



EurobioPlex

SARS-CoV-2 Fast-SVD

Screening and Variants Detection

RT-PCR EN TEMPS REEL

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

REF EBX-047

EBX-047-48

EBX-047-192



48/96/192 réactions



Version 2.00 – Décembre 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

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

Table des matières

1.	Informations générales.....	3
2.	Destination du dispositif.....	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	8
10.	Protocole.....	10
11.	Validation de l'expérimentation	14
12.	Analyse des données et interprétation	17
13.	Analyse des performances.....	19
14.	Bibliographie.....	24
15.	Contrôle qualité	25
16.	Elimination des déchets.....	25
17.	Déclaration d'incident	25
18.	Assistance technique	25

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

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^{ème} 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.
- Variant nommé Omicron apparu en Afrique du Sud au cours du mois de novembre 2021 portant jusqu'à 61 mutations réparties dans plusieurs régions du génome viral dont la mutation K417N.

L'intérêt de la différenciation des variants de la Covid-19 est donc de s'intéresser au variant Delta, Beta ainsi qu'au variant Omicron sur lesquelles les vaccins actuellement disponibles pourraient n'avoir que peu ou pas d'effet, puisque ce sont des mutations responsables de l'échappement immunitaire. La stratégie d'identification des variants mise en place vise à identifier prioritairement les mutations d'échappement immunitaire, et non plus à distinguer

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

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

Le kit EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD 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 Fast-SVD 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 K417N (criblage du variant Omicron et Beta), E484K (criblage du variant Beta et Gamma) et L452R (criblage du variant Delta) de façon qualitative. La présence de la mutation K417N seule (sans la mutation E484K) permet de différencier le variant Omicron du variant Beta et de cribler le variant Omicron. Si la mutation K417N est détectée, alors l'échantillon devra être étudié en séquençage afin de cribler le variant Omicron (et donc de le différencier du variant beta).

L'extrait d'ARN est le matériel de départ pour le kit EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD. 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 Fast-SVD est un dispositif médical de diagnostic *in vitro* exclusivement destiné à la détection du SARS-CoV-2 et des mutations d'intérêt pour différencier le variant Omicron, des variants Delta, Beta et Gamma.

Il peut être utilisé conjointement pour un diagnostic de première intention et le typage des mutations E484K, K417N et L452R.

Le test EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD 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 Fast-SVD

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 Fast-SVD

4. Principe

Le kit EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD 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 L452R, K417N, E484K et faire 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 Fast-SVD. 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 marquée en FAM, HEX, Texas Red et 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
Cible 1 / Mutation E484K	FAM	495 nm	515 nm
Cible 2 / Mutation K417N	HEX	535 nm	555 nm
Cible 3 / Gène RdRP1/RdRP2	Texas Red	585 nm	605 nm
Cible 4 / Mutation L452R	Quasar 705	681 nm	698 nm
Contrôle interne endogène	Cy5	650 nm	670 nm

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

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 Fast-SVD 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
Rouge	Enzymes	325 µL	750 µL	1250 µL	Prêt à l'emploi
Transparent	Oligomix	260 µL	600 µL	1000 µl	Prêt à l'emploi
Jaune	Contrôle Positif (CP)*	80 µL	160 µL	320 µl	Prêt à l'emploi
Bleu	Eau = Contrôle Négatif (CN-H2O)	1500 µL	1500 µL	2 x 1500 µl	Prêt à l'emploi

Oligomix : contient les amorces et sondes pour les 4 cibles et pour le contrôle endogène

*CP : mélange plasmidique (ALB-P, RdRp1-P, RdRp2-P, VAR452-P et VAR452-P2)

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

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.



La sensibilité du dépistage peut diminuer si les composants du kit subissent plusieurs cycles de congélation/décongélation. Le kit peut être utilisé après l'ouverture initiale pendant un maximum de 5 cycles de congélation et décongélation.

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 Fast-SVD 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)

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.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

- ◇ 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.
- ◇ Les sondes fluorescentes contenues dans l'oligomix sont sensibles à la lumière. Toute exposition prolongée de l'oligomix à la lumière doit être limitée au temps technique nécessaire à la préparation de la plaque PCR.
- ◇ 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.
- ◇ Le contrôle interne endogène détecte une cible cellulaire détectable dans tous les échantillons d'origine humaine mais pas dans le contrôle négatif CN-H2O fourni dans la trousse. L'absence de signal au niveau du contrôle négatif permet de prévenir la survenue de contaminations croisées.
- ◇ 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.

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	
	◇ 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 ◇ Les ARN extraits doivent être stockés à -80°C. ◇ Le transport des échantillons cliniques est soumis à la réglementation locale pour le transport des agents infectieux.

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. 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-047, 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 Fast-SVD

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-H2O) (voir II-2/6 du protocole de RT-PCR en temps réel).

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

Schéma de la procédure :

1 - PREPARATION MELANGE REACTIONNEL / MASTERMIX

Nombre de réactions	N+3
Mix enzymatique	(N+3) x 6,25 µL
Eau	(N+3) x 8,75 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-H₂O)



3 – INSTRUMENT PCR EN TEMPS REEL

Programme	Température	Durée	Cycle(s)	
Reverse Transcription	45°C	5 min	1	-
Dénaturation	98°C	20 sec	1	-
Amplification	98°C	3 sec	40	-
	58°C	10 sec		Acquisition de fluorescence

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

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*
Enzymes	(N+3) x 6,25 µL
Eau	(N+3) x 8,75 µL
Oligomix	(N+3) x 5 µL
Volume total Mastermix	(N+3) x 20 µL

**Pour les petites séries (≤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	5 min	1	-
Dénaturation	98°C	20 sec	1	-
Amplification	98°C	3 sec	40	-
	58°C	10 sec		Acquisition de fluorescence

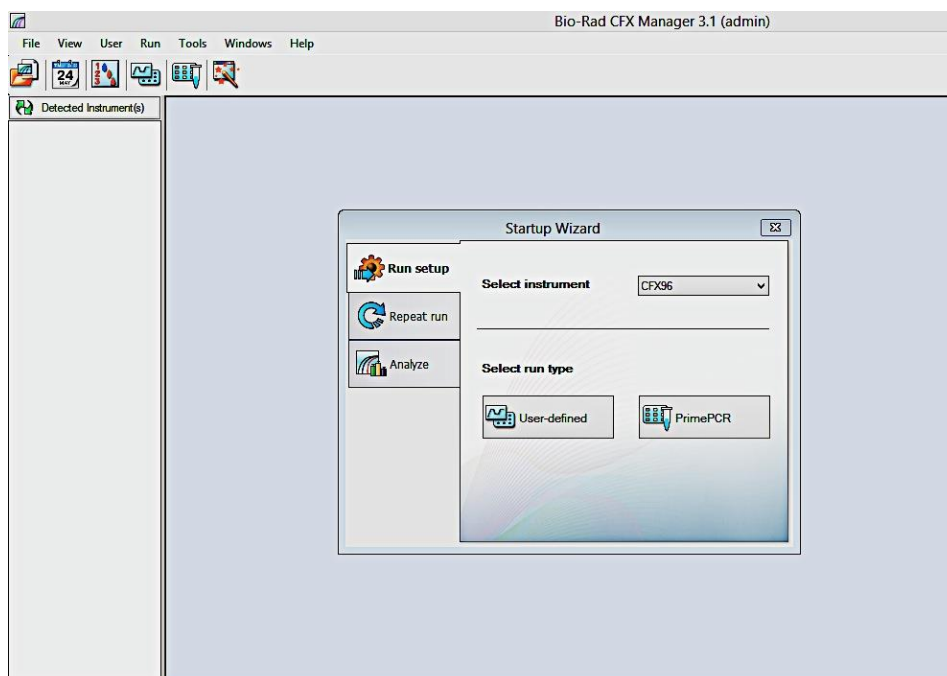
Note 1 : Sur CFX96™ (Bio-Rad), lancer le run à partir de la version 1.6 ou postérieure, puis analyser avec la version 3.1 (voir § Validation de l'expérience). **Veillez à bien utiliser des plaques PCR blanches pour une lecture appropriée dans tous les canaux.**

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

11. Validation de l'expérimentation

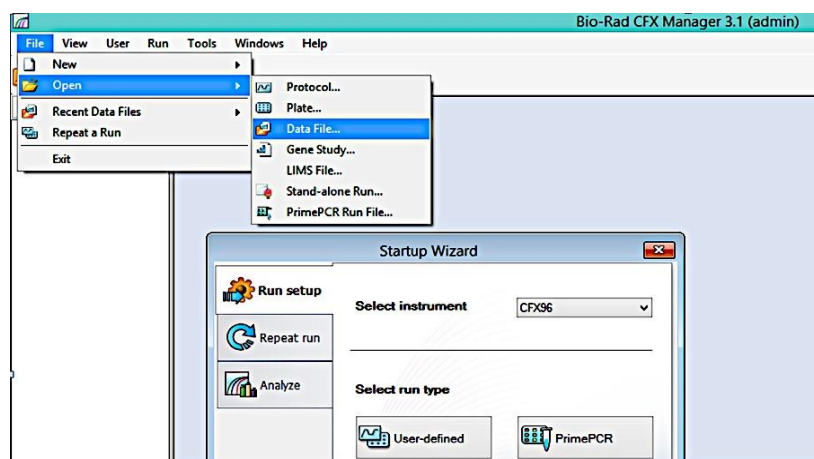
L'analyse des data post-acquisition sur un appareil de PCR CFX96 (Bio-Rad) doit être réalisée à l'aide de la version 3.1 du logiciel CFX Manager (Bio-Rad). Afin de passer sur cette version à partir d'un run lancé sur une version antérieure, veuillez suivre la procédure suivante : à la fin du run, le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



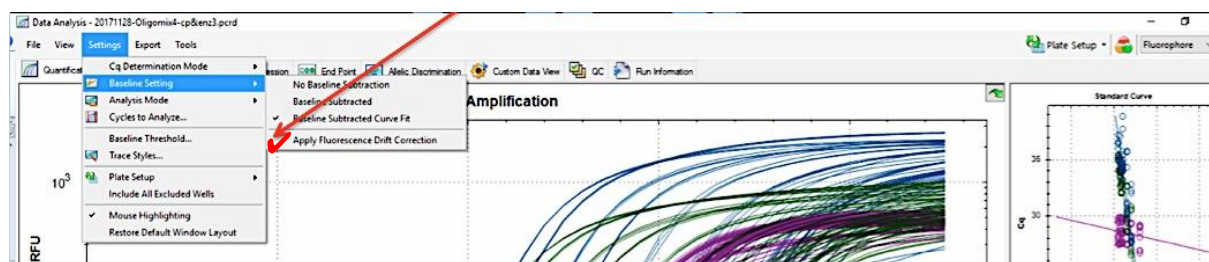
Cliquer sur « File » et sélectionner « Open » puis « Data File ».

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

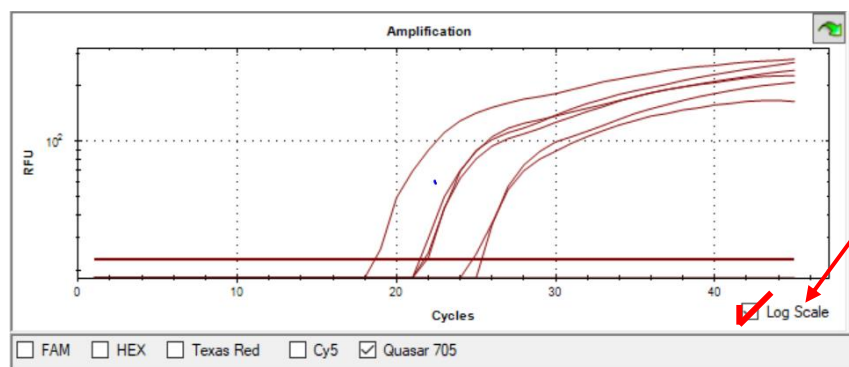


Sélectionner le fichier que vous souhaitez analyser et cliquer sur « Ouvrir ».

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 ».

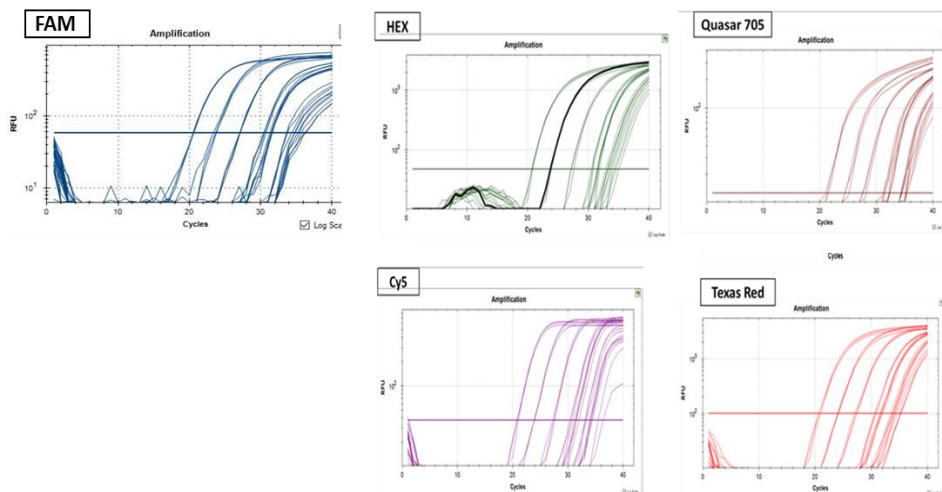


Pour optimiser l'analyse du run, cocher la case « Log Scale » pour chaque canal analysé. Ensuite, placer la barre de seuil (*threshold*) au-dessus du bruit de fond correspondant au milieu de la phase exponentielle. Les 5 canaux d'intérêt présentent des RFU très élevés et différents selon le canal considéré,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



Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

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 Fast-SVD

12. Analyse des données et interprétation

Pour les échantillons cliniques, les résultats suivants sont possibles :

***Seuil de Ct pour échantillon : + Positif → Ct positif < 40**

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 K417N (HEX), mutation L452R (Quasar 705), Contrôle interne endogène (Cy5) : Ct < 40

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

Validité du test					
FAM	HEX	Texas Red	Quasar 705	Cy5	
-	-	+/- ¹	+	+/-	Positif SARS-CoV-2 et présence de la mutation L452R (Delta suspecté)
-	+	+/- ¹	-	+/-	Positif SARS-CoV-2 et présence de la seule mutation K417N (Omicron suspecté)
-	-	+	-	+/-	Positif SARS-CoV-2 sans mutations K417N, E484K et L452R (Beta et Delta exclus)
+	+	+/- ¹	-	+/-	Positif SARS-CoV-2 et présence des mutations K417N et E484K (Beta suspecté)
+	-	+/- ¹	-	+/-	Positif SARS-CoV-2 et présence de la mutation E484K (Gamma suspecté)
-	-	-	-	+	Négatif SARS-CoV-2
-	-	-	-	-	NI ²

¹+/- : 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.

²NI : 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.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD



Le typage des mutations E484K, K417N et L452R est présomptif. Seul un séquençage génomique délivre un résultat définitif.

Limites d'utilisation et d'interprétation :

- ❖ Le kit EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD 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.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

13. Analyse des performances

Limite de détection/sensibilité analytique

Une gamme de dilution a été réalisée à partir d'un mélange plasmidique allant de 10^5 à 1 copie/ μ L. Cette gamme de dilution a été utilisée pour déterminer la limite de détection du kit EBX-047.

Limite de détection/sensibilité analytique sur mélange plasmidique :

SARS-CoV-2 : 5 copies/ μ L

Mutation K417N : 5 copies/ μ L

Mutation L452R : 5 copies/ μ L

Mutation E484K : 5 copies/ μ L

CI Cy5 : 10 copies/ μ L

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

■ Variabilité intra-expérience :

Moyenne CV %				
E484K	K417N	L452R	SARS-CoV-2	Contrôle interne endogène
1.07%	1.24%	1.85%	0.85%	1.12%

CV: coefficient de variation

■ Variabilité inter-lots :

Moyenne CV %				
E484K	K417N	L452R	SARS-CoV-2	Contrôle interne endogène
1.27%	0.53%	5.93%	0.53%	0.89%

CV: coefficient de variation

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

Spécificité diagnostique

Cette validation a porté sur :

- 40 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-047
1	Adenovirus	Négatif	Négatif
5	Parainfluenzae	Négatif	Négatif
1	Rhinovirus	Négatif	Négatif
1	Bocavirus	Négatif	Négatif
2	Legionella pneumoniae	Négatif	Négatif
1	Metapneumovirus	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
1	HPV	Négatif	Négatif

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

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.

Aucune aspécificité ou cross réaction n'a été détectée.

Le kit est 100 % spécifique.

Sensibilité diagnostique

La validation des performances a porté sur :

570 échantillons négatifs	
523 échantillons SARS-CoV-2 négatifs	Caractérisés avec kit EurobioPlex EBX-046 CE-IVD
47 échantillons respiratoires positifs	RSV-A/B, Parainfluenzae, Rhinovirus, Metapneumovirus, CoV NL63, CoV OC43, CoV 229E, CoV KU1

269 échantillons positifs	
165 échantillons variant Beta	Caractérisés avec kit EurobioPlex EBX-046 CE-IVD
10 échantillons variant Alpha ou WT*	Caractérisés avec kit EurobioPlex EBX-046 CE-IVD
3 échantillons variant Gamma	Caractérisés avec kit EurobioPlex EBX-046 CE-IVD
91 échantillons variant Delta	Caractérisés avec kit EurobioPlex EBX-046 CE-IVD

*Aucun des deux kits EBX-047 ou EBX-046 ne pouvant différencier un variant Alpha d'un Wild Type.

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).

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

Performance générale SARS-CoV-2

		EBX-047 : Canal de détection du SARS-CoV-2 (Texas Red)	
		Positifs SARS-CoV-2	Négatifs SARS-CoV-2
Pré-testés EBX-046	Positifs SARS-CoV-2	269	0
	Négatifs SARS-CoV-2	0	570

Sensibilité globale : > 99% (269/269)

Spécificité globale : > 99% (570/570)

Concordance globale : > 99% (839/839)

Echantillons négatifs pré-testés avec le kit CE-IVD EBX-046 :

spécificité pour les mutations d'intérêt

		SARS-CoV-2 (cibles RdRp1/RdRp2)
SARS-CoV-2 négatifs	N=570	(570/570)
Spécificité vis-à-vis des mutations		100%

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

Echantillons SARS-CoV-2 positifs pré-testés avec le kit CE-IVD EBX-046:
sensibilité pour le SARS-CoV-2 et spécificité pour les mutations d'intérêt

N=269 (+) positif / (-) négatif		SARS-CoV-2 (cibles RdRp1/RdRp2)	Mutations		
			L452R	K417N	E484K
Echantillons SARS-CoV-2 ne portant pas les mutations L452R, K417N et E484K	N=10	+ (10/10)	-	-	-
Sensibilité vis-à-vis du SARS-CoV-2		100%	N/A		
Spécificité vis-à-vis des mutations		N/A	100%		
Echantillons variant Beta portant les mutations K417N et E484K	N=165	+ (165/165)	-	+ (165/165)	+ (165/165)
Sensibilité vis-à-vis du SARS-CoV-2		100%	N/A		
Spécificité vis-à-vis des mutations		N/A	N/A	100%	100%
Echantillons variant Delta portant la mutation L452R	N=91	+ (91/91)	+ (91/91)	-	-
Sensibilité vis-à-vis du SARS-CoV-2		100%	N/A		
Spécificité vis-à-vis des mutations		N/A	100%	N/A	N/A
Echantillons variant Gamma portant la mutation E484K		+ (3/3)	-	-	+ (3/3)
Sensibilité vis-à-vis du SARS-CoV-2		100%	N/A		
Spécificité vis-à-vis des mutations		N/A	N/A	N/A	100%

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

Sensibilité K417N : > 99% (165/165)
Spécificité K417N : > 99% (104/104)
Concordance K417N : > 99% (269/269)

Sensibilité L452R : > 99% (91/91)
Spécificité L452R : > 99% (178/178)
Concordance L452R : > 99% (269/269)

Sensibilité E484K : > 99% (168/168)
Spécificité E484K : > 99% (101/101)
Concordance E484K : > 99% (269/269)

14. 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>

<https://doi.org/10.1101/2021.08.04.455140>

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

15. Contrôle qualité

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

16. Elimination des déchets

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

17. Déclaration d'incident

Tout incident grave survenu en lien avec le réactif 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.

18. 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 ou par téléphone au +33 (0)1.69.07.94.77.





EurobioPlex

SARS-CoV-2 Fast-SVD

Screening and Variants Detection

REAL-TIME RT-PCR

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

REF

EBX-047

EBX-047-48

EBX-047-192



48/96/192 reactions



Version 2.00 – December 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

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

Table of contents

1. Introduction.....	28
2. Purpose of the system.....	31
3. Symbols	30
4. Principle of detection	31
5. Content of the kit	32
6. Storage.....	32
7. Materials required not provided	33
8. Real-time PCR instrument	33
9. Cautions and note	33
10. Procedure	34
11. Validation of the experiment	38
12. Data analysis and interpretation	41
13. Performance analysis	42
14. Bibliography.....	53
15. Quality control.....	53
16. Waste disposal.....	54
17. Incident report.....	48
18. Technical assistance	49

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

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.
- A variant called Omicron appeared in South Africa in November 2021 carrying up to 61 mutations in several regions of the viral genome including the K417N mutation.

The interest of the differentiation of the variants of Covid-19 is therefore to focus on the Delta, Beta variants as well as the Omicron variant on which the currently available vaccines could have little or no effect, since these are mutations responsible for immune escape. The identification strategy of the variants set up aims at identifying immune escape mutations as a priority, rather than distinguishing variants. This strategy will allow faster management of patients with variants with this type of mutation.

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

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

2. Purpose of the system

The EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD test is a real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) assay which, in a single test, identifies the prevalence of SARS-CoV-2 and distinguishes between the K417N (Omicron and Beta variant screening), E484K (Beta and Gamma variant screening) and L452R (Delta variant screening) mutations in a qualitative manner. The presence of the K417N mutation alone (without the E484K mutation) allows the Omicron variant to be differentiated from the Beta variant and to screen for the Omicron variant. If the K417N mutation is detected, then the sample should be studied in sequencing in order to screen for the Omicron variant (and thus differentiate it from the beta variant).

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

The EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD kit is an in Vitro Diagnostic Medical Device for the detection of SARS-CoV-2 and mutations of interest for differentiating the Omicron variant from the Delta and Beta variant. This kit is available for first-line diagnostic purposes.

It can be used jointly for first-line diagnosis and typing of E484K, K417N and L452R mutations

The EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD test must be used by qualified medical laboratory personnel. It is for single use only and should not be recycled after use.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

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 Fast-SVD

4. Principle of detection

The EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD kit is a qualitative ribonucleic acid (RNA) amplification test that allows the analysis of :

- The presence of two targets (RdRp1/RdRp2) of SARS-CoV-2 on the RdRp gene, in the same reading channel.
- The presence of the L452R (Delta variant screening), K417N (Omicron variant screening) and E484K (Gamma variant screening), E484K and K417N (Beta variant screening) mutations and distinguish them in two different 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 latter allows to determine possible variations that may occur during the RNA extraction and real-time RT-PCR amplification steps. It ensures that a negative result cannot be due to poor RNA extraction and/or the presence of too many RT-PCR inhibitors.

The RNA extract is the starting material for the EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD kit. The RNA is extracted from a patient's nasopharyngeal swab.

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

Table 1: Detection of targets by fluorophores

Targets	Fluorophore	Excitation	Emission
Target 1 / E484K mutation	FAM	495 nm	515 nm
Target 2 / K417N mutation	HEX	535 nm	555 nm
Target 3 / RdRP1/RdRP2 gene	Texas Red	585 nm	605 nm
Target 4 / L452R mutation	Quasar 705	681 nm	698 nm
Endogenous internal control	Cy5	650 nm	670 nm

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

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),
- **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
Red	Enzymes	325 µL	750 µL	1250 µL	Ready to use
Transparent	Oligomix	260 µL	600 µL	1000 µl	Ready to use
Yellow	Positive control (PC)*	80 µL	160 µL	320 µl	Ready to use
Blue	Water = Negative Control (CN-H ₂ O)	1500 µL	1500 µL	2 x 1500 µl	Ready to use

Oligomix: contains primers and probes for the 4 targets and for the endogenous control

*PC: plasmid mixture (ALB-P, RdRp1-P, RdRp2-P, VAR452-P and VAR452-P2)

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 sensitivity of the assay may decrease if the kit components undergo multiple freeze/thaw cycles. The kit can be used after the initial opening for up to 5 freeze/thaw cycles.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

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 Fast-SVD 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.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

- ◇ 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.
- ◇ The fluorescent probes in the oligomix are light sensitive. Any prolonged exposure of the oligomix to light should be limited to the technical time required to prepare the PCR plate.
- ◇ 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 (talc-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.
- ◇ The internal endogenous control detects a detectable cell target in all samples of human origin but not in the CN-H2O negative control provided in the kit. The absence of a signal in the negative control prevents cross-contamination from occurring.
- ◇ 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.

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

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

Caution	
	◇ 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. ◇ Extracted RNA should be stored at -80°C. ◇ The transport of clinical samples is subject to local regulations for the transport of infectious agents.

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. 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-047 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).

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-H₂O) (see II-2/6 of the real-time RT-PCR protocol).

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

Diagram of the procedure:

1 - PREPARATION OF MASTERMIX

Number of reactions	N+3
Enzymes	(N+3) x 6,25 µl
Water	(N+3) x 8,75 µl
Oligomix	(N+3) x 5 µl
Total Volume Mastermix	(N+3) x 20 µl

2 - PREPARATION OF REACTIONS

Sample

20 µl Mastermix
+
5µl RNA sample

Positive Control

20 µl Mastermix
+
5µl PC

Negative Control

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

3 – REAL TIME PCR INSTRUMENT

Program	Temperature	Duration	Cycle(s)	
Reverse Transcription	45°C	5 min	1	-
Denaturation	98°C	20 sec	1	-
Amplification	98°C	3 sec	40	-
	58°C	10 sec		Acquisition of fluorescence

d. Detailed procedure

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

- 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.

Number of reactions	N+3
Enzymes	(N+3) x 6,25 µl
Water	(N+3) x 8,75 µl
Oligomix	(N+3) x 5 µl
Total Volume 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 PC.
 - Negative Control:
 - 20 µL of Mastermix + 5 µL supplied water (CN-H2O).
- 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.

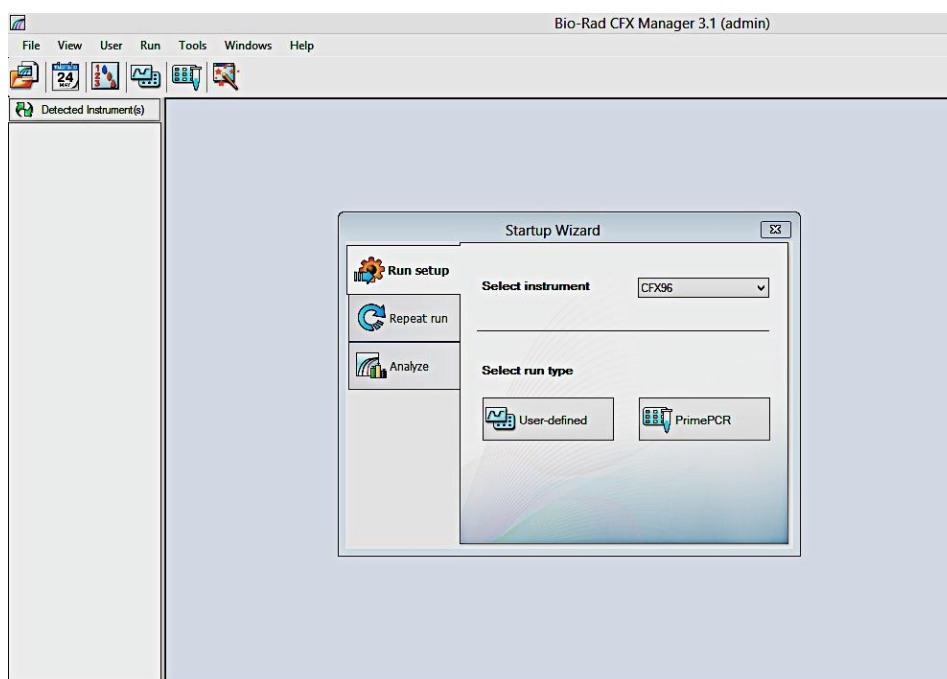
Program	Temperature	Duration	Cycle(s)	
Reverse Transcription	45°C	5 min	1	-
Denaturation	98°C	20 sec	1	-
Amplification	98°C	3 sec	40	-
	58°C	10 sec		Acquisition of fluorescence

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.**

11. Validation of the experiment

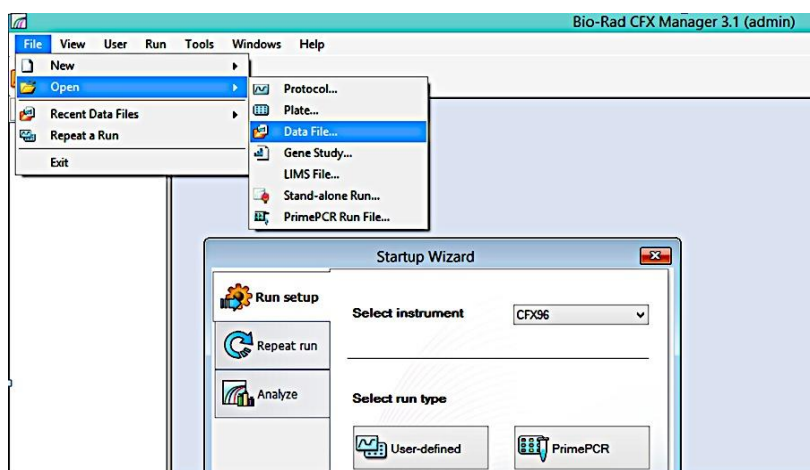
Post-acquisition data analysis on a CFX96 PCR instrument (Bio-Rad) must be performed using version 3.1 of the CFX Manager software (Bio-Rad). In order to change to this version from a run started on an earlier version, please follow the procedure below: At the end of the run, the data file with the extension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



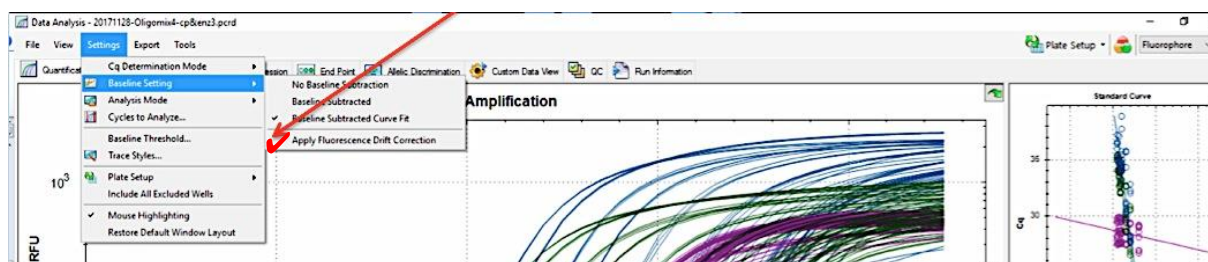
Click on "File" and select "Open" then "Data File".

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

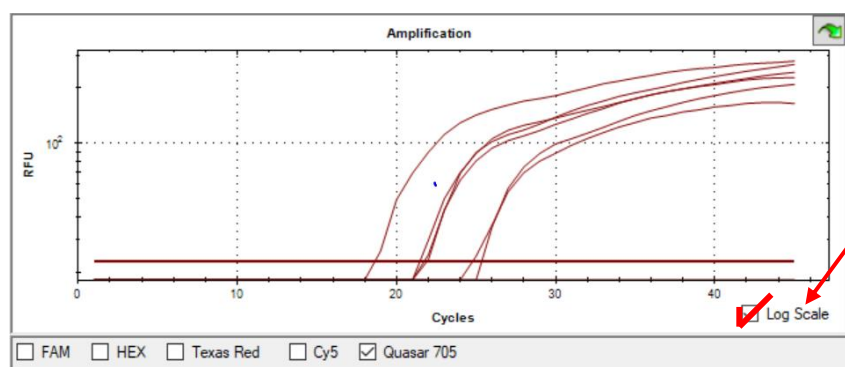


Select the file you need to analyse and click on "Open".

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".

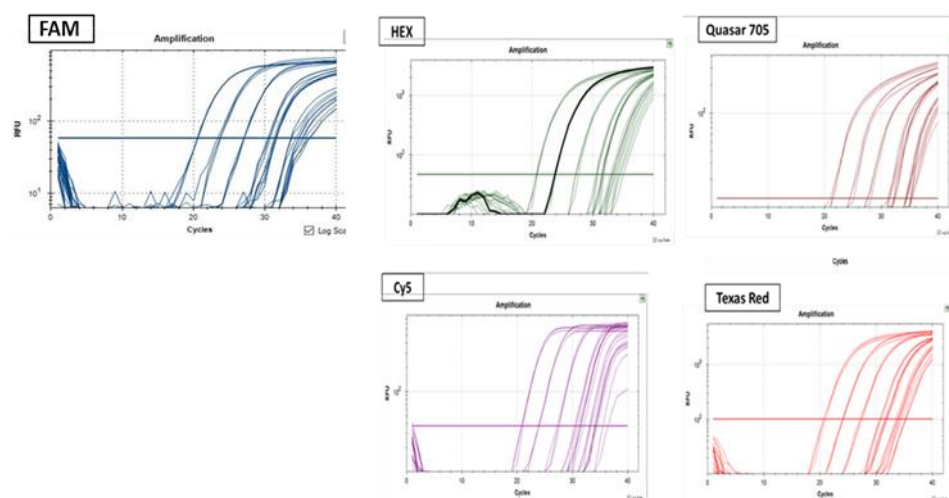


To optimise the run analysis, select the "Log Scale" checkbox for each channel analysed. Then place the threshold bar above the background noise corresponding to the middle of the exponential phase. The 5 channels of interest have high RFUs and differ according to the channel considered, so the "Log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



Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

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 Fast-SVD

12. Data analysis and interpretation

For clinical samples, the following results are possible:

* Ct threshold for sample: + Positive → positive Ct < 40

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

Analyse the results as described below.



SARS-CoV-2 (Texas Red), E484K mutation (FAM), K417N mutation (HEX), L452R mutation (Quasar 705), Endogenous internal control (Cy5) : Ct < 40

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

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

Test validity					
FAM	HEX	Texas Red	Quasar 705	Cy5	
-	-	+/- ¹	+	+/-	SARS-CoV-2 positive and presence of L452R mutation (Delta suspected)
-	+	+/- ¹	-	+/-	SARS-CoV-2 positive and presence of K417N mutation alone (Omicron suspected)
-	-	+	-	+/-	SARS-CoV-2 positive without K417N, E484K and L452R mutations (Omicron, Beta et Delta excluded)
+	+	+/- ¹	-	+/-	SARS-CoV-2 positive and presence of K417N and E484K mutations (Beta suspected)
+	-	+/- ¹	-	+/-	SARS-CoV-2 positive and presence of E484K mutation (Gamma suspected)
-	-	-	-	+	SARS-CoV-2 negative
-	-	-	-	-	NI ²

¹+/- : 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.

²NI: 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.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD



Typing for E484K, K417N and L452R mutations is presumptive. Only genomic sequencing provides a definitive result.

Limitations on use and interpretation:

- ❖ The EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD 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 limit/analytical sensitivity

A dilution range was performed from a plasmid mixture ranging from 10^5 to 1 copy/ μ L. This dilution range was used to determine the detection limit (LoD) of the kit.

Detection limit/analytical sensitivity on plasmid mixture:

SARS-CoV-2 : 5 copies/ μ L
K417N mutation : 5 copies/ μ L
L452R mutation : 5 copies/ μ L
E484K mutation : 5 copies/ μ L
IC Cy5 : 10 copies/ μ L

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

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

- Intra-experimental variability:

Mean CV %				
E484K	K417N	L452R	SARS-CoV-2	Endogenous internal control
1,07%	1,24%	1,85%	0,85%	1,12%

CV: coefficient of variation

- Inter-batch variability:

Mean CV %				
E484K	K417N	L452R	SARS-CoV-2	Endogenous internal control
1,27%	0,53%	5,93%	0,53%	0,89%

CV: coefficient of variation

Diagnostic specificity

This validation included:

- 40 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-047
1	Adenovirus	Negative	Negative
5	Parainfluenzae	Negative	Negative
1	Rhinovirus	Negative	Negative
1	Bocavirus	Negative	Negative
2	Legionella pneumoniae	Negative	Negative

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

2	Metapneumovirus	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
1	HPV	Negative	Negative

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.

No aspecificity or cross reaction was detected.

The kit is 100% specific.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

Diagnostic sensibility

The validation of the performance was performed on:

570 negative samples	
523 SARS-CoV-2 negative samples	Characterised with EurobioPlex EBX-046 CE-IVD kit
47 positive respiratory samples	RSV-A/B, Parainfluenzae, Rhinovirus, Metapneumovirus, CoV NL63, CoV OC43, CoV 229E, CoV KU1

269 positive samples	
165 Beta variant samples with E484K and K417N mutations	Characterized by EurobioPlex EBX-046 CE-IVD kit
10 Alpha variant or WT samples	Characterized by EurobioPlex EBX-046 CE-IVD kit
3 Gamma variant samples	Characterized by EurobioPlex EBX-046 CE-IVD kit
91 Delta variant samples with the L452R mutation	Characterized by EurobioPlex EBX-046 CE-IVD kit

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-047: SARS-CoV-2 detection channel (Texas Red)	
		SARS-CoV-2 positive	SARS-CoV-2 negative
Pre-tested EBX-046	SARS-CoV-2 positive	269	0
	SARS-CoV-2 negative	0	570

General sensitivity: > 99% (269/269)

General specificity: > 99% (570/570)

General concordance: > 99% (839/839)

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

Negative samples pre-tested with the EBX-046 CE-IVD kit:
specificity for mutations of interest

		SARS-CoV-2 (RdRp1/RdRp2 targets)
SARS-CoV-2 negative	N=570	(570/570)
Specificity to mutations		100%

SARS-CoV-2 positive samples pre-tested with the EBX-046 CE-IVD kit:
sensitivity for SARS-CoV-2 and specificity for mutations of interest

N=269 (+) positive / (-) négative		SARS-CoV-2 (RdRp1/RdRp2 tar- gets)	Mutations		
			L452R	K417N	L452R
SARS-CoV-2 samples without L452R, E484K and K417N muta- tions	N=10	+ (10/10)	-	-	-
Sensitivity to SARS-CoV-2		100%	N/A		
Specificity to mutations		N/A	100%		
Beta variants samples with the K417N and E484K mutations	N=165	+ (165/165)	-	+ (165/165)	+ (165/165)
Sensitivity to SARS-CoV-2		100%	N/A		
Specificity to mutations		N/A	N/A	100%	100%

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

Delta variants Samples with the L452R mutation	N=91	+ (91/91)	+ (91/91)	-	-
Sensitivity to SARS-CoV-2		100%	N/A		
Specificity to mutations		N/A	100%	N/A	N/A
Gamma variants Samples with the E484K mutation	N=3		-	-	+ (3/3)
Sensitivity to SARS-CoV-2		100%	N/A		
Specificity to mutations		N/A	N/A	N/A	100%

K417N sensitivity: > 99% (165/165)
K417N specificity: > 99% (104/104)
K417N concordance: > 99% (269/269)

L452R sensitivity: > 99% (91/91)
L452R specificity: > 99% (178/178)
L452R concordance: > 99% (269/269)

E484K sensitivity : > 99% (168/168)
E484K specificity : > 99% (101/101)
E484K concordance : > 99% (269/269)

14. Bibliography

Cherian, Sarah, Varsha Potdar, Santosh Jadhav, Pragma 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*

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVD

& *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>

<https://doi.org/10.1101/2021.08.04.455140>

15. Quality control

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

16. Waste disposal

Eliminate all waste in accordance with the legislation on DASRI.

17. 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.

18. 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 or by phone at +33 (0)1.69.07.94.77.

