

Instructions for use EurobioPlex FluCoSyn



EurobioPlex FluCoSyn

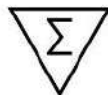
REAL-TIME RT-PCR

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

REF

EBX-042

EBX-042-25 ; EBX-042-50 ; EBX-042-100 ; EBX-042-200 ; EBX-042-600



25/50/100/200/600 reactions



Reference EBX-042 Version 8.03 – 14/02/2025

Validated on:

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) with analysis on CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 (Roche) with analysis on LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- T-COR 8®-IVD (Tetracore Inc.) with T-COR 8 Per-Well SmartCT™ (auto v1) software
- CFX Opus 96 (Bio-Rad) with analysis on CFX Maestro version 2.2 (Bio-Rad)

Storage conditions:

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



Instructions for use

Available on request at www.info@eurobio-scientific.com

Instructions for use EurobioPlex FluCoSyn

Table of content

English.....	1
Français	27

1. Introduction	3
2. Purpose of the system	4
3. Symbols.....	5
4. Principle of detection	6
5. Content of the kit.....	7
6. Storage.....	7
7. Materials required not provided	7
8. Real-time PCR instrument	8
9. Cautions and note.....	8
10. Procedure	9
11. Validation of the experiment	13
12. Data analysis and interpretation	14
13. Performance analysis	15
14. Bibliography.....	25
15. Quality control.....	25
16. Waste disposal.....	25
17. Incident report.....	25
18. Technical assistance	26

Instructions for use EurobioPlex FluCoSyn

1. Introduction

The influenza A virus (Influenza A, Flu A) and the influenza B virus (Flu B) belong to the *Orthomyxoviridae* family. Respiratory Syncytial Virus A and B (RSV A and B) are members of the *Paramyxoviridae* family. SARS-CoV-2 virus belongs to the *Coronaviridae* family and subgenus *Sarbecovirus*. The latter emerged in China at the end of 2019, in the city of Wuhan, and caused an unprecedented worldwide pandemic in the first half of 2020. All three are RNA viruses, with human-to-human transmission mainly infecting the lungs and respiratory tract (cough and sneeze droplets from infected individuals).

The genome of the SARS-CoV-2 virus consists of 29903 ribonucleic acid (RNA) bases. The SARS-CoV-2 is the seventh coronavirus identified as infecting humans, after human coronaviruses (HCoV) 229E, NL63, OC43, HKU1, SARS-CoV (coronavirus causing severe acute respiratory syndrome) and MERS-CoV (coronavirus inducing Middle Eastern respiratory syndrome). The SARS-CoV-2 sequences present similarities with those of betacoronaviruses found in bats. The SARS-CoV-2 virus is genetically distinct from other human coronaviruses such as those related to SARS and MERS.

These viruses are a major public health problem worldwide (morbidity rate, and health and social costs). They are seasonal, mainly autumn/winter. Flu induces epidemic, with possible serious consequences especially in the elderly. RSV is the main cause of bronchiolitis in young children. SARS-CoV-2 led to a pandemic. Clinical signs usually disappear after a few days, but the symptoms are variable, commonly covering an influenza-like illness such as fever, headache, cough, runny nose, pharyngitis, myalgia, asthenia, breathing difficulty, but in the most severe cases, complications occur (pneumonia, severe respiratory syndrome, and dehydration) and can be fatal. Antivirals are currently available for influenza and RSV, but not for SARS-CoV-2, whose treatment and prophylaxis are being studied worldwide. To date, only the annual influenza vaccine has a Marketing Authorization.

In July 2020, the actual case-fatality rate associated with SARS-CoV-2 in France is between 0.5% and 1% according to the WHO, which is well above the seasonal influenza rate of 0.1%, but without any measurement compared to that associated with SARS-CoV-1 or MERS, which are 10% and 30% respectively. SARS-CoV-2 is highly contagious with more than 16 million cases worldwide at the end of July 2020. According to WHO reports, the pandemic is very active in the USA, the Middle East, and Central and South Asia, and is on the rise in countries where influenza usually circulates at this time of year (South Africa, Australia).

Respiratory viral infections are generally diagnosed clinically on the basis of symptoms and local epidemic situation. The 3 types of viruses detected by EurobioPlex FluCoSyn co-circulate. Despite the fact that the pathogenic agents lead to specific manifestations, each can lead to various symptoms of the respiratory tract, with different degree of severity, depending on the host. Moreover, the therapeutic approach is different depending on the virus. It is therefore crucial to be able to differentiate which type of virus is at the origin of the symptoms, within an epidemic and pandemic context. This is achieved with EurobioPlex EBX-042.

Instructions for use EurobioPlex FluCoSyn

2. Purpose of the system

The EurobioPlex FluCoSyn is a real-time reverse transcription polymerase chain reaction (*RT-PCR*) *amplification test in an RNA nucleic acid extract designed for in vitro* use for the qualitative determination of the presence or absence of the following respiratory viruses:

- SARS-CoV-2, an emerging virus, which appeared in China in late 2019 in the city of Wuha
- Influenza A virus (Flu A) and Influenza B virus (Flu B)
- Respiratory Syncytial Virus A and B (RSV A and B)

EurobioPlex FluCoSyn has been designed to detect Flu and RSV without differentiation of types A and B, and all known SARS-CoV-2 sequences known to date, and by *in silico* alignment, particularly allowing to exclude other benign coronaviruses or SARS-CoV-1 or MERS coronaviruses. The determination of SARS-CoV-2 status is based on the detection of 2 targets coupled to the same fluorophore: one in the RdRp gene and the other target in the N gene.

The test is indicated to help diagnose presumptive infection with these three viruses associated with respiratory syndrome in humans, or to complement a proven or undetermined diagnosis, specifically distinguishing the SARS-CoV-2 coronavirus from RSV or Influenza respiratory viruses. The diagnosis should always be made by medical personnel and in the clinical, historical and symptomatic context of the patient.

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

The RNA extract from any respiratory specimen is the starting material for the EurobioPlex FluCoSyn. It is the responsibility of the user to use extraction methods appropriate to the specimens tested.

The kit has been validated on the following types of respiratory specimen:

- Nasopharyngeal swab ;
- Nasopharyngeal aspirate ;
- Bronchial aspiration ;
- Bronchoalveolar fluid ;
- Sputum.

Instructions for use EurobioPlex FluCoSyn

3. Symbols



Reference



Batch number



Limits of storage temperature



Expiration date



Content sufficient for « N » reactions



Manufacturer



CE marked product



In Vitro Diagnostic Medical Device



Instructions for use



Store away from light



Do not use if packaging is damaged



Caution

Instructions for use EurobioPlex FluCoSyn

4. Principle of detection

EurobioPlex FluCoSyn is a test using reverse-transcription and real-time amplification of viral RNA of Influenza (A and B), RSV (A and B) and SARS-CoV-2 (one target in RdRp gene and the other in N gene), based on a single Multiplex RT-PCR test, detecting all 3 viruses in a signal well.

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

The endogenous control allows to check for variations that may occur during the RNA extraction step of biological samples and real-time RT-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.

Influenza A and B are detected with FAM-labeled probes, RSV A and B are detected with an HEX labeled probe, and SARS-CoV-2 with Texas Red labeled probes.

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.

Table 1: Detection of targets by fluorophores

Targets	Fluorophore	Excitation	Emission
Target 1 / Flu	FAM	495 nm	515 nm
Target 2 / RSV	HEX	535 nm	555 nm
Target 3 / RdRP1/RdRP2 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, SmartCycler II, Systems Mx, CFX96™/Chromo4, T-COR8-IVD, LC480), Channel Green (RotorGene), CFX® Opus 96 (Bio-Rad).
- Channel **HEX** (Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx, T-COR 8-IVD, LC480), Canal VIC (Systèmes ABI), Canal Alexa532 (SmartCycler II), Canal Yellow (RotorGene), CFX® Opus 96 (Bio-Rad).
- Channel **Texas Red** (Systems ABI, Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx, T-COR 8-IVD), LC Red 610 (LC480), Canal Orange (RotorGene), CFX® Opus 96 (Bio-Rad).
- Channel **Cy5** (CFX96™/Chromo4, Systems ABI, Systems Mx, T-COR8-IVD, LC 480), Channel Alexa647 (SmartCycler II), Channel Red (RotorGene), CFX® Opus 96 (Bio-Rad).

Instructions for use EurobioPlex FluCoSyn

Note 1: 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).

Note 2: During the analysis using LC480 Software release 1.5.0, do not leave Noiseband Auto on Texas red and HEX channels, but apply the NoiseBan Fluor manually at 0,43 for Texas Red channel and 5,5 for HEX channel (the operator need to adjust the baseline).

5. Content of the kit

The real-time RT-PCR kit EurobioPlex FluCoSyn is ready to use and contains the reagents and enzymes necessary for the detection of these viruses (Table 2).

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

Table 2: Content of the kit

Cap color	Content of the kit	25 reactions	50 reactions	100 reactions	200 reactions	600 reactions	Reconstitution
Red	Enzymes	5x25 µL	10x25 µL	525 µl	800 µl	2 x 1200 µl	Ready to use
Transparent	Oligomix	5x20 µL	10x20 µL	420 µl	700 µL	2 x 950 µl	Ready to use
Yellow	Positive Control CP	5x15 µL	10x15 µL	160 µl	320 µl	320 µl	Ready to use
Blue	Water = negative control (CN-H2O)	1500 µL	1500 µL	1500µl	1500 µl	2 x 1500 µl	Ready to use

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

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

Instructions for use EurobioPlex FluCoSyn

- ◇ DNase-free and RNase-free filter tips for micropipettes
- ◇ Sterile microtubes
- ◇ Gloves (talc-free)

8. Real-time PCR instrument

The EurobioPlex FluCoSyn 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)
- LightCycler®480 with analysis on LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- T-COR 8®-IVD (Tetacore Inc.) with T-COR 8 Per-Well SmartCTTM (auto v1) software
- CFX Opus 96 (Bio-Rad) with analysis on CFX Maestro version 2.2 (Bio-Rad)

9. Cautions and note



Read these instructions carefully before starting the procedure.

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

Instructions for use EurobioPlex FluCoSyn

- ◇ 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 (talco-free) should be worn in each work area.
- ◇ Pipettes, reagents and other working materials should not be moved between these areas.
- ◇ Special care should be taken to maintain the purity of reagents and reaction mixtures.
- ◇ 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 aerosols.

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.

Instructions for use EurobioPlex FluCoSyn

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

b. RNA extraction

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

In the EBX-042 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).

Instructions for use EurobioPlex FluCoSyn

Diagram of the procedure:

1 - PREPARATION OF MASTERMIX

Number of reactions	N+3
Enzymes	(N+3) x 3.75 µl
Water	(N+3) x 3.25 µl
Oligomix	(N+3) x 3 µl
Total Volume Mastermix	(N+3) x 10 µl

* N+1 on T-COR 8⁺-IVD

2 - PREPARATION OF REACTIONS

Sample

10 µl Mastermix
+
5µl RNA sample

Positive Control

10 µl Mastermix
+
5µl CP

Negative Control

10 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

Instructions for use EurobioPlex FluCoSyn

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 (*N+1 on T-COR8).

Number of reactions	N+3*
Enzymes	(N+3) x 3.75 µl
Water	(N+3) x 3.25 µl
Oligomix	(N+3) x 3 µl
Total Volume Mastermix	(N+3) x 10 µl

- 1) Homogenise the Mastermix prepared in 2) and centrifuge briefly
- 2) Dispense 10 µL of Mastermix into separate microplate tubes/wells using a micropipette and filter tips.
- 3) Add 5 µL of extracted RNA sample.
- 4) In parallel perform the following controls:
 - Positive Control:
 - 10 µL of Mastermix + 5 µL of CP.
 - Negative Control:
 - 10 µL of Mastermix + 5 µL supplied water (CN-H2O).
- 5) Immediately close the tubes, or plate with an adhesive film to avoid contamination.
- 6) 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). **Please ensure that white PCR plates are used for appropriate reading in all channels.**

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).

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.

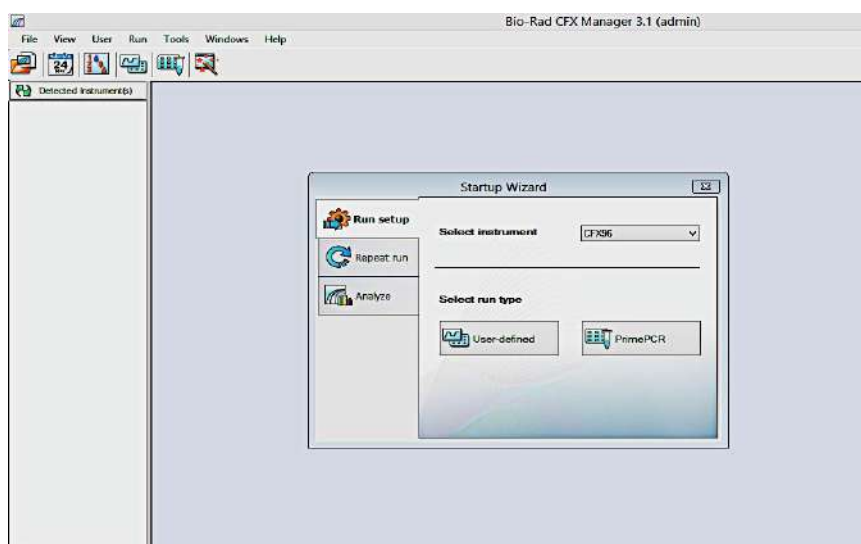
Instructions for use EurobioPlex FluCoSyn

11. Validation of the experiment

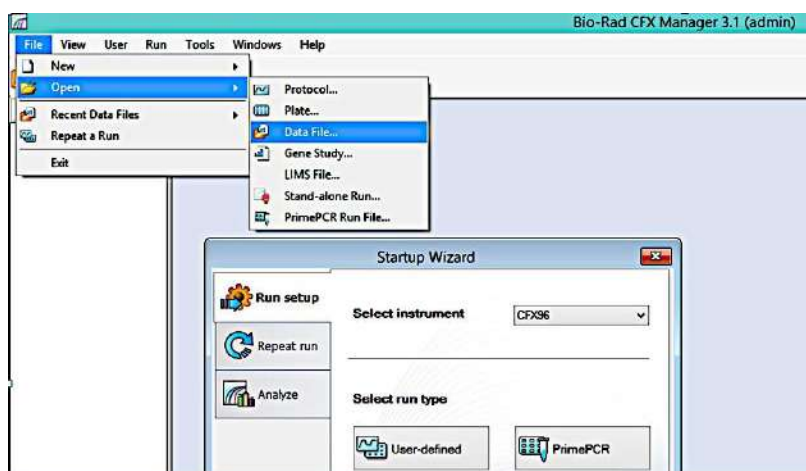
Post-acquisition data analysis on a CFX96 PCR instrument (Bio-Rad) must be performed using version 3.1 of the CFX Manager software (Bio-Rad). In order to change to this version from a run started on an earlier version, please follow the procedure below: At the end of the run, the data file with the extension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

If a CFX Opus 96 PCR instrument is used, the analysis should be performed on the CFX Maestro software version 2.2. The remainder of the analysis is identical to that to be performed with a CFX96, as shown below.



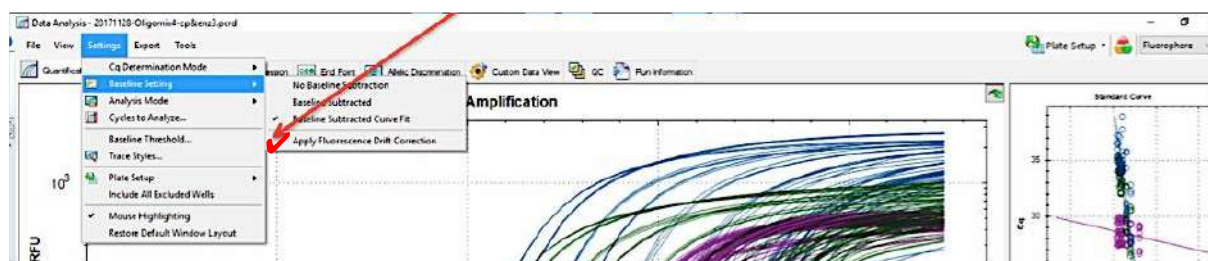
Click on "File" and select "Open" then "Data File".



Instructions for use EurobioPlex FluCoSyn

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".



Once this is done, the analysis can start.

The results for the controls must be the following (Table 4); otherwise, the experiment is not valid.

On T-COR 8®-IVD, these controls must be performed at least during the first use of a new box of kit.

Table 4: Validation of the run

Positive Control	
FAM	Ct ≤ 30
HEX	Ct ≤ 30
Texas Red	Ct ≤ 30
Cy5	Ct ≤ 30
Negative Control	
FAM	Undetermined Ct
HEX	Undetermined Ct
Texas Red	Undetermined Ct
Cy5	Undetermined Ct

12. Data analysis and interpretation

For clinical samples, the following results are possible:



***SARS-CoV-2 (Texas Red), Flu (FAM) ou RSV (HEX): Ct < 40**

*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.

Instructions for use EurobioPlex FluCoSyn

Table 5:

PCR Signal Flu and/or RSV and/or SARS-CoV-2	CI-PCR Signal	Presence of virus	Test validity/comment
FAM and/or HEX and/or Texas Red	Cy5		
+	+	Yes	VALID
-	+	No	VALID
+	-	Yes	VALID Possible RT-PCR inhibition or problem with extraction that does not prevent the detection of viruses.
-	-	No possible interpretation	RT-PCR inhibition or problem with extraction → dilute first 5 x the sample and test again; if necessary take a new sample and/or redo an extraction

Limitations on use and interpretation:

- ❖ All samples should be treated as potentially infected with SARS-CoV-2, and local biosafety regulations should be carefully followed.
- ❖ Interpretation of results should consider the possibility of false negatives and false positives.
False negatives may be due to:
 - Inadequate collection of samples, or incorrect storage,
 - Samples outside the viremia phase,
 - Inappropriate extraction conditions or use of non-validated PCR instruments,
 - Experimentation not respecting all elements of these instructions for use.
 False positives may be due to:
 - Contamination due to mishandling of high positive samples, the positive control, or the PCR amplification products,
 - Failure to follow the procedure described in these instructions for use, especially to avoid sources of contamination.
- ❖ All results should be interpreted by medical professionals in the context of the patient's clinical situation, history and symptoms.

13. Performance analysis

A dilution range was performed using a plasmid mixture ranging from 10^5 to 1 copy/ μ L. This dilution range was used to determine the detection limit (at 100% detection) of the EBX-042 kit.

In addition, a detection limit was determined on the WHO 1st International Standard for SARS-CoV-2 RNA (NIBSC code 21/146) and on a SARS-CoV-2 synthetic RNA of Twist Biosciences.

Instructions for use EurobioPlex FluCoSyn

Detection limitation/analytical sensitivity on CP:

SARS-CoV-2 : 7.5 copies/ μ L

Influenza/Flu : 5 copies/ μ L

RSV : 5 copies/ μ L

CI Cy5 : 7.5 copies/ μ L

Detection limitation/analytical sensitivity on WHO 1st International Standard for SARS-CoV-2 RNA:

SARS-CoV-2: 12.5 copies/ μ L

Detection limitation/analytical sensitivity on a SARS-CoV-2 synthetic RNA (Twist Biosciences, USA) :

SARS-CoV-2: 6.25 copies/ μ L

Sensitivity study on 106 known positive samples diluted in known samples Negatives at 3x 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.

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

- Intra-experimental variability:

Average intra-batch CV (%)	Endogenous ctrl Gene	Influenza	RSV	SARS-CoV-2
CFX96	1,62	1,19	1,11	2,39
LC480	1,37	1,09	1,97	1,00
T-COR-8-IVD	2,97	1,94	2,37	1,96
CFX [®] Opus 96	0.39	0.33	0.76	0.64

CV: coefficient of variation

- Inter-batch variability:

Average inter-batch CV (%)	Endogenous ctrl Gene	Influenza	RSV	SARS-CoV-2
CFX96	2,75	4,06	1,18	4,85
LC480	0,45	1,80	1,95	1,13
T-COR-8-IVD	0,73	1,15	3,20	0,93
CFX [®] Opus 96	5.75	1.98	1.55	0.92

Instructions for use EurobioPlex FluCoSyn

CV: coefficient of variation

Diagnostic specificity

This validation included:

- 508 SARS-CoV-2 negative samples, pretested and characterized by CE approved tests.
- 40 samples negative for all known coronaviruses, including respiratory panel samples characterized for other viruses to test for cross-reactions.
- 3 samples positive for CoV NL63, 2 samples positive for CoV OC43, 1 sample positive for CoV 229E and 1 sample positive for CoV HKU1.

Number of sample	Positive for	Coronavirus	Status SARS-CoV-2 EBX-042
1	Adenovirus	Negative	Negative
5	ParaInfluenza	Negative	Negative
1	Rhinovirus	Negative	Negative
1	Bocavirus	Negative	Negative
2	Legionella pneumoniae	Negative	Negative
3	Mycoplasma pneumoniae	Negative	Negative
3	Mycoplasma tuberculosis	Negative	Negative
2	Bordetella pertussis	Negative	Negative
1	Parechovirus Type 1	Negative	Negative
1	Parechovirus Type 2	Negative	Negative
1	Parechovirus Type 3	Negative	Negative
1	Parechovirus Type 4	Negative	Negative
1	Parechovirus Type 5	Negative	Negative
1	Parechovirus Type 6	Negative	Negative
3	Enterovirus	Negative	Negative
1	Streptococcus pyogenes	Negative	Negative
3	Streptococcus pneumoniae	Negative	Negative
2	Staph.epiderm/oralis/mi-	Negative	Negative
3	Candida albicans	Negative	Negative
2	Pseudomonas aeruginosa	Negative	Negative
3	CoV NL63	Positive	Negative
2	CoV OC43	Positive	Negative

Instructions for use EurobioPlex FluCoSyn

1	CoV 229E	Positive	Negative
1	CoV HKU1	Positive	Negative
1	Metapneumovirus	Positive	Negative
1	Human papillomavirus	Positive	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 and specificity

The validation of the performance was performed on :

555 negative samples	
508 SARS-CoV-2 negative samples	Characterised with EBX-041 kit, CE marked
47 positive respiratory samples	RSV-A/B, Parainfluenzae, Rhinovirus, Metapneumovirus, CoV NL63, CoV OC43, CoV 229E, CoV KU1

335 positive samples	
270 SARS-CoV-2 positive samples	Characterized by EurobioPlex EBX-041 CE-IVD kit
29 VRS positive samples	Characterized with the Seegene Allplex SARS-Cov-2 Flu A / Flu B RSV Assay
37 Influenza positive samples	characterized with the Seegene Allplex SARS-Cov-2 Flu A / Flu B RSV Assay

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).

Overall performances are:

		EBX-042		
		Flu		
		POSITIVE	NEGATIVE	TOTAL
Pretested	POSITIVE	34	0	34
	NEGATIVE	3	806	809

Instructions for use EurobioPlex FluCoSyn

		RSV		
		POSITIVE	NEGATIVE	TOTAL
Pretested	POSITIVE	29	0	29
	NEGATIVE	0	814	814
		SARS-CoV-2		
		POSITIVE	NEGATIVE	TOTAL
Pretested	POSITIVE	269	0	269
	NEGATIVE	0	574	574

The tests were performed on CFX96™ (Bio-Rad).

	Sensitivity %	Specificity %	Concordance %
FLU	92	> 99	> 99
RSV	> 99	> 99	> 99
SARS-Cov-2	> 99	> 99	> 99

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-042, FAM/HEX/Texas Red/Cy5 combination is used. If some channels are not used, do not consider this channel for results analysis.

Instructions for use EurobioPlex FluCoSyn

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-042 Pos Ctrl),
- For the negative control (Barcode EBX-042 Neg Ctrl),
- For a patient sample (Barcode EBX-042)

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-.

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

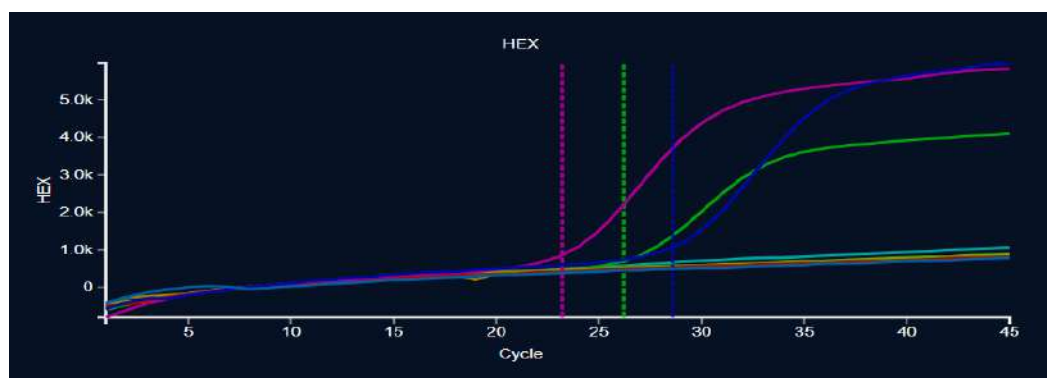
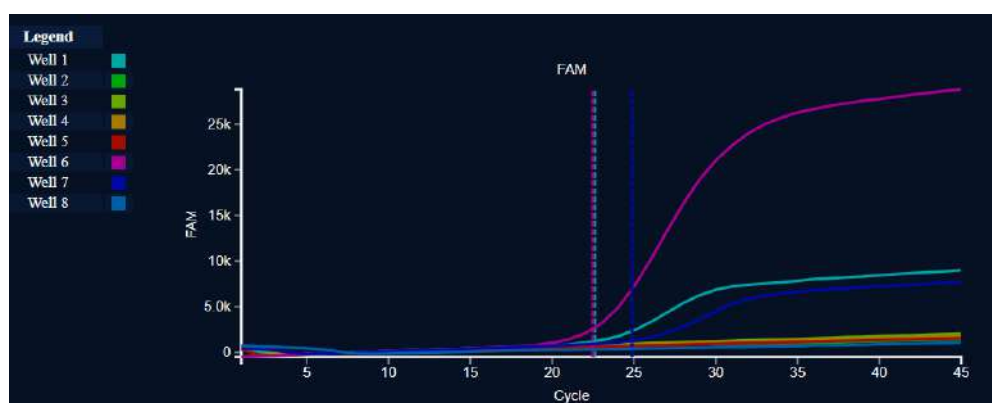
« Invalid »: Invalid result → yellow box: retest

Instructions for use EurobioPlex FluCoSyn

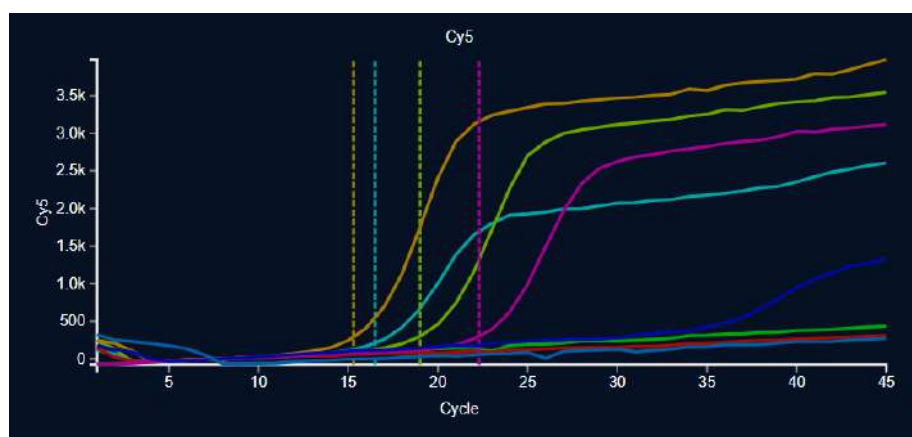
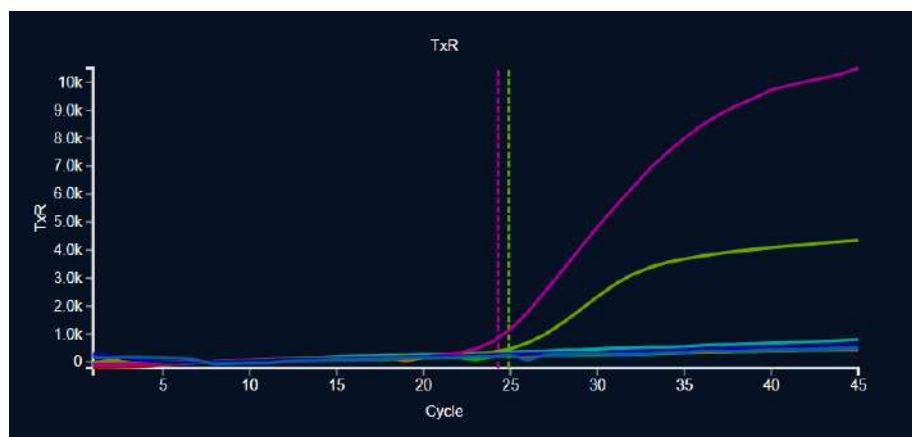
Example of automatic interpretation of results on T-COR 8®-IVD

Summary							
Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5	Call
1	Sample 1	EBX-042	22.6			16.5	Detected • Influa
2	Sample 2	EBX-042		26.2			Detected • RSV
3	Sample 3	EBX-042			24.9	19.0	Detected • SARS-CoV-2
4	Sample 4	EBX-042				15.3	Not Detected
5	Sample 5	EBX-042					Invalid
6	Ctrl pos	EBX-042 Pos Ctrl	22.5	23.2	24.3	22.3	Detected • Pos Ctrl
7	Ctrl pos	EBX-042 Pos Ctrl	24.9	28.6			Invalid
8	Ctrl neg	EBX-042 Neg Ctrl					Detected • Neg Ctrl
							Note
							RSV, SARS-CoV-2 negative
							Retest for Influa, SARS-CoV-2
							Influa, RSV negative
							Influa, RSV, SARS-CoV-2 negative
							Retest
							Pos Ctrl Valid
							Pos Ctrl Fail
							Neg Ctrl Valid

Exemple of amplification curves



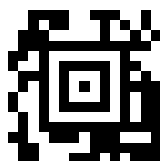
Instructions for use EurobioPlex FluCoSyn



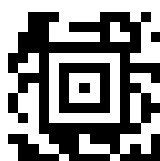
Instructions for use EurobioPlex FluCoSyn

Barcodes for EBX-042 for use on T-COR8®-IVD

EBX-042 Pos Ctrl
Positive control CP

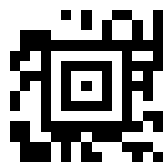


EBX-042 Neg Ctrl
Water = Negative control (CN-H2O)



Instructions for use EurobioPlex FluCoSyn

EBX-042



Instructions for use EurobioPlex FluCoSyn

14. Bibliography

Xiaojing Wu, Ying Cai, Xu Huang, Xin Yu, Li Zhao, Fan Wang, Quanguo Li, Sichao Gu, Teng Xu, Yongjun Li, Binghuai Lu, Qingyuan Zhan, Co-infection with SARS-CoV-2 and Influenza A Virus in Patient with Pneumonia, China, *Emerg Infect Dis.* 2020 Jun;26(6):1324-1326.

Yan Li, Jiangshan Wang, Chunting Wang, Qiwen Yang, Yingchun Xu, Jun Xu, Yi Li Xuezhong Yu, Huadong Zhu, Jihai Liu Characteristics of respiratory virus infection during the outbreak of 2019 novel coronavirus in Beijing. *Int J Infect Dis.* 2020 Jul;96:266-269.

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 Wuhan. *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.

Cryopreservation of tissues, cells and biological fluids from care, Recommendations for good practices, www.has-santé.fr.

15. Quality control

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

16. Waste disposal

Eliminate all waste in accordance with the legislation on DASRI.

17. Incident report

Serious incidents related to the system must be reported to Eurobio Scientific.

Instructions for use EurobioPlex FluCoSyn

18. Technical assistance

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

Eurobio Scientific's customer service can be contacted by e-mail at adv@eurobio-scientific.com or by phone at +33 (0)1.69.79.64.80.



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



EurobioPlex FluCoSyn

RT-PCR EN TEMPS REEL

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

REF

EBX-042

EBX-042-25 ; EBX-042-50 ; EBX-042-100 ; EBX-042-200 ; EBX-042-600



25/50/100/200/600



Version 8.03 du 14/02/2025

Validé sur :

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) avec analyse sur CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)
- LightCycler®480 (Roche) 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
- CFX® Opus 96 (Bio-Rad) avec analyse sur Bio-Rad CFX Maestro version 2.2(Bio-Rad)

Conditions de stockage:

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

Notice d'utilisation



Disponible sur demande à www.info@eurobio-scientific.com

Notice d'utilisation EurobioPlex FluCoSyn

Table des matières

English	1
----------------------	----------

Français	27
-----------------------	-----------

1. Informations générales.....	29
1. Destination du dispositif.....	30
2. Symboles.....	31
3. Principe	32
4. Composants du kit	33
5. Conservation et stockage	33
6. Matériel requis non fournis.....	34
7. Instrument de PCR en temps réel.....	34
8. Mises en garde et précautions	34
9. Protocole.....	35
10. Validation de l'expérimentation.....	39
11. Analyse des données et interprétation	40
12. Analyse des performances	42
13. Bibliographie.....	50
14. Contrôle qualité.....	51
15. Elimination des déchets	51
16. Déclaration d'incident	51
17. Assistance technique.....	52

Notice d'utilisation EurobioPlex FluCoSyn

1. Informations générales

Les virus de la grippe A et B appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae*. Les virus respiratoires RSV A et B sont des pneumovirus, membres de la famille des *Paramyxoviridae*. Le virus SARS-CoV-2 appartient à la famille des *Coronaviridae* et au sous-genre *Sarbecovirus*. Ce dernier apparut en Chine fin 2019, dans la ville de Wuhan, est à l'origine d'une pandémie mondiale sans précédent au premier semestre 2020. Tous trois sont des virus à ARN, de transmission inter-humaine infectant principalement les poumons et les voies respiratoires (gouttelettes de toux et éternuements de sujets infectés).

Le génome du virus SARS-CoV-2 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). Les séquences du SARS-CoV-2 présentent des similitudes avec celles des bêta-coronavirus 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.

Ces 3 virus sont un problème majeur de santé publique à l'échelle planétaire (taux de morbidité, et coût sanitaire et social). Ils sévissent sur le mode saisonnier essentiellement automno-hivernal. La grippe induit des épidémies, pouvant avoir des conséquences graves, en particulier chez le sujet âgé, alors que le RSV est la principale cause de bronchiolite chez le jeune enfant. Le SARS-CoV-2 est à l'origine d'une pandémie. Les signes cliniques disparaissent généralement après quelques jours d'évolution, mais le tableau clinique est variable, recouvrant communément un syndrome grippal avec fièvre, céphalées, toux, écoulement nasal, pharyngite, myalgie, asthénie, difficulté respiratoire, mais dans les cas les plus graves, des complications surviennent (pneumonie, syndrome respiratoire sévère, déshydratation) et peuvent être fatales. Des antiviraux sont disponibles à l'heure actuelle pour la grippe et RSV, mais pas pour SARS-CoV-2 dont le traitement et prophylaxie sont mondialement à l'étude. A ce jour, seul le vaccin annuel de la grippe dispose d'une Autorisation de Mise sur le Marché.

En Juillet 2020, le taux de létalité associé au SARS-CoV-2 en France se situe entre 0,5% et 1% d'après l'OMS, ce qui est bien au-dessus de la grippe saisonnière (0,1%), mais sans aucune mesure par rapport à celui lié au SRAS-CoV-1 ou au MERS qui sont de 10 % et 30 % respectivement. Le SARS-CoV-2 est hautement contagieux avec plus de 16 millions de cas dans le monde fin juillet 2020. D'après les rapports de l'OMS, la pandémie de SARS-CoV-2 est très active sur le continent américain, au Moyen-Orient, et en Asie centrale et du Sud, et est en hausse dans les pays où circule habituellement la grippe en cette période de l'année (Afrique du Sud, Australie).

Les infections respiratoires virales sont généralement diagnostiquées cliniquement sur la base des symptômes et de l'épidémiologie locale. Les 3 types de virus détectés par EBX-042 circulent en même temps. Bien que les agents pathogènes spécifiques entraînent des manifestations cliniques caractéristiques, chacun peut causer de nombreux syndromes viraux des voies respiratoires, et avoir des degrés de sévérité variables en fonction de l'hôte. De plus, la prise en charge thérapeutique est différente en fonction des virus responsables de l'infection.

Notice d'utilisation EurobioPlex FluCoSyn

Il est donc primordial de pouvoir différencier quel type de virus est à l'origine de la symptomatologie observée, dans un contexte d'épidémie et de pandémie, ce que permet l'EBX-042.

2. Destination du dispositif

L'EurobioPlex FluCoSyn est un test d'amplification par reverse transcription-réaction en chaîne de la polymérase (RT-PCR) en temps réel, dans un extrait d'acides nucléiques ARN, pour un usage *in vitro*, conçu pour la détection des virus respiratoires suivants :

- SARS-CoV-2, virus émergent, apparu en Chine fin 2019 dans la ville de Wuhan,
- Virus de la grippe (Influenza A et B/Flu A et B),
- Virus respiratoire syncytial (RSV A et B),

L'EurobioPlex FluCoSyn a été conçu pour détecter Flu et RSV sans différencier les types A et B, ainsi que toutes les séquences de SARS-CoV-2 connues à ce jour, par alignement *in silico*, notamment permettant d'exclure les autres coronavirus bénins et SARS-CoV-1 ou MERS. La détermination du statut de SARS-CoV-2 repose sur la détection de 2 cibles couplée au même fluorophore: l'une dans le gène RdRp et l'autre dans le gène N.

Le test est indiqué pour aider à poser un diagnostic de présomption d'infection par ces trois virus associés à un syndrome respiratoire chez l'homme, ou compléter un diagnostic avéré ou indéterminé, en distinguant spécifiquement le coronavirus SARS-CoV-2 des virus respiratoires Influenza ou RSV.

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

L'extrait d'ARN de tout prélèvement respiratoire est le matériel de départ pour le kit EurobioPlex FluCoSyn. Il revient à l'utilisateur d'utiliser des méthodes d'extraction adaptées aux prélèvements testés.

Le test EurobioPlex FluCoSyn 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 est validé sur les types de prélèvements respiratoires suivants :

- Ecouvillon nasopharyngé ;
- Aspiration bronchique ;
- Aspiration nasopharyngée ;
- Liquide broncho-alvéolaire ;
- Crachat.

Notice d'utilisation EurobioPlex FluCoSyn

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



Ne pas utiliser si l'emballage est edomagé



Conserver à l'abri de la lumière du soleil



Attention

Notice d'utilisation EurobioPlex FluCoSyn

4. Principe

L'EurobioPlex FluCoSyn est un test d'amplification de l'acide ribonucléique (ARN) des virus respiratoires suivants : virus de la grippe (Influenza A et B), virus respiratoire syncytial RSV (A et B), et le virus coronavirus SARS-CoV-2 (une cible dans le gène RdRp, et une autre dans le gène N), basé sur 1 test de RT-PCR multiplex détectant toutes ces cibles virales dans un même puits.

Le kit contient 1 oligomix unique qui permet de détecter ces trois virus, ainsi qu'un contrôle endogène. Celui-ci 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 PCR en trop grande quantité.

Le test est réalisé à partir de l'ARN extrait du prélèvement respiratoire au moyen d'une réaction dans 1 puits/tube.

L'ARN d'Influenza A et B est détecté à l'aide de sondes marquées FAM, l'ARN de RSV A et B est détecté à l'aide d'une sonde marquée HEX, et l'ARN du SARS-CoV-2 est détecté à l'aide de sondes spécifiques pour chaque gène marqué en TEXAS RED. 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.

La mesure de l'intensité de fluorescence en temps réel, émise et mesurée de façon individuelle par un système optique au cours de la PCR, est relative à l'accumulation des produits d'amplification.

Tableau 1 : Détection des cibles selon les fluorophores

Cibles	Fluorophore	Excitation	Emission
Cible 1/ Flu	FAM	495 nm	515 nm
Cible 2/RSV	HEX	535 nm	555 nm
Cible 3/Gènes RdRp1/RdRp2	Texas Red	585 nm	605 nm
Contrôle interne endogène	Cy5	650 nm	670 nm

Notice d'utilisation EurobioPlex FluCoSyn

Canaux équivalents sur différents instruments de PCR:

- Canal **FAM** (Systèmes ABI, SmartCycler II, Systèmes Mx, Chromo4/CFX96™, T-COR 8™-IVD, LC480), Canal Green (RotorGene®), CFX® Opus 96 (Bio-Rad).
- Canal **HEX** (Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx, T-COR 8™-IVD, LC 480), Canal VIC (Systèmes ABI), Canal Alexa532 (SmartCycler II), Canal Yellow (RotorGene), CFX® Opus 96 (Bio-Rad)
- Canal **TEXAS RED** (Systèmes ABI, Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx, T-COR 8™-IVD), LC Red 610 (LC480), Canal Orange (RotorGene), CFX® Opus 96 (Bio-Rad)
- Canal **CY5** (Systèmes ABI, Systèmes Mx, Chromo4/CFX96™, T-COR 8™-IVD, LC480), Canal Alexa647 (SmartCycler II), Canal Red (RotorGene®), CFX® Opus 96 (Bio-Rad).

Note 1: Sur LC480 instrument II : Appliquer une compensation de couleur pour les longueurs d'ondes FAM-HEX/VIC-TexasRed-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 Texas Red et HEX, mais appliquer la Noiseband Fluor manuellement à 0.43 pour Texas Red et 5.5 pour HEX.

5. Composants du kit

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

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

Tableau 2 : Composants du kit

Couleur de Bouchon	Contenu du kit	25 réactions	50 réactions	100 réactions	200 réactions	600 réactions	Reconstitution
Rouge	Enzymes	5x25 µL	10x25 µL	525 µl	800 µl	2 x 1200 µl	Prêt à l'emploi
Transparent	Oligomix	5x20 µL	10x20 µL	420 µl	700 µL	2 x 950 µl	Prêt à l'emploi
Jaune	Contrôle positif CP	5x15 µL	10x15 µL	160 µl	320 µl	320 µl	Prêt à l'emploi
Bleu	Eau = contrôle négatif (CN-H2O)	1500 µL	1500 µL	1500µl	1500 µl	2 x 1500 µl	Prêt à l'emploi

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

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.

Notice d'utilisation EurobioPlex FluCoSyn



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 FluCoSyn 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)
- LightCycler® 480 avec analyse sur LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- T-COR 8®-IVD (Tetracore Inc.) avec T-COR 8 Per-Well SmartCT™ (auto v1) software
- CFX® Opus 96 (Bio-Rad) avec analyse sur Bio-Rad CFX Maestro version 2.2 (Bio-Rad)

9. Mises en garde et précautions



Lire attentivement ces instructions avant de débiter le protocole.

- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée par des techniciens de laboratoire d'analyse de biologie médicale.
- ◇ La réglementation de biosécurité locale et nationale en vigueur pour le dépistage du SARS-CoV-2 doit être suivie scrupuleusement en toute circonstance, notamment dans des laboratoires et avec les équipements de laboratoire en accord.
- ◇ 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.

Notice d'utilisation EurobioPlex FluCoSyn

- ◇ 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 Scientifc.
- ◇ Eviter les cycles de congélation / décongélation des réactifs, cela peut conduire à une baisse de la sensibilité du test.
- ◇ Une fois les réactifs décongelés, centrifuger brièvement les tubes avant leur utilisation.
- ◇ L'utilisation de glace ou d'un bloc réfrigérant est conseillée en cas de longs délais du fait par exemple d'un important nombre d'échantillons à traiter ou de fortes températures.
- ◇ Il est recommandé de définir trois zones de travail distinctes : 1) Isolation de l'ARN, 2) Préparation du mélange réactionnel, et 3) Amplification/Détection des produits amplifiés.
- ◇ Les sondes fluorescentes contenues dans l'oligomix sont sensibles à la lumière. Toute exposition prolongée de l'oligomix à la lumière doit être limitée au temps technique nécessaire à la préparation de la plaque PCR.
- ◇ Il est recommandé d'ouvrir et de manipuler le contrôle positif à l'écart des échantillons biologiques à tester et des autres composants du kit afin d'éviter les contaminations croisées.
- ◇ Porter des blouses et des gants (sans talc) distincts dans chaque zone de travail.
- ◇ Les pipettes, les réactifs et autres matériels de travail ne doivent pas circuler entre ces zones.
- ◇ Une attention particulière doit être mise en œuvre pour conserver la pureté des réactifs et des mélanges réactionnels.
- ◇ Le contrôle interne endogène détecte une cible cellulaire détectable dans tous les échantillons d'origine humaine mais pas dans le contrôle négatif CN-H2O fourni dans la trousse. L'absence de signal au niveau du contrôle négatif permet de prévenir la survenue de contaminations croisées.
- ◇ Des méthodes appropriées de préparation/extraction d'ARN pour une production d'ARN de qualité et une application de RT-PCR doivent être utilisées, notamment afin d'éviter tout risque de contamination avec les RNAses.
- ◇ Utiliser des embouts à filtre pour micropipettes, RNase-free et DNase-free.
- ◇ Ne pas pipeter avec la bouche. Ne pas manger, ni boire ou fumer dans le laboratoire.
- ◇ Eviter les aérosols.

10. Protocole

1.1 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).



Notice d'utilisation EurobioPlex FluCoSyn

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.

1.2 Extraction de l'ARN

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

Dans le kit EurobioPlex FluCoSyn, 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), Microlab Starlet IVD Hamilton, le kit OptiPure Viral Auto Plate (réf : W665A46) et le kit Starmag 96X4.

1.3 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).
Sur T-COR 8®-IVD, ces contrôles doivent être réalisés à minima lors de la première utilisation d'un nouveau kit.

Notice d'utilisation EurobioPlex FluCoSyn

Schéma de la procédure :

1 - PREPARATION MELANGE REACTIONNEL / MASTERMIX

Nombre de réactions	N+3
Mix enzymatique	(N+3) x 3.75 µL
Eau	(N+3) x 3.25 µL
Oligomix	(N+3) x 3 µL
Volume total Mastermix	(N+3) x 10 µL

* N+1 sur T-COR 8²-IVD



2 - PREPARATION DES REACTIONS

Echantillon

10 µL de Mastermix
+
5 µL échantillon ARN

Contrôle Positif

10 µL de Mastermix
+
5µL CP

Contrôle Négatif

10 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

Notice d'utilisation EurobioPlex FluCoSyn

1.4 Protocole détaillé

- 7) 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.
- 8) 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 (*N+1 sur T-COR 8®-IVD).

Nombre de réactions	N+3*
Enzymes	(N+3) x 3.75 µL
Eau	(N+3) x 3.25 µL
Oligomix	(N+3) x 3 µL
Volume total Mastermix	(N+3) x 10 µL

- 3) Homogénéiser le Mastermix préparé en 2) et centrifuger brièvement.
- 4) Distribuer 10 µL de Mastermix à l'aide d'une micropipette et d'embouts à filtre dans des tubes/puits de microplaques indépendants.
- 5) Ajouter 5 µL d'échantillon d'ARN extrait.
- 6) En parallèle réaliser les contrôles suivants :
 - Contrôle positif :
 - 10 µL de Mastermix + 5 µL de CP.
 - Contrôle négatif :
 - 10 µL de Mastermix + 5 µL d'eau fournie (CN-H2O)
- 7) Fermer immédiatement les tubes, ou plaque avec un film adhésif pour éviter toute contamination.
- 8) Centrifuger brièvement pour collecter le mélange réactionnel au fond des tubes ou des puits de microplaque.
- 9) Réaliser le programme suivant sur l'instrument de PCR temps réel.

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

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

Note 2 : 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 3 : Lors de l'analyse sur le logiciel LC480 Software release 1.5.0 , ne pas laisser la Noiseband (Auto) pour les canaux Texas Red et HEX mais appliquer la Noiseband Fluor manuellement à 0.43 pour Texas Red et 5.5 pour HEX.

Notice d'utilisation EurobioPlex FluCoSyn

11. Validation de l'expérimentation

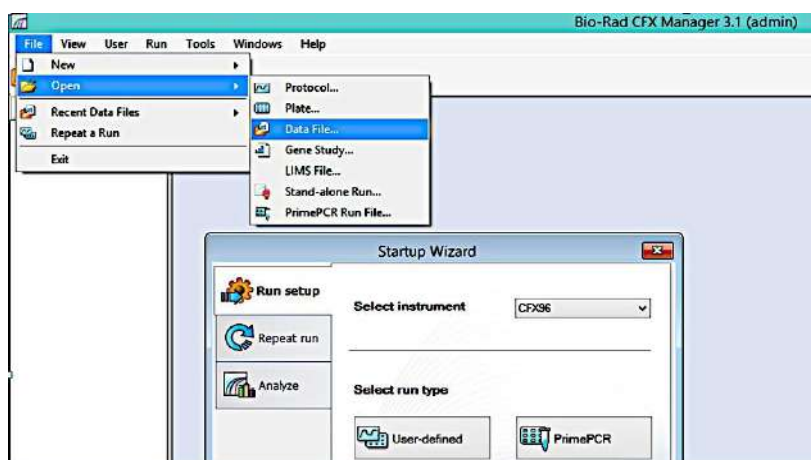
L'analyse des data post-acquisition sur un appareil de PCR CFX96 (Bio-Rad) doit être réalisée à l'aide de la version 3.1 du logiciel CFX Manager (Bio-Rad). Afin de passer sur cette version à partir d'un run lancé sur une version antérieure, veuillez suivre la procédure suivante : à la fin du run, le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

Si un appareil de PCR CFX Opus 96 est utilisé, l'analyse doit être réalisée sur le logiciel CFX Maestro version 2.2. Le reste de l'analyse est identique à celle devant être réalisée avec un CFX96, comme présenté ci-dessous.



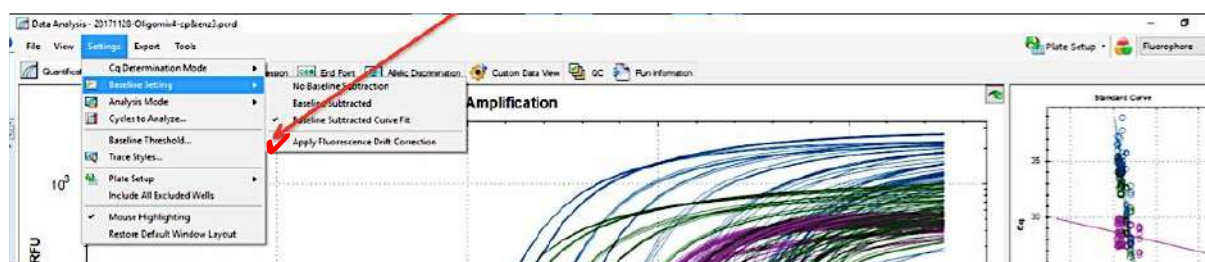
Cliquer sur « File » et sélectionner « Open » puis « Data File ».



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

Notice d'utilisation EurobioPlex FluCoSyn

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 ».



Une fois ces étapes réalisées, l'analyse peut débuter.

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

Tableau 4: Validation du run

Contrôle positif	
FAM	Ct ≤ 30
HEX	Ct ≤ 30
Texas Red	Ct ≤ 30
Cy5	Ct ≤ 30
Contrôle Négatif	
FAM	Ct non déterminé
HEX	Ct non déterminé
Texas Red	Ct non déterminé
Cy5	Ct non déterminé

12. Analyse des données et interprétation

Pour les échantillons cliniques, les résultats suivants sont possibles :



***SARS-CoV-2 (Texas Red), Flu (FAM) ou RSV (HEX): Ct < 40**

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

Notice d'utilisation EurobioPlex FluCoSyn

Tableau 5:

Signal PCR SARS-CoV-2 et/ou Flu et/ou RSV Texas Red et/ou FAM et/ou HEX	Contrôle endogène Cy5	Présence de virus SARS-CoV-2 et/ou Flu et/ou RSV	Validité du test/commentaire
+	+	Oui	VALIDE
-	+	Non	VALIDE
+	-	Oui	VALIDE Possible inhibition de RT-PCR ou problème d'extraction qui n'empêche pas la détection des virus.
-	-	Non Interprétable	Inhibition de RT-PCR ou problème d'extraction → diluer 5 x l'échantillon ; si même résultat, réaliser un nouveau prélèvement et/ou extraire à nouveau l'échantillon

Limites d'utilisation et d'interprétation :

- ❖ Tous les échantillons doivent être traités comme potentiellement infectés par le SARS-CoV-2, et la réglementation locale de biosécurité doit être scrupuleusement suivie.
- ❖ L'interprétation des résultats doit prendre en compte la possibilité de faux négatifs et de faux positifs.

Les faux négatifs peuvent être dus à :

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

Les faux positifs peuvent être dus à :

- Une contamination liée à une mauvaise manipulation d'échantillons fortement positifs, du contrôle positif, ou des produits issus de l'amplification de PCR,
- Un non-respect de la procédure décrite dans ce mode d'emploi, notamment pour éviter toute source de contamination.
- ❖ Tout résultat doit être interprété par du personnel médical dans le contexte clinique du patient, son historique et ses symptômes.

Notice d'utilisation EurobioPlex FluCoSyn

13. Analyse des performances

Limite de détection/sensibilité analytique

Une gamme de dilution a été réalisée à partir d'un mélange plasmidique (CP) allant de 10^5 à 2.5 copies/ μ L. Cette gamme de dilution a été utilisée pour déterminer la limite de détection (à 100% de détection) du kit EurobioPlex FluCoSyn.

De plus, une limite de détection a été déterminée sur le WHO 1st International Standard for SARS-CoV-2 RNA (NIBSC code 21/146) et sur un ARN synthétique de Twist Biosciences.

Limite de détection/sensibilité analytique sur CP :

SARS-CoV-2 : 7.5 copies/ μ L

Influenza/Flu : 5 copies/ μ L

RSV : 5 copies/ μ L

CI Cy5 : 7.5 copies/ μ L

Limite de détection sur le WHO 1st International Standard for SARS-CoV-2 RNA :

SARS-CoV-2: 12.5 copies/ μ L

Limite de détection sur un ARN synthétique (Twist Biosciences, USA) :

SARS-CoV-2: 6.25 copies/ μ L

Etude de sensibilité sur 106 échantillons connus positifs, dilués dans des échantillons connus Négatifs à 3 x LOD: 100 % de sensibilité (détection 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.

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

- Variabilité intra-expérience :

CV moyen intra lot (%)	Gène ctrl endogène	Influenza	RSV	SARS-CoV-2
CFX96	1,62	1,19	1,11	2,39
LC480	1,37	1,09	1,97	1,00
T-COR-8-IVD	2,97	1,94	2,37	1,96
CFX® Opus 96	0.39	0.33	0.76	0.64

Notice d'utilisation EurobioPlex FluCoSyn

CV: coefficient de variation

- Variabilité inter-lots :

CV moyen inter lots (%)	Gène ctrl endogène	Influenza	RSV	SARS-CoV-2
CFX96	2,75	4,06	1,18	4,85
LC480	0,45	1,80	1,95	1,13
T-COR-8-IVD	0,73	1,15	3,20	0,93
CFX® Opus 96	5.75	1.98	1.55	0.92

CV: coefficient de variation

Spécificité diagnostique

Cette validation a porté sur :

- 508 échantillons SARS-CoV-2 négatifs pré-testés et caractérisés négatifs par des tests marqués CE.
- 40 échantillons négatifs pour tous les coronavirus connus, dont des échantillons de panels respiratoires caractérisés pour d'autres virus afin de tester les réactions croisées.
- 3 échantillons positifs pour le CoV NL63, 2 échantillons positifs pour le CoV OC43, 1 échantillon positif pour le CoV 229E et 1 échantillon positif pour le COV HKU1.

Nombre d'échantillons	Echantillon positif pour	Coronavirus	Statut SARS-CoV-2 EBX-042
1	Adenovirus	Négatif	Négatif
5	ParaInfluenza	Négatif	Négatif
1	Rhinovirus	Négatif	Négatif
1	Bocavirus	Négatif	Négatif
2	Legionella pneumoniae	Négatif	Négatif
3	Mycoplasma pneumoniae	Négatif	Négatif
3	Mycoplasma tuberculosis	Négatif	Négatif
2	Bordetella pertussis	Négatif	Négatif
1	Parechovirus Type 1	Négatif	Négatif
1	Parechovirus Type 2	Négatif	Négatif
1	Parechovirus Type 3	Négatif	Négatif
1	Parechovirus Type 4	Négatif	Négatif

Notice d'utilisation EurobioPlex FluCoSyn

Nombre d'échantillons	Echantillon positif pour	Coronavirus	Statut SARS-CoV-2 EBX-042
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/mi-	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 HKU1	Positif	Négatif
1	Metapneumovirus	Positif	Négatif
1	Human papillomavirus	Positif	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 :

555 échantillons négatifs	
508 échantillons SARS-CoV-2 négatifs	Caractérisés avec le kit EBX-041 marqué CE-IVD
47 échantillons respiratoires positifs	RSV-A/B, Parainfluenzae, Rhinovirus, Metapneumovirus, CoV NL63, CoV OC43, CoV 229E, CoV KU1

Notice d'utilisation EurobioPlex FluCoSyn

335 échantillons positifs	
269 échantillons SARS-CoV-2 positifs	Caractérisés avec le kit EBX-041 CE-IVD
29 échantillons VRS positifs	Caractérisés avec le kit Seegene Allplex SARS-Cov-2 Flu A / Flu B RSV Assay
37 échantillons Influenza positifs	Caractérisés avec le kit Seegene Allplex SARS-Cov-2 Flu A / Flu B RSV Assay

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).

Les performances globales sont les suivantes :

		EBX-042		
		Flu		
		POSITIFS	NEGATIFS	TOTAL
Pretestés	POSITIFS	34	0	34
	NEGATIFS	3	806	809
		RSV		
		POSITIFS	NEGATIFS	TOTAL
Pretestés	POSITIFS	29	0	29
	NEGATIFS	0	814	814
		SARS-CoV-2		
		POSITIFS	NEGATIFS	TOTAL
Pretestés	POSITIFS	269	0	269
	NEGATIFS	0	574	574

	Sensibilité %	Spécificité %	Concordance %
FLU	92	> 99	> 99

Notice d'utilisation EurobioPlex FluCoSyn

	Sensibilité %	Spécificité %	Concordance %
RSV	> 99	> 99	> 99
SARS-Cov-2	> 99	> 99	> 99

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-042, 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-042 Pos Ctrl),
 - soit pour le contrôle négatif (Code-barre EBX-042 Neg Ctrl),

Notice d'utilisation EurobioPlex FluCoSyn

- soit pour un échantillon (Code-Barre EBX-042)

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

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

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

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

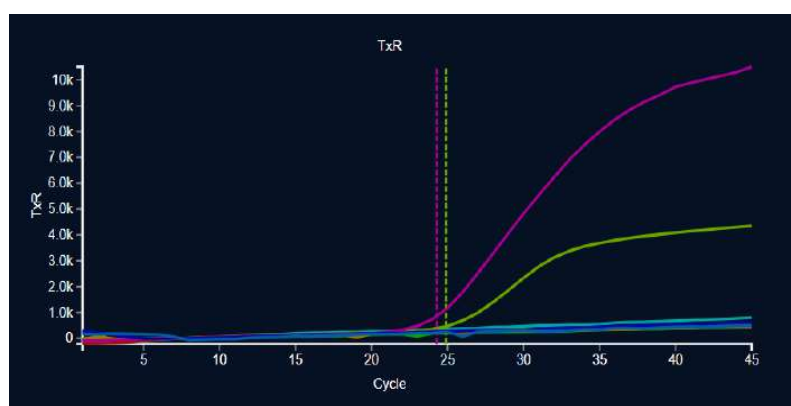
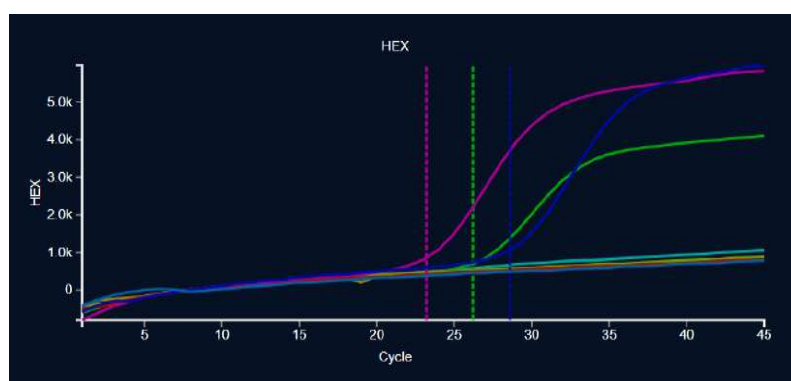
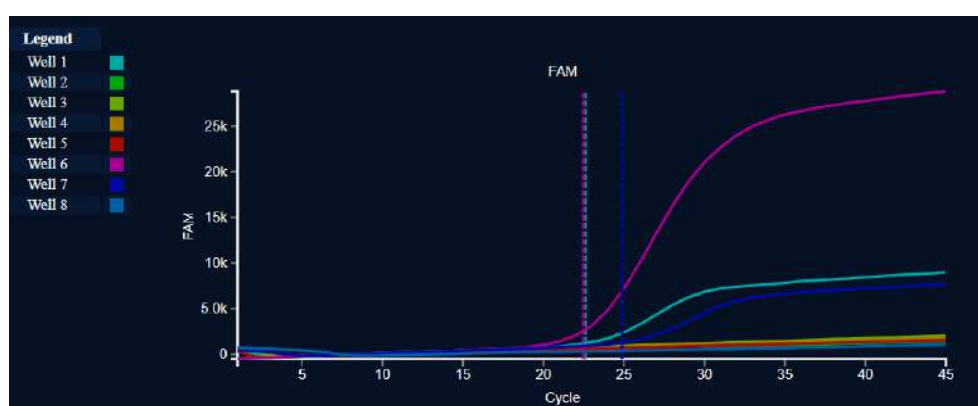
Exemple de présentation d'interprétation automatique des résultats

Notice d'utilisation EurobioPlex FluCoSyn

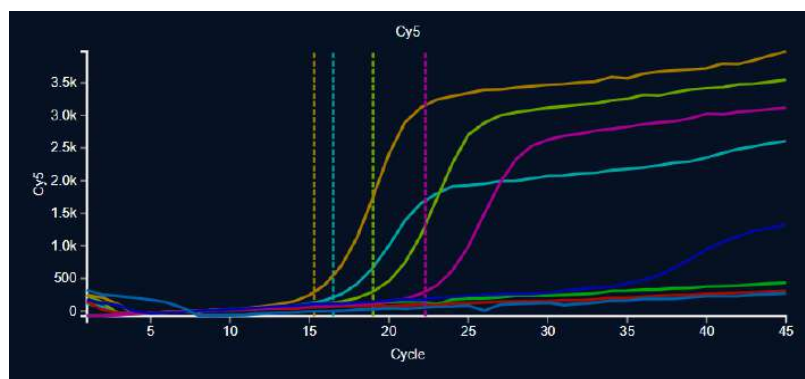
Summary						
Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5
1	Sample 1	EBX-042	22.6			16.5
2	Sample 2	EBX-042		26.2		
3	Sample 3	EBX-042		24.9	19.0	
4	Sample 4	EBX-042			15.3	
5	Sample 5	EBX-042				
6	Ctrl pos	EBX-042 Pos Ctrl	22.5	23.2	24.3	22.3
7	Ctrl pos	EBX-042 Pos Ctrl	24.9	28.6		
8	Ctrl neg	EBX-042 Neg Ctrl				

Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5	Call	Note
1	Sample 1	EBX-042	22.6			16.5	Detected • Influenza	RSV, SARS-CoV-2 negative
2	Sample 2	EBX-042		26.2			Detected • RSV	Retest for Influenza, SARS-CoV-2
3	Sample 3	EBX-042		24.9	19.0		Detected • SARS-CoV-2	Influenza, RSV negative
4	Sample 4	EBX-042			15.3		Not Detected	Influenza, RSV, SARS-CoV-2 negative
5	Sample 5	EBX-042					Invalid	Retest
6	Ctrl pos	EBX-042 Pos Ctrl	22.5	23.2	24.3	22.3	Detected • Pos Ctrl	Pos Ctrl Valid
7	Ctrl pos	EBX-042 Pos Ctrl	24.9	28.6			Invalid	Pos Ctrl Fail
8	Ctrl neg	EBX-042 Neg Ctrl					Detected • Neg Ctrl	Neg Ctrl Valid

Exemple de courbes d'amplification

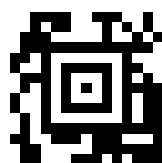


Notice d'utilisation EurobioPlex FluCoSyn

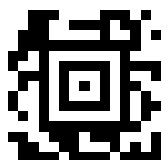


Codes-Barres sur T-COR8®-IVD pour EBX-042

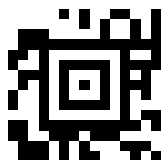
EBX-042 Pos Ctrl
Contrôle Positif CP



EBX-042 Neg Ctrl
Eau = contrôle négatif (CN-H2O)



EBX-042



14. Bibliographie

Xiaojing Wu, Ying Cai, Xu Huang, Xin Yu, Li Zhao, Fan Wang, Quanguo Li, Sichao Gu, Teng Xu, Yongjun Li, Binghuai Lu, Qingyuan Zhan, Co-infection with SARS-CoV-2 and Influenza A Virus in Patient with Pneumonia, China, Emerg Infect Dis. 2020 Jun;26(6):1324-1326.

Notice d'utilisation EurobioPlex FluCoSyn

Yan Li, Jiangshan Wang, Chunting Wang, Qiwen Yang, Yingchun Xu, Jun Xu, Yi Li Xuezhong Yu, Huadong Zhu, Jihai Liu Characteristics of respiratory virus infection during the outbreak of 2019 novel coronavirus in Beijing. *Int J Infect Dis.* 2020 Jul;96:266-269.

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 Wuhan. *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.

15. Contrôle qualité

Conformément au système de management de la qualité d'Eurobio, certifié ISO EN 13485, chaque lot de EurobioPlex SARS-CoV-2 Fast-SVT 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.

Notice d'utilisation EurobioPlex FluCoSyn

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)1.69.79.64.80.



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