



EurobioPlex
Streptocoque Groupe B
(SGB/Streptococcus agalactiae)
PCR EN TEMPS REEL

Pour la PCR **qualitative** en temps réel

REF

EBX-039-25
EBX-039-50
EBX-039-100



25/50/100 réactions



Version 2.00 du 04/11/2022

Validé sur instrument de PCR :

- T-COR 8®-IVD (Tetracore Inc.) avec T-COR 8 Per-well SmartCT™ (auto v1) software

Conditions de stockage:

Conserver tous les réactifs entre -15°C et -22°C jusqu'à utilisation et après première utilisation



Fiche technique

Disponible sur www.eurobio-scientific.com

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B
Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus
Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	2
1. DESTINATION DU DISPOSITIF	4
2. INFORMATIONS GENERALES	4
3. PRINCIPE DE LA DETECTION	5
4. COMPOSANTS DU KIT.....	5
5. CONSERVATION ET STOCKAGE.....	6
6. MISE EN GARDE ET precautions	6
7. PROTOCOLE	7
8. analyse des donnees et interpretation	11
9. Analyse deS performances	13
10. contrôle qualite	17
11. ELIMINATION DES DECHETS	17
12. declaration D'INCIDENT.....	17
13. Symboles	18
ENGLISH VERSION.....	23
SPANISH VERSION	38

1. DESTINATION DU DISPOSITIF

Le test EBX-039 est un test d'amplification par réaction en chaîne de la polymérase (PCR) en temps réel, pour un *usage in vitro*, conçu pour la détection qualitative, dans un prélèvement vaginal, de la présence de streptocoque de groupe B (SGB), *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*). La PCR temps-réel **peut être directement réalisée sur des prélèvements vaginaux, non extraits**, ce qui permet de répondre rapidement à l'urgence diagnostique de cette pathologie. Le test est indiqué pour poser un diagnostic de présomption d'infection chez la femme ou son nouveau-né, ou compléter un diagnostic avéré ou indéterminé par les autres techniques.

L'Eurobioplex EBX-039 a été validé sur le type de prélèvement suivant :

- Prélèvement vaginal

Le test EurobioPlex EBX-039 est un dispositif médical de diagnostic *in vitro*. Il doit être utilisé par du personnel de laboratoire d'analyse de biologie médicale qualifié. Ce dispositif ne doit pas être recyclé après utilisation.

2. INFORMATIONS GENERALES

Le streptocoque de groupe B (SGB), *S. agalactiae*, fait partie de la flore commensale, et est responsable d'infections invasives graves (bactériémie, méningite) chez les nouveau-nés. Une transmission materno-fœtale par voie verticale est le plus souvent à l'origine de l'infection chez le nouveau-né et a un potentiel de gravité élevé (10% de mortalité néonatale précoce en particulier chez les enfants prématurés, ou à petit poids de naissance), et constitue une urgence diagnostique et thérapeutique absolue. Le pronostic vital est rapidement engagé si l'antibiothérapie ciblée tarde.

Le SGB a pour réservoir essentiel les voies gastro-intestinale et urinaire, à partir desquelles se fait la colonisation des voies génitales de la femme. Le portage vaginal varie de 5 à 40 % au cours de la grossesse. La transmission materno-fœtale est essentiellement aérodigestive, par inhalation ou ingestion de liquide amniotique contaminé au cours de l'accouchement. Le taux de transmission de la mère colonisée au nouveau-né est en moyenne de 50 %, et environ 1 à 2 % des nouveau-nés développeront une infection en l'absence d'antibioprophylaxie réalisée au moment de l'accouchement chez les femmes colonisées à SGB.

On distingue deux types d'infections néonatales à SGB : les infections précoces qui surviennent dans 80 % des cas durant les 24 premières heures de vie et les infections tardives entre la première semaine et le troisième mois de vie. Les infections précoces se manifestent communément par une détresse respiratoire et une bactériémie (89 % des cas). La méningite reste une présentation clinique moins commune lors des formes précoces (10-20% des cas). Les infections néonatales tardives sont associées à des bactériémies et à des méningites dans la plupart des cas.

Plusieurs symptômes de la méningite n'apparaissent que lorsque la maladie est déjà bien avancée et nombre d'entre eux s'observe également dans plusieurs maladies, compliquant le diagnostic.

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B
Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus
Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

Le diagnostic rapide et ciblé par amplification génique en temps réel de *S. agalactiae*, directement sur prélèvement vaginal sans extraction, est la technique présentant la meilleure sensibilité et spécificité. Ce diagnostic permet de détecter précocement la présence de la bactérie et d'amorcer une antibioprophylaxie.

3. PRINCIPE DE LA DETECTION

L'Eurobioplex EBX-039 est un test d'amplification des acides nucléiques ADN bactériens de *S. agalactiae* ainsi que d'un contrôle d'inhibition de PCR, qui utilise l'amplification par PCR en temps réel. Le test est réalisé directement sur prélèvement vaginal dans un seul puits/tube.

Un contrôle d'inhibition de PCR (CI-PCR) permet de s'assurer qu'un résultat négatif ne peut être dû à la présence d'inhibiteurs de PCR en trop grande quantité.

Les ADN de *S. agalactiae* et du CI-PCR sont détectés à l'aide d'une sonde marquée FAM et CY5, respectivement. La mesure de l'émission d'une fluorescence spécifique suite à l'hydrolyse de leur sonde respective au cours de l'élongation du produit d'amplification en temps réel, est relative à l'accumulation des produits d'amplification spécifiques.

4. COMPOSANTS DU KIT

Le kit de PCR en temps réel EBX-039 est prêt à l'emploi pour la détection spécifique de *S. agalactiae* et d'un contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (CI-PCR).

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 ci-dessous.

Le kit contient les réactifs et l'enzyme nécessaires à l'amplification de l'ADN de ces bactéries et du contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (cf. Tableau 2).

Tableau 1 :

Cible	Fluorophore	Excitation	Emission
<i>Streptocoque groupe B/S. agalactiae</i>	FAM	495 nm	515 nm
Contrôle d'inhibition de PCR (CI-PCR)	Cy5	647 nm	667 nm

Canaux équivalents sur différents instruments de PCR:

- Canal **FAM** (Systèmes ABI, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx, T-COR 8®-IVD), Canal 510 (LC 480), Canal Green (RotorGene)
- Canal **Cy5** (Systèmes ABI, Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx, T-COR 8®-IVD), Canal Alexa647 (SmartCycler II), Canal 660 (LC 480), Canal Red (RotorGene)

Tableau 2 :

Couleur de Bouchon	Contenu du kit	25 réactions	50 réactions	100 réactions	Reconstitution
Rouge	ENZYME	5 x 90 µl	10 x 90 µl	20 x 90 µl	Prêt à l'emploi
Transparent	OLIGOMIX	3 x 75 µl	6 x 75 µl	12 x 75 µl	Prêt à l'emploi

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B
Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus
Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

Jaune	Contrôle Positif	3 x 25 µl	6 x 25 µl	12 x 25 µl	Prêt à l'emploi
Blanc	Contrôle d'inhibition de PCR (CI-PCR)	3 x 20 µl	6 x 20 µl	12 x 20 µl	Prêt à l'emploi
Bleu	Contrôle négatif (CN-H2O)	500 µl	500 µl	500 µl	Prêt à l'emploi

Nombre de tests patients en respectant le nombre de cycles de décongelations/congelations recommandés:

	25 réactions	50 réactions	100 réactions
Au coup par coup	15	30	60
Par 2 ou plus	23	48	98

Matériel nécessaire non fourni:

- ◇ Hotte biologique
- ◇ Appareil de PCR en temps réel T-COR 8®-IVD
- ◇ Microtubes stériles
- ◇ Microtubes pour réaction de PCR en temps réel sur T-COR 8®-IVD
- ◇ Vortex
- ◇ Centrifugeuse pour microtubes
- ◇ Micropipettes
- ◇ Embouts DNase-free et RNase-free à filtre pour micropipettes
- ◇ Gants (sans talc)

5. 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.

 Plusieurs cycles de congélation / décongélation de l'enzyme (>3x) ou des autres réactifs (>5x) doivent être évités, cela pourrait réduire la sensibilité de l'analyse.

6. MISE EN GARDE ET PRECAUTIONS

 **Lire attentivement ces instructions avant de débuter la procédure.**

- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée par des techniciens de laboratoire d'analyse de biologie médicale.
- ◇ 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.

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B
Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus
Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

- ◇ 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 sur l'étiquette.
- ◇ Eviter une exposition prolongée à la lumière des réactifs, limitée au temps technique nécessaire à la préparation de la plaque PCR, sans quoi les performances ne sont pas garanties.
- ◇ 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.
- ◇ Une fois les réactifs décongelés, centrifuger brièvement les tubes avant leur utilisation.
- ◇ Il est recommandé de définir trois zones de travail distinctes : 1) Isolation de l'ARN/ADN, 2) Préparation du mélange réactionnel et 3) Amplification / Détection des produits amplifiés.
- ◇ 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 des acides nucléiques pour une production d'ARN/ADN de qualité et une application de RT-PCR en temps réel doivent être utilisées, notamment afin d'éviter tout risque de contamination avec les RNases/DNases.
- ◇ Utiliser des embouts à filtre pour micropipettes, DNase-free et RNase-free.
- ◇ Ne pas pipeter avec la bouche. Ne pas manger, ni boire ou fumer dans le laboratoire.
- ◇ Ne pas utiliser le dispositif si l'emballage est endommagé
- ◇ Eviter les aérosols.

7. PROTOCOLE

I- Collecte des échantillons

- **Le prélèvement d'échantillons vaginaux doit être effectué conformément aux lignes directrices publiées pour le prélèvement d'échantillons cliniques pour la culture de streptocoques du groupe B.**
- Il revient à l'utilisateur de maîtriser ses propres conditions de collecte, transport, conservation des échantillons, afin de préserver des acides nucléiques de qualité.
- Il est recommandé que les échantillons soient conservés selon les recommandations de stockage des échantillons (Tableau 4).

Tableau 4 :

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B
Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus
Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

Recommandations de stockage maximum des échantillons	
Température ambiante	2 h
4°C	16 h
-20°C	Stockage à long terme

⚠ 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.

⚠ Le transport des échantillons cliniques est soumis à la réglementation locale pour le transport des agents infectieux.

II- Réalisation de la PCR en temps réel

T-COR 8®-IVD est un instrument de PCR en temps réel avec 8 puits programmables de façon indépendante qui peuvent être utilisés, patient par patient, indépendamment les uns des autres, du point de vue des tests / « Dosage/Assay » réalisés, des programmes thermiques, et du moment du lancement de la PCR.

Les 8 puits peuvent également être utilisés simultanément avec le même « Dosage/Assay ».

Contrôles

Sur T-COR 8®-IVD, nous recommandons que le contrôle positif et le contrôle négatif soient testés à minima lors de la première utilisation d'un nouveau kit.

Par la suite, le contrôle interne permet de s'assurer qu'au sein de l'échantillon testé, il n'y a pas d'inhibition de la PCR, et que celle-ci fonctionne correctement.

Le contrôle positif ainsi que le contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (CI-PCR) contiennent des concentrations élevées de matrice. Les manipulations doivent être réalisées précautionneusement pour éviter toute contamination.

Schéma de la procédure

1 - PREPARATION MELANGE REACTIONNEL / MASTERMIX

Nombre de réaction(s)	N+1*
Enzyme	(N+1) x 12.5 µl
Oligomix	(N+1) x 7.5 µl
CI-PCR	(N+1) x 1 µl
Volume total Mastermix	(N+1) x 21 µl

*Pour 1 ou 2 tubes, déposer la quantité exacte/réaction dans 1 tube



2 - PREPARATION DES REACTIONS

Echantillon

20 µl de Mastermix
+
5µl prélèvement

Contrôle positif*

20 µl de Mastermix
+
5µl CP

Contrôle Négatif*

20 µl de Mastermix
+
5µl Eau biologie moléculaire (CN-H2O)

* Sur T-COR 8®-IVD, nous recommandons que le contrôle positif et le contrôle négatif soient testés à minima lors de la première utilisation d'un nouveau kit.



Bien mélanger après dépôt de l'échantillon dans le tube avec allers-retours de pipetage, en évitant la formation de bulles et s'assurer que le volume de liquide est bien situé au fond du tube. Bien refermer chaque tube après chaque dépôt des contrôles et d'échantillon pour éviter toute contamination.



3 – UTILISATION DES CODES-BARRES (voir III-)

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B
 Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus
 Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

Procédure détaillée :

- 1) Homogénéiser le tube d'Enzyme, et vortexer Oligomix, CP et CI-PCR, puis centrifuger.
- 2) Pour 1 ou 2 tubes, déposer la quantité exacte/réaction de chaque réactif dans chaque tube. Passer directement au point III-Utilisation des codes-barres.
- 3) A partir de 3 tubes, préparer le Mastermix comme ci-dessous, N étant le nombre de réactions. Prévoir la quantité de Mastermix pour au minimum N+1 réactions.

Nombre de réaction(s)	1	N+1	Exemple pour 1 patient + CP + C Neg N = 3
Enzyme	12.5 µl	(N+1) x 12.5 µl	50 µl
Oligomix	7.5 µl	(N+1) x 7.5 µl	20 µl
CI-PCR	1 µl	(N+1) x 1 µl	4 µl
Volume total Mastermix	21 µl	(N+1) x 21 µl	74 µl

- 3) Homogénéiser le Mastermix préparés en 2) et centrifuger brièvement.
- 4) Distribuer 20 µL de Mastermix à l'aide d'une micropipette et d'embouts à filtre dans chaque tube pour PCR en temps réel.
- 5) Ajouter 5 µL d'échantillon non extrait
- 6) En parallèle réaliser les contrôles suivants, au minimum lors de la première ouverture d'un nouveau kit.
 - Contrôle positif : 20µl de Mastermix + 5 µl de contrôle positif CP
 - Contrôle négatif : 20µL de Mastermix + 5µL d'eau fournie (CN-H2O)



Bien mélanger après dépôt de l'échantillon dans le tube avec allers-retours de pipetage, en évitant la formation de bulles et s'assurer que le volume de liquide est bien situé au fond du tube. Bien refermer chaque tube après chaque dépôt du contrôle ou de l'échantillon pour éviter toute contamination.

III- Utilisation des Codes-Barres sur T-COR 8®-IVD

- 1- Sélectionner Menu > Nouvelle Analyse/New Run
- 2- Sélectionner Code-barres/Barcode
- 3- Scanner sur la droite de l'appareil le Code-Barre désiré :
 - soit pour le contrôle positif (Code-barre EBX-039 Pos Ctrl),
 - soit pour le contrôle négatif (Code-barre EBX-039 Neg Ctrl),
 - soit pour un échantillon (Code-Barre Assay : EBX-039)

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B
Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus
Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

L'instrument sélectionne automatiquement un des 8 puits disponibles. Suivre les instructions données par l'instrument.

4- Soulever le clapet du puits x sélectionné par l'appareil, et vérifier que la lumière LED bleue est allumée, puis sélectionner « Oui/Yes ».

5- Positionner le tube dans le puits correspondant et rabattre le clapet puis sélectionner « Suivant/Next ».

6- Si vous souhaitez le nommer (optionnel), sélectionner « échantillon x/sample x », et le nommer. Sélectionner « Accept ».

7- Sélectionner « Suivant/Next »

8- Pour ajouter/tester un autre contrôle ou échantillon, sélectionner « Ajouter un puits/Add well » et recommencer au point 3-

9- Sélectionner « Démarrer l'analyse/Start run »

***Note :** la nomination d'un échantillon ou du run ne peut être modifiée ou ajoutée après la fin du run. Elle doit être réalisée avant ou pendant que le run se déroule.*

IV- Présentation des résultats

Les résultats de Ct et les courbes d'amplification sont disponibles, à partir du Tableau Valeurs SmartCT™/SmartCT™ Table (valeurs de Ct attribuées sur chaque canal), et des graphes de Ct en fonction des cycles sur chaque canal, les 2 étant visualisables en temps réel sur la machine.

Une analyse pour les contrôles négatif et positif, ainsi que pour les échantillons est générée de façon automatique. Celle-ci est disponible dans « Interprétations/Interpretations », à la fin du run, dans la fenêtre « Vue/View ».

8. ANALYSE DES DONNEES ET INTERPRETATION

L'interprétation se fait automatiquement sur T-COR 8®-IVD

Pour le contrôle positif et le contrôle négatif, les résultats suivants sont possibles:

« Neg Ctrl Fail » : Non valide

« Neg Ctrl Valid » : Valide

« Pos Ctrl Fail » : Non valide

« Pos Ctrl Valid » : Valide

Ceux-ci, testés à minima lors de la première ouverture du kit, doivent être valides pour pouvoir utiliser le kit.

Détermination du statut pour les échantillons :

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B

Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus

Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

Le contrôle interne CI-PCR permet automatiquement de valider le résultat de chaque échantillon.

« Détecté(e-s)/Detected »: Positif → encadré vert

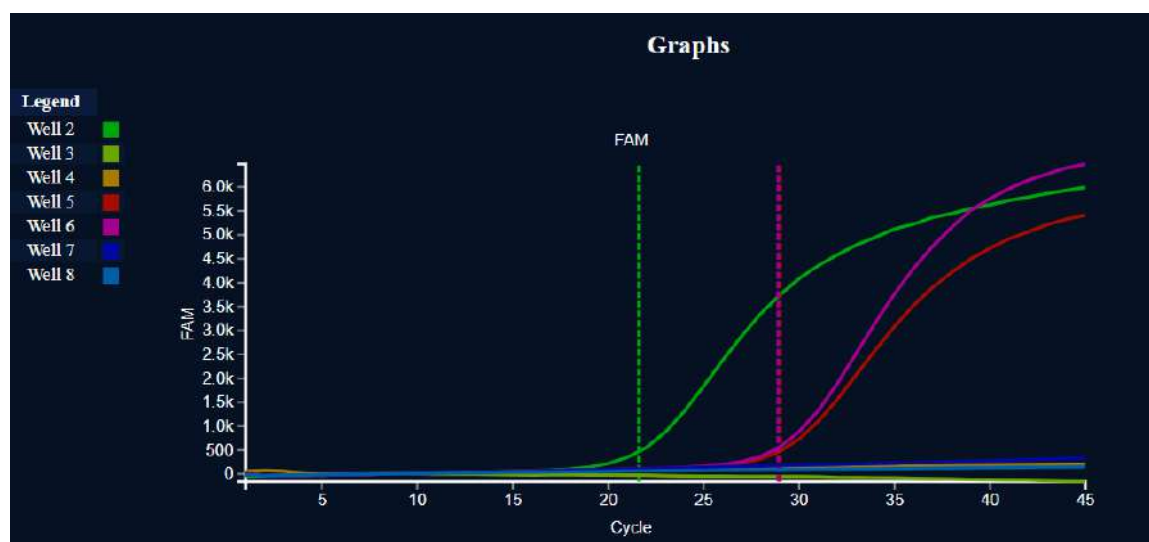
« Non détecté/Not detected »: Négatif → encadré rouge

« Non valide/Invalid »: Résultat non valide -> encadré jaune -> retester

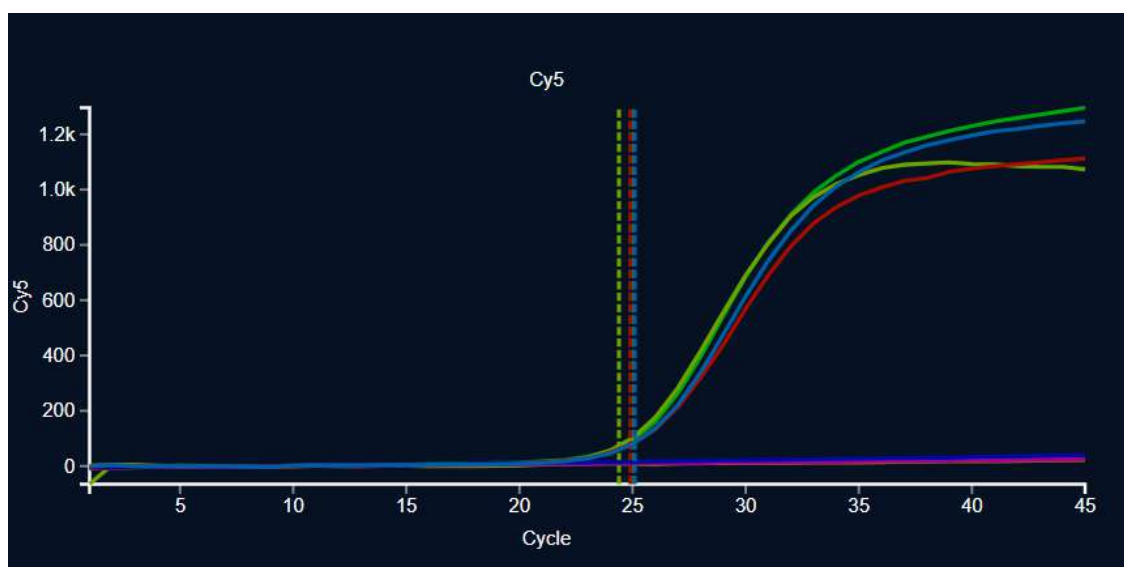
Exemple de présentation d'interprétation automatique des résultats :

Summary							
Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5	Note
2	Ctrl POS	EBX-039 Pos Ctrl	21.6			25.0	Detected • Pos Ctrl Pos Ctrl Valid
3	Ctrl NEG	EBX-039 Neg Ctrl				24.4	Detected • Neg Ctrl Neg Ctrl Valid
4	Ctrl NEG	EBX-039 Neg Ctrl					Invalid Neg Ctrl Fail
5	POS sample	EBX-039	29.0			24.9	Detected • S. Agalactiae S. Ag Positive
6	POS sample	EBX-039	28.9				Detected • S. Agalactiae S. Ag Positive
7	NEG sample	EBX-039					Invalid Retest
8	NEG sample	EBX-039				25.1	Not Detected S. Ag Negative

Exemple de courbes d'amplification



Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B
 Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus
 Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B



9. ANALYSE DES PERFORMANCES

➤ **Sensibilité analytique du Contrôle positif:** 10 copies/microlitres

➤ **Variabilité du signal :** Coefficient de Variation (%)

EBX-039	INTRA-lot	INTER-lots
<i>Streptococcus groupe B/S. agalactiae</i> (FAM)	0,71	1,52
Contrôle interne (CI-PCR)	0,66	1,77

➤ **Validation sur les échantillons cliniques**

La spécificité et la sensibilité ont été analysées à partir de prélèvements vaginaux (non extraits) prétestés.

		EBX-039		
		<i>Streptococcus groupe B/S. agalactiae</i>		
		POS	NEG	TOTAL
Pretest	POS	15	0	15
	NEG	0	18	18
	TOTAL	15	18	33

EBX-039	Spécificité	Sensibilité	Concordance
<i>Streptococcus agalactiae</i> (FAM)	>99 %	>99 %	>99 %

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B
Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus
Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

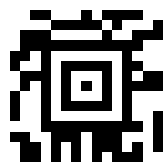
Etude de cross-réaction :

Chaque bactérie ci-dessous a été testée et ne présente pas de cross-réaction :

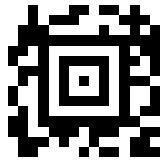
- *Listeria monocytogenes*
- *Escherichia coli*
- *Neisseria meningitidis*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenza*
- *Staphylococcus aureus*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Bartonella spp*
- *Coxiella burnetii*
- *Mycobacterium avium*
- *Klebsiella kingae*

Codes-Barres sur T-COR8®-IVD pour EBX-039

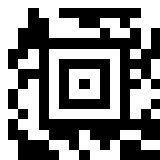
EBX-039 Pos Ctrl
Contrôle Positif CP



EBX-039 Neg Ctrl
Eau = Contrôle Négatif (CN-H2O)



Assay: EBX-039



10. CONTROLE QUALITE

Conformément au système de management de la qualité d'Eurobio Scientific, certifié ISO EN 13485, chaque lot de EurobioPlex Streptocoque Groupe B est testé selon des spécifications prédéfinies afin de garantir une qualité constante des produits.

11. ELIMINATION DES DECHETS

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

12. DECLARATION D'INCIDENT

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

13. SYMBOLES



Référence



Numéro de lot



Limite de température



Date d'expiration



Contenu suffisant pour « N » réactions



Fabricant



Produit marqué CE



Dispositif Médical de Diagnostic *in vitro*



Mode d'emploi



Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé



Conserver à l'abri de la lumière du soleil



Attention



7, avenue de Scandinavie
ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis
FRANCE

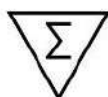


EurobioPlex
Group B Streptococcus
(GBS/Streptococcus agalactiae)
Real Time PCR

For a **qualitative** real-time PCR

REF

EBX-039-25
EBX-039-50
EBX-039-100



25/50/100 tests



Version 2.00 (2022/11/04)

Validated on PCR instruments:

T-COR 8®-IVD (Tetracore Inc.) with T-COR 8 Per-well SmartCT™ (auto v1) software

Storage conditions:

Keep all reagents between -15°C and -22°C until use and after the first use



Instructions for use

Available on www.eurobio-scientific.com

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B
Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus
Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

TABLE OF CONTENTS

FRENCH VERSION	2
1 – Intended Purpose	23
2 – General Information	23
3 – Principle of the test	24
4 – Kit components.....	24
5 – Conservation and Storage	25
6 – Precautions.....	26
7 - Procedure	26
I- Sample collection	26
II- Real-time PCR program	27
Controls	27
Procedure	28
Detailed Procedure	29
III- Barcodes use on T-COR 8® - IVD	29
IV- Results presentation	30
8 – Data Analysis and Interpretation.....	30
9 - Performance Analysis.....	32
10 – Quality Control	35
11 – Waste Disposal	35
12 – Incident Report.....	35
13 - Symbols	36
SPANISH VERSION	38

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B

Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus

Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

1 – INTENDED PURPOSE

The EBX-039 assay is a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay for *in vitro* use, designed for the qualitative detection of Group B Streptococcus (GBS), *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) in a vaginal swab. The real-time PCR **can be performed directly on vaginal swabs, without extraction**, which allows for a rapid answer to the diagnostic urgency of this pathology. The test is indicated to make a diagnosis of presumed infection in women or new-borns, or to complete a diagnosis that has been proven or undetermined by other techniques.

The EurobioPlex EBX-039 has been validated on the following specimen:

- Vaginal swab

The EurobioPlex EBX-039 test is an *in vitro* medical device. It must be used by qualified medical analysis technicians. This device should not be recycled after use.

2 – GENERAL INFORMATION

Group B Streptococcus (GBS), *S. agalactiae*, belongs to the commensal flora and is responsible for serious invasive infections (bacteraemia, meningitis) in new-borns. Mother to child transmission by a vertical route is most of the time the cause of the infection in new-borns, has a high potential for severity (10% of early neonatal mortality, especially in premature or low birth-weight infants), and constitute an absolute diagnostic and therapeutic emergency. The vital prognosis is rapidly engaged if the targeted antibiotic is delayed.

The main reservoirs for GBS are the gastrointestinal and urinary tracts, from which the colonization of the female genital tract occurs. Vaginal carriage varies from 5 to 40% during pregnancy. Mother to child transmission is essentially aerodigestive, by inhalation or ingestion of contaminated amniotic fluid during delivery. The rate of transmission from the colonized mother to the new-born averages 50 %, and in women colonized by GBS, approximately 1 to 2 % of new-borns will develop an infection in the absence of an antibiotic prophylaxis at the time of delivery.

There are two types of neonatal GBS infections: early infections, which occurs in 80 % of cases during the first 24 hours of life, and late infections occurring between the first week and the third month of life.

- Early infections commonly present with respiratory distress and bacteraemia (89 % of the cases). Meningitis remains a less common clinical presentation in early forms (10-20% of the cases).
- Late neonatal infections are associated with bacteraemia and meningitis in most cases.

Several symptoms of meningitis only appear when the disease is well advanced and many of them can also be seen in several illnesses, complicating the diagnosis.

Rapid and targeted diagnosis by real-time gene amplification of *S. agalactiae*, directly on vaginal swab without extraction, is the technic offering the best sensitivity and specificity. This diagnosis allows an early detection of the presence of the bacteria and the initiation of an early antibiotic prophylaxis.

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B
Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus
Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

3 – PRINCIPLE OF THE TEST

The EurobioPlex EBX-039 is a bacterial DNA nucleic acid amplification test of *S. agalactiae* as well as of a PCR Inhibition Control, which uses real-time PCR amplification. The test is performed directly on a vaginal swab in a single well/tube.

A PCR Inhibition Control (CI-PCR) is used, in order to check that a negative result is not due to an excess of PCR inhibitors.

S. agalactiae and CI-PCR DNAs are detected using a probe labelled with FAM and CY5 respectively. Following the hydrolysis of their respective probe during the extension of the amplification product in real-time, the measurement of specific fluorescence emission is related to the accumulation of specific amplification products.

4 – KIT COMPONENTS

The real-time PCR EBX-039 kit is ready for use for the specific detection of *S. agalactiae* and a PCR Extraction/Inhibition Control (CI-PCR).

The fluorescence is emitted and measured individually by an optical system during PCR. The detection of amplified fragments is performed by a fluorometer using the channels listed in Table 1 below.

The kit contains the necessary reagents and enzyme for the amplification of the DNA of these bacteria and of the PCR Extraction/Inhibition Control (see Table 2).

Table 1:

Target	Fluorophore	Excitation	Emission
<i>Group B Streptococcus/S. agalactiae</i>	FAM	495 nm	515 nm
PCR Inhibition Control (CI-PCR)	Cy5	647 nm	667 nm

Equivalent channels on different PCR instruments:

- Channel **FAM** (Systems ABI, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96, Systems Mx, T-COR 8[®]-IVD), Channel 510 (LC 480), Channel Green (RotorGene)
- Channel **Cy5** (Systems ABI, Chromo 4/CFX96, Systems Mx, T-COR 8[®]-IVD), Channel Alexa647 (SmartCycler II), Channel 660 (LC 480), Channel Red (RotorGene)

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B
Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus
Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

Table 2:

Cap color	Kit content	25 tests	50 tests	100 tests	Reconstitution
Red	Enzyme	5 x 90 µl	10 x 90 µl	20 x 90 µl	Ready to use
Transparent	Oligomix	3 x 75 µl	6 x 75 µl	12 x 75 µl	Ready to use
Yellow	Positive Control	3 x 25 µl	6 x 25 µl	12 x 25 µl	Ready to use
White	PCR Inhibition Control (CI-PCR)	3 x 20 µl	6 x 20 µl	12 x 20 µl	Ready to use
Blue	Negative Control (CN-H ₂ O)	500 µl	500 µl	500 µl	Ready to use

Number of patients tests within the recommended number of thawing/freezing cycles:

	25 tests	50 tests	100 tests
One by one	15	30	60
By 2 or more	23	48	98

Materials required but not provided:

- ◇ Biological safety cabinet
- ◇ Real-time PCR instrument T-COR 8®-IVD
- ◇ Sterile microtubes
- ◇ Real-time PCR microtubes suitable for T-COR 8®-IVD
- ◇ Vortex
- ◇ Centrifuge suitable for microtubes
- ◇ Micropipettes
- ◇ Disposable tips DNase-free and RNase-free containing filters for micropipettes
- ◇ Gloves (without talc)

5 – CONSERVATION AND STORAGE

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

All reagents may be used until the expiration date mentioned on the kit label

 Multi freeze/thaw cycles should be avoided for the enzyme (>3x) or for the other reagents (>5x), as the test sensitivity could be reduced.

6 – PRECAUTIONS



Carefully read these instructions before starting the procedure.

- ◇ This experimentation should be carried out by qualified medical analysis technicians. Check that the instruments have been installed, calibrated and maintained according to the manufacturer's instructions.
- ◇ It is the user's responsibility to use another system than those validated. In this case, performances are not guaranteed.
- ◇ Clinical samples should be considered as potentially infectious material and should be prepared under a laminar air flow cabinet.
- ◇ This experimentation must be performed according to good laboratory practice
- ◇ Do not use this kit after the expiration date mentioned on the label.
- ◇ Avoid a long exposure of the reagents to light. It should be limited to the technical time necessary to prepare the PCR plate, otherwise performances are not guaranteed.
- ◇ The kit is shipped under dry ice and the kit components should stay frozen. If one or more of these components arrive unfrozen, or if the tubes are damaged during transportation, please contact Eurobio Scientific.
- ◇ Once the reagents are thawed, briefly centrifuge the tubes before use.
- ◇ It is recommended to perform the activities in three separate areas: 1) RNA/DNA isolation, 2) Preparation of the reaction mixture and 3) Amplification/Detection of the amplified products.
- ◇ Wear separate lab coats and gloves (without talc) in each working area
- ◇ Pipettes, reagents and other material should not be moved around between these areas.
- ◇ Special care must be taken to maintain the purity of reagents and reaction mixtures.
- ◇ Appropriate nucleic acids preparation/extraction methods for quality RNA/DNA production and real-time PCR application should be used, in order to avoid any risk of contamination with RNases/DNases.
- ◇ Use disposable tips with filters for the micropipettes, DNase-free and RNase-free.
- ◇ Do not pipette by mouth. Do not eat, drink or smoke in the laboratory.
- ◇ Do not use the device if the packaging is damaged
- ◇ Avoid aerosols.

7 - PROCEDURE

I- Sample collection

- **Vaginal specimen collection should be performed according to published guidelines for the collection of clinical specimens for group B streptococcal culture.**
- It is up to the user to control his own conditions of collection, transportation and conservation of the samples, in order to preserve the nucleic acids quality.
- Samples should be kept as described in the table below (Table 4).

Table 4:

Maximum recommended storage for the samples	
Room temperature	2 h

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B
Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus
Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

4°C	16 h
-20°C	Long term storage



The user may refer to the recommendations issued by the World Health Organization or the “Haute Autorité de Santé” for a proper storage of the samples.



The transport of clinical samples should follow local regulations for the transport of infectious agents.

II- Real-time PCR program

T-COR 8[®]-IVD is a real-time PCR system with 8 wells independently programmable that can be used, patient by patient, independently of each other, in terms of tests performed, thermal programs, and timing of the PCR start.

The 8 wells may as well be used simultaneously in the same assay.

Controls

On T-COR 8[®]-IVD, we recommend testing the Positive Control and the Negative Control at least when first opening a new kit.

Thereafter, the Internal Control ensures that in the tested sample there is no PCR inhibition and that the PCR works properly.

There is a high matrix concentration in the Positive Control and the Extraction and Inhibition PCR Control (CI-PCR). Handle them with care in order to avoid any contamination.

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B
Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus
Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

Procedure

1 – REACTION MIXTURE PREPARATION / MASTERMIX

Number of test (s)	N+1*
Enzyme	(N+1) x 12.5 µl
Oligomix	(N+1) x 7.5 µl
Cl-PCR	(N+1) x 1 µl
Total Mastermix volume	(N+1) x 21 µl

*For 1 or 2 tubes, pipet the exact quantity of reagents in each tube



2 – REACTION PREPARATION

Sample

20 µl Mastermix
+
5µl sample

Positive Control*

20 µl Mastermix
+
5µl CP

Negative Control*

20 µl Mastermix
+
5µl Molecular Biology Water (CN-H₂O)

* On T-COR 8®-IVD, we recommend testing the Positive Control and the Negative Control at least when first opening a new kit.



Mix well after adding the sample in the tube, with back and forth pipetting avoiding foaming and check that the liquid volume is at the bottom of the tube. To prevent contamination, carefully close each tube after each pipetting of a control or a sample.



3 – BARCODES USE (see III-)

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B

Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus

Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

Detailed Procedure

- 4) Homogenize the Enzyme tube and vortex Oligomix, CP and CI-PCR, then centrifuge.
- 5) For 1 or 2 tubes, pipet the exact quantity of reagents in each tube. Proceed directly to point III – Barcodes use.
- 6) From 3 tubes on, prepare the Mastermix as described in the table below (N = number of tests). Prepare the necessary Mastermix volume for at least N+1 tests.

Number of test (s)	1	N+1	Example for 1 patient + CP + C Neg N = 3
Enzyme	12.5 µl	(N+1) x 12.5 µl	50 µl
Oligomix	7.5 µl	(N+1) x 7.5 µl	20 µl
CI-PCR	1 µl	(N+1) x 1 µl	4 µl
Total Mastermix volume	21 µl	(N+1) x 21 µl	74 µl

- 7) Homogenize the prepared Mastermix and briefly centrifuge.
- 8) Using a micropipette and tips with filters, distribute 20 µl Mastermix in each tube for real-time PCR.
- 9) Add 5 µl non extracted sample.
- 10) In parallel, make the following controls, at least when first opening a new kit:
 - Positive Control: 20µl Mastermix + 5 µl Positive Control CP
 - Negative Control: 20µl Mastermix + 5µl water supplied (CN-H₂O)



Mix well after adding the sample in the tube, with back and forth pipetting avoiding foaming and check that the liquid volume is at the bottom of the tube. To prevent contamination, carefully close each tube after each pipetting of a control or a sample.

III- Barcodes use on T-COR 8[®] - IVD

1- Select Menu > New Run

2- Select Barcode

3- Scan the desired barcode on the right of the system:

- Either for the Positive Control (Barcode EBX-039 Pos Ctrl),
- Or for the Negative Control (Barcode EBX-039 Neg Ctrl),
- Or for a sample (Barcode Assay: EBX-039)

The system will automatically select one of the 8 available wells. Follow the instructions given by the instrument.

4- Lift the flap from the well x selected by the system, check that the blue LED light is on, then select « Yes ».

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B

Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus

Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

5- Position the tube in the corresponding well and lower the flap, then select « Next ».

6- If you want to name it (optional), select « Sample x », and name it. Select « Accept ».

7- Select « Next »

8- To add or test another control or sample, select « Add well » and start again at point 3.

9- Select « Start run »

***Note:** Naming a sample or a run cannot be modified or added after the end of the run. It must be done before or during the run.*

IV- Results presentation

The C_t results and the amplification curves are available, in the SmartCT™ Table (C_t values assigned for each channel), as well as C_t graphs according to the cycles in each channel, which can both be viewed in real time on the instrument.

An analysis for the Negative and Positive Controls, as well as for the samples, is generated automatically. It is available in « Interpretations », at the end of the run, in the « View » window.

8 – DATA ANALYSIS AND INTERPRETATION

Interpretation will be done automatically on T-COR 8®-IVD

For Positive and Negative Controls, the following results may occur:

« Neg Ctrl Fail »: Not valid

« Neg Ctrl Valid »: Valid

« Pos Ctrl Fail »: Not valid

« Pos Ctrl Valid »: Valid

Having been tested at least when the kit is opened for the first time, they must be valid in order to use the kit.

Status determination for samples:

Internal Control CI-PCR automatically validates the result of each sample.

« Detected »: Positive → green frame

« Not detected »: Negative → red frame

« Invalid »: Invalid result → yellow frame → to be retested

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B

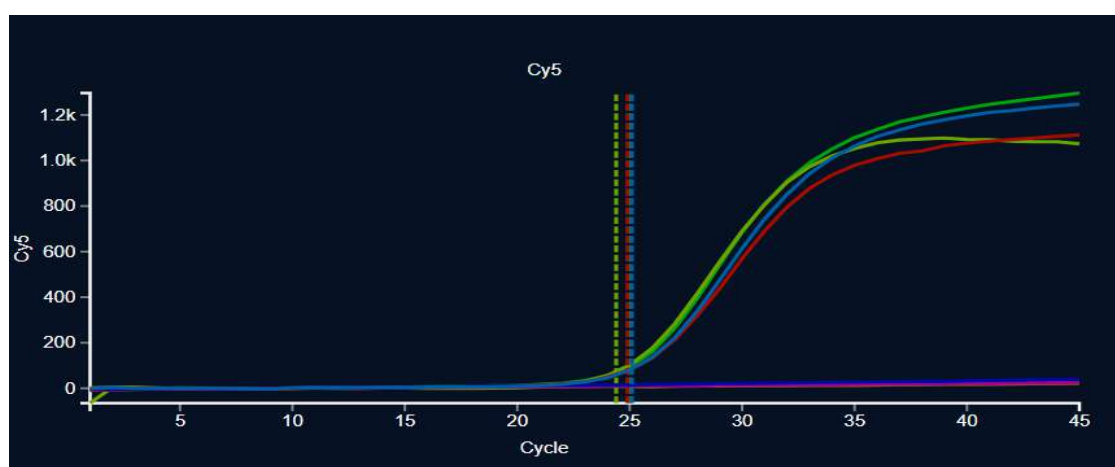
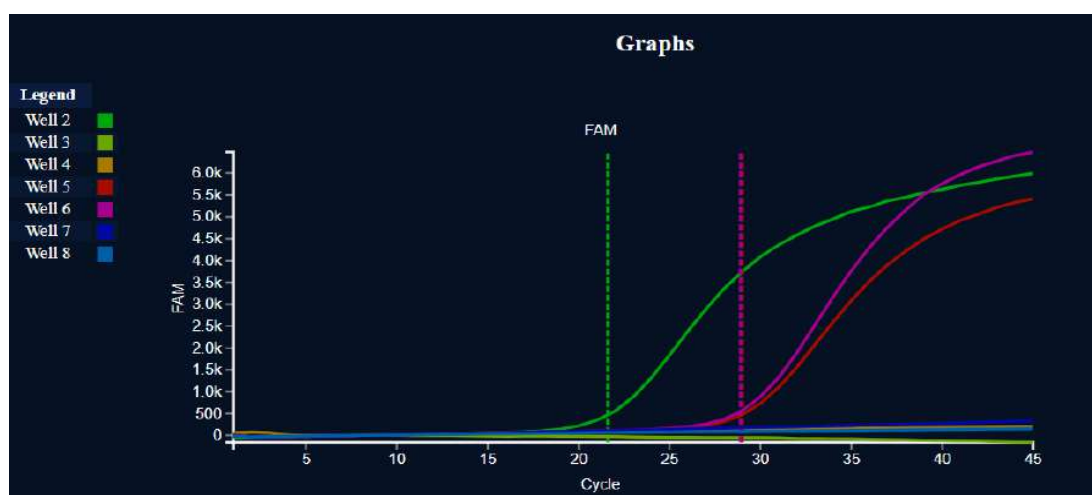
Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus

Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

Presentation example of an automatic result interpretation:

Summary							
Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5	Call
2	Ctrl POS	EBX-039 Pos Ctrl	21.6			25.0	Detected • Pos Ctrl
3	Ctrl NEG	EBX-039 Neg Ctrl				24.4	Detected • Neg Ctrl
4	Ctrl NEG	EBX-039 Neg Ctrl					Invalid
5	POS sample	EBX-039	29.0			24.9	Detected • S. Agalactiae
6	POS sample	EBX-039	28.9				Detected • S. Agalactiae
7	NEG sample	EBX-039					Invalid
8	NEG sample	EBX-039				25.1	Not Detected
							Note
							Pos Ctrl Valid
							Neg Ctrl Valid
							Neg Ctrl Fail
							S. Ag Positive
							S. Ag Positive
							Retest
							S. Ag Negative

Example of amplification curves



Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B
Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus
Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

9 - PERFORMANCE ANALYSIS

- **Analytical sensitivity of Positive Control:** 10 copies/microliters
- **Signal variability:** Coefficient of Variation (%)

EBX-039	INTRA-lot	INTER-lots
<i>Group B Streptococcus/S. agalactiae</i> (FAM)	0,71	1,52
<i>Internal Control (CI-PCR)</i>	0,66	1,77

- **Validation on clinical samples**

The specificity and sensitivity have been analysed on pretested vaginal samples (non-extracted).

		EBX-039		
		Group B Streptococcus/<i>S. agalactiae</i>		
		POS	NEG	TOTAL
Pre-test	POS	15	0	15
	NEG	0	18	18
	TOTAL	15	18	33

EBX-039	Specificity	Sensitivity	Agreement
<i>Streptococcus agalactiae</i> (FAM)	>99 %	>99 %	>99 %

Cross-reaction study:

Each of the following bacteria has been tested and show no cross-reactivity:

- *Listeria monocytogenes*
- *Escherichia coli*
- *Neisseria meningitidis*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenza*
- *Staphylococcus aureus*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Bartonella spp*
- *Coxiella burnetii*
- *Mycobacterium avium*
- *Klebsiella kingae*

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B
Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus
Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

Barcodes on T-COR8®-IVD for EBX-039

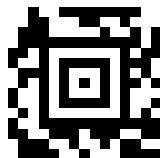
EBX-039 Pos Ctrl
Positive Control CP



EBX-039 Neg Ctrl
Water = Negative Control (CN-H2O)



Assay: EBX-039



10 – QUALITY CONTROL

In accordance with Eurobio Scientific quality management system, certified ISO EN 13485, each batch of EurobioPlex Streptocoque Groupe B is tested according to predefined specifications, in order to guarantee a constant quality of the products.

11 – WASTE DISPOSAL

Waste elimination should be done following PIMW rules.

12 – INCIDENT REPORT

Any serious incident related to this device should be reported to EUROBIO and to the competent authority of the member State in which the user and/or the patient is established.

13 - SYMBOLS

	Reference
	Lot number
	Limits of storage temperature
	Expiration date
	Enough for « N » tests
	Keep away from sunlight
	Manufacturer
	CE marked product
	In Vitro Diagnostic
	Instructions for use
	Caution
	Not to be used if the packaging is damaged



7, avenue de Scandinavie
 ZA de Courtaboeuf
 91940 Les Ulis
 FRANCE



EurobioPlex
Estreptococo del grupo B
(SGB/Streptococcus agalactiae)
PCR EN TIEMPO REAL

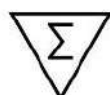
Para la PCR **cualitativa** en tiempo real

REF

EBX-039-25

EBX-039-50

EBX-039



25/50/100 reacciones



Versión 2.0 de 04/11/2022

Validado en el instrumento de PCR:

T-COR 8®-IVD (Tetracore Inc.) con el software T-COR 8 Per-well SmartCT™
(auto v1)

Condiciones de almacenamiento:

Almacenar todos los reactivos a una temperatura de -15°C a -22°C
hasta su utilización y tras su primer uso.



Ficha técnica

Disponible en www.eurobio-scientific.com

ÍNDICE

FRENCH VERSION	2
ENGLISH VERSION.....	23
1. FINALIDAD DEL DISPOSITIVO	39
2. INFORMACIÓN GENERAL.....	39
3. PRINCIPIO DE DETECCIÓN	40
4. COMPONENTES DEL KIT	40
5. CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO.....	41
6. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	41
7. PROTOCOLO	42
8. Análisis e interpretación de datos.....	46
9. Análisis del rendimiento.....	48
10. Control de calidad	52
11. RECICLAJE DE RESIDUOS.....	52
12. NOTIFICACIÓN DE INCIDENTES.....	52
13. Símbolos	53

1. FINALIDAD DEL DISPOSITIVO

La prueba EBX-039 es una prueba de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real para uso *in vitro*, diseñado para la detección cualitativa del estreptococo del grupo B (SGB), *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) en un hisopo vaginal. La PCR en tiempo real **puede realizarse directamente en hisopos vaginales, no extraídos**, lo que permite una respuesta rápida a la emergencia diagnóstica de esta enfermedad. La prueba está indicada para realizar un diagnóstico presuntivo de infección en mujeres o en recién nacidos, o para complementar un diagnóstico conocido o indeterminado por otras técnicas.

Eurobioplex EBX-039 ha sido validado en el siguiente tipo de muestra:

- Hisopo vaginal

La prueba EurobioPlex EBX-039 es un dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*. Debe ser utilizado por personal de laboratorio médico cualificado. Este dispositivo no debe ser reciclado después de su uso.

2. INFORMACIÓN GENERAL

El estreptococo del grupo B (SGB), *S. agalactiae*, forma parte de la flora comensal y es responsable de graves infecciones invasivas (bacteriemia, meningitis) en los recién nacidos. La transmisión materno-fetal por vía vertical es la causa más frecuente de infección en los recién nacidos y tiene un alto potencial de gravedad (10% de la mortalidad neonatal temprana, sobre todo en prematuros o recién nacidos de bajo peso), y constituye una urgencia diagnóstica y terapéutica. El pronóstico vital se ve rápidamente comprometido si se retrasa la terapia antibiótica dirigida.

El SGB tiene su principal reservorio en el tracto gastrointestinal y urinario, desde donde se produce la colonización del tracto genital femenino. La portación vaginal varía del 5 al 40% durante el embarazo. La transmisión materno-fetal es esencialmente aerodigestiva, por inhalación o ingestión de líquido amniótico contaminado durante el parto. La tasa de transmisión de la madre colonizada al recién nacido es de una media del 50%, y aproximadamente el 1-2% de los recién nacidos desarrollarán, en ausencia de profilaxis antibiótica, una infección en el momento del parto en mujeres colonizadas por SGB.

Existen dos tipos de infecciones neonatales por SGB: las tempranas, que se producen en el 80% de los casos en las primeras 24 horas de vida, y las tardías, entre la primera semana y el tercer mes de vida. Las infecciones tempranas suelen presentarse con dificultad respiratoria y bacteriemia (89% de los casos). La meningitis sigue siendo una presentación clínica menos frecuente en las formas tempranas (10-20% de los casos). En la mayoría de los casos, las infecciones neonatales tardías se asocian con bacteriemia y meningitis.

Muchos de los síntomas de la meningitis no aparecen hasta que la enfermedad está muy avanzada y muchos de ellos también se observan en otras enfermedades, hecho que complica el diagnóstico.

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B
Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus
Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

El diagnóstico rápido y específico mediante la amplificación génica en tiempo real del *S. agalactiae*, directamente a partir de hisopos vaginales sin extracción, es la técnica con mayor sensibilidad y especificidad. Este diagnóstico permite detectar precozmente la presencia de la bacteria e iniciar la profilaxis antibiótica.

3. PRINCIPIO DE DETECCIÓN

Eurobioplex EBX-039 es una prueba para la amplificación de los ácidos nucleicos del ADN bacteriano de *S. agalactiae* y un control de inhibición de la PCR, utilizando la amplificación de la PCR en tiempo real. La prueba se realiza directamente en un hisopo vaginal en un solo pocillo/tubo.

Un control de inhibición de la PCR (CI-PCR) garantiza que un resultado negativo no pueda deberse a la presencia de demasiados inhibidores de la PCR.

El ADN de *S. agalactiae* y CI-PCR se detecta utilizando una sonda marcada con FAM y CY5, respectivamente. La medición de la emisión de fluorescencia específica tras la hidrólisis de su respectiva sonda durante la elongación del producto de amplificación en tiempo real es relativa a la acumulación de productos de amplificación específicos.

4. COMPONENTES DEL KIT

El kit EBX-039 de PCR en tiempo real está listo para ser utilizado para detectar específicamente *S. agalactiae* y un control de extracción e inhibición de la PCR (CI-PCR).

La fluorescencia es emitida y medida individualmente por un sistema óptico durante la PCR. La detección de los fragmentos amplificados se realiza mediante un fluorímetro utilizando los canales que se muestran en la Tabla 1.

El kit contiene los reactivos y la enzima necesarios para la amplificación del ADN de estas bacterias, así como la extracción de la PCR y el control de inhibición (véase el cuadro 2).

Tabla 1:

Objetivo	Fluoróforo	Excitación	Emisión
<i>Estreptococo del grupo B/S. agalactiae</i>	FAM	495 nm	515 nm
Control de inhibición de la PCR (CI-PCR)	Cy5	647 nm	667 nm

Canales equivalentes en los diferentes instrumentos de PCR:

- Canal **FAM** (Sistemas ABI, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96, Sistemas Mx, T-COR 8®-IVD), canal 510 (LC 480), Canal Green (RotorGene)
- Canal **Cy5** (Sistemas ABI, Chromo 4/CFX96, Sistemas Mx, T-COR 8®-IVD), Canal Alexa647 (SmartCycler II), Canal 660 (LC 480), Canal Red (RotorGene)

Tabla 2:

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B
Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus
Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

Color del tapón	Contenido del kit	25 reacciones	50 reacciones	100 reacciones	Reconstitución
Rojo	ENZYME	5 x 90 µl	10 x 90 µl	20 x 90 µl	Listo para usar
Transparente	OLIGOMIX	3 x 75 µl	6 x 75 µl	12 x 75 µl	Listo para usar
Amarillo	Control positivo	3 x 25 µl	6 x 25 µl	12 x 25 µl	Listo para usar
En blanco	Control de inhibición de la PCR (CI-PCR)	3 x 20 µl	6 x 20 µl	12 x 20 µl	Listo para usar
Azul	Control negativo (CN-H ₂ O)	500 µl	500 µl	500 µl	Listo para usar

Número de pruebas de pacientes dentro del número recomendado de ciclos de descongelación/congelación:

	25 reacciones	50 reacciones	100 reacciones
Uno a uno	15	30	60
Para 2 o más	23	48	98

Material necesario no incluido:

- ◇ Campana biológica
- ◇ Instrumento de PCR en tiempo real T-COR 8®-IVD
- ◇ Microtubos estériles
- ◇ Microtubos para la reacción de PCR en tiempo real en T-COR 8®-IVD
- ◇ Vórtex
- ◇ Centrífuga para microtubos
- ◇ Micropipetas
- ◇ Boquillas sin DNasa y sin RNasa con filtro para micropipetas
- ◇ Guantes (sin talco)

5. CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Todos los reactivos deben almacenarse entre -15°C y -22°C.

Todos los reactivos pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad que se indica en la etiqueta del kit.

 Deben evitarse múltiples ciclos de congelación/descongelación de la enzima (>3x) u otros reactivos (>5x), ya que podría reducir la sensibilidad del ensayo.

6. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B
Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus
Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B



Leer atentamente estas instrucciones antes de iniciar el procedimiento.

- ◇ Este proceso debe ser realizado por técnicos de laboratorio médico.
- ◇ Comprobar que los instrumentos hayan sido instalados, calibrados y mantenidos de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.
- ◇ Si el usuario utiliza equipos distintos a los validados, lo hará bajo su responsabilidad, en cuyo caso no se garantiza el rendimiento.
- ◇ Las muestras clínicas deben considerarse como material potencialmente infeccioso y han de prepararse bajo una campana de flujo laminar.
- ◇ Esta prueba debe realizarse de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio.
- ◇ No utilizar este kit después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- ◇ Evitar la exposición prolongada de los reactivos a la luz, limitada al tiempo técnico necesario para preparar la placa de PCR, de lo contrario no se garantiza el rendimiento.
- ◇ El kit se envía en hielo seco y los componentes del kit deberían llegar congelados. Si uno o más de los componentes llegan descongelados, o si los tubos se han dañado durante el transporte, contactar con Eurobio Scientific.
- ◇ Una vez descongelados los reactivos, centrifugar brevemente los tubos antes de utilizarlos.
- ◇ Se recomienda definir tres zonas de trabajo separadas: 1) Aislamiento del ARN/ADN, 2) Preparación de la mezcla de reacción y 3) Amplificación/detección de los productos amplificados.
- ◇ Deben usarse batas y guantes (sin talco) diferentes en cada zona de trabajo.
- ◇ Las pipetas, reactivos y otros materiales de trabajo no deben pasar entre las diferentes zonas.
- ◇ Se ha de tener especial cuidado para mantener la pureza de los reactivos y las mezclas de reacción.
- ◇ Se utilizarán los métodos adecuados de preparación/extracción de ácido nucleico para la producción de ARN/ADN de calidad y la aplicación de la RT-PCR en tiempo real, en particular para evitar cualquier riesgo de contaminación con RNasas/DNasas.
- ◇ Utilizar puntas con filtro para micropipetas, libres de DNasa y RNasa.
- ◇ No pipetear con la boca. No comer, beber ni fumar en el laboratorio.
- ◇ No utilizar el dispositivo si el embalaje está dañado.
- ◇ Evitar los aerosoles.

7. PROTOCOLO

I- Recogida de muestras

- **La recogida de muestras vaginales debe realizarse de acuerdo con las directrices publicadas para la recogida de muestras clínicas para el cultivo de estreptococos del grupo B.**

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B
Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus
Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

- Es responsabilidad del usuario controlar sus propias condiciones de recogida, transporte y almacenamiento de las muestras para preservar la calidad de los ácidos nucleicos.
- Se recomienda almacenar las muestras de acuerdo con las recomendaciones de almacenamiento de muestras (Tabla 4).

Tabla 4:

Recomendaciones de almacenamiento máximo de muestras	
Temperatura ambiente	2 h
4°C	16 h
-20°C	Almacenamiento a largo plazo

 El usuario puede remitirse a las recomendaciones emitidas por la Organización Mundial de la Salud o la Autoridad Nacional Francesa de la Salud para el correcto almacenamiento de las muestras.

 El transporte de muestras clínicas está sujeto a la normativa local para el transporte de agentes infecciosos.

II- Realización de la PCR en tiempo real

El T-COR 8®-IVD es un instrumento de PCR en tiempo real con 8 pocillos programables de forma independiente, paciente por paciente, en cuanto a las pruebas/ensayos realizados, los programas térmicos y el tiempo de ejecución de la PCR.

Los 8 pocillos también pueden utilizarse simultáneamente con el mismo ensayo.

Controles

En el caso de T-COR 8®-IVD, recomendamos que los controles positivo y negativo se analicen al menos la primera vez que se utilice un nuevo kit.

Posteriormente, el control interno garantiza que, dentro de la muestra objeto de la prueba, no hay inhibición de la PCR y que esta funciona correctamente.

Tanto el control positivo como el control de extracción e inhibición de la PCR (CI-PCR) contienen altas concentraciones de plantilla. La manipulación debe hacerse con precaución para evitar una posible contaminación.

Esquema del procedimiento

1 - PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE REACCIÓN / MASTERMIX

Número de reacción/es	N+1*
Enzyme	(N+1) x 12,5 µl
Oligomix	(N+1) x 7,5 µl
CI-PCR	(N+1) x 1 µl
Volumen total Mastermix	(N+1) x 21 µl

*Para 1 o 2 tubos, colocar la cantidad/reacción exacta en 1 tubo



2 - PREPARACIÓN DE LAS REACCIONES

Muestra

20 µl de Mastermix
+
muestra de 5 µl

Control positivo*

20 µl de Mastermix
+
5µl de CP

Control negativo*

20 µl de Mastermix
+
5µl de agua par biología molecular (CN-H₂O)

* En el T-COR 8®-IVD, recomendamos que los controles positivos y negativos se analicen al menos la primera vez que se utilice un nuevo kit.



Mezclar bien después de colocar la muestra en el tubo con repetidos pipeteos, evitando la formación de burbujas y comprobando que el volumen de líquido esté en el fondo del tubo. Cerrar bien cada tubo después de depositar los controles y la muestra para evitar cualquier posible contaminación.



3 - UTILIZACIÓN DE LOS CÓDIGOS DE BARRAS (véase III-)

Procedimiento detallado:

- 7) Homogeneizar el tubo de enzimas, y agitar en vórtex el Oligomix, el CP y el CI-PCR. Y a continuación centrifugar.
- 8) Para 1 o 2 tubos, colocar la cantidad/reacción exacta de cada reactivo en cada tubo. Pasar directamente al punto III-Utilización de los códigos de barras.
- 9) Para 3 o más tubos, preparar la Mastermix como se indica a continuación, siendo N el número de reacciones. Preparar la cantidad de Mastermix para al menos N+1 reacciones.

Número de reacción/es	1	N+1	Ejemplo para 1 paciente + CP + C Neg N = 3
Enzyme	12,5 µl	(N+1) x 12,5 µl	50 µl
Oligomix	7,5 µl	(N+1) x 7,5 µl	20 µl
CI-PCR	1 µl	(N+1) x 1 µl	4 µl
Volumen total Mastermix	21 µl	(N+1) x 21 µl	74 µl

- 3) Homogeneizar la Mastermix preparada en 2) y centrifugar brevemente.
- 11) Dispensar 20 µl de Mastermix en cada tubo de PCR en tiempo real utilizando una micropipeta y puntas con filtro.
- 12) Añadir 5 µL de muestra no extraída
- 13) Paralelamente realizar los siguientes controles, al menos la primera vez que se abra un nuevo kit.
 - Control positivo: 20µL de Mastermix + 5 µL de control positivo CP
 - Control negativo: 20µL de Mastermix + 5µL de agua suministrada (CN-H2O)



Mezclar bien después de colocar la muestra en el tubo con repetidos pipeteos, evitando la formación de burbujas y comprobando que el volumen de líquido esté en el fondo del tubo. Cerrar bien cada tubo después de depositar el control o de la muestra para evitar la contaminación.

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B
Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus
Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

III- Utilización de los códigos de barras en T-COR 8®-IVD

- 1- Seleccionar Menú > Nuevo Análisis/Nueva Ejecución
- 2- Seleccionar el código de barras
- 3- Escanear en la parte derecha del instrumento el Código de Barras deseado:
 - tanto para el control positivo (código de barras EBX-039 Pos Ctrl),
 - como para el control negativo (código de barras EBX-039 Neg Ctrl),
 - o para una muestra (Código de barras del ensayo: EBX-039)

El instrumento selecciona automáticamente uno de los 8 pocillos disponibles. Seguir las instrucciones indicadas por el instrumento.

- 4- Levantar la solapa del pocillo x seleccionado por el instrumento, y comprobar que la luz LED azul está encendida. A continuación seleccionar "Sí/Yes".
- 5- Colocar el tubo en el pocillo correspondiente y doblar la válvula hacia atrás. Luego seleccionar "Siguiente/Next".
- 6- Si se desea dar un nombre (opcional), seleccionar "muestra x/sample x", y nombrarla. Seleccionar "Aceptar".
- 7- Seleccionar "Siguiente/Next".
- 8- Para añadir/probar otro control o muestra, seleccionar "Añadir un pocillo/Add well" y repetir el punto 3.
- 9- Seleccionar "Iniciar la ejecución/Start run".

Nota: la nominación de una muestra o de la tirada no puede modificarse o añadirse una vez finalizada la tirada. Ha de hacerse antes o durante el proceso.

IV- Presentación de los resultados

Los resultados de Ct y las curvas de amplificación están disponibles en la tabla de valores SmartCT™ /Table SmartCT™ (valores de Ct asignados a cada canal), y en los gráficos de Ct frente a ciclos en cada canal, que pueden visualizarse en tiempo real en la máquina.

Se genera automáticamente un análisis para los controles negativos y positivos, así como para las muestras. Esto está disponible en "Interpretaciones/Interpretations" al final de la ejecución en la ventana "Ver/View".

8. ANALISIS E INTERPRETACION DE DATOS
--

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B

Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus

Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

La interpretación se realiza automáticamente en T-COR 8®-IVD

Para el control positivo y negativo, es posible obtener los siguientes resultados:

« Neg Ctrl Fail »: No válido
 « Neg Ctrl Valid »: Válido
 « Pos Ctrl Fail »: No válido
 « Pos Ctrl Valid »: Válido

Estos, comprobados al menos cuando se abre el kit por primera vez, deben ser válidos para poder utilizarlo.

Determinación del estado de las muestras:

El control interno de CI-PCR valida automáticamente el resultado de cada muestra.

"Detectado/Detected": Positivo → casilla verde

"No detectado/Not detected": Negativo → cuadro rojo

"No válido/Invalid": Resultado no válido -> cuadro amarillo -> volver a probar

Ejemplo de presentación de interpretación automática de resultados:

Summary							
Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5	Note
2	Ctrl POS	EBX-039 Pos Ctrl	21.6			25.0	Pos Ctrl Valid
3	Ctrl NEG	EBX-039 Neg Ctrl				24.4	Neg Ctrl Valid
4	Ctrl NEG	EBX-039 Neg Ctrl					Neg Ctrl Fail
5	POS sample	EBX-039	29.0			24.9	S. Ag Positive
6	POS sample	EBX-039	28.9				S. Ag Positive
7	NEG sample	EBX-039					Retest
8	NEG sample	EBX-039				25.1	S. Ag Negative

Summary	Resumen
Well	Pocillo
POS sample	Muestra POS
NEG sample	Muestra NEG
Sample	Muestra
Assay	Ensayo
Call	Llamada
Detected	Detectado
Invalid	Inválido
Not detected	No detectado
Note	Nota
Pos Ctrl Valid	Pos Ctrl Válido
Neg Ctrl Valid	Neg Ctrl Válido
S. Ag Positive	S. Ag Positivo

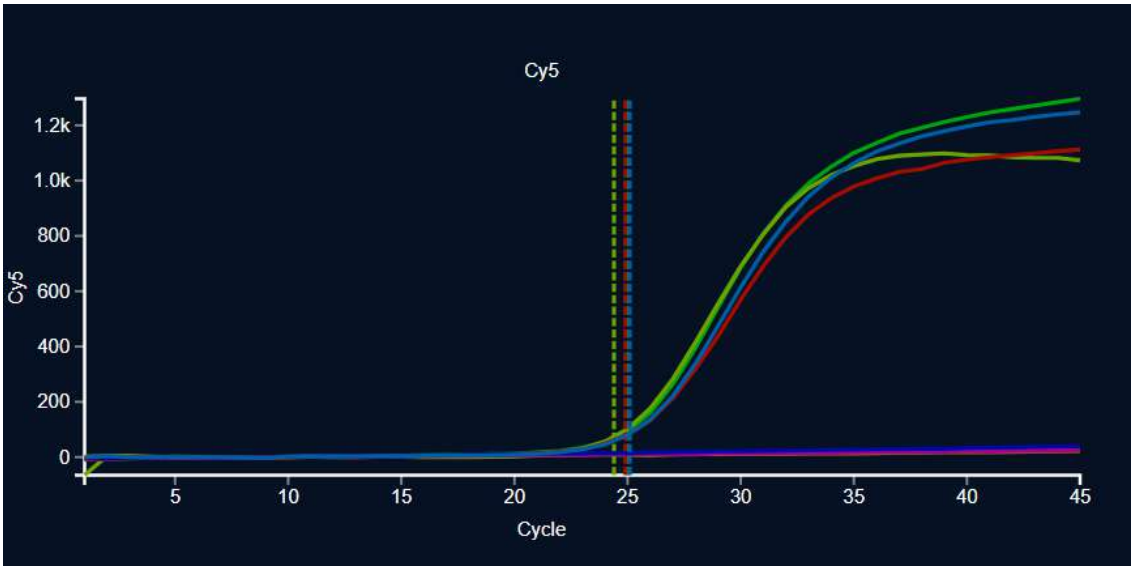
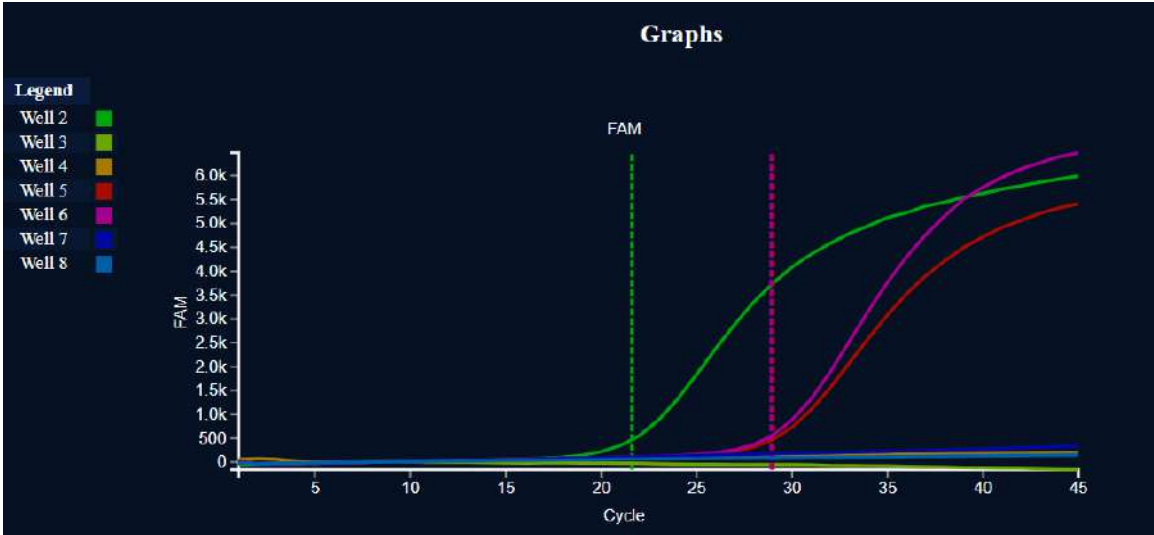
Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B

Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus

Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

Retest	Retest
S. Ag Negative	S. Ag Negativo

Ejemplo de curvas de amplificación



Legend	Leyenda
Well 2	Pocillo 2
Graphs	Gráficos

9. ANALISIS DEL RENDIMIENTO

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B
Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus
Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

➤ **Sensibilidad analítica del Control Positivo:** 10 ejemplares/microlitro

➤ **Variabilidad de la señal:** Coeficiente de variación (%)

EBX-039	INTRA-lote	INTER-lotes
<i>Streptococo del grupo B/S. agalactiae</i> (FAM)	0,71	1,52
Control interno (CI-PCR)	0,66	1,77

➤ **Validación en muestras clínicas**

La especificidad y la sensibilidad se analizaron utilizando hisopos vaginales previamente probados (no extraídos).

		EBX-039		
		Estreptococo del grupo B/S. <i>agalactiae</i>		
		POS	NEG	TOTAL
Prueba preliminar	POS	15	0	15
	NEG	0	18	18
	TOTAL	15	18	33

EBX-039	Especificidad	Sensibilidad	Concordancia
<i>Streptococcus agalactiae</i> (FAM)	>99 %	>99 %	>99 %

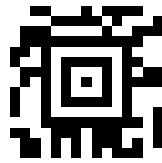
Estudio de reacción cruzada:

Las siguientes bacterias han sido probadas y no muestran reacción cruzada:

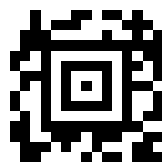
- *Listeria monocytogenes*
- *Escherichia coli*
- *Neisseria meningitidis*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenza*
- *Staphylococcus aureus*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Bartonella spp*
- *Coxiella burnetii*
- *Mycobacterium avium*
- *Klebsiella kingae*

Códigos de barras en T-COR8®-IVD para EBX-039

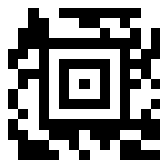
EBX-039 Pos Ctrl
Control positivo del CP



EBX-039 Neg Ctrl
Agua = Control Negativo (CN-H2O)



Ensayo: EBX-039



10. CONTROL DE CALIDAD

De acuerdo con el sistema de gestión de la calidad de Eurobio Scientific, que cuenta con la certificación ISO EN 13485, cada lote de EurobioPlex estreptococo grupo B se somete a pruebas de acuerdo con las especificaciones predefinidas para garantizar la calidad constante del producto.

11. RECICLAJE DE RESIDUOS

Reciclar todos los residuos de acuerdo con la legislación.

12. NOTIFICACIÓN DE INCIDENTES

Cualquier incidente grave relacionado con el producto deberá notificarse a EUROBIO y a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido el usuario y/o el paciente.

Fiche technique EurobioPlex Streptocoque Groupe B
 Technical Sheet EurobioPlex Group B Streptococcus
 Ficha técnica de EurobioPlex estreptococo grupo B

13. SIMBOLOS

REF

Referencia

LOT

Número de lote



Límite superior de la temperatura de almacenamiento



Fecha de caducidad



Contenido suficiente para las reacciones "N".



Almacenar en un lugar oscuro



Fabricante

RUO

Solo para uso de investigación

DIV

Diagnóstico in vitro

CE

Producto con marcado CE



Instrucciones de uso



Advertencia



No utilizar si el embalaje está dañado



eurobio
SCIENTIFIC

7, avenue de Scandinavie
 ZA de Courtaboeuf
 91940 Les Ulis
 FRANCIA