



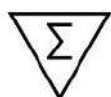
EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

RT-PCR EN TEMPS REEL

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

REF

EBX-041-25
EBX-041-50
EBX-041-100
EBX-041-192
EBX-041-200
EBX-041-600



25/50/100/192/200/600 réactions



Référence EBX-041 Version 14.00 du **27/01/2023**

Validé sur :

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) avec analyse sur CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)
- CFX® Opus 96 (Bio-Rad) avec analyse sur Bio-Rad CFX Maestro version 2.2 (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 avec analyse sur LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- T-COR 8®-IVD (Tetacore Inc.) avec T-COR 8 Per-Well SmartCT™ (auto v1) software
- QuantStudio™ 5 et QuantStudio™ 7 Pro (Applied Biosystems™ by ThermoFisher Scientific) avec QuantStudio 6/7 Pro Real-Time PCR Systems Software (Applied Biosystems™ by ThermoFisher Scientific)

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 SARS-CoV-2 Multiplex

Table des matières

1.	Informations générales	3
2.	Destination du dispositif	4
3.	Symboles	5
4.	Principe.....	6
5.	Composants du kit.....	6
6.	Conservation et stockage	8
7.	Matériel requis non fournis.....	8
8.	Instrument de PCR en temps réel	8
9.	Mises en garde et précautions.....	9
10.	Protocole	10
11.	Validation de l'expérimentation.....	14
12.	Analyse des données et interprétation.....	16
13.	Analyse des performances.....	18
14.	Bibliographie	27
15.	Contrôle qualité.....	28
16.	Elimination des déchets.....	28
17.	Déclaration d'incident	28
18.	Assistance technique.....	28

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

1. Informations générales

Le virus SARS-CoV-2 est apparu en Chine fin 2019, dans la ville de Wuhan. 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 septième coronavirus identifié infectant l'humain, après les coronavirus humains (HCoV) 229E, NL63, OC43, HKU1, les SRAS-CoV (coronavirus causant un syndrome respiratoire aigu sévère) et les MERS-CoV (coronavirus induisant le syndrome respiratoire du Moyen-Orient).

Dix-huit génomes ont été isolés et signalés notamment BetaCoV / Wuhan / IVDC-HB-01/2019, BetaCoV / Wuhan / IVDC-HB-04/2020, BetaCoV / Wuhan / IVDC-HB-05/2019, BetaCoV / Wuhan / WIV04 / 2019 et BetaCoV / Wuhan / IPBCAMS-WH-01/2019. Les séquences du SARS-CoV-2 présentent des similitudes avec celles des bêtacoronavirus trouvés chez les chauves-souris. Le virus SARS-CoV-2 est génétiquement distinct des autres coronavirus humains tels que ceux liés au SRAS et au MERS.

Le tableau clinique est variable, recouvrant les 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 mortalité est imprécis au début de l'épidémie, autour des 2 % fin janvier 2020, donc moindre par rapport à celui lié au SRAS-CoV ou au MERS-CoV qui sont de 10 % et 30 % respectivement. Le SARS-CoV-2 est hautement contagieux avec plus de 90 000 cas dans le monde début Mars 2020.

L'EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex a été conçu pour détecter toutes les séquences de SARS-CoV-2 connues à ce jour, et par alignement in silico avec les séquences des autres coronavirus.

Un algorithme de décision basé sur la détection de 3 cibles (2 cibles dans le gène RdRp identiques à celles recommandées par l'Organisation Mondiale de la Santé (<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>: published under Real-time RT-PCR assays for the detection of SARS-CoV-2 Institut Pasteur, Paris (2 March 2020)) et une dans le gène N) peut être utilisé pour déterminer le statut SARS-CoV-2 (voir partie analyse des résultats et interprétation et limites).

Le diagnostic doit être toujours posé par un personnel médical et dans le contexte clinique, historique et symptomatique du patient.

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

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

2. Destination du dispositif

L'EurobioPlex SARS-CoV-2 est un test d'amplification par reverse transcription-réaction en chaîne de la polymérase (RT-PCR) en temps réel, pour un usage *in vitro* conçu pour la détermination qualitative de la présence ou de l'absence de SARS-CoV-2 dans un extrait d'acides nucléiques ARN. Le test est indiqué pour aider à poser un diagnostic de présomption d'infection chez l'homme, ou compléter un diagnostic avéré ou indéterminé.

Le test EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex est un dispositif médical de diagnostic *In Vitro*, il doit être utilisé par du personnel de laboratoire d'analyse de biologie médicale qualifié. Il ne doit pas être recyclé après utilisation.

Le kit a été testé sur le type de prélèvements suivants :

- Aspirations nasopharyngées
- Ecouvillon nasopharyngé
- Liquide broncho-alvéolaire
- Crachat
- Ecouvillon nasal
- Prélèvements salivaires

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

3. 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



Attention

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

4. Principe

L'EurobioPlex SARS-CoV-2 est un test d'amplification de l'acide ribonucléique (ARN) de SARS-CoV-2 basé sur 1 test de RT-PCR multiplex détectant 3 cibles du virus (2 cibles dans le gène RdRp et une dans le gène N) dans un même puits. Il suffit qu'une des séquences du gène RdRp soit amplifiée pour que le diagnostic de SARS-CoV-2 puisse être directement rendu positif (voir Analyse des données et Interprétation des résultats).

Le kit contient 1 oligomix pour détecter les 3 cibles, ainsi qu'un contrôle endogène. Le test est réalisé à partir de l'ARN extrait de prélèvement au moyen d'une réaction dans 1 puits/tube.

La recherche des 3 cibles permet de garantir la sensibilité, et la spécificité par rapport aux autres coronavirus connus de type HCoV, SRAS-CoV, les Bétacoronavirus principalement associés aux chiroptères (BtCoV) et les MERS-CoV. 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 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'ARN du SARS-CoV-2 est détecté à l'aide de sondes spécifiques pour chaque gène respectivement marquées en FAM (cible 1/Gène RdRp), HEX (cible 2/Gène RdRp) et Texas Red (cible 3/Gène N). Le Contrôle endogène est détecté à l'aide d'une sonde marquée CY5. 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 est relative à l'accumulation des produits d'amplification.

5. Composants du kit

Le kit de RT-PCR en temps réel EurobioPlex SARS-CoV-2 est prêt à l'emploi et contient les réactifs et les enzymes nécessaires pour la détection de ce virus (Tableau 1).

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 2.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

Tableau 1: Composants du kit

Couleur de Bouchon	Contenu du kit	25 réactions	50 réactions	100 réactions	192 réactions	200 réactions	600 réactions	Reconstitution
Rouge	Enzymes	2x100 µL	400 µL	900 µl	2 x 900µl	2 x 900µl	3 x 1300 µl	Prêt à l'emploi
Transparent	Oligomix	2x80 µL	320 µL	720 µl	1440µL	1440µL	3 x 1050 µl	Prêt à l'emploi
Jaune	Contrôle positif CP	2x20 µL	80 µL	160 µl	320 µl	320 µl	320 µl	Prêt à l'emploi
Bleu	Eau = contrôle négatif (CN-H2O)	1500 µL	1500 µL	1500µl	2x1500 µl	2x1500 µl	5 x 1500 µl	Prêt à l'emploi

Oligomix : contient les amorces et sondes pour les 3 cibles et pour le contrôle endogène

Tableau 2 : Détection des cibles selon les fluorophores

Cibles	Fluorophore	Excitation	Emission
Cible 1 gene RdRp	FAM	495 nm	515 nm
Cible 2 gene RdRp	HEX	535 nm	555 nm
Cible 3 Gène N	Texas Red	585 nm	605 nm
Contrôle interne endogène	Cy5	650 nm	670 nm

Canaux équivalents sur différents instruments de PCR :

- Canal **FAM** (Systèmes ABI, QS5, QS7, SmartCycler II, Systèmes Mx, Chromo4/CFX96™/CFX Opus 96, T-COR 8™-IVD, Dtpime, LC480), Canal Green (Rotor-Gene Q).
- Canal **HEX** (Chromo 4/CFX96/CFX Opus 96, Systèmes Mx, T-COR 8®-IVD, Dtpime, LC 480), Canal VIC (Systèmes ABI, QS5, QS7), Canal Alexa532 (SmartCycler II), Canal Yellow (Rotor-Gene Q),
- Canal **Texas Red** (ABI 7500, Chromo 4/CFX96/ CFX Opus 96, Systèmes Mx, T-COR 8®-IVD), LC Red 610 (LC480), Canal Orange (Rotor-Gene Q), Canal Rox (QS5, QS7, DTprime)
- Canal **Cy5** (Systèmes ABI, QS5, QS7, Systèmes Mx, Chromo4/CFX96™/CFX Opus 96, T-COR 8™-IVD, Dtpime, LC480), Canal Alexa647 (SmartCycler II), Canal Red (Rotor-Gene Q).

Note 1: Sur LC480 instrument : Appliquer une compensation de couleur pour les longueurs FAM/HEX-VIC/Texas Red/Cy5 (FAM : 483-533 / HEX-VIC : 523-568 /Texas Red : 558-610 / Cy5 : 615-670).

Note 2: Lors de l'analyse sur le logiciel LC480 Software release 1.5.0 ne pas laisser la Noiseband (Auto) pour les canaux FAM et HEX mais appliquer une Noiseband Fluor manuellement à 2,1 dans le canal FAM et de 4,5 dans le canal HEX.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

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 Multiplex 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)
- CFX® Opus 96 (Bio-Rad) avec analyse sur Bio-Rad CFX Maestro version 2.2 (Bio-Rad)
- LightCycler®480 avec analyse sur LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- T-COR 8®-IVD (Tetradcore Inc.) avec T-COR 8 Per-Well SmartCT™ (auto v1) software
- QuantStudio™ 5 et QuantStudio™ 7 Pro (Applied Biosystems™ by ThermoFisher Scientific) avec QuantStudio 6/7 Pro Real-Time PCR Systems Software (Applied Biosystems™ by ThermoFisher Scientific)

9. Mises en garde et précautions



Lire attentivement ces instructions avant de débiter le protocole.

- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée par des techniciens de laboratoire d'analyse de biologie médicale.
- ◇ La réglementation de biosécurité locale et nationale en vigueur pour le dépistage du SARS-CoV-2 doit être suivie scrupuleusement en toute circonstance, notamment dans des laboratoires et avec les équipements de laboratoire en accord.
- ◇ S'assurer que les instruments ont été installés, calibrés et maintenus en accord avec les recommandations du fabricant.
- ◇ Il est de la responsabilité de l'utilisateur d'utiliser un autre équipement que ceux validés, et dans ce cas, les performances ne sont pas garanties.
- ◇ Les échantillons cliniques doivent être considérés comme du matériel potentiellement infectieux et doivent être préparés sous une hotte à flux laminaire.
- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée selon les bonnes pratiques de laboratoire.
- ◇ Ne pas utiliser ce kit après la date de péremption indiquée.
- ◇ Le kit est expédié sous carboglace, et les composants du kit doivent arriver congelés. Si un ou plus des composants arrive décongelé, ou si les tubes ont été endommagés pendant le transport, contacter Eurobio Scientific.
- ◇ Eviter les cycles de congélation / décongélation des réactifs, cela peut conduire à une baisse de la sensibilité du test.
- ◇ Une fois les réactifs décongelés, centrifuger brièvement les tubes avant leur utilisation.
- ◇ L'utilisation de glace ou d'un bloc réfrigérant est conseillée en cas de longs délais du fait par exemple d'un important nombre d'échantillons à traiter ou de fortes températures.
- ◇ Il est recommandé de définir trois zones de travail distinctes : 1) Isolation de l'ARN, 2) Préparation du mélange réactionnel, et 3) Amplification/Détection des produits amplifiés.
- ◇ 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.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

- ◇ 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.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

Pour les prélèvements salivaires, nous recommandons l'utilisation d'un fluidifiant à base de Dithiothreitol (DTT) tel que le produit commercialisé par Eurobio (Digest-EUR- ref : DD0DIG00-AI). Dans le cas de l'utilisation de ce dernier, nous recommandons d'utiliser 10 µl de la référence DD0DIG00-AI pour 200 µl de salive. Sans fluidifiant, les performances ne sont pas garanties.

Dans le kit EBX-041, 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).

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 Multiplex

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 Multiplex

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 μ L
Eau	(N+3) x 8,75 μ L
Oligomix	(N+3) x 5 μ L
Volume total Mastermix	(N+3) x 20 μ L

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

- 3) Homogénéiser le Mastermix préparé en 2) et centrifuger brièvement.
- 4) Distribuer 20 μ L de Mastermix à l'aide d'une micropipette et d'embouts à filtre dans des tubes/puits de microplaques indépendants.
- 5) Ajouter 5 μ L d'échantillon d'ARN extrait.
- 6) En parallèle réaliser les contrôles suivants :
 - Contrôle positif :
 - 20 μ L de Mastermix + 5 μ L de CP.
 - Contrôle négatif :
 - 20 μ L de Mastermix + 5 μ L 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).

Note2 : Sur LC480 instrument : Appliquer une compensation de couleur pour les longueurs FAM/HEX-VIC/Texas Red/Cy5 (FAM : 483-533 / HEX-VIC : 523-568 /Texas Red : 558-610 / Cy5 : 615-670).

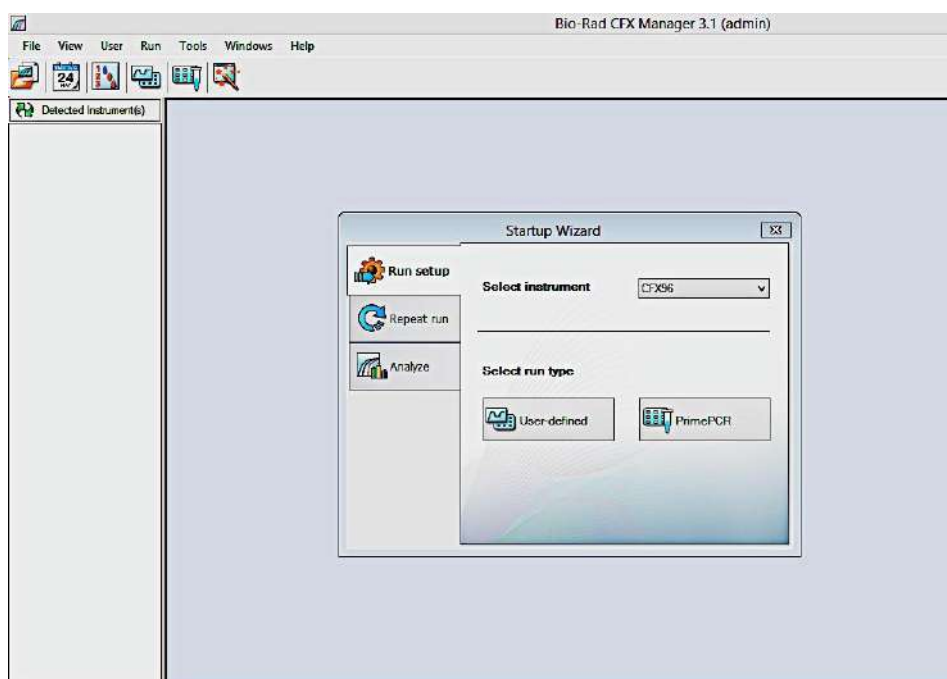
Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

Note 3 : Lors de l'analyse sur le logiciel LC480 Software release 1.5.0, ne pas laisser la Noiseband (Auto) pour les canaux FAM et HEX mais appliquer la Noiseband Fluor manuellement à 2,1 dans le canal FAM et de 4,5 dans le canal HEX

11. Validation de l'expérimentation

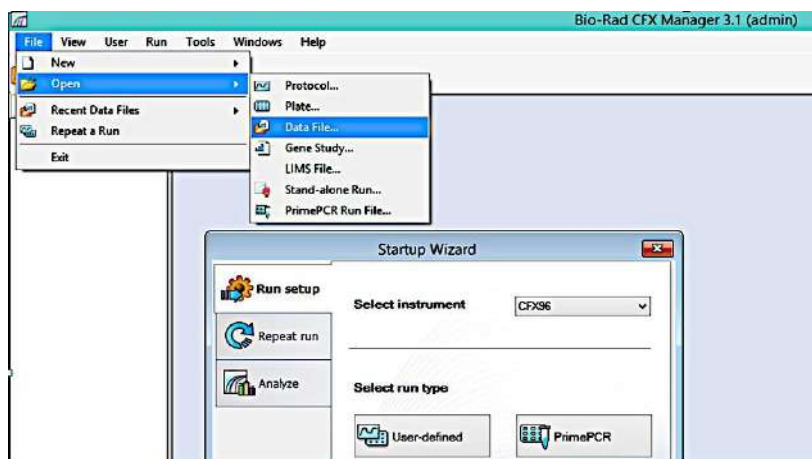
L'analyse des data post-acquisition sur un appareil de PCR CFX96 (Bio-Rad) doit être réalisée à l'aide de la version 3.1 du logiciel CFX Manager (Bio-Rad). Afin de passer sur cette version à partir d'un run lancé sur une version antérieure, veuillez suivre la procédure suivante : à la fin du run, le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



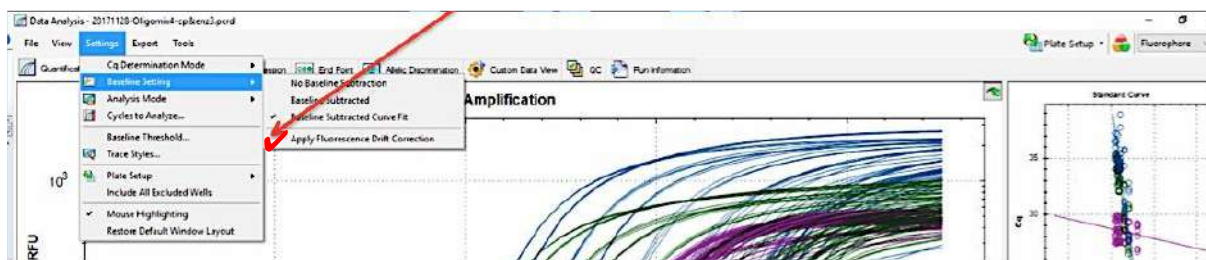
Cliquer sur « File » et sélectionner « Open » puis « Data File ».

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

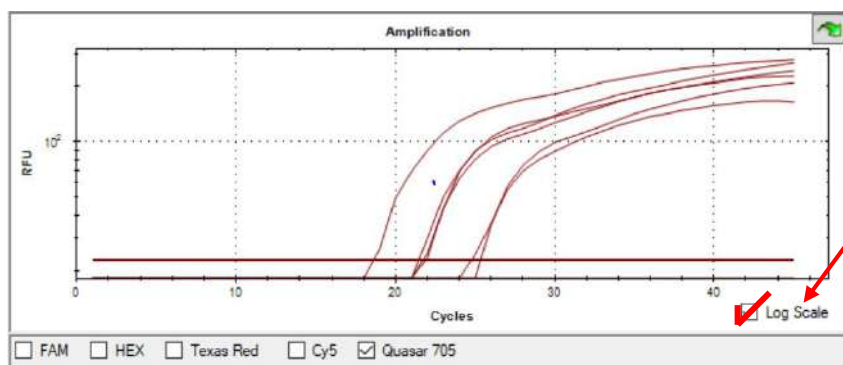


Sélectionner le fichier que vous souhaitez analyser et cliquer sur « Ouvrir ».

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 ».

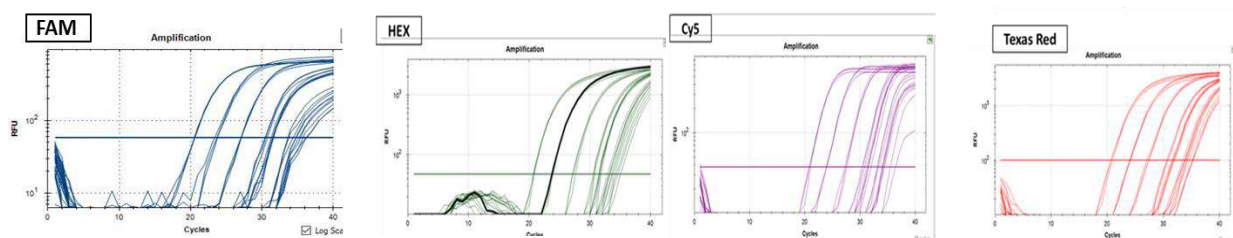


Pour optimiser l'analyse du run, cocher la case « Log Scale » pour chaque canal analysé. Ensuite, placer la barre de seuil (*threshold*) au-dessus du bruit de fond correspondant au milieu de la phase exponentielle. Les 5 canaux d'intérêt présentent des RFU très élevés et différents selon le canal considéré,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



Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

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



Les résultats pour les contrôles doivent remplir les conditions du Tableau 4. Sur T-COR 8®-IVD, ces contrôles doivent être réalisés à minima lors de la première utilisation d'un nouveau kit.

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 ≤ 32
HEX	Ct ≤ 32
Texas Red	Ct ≤ 32
Cy5	Ct ≤ 32
Contrôle Négatif	
FAM	Ct non déterminé
HEX	Ct non déterminé
Texas Red	Ct ≥ 38 ou non déterminé
Cy5	Ct non déterminé

12. Analyse des données et interprétation

Contrôle d'extraction d'ARN et d'inhibition de RT-PCR dans les échantillons :

Le bon fonctionnement de la réaction de RT-PCR peut être évalué sur le canal Cy5 mesurant le contrôle endogène.

Dans certains cas, il est recommandé de répéter l'extraction ou de diluer l'échantillon 5 fois, car le résultat est non interprétable (NI) (Voir colonne « validité du test » du Tableau 5 d'interprétation). Tous les cas de figures sont rassemblés dans le Tableau 5.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

Pour les échantillons cliniques, et la détermination de la présence ou absence du SARS-CoV-2 :



Cut-off de valeurs de CT pour la positivité :
Cibles 1 et 2 gènes RdRp cible 3 gène N: Ct < 40

Le seuil de Ct pour positivité des échantillons pour T-COR 8®-IVD est : + Positif => Ct positif soit Ct ≤ 45 dans les trois canaux, avec interprétation automatique avec les codes-barres.

Les résultats suivants sont possibles

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

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

Cible 1 RdRp	Cible 2 RdRp	Cible 3 N	Contrôle endogène	Validité du test	Présence de SARS-CoV-2 ou interprétation impossible (NI)
FAM	HEX	Texas Red	CY5		
+	+/-	+/-	+ / -	Oui	OUI
+/-	+	+/-	+ / -	Oui	OUI
-	-	-	+	Oui	NON
-	-	+	+	Oui	Indéterminé
-	-	+/-	-	Partielle	NI

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

Limites d'utilisation et d'interprétation :

- ❖ Le kit EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex 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.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

Les faux positifs peuvent être dus à :

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

13. Analyse des performances

Limite de détection/sensibilité analytique

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-041.

Limite de détection/sensibilité analytique:

- **Contrôle positif du kit** : 10 copies/ μ L CP
- **Un ARN synthétique SARS-CoV-2** (Twist Bioscience, USA) est détecté avec une sensibilité de 12,5 copies ARN/ μ L
- **Le First WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA** est détecté avec une sensibilité de 7.5 copies/ μ L
- **Etude de sensibilité sur 106 échantillons connus positifs, dilués dans des échantillons connus Négatifs à 3 x LOD**: 100 % de sensibilité (detection de 106 échantillons / 106)

- **Substances interférentes** : 7 substances provenant du kit AcroMetrix™ Inhibition Panel REF 956400, de l'Oxymetazoline et du Zanamivir. Une concentration élevée, pouvant être contenue dans certains médicaments, a été ajoutée à l'échantillon positif avant extraction: Aucun impact des substances interférentes testées n'a été observé sur le résultat obtenu.
- **La limite de détection sur prélèvement salivaire**, calculée à 95% de confiance à partir des données reportées ci-dessous s'établit à **1940 c/mL** :

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

Copies/ml SARS-CoV-2	Nombre de salives testées	Nombre de salives positives	% de détection
800	20	16	80
1200	13	12	91,7
3600	20	20	100
12000	20	20	100

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

- La variabilité inter-lots sur le Ct de 3 lots indépendants d'EBX-041 est la suivante :

Coefficient de variation %	Gène RdRp cible 1	Gène RdRp cible 2	Gène N cible 3	Gène ctrl endo-gène
CFX96	1.21	0.37	1,67	4.44
LC480	1.24	0.91	2.18	1.41
T-COR-8-IVD	1.80	1.66	1.33	2.53
QS5 / QS7 pro	3.90	4.41	3.31	6.50

Spécificité diagnostique

Cette validation a porté sur :

- 508 échantillons SARS-CoV-2 négatifs pré-testés et caractérisés négatifs par des tests marqués CE.
- 50 échantillons négatifs pour tous les coronavirus connus, dont des échantillons de panels respiratoires caractérisés pour d'autres virus afin de tester les réactions croisées.

Les extractions d'ARN ont été réalisées sur les systèmes suivants :

QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen)

Magna Pure Compact (Roche Life Science)

EZ1 Advanced XL virus card 2.0 (Qiagen)

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

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

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

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 et spécificité diagnostique

La validation des performances a porté sur :

558 échantillons négatifs	
508 échantillons SARS-CoV-2 négatifs	Caractérisés avec kit Allplex 2019 n-CoV (Seegene), marqué CE.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

50 échantillons respiratoires positifs	RSV-A/B, Parainfluenzae, Rhinovirus, Metapneumovirus, CoV NL63, CoV OC43, CoV 229E, CoV KU1
--	---

270 échantillons positifs	
270 échantillons Positifs	Caractérisés avec kit EurobioPlex EBX-041 CE-IVD

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). Et les tests ont été réalisés sur CFX96™ (Bio-Rad).

		EBX-041	
		Positifs SARS-CoV-2	Négatifs SARS-CoV-2
Pré-testés EBX-041 et Kit Seegene	Positifs SARS-CoV-2	270	0
	Négatifs SARS-CoV-2	0	558

Sensibilité globale : > 99% (270/270)
Spécificité globale : > 99% (558/558)
Concordance globale : > 99% (828/828)

Spécificité et sensibilité diagnostique sur prélèvements salivaires et sur écouvillons nasopharyngés prélevés de façon concomitante sur les mêmes patients :

Cette validation a porté sur 103 prélèvements salivaires et 103 écouvillons nasopharyngés SARS-CoV-2 positifs prélevés de façon concomitante chez 103 patients. Parmi les 103 prélèvements nasopharyngés, 37 ont été détectés SARS-CoV-2 positifs et 66 se sont révélés négatifs.

Les extractions d'ARN ont été réalisées sur un extracteur Genolution (Nextractor®). La salive a été recueillie initialement dans un pot sec stérile de 30 mL en parallèle du prélèvement nasopharyngé, puis transférée dans un tube secondaire avec milieu de transport. Le prélèvement salivaire a été fluidifié avec du Digest-EUR (Eurobio. Réf. : DD0DIG00-AI) à raison de 12.5 µL pour 250 µL de salive dans 250 µL de PBS.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

- **Spécificité diagnostique sur prélèvements salivaires/écouvillons nasopharyngés prélevés de façon concomitante sur les mêmes patients :**

Cette validation a porté sur 66 prélèvements salivaires provenant des mêmes patients ayant eu un résultat SARS-CoV-2 négatif sur prélèvement nasopharyngés.

Aucun signal aspécifique n'a été détecté dans aucune salive, toutes présentant un signal valide du contrôle d'extraction et d'inhibition de RT-PCR.

- **Sensibilité diagnostique sur prélèvements salivaires et sur écouvillons nasopharyngés prélevés de façon concomitante sur les mêmes patients :**

Cette validation a porté sur 37 prélèvements salivaires provenant des mêmes patients ayant eu un résultat SARS-CoV-2 positif sur prélèvement nasopharyngés.

Les performances globales sur les prélèvements salives et nasopharyngés concomitants sont les suivantes :

Performances sur prélèvements salivaires/nasopharyngés (NP) concomitants sur les mêmes patients		Echantillons salivaires	
		Salives SARS-CoV-2 positives	Salives SARS-CoV-2 négatives
Echantillons nasopharyngés (NP)	NP SARS-CoV-2 positives	34	3
	NP SARS-CoV-2 négatifs	0	66

Les tests ont été réalisés sur CFX96™ (Bio-Rad).

Sensibilité sur salives (de patients ayant un résultat positif sur NP) /Concordance positive: 91.9 % (34/37) (IC₉₅ : 83.1 , 100)

Spécificité sur salives (de patients ayant un résultat négatif sur NP) /Concordance négative: > 99% (66/66) (IC₉₅ : 95 - 100)

Concordance globale entre les résultats sur prélèvements salivaires et nasopharyngés concomitants : 97.1% (100/103) (IC₉₅ : 93.8 , 100)

La **concordance positive** du test **EBX-041** entre échantillons nasopharyngés et salivaires est en accord avec les recommandations de la HAS, qui exigent une sensibilité clinique minimale du test RT-PCR salivaire d'au moins 80% (en considérant la borne inférieure d'intervalle de confiance à 95% de la sensibilité ainsi estimée).

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

PARTICULARITES LIEES A L'INSTRUMENT DE PCR EN TEMPS REEL T-COR 8®-IVD

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 ».

Note : 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.

Contrôles

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

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

Fluorophores

Il existe 4 combinaisons de fluorophores disponibles sur le T-COR 8®-IVD.

Pour tous les EBX, dont EBX-041, la combinaison FAM/HEX/Texas Red/Cy5 est celle choisie. Si certains canaux ne sont pas utilisés dans certains kits, ne pas en tenir compte lors de l'analyse des résultats.

Utilisation des Codes-Barres

- 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-041 Pos Ctrl),
 - soit pour le contrôle négatif (Code-barre EBX-041 Neg Ctrl),
 - soit pour un échantillon (Code-Barre EBX-041)

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 ».

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

6- Si vous souhaitez le nommer (optionnel), sélectionner « Echantillon 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.

Présentation et Interprétation 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 deux 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 ».

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

Détermination du statut pour les échantillons :

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

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

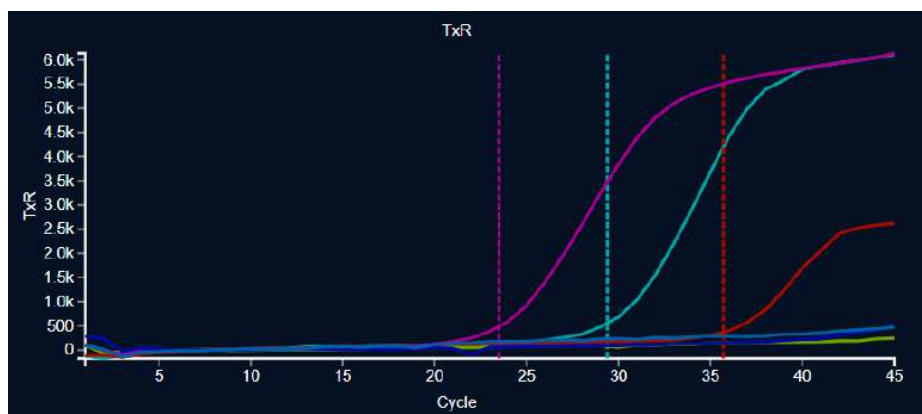
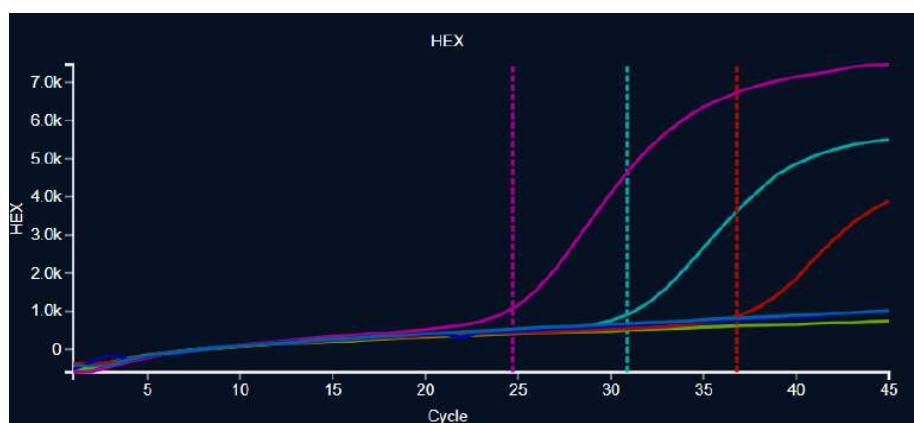
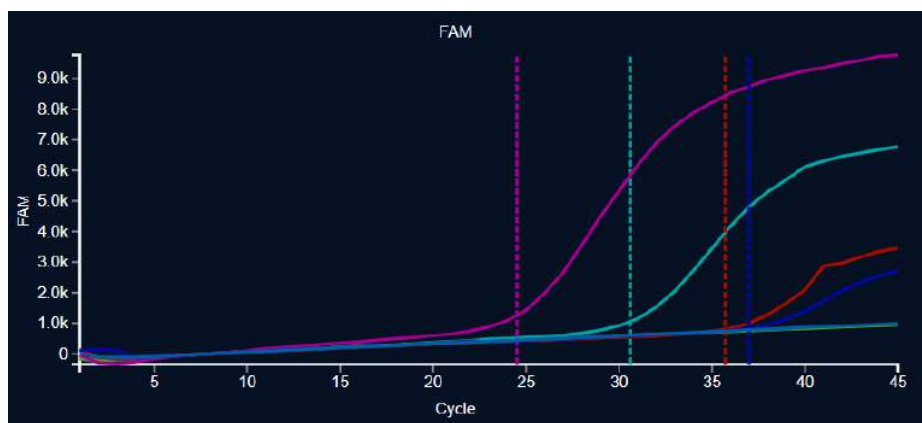
« Non Valide / Invalid » : Résultat non valide -> retester -> encadré jaune

Exemple de présentation d'interprétation automatique des résultats

Summary									
Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5	Call	Note	
1	ECH POS	EBX-041	30.6	30.9	29.4	28.9	Detected • Sars-Cov-2	Sars-Cov-2 positive	
2	ECH NEG	EBX-041				16.3	Not Detected	Sars-Cov-2 negative	
3	ECH NEG	EBX-041					Invalid	Retest	
5	Ctrl POS	EBX-041 Pos Ctrl	35.7	36.8	35.7		Invalid	Pos Ctrl Fail	
6	Ctrl POS	EBX-041 Pos Ctrl	24.5	24.7	23.5	23.0	Detected • Pos Ctrl	Pos Ctrl Valid	
7	Ctrl NEG	EBX-041 Neg Ctrl	37.0			32.5	Invalid	Neg Ctrl Fail	
8	Ctrl NEG	EBX-041 Neg Ctrl					Detected • Neg Ctrl	Neg Ctrl valid	

Exemple de courbes d'amplification

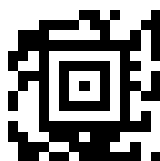
Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex



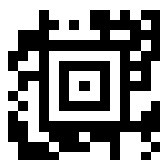
Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

Codes-Barres sur T-COR8®-IVD pour EBX-041

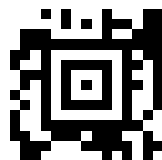
EBX-041 Pos Ctrl
Contrôle Positif CP



EBX-041 Neg Ctrl
Eau = contrôle négatif (CN-H2O)



EBX-041



14. Bibliographie

Chan JF, Kok KH, Zhu Z, Chu H et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wu-han. *Emerg microbes infect.* 2020 Dec; 9(1):221-236.

Cohen J, Normile D. New SRAS-like virus in China triggers alarm, *Science*. 2020 Jan 17;367(6475):234-235.

Drosten C, Muth D, Corman VM, Hussain R et al. An observational, laboratory-based study of outbreaks of middle east respiratory syndrome coronavirus in Jeddah and Riyadh, kingdom of Saudi Arabia, 2014. *Clin infect dis.* 2015 Feb 1; 60(3):369-77.

Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, Recommandations de bonnes pratiques, www.has-santé.fr

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

15. Contrôle qualité

Conformément au système de management de la qualité d'Eurobio, certifié ISO EN 13485, chaque lot de EurobioPlex SARS-CoV-2 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-scientific.com ou par téléphone au +33 (0)1.69.79.18.26.



Historique des changements

Date	Version	Révision
27/01/2023	V14.00	Validation du kit EBX-041 sur deux instruments : QuantStudio7 pro et QuantStudio5 (Applied Biosystem by Thermo Fisher Scientific)

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

09/11/2022	V13.00	Validation de l'instrument CFX® Opus 96 (Bio-Rad)

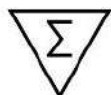


EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex REAL-TIME RT-PCR

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

REF

EBX-041-25
EBX-041-50
EBX-041-100
EBX-041-192
EBX-041-200
EBX-041-600



25/50/100/192/200/600 reactions

Reference EBX-041 Version 14.00 of January **27/01/2023**



Validated on:

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) with analysis on CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)
- CFX Opus 96 (Bio-Rad) with analysis on CFX Maestro version 2.2 (Bio-Rad)
- LightCycler®480 with analysis on LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- T-COR 8®-IVD (Tetradcore Inc.) with T-COR 8 Per-Well SmartCT™ (auto v1) software
- QuantStudio™ 5 & QuantStudio™ 7 Pro (Applied Biosystems™ by ThermoFisher Scientific) avec QuantStudio 6/7 Pro Real-Time PCR Systems Software (Applied Biosystems™ by ThermoFisher Scientific)

Storage conditions:

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



Instructions for use

Available on www.eurobio-scientific.com

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

Table of contents

1. Introduction.....	32
2. Purpose of the system	31
3. Symbols	34
4. Principle of detection.....	35
5. Content of the kit.....	35
6. Storage	36
7. Materials required not provided.....	37
8. Real-time PCR instrument	37
9. Cautions and note.....	37
10. Procedure.....	39
11. Validation of the experiment	43
12. Data analysis and interpretation.....	45
13. Performance analysis.....	47
14. Bibliography	53
15. Quality control	53
16. Waste disposal.....	54
17. Incident report.....	57
18. Technical assistance	57

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

1. Introduction

SARS-CoV-2/Covid-19 virus appeared in China end of 2019 in the city of Wuhan. It belongs to the Coronaviridae family and the sub-genera Sarbecovirus.

Its genome consists of 29903 ribonucleic acid bases (RNA). SARS-CoV-2 is the 7th coronavirus infecting humans to be identified, since human coronavirus (HCoV) 229E, NL63, OC43, HKU1, SARS-CoV (coronavirus responsible for severe acute respiratory syndrome) and MERS-CoV (coronavirus inducing Middle-East respiratory syndrome).

Eighteen genomes have been isolated and reported, amongst which BetaCoV / Wuhan / IVDC-HB-01/2019, BetaCoV / Wuhan / IVDC-HB-04/2020, BetaCoV / Wuhan / IVDC-HB-05/2019, BetaCoV / Wuhan / WIV04 / 2019 et BetaCoV / Wuhan / IPBCAMS-WH-01/2019. These sequences of SARS-CoV-2 have similarities with the ones of betacoronaviruses found in bats. SARS-CoV-2 is genetically distinct from other human coronaviruses such as the ones related to SARS and to MERS.

Symptoms can come as a cold, fever, cough, difficulty breathing, pneumonia, to severe respiratory syndrome, which can be fatal. The level of mortality is not precise at the beginning of the epidemic, around 2 % end of January. This is much less compared to 10 % for SARS-CoV or 30% for MERS-CoV. SARS-CoV-2 is highly contagious with more than 90 000 cases worldwide beginning of March 2020.

EurobioPlex SARS-CoV-2 was designed to detect all known SARS-CoV-2 published sequences by alignment in silico with sequences of other coronaviruses.

A decision algorithm based on the detection of 3 targets (RdRp Gene target 1 and RdRp target 2, identical to the ones recommended by the World Health Organization (<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>: published under Real-time RT-PCR assays for the detection of SARS-CoV-2 Institut Pasteur, Paris (2 March 2020)), and N Gene) can be used to determine SARS-CoV-2 patient status (see Data analysis and interpretation and limitations). The diagnostic must always be made by a physician and using the clinical context, history and symptoms of the patient.

Extracted RNA is the starting material for the EurobioPlex SARS-CoV-2 kit.

It is the user's responsibility to choose extraction methods relevant to the type of samples tested.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

2. Purpose of the system

EurobioPlex SARS-CoV-2 is a test based on real-time reverse-transcription and amplification designed for *in vitro* use for qualitative determination of absence or presence of SARS-CoV-2 in a RNA extract. This test is indicated to help diagnose the occurrence of this infection in humans, or complement a proven or indeterminate diagnosis.

The EurobioPlex SARS-CoV-2 test is an *In Vitro* diagnostic medical device, it must be used by qualified medical biology analysis laboratory personnel. It should not be recycled after use.

The EurobioPlex SARS-CoV-2 has been validated on the following specimen:

- Nasopharyngeal aspirate
- Nasopharyngeal swab
- Bronchoalveolar fluid
- Sputum
- Nasal swab
- Salivary samples

3. Symbols



Reference



Batch number



Temperature limitations



Expiration date



Content sufficient for « N » reactions



Manufacturer



CE marked product



In vitro diagnostic



Instructions for use



Caution

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

4. Principle of detection

The EBX-041 is a test using reverse-transcription and real-time amplification of viral RNA of SARS-CoV-2 based on amplification of 3 genes (RdRp Gene Target 1, RdRp Gene Target 2 and N Gene target 3). If at least one RdRp target is positive, a SARS-CoV-2 positive diagnostic can be called (see Data analysis and Interpretation).

The kit contains one oligomix to detect the 3 targets, as well as an encapsulated control of RNA extraction and RT-PCR inhibition. The test is performed from extracted RNA from a sample, using one RT-PCR reaction in a single distinct well/tube.

This test ensures sensitivity, and specificity with regard to other coronaviruses known, such as HCoV, SARS-CoV, betacoronavirus associated to bats (BtCoV) and MERS-CoV. The RNA extraction and RT-PCR inhibition control allows to check for variations that may occur during the RNA extraction step of biological samples and real-time PCR amplification. Thus, it ensures that a negative result may be due to a bad RNA extraction, and/or due to the presence of PCR inhibitors in too large quantities.

RNA of SARS-CoV-2 is detected with specific probes of each target, labeled respectively with FAM (target 1/RdRp gene), HEX (target 2/RdRp gene) and Texas red (target 3/N gene). The endogenous control is detected using a CY5 labeled probe. Probes emit a specific fluorescence following their hydrolysis during the elongation of the amplification product. The measurement of the intensity of real-time fluorescence correlates with the accumulation of amplification products.

5. Content of the kit

The RT-PCR real-time EurobioPlex SARS-CoV-2 kit is ready to use and contains all reagents and enzymes for the detection of this virus (Table 1).

Fluorescence is emitted and individually recorded through optical measurements during the PCR. The detection of the amplified fragment is performed by a fluorimeter using the channels shown in the Table 2.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

Table 1: Content of the kit

Cap color	Content of the kit	25 reactions	50 reactions	100 reactions	192 reactions	200 reactions	600 reactions	Reconstitution
Red	Enzymes	2x100 µL	400 µL	900 µl	2 x 900µl	2 x 900µl	3 x 1300 µl	Ready to use
Transparent	Oligomix	2x80 µL	320 µL	720 µl	1440µL	1440µL	3 x 1050 µl	Ready to use
Yellow	Positive control CP	2x20 µL	80 µL	160 µl	320 µl	320 µl	320 µl	Ready to use
Blue	Water = negative control (CN-H2O)	1500 µL	1500 µL	1500µl	2x1500 µl	2x1500 µl	5 x 1500 µl	Ready to use

Oligomix: contains primers and probes for the 3 targets and for the endogenous control

Table 2: Detection of targets by fluorophores

Targets	Fluorophore	Excitation	Emission
Target 1 / RdRp Gene	FAM	495 nm	515 nm
Target 2 / RdRp Gene	HEX	535 nm	555 nm
Target 3 / N Gene	Texas Red	585 nm	605 nm
Endogenous internal control	Cy5	650 nm	670 nm

Equivalent channels on different real time PCR cyclers:

- Channel **FAM** (Systems ABI, QS5, QS7, SmartCycler II, Systems Mx, CFX96™/CFX Opus 96/Chromo4, T-COR8™-IVD, Dtprime, LC 480), Channel Green (Rotor-Gene Q)
- Channel **HEX** (Chromo 4/CFX96/CFX Opus 96, Systèmes Mx, T-COR 8®-IVD, Dtprime, LC 480), Canal VIC (Systèmes ABI, QS5, QS7.), Canal Alexa532 (SmartCycler II), Canal Yellow (Rotor-Gene Q),
- Channel **Texas Red** (ABI 7500, Chromo 4/CFX96/CFX Opus 96, Systèmes Mx, T-COR 8®-IVD), LC Red 610 (LC480), Channel Orange (Rotor-Gene Q), Channel Rox (QS5, QS7, DTprime)
- Channel **Cy5** (CFX96™/CFX Opus 96/Chromo4, Systems ABI, QS5, QS7, Systems Mx, T-COR8™-IVD, Dtprime, LC 480), Channel Alexa647 (SmartCycler II), Channel Red (Rotor-Gene Q)

Note1: On LC480, apply color compensation for the following channels: FAM/HEX-VIC/Texas Red/Cy5 (FAM : 483-533 / HEX-VIC : 523-568 /Texas Red : 558-610 / Cy5 : 615-670).

Note2: During the analysis using LC480 Software release 1.5.0 apply a noise band of 2,1 for the FAM channel and 4,5 for the HEX channel.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

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.

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)
- CFX Opus 96 (Bio-Rad) with analysis on CFX Maestro version 2.2 (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 with analysis on LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- T-COR 8®-IVD (Tetradcore Inc.) with T-COR 8 Per-Well SmartCT™ (auto v1) software
- QuantStudio™ 5 & QuantStudio™ 7 Pro (Applied Biosystems™ by ThermoFisher Scientific) avec QuantStudio 6/7 Pro Real-Time PCR Systems Software (Applied Biosystems™ by ThermoFisher Scientific)

9. Cautions and note



Read these instructions carefully before starting the procedure.

- ◇ This experimentation should be performed by medical laboratory technicians.
- ◇ The local and national biosafety regulations in place for the detection of SARS-CoV-2 must be followed strictly at all times, especially in laboratories and with laboratory equipment in agreement.
- ◇ Ensure that instruments have been installed, calibrated and maintained in accordance with the manufacturer's recommendations.
- ◇ It is the responsibility of the user to use equipment other than that validated, and in such cases performance is not guaranteed.
- ◇ Clinical samples should be considered as potentially infectious material and should be prepared in a laminar flow cabinet.
- ◇ This experiment should be performed according to good laboratory practice.
- ◇ Do not use this kit after the stated expiration date.
- ◇ The kit is shipped under dry ice, and the kit components should arrive frozen. If one or more of the components arrive thawed, or if the tubes have been damaged in transit, contact Eurobio Scientific.
- ◇ Avoid freeze/thaw cycles of reagents as this may lead to a decrease in assay sensitivity.
- ◇ Once the reagents have been thawed, centrifuge the tubes briefly before use.
- ◇ The use of ice or an ice pack is recommended in case of long delays due to, for example, a large number of samples to be processed or high temperatures.
- ◇ It is recommended to define three separate work areas: 1) RNA isolation, 2) Preparation of the reaction mixture, and 3) Amplification/Detection of the amplified products.
- ◇ 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.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

- ◇ 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

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.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

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.

For salivary samples, we recommend the use of a Dithiothreitol -based fluidifier (DTT) such as the product marketed by Eurobio (Digest-EUR - reference DD0DIG00-AI). In the case of the use of the latter, we recommend to use 10 µl of the reference DD0DIG00-AI for 200 µl of saliva). Without fluidizer, performance is not guaranteed.

In the EBX-041 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 Multiplex

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 CP

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

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

d. Detailed procedure

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

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

(≤ 10):
is sufficient.

**For smaller series
preparing for N+2*

- 3) Homogenise the Mastermix prepared in 2) and centrifuge briefly
- 4) Dispense 20 μ L of Mastermix into separate microplate tubes/wells using a micropipette and filter tips.
- 5) Add 5 μ L of extracted RNA sample.
- 6) In parallel perform the following controls:
 - Positive Control:
 - 20 μ L of Mastermix + 5 μ L of CP.
 - Negative Control:
 - 20 μ L of Mastermix + 5 μ L 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

Note1: On CFX96™ (Bio-Rad), start the run using the v1.6 or later version of CFX Manager Software, and analyze with v 3.1 (see § Validation of the Experiment)

Note 2: On LightCycler ® 480 (Roche), apply color compensation for the following channels: FAM/HEX-VIC/Texas Red/Cy5 (FAM : 483-533 / HEX-VIC : 523-568 /Texas Red : 558-610 / Cy5 : 615-670).

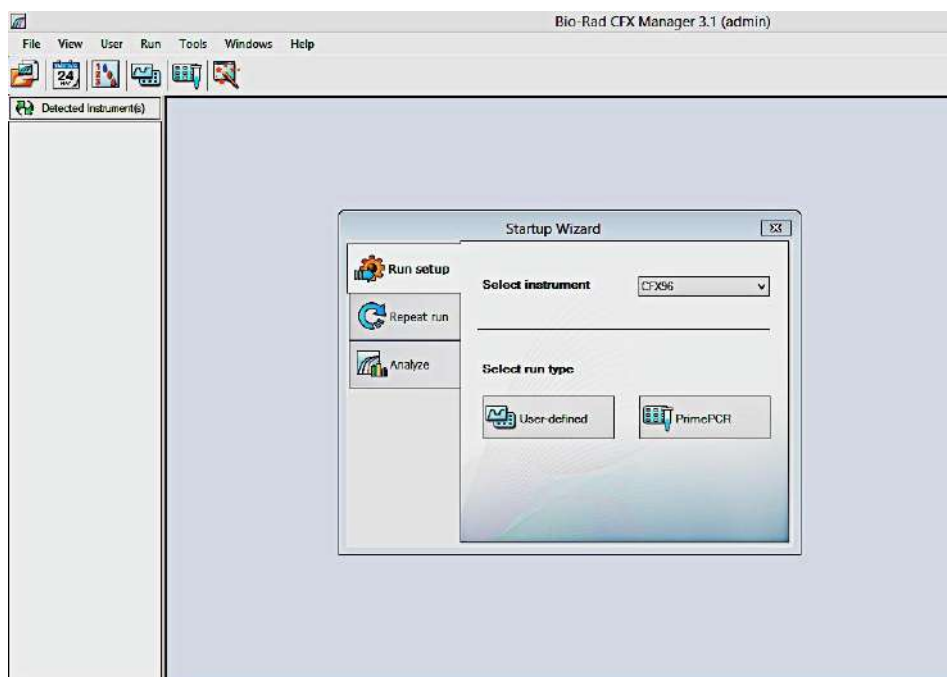
Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

Note 3 : During the analysis using LC480 Software release 1.5.0 apply a noise band of 2,1 for the FAM channel and 4,5 for the HEX channel.

11. Validation of the experiment

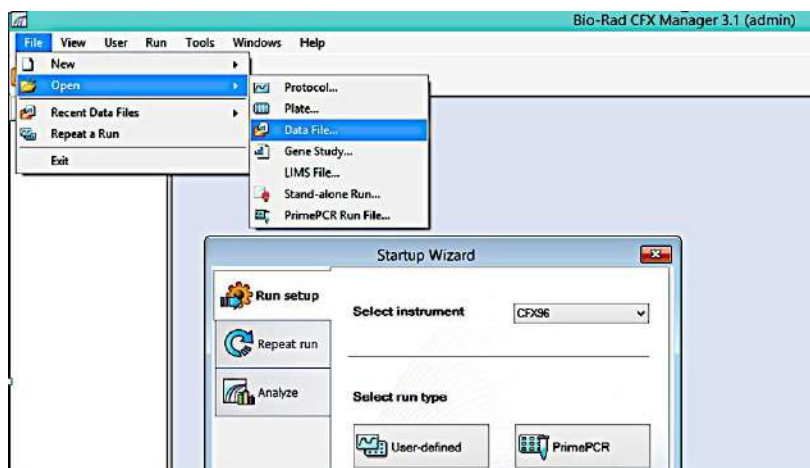
Post-acquisition data analysis on a CFX96 PCR instrument (Bio-Rad) must be performed using version 3.1 of the CFX Manager software (Bio-Rad). In order to change to this version from a run started on an earlier version, please follow the procedure below: At the end of the run, the data file with the extension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



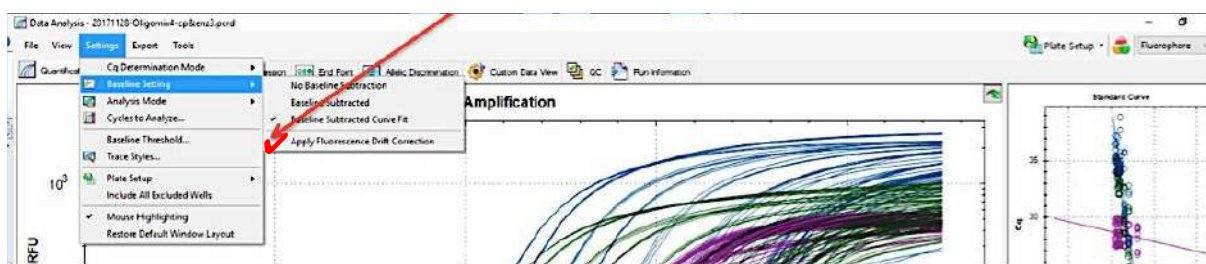
Click on "File" and select "Open" then "Data File".

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

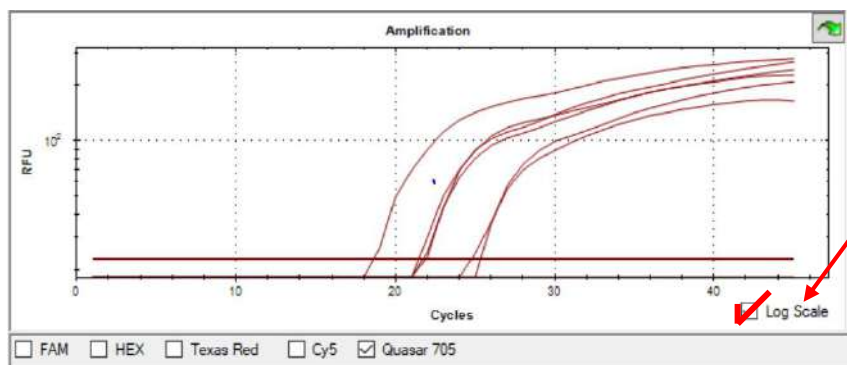


Select the file you need to analyse and click on "Open".

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".

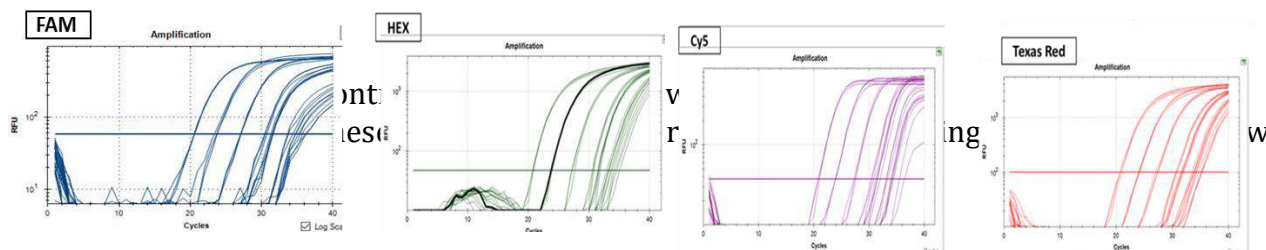


To optimise the run analysis, select the "Log Scale" checkbox for each channel analysed. Then place the threshold bar above the background noise corresponding to the middle of the exponential phase. The 5 channels of interest have high RFUs and differ according to the channel considered, so the "Log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



Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

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



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 ≤ 32
HEX	Ct ≤ 32
Texas Red	Ct ≤ 32
Cy5	Ct ≤ 32
Negative Control	
FAM	Undetermined Ct
HEX	Undetermined Ct
Texas Red	Ct ≥ 38 or Undetermined
Cy5	Undetermined Ct

12. Data analysis and interpretation

RNA extraction and RT-PCR inhibition control in samples:

The proper functioning of RT-PCR reaction can be evaluated on the Cy5 channel measuring the endogenous control.

In some cases, it is recommended to repeat the extraction or to dilute the sample 5 times, because the result cannot be interpreted (NI) (See column « validity of the test » on Table 5. All cases that can be encountered are described in Table 5.

For clinical samples, and determination of presence or absence of SARS-CoV-2:



Cut-off Ct values for positivity:
Target 1 and Target 2 RdRp Gene and Target 3 N gene: Ct < 40

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

Ct cut off for positivity of samples for T-COR 8®-IVD is: + Positive => Ct positive (≤ 45) for the 3 channels, but automatic interpretation is provided with Barcodes.

The following results are possible:

Table 5: Detection of SARS-CoV-2

Target 1 RdRp	Target 2 RdRp	Target 3 N	Endogenous control	Validity of the test	Presence of SARS-CoV-2 or no possible interpretation (NI)
FAM	HEX	Texas Red	CY5		
+	+/-	+/-	+ / -	Yes	YES
+/-	+	+/-	+ / -	Yes	YES
-	-	-	+	Yes	NO
-	-	+	+	Yes	Undetermined
-	-	+/-	-	Limited	NI

NI: no possible interpretation because of RT-PCR inhibition or failed extraction: no conclusion can be given. **It is then recommended to proceed to a new sampling and/or repeat the extraction and/or to dilute 5 times the sample.**

Limitations of use and interpretation:

- ❖ All samples must be treated as potentially infected by SARS-CoV-2, and biosafety local regulations must be thoroughly followed.
- ❖ Interpretation of results must take into account the possibility of false negatives and false positives.
 - False negative can be due to:
 - Inappropriate collection of samples, or bad storage
 - Samples outside the viremic phase
 - Incorrect extraction methods or use of non-validated PCR instruments
 - Manipulations that do not rigorously follow all the indications of this manual.
 - False positive can be due to:
 - A contamination related to wrong manipulation of highly positive samples, or from the positive control, or PCR products
 - Procedures that do not rigorously follow precautions to avoid contamination described in this manual
- ❖ Results must be interpreted by medical professionals in the clinical context of the patient, its history and symptoms.
- ❖ This test does not exclude the presence of other pathogens than the SARS-CoV-2.
- ❖ A negative result for this test does not absolutely exclude a possible infection with SARS-CoV-2.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

13. Performance analysis

Limit of detection/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 limitation/analytical sensitivity:

- **Positive control:** 10 copies/ μ L CP.
- **A SARS-CoV-2 synthetic RNA** (Twist Bioscience, USA) was detected with a sensitivity of 12.5 copies ARN/ μ L.
- **The First WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA** was detected with a sensitivity of 7.5 copies/ μ L
- **Sensitivity study on 106 known positive samples, diluted in known samples**
Negatives at 3 x LOD: 100% sensitivity (detection of 106 samples / 106)

- **Interfering substances:** 7 substances from the AcroMetrixTM Inhibition Panel REF 956400 kit, Oxymetazoline and Zanamivir. A high concentration, which may be contained in some drugs, was added to the positive sample before extraction: No impact of the tested interfering substances was observed on the result obtained.
- **The limit of detection on salivary sample**, with a confidence of 95% calculated from the data reported below is under **1940 c/mL**:

Copies/ml SARS-CoV-2	Number of saliva tested	Number of positive saliva	% detection
800	20	16	80
1200	13	12	91,7
3600	20	20	100
12000	20	20	100

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

- Between-lots Ct variability (3 lots) of EBX-041 is the following:

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

Coefficient of variation %	RdRp Gene Target 1	RdRp Gene Target 2	N Gene Target 3	Endogenous control gene
CFX96	1.21	0.37	1.67	4.44
LC480	1.24	0.91	2.18	1.41
T-COR8-IVD	1.80	1.66	1.33	2.53
QS5 / QS7 pro	3.90	4.41	3.31	6.50

Diagnostic specificity

This validation included :

- 508 SARS-CoV-2 negative samples, pretested and characterized by CE approved tests.
- 50 negative samples for known coronaviruses, some of which are positive for other respiratory viruses, in order to evaluate potential cross-reactions.

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
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

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

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.

Diagnostic sensibility

The validation of the performance was performed on:

558 negative samples	
508 SARS-CoV-2 negative samples	Characterised with Allplex 2019 n-CoV (Seegene) kit, CE marked
50 positive respiratory samples	RSV-A/B, Parainfluenzae, Rhinovirus, Metapneumovirus, CoV NL63, CoV OC43, CoV 229E, CoV KU1

270 positive samples	
270 positive samples	Characterized by EurobioPlex EBX-041 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). And tests were performed on CFX96™ (Bio-Rad).

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

		EBX-041	
		SARS-CoV-2 positive	SARS-CoV-2 negative
Pre-tested EBX-041 and Seegene kit	SARS-CoV-2 positive	270	0
	SARS-CoV-2 negative	0	558

General sensitivity: > 99% (270/270)
General specificity: > 99% (558/558)
General concordance: > 99% (828/828)

Diagnostic specificity and sensitivity on salivary samples/nasopharyngeal swabs taken concurrently on the same patients:

Evaluation was carried out on 103 salivary samples and 103 nasopharyngeal samples, taken concurrently on the same patients.

Out of the 103 nasopharyngeal samples, 37 were positive and 66 negative for SARS-CoV-2 using EBX-041.

RNA extraction was performed on Genolution system (Nextractor®). Saliva was pre-treated with Digest-EUR (Eurobio. Réf. : DD0DIG00-AI) using 12.5 µL in a mix of saliva and PBS (250µL/250µL).

➤ **Diagnostic specificity on salivary samples/nasopharyngeal swabs taken concurrently on the same patients:**

Evaluation was carried out on the concurrent 66 salivary samples from the same 66 patients that had a SARS-CoV-2 negative nasopharyngeal sample.

No specific signal was detected in any of the 66 saliva, all displaying a valid control of extraction and RT-PCR amplification.

➤ **Diagnostic sensitivity on salivary samples/nasopharyngeal swabs taken concurrently on the same patients:**

Evaluation was carried out on the concurrent 37 salivary samples from the same 37 patients that had a positive SARS-CoV-2 nasopharyngeal sample.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

Overall performances on concurrent NP and saliva samples are the following:

Performances on salivary /nasopharyngeal (NP) concurrent samples on the same patients		Salivary samples	
		Saliva SARS-CoV-2 positive	Saliva SARS-CoV-2 negative
Nasopharyngeal samples	NP SARS-CoV-2 positive	34	3
	NP SARS-CoV-2 negative	0	66

Tests were performed on CFX96™ (Bio-Rad).

Sensitivity on saliva (from patients with a NP positive result)/positive concordance:

91.9 % (34/37) (IC₉₅ : 83.1 , 100)

Specificity on saliva (from patients with a NP negative result)/negative concordance:

> 99% (66/66) (IC₉₅ : 95 - 100)

Overall concordance between results on concurrent salivary and nasopharyngeal samples: 97.1% (100/103) (IC₉₅ : 93.8 , 100)

The positive concordance of EBX-041 test between nasopharyngeal and salivary samples is consistent with the HAS recommendations, that require a minimum clinical sensitivity of the salivary RT-PCR test of at least 80% (considering the lower confidence interval limit at 95% of the estimated sensitivity).

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

SPECIFICITIES OF THE REAL-TIME PCR T-COR 8®-IVD INSTRUMENT

T-COR 8®-IVD is a real-time PCR instrument with 8 independent wells, which can be programmed independently, patient by patient, regarding thermic protocol, assays, and time of start of the run.

The 8 wells can also be used simultaneously with the same assay.

Note: Mix well after adding the sample in the tube with pipetting back and forth, avoiding the formation of bubbles and make sure that the volume of liquid is located at the bottom of the tube. Close each tube tightly after each deposit of the control or sample to avoid contamination.

Controls

On T-COR 8®-IVD, the positive and negative controls must be tested at least when a new kit is being opened.

After this initial control, the internal control allows to check that the PCR is working properly, and that there is no PCR inhibition.

Fluorophores

Four combinations of fluorophores are available on T-COR 8®-IVD.

For all EBX, such as EBX-041, FAM/HEX/Texas Red/Cy5 combination is used. If some channels are not used, do not consider this channel for results analysis.

Use of Barcodes (available on pages 45-47)

1- Select Menu > New Run

2- Select Barcode

3- Scan the appropriate Barcode on the right side of the instrument:

- For the positive control (Barcode EBX-041 Pos Ctrl),
- For the negative control (Barcode EBX-041 Neg Ctrl),
- For a patient sample (Barcode EBX-041)

The instrument randomly selects one of the 8 available wells. Follow the instructions on the instrument.

4- Lift up the lid of the selected well (well x), check that the blue LED light is on, and select "Yes"

5- Place the tube in the corresponding well and select "Next".

6- If you wish to name the sample (optional), select "sample x", name it and select "Accept".

7- Select "Next"

8- To add/test another control or sample, select « Add well » and go back to point 3-.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

9- Select "Start run".

Note: The name of a sample or of a run cannot be modified or added after the run is finished. It must be done before or during the run.

Presentation and Interpretation of results

Ct values and amplification curves are available in the SmartCT™ Table (Ct values on each channel), and "Ct versus PCR cycles" graphs, both being available in real-time while the run is ongoing.

An automatic analysis for positive and negative controls as well as patients' samples is available in "Interpretations", at the end of the run, in the "View" window.

For positive and negative controls, the following results are possible:

« Neg Ctrl Fail »: Not valid

« Neg Ctrl Valid »: Valid

« Pos Ctrl Fail »: Non valid

« Pos Ctrl Valid »: Valid

For patients status:

"Detected": Positive for at least one target → green box

"Not detected": Negative → red box

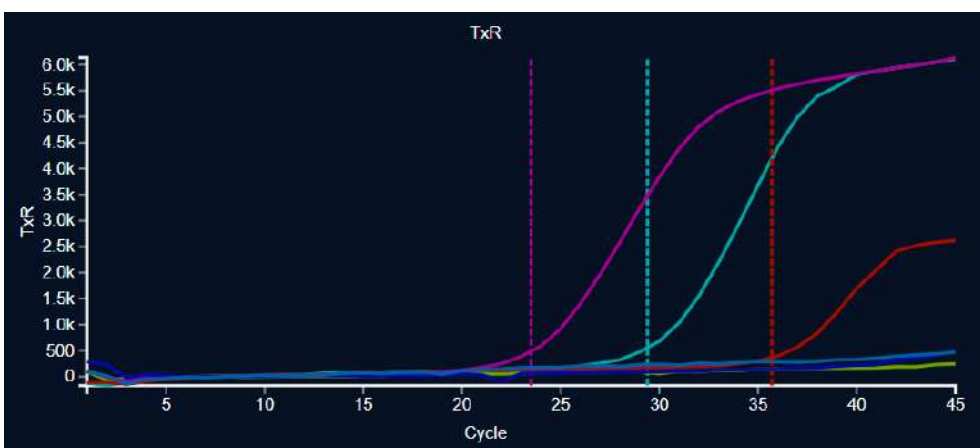
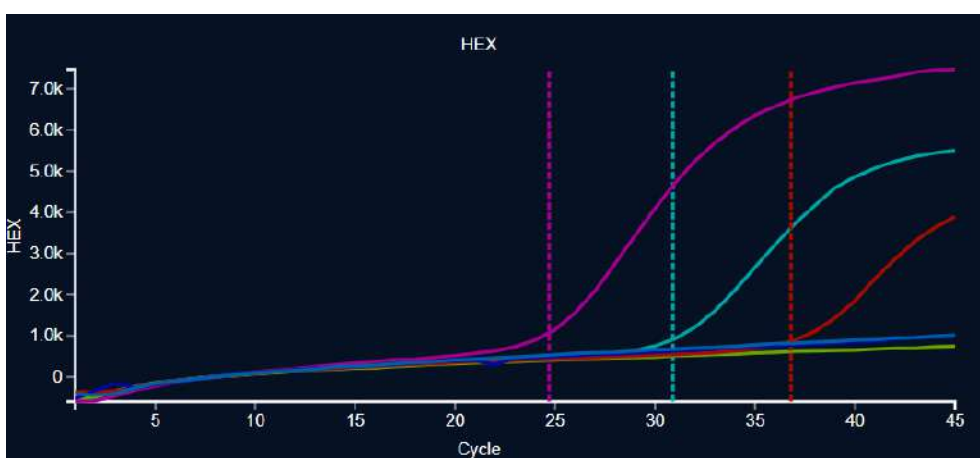
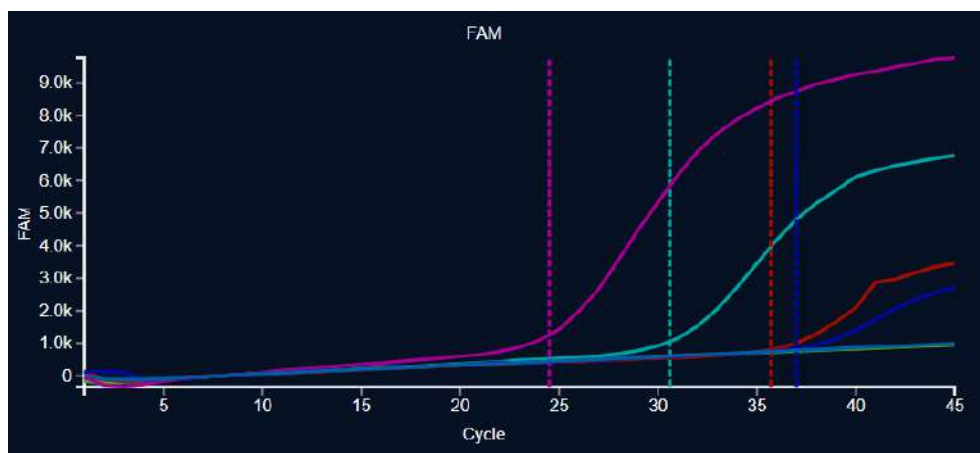
« Invalid »: Invalid result → yellow box: retest

Example of visual automatic interpretation of results on T-COR 8®-IVD

Summary								
Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5	Call	Note
1	ECH POS	EBX-041	30.6	30.9	29.4	28.9	Detected • Sars-Cov-2	Sars-Cov-2 positive
2	ECH NEG	EBX-041				16.3	Not Detected	Sars-Cov-2 negative
3	ECH NEG	EBX-041					Invalid	Retest
5	Ctrl POS	EBX-041 Pos Ctrl	35.7	36.8	35.7		Invalid	Pos Ctrl Fail
6	Ctrl POS	EBX-041 Pos Ctrl	24.5	24.7	23.5	23.0	Detected • Pos Ctrl	Pos Ctrl Valid
7	Ctrl NEG	EBX-041 Neg Ctrl	37.0			32.5	Invalid	Neg Ctrl Fail
8	Ctrl NEG	EBX-041 Neg Ctrl					Detected • Neg Ctrl	Neg Ctrl valid

Exemple of amplification curves

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex



Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

Barcodes for EBX-041 for use on T-COR8®-IVD

EBX-041 Pos Ctrl
Positive Control CP



EBX-041 Neg Ctrl
Water = Negative Control (CN-H2O)



EBX-041



15. Bibliography

Chan JF, Kok KH, Zhu Z, Chu H et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wu-han. Emerg microbes infect. 2020 Dec; 9(1):221-236.

Cohen J, Normile D. New SRAS-like virus in China triggers alarm, Science. 2020 Jan 17;367(6475):234-235.

Drosten C, Muth D, Corman VM, Hussain R et al. An observational, laboratory-based study of outbreaks of middle east respiratory syndrome coronavirus in Jeddah and Riyadh, kingdom of Saudi Arabia, 2014. Clin infect dis. 2015 Feb 1; 60(3):369-77.

Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, Recommandations de bonnes pratiques, www.has-santé.fr

16. Quality control

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

17. Waste disposal

Eliminate all waste in accordance with the legislation on DASRI.

18. Incident report

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

19. Technical assistance

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

Eurobio Scientific's customer service can be contacted by e-mail at adv@eurobio-scientific.com or by phone at +33 (0)1.69.79.18.26.



FRANCE

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

Change Tracking

Date	Version	Revision
27/01/2023	V14.00	Validation of EBX-041 on new instruments QuantStudio7 pro and-QuantStudio5 (Applied Biosystem by Thermo Fisher Scientific)
09/11/2022	V13.00	Validation of the instrument CFX® Opus 96 (Bio-Rad)



EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

RT-PCR EM TEMPO REAL

Para a RT-PCR **qualitativa** em tempo real

REF

EBX-041-25
EBX-041-50
EBX-041-100
EBX-041-192
EBX-041-200
EBX-041-600



25/50/100/192/200/600 reacções

Referencia EBX-041 Versão 14.00 do 27/01/2023



Validado sobre :

- CFX96™ Real Time PCR detecção sistema (Bio-Rad) com analise sobre CFX Manager versão 3.1 (Bio-Rad)
- CFX Opus 96 (Bio-Rad) com analise sobre CFX Maestro versão 2.2 (Bio-Rad)
- LightCycler®480 com analise sobre LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- T-COR 8®-IVD (Tetracore Inc.) com T-COR 8 Per-Well SmartCT™ (auto v1) software
- QuantStudio™ 5, QuantStudio™ 7 Pro (Applied Biosystems™ by ThermoFisher Scientific) sobre QuantStudio 6/7 Pro Real-Time PCR Systems Software (Applied Biosystems™ by ThermoFisher Scientific)

Condições de armazenagem:

Conservar todos os reagentes entre -15°C et -22°C depois de utilização e depois da primeira utilização



Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

Ficha técnica

Disponível em www.eurobio-scientific.com

Sumario

1.	Informações gerais.....	61
2.	Destino do dispositivo	62
3.	Simbolos	63
4.	Principio	64
5.	Componentes do kit.....	64
6.	Conservação e armazenagem	66
7.	Material requisitado não fornecido	66
8.	Instrumento de PCR em tempo real.....	66
9.	Avisos e precauções.....	67
10.	Protocolo	68
11.	Validação da experiencia.....	72
12.	Análise dos dados e interpretação.....	74
13.	Análise das performances	76
14.	Bibliografia.....	85
15.	Controlo qualidade.....	86
16.	Eliminação dos residuos.....	86
17.	Declaração de incidente.....	86
18.	Assistencia tecnica	86

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

1. Informações gerais

O vírus SARS-CoV-2 apareceu na China no final de 2019, na cidade de Wuhan. Pertence à família dos Coronaviridae e ao sub-gênero Sarbecovirus. Seu genoma é constituído de 29903 bases de ácido ribonucleico (ARN). O SARS-CoV-2 é o sétimo coronavírus identificado infectando o humano, depois dos coronavírus humanos (HCoV) 229E, NL63, OC43, HKU1, os SARS-CoV (coronavírus causando um síndrome respiratório agudo severo) e os MERS-CoV (coronavírus induzindo o síndrome respiratório do Meio-Oriente).

Dois genomas foram isolados e assinalados nomeadamente BetaCoV / Wuhan / IVDC-HB-01/2019, BetaCoV / Wuhan / IVDC-HB-04/2020, BetaCoV / Wuhan / IVDC-HB-05/2019, BetaCoV / Wuhan / WIV04 / 2019 e BetaCoV / Wuhan / IPBCAMS-WH-01/2019. As sequências do SARS-CoV-2 apresentam semelhanças com as dos betacoronavírus encontrados nos morcegos. O vírus SARS-CoV-2 é geneticamente diferente dos outros coronavírus humanos tais como os ligados ao SARS e ao MERS.

O quadro clínico é variável, abrangendo os sintomas de uma constipação, febre, tosse, dificuldades em respirar a uma pneumonia, até um síndrome respiratório severo que pode ser fatal. A taxa de mortalidade é vaga no início da epidemia, à volta de 2 % no final de janeiro de 2020, por conseguinte, menor do que o associado ao SARS-CoV ou ao MERS-CoV que são de 10 % e 30 % respetivamente. O SARS-CoV-2 é altamente contagioso com mais de 90 000 casos no mundo no início de Março de 2020.

O EurobioPlex SARS-CoV-2 foi concebido para detectar todas as sequências do SARS-CoV-2 conhecidas até hoje, e por alinhamento in silico com as sequências dos outros coronavírus.

Um algoritmo de decisão baseado sobre a deteção de 3 alvos (2 alvos no gene RdRp idênticos às recomendadas pela Organização Mundial da Saúde (<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>: published under Real-time RT-PCR assays for the detection of SARS-CoV-2 Institut Pasteur, Paris (2 March 2020)) e uma do gene N) pode ser utilizada para determinar o estatuto SARS-CoV-2 (ver parte análise dos resultados e interpretação e limites).

O diagnóstico deve ser sempre apresentado ao pessoal médico e dentro do contexto clínico, histórico e sintomático do paciente.

O extracto de ARN é o material de partida para o kit EurobioPlex SARS-CoV-2. O utilizador deve usar métodos de extração adaptados às colheitas testadas.

2. Destino do dispositivo

O EurobioPlex SARS-CoV-2 é um teste de amplificação por reverse transcription-reacção em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real, para um uso *in vitro* concebido para a determinação qualitativa da presença ou da ausência de SARS-CoV-2 no extracto de ácidos nucleicos ARN. O teste é indicado para ajudar a fazer um diagnóstico de presunção de infecção no homem, ou completar um diagnóstico efetivo ou indeterminado.

O teste EurobioPlex SARS-CoV-2 é um dispositivo medical de diagnóstico *In Vitro*, deve ser utilizado por pessoal de laboratório de análise de biologia medical qualificado. Não deve ser reciclado depois de utilização.

O kit foi testado sobre as amostras seguintes :

- Aspirações nasofaríngeas
- Cotonete nasofaríngeo
- Líquido bronco-alveolar
- Cuspe
- Cotonete nasal
- Amostras salivares

3. Simbolos



Referencia



Numero de lote



Limite de temperatura



Data de validade



Conteudo suficiente para « N » reações



Fabricante



Produto marcado CE



Dispositivo Medical de Diagnostico *in vi-*
tro



Instruções de Uso



Cuidado

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

4. Principe

O EurobioPlex SARS-CoV-2 é um teste de amplificação do ácido ribonucleico (ARN) de SARS-CoV-2 baseado sobre 1 teste de RT-PCR multiplex detectando 3 metas do vírus (2 metas dentro do gene RdRp e uma no gene N) dentro de um mesmo poço. Basta uma das sequências do gene RdRp ser amplificada para que o diagnóstico de SARS-CoV-2 possa directamente tornar-se positivo (ver Análise de dados e interpretação dos resultados).

O kit contém 1 oligomix para detectar as 3 metas, assim como um controlo endógeno. O teste é realizado a partir do ARN extracto da recolha através de uma reacção dentro de 1 poço/tubo.

A procura das 3 metas permite garantir a sensibilidade, e a especificidade em relação aos outros coronavírus conhecidos de tipo HCoV, SRAS-CoV, os Bétacoronavirus principalmente associados aos chiropteros (BtCoV) e os MERS-CoV. A presença de um gene de habitação humana servindo de controlo para a qualidade da amostra, para a extração do ARN e inibição da RT-PCR permite determinar possíveis variações podendo produzir-se ao longo das etapas de extração de ARN de amostras biológicas e de amplificação por RT-PCR em tempo real. Permite assim assegurar-se que um resultado negativo não pode ser devido a uma má extração de ARN e/ou à presença de inibidores de RT-PCR em grande quantidade.

O ARN do SARS-CoV-2 é detectado com a ajuda de sondas específicas para cada gene respetivamente marcadas em FAM (meta 1/Gene RdRp), HEX (meta 2/Gene RdRp) e Texas Red (meta 3/Gene N). O controlo endógeno é detectado com a ajuda de uma sonda marcada CY5. Ao longo da elongação do produto de amplificação, as sondas emitem uma fluorescência específica depois de sua hidrólise. A medida da intensidade da fluorescência em tempo real é relativa à acumulação de produtos de amplificação.

5. Componentes do kit

O kit de RT-PCR em tempo real EurobioPlex SARS-CoV-2 é pronto a usar e contém reagentes e enzimas necessários para a deteção deste vírus (Quadro 1).

A fluorescência é emitida e medida de maneira individual por um sistema óptico ao longo da PCR. A deteção dos fragmentos amplificados é realizada por um fluorímetro utilizando os canais indicados no Quadro 2.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

Quadro 1: Componentes do kit

Cor da tampa	Componente do kit	25 reações	50 reações	100 reações	192 reações	200 reações	600 reações	Reconstituição
Vermelho	Enzimas	2x100 µL	400 µL	900 µl	2 x 900µl	2x900 µl	3x1300 µl	Pronto a usar
Transparente	Oligomix	2x80 µL	320 µL	720 µl	1440µL	1440 µl	3X1050 µl	Pronto a usar
Amarelo	Controlo positivo CP	2x20 µL	80 µL	160 µl	320 µl	320 µl	320 µl	Pronto a usar
Azul	Agua = controlo negativo (CN-H2O)	1500 µL	1500 µL	1500 µl	2x1500 µl	2 x 1500 µL	5x1500 µL	Pronto a usar

Oligomix : contem primers e sondas para as 3 metas e para o control endogene

Quadro 2 : Detecção das metas segundo as fluoroforas

Metas	Fluorofora	Excitação	Emissão
Meta 1 gene RdRp	FAM	495 nm	515 nm
Meta 2 gene RdRp	HEX	535 nm	555 nm
Meta 3 Gène N	Texas Red	585 nm	605 nm
Controlo interno endogene	Cy5	650 nm	670 nm

Canais equivalentes sobre diferentes instrumentos de PCR:

- Canal **FAM** (Sistemas ABI, QS5, QS7, SmartCycler II, Sistemas Mx, Chromo4/CFX96™/CFX Opus 96), T-COR 8™-IVD, Dtpriime, LC480), Canal Green (Rotor-Gene Q).
- Canal **HEX** (Chromo 4/CFX96/CFX Opus 96), Sistemas Mx, T-COR 8®-IVD, Dtpriime, LC 480), Canal VIC (Sistemas ABI, QS5, QS7,), Canal Alexa532 (SmartCycler II), Canal Yellow (Rotor-Gene Q),
- Canal **Texas Red** (ABI 7500, Chromo 4/CFX96/CFX Opus 96, Sistemas Mx, T-COR 8®-IVD), LC Red 610 (LC480), Canal Orange (Rotor-Gene Q), Canal Rox (QS5, QS7,,DTprime)
- Canal **Cy5** (Sistemas ABI, QS5, QS7, Sistemas Mx, Chromo4/CFX96™/CFX Opus 96, T-COR 8™-IVD, Dtpriime, LC480), Canal Alexa647 (SmartCycler II), Canal Red (Rotor-Gene Q).

Nota 1: Sobre instrumento LC480 : Aplicar uma compensação de cor para os comprimentos FAM/HEX-VIC/Texas Red/Cy5 (FAM : 483-533 / HEX-VIC : 523-568 /Texas Red : 558-610 / Cy5 : 615-670).

Nota 2: Durante a análise no logicial LC480 Software release 1.5.0 não deixar a Noiseband (Auto) para os canais FAM e HEX mas aplicar uma Noiseband Fluor manualmente a 2,1 no canal FAM e de 4,5 no canal HEX.

6. Conservação e armazenagem

Todos os reagentes devem ser guardados entre -15°C e -22°C.

Todos os reagentes podem ser utilizados até a data de validade indicada na etiqueta do kit.



A sensibilidade da depistagem pode diminuir se os components do kit sofrem varios ciclos de congelação/descongelação. O kit pode ser utilizado depois de abertura inicial durante um maximo de 5 ciclos de congelação e descongelação

7. Material requisitado não fornecido

- ◇ Exaustor biologico
- ◇ Aparelho de PCR tempo real
- ◇ Centrifugadora para microtubos
- ◇ Vortex
- ◇ Placas / tubos para reação de PCR tempo real
- ◇ Micropipetas
- ◇ Pontas DNase-free e RNase-free a filtro para micropipetas
- ◇ Microtubos estéreis
- ◇ Luvas (sem talco)

8. Instrumento de PCR em tempo real

O kit EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex foi desenvolvido e validado para ser utilizado com os instrumentos de PCR em tempo real seguintes :

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) com analise sobre CFX Manager versão 3.1 (Bio-Rad)
- CFX Opus 96 (Bio-Rad) com analise sobre CFX Maestro versão 2.2 (Bio-Rad)
- LightCycler®480 com analise sobre LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- T-COR 8®-IVD (Tetracore Inc.) com T-COR 8 Per-Well SmartCT™ (auto v1) software
- QuantStudio™ 5 & 7 Pro (Applied Biosystems™ by ThermoFisher Scientific) sobre QuantStudio 6/7 Pro Real-Time PCR Systems Software (Applied Biosystems™ by ThermoFisher Scientific)

9. Avisos e precauções



Ler atentamente estas instruções antes de iniciar o protocolo.

- ◇ Esta experimentação deve ser realizada por técnicos de laboratório de análise de biologia medical.
- ◇ O regulamento de biosegurança local e nacional em vigor para a depistagem do SARS-CoV-2 deve ser seguida rigorosamente em toda circunstancia, nomeadamente em laboratorios e com os equipamentos de laboratório em concordancia
- ◇ Assegurar-se que os instrumentos foram instalados, calibrados e mantidos em acordo com as recomendações do fabricante.
- ◇ E da responsabilidade do utilizador usar outro equipamento que os que foram validados, neste caso, as performances não são garantidas.
- ◇ As amostras clinicas devem ser consideradas como material potencialmente infeccioso e devem ser preparados baixo um exaustor a fluxo laminar.
- ◇ Esta experimentação deve ser realizada seguindo as boas practicas de laboratório.
- ◇ Não utilizar este kit depois da data de validade indicada.
- ◇ O kit é mandado com gelo seco, e os componentes do kit devem chegar congelados. Se um ou mais componentes chegam descongelados, ou se os tubos foram danificados durante o transporte, contactar Eurobio Scientific.
- ◇ Evitar ciclos de congelação / descongelação dos reagentes, poderia levar a baixa de sensibilidade do teste.
- ◇ Uma vez os reagentes descongelados, centrifugar brevemente os tubos antes de utilização.
- ◇ O uso de gelo ou de um bloco refrigerante é aconselhado em caso de longos prazos por causa de um numero importante de amostras a tratar ou de fortes temperaturas
- ◇ Recomenda-se definir tres zonas de trabalho distintas : 1) Isolamento do ARN, 2) Preparação da mistura reaccional, et 3) Amplificação/Deteção dos produtos amplificados.
- ◇ As sondas fluorescentes contidas no oligomix são sensíveis à luz. Toda exposição prolongada do oligomix à luz deve ser limitada ao tempo técnico necessario à preparação da placa PCR.
- ◇ Recomenda-se abrir e manipular o controlo positivo afastado das amostras biológicas a testar e de outros componentes do kit a fim se evitar contaminações cruzadas.
- ◇ Usar batas e luvas (sem talco) distintos em cada zona de trabalho.
- ◇ As pipetas, os reagentes e outros materiais de trabalho não devem circular entre estas zonas.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

- ◇ Uma atenção particular deve ser aplicada para conservar a pureza dos reagentes e das misturas reacionais.
- ◇ O controlo interno endogene detecta uma meta celular detectavel em todas as amostras de origem humana mas não no controle negativo CN-H2O fornecido no kit. A ausencia de sinal ao nível do controle negativo permite prevenir a ocorrência de contaminações cruzadas.
- ◇ Métodos apropriados de preparação/extração de ARN para uma produção de ARN de qualidade e uma aplicação de RT-PCR devem ser utilizados, nomeadamente a fim de evitar todo risco de contaminação com as RNases.
- ◇ Usar pontas a filtro para micropipetas, RNase-free e DNase-free.
- ◇ Não pipetar com a boca. Não comer, não beber ou fumar no laboratório.
- ◇ Evitar os aerossóis.

10. Protocolo

10.1 Colheita das amostras

- ◇ Colher as amostras em tubes estereis.
- ◇ Cabe ao utilizador manter sus proprias condições de colheita, transporte, conservação e extração das amostras para que a extração de ARN por sistemas adaptados produzam ARN de qualidade.
- ◇ Recomenda-se que as amostras sejam extractos imediatamente, ou conservados segundo as recomendações de armazenagem das amosras antes de extração (Quadro 3).



Quadro 3 : Recomendações de armazenagem antes de uso

Recomendações de armazenagem maximo das amostras antes de extração	
Temperatura ambiente	2 h
4°C	72 h
-20°C (de preferencia -80°C)	Armazenagem a longo prazo

Cuidado	
	◇ O utilizador pode referir-se às recomendações emitidas pela Organização Mundial da Saude ou pela Alta Autoridade de Saude para a boa conservação das amostras ◇ Os ARN extraídos devem ser armazenados a -80°C. ◇ O transporte das amostras clinicas é submetida ao regulamento local para o transporte dos agentes infecciosos.

10.2 Extração de ARN

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

Cabe aos utilizadores assegurar-se que o sistema de extração dos ácidos nucleicos utilizado é compatível com a tecnologia de RT-PCR em tempo real. Nos recomendamos utilizar métodos de extração de ARN de vírus adaptados a colheitas respiratorias, e de referir-se às instruções do fornecedor do kit de extração utilizado.

Para as colheitas salivares, recomendamos o uso de um mucolítico a base de Dithiothreitol (DTT) tal como o produto comercializado por Eurobio (Digest-EUR- ref : DD0DIG00-AI). Caso use este produto, recomendamos o uso de 10 µl da referencia DD0DIG00-AI para 200 µl de saliva. Sem mucolítico, os rendimentos não são garantidos.

No kit EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex, o controlo interno endogeno lido sobre o canal Cy5 é já presente na amostra clinica a extrair. Sua deteção depois de amplificação permite verificar a qualidade da colheita e da extração.

Os rendimentos tais como descritas na parte 13 do presente documento foram obtidas com a técnica de extração seguinte : Maelstrom 9600 (TANBead) e o kit OptiPure Viral Auto Plate (ref : W665A46).

10.3 Realização da RT-PCR em tempo real

Nota geral :

- O controlo positivo contem concentrações elevada de matriz. As manipulações devem ser realizadas com precaução para evitar qualquer contaminação.
- Para controlar o bom funcionamento da RT-PCR, é necessario testar o controle positivo, assim como o controlo negativo (agua fornecida = CN-H2O) (ver II-2/6 do protocolo da RT-PCR em tempo real).

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

Esquema do procedimento :

1 - PREPARACAO MISTURA REACCIONAL / MASTERMIX

Numero de reações	N+3
Mix enzymatico	(N+3) x 6,25 μ L
Agua	(N+3) x 8,75 μ L
Oligomix	(N+3) x 5 μ L
Volume total Mastermix	(N+3) x 20 μ L



2 - PREPARACAO DAS REACOES

Amostra

20 μ L de Mastermix
+
5 μ L amostra ARN

Controlo Positivo

20 μ L de Mastermix
+
5 μ L CP

Controlo Negativo

20 μ L de Mastermix
+
5 μ L Agua biologia molecular (CN-H₂O)



3 - INSTRUMENTO PCR EM TEMPO REAL

Programa	Temperatura	Duração	Ciclo(s)	
Reverse Transcription	45°C	5 min	1	-
Desnaturação	98°C	20 seg	1	-
Amplificação	98°C	3 seg	40	-
	58°C	10 seg		Aquisição de fluorescencia

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

10.4 Protocolo detalhado

- 9) Verificar que os reagentes estejam totalmente descongelados. Homogeneizar os tubos de enzimas, e vortexer mais ou menos 15 segundos o Oligomix e o CP, depois centrifugar brevemente.
- 10) Preparar os Mastermix como aqui abaixo, N é o numero de reações (incluindo os controlos positivo e negativo). Prever a quantidade de Mastermix para N+3 reações no minimo.

Numero de reações	N+3*
Enzimas	(N+3) x 6,25 μ L
Agua	(N+3) x 8,75 μ L
Oligomix	(N+3) x 5 μ L
Volume total Mastermix	(N+3) x 20 μ L

**Para as pequenas séries (≤ 10) : preparar para N+2 é suficiente.*

- 3) Homogeneizar o Mastermix preparado em 2) e centrifugar brevemente.
- 10) Distribuir 20 μ L de Mastermix com a ajuda de uma micropipeta e de pontas a filtro dentro de tubos/poços de microplacas independentes.
- 11) Adicionar 5 μ L de amostras de ARN extracto.
- 12) Em paralelo realizar os controlos seguintes :
 - Controlo positivo :
 - 20 μ L de Mastermix + 5 μ L de CP.
 - Controlo negativo :
 - 20 μ L de Mastermix + 5 μ L de agua fornecida (CN-H2O)
- 13) Fechar imediatamente os tubos, ou placa com um filme adesivo para evitar qualquer contaminação.
- 14) Centrifugar brevemente para recolher a mistura reaccional no fundo dos tubos ou dos poços de microplaca.
- 15) Realizar o programa seguinte sobre o instrumento de PCR tempo real.

Programa	Temperatura	Duração	Ciclo(s)	
Reversa Transcrição	45°C	5 min	1	-
Denaturação	98°C	20 seg	1	-
Amplificação	98°C	3 seg	40	-
	58°C	10 seg		Aquisição de fluorescência

Nota 1 : Sobre CFX96™ (Bio-Rad), lançar o run a partir da versão 1.6 ou posterior, depois analisar con a versão 3.1 (ver § Validação da experiencia).

Nota 2 : Sobre instrumento LC480 : Aplicar uma compensação de cor para os comprimentos FAM/HEX-VIC/Texas Red/Cy5 (FAM : 483-533 / HEX-VIC : 523-568 /Texas Red : 558-610 / Cy5 : 615-670).

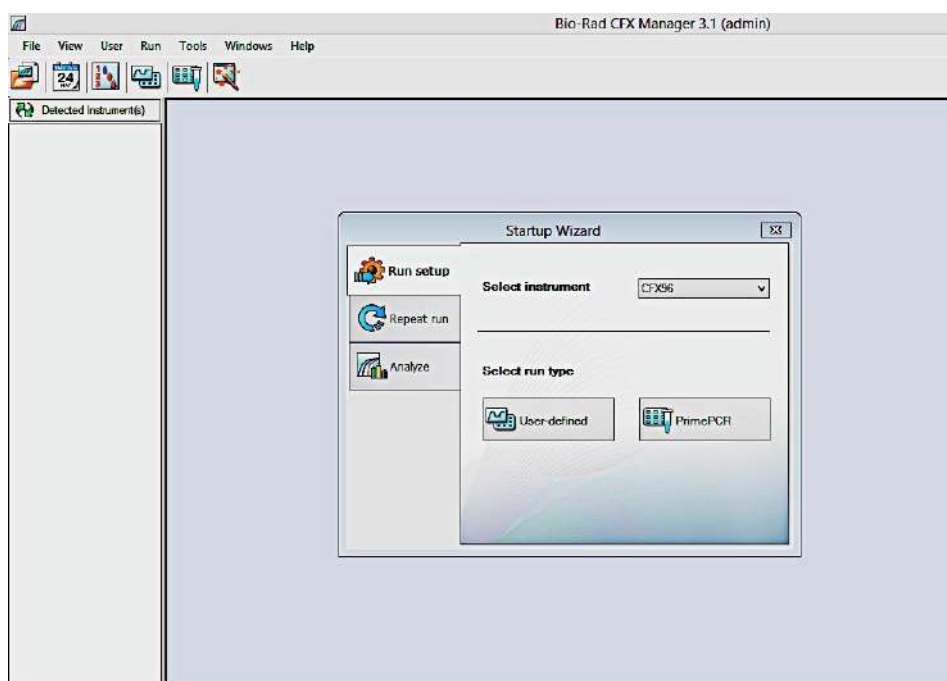
Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

Nota 3 : Durante a análise sobre o software LC480 Software release 1.5.0, não deixar a Noiseband (Auto) para os canais FAM et HEX mas aplicar a Noiseband Fluor manualmente a 2,1 no canal FAM e a 4,5 no canal HEX

11. Validação da experiencia

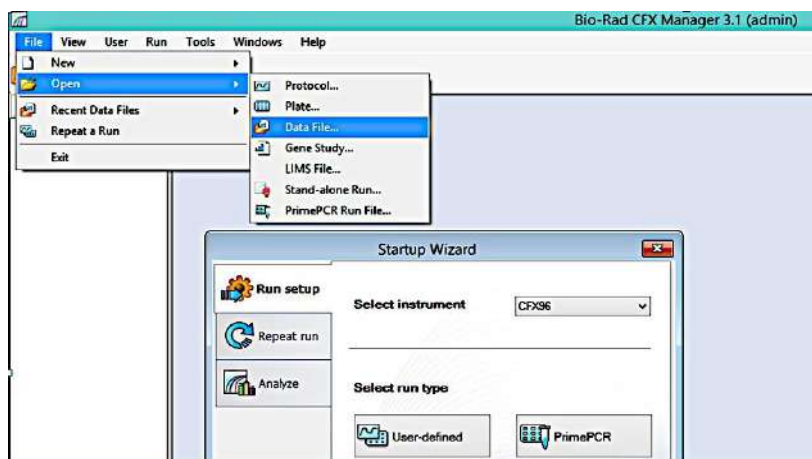
A análise dos dados post-aquisição sobre um instrumento de PCR CFX96 (Bio-Rad) deve ser realizada com a ajuda da versão 3.1 do software CFX Manager (Bio-Rad). A fim de passar sobre esta versão a partir de um run lançado sobre uma versão anterior, deve-se seguir o processo seguinte : no final do run, o ficheiro de dados com o sufixo .pcrd deve ser aberto e tratado com a versão 3.1 do CFX Manager (Bio-Rad).

Se o run foi lançado com o software CFX Manager v1.6 por exemplo, para abrir o ficheiro de dados com o software CFX Manager v3.1, clicar no icônio CFX Manager v3.1. No ecrã inicial aparece.



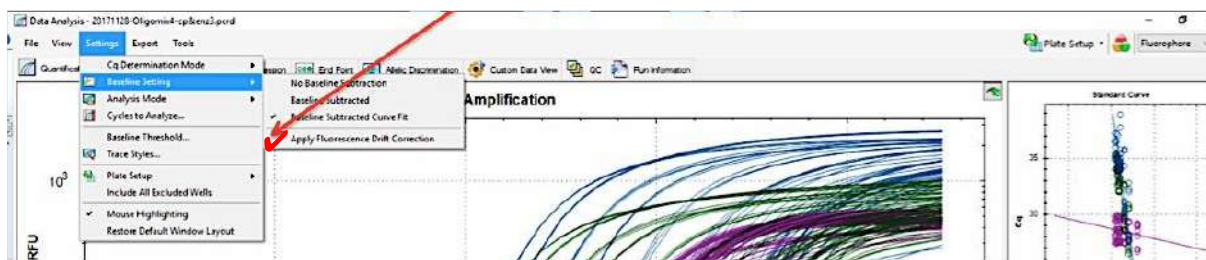
Clicar em « File » e seleccionar « Open » e depois « Data File ».

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

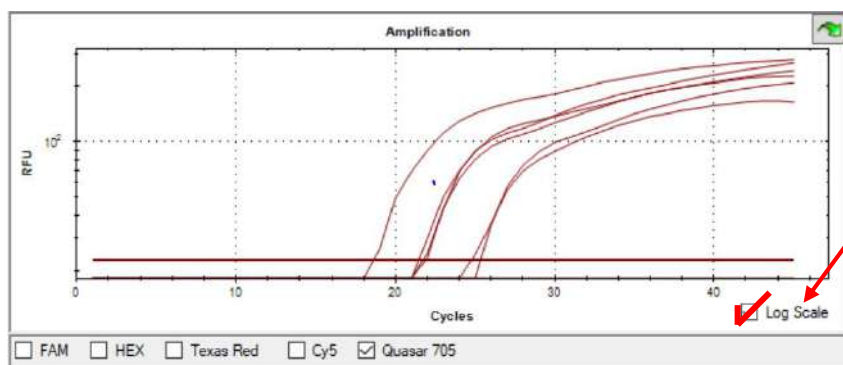


Seleccionar o ficheiro que deseja analisar e clicar em « Abrir ».

A opção « Drift correction » deve ser aplicada na guia « Settings » como na imagem abaixo : clicar na guia « Settings », depois em « Baseline Setting » e em « Apply Fluorescence Drift Correction ».

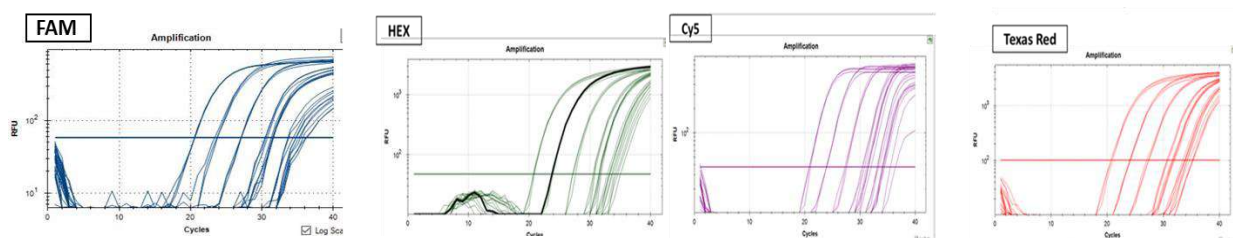


Para otimizar a análise do run, seleccionar a opção « Log Scale » para cada canal analisado. A seguir, colocar a barrar de limiar (*threshold*) encima do barulho de fundo correspondente ao meio da fase exponencial. Os 5 canauis de interesse apresentam RFU muito elevados e diferentes segunto o canal considerado, a opção « Log Scale » permite assim a melhor leitura e análise do run.



Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

Uma vez esta etapa realizada, a análise pode começar para os 5 canais considerados **FAM**, **HEX**, **Texas Red**, et **CY5**.



Os resultados para os controlos devem cumprir as condições do Quadro 4. Sur T-COR 8®-IVD, estes controlos devem ser realizados no mínimo durante a primeira utilização de um novo kit.

Para que a dosagem seja válida, os valores de Ct para os controlos devem ser os seguintes (Quadro 4). Fora desses valores, a experiência não pode ser validada.

Quadro 4: Validação do run

Controlo positivo	
FAM	Ct ≤ 32
HEX	Ct ≤ 32
Texas Red	Ct ≤ 32
Cy5	Ct ≤ 32
Controlo Negativo	
FAM	Ct não determinado
HEX	Ct não determinado
Texas Red	Ct ≥ 38 ou não determinado
Cy5	Ct não determinado

12. Análise dos dados e interpretação

Controlo da extração da ARN e de inibição de RT-PCR nas amostras :

O bom funcionamento da reacção da RT-PCR pode ser avaliada sobre o canal Cy5 medindo o controlo endógeno.

Em certos casos, recomenda-se repetir a extração ou diluir a amostra 5 vezes, porque o resultado não é interpretável (NI) (Ver coluna « validade do teste » do Quadro 5 de interpretação). Todos os casos são reunidos no Quadro 5.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

Para as amostras clinicas, e a determinação da presença ou ausencia do SARS-CoV-2 :



**Cut-off de valores de CT para a positividade :
Alvos 1 e 2 genes RdRp alvo 3 gene N: Ct < 40**

O limiar de Ct para positividade das amostras para T-COR 8®-IVD é : + Positivo => Ct positivo ou seja Ct ≤ 45 nos tres canais, com interpretação automatica com os codigos-bar-ras.

Os resultados seguintes são possíveis

Os resultados são analisados nos canais **FAM, HEX, Texas Red, e Cy5** (Quadro 5).

Quadro 5 : Detecção de SARS-CoV-2 e das mutações de interesse

Alvo 1 RdRp	Alvo 2 RdRp	Alvo 3 N	Controlo endogeno	Vali- dade do teste	Presença de SARS-CoV-2 ou in- terpretação impossível (NI)
FAM	HEX	Texas Red	CY5		
+	+/-	+/-	+ / -	Sim	SIM
+/-	+	+/-	+ / -	Sim	SIM
-	-	-	+	Sim	NAO
-	-	+	+	Sim	Indeterminado
-	-	+/-	-	Parcial	NI

NI : não interpretavel porque a inibição de RT-PCR ou problema de extração : nenhuma conclusão poed ser dada. Recomenda-se então realizar uma nova recolha e/ou repetir a extração e/ou diluir a amostra 5 vezes.

Limites de utilização e de interpretação :

- ❖ O kit EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex é utilizado a fins de diagnostico de primeira intenção.
- ❖ Todas as amostras devem ser tratadas como potencialmente infecciosas para o SARS-CoV-2, e o regulamento local de biosegurança devem ser cuidadosamente seguidas.
- ❖ A interpretação dos resultados deve considerar a possibilidade de falsos negativos e de falsos positivos.

Os falsos negativos podem ser devidos a :

- Uma colheita inadaptada das amostras, ou um mau armazenamento,
- Amostras fora da fase de viremia,
- Condições de extração inadaptadas ou o uso de instrumentos de PCR não validados,
- Uma experiencia que não respeite todos os elementos do manual de instruções.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

Os falsos positivos podem ser devidos a :

- Uma contaminação ligada a uma má manipulação das amostras fortemente positivas, do controlo positivo, ou dos produtos provenientes da amplificação da PCR,
 - Um incumprimento do procedimento descrito no manual de instruções, notadamente para evitar qualquer fonte de contaminação.
- ❖ Todo resultado deve ser interpretado por pessoal médico no contexto clínico do paciente, seu histórico assim como seus sintomas.
- ❖ Este teste não exclui a presença de outros patógenos que o SARS-CoV-2.
- ❖ Um resultado negativo deste teste não exclui de maneira absoluta uma possível infecção ao SARS-CoV-2.

13. Análise das performances

Limite de detecção/sensibilidade analítica

Uma gama de diluição foi realizada a partir de uma mistura plasmídica de 10^5 a 1 cópia/ μ L. Esta gama de diluição foi utilizada para determinar o limite de detecção do kit EBX-041.

Limite de detecção/sensibilidade analítica:

- **Controlo positivo do kit :** 10 cópias/ μ L CP
- **Um ARN sintético SARS-CoV-2** (Twist Bioscience, USA) é detectado com uma sensibilidade de 12,5 cópias ARN/ μ L
- **O primeiro WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA** é detectado com uma sensibilidade de 7.5 cópias/ μ L
- **Estudo de sensibilidade sobre 106 amostras conhecidas positivas, diluídas em amostras conhecidas Negativas a 3 x LOD:** 100 % de sensibilidade (detecção de 106 amostras / 106)

- **Substâncias interferentes :** 7 substâncias provenientes do kit AcroMetrix™ Inhibition Panel REF 956400, do Oxymetazoline e do Zanamivir. Uma concentração elevada, podendo estar presente em certos medicamentos, foi adicionado à amostra positiva antes de extração: Nenhum impacto das substâncias interferentes testadas foi observado sobre o resultado obtido.
- **O limite de detecção na recolha salivar,** calculado a 95% de confiança a partir dos dados reportados abaixo é de **1940 c/mL :**

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

Copias/ml SARS-CoV-2	Numero de salivas testadas	Numero de salivas positivas	% de detecção
800	20	16	80
1200	13	12	91,7
3600	20	20	100
12000	20	20	100

Variabilidade do sinal sobre os canais FAM, HEX, Texas Red e Cy5

- A variabilidade inter-lotes sobre o Ct de 3 lotes independentes de EBX-041 é a seguinte :

Coeficiente de variação %	Gene RdRp alvo 1	Gene RdRp alvo 2	Gene N alvo 3	Gene ctrl endogene
CFX96	1.21	0.37	1,67	4.44
LC480	1.24	0.91	2.18	1.41
T-COR-8-IVD	1.80	1.66	1.33	2.53
QS7 pro	3.90	4.41	3.31	6.50

Especificidade diagnostico

Esta validação incidiu sobre :

- 508 amostras SARS-CoV-2 negativas pré-testadas e caracterizadas negativas por testes marcados CE.
- 50 amostras negativas para todos os coronavírus conhecidos, incluindo amostras de painéis respiratórios caracterizados por outros vírus a fim de testar as reações cruzadas.

As extrações de ARN foram realizadas sobre os sistemas seguintes :

QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen)

Magna Pure Compact (Roche Life Science)

EZ1 Advanced XL virus card 2.0 (Qiagen)

Numero de amostras	Amostra positiva para	Coronavírus	Estatuto SARS-CoV-2 EBX-047
1	Adenovirus	Negativo	Negativo
5	Parainfluenzae	Negativo	Negativo
1	Rhinovirus	Negativo	Negativo
1	Bocavirus	Negativo	Negativo

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

2	Legionella pneumoniae	Negativo	Negativo
1	Metapneumovirus	Negativo	Negativo
3	Mycoplasma pneumoniae	Negativo	Negativo
3	Mycoplasma tuberculosis	Negativo	Negativo
2	Bordetella pertussis	Negativo	Negativo
1	Parechovirus Type 1	Negativo	Negativo
1	Parechovirus Type 2	Negativo	Negativo
1	Parechovirus Type 3	Negativo	Negativo
1	Parechovirus Type 4	Negativo	Negativo
1	Parechovirus Type 5	Negativo	Negativo
1	Parechovirus Type 6	Negativo	Negativo
3	Enterovirus	Negativo	Negativo
1	Streptococcus pyogenes	Negativo	Negativo
3	Streptococcus pneumoniae	Negativo	Negativo
2	Staph.epiderm/oralis/mitis/sanguis	Negativo	Negativo
3	Candida albicans	Negativo	Negativo
2	Pseudomonas aeruginosa	Negativo	Negativo
3	CoV NL63	Positivo	Negativo
2	CoV OC43	Positivo	Negativo
1	CoV 229E	Positivo	Negativo
1	CoV KU1	Positivo	Negativo
1	HPV	Negativo	Negativo

Uma análise *in silico* foi usada e demonstra a especificidade dos primers e sondas para o SARS-CoV-2. Por exemplo, sobre as sequências de vírus de MERS e de SARS, nenhuma homologia significativa dos primers e das sondas SARS-CoV-2 susceptível de amplificar estes vírus não foi encontrado.

Nenhuma especificidade ou cross reação não foi detectada.

O kit é 100 % específico.

Sensibilidade e especificidade diagnóstico

A validação das performances incidu sobre :

558 ostras negativas			
508	amostras	SARS-CoV-2	Caracterizadas com kit Allplex 2019 n-CoV (Seegene), marcado CE.
negativas			

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

50 amostras respiratorias positivas	RSV-A/B, Parainfluenzae, Rhinovirus, Metapneumovirus, CoV NL63, CoV OC43, CoV 229E, CoV KU1
-------------------------------------	---

270 amostras positivas	
270 amostras Positivas	Caracterizadas com kit EurobioPlex EBX-041 CE-IVD

Para este estudo, a extração das amostras foi realizada sobre Maelstrom 9600 (TANBead) com o kit OptiPure Viral Auto Plate (ref : W665A46), e a RT-PCR sobre CFX96 (Bio-Rad). E os testes foi realizados sobre CFX96™ (Bio-Rad).

		EBX-041	
		Positivos SARS-CoV-2	Negativos SARS-CoV-2
Pré-testados EBX-041 e Kit Seegene	Positivos SARS-CoV-2	270	0
	Negativos SARS-CoV-2	0	558

Sensibilidade global : > 99% (270/270)
Especificidade global : > 99% (558/558)
Correspondencia global : > 99% (828/828)

Especificidade e sensibilidade diagnostica sobre recolhas salivares e sobre cotonetes nasofaringeos recolhidos de maneira concomitante sobre os mesmos pacientes :

Esta validação incidiu sobre 103 recolhas salivares e 103 cotonetes nasofaringeos SARS-CoV-2 positivos recolhidos de maneira concomitante em 103 pacientes. Em 103 recolhas nasofaringeas, 37 foram detectadas SARS-CoV-2 positivas e 66 foram reveladas negativas. As extrações de ARN foram realizadas sobre um extrator Genolution (Nextractor®). A saliva foi recolhida inicialmente num frasco seco esteril de 30 mL ao mesmo tempo da recolha nasofaríngea, depois transferir num tubo secundario com meio de transporte. A recolha salivar foi fluidificada com Digest-EUR (Eurobio. Ref. : DD0DIG00-AI) nna proporção de 12.5 µL para 250 µL de saliva em 250 µL de PBS.

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

➤ **Especificidade diagnostica sobre recolhas salivares/cotonetes nasofaríngeos recolhidos de maneira concomitante sobre os mesmos pacientes:**

Esta validação incidiu sobre 66 recolhas salivares provenientes dos mesmos pacientes que tiveram um resultado SARS-CoV-2 negativo sobre recolha nasofaríngea.

Nenhum sinal específico foi detectado em nenhuma saliva, todas apresentando um sinal válido do controlo de extração e de inibição de RT-PCR.

➤ **Sensibilidade diagnostica sobre recolhas salivares e sobre cotonetes nasofaríngeos recolhidos de maneira concomitante sobre os mesmos pacientes:**

Esta validação incidiu sobre 37 recolhas salivares provenientes dos mesmos pacientes que tiveram um resultado SARS-CoV-2 positivo sobre recolha nasofaríngea.

As performances globais sobre as recolhas salivas e nasofaríngeas concomitantes são as seguintes :

Performances sobre recolhas salivares/nasofaríngeas (NP) concomitantes sobre os mesmos pacientes		Amostras salivares	
		Salivas SARS-CoV-2 positivas	Salivas SARS-CoV-2 negativas
Amostras nasofaríngeas (NP)	NP SARS-CoV-2 positivas	34	3
	NP SARS-CoV-2 negativas	0	66

Os testes foram realizados sobre CFX96™ (Bio-Rad).

Sensibilidade sobre salivas (de pacientes tendo um resultado positivo sobre NP) /Concordancia positiva: 91.9 % (34/37) (IC₉₅ : 83.1 , 100)

Especificidade sobre salivas (de pacientes tendo um resultado negativo sobre NP) /Concordancia negativa: > 99% (66/66) (IC₉₅ : 95 - 100)

Concordancia global entre os resultados sobre recolhas salivares e nasofaríngeas concomitantes : 97.1% (100/103) (IC₉₅ : 93.8 , 100)

A **concordancia positiva** do teste **EBX-041** entre amostras nasofaríngeas e salivares é em acordo com as recomendações da Alta Autoridade de Saude, que exigem uma sensibilidade clinica minimal do teste RT-PCR salivar de pelo menos 80% (considerando a limita inferior de intervalo de confiança a 95% da sensibilidade assim estimada).

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

PARTICULARIDADES LIGADAS AO INSTRUMENTO DE PCR EM TEMPO REAL T-COR

8®-IVD

T-COR 8®-IVD é um instrumento de PCR em tempo real com 8 poços programáveis de maneira independente que podem ser utilizados, paciente por paciente, independentemente dos outros, do ponto de vista dos testes / « Dosagem/assay » realizados, dos programas termicos, e do momento do lançamento da PCR.

Os 8 poços podem também ser utilizados simultaneamente com a mesma « Dosagem/Assay ».

Nota: Bem misturar depois do depósito da amostra no tubo com idas e voltas de pipetagem, evitando a formação de bolhas e assegurar-se que o volume de líquido está bem situado no fundo do tubo. Bem fechar cada tubo depois de cada depósito do controlo ou da amostra para evitar qualquer contaminação.

Controlos

Sobre T-COR 8®-IVD, o controlo positivo e o controlo negativo devem ser testados no mínimo na primeira utilização de um novo kit.

De seguida ; o controlo interno permite assegurar-se que a extração foi bem realizada, e que na amostra testada, não há inibição da PCR, e que esta funciona correctamente.

Fluoróforos

Existem 4 combinações de fluoróforos disponíveis sobre o T-COR 8®-IVD.

Para todos os EBX, incluindo EBX-041, a combinação FAM/HEX/Texas Red/Cy5 é a escolhida. Se alguns canais não são utilizados em certos kits, não ter em conta durante a análise dos resultados.

Uso dos Codigos-Barras

1- Seleccionar Menu > Nova analise/New Run

2- Seleccionar Codigo-barras/Barcode,

3- Digitalizar na direita do aparelho o Codigo-Barra desejado :

- Seja para o controlo positivo (Codigo-barra EBX-041 Pos Ctrl),
- Seja para o controlo negativo (Codigo-barra EBX-041 Neg Ctrl),
- Seja para uma amostra (Codigo-Barra EBX-041)

O instrumento selecciona automaticamente um dos 8 poços disponíveis. Seguir as instruções dadas pelo instrumento.

4- Levantar a valvula do poço x seleccionado pelo aparelho, e verificar que a luz LED azul está ligada, depois seleccionar « Sim / Yes ».

5- Posicionar o tubo no poço correspondente e fechar a valvula depois seleccionar « Seguinte / Next ».

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

6- Se quer nomea-lo (opcional), seleccionar « Amostra x / Sample x », et le nommer. Seleccionar « Accept ».

7- Seleccionar « Seguinte / Next »

8- Para adicionar/testar outro controlo ou amostra, seleccionar « Adicionar um poço / Add well » e começar de novo ao ponto 3-

9- Seleccionar « Começar o analise / Start Run »

Nota : a nomeação de uma amostra ou de um run não pode ser modificada ou adicionada depois do final do run. Ela deve ser realizada antes ou durante o run.

Apresentação e Interpretação dos resultados

Os resultados de Ct e as curvas de amplificação são disponíveis a partir do quadro Valores SmartCT™ / SmartCT™ Table (valores de Ct atribuídos sobre cada canal), e dos gráficos de Ct em função dos ciclos sobre cada canal, os dois sendo visualizáveis em tempo real sobre a máquina.

Uma análise para os controlos negativo e positivo, assim como para as amostras é gerada de maneira automática. Esta é disponível em « Interpretações / Interpretations », no final do run, na janela « Vista / View ».

Para o controlo positivo e o controlo negativo, os resultados seguintes são possíveis:

« Neg Ctrl Fail » : Não válido

« Neg Ctrl Valid » : Válido

« Pos Ctrl Fail » : Não válido

« Pos Ctrl Valid » : Válido

Determinação do estatuto para as amostras :

« Detectado(a-s) / Detected » : Positivo → quadrado verde

« Não detectado / Not detected » : Negativo → quadrado vermelho

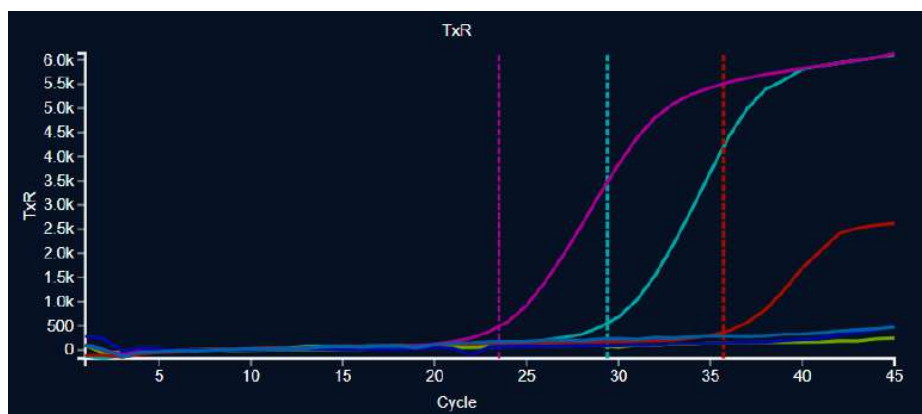
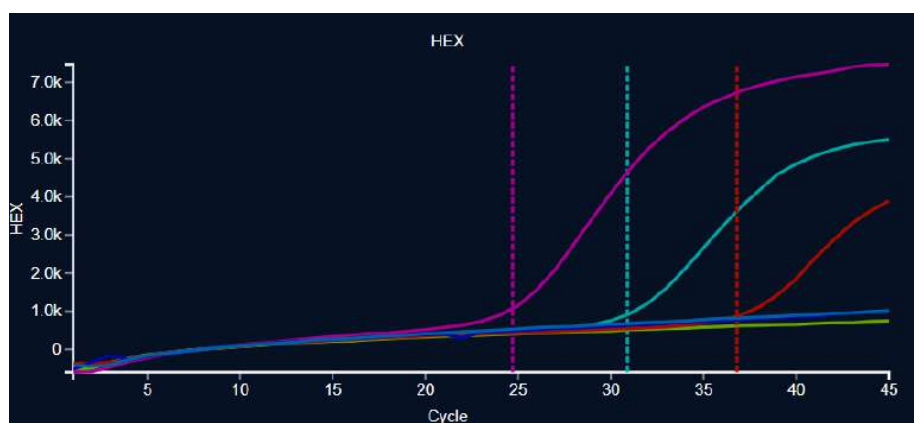
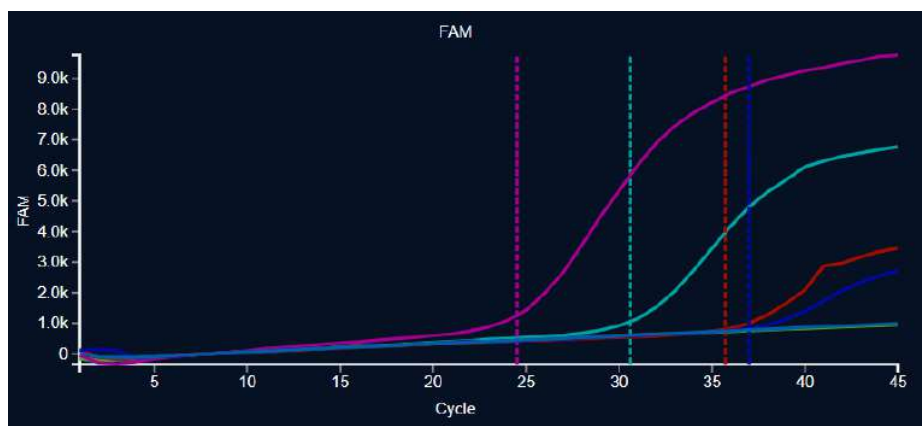
« Não Válido / Invalid » : Resultado não válido -> testar de novo -> quadrado amarelo

Exemplo de apresentação de interpretação automática dos resultados

Summary									
Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5	Call	Note	
1	ECH POS	EBX-041	30.6	30.9	29.4	28.9	Detected • Sars-Cov-2	Sars-Cov-2 positive	
2	ECH NEG	EBX-041				16.3	Not Detected	Sars-Cov-2 negative	
3	ECH NEG	EBX-041					Invalid	Retest	
5	Ctrl POS	EBX-041 Pos Ctrl	35.7	36.8	35.7		Invalid	Pos Ctrl Fail	
6	Ctrl POS	EBX-041 Pos Ctrl	24.5	24.7	23.5	23.0	Detected • Pos Ctrl	Pos Ctrl Valid	
7	Ctrl NEG	EBX-041 Neg Ctrl	37.0			32.5	Invalid	Neg Ctrl Fail	
8	Ctrl NEG	EBX-041 Neg Ctrl					Detected • Neg Ctrl	Neg Ctrl valid	

Exemplo de curvas de amplificação

Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex



Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

Codigos-Barras sobre T-COR8®-IVD para EBX-041

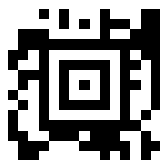
EBX-041 Pos Ctrl
Controlo Positivo CP



EBX-041 Neg Ctrl
Agua = controlo negativo (CN-H2O)



EBX-041



14. Bibliografia

Chan JF, Kok KH, Zhu Z, Chu H et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wu-han. Emerg microbes infect. 2020 Dec; 9(1):221-236.

Cohen J, Normile D. New SRAS-like virus in China triggers alarm, Science. 2020 Jan 17;367(6475):234-235.

Drosten C, Muth D, Corman VM, Hussain R et al. An observational, laboratory-based study of outbreaks of middle east respiratory syndrome coronavirus in Jeddah and Riyadh, kingdom of Saudi Arabia, 2014. Clin infect dis. 2015 Feb 1; 60(3):369-77.

Cryopreservação de tecidos, células e líquidos biológicos do cuidado, Recomendações de boas práticas,

15. Controlo qualidade

Em conformidade com o sistema de management da qualidade de Eurobio, certificado ISO EN 13485, cada lote de EurobioPlex SARS-CoV-2 é testado seguindo as especificações pré-definidas a fim de garantir uma qualidade constante dos produtos.

16. Eliminação dos resíduos

Eliminar todos os resíduos em conformidade com a legislação sobre os DASRI.

17. Declaração de incidente

Todo incidente grave ocorrido em relação com o reagente deve ser notificado a Eurobio Scientific e à autoridade competente do Estado membro no qual o utilizador e/ou o paciente é estabelecido.

18. Assistencia tecnica

Para obter uma assistencia sobre nossos produtos, é favor contactar nosso suporte técnico.

O serviço cliente da Eurobio Scientific é contactavel por via electronica (mail), no endereço adv@eurobio-scientific.com ou por telefone ao +33 (0)1.69.79.18.26.



Fiche technique EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex

História das mudanças

Data	Versão	Revisão
27/01/2023	V14.00	Validação da EBX-041 em novos instrumentos QuantStudio7 pro e QuantStudio5 (Applied Biosystem by Thermo Fisher Scientific)
09/11/2022	V13.00	Validação do instrumento CFX® Opus 96 (Bio-Rad)