifies the presence of SARS-CoV-2 and distinguishes the E484K, E484Q and L452R mutations in a qualitative manner.

The RNA extract is the starting material for the EurobioPlex SARS-CoV-2 kit. It is up to the user to use extraction methods adapted to the tested samples. The kit has been validated on nasopharyngeal samples.

The EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs kit is an *in Vitro Diagnostic Medical Device* for the detection of SARS-CoV-2 and mutations of interest. This kit is available for first-line diagnostic purposes.

The EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs test must be used by qualified medical laboratory staff. It is for single use only and should not be reused after usage.

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

---

## 3. Symbols



Reference



Batch number



Limits of storage temperature



Expiration date



Content sufficient for « N » reactions



Manufacturer



CE marked product



In Vitro Diagnostic Medical Device



Instructions for use



Single use



Caution

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

## 4. Principle of detection

The EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs kit is a qualitative ribonucleic acid (RNA) amplification assay for the analysis of:

- The presence of the two targets (RdRp1/RdRp2) of SARS-CoV-2 on the RdRp gene, in the same channel.
- The presence of E484K, E484Q and L452R mutations and their distinction in three distinct detection channels.
- The presence of a human housekeeping gene used as a control for the quality of the sample, for RNA extraction and RT-PCR inhibition. The control is used to identify potential variations that may occur during the RNA extraction from biological samples and real-time RT-PCR amplification steps. This ensures that a negative result cannot be due to incorrect RNA extraction and/or the presence of an excessive quantity of RT-PCR inhibitors.

The RNA extract is the source material for the EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs kit. The RNA is extracted from a patient's nasopharyngeal sample.

SARS-CoV-2 RNA is detected using specific probes for each mutation or gene labelled as FAM, HEX, Texas Red, Quasar 705. The endogenous internal control is detected using a Cy5 labelled probe (Table 1). During elongation of the amplification product, the probes emit specific fluorescence following their hydrolysis. The measurement of the fluorescence intensity in real time, emitted and measured individually by an optical system during the PCR, is related to the accumulation of the amplification products.

**Table 1: Detection of targets by fluorophores**

| Targets                     | Fluorophore | Excitation | Emission |
|-----------------------------|-------------|------------|----------|
| 484K                        | FAM         | 495 nm     | 515 nm   |
| 484Q                        | HEX         | 535 nm     | 555 nm   |
| RdRp1/RdRp2                 | Texas Red   | 585 nm     | 605 nm   |
| Endogenous internal control | Cy5         | 650 nm     | 670 nm   |
| 452R                        | Quasar 705  | 683 nm     | 703 nm   |

Recommended equivalent channels on different PCR instruments:

- **FAM channel** (CFX96, QuantStudio 5, QuantStudio 6), Green channel (Rotor-Gene Q),
- **HEX channel** (CFX96), VIC channel (QuantStudio 5, QuantStudio 6), Yellow channel (Rotor-Gene Q),

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

---

- **Texas Red channel** (CFX96, QuantStudio 6), Orange channel (Rotor-Gene Q), Rox channel (QuantStudio 5),
- **Cy5 channel** (CFX96, QuantStudio 5, QuantStudio 6), Red channel (Rotor-Gene Q),
- **Quasar 705 channel** (CFX96, QuantStudio 5, QuantStudio 6), Purple channel (Rotor-Gene Q).

## 5. Content of the kit

The Eurobioplex SARS-CoV-2 SNPs real-time RT-PCR kit is ready to use and contains the reagents and enzymes necessary for the detection of the virus (Table 2).

Fluorescence is emitted and measured individually by an optical system during the PCR process. Detection of the amplified fragments is performed by a fluorometer using the channels listed in Table 1.

**Table 2: Content of the kit**

| Cap color          | Content of the kit                   | 48 reactions | 96 reactions | 192 reactions | Reconstitution |
|--------------------|--------------------------------------|--------------|--------------|---------------|----------------|
| <b>Red</b>         | Enzyme Taq polymere-<br>rase         | 650 µL       | 1500 µL      | 2 X 1250 µL   | Ready to use   |
| <b>Brown</b>       | Enzyme Reverse<br>transcriptase      | 15 µL        | 30 µL        | 40 µL         | Ready to use   |
| <b>Transparent</b> | Oligomix                             | 260 µL       | 600 µL       | 1000 µL       | Ready to use   |
| <b>Yellow</b>      | Positive Control (CP)                | 80 µL        | 160 µL       | 320 µL        | Ready to use   |
| <b>Blue</b>        | Water = Negative<br>Control (CN-H2O) | 1 mL         | 1 mL         | 1 mL          | Ready to use   |

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

---

## 6. Storage

All reagents should be stored between -15°C and -22°C.

All reagents can be used until the expiration date indicated on the kit label.



**The kit can be used after the initial opening for a maximum of 5 freezing and thawing cycles. Beyond that, the performance of the kit is not guaranteed.**

## 7. Materials required not provided

- ◇ Biological cabinet
- ◇ Real time PCR instrument
- ◇ Centrifuge for microtubes
- ◇ Vortex
- ◇ Plates / tubes for real-time PCR reaction
- ◇ Micropipettes
- ◇ DNase-free and RNase-free filter tips for micropipettes
- ◇ Sterile microtubes
- ◇ Gloves (talc-free)

## 8. Real-time PCR instrument

The EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs kit has been developed and validated for use with the following real-time PCR instruments:

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) with analysis on CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)

## 9. Cautions and note



**Read these instructions carefully before starting the procedure.**

- ◇ This experimentation should be performed by medical laboratory technicians.
- ◇ The local and national biosafety regulations in place for the detection of SARS-CoV-2 must be followed strictly at all times, especially in laboratories and with laboratory equipment in agreement.
- ◇ Ensure that instruments have been installed, calibrated and maintained in accordance with the manufacturer's recommendations.
- ◇ It is the responsibility of the user to use equipment other than that validated, and in such cases performance is not guaranteed.
- ◇ Clinical samples should be considered as potentially infectious material and should be prepared in a laminar flow cabinet.
- ◇ This experiment should be performed according to good laboratory practice.
- ◇ Do not use this kit after the stated expiration date.
- ◇ The kit is shipped under dry ice, and the kit components should arrive frozen. If one or more of the components arrive thawed, or if the tubes have been damaged in transit, contact Eurobio Scientific.
- ◇ Avoid freeze/thaw cycles of reagents as this may lead to a decrease in assay sensitivity.
- ◇ Once the reagents have been thawed, centrifuge the tubes briefly before use.
- ◇ The use of ice or an ice pack is recommended in case of long delays due to, for example, a large number of samples to be processed or high temperatures.
- ◇ It is recommended to define three separate work areas: 1) RNA isolation, 2) Preparation of the reaction mixture, and 3) Amplification/Detection of the amplified products.
- ◇ It is recommended that the positive control be opened and handled separately from the biological samples to be tested and the other kit components to avoid cross-contamination.
- ◇ Distinct lab coat and gloves (talco-free) should be worn in each work area.
- ◇ Pipettes, reagents and other working materials should not be moved between these areas.
- ◇ Special care should be taken to maintain the purity of reagents and reaction mixtures.
- ◇ Appropriate RNA preparation/extraction methods for quality RNA production and RT-PCR application should be used, especially to avoid contamination with RNAs.
- ◇ Use filter tips for micropipettes, RNase-free and DNase-free.
- ◇ Do not pipette with the mouth. Do not eat, drink or smoke in the laboratory.
- ◇ Avoid aérosols.

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

## 10. Procedure

### a. Samples collection

- ◇ Collect samples in sterile tubes.
- ◇ It is the responsibility of the user to control their own sample collection, transport, storage and extraction conditions to ensure that RNA extraction using appropriate systems produces RNA of high quality.
- ! ◇ It is recommended that samples are extracted immediately, or stored according to the sample storage recommendations before extraction (Table 3).

**Table 3: Storage recommendations before use**

| Recommendations for maximum storage of samples before extraction |                   |
|------------------------------------------------------------------|-------------------|
| Ambient temperature                                              | 2 h               |
| 4°C                                                              | 72 h              |
| -20°C (preferably -80°C)                                         | Long-term storage |

| Caution                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <ul style="list-style-type: none"><li>◇ The user may refer to the recommendations issued by the World Health Organization or the French National Authority for Health for the proper storage of samples.</li><li>◇ Extracted RNA should be stored at -80°C.</li><li>◇ The transport of clinical samples is subject to local regulations for the transport of infectious agents.</li></ul> |

### b. RNA extraction

It is the responsibility of the user to ensure that the nucleic acid extraction system used is compatible with real-time RT-PCR technology. For this kit, we recommend using virus RNA extraction methods suitable for respiratory specimens, and to refer to the instructions of the supplier of the extraction kit used.

In the EBX-046 kit, the endogenous internal control on the Cy5 channel is already present in the clinical sample. Properly detected after amplification, the endogenous internal control is used to ensure the quality of the sample and the extraction. The performance described in this document was obtained with the following extraction technique: Maelstrom 9600 (TanBEAD) and the OptiPure Viral Auto Plate kit (ref: W665A46).

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

---

## c. Real-time RT-PCR

### General note:

- The positive control contains high concentrations of matrix. Handling must be done carefully to avoid contamination.
- To confirm that the RT-PCR is working correctly, it is necessary to test the positive control, as well as the negative control (water supplied = CN-H<sub>2</sub>O) (see II-2/6 of the real-time RT-PCR protocol).

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

Diagram of the procedure:

## 1 - PREPARATION OF MASTERMIX

| Number of reactions          | N+3*            |
|------------------------------|-----------------|
| Enzyme Taq polymerase        | (N+3) x 12,5 µL |
| Enzyme Reverse transcriptase | (N+3) x 0,2 µL  |
| Water                        | (N+3) x 2,3 µL  |
| Oligomix                     | (N+3) x 5 µL    |
| Total volume Mastermix       | (N+3) x 20 µL   |



## 2 - PREPARATION OF REACTIONS

### Sample

20 µL Mastermix  
+  
5 µL RNA sample

### Positive Control

20 µL Mastermix  
+  
5µL CP

### Negative Control

20 µL Mastermix  
+  
5 µL Molecular biology water (CN-H2O)



## 3 – REAL TIME PCR INSTRUMENT

| Program               | Temperature | Duration | Cycle(s) |                             |
|-----------------------|-------------|----------|----------|-----------------------------|
| Reverse Transcription | 45°C        | 10 min   | 1        | -                           |
| Denaturation          | 95°C        | 3 min    | 1        | -                           |
| Amplification         | 95°C        | 15 sec   | 45       | -                           |
|                       | 58°C        | 30 sec   |          | Acquisition of fluorescence |

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

## d. Detailed procedure

- 1) Ensure that the reagents are completely thawed. Homogenise the enzyme tubes, and vortex the Oligomix and CP for about 15 seconds, then centrifuge briefly.
- 2) Prepare the Mastermix as below. N is the number of reactions (including positive and negative controls. Plan to prepare enough reagents for at least N+3 reactions.

| Nombre de réactions          | N+3*            |
|------------------------------|-----------------|
| Enzyme Taq polymérase        | (N+3) x 12,5 µL |
| Enzyme Reverse transcriptase | (N+3) x 0,2 µL  |
| Eau                          | (N+3) x 2,3 µL  |
| Oligomix                     | (N+3) x 5 µL    |
| Volume total Mastermix       | (N+3) x 20 µL   |

*\*For smaller series (≤10): preparing for N+2 is sufficient.*

- 3) Homogenise the Mastermix prepared in 2) and centrifuge briefly
- 4) Dispense 20 µL of Mastermix into separate microplate tubes/wells using a micropipette and filter tips.
- 5) Add 5 µL of extracted RNA sample.
- 6) In parallel perform the following controls:
  - Positive Control:
    - 20 µL of Mastermix + 5 µL of CP.
  - Negative Control:
    - 20 µL of Mastermix + 5 µL supplied water (CN-H<sub>2</sub>O).
- 7) Immediately close the tubes, or plate with an adhesive film to avoid contamination.
- 8) Centrifuge briefly to collect the reaction mixture at the bottom of the tubes or microplate wells.
- 9) Run the following program on the real-time PCR instrument.

| Program               | Temperature | Duration | Cycle(s) |                             |
|-----------------------|-------------|----------|----------|-----------------------------|
| Reverse Transcription | 45°C        | 10 min   | 1        | -                           |
| Denaturation          | 95°C        | 3 min    | 1        | -                           |
| Amplification         | 95°C        | 15 sec   | 45       | -                           |
|                       | 58°C        | 30 sec   |          | Acquisition of fluorescence |

**Note 1:** On the CFX96™ (Bio-Rad), start the run from version 1.6 or later, then analyse with version 3.1 (see § Validation of the experiment). **Please ensure that white PCR plates are used for appropriate reading in all channels.**

**Note 2:** For Applied Biosystems instruments, select "NONE" in "PASSIVE REFERENCE".

**Note 3:** On QuantStudio 5® (Applied Biosystems), start the run from QuantStudio Design & Analysis software v1.5, then analyse with Design & Analysis software v1.5 or v2.5

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

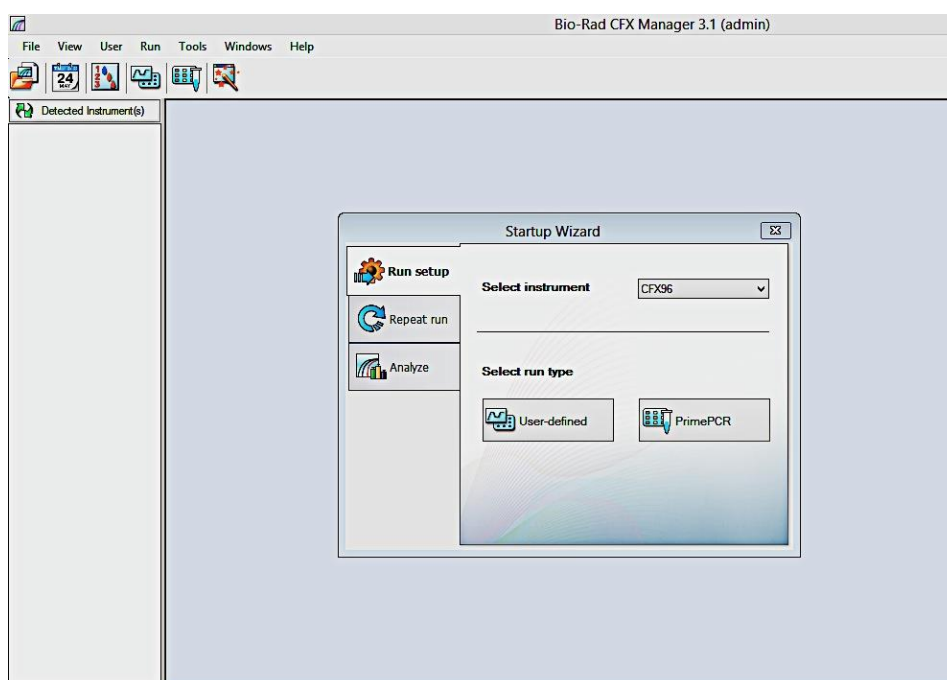
---

**Note 4:** On QuantStudio 6® (Applied Biosystems), start the run from QuantStudio Real-Time PCR software v1.3, then analyze with Design & Analysis software v1.3 or v2.5

## 11. Validation of the experiment

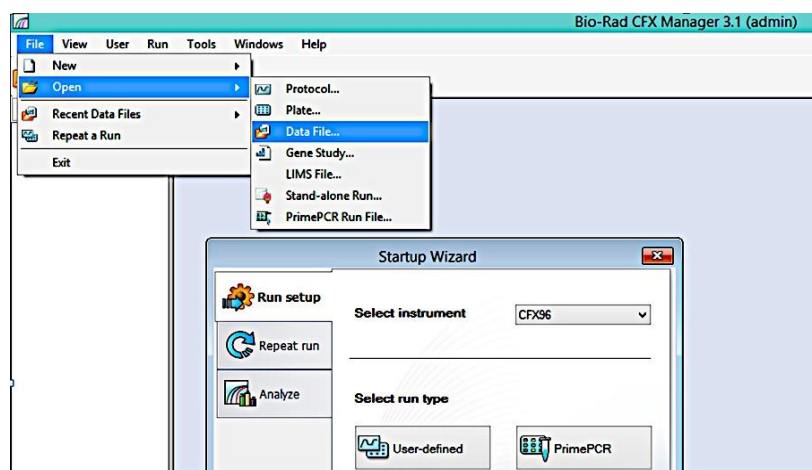
Post-acquisition data analysis on a CFX96 PCR instrument (Bio-Rad) must be performed using version 3.1 of the CFX Manager software (Bio-Rad). In order to change to this version from a run started on an earlier version, please follow the procedure below: At the end of the run, the data file with the extension .pcrd must be opened and processed with CFX Manager (Bio-Rad) version 3.1.

If the run was started with CFX Manager v1.6 for example, to open a data file with CFX Manager v3.1, click on the CFX Manager v3.1 icon. The home screen appears.



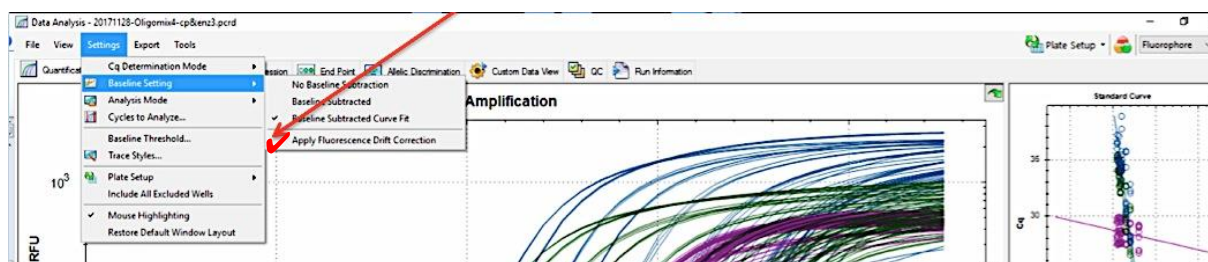
Click on "File" and select "Open" then "Data File".

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

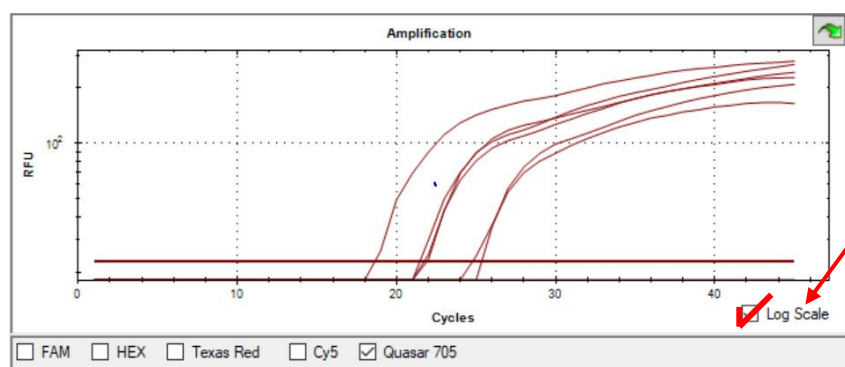


Select the file you need to analyse and click on "Open".

The "Drift correction" option must be applied in the "Settings" tab as shown in the image below: click on the "Settings" tab, then on "Baseline Setting" and on "Apply Fluorescence Drift Correction".

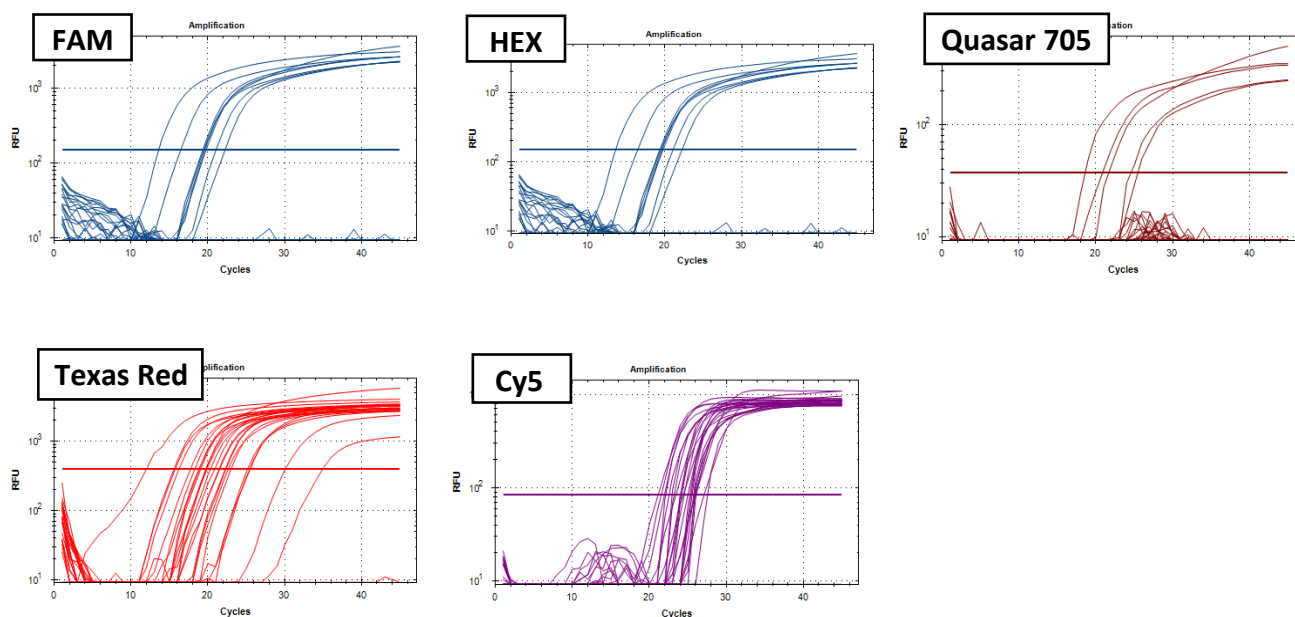


To optimise the run analysis, select the "Log Scale" checkbox for each channel analysed. Then place the threshold bar above the background noise corresponding to the middle of the exponential phase. The 5 channels of interest have high RFUs and differ according to the channel considered, so the "Log Scale" option allows for a better reading and analysis of the run.



# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

Once this step has been completed, the analysis can proceed for the 5 channels considered FAM, HEX, Texas Red, CY5 and Quasar 705.



**To validate the assay**, the Ct values for the controls must be the following (Table 4). Outside of these values, the experiment cannot be validated.

**Table 4: Run validation**

| Positive Control |                   |
|------------------|-------------------|
| FAM              | Ct ≤ 30           |
| HEX              | Ct ≤ 30           |
| Texas Red        | Ct ≤ 30           |
| Cy5              | Ct ≤ 30           |
| Quasar 705       | Ct ≤ 30           |
| Negative Control |                   |
| FAM              | Ct not determined |
| HEX              | Ct not determined |
| Texas Red        | Ct not determined |
| Cy5              | Ct not determined |
| Quasar 705       | Ct not determined |

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

## 12. Data analysis and interpretation

For clinical samples, the following results are possible:

\* Ct threshold for sample: + Positive → positive Ct < 45

For SARS-CoV-2 targets and mutations in samples:

Analyse the results as described below.



**SARS-CoV-2 (Texas Red), E484K mutation (FAM), E484Q mutation (HEX), L452R mutation (Quasar 705), Endogenous internal control (Cy5) : Ct < 45**

Results are analysed in the **FAM, HEX, Texas Red, Quasar 705** and **Cy5** channels (Table 5).

**Table 5: Detection of SARS-CoV-2 and mutations of interest**

| PCR signal |     |                  |            |     | Test validity                                                                          |
|------------|-----|------------------|------------|-----|----------------------------------------------------------------------------------------|
| FAM        | HEX | Texas Red        | Quasar 705 | Cy5 |                                                                                        |
| +          | -   | +/- <sup>1</sup> | -          | +/- | SARS-CoV-2 positive and presence of E484K mutation                                     |
| +          | -   | +/-              | +          | +/- | SARS-CoV-2 positive and presence of E484K and L452R mutations                          |
| -          | +   | +/-              | -          | +/- | SARS-CoV-2 positive and presence of E484Q mutation                                     |
| -          | +   | +/-              | +          | +/- | SARS-CoV-2 positive and presence of E484Q and L452R mutations                          |
| -          | -   | +/-              | +          | +/- | SARS-CoV-2 positive and presence of L452R mutation                                     |
| +          | +   | +/-              | -          | +/- | SARS-CoV-2 positive and and presumed positive for E484K or E484Q mutation <sup>2</sup> |
| -          | -   | +                | -          | +/- | SARS-CoV-2 positive without mutations E484K, E484Q, L452R                              |
| -          | -   | -                | -          | +   | SARS-CoV-2 negative                                                                    |
| -          | -   | -                | -          | -   | NI <sup>3</sup>                                                                        |

<sup>1</sup>+/- : if a signal is detected in one of the FAM/HEX/Quasar 705 channels but not in the Texas Red channel, the sample is considered to be SARS-CoV-2 positive because one or more mutations of interest are revealed.

<sup>2</sup>Additional confirmatory analysis can be performed in case it is necessary to differentiate between the E484K and E484Q mutation.

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

---

<sup>3</sup>NI : not interpretable because of RT-PCR inhibition or extraction problems: no conclusion can be given. It is then recommended to collect a new sample and/or repeat the extraction and/or dilute the sample 5 times.

## **Limitations on use and interpretation:**

- ❖ The EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs kit is used for first-line diagnostic purposes.
- ❖ All samples should be treated as potentially infected with SARS-CoV-2, and local biosafety regulations should be carefully followed.
- ❖ Interpretation of results should consider the possibility of false negatives and false positives.

False negatives may be due to:

- Inadequate collection of samples, or incorrect storage,
- Samples outside the viremia phase,
- Inappropriate extraction conditions or use of non-validated PCR instruments,
- Experimentation not respecting all elements of these instructions for use.

False positives may be due to:

- Contamination due to mishandling of high positive samples, the positive control, or the PCR amplification products,
  - Failure to follow the procedure described in these instructions for use, especially to avoid sources of contamination.
- ❖ All results should be interpreted by medical professionals in the context of the patient's clinical situation, history and symptoms.
  - ❖ This assay does not exclude the presence of pathogens other than SARS-CoV-2.
  - ❖ A negative result of this assay does not absolutely exclude a possible SARS-CoV-2 infection.

## 13. Performance analysis

### **Detection limitation/analytical sensitivity on CP:**

SARS-CoV-2 : 5 copies/μL

E484K mutation : 5 copies/μL

E484Q mutation : 5 copies/μL

L452R mutation : 10 copies/μL

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

## Analytical detection/sensitivity limitation on a synthetic SARS-CoV-2 RNA of Beta variant (Twist Bioscience):

SARS-CoV-2 : 1 copy/ $\mu$ L

E484K mutation : 12,5 copies/ $\mu$ L

E484Q mutation : N/A

L452R mutation : N/A

NA : not applicable.

## Analysis of two reference samples provided by the CNR des Virus des Infections Respiratoires (Hospices Civils de Lyon) from viral culture supernatant\* :

### - Beta variant

SARS-CoV-2:  $5.10^{e3}$  copies/ $\mu$ L

E484K mutation:  $5.10^{e3}$  copies/ $\mu$ L

### - Delta variant

ID sample: hCoV-19/France/NAQ-HCL021079453301/2021

SARS-CoV-2:  $4.10^{e4}$  copies/ $\mu$ L

L452R mutation:  $4.10^{e4}$  copies/ $\mu$ L

\* RNA extracted from VERO cell cultures.

The validation of the performance was performed on:

| 114 negative samples            |                                                                                                        |
|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 94 SARS-CoV-2 negative samples  | Characterised with EurobioPlex EBX-041 CE-IVD kit                                                      |
| 20 positive respiratory samples | RSV-A/B, Parainfluenzae, Rhinovirus, Metapneumovirus, Bocavirus, CoV NL63, CoV OC43, CoV 229E, CoV KU1 |

| 128 positive samples                                                                                               |                                                                                                                          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 18 Alpha variant samples (lineage B.1.1.7)                                                                         | Characterised by sequencing                                                                                              |
| 22 Beta variant samples (lineage B.1.351)                                                                          | Characterised by sequencing                                                                                              |
| 3 samples with E484K mutation                                                                                      | Characterised by sequencing, EurobioPlex EBX-041 CE-IVD kit and Eurofins Genomics ViroBOAR Spike RT-PCR (SARS-CoV-2) kit |
| 63 SARS-CoV-2 positive samples not tested for the E484Q and L452R mutations, and not containing the E484K mutation | Characterised with EurobioPlex EBX-041 CE-IVD kit and Seegene Allplex SARS-CoV-2 Variants I Assay                        |
| 14 SARS-CoV-2 positive samples with L452R mutation <sup>1</sup>                                                    | Characterised with EurobioPlex EBX-041 CE-IVD kit and/or Seegene Allplex SARS-CoV-2 Variants I ou Variants II            |

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

|                                                                |                                                                |
|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| 5 SARS-CoV-2 positive samples with E484Q mutation <sup>2</sup> | Characterised with EurobioPlex EBX-041 CE-IVD kit              |
| 1 SARS-CoV-2 positive sample with L452R and E484Q mutations    | Characterised by sequencing and EurobioPlex EBX-041 CE-IVD kit |
| 2 SARS-CoV-2 positive samples with L452Q mutation              | Characterised by sequencing and EurobioPlex EBX-041 CE-IVD kit |

<sup>1</sup>Samples being sequenced for confirmation of the L452R mutation, or already characterised by sequencing as Delta variant (lineage B.1.617.2), or lineage A.27, or lineage C.36

<sup>2</sup>Samples being sequenced for confirmation of the E484Q mutation.

For this study, sample extraction was performed on Maelstrom 9600 (TANBead) with the OptiPure Viral Auto Plate kit (ref: W665A46), and RT-PCR on CFX96 (Bio-Rad).

## SARS-CoV-2 general performance

|                                        |                            | EBX-046: SARS-CoV-2 detection channel (Texas Red) |                     |
|----------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------------------|---------------------|
|                                        |                            | SARS-CoV-2 positive                               | SARS-CoV-2 negative |
| Pre-tested<br>EBX-041 or<br>sequencing | <b>SARS-CoV-2 positive</b> | 128                                               | 0                   |
|                                        | <b>SARS-CoV-2 negative</b> | 0                                                 | 114                 |

SARS-CoV-2 positive samples detected by the EBX-046 kit and pre-tested with the EBX-041 CE-IVD reference kit have Ct values between 9 and 37.

**General sensitivity:** > 99% (128/128)  
**General specificity:** > 99% (114/114)  
**General concordance:** > 99% (242/242)

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

Negative samples pre-tested with the EBX-041 CE-IVD kit:  
specificity for mutations of interest

| (-) negative             |       | SARS-CoV-2<br>(RdRp1/RdRp2 targets) | Mutations |       |       |
|--------------------------|-------|-------------------------------------|-----------|-------|-------|
|                          |       |                                     | E484K     | E484Q | L452R |
| SARS-CoV-2 negative      | N=114 | - (114/114)                         |           |       |       |
| Specificity to mutations |       | 100%                                |           |       |       |

Positive samples pre-tested with the EBX-041 CE-IVD kit or by sequencing:  
sensitivity for SARS-CoV-2 and specificity for mutations of interest

| N=128<br>(+) positive / (-) negative                        |      | SARS-CoV-2<br>(RdRp1/RdRp2 targets) | Mutations |       |       |
|-------------------------------------------------------------|------|-------------------------------------|-----------|-------|-------|
|                                                             |      |                                     | E484K     | E484Q | L452R |
| SARS-CoV-2 samples without E484K, E484Q, L452R mutations    | N=63 | + (63/63)                           | -         | -     | -     |
| Sensitivity to SARS-CoV-2                                   |      | 100%                                | N/A       |       |       |
| Specificity to mutations                                    |      | N/A                                 | 100%      |       |       |
| Alpha variant samples without E484K, E484Q, L452R mutations | N=18 | + (18/18)                           | -         | -     | -     |
| Sensitivity to SARS-CoV-2                                   |      | 100%                                | N/A       |       |       |
| Specificity to mutations                                    |      | N/A                                 | 100%      |       |       |

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

|                                              |      |             |             |         |           |
|----------------------------------------------|------|-------------|-------------|---------|-----------|
| <b>Samples with E484K mutation</b>           | N=25 | + (25/25)   | + (25/25)   | -       | -         |
| Sensitivity to SARS-CoV-2                    |      | <b>100%</b> | N/A         |         |           |
| Specificity to mutations                     |      | N/A         | <b>100%</b> |         |           |
| <b>Samples with L452R mutation</b>           | N=14 | + (14/14)   | -           | -       | + (14/14) |
| Sensitivity to SARS-CoV-2                    |      | <b>100%</b> | N/A         |         |           |
| Specificity to mutations                     |      | N/A         | <b>100%</b> |         |           |
| <b>Samples with E484Q mutation</b>           | N=5  | + (5/5)     | -           | + (5/5) | -         |
| Sensitivity to SARS-CoV-2                    |      | <b>100%</b> | N/A         |         |           |
| Specificity to mutations                     |      | N/A         | <b>100%</b> |         |           |
| <b>Sample with L452R and E484Q mutations</b> | N=1  | + (1/1)     | -           | + (1/1) | + (1/1)   |
| Sensitivity to SARS-CoV-2                    |      | <b>100%</b> | N/A         |         |           |
| Specificity to mutations                     |      | N/A         | <b>100%</b> |         |           |
| <b>Samples with L452Q mutation</b>           | N=2  | + (2/2)     | -           | -       | -         |
| Sensitivity to SARS-CoV-2                    |      | <b>100%</b> | N/A         |         |           |
| Specificity to mutations                     |      | N/A         | <b>100%</b> |         |           |

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

**484K sensitivity:** > 99% (25/25)  
**E484K specificity:** > 99% (217/217)  
**E484K concordance:** > 99% (242/242)

**E484Q sensitivity:** > 99% (6/6)  
**E484Q specificity:** > 99% (236/236)  
**E484Q concordance:** > 99% (242/242)

**L452R sensitivity:** > 99% (15/15)  
**L452R specificity:** > 99% (227/227)  
*No cross with L452Q mutation detected in the Quasar 705 channel (L452R)*  
**L452R concordance:** > 99% (242/242)

## Signal variability on FAM, HEX, Texas Red, Cy5 and Quasar 705 channels

- Intra-experimental variability:

| Mean CV % |       |       |            |                             |
|-----------|-------|-------|------------|-----------------------------|
| E484K     | E484Q | L452R | SARS-CoV-2 | Endogenous internal control |
| 1,70%     | 1,73% | 1,11% | 1,08%      | 2,03%                       |

CV: coefficient of variation

- Inter-batch variability:

| Mean CV % |       |       |            |                             |
|-----------|-------|-------|------------|-----------------------------|
| E484K     | E484Q | L452R | SARS-CoV-2 | Endogenous internal control |
| 2,12%     | 2,00% | 4,93% | 2,90%      | 3,83%                       |

CV: coefficient of variation

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

## Diagnostic specificity

This validation included:

- 44 samples negative for all known coronaviruses, including respiratory panel samples characterised for other viruses to test for cross-reactions.
- 7 positive samples for CoV NL63 (n=3) or CoV OC43 (n=2) or CoV 229E (n=1) or CoV KU1 (n=1).

| Number of samples | Positive for                       | Coronavirus | Status SARS-CoV-2 EBX-046 |
|-------------------|------------------------------------|-------------|---------------------------|
| 1                 | Adenovirus                         | Negative    | Negative                  |
| 2                 | RSV A ou B                         | Negative    | Negative                  |
| 7                 | Parainfluenzae                     | Negative    | Negative                  |
| 1                 | Rhinovirus                         | Negative    | Negative                  |
| 2                 | Metapneumovirus                    | Negative    | Negative                  |
| 1                 | Bocavirus                          | Negative    | Negative                  |
| 2                 | Legionella pneumoniae              | Negative    | Negative                  |
| 3                 | Mycoplasma pneumoniae              | Negative    | Negative                  |
| 3                 | Mycoplasma tuberculosis            | Negative    | Negative                  |
| 2                 | Bordetella pertussis               | Negative    | Negative                  |
| 1                 | Parechovirus Type 1                | Negative    | Negative                  |
| 1                 | Parechovirus Type 2                | Negative    | Negative                  |
| 1                 | Parechovirus Type 3                | Negative    | Negative                  |
| 1                 | Parechovirus Type 4                | Negative    | Negative                  |
| 1                 | Parechovirus Type 5                | Negative    | Negative                  |
| 1                 | Parechovirus Type 6                | Negative    | Negative                  |
| 3                 | Enterovirus                        | Negative    | Negative                  |
| 1                 | Streptococcus pyogenes             | Negative    | Negative                  |
| 3                 | Streptococcus pneumoniae           | Negative    | Negative                  |
| 2                 | Staph.epiderm/oralis/mitis/sanguis | Negative    | Negative                  |
| 3                 | Candida albicans                   | Negative    | Negative                  |
| 2                 | Pseudomonas aeruginosa             | Negative    | Negative                  |
| 3                 | CoV NL63                           | Positive    | Negative                  |
| 2                 | CoV OC43                           | Positive    | Negative                  |
| 1                 | CoV 229E                           | Positive    | Negative                  |
| 1                 | CoV KU1                            | Positive    | Negative                  |

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

In silico analysis was used and demonstrated the specificity of the primers and probes for SARS-CoV-2. For example, on the sequences of MERS and SARS viruses, no significant homology of SARS-CoV-2 primers and probes that could amplify these viruses was found.

## 14. Comparative analysis of the EBX-046 kit's diagnostic performance versus a commercial reference kit

The performance analysis of the EurobioPlex EBX-046 kit was conducted in comparison with another commercial CE-IVD reference kit by an external laboratory. The reference kit detects the presence of SARS-CoV-2 and targets the N501Y and E484K mutations, compared to our EBX-046 kit which detects the presence of SARS-CoV-2 and targets the E484K, E484Q and L452R mutations.

For this comparative study, 44 samples were tested and analysed. Four of the samples were retested with the EurobioPlex EBX-041 CE-IVD and Seegene Allplex SARS-CoV-2 Variants I Assay kits to validate their positivity to SARS-CoV-2.

|                              | EurobioPlex EBX-046 kit                |             |       |       | CE-IVD reference kit              |             |
|------------------------------|----------------------------------------|-------------|-------|-------|-----------------------------------|-------------|
|                              | SARS-CoV-2<br>(RdRp1/RdRp2<br>targets) | Mutations   |       |       | SARS-CoV-2<br>(RdRp/N<br>targets) | Mutations   |
|                              |                                        | E484K       | E484Q | L452R |                                   | E484K       |
|                              | + (42/44)                              | + (6/44)    | -     | -     | + (44/44)                         | + (6/44)    |
| Sensitivity to<br>SARS-CoV-2 | <b>95,45%*</b>                         | N/A         |       |       | <b>100%</b>                       | N/A         |
| Specificity to<br>mutations  | N/A                                    | <b>100%</b> |       |       | N/A                               | <b>100%</b> |

*\*Two samples were identified as negative for SARS-CoV-2. They have a very low viral charge, with no evident clinical significance (Ct>33,) and at the limit of sensitivity, which does not affect the possible use of the EBX-046 kit as a first-line test. This opinion, relating to weakly positive RT-PCR and the relevance of nasal swabbing, was issued by the Haut Conseil de la santé publique in November 2020 in an official press release (<https://www.hcsp.fr/Explore.cgi/AvisRapportsDomaine?clefr=963>).*

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

---

## 15. Bibliography

Cherian, Sarah, Varsha Potdar, Santosh Jadhav, Pragya Yadav, Nivedita Gupta, Mousmi Das, Partha Rakshit, et al. 2021. « Convergent Evolution of SARS-CoV-2 Spike Mutations, L452R, E484Q and P681R, in the Second Wave of COVID-19 in Maharashtra, India ». Preprint. Molecular Biology. <https://doi.org/10.1101/2021.04.22.440932>.

Hu, Ben, Hua Guo, Peng Zhou, et Zheng-Li Shi. 2021. « Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19 ». *Nature Reviews Microbiology* 19 (3): 141-54. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>.

Lauring, Adam S., et Emma B. Hodcroft. 2021. « Genetic Variants of SARS-CoV-2—What Do They Mean? » *JAMA* 325 (6): 529. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.27124>.

Plante, Jessica A., Brooke M. Mitchell, Kenneth S. Plante, Kari Debbink, Scott C. Weaver, et Vineet D. Menachery. 2021. « The Variant Gambit: COVID-19's next Move ». *Cell Host & Microbe* 29 (4): 508-15. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.02.020>.

Seyed Hosseini, Elahe, Narjes Riahi Kashani, Hossein Nikzad, Javid Azadbakht, Hassan Hassani Bafrani, et Hamed Haddad Kashani. 2020. « The Novel Coronavirus Disease-2019 (COVID-19): Mechanism of Action, Detection and Recent Therapeutic Strategies ». *Virology* 551 (décembre): 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.08.011>.

Srivastava, Surabhi, Sofia Banu, Priya Singh, Divya Tej Sowpati, et Rakesh K. Mishra. 2021. « SARS-CoV-2 Genomics: An Indian Perspective on Sequencing Viral Variants ». *Journal of Biosciences* 46 (1): 22. <https://doi.org/10.1007/s12038-021-00145-7>.

European Centre for Disease Prevention and Control :  
<https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern>

Haut Conseil de la Santé Publique :  
<https://www.hcsp.fr/Explore.cgi/AvisRapportsDomaine?clefr=963>

## 16. Quality control

In accordance with Eurobio's ISO EN 13485 certified quality management system, each batch of EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs is tested according to predefined specifications to ensure consistent product quality.

# Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 SNPs

---

## 17. Waste disposal

Eliminate all waste in accordance with the legislation on DASRI.

## 18. Incident report

Serious incidents related to the system must be reported to Eurobio Scientific and to the competent authority of the Member States in which the user and/or the patient is registered.

## 19. Technical assistance

For assistance with our products, please contact our technical support.

Eurobio Scientific's customer service can be contacted by e-mail at [adv@eurobio.fr](mailto:adv@eurobio.fr) or by phone at +33 (0)1.69.07.94.77.



7, avenue de Scandinavie  
91940 Les Ulis Cedex  
FRANCE