



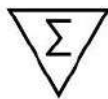
EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

RT-PCR EN TEMPS REEL

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

REF

EBX-043-25
EBX-043-50
EBX-043-100
EBX-043-200
EBX-043-600



25/50/100/200/600



Version 2.00 du 17/02/2023

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 (Tetracore Inc.) avec T-COR 8 Per-Well SmartCT™ (auto v1) software
- MIC® (Bio Molecular Systems) avec analyse sur le MIC software version 2.12.6

Conditions de stockage:

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



Instruction d'utilisation
Disponible sur www.eurobio-scientific.com

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

Table des matières

1.	Informations générales.....	3
2.	Destination du dispositif.....	4
3.	Symboles.....	5
4.	Principe	6
5.	Composants du kit.....	7
6.	Conservation et stockage	8
7.	Matériel requis non fournis.....	8
8.	Instrument de PCR en temps réel.....	8
9.	Mises en garde et précautions	8
10.	Protocole	10
11.	Validation de l'expérimentation.....	14
12.	Analyse des données et interprétation	15
13.	Analyse des performances	17
14.	Bibliographie.....	21
15.	Contrôle qualité.....	28
16.	Elimination des déchets	28
17.	Déclaration d'incident	28
18.	Assistance technique.....	28

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

1. Informations générales

Les virus de la grippe A et B appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae*. Le virus SARS-CoV-2 appartient à la famille des *Coronaviridae* et au sous-genre *Sarbecovirus*. Ce dernier apparu 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. 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 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-043 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.

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

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-043.

2. Destination du dispositif

L'EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2 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 :

- Virus de la grippe A (Influenza A ou Flu A),
- Virus de la grippe B (Influenza B ou Flu B),
- SARS-CoV-2, virus émergent, apparu en Chine fin 2019 dans la ville de Wuhan.

L'EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2 a été conçu pour détecter les virus de la grippe A et B sans différencier les sous-types de virus de type A H1N1 et H3N2, 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 IP2 (RdRp2) et l'autre dans le gène IP4 (RdRp).

Le test est indiqué pour 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 deux virus de la grippe. 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 EBX-043. Il revient à l'utilisateur d'utiliser des méthodes d'extraction adaptées aux prélèvements testés.

Le test EurobioPlex EBX-043 est un dispositif médical de diagnostic *In Vitro*, il doit être utilisé par du personnel de laboratoire d'analyse de biologie médicale qualifié.

Le kit est validé sur le type de prélèvement écouvillon nasopharyngé.

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 endommagé



Conserver à l'abri de la lumière du soleil



Attention

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

4. Principe

L'EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2 est un test d'amplification de l'acide ribonucléique (ARN) des virus responsables de la grippe A, grippe B et du SARS-CoV-2 basé sur 1 test de RT-PCR multiplex (1 gène cible pour le virus de la grippe A, 1 gène cible pour le virus de la grippe B et deux gènes cibles pour le SARS-CoV-2 : gènes RdRp et RdRp2) dans un même puits.

Le kit contient 1 oligomix pour détecter les 3 cibles, ainsi qu'un contrôle endogène.

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.

Le test est réalisé à partir de l'ARN extrait de prélèvement au moyen d'une réaction dans 1 puits/tube. L'ARN du virus de la grippe A est détecté à l'aide d'une sonde marquée en FAM. Celui du virus de la grippe B est détecté à l'aide d'une sonde marquée en HEX. Enfin, l'ARN du SARS-CoV-2 est détecté à l'aide de sondes spécifiques pour chaque gène (RdRp et RdRp2) 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

Virus	Fluorophore	Excitation	Emission
Cible 1/ Flu A	FAM	495 nm	515 nm
Cible 2/ Flu B	HEX	535 nm	555 nm
Cible 3/ Gènes RdRp1/RdRp2	TEXAS RED	585 nm	605 nm
Contrôle Endogène	CY5	650 nm	670 nm

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

Canaux équivalents sur différents instruments de PCR:

- Canal **FAM** (Systèmes ABI, SmartCycler II, Systèmes Mx, CFX96™/Chromo4, T-COR8-IVD, LC480), Canal Green (RotorGene), Canal Green (MIC).
- Canal **HEX** (Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx, T-COR 8-IVD, LC480), Canal VIC (Systèmes ABI), Canal Alexa532 (SmartCycler II), Canal Yellow (RotorGene), Canal Yellow (MIC).
- Canal **Texas Red** (Systèmes ABI, Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx, T-COR 8-IVD), LC Red 610 (LC480), Canal Orange (RotorGene), Canal Orange (MIC).
- Canal **Cy5** (CFX96™/Chromo4, Systèmes ABI, Systèmes Mx, T-COR8-IVD, LC 480), Canal Alexa647 (SmartCycler II), Canal Rouge (RotorGene), Canal Rouge (MIC).

Note 1: Sur le LC480, appliquer la compensation de couleur pour les canaux suivants : FAM/HEX-VIC/Texas Red/Cy5 (FAM : 483-533 / HEX-VIC : 523-568 / Texas Red : 558-610 / Cy5 : 615-670).

Note 2: Pendant l'analyse avec le logiciel LC480 version 1.5.0, ne pas laisser Noiseband Auto sur les canaux Texas Red et HEX, mais appliquer la Noiseband Fluor manuellement à 0.43 pour Texas Red et 5.5 pour HEX (l'opérateur doit ajuster la ligne de base).

5. Composants du kit

Le kit de RT-PCR en temps réel EBX-043 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

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

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 Flu-A/Flu-B/SARS-CoV-2 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 (Tetacore Inc.) avec T-COR 8 Per-Well SmartCT™ (auto v1) software
- MIC® (Bio Molecular Systems) avec analyse sur le MIC software version 2.12.6

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.

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

- ◇ 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 Scientifique.
- ◇ 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.

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

- ◇ 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).
- ◇ Les références bibliographiques dans la section « 14. Bibliographie » fournissent des données indicatives sur la stabilité des échantillons et des ARNs.

Tableau 3 : Recommandations de stockage avant utilisation

Recommandations de stockage maximum des échantillons avant extraction	
Température ambiante	2 h
+2°C/+8°C	5 jours
<-70°C (préféré par rapport à -20°C)	Stockage à long terme (>5 jours et maximum 2 mois à -20°C)

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 : https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2010-02/cryopreservation_-_recommandations.pdf ◇ Les ARN extraits doivent être stockés à <-70°C. Au-delà d'une année de stockage des ARNs à <-70°C, les Ct obtenus peuvent augmenter. Il est conseillé de ré-extraire un échantillon biologique stocké depuis plus d'un an. Il est conseillé de limiter à 3 le nombre de décongélation des ARNs. ◇ 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. Pour le présent coffret, nous recommandons d'utiliser des méthodes d'extraction d'ARN de virus adaptés aux prélèvements respiratoires, et de se référer aux instructions du fournisseur du kit d'extraction utilisé.

Dans le kit EBX-043, 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.

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

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

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 8⁺-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

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

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 (*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.

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

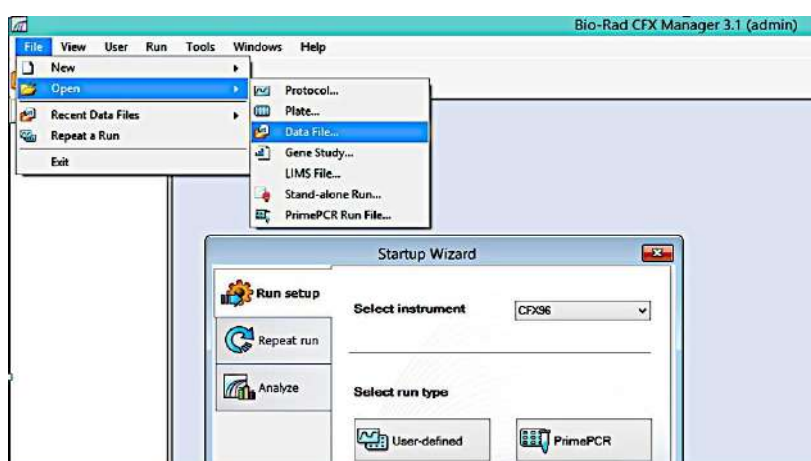
11. Validation de l'expérimentation

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.



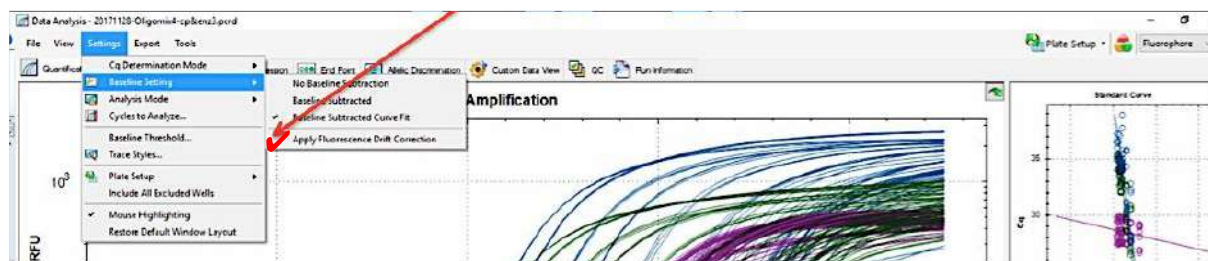
Cliquer sur « File » et sélectionner « Open » puis « Data File ».



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

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

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 A (FAM) ou Flu B (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.

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

Tableau 5:

Signal PCR SARS-CoV-2 et/ou Flu A et/ou Flu B Texas Red et/ou FAM et/ou HEX	Contrôle endogène Cy5	Présence de virus SARS-CoV-2 et/ou Flu A et/ou Flu B	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 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.

EurobioPlex Flu A/Flu B/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 (CP) allant de 10^5 à 1 copie/ μ L. Cette gamme de dilution a été utilisée pour déterminer la limite de détection (à 100% de détection) du kit EBX-043.

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.

Enfin, la limite de détection a été vérifiée sur un plasmide qui mime la séquence d'un sous-type H3N2 qui a émergé au Danemark en mars 2022 et dont les mutations altèrent l'efficacité du système de détection habituellement utilisé sur le gène M.

Jørgensen RL, Lerche CJ, Pedersen MS, Kirkby NS, Botnen AB, Trebbien R, Nilsson-Møller S, Pinholt M, Nielsen ACY, Westh H, Lisby JG, Schneider UV. Emergence of circulating influenza A H3N2 viruses with genetic drift in the matrix gene: be alert of false-negative test results. APMIS. 2022 Oct;130(10):612-617. doi: 10.1111/apm.13262. Epub 2022 Aug 10. PMID: 35836366; PMCID: PMC9544743.

Notre système d'amorces et sonde utilisé pour la détection de la grippe A cible un amplicon proche mais décalé par rapport au design décrit dans l'article de Jørgensen.

Limite de détection/sensibilité analytique sur CP :

SARS-CoV-2 : 10 copies/ μ L

Flu A : 5 copies/ μ L

Flu B : 50 copies/ μ L

CI Cy5 : 50 copies/ μ L

Limite de détection sur le WHO 1st International Standard for SARS-CoV-2 RNA (cut-off 95%) :

SARS-CoV-2: 5.31 copies/ μ L

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

SARS-CoV-2: 12.5 copies/ μ L

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

Limite de détection/sensibilité analytique sur plasmide mimant le Variant Danois (Grippe A H3N2) :

SARS-CoV-2 : 10 copies/μL

Flu A : 10 copies/μL

Flu B : 50 copies/μL

CI Cy5 : 50 copies/μL

Etude de sensibilité sur 107 échantillons connus positifs, dilués dans des échantillons connus Négatifs à 3 x LOD: 100 % de sensibilité (détection de 107 échantillons / 107)

- **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 (%)	Flu A	Flu B	SARS-CoV-2	Gène ctrl endogène
CFX96™	0,26	0,67	0,52	1,11
T-COR-8®-IVD	1,67	1,40	1,18	1,58
LC480®	0,25	0,56	0,50	0,25
MIC®	3,20	0,39	1,26	2,12

CV: coefficient de variation

- Variabilité inter-lots :

CV moyen inter lots (%)	Flu A	Flu B	SARS-CoV-2	Gène ctrl endogène
CFX96™	0,68	0,81	1,14	3,71
T-COR-8® IVD	3,44	3,17	1,09	2,80
LC480®	1,42	1,06	1,03	0,94
MIC®	2,66	4,77	5,78	6,98

CV: coefficient de variation

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

Spécificité diagnostique

Cette validation a porté sur :

- 505 échantillons SARS-CoV-2 négatifs pré-testés et caractérisés négatifs par des tests marqués CE.
- 32 échantillons négatifs pour tous les coronavirus connus, dont des échantillons de panels respiratoires caractérisés pour d'autres virus afin de tester les réactions croisées.
- 1 échantillon positif pour le CoV NL63.

Nombre d'échantillons	Echantillon positif pour	Coronavirus	Statut SARS-CoV-2 EBX-043
3	Adenovirus	Négatif	Négatif
2	Parainfluenzae	Négatif	Négatif
7	Rhinovirus	Négatif	Négatif
1	Legionella pneumoniae	Négatif	Négatif
1	Mycoplasma pneumoniae	Négatif	Négatif
3	Mycoplasma tuberculosis	Négatif	Négatif
1	ParaInfluenza Type 4	Négatif	Négatif
3	Enterovirus	Négatif	Négatif
3	Streptococcus pneumoniae	Négatif	Négatif
1	Staph.epiderm/oralis/mitis/sanguis	Négatif	Négatif
2	Candida albicans	Négatif	Négatif
2	Pseudomonas aeruginosa	Négatif	Négatif
1	CoV NL63	Positif	Négatif
3	VRS	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.

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

Sensibilité et spécificité diagnostique

La validation des performances a porté sur :

538 échantillons négatifs	
505 échantillons SARS-CoV-2 négatifs	Caractérisés avec le kit EBX-041 marqué CE-IVD
33 échantillons respiratoires positifs	RSV-A/B, Parainfluenzae, Rhinovirus, Metapneumovirus, CoV NL63
305 échantillons positifs	
140 échantillons SARS-CoV-2 positifs	Caractérisés avec le kit EBX-041 CE-IVD
59 échantillons grippe B positifs	Caractérisés avec le kit Seegene Allplex SARS-Cov-2 Flu A / Flu B RSV Assay
106 échantillons grippe A 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-043		
		Flu A		
		POSITIFS	NEGATIFS	TOTAL
Pretestés	POSITIFS	106	0	106
	NEGATIFS	2	707	709
		Flu B		
		POSITIFS	NEGATIFS	TOTAL
Pretestés	POSITIFS	59	0	59
	NEGATIFS	3	753	756
		SARS-CoV-2		
		POSITIFS	NEGATIFS	TOTAL

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

Pretestés	POSITIFS	140	0	140
	NEGATIFS	0	505	505

	Sensibilité %	Spécificité %	Concordance %
FLU A	> 98%	> 99%	> 99%
FLU B	95.16%	> 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.

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

Pour tous les EBX, dont EBX-043, 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-Barres désiré :

- soit pour le contrôle positif (Code-barres EBX-043 Pos Ctrl),
- soit pour le contrôle négatif (Code-barres EBX-043 Neg Ctrl),
- soit pour un échantillon (Code-Barres EBX-043)

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.

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

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

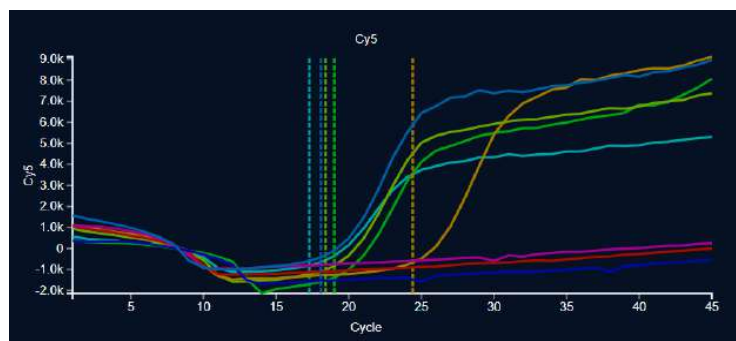
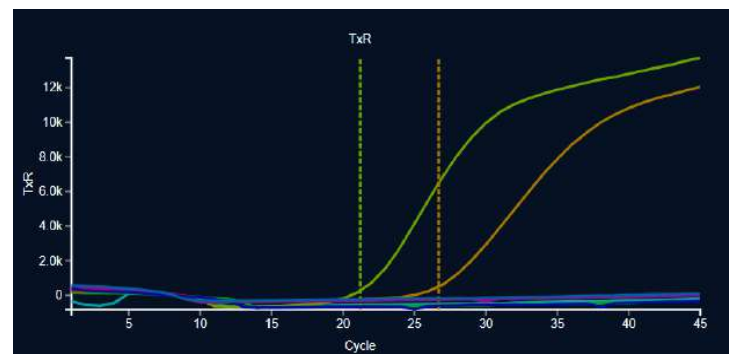
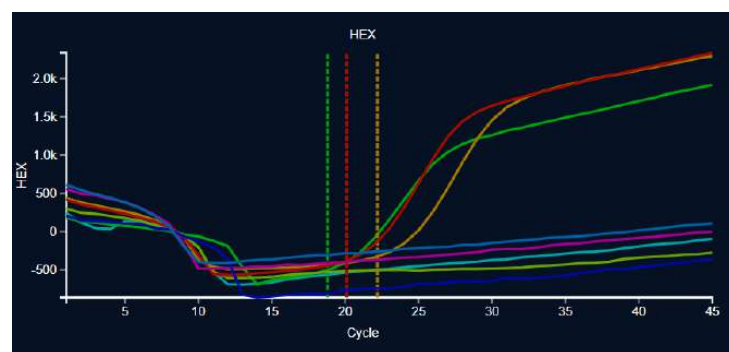
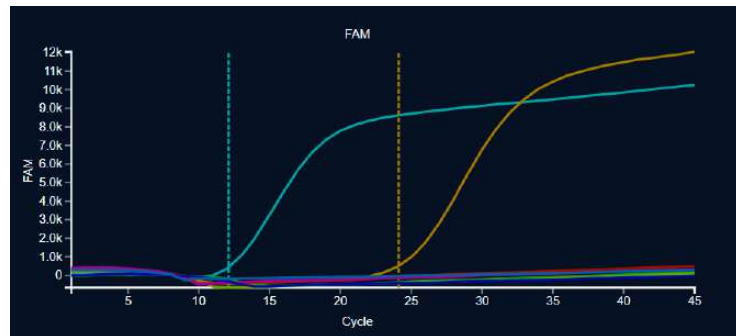
« Non Valide / Invalid » : Résultat non valide -> retester -> encadré jaune

Summary									
Well	Sample	Assay	FAM HEX TxR Cy5				Call	Note	
1	Sample 1	EBX-043	12.1		17.3		Detected • FLUA	FLUB, SARS-CoV-2 Negative	
2	Sample 2	EBX-043	18.8		19.0		Detected • FLUB	FLUA, SARS-CoV-2 Negative	
3	Sample 3	EBX-043	21.2		18.4		Detected • SARS-CoV-2	FLUA, FLUB Negative	
4	Ctlr POS	EBX-043 Pos Ctrl	24.1	22.2	26.7	24.4	Detected • Pos Ctrl	Pos Ctrl Valid	
5	Ctlr POS	EBX-043 Pos Ctrl	20.1				Invalid	Pos Ctrl Fail	
6	Ctlr NEG	EBX-043 Neg Ctrl					Detected • Neg Ctrl	Neg Ctrl Valid	
7	Sample 4	EBX-043					Invalid	Retest	
8	Sample 5	EBX-043			18.1		Not Detected	FLUA, FLUB, SARS-CoV-2 Negative	

Exemple de présentation d'interprétation automatique des résultats

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

Exemple de courbes d'amplification

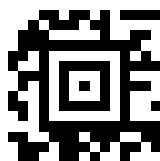


EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

Codes-Barres sur T-COR8®-IVD pour EBX-043

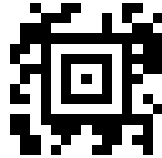
EBX-043 Pos Ctrl

Contrôle Positif CP

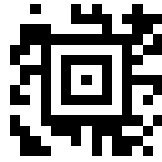


EBX-043 Neg Ctrl

Eau = contrôle négatif (CN-H2O)



EBX-043



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.

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.

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

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.

Jørgensen RL, Lerche CJ, Pedersen MS, Kirkby NS, Botnen AB, Trebbien R, Nilsson-Møller S, Pinholt M, Nielsen ACY, Westh H, Lisby JG, Schneider UV. Emergence of circulating influenza A H3N2 viruses with genetic drift in the matrix gene: be alert of false-negative test results. APMIS. 2022 Oct;130(10):612-617. doi: 10.1111/apm.13262. Epub 2022 Aug 10. PMID: 35836366; PMCID: PMC9544743.

15. Contrôle qualité

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

16. Elimination des déchets

Éliminer 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.

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.

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

[Suivi des modifications](#)

Date de la révision	Version	Révision
17/02/2023	2.00	Etude clinique supplémentaire sur des échantillons de grippe A et B. Validation de l'EBX-043 sur un nouvel instrument : MIC®. Etude sur le nouveau variant danois pour la grippe AH3N2.
03/05/2022	1.00	Création



7, avenue de Scandinavie
91940 Les Ulis Cedex
FRANCE



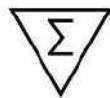
EurobioPlex Flu A/Flu B/ SARS-CoV-2

REAL-TIME RT-PCR

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

REF

EBX-043-25
EBX-043-50
EBX-043-100
EBX-043-200
EBX-043-600



25/50/100/200/600 reactions



Version 2.00 of 2023/02/17

Validated on:

- 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 SmartCT™ (auto v1) software
- MIC® (Bio Molecular Systems) with analysis on MIC software version 2.12.6

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

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

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	36
6. Storage.....	36
7. Materials required not provided	37
8. Real-time PCR instrument	37
9. Cautions and note	37
10. Procedure	38
11. Validation of the experiment	43
12. Data analysis and interpretation	45
13. Performance analysis	46
14. Bibliography.....	53
15. Quality control.....	53
16. Waste disposal.....	54
17. Incident report.....	57
18. Technical assistance	57

1. Introduction

Influenza A and B viruses belong to the Orthomyxoviridae family. The SARS-Cov-2 virus belongs to the family Coronaviridae and the subgenus Sarbecovirus. The latter appeared in China at the end of 2019, in the city of Wuhan, is the cause of an unprecedented global pandemic in the first half of 2020. All three are RNA viruses, of human-to-human transmission infecting mainly the lungs and respiratory tract (cough droplets and sneezes of infected subjects).

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

These 3 viruses are a major public health problem worldwide (morbidity rate, and health and social costs). They occur seasonally, essentially in the fall and winter. Influenza induces epidemics, which can have serious consequences, particularly in the elderly. SARS-CoV-2 is at the origin of a pandemic. Clinical signs usually disappear after a few days of evolution, but the clinical picture is variable, commonly covering an influenza-like syndrome with fever, headache, cough, runny nose, pharyngitis, myalgia, asthenia, respiratory difficulty, but in the most severe cases, complications occur (pneumonia, severe respiratory syndrome, dehydration) and can be fatal. Antivirals are currently available for influenza but not for SARS-Cov-2, whose treatment and prophylaxis are under study worldwide. To date, only the annual influenza vaccine has a Marketing Authorization.

In July 2020, the case fatality rate associated with SARS-CoV-2 in France is between 0.5% and 1% according to the WHO, which is well above that of seasonal influenza (0.1%), but in no way comparable 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 SARS-CoV-2 pandemic is very active in the Americas, 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 usually diagnosed clinically based on symptoms and local epidemiology. All 3 types of viruses detected by EBX-043 circulate at the same time. Although the specific pathogens cause characteristic clinical manifestations, each can cause numerous viral respiratory tract syndromes, with varying degrees of severity depending on the host. In addition, the therapeutic management is different depending on the viruses responsible for the infection. It is therefore essential to be able to differentiate which type of virus is responsible for the observed symptomatology, in the context of epidemics and pandemics, which is what EBX-043 allows.

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

2. Purpose of the system

The EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2 is a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay in RNA nucleic acid extract for in vitro use, designed for the detection of the following respiratory viruses:

- Influenza A virus (Influenza A or Flu A),
- Influenza B virus (Influenza B or Flu B),
- SARS-CoV-2, an emerging virus that appeared in China in late 2019 in the city of Wuhan.

The EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2 has been designed to detect influenza A and B viruses without differentiating between the A H1N1 and H3N2 virus subtypes, as well as all SARS-CoV-2 sequences known to date, by in silico alignment, notably allowing the exclusion of other benign coronaviruses and SARS-CoV-1 or MERS. The determination of the SARS-CoV-2 status is based on the detection of 2 targets coupled to the same fluorophore: one in the IP2 gene (RdRp2) and the other in the IP4 gene (RdRp).

The test is indicated to make a presumptive diagnosis of infection by these three viruses or to complete a proven or undetermined diagnosis, by specifically distinguishing the SARS-CoV-2 coronavirus from the two influenza viruses. The diagnosis should always be made by medical personnel and in the clinical, historical and symptomatic context of the patient.

The RNA extract of any respiratory specimen is the starting material for the EurobioPlex EBX-043 kit. It is the responsibility of the user to use extraction methods appropriate for the specimens tested.

The EurobioPlex EBX-043 test is an in vitro diagnostic medical device and must be used by qualified medical laboratory personnel.

The kit is validated on Nasopharyngeal swab.

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

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

4. Principle of detection

The EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2 is a test for the amplification of ribonucleic acid (RNA) of viruses responsible for influenza A, influenza B and SARS-CoV-2 based on 1 multiplex RT-PCR assay (1 target gene for influenza A virus, 1 target gene for influenza B virus and two target genes for SARS-CoV-2: genes RdRp and RdRp2) in a single well.

The kit contains 1 oligomix to detect the 3 targets, as well as an endogenous control.

The presence of a human housekeeping gene serving as a control for the quality of the sample, for RNA extraction and RT-PCR inhibition allows to determine possible variations that may occur during the steps of RNA extraction from biologic samples and amplification by real-time RT-PCR. It ensures that a negative result cannot be due to poor RNA extraction and/or the presence of too many RT-PCR inhibitors.

The test is performed on RNA extracted from samples using a 1-well/tube reaction. Influenza A virus RNA is detected using a FAM-labeled probe. Influenza B virus RNA is detected using a HEX-labeled probe. Finally, the RNA of SARS-CoV-2 is detected using specific probes for each gene (RdRp and RdRp2) labeled in TEXAS RED. Endogenous control is detected using a CY5-labeled probe. During the elongation of the amplification product, the probes emit a specific fluorescence following their hydrolysis. The measurement of fluorescence intensity in real time is relative to the accumulation of amplification products.

Table 1: Detection of targets by fluorophores

Targets	Fluorophore	Excitation	Emission
Target 1 / Flu A	FAM	495 nm	515 nm
Target 2 / Flu B	HEX	535 nm	555 nm
Target 3 / RdRP1/RdRP2 genes	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), Channel Green (MIC).

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

- Channel **HEX** (Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx, T-COR 8-IVD, LC480), Canal VIC (Systèmes ABI), Canal Alexa532 (SmartCycler II), Canal Yellow (RotorGene), Yellow Channel (MIC).
- Channel **Texas Red** (Systems ABI, Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx, T-COR 8-IVD), LC Red 610 (LC480), Canal Orange (RotorGene), Orange Channel (MIC).
- Channel **Cy5** (CFX96™/Chromo4, Systems ABI, Systems Mx, T-COR8-IVD, LC 480), Channel Alexa647 (SmartCycler II), Channel Red (RotorGene), Red Channel (MIC).

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 EBX-043 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 fluorimeter 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-H ₂ O)	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.



EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

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 EBX-043 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 (Tetradcore Inc.) with T-COR 8 Per-Well SmartCTM (auto v1) software
- MIC® (Bio Molecular Systems) with analysis on MIC software version 2.12.6

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.

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

- ◇ 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.
- ◇ 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

10.1 Samples collection

- ◇ Collect samples in sterile tubes.



EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

- ◇ 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 be extracted immediately, or stored according to sample storage recommendations prior to extraction (Table 3).
- ◇ The bibliographic references in section "14. Bibliography" provide indicative data on the stability of samples and RNAs.

Table 3: Storage recommendations before use

Recommendations for maximum storage of samples before extraction	
Ambient temperature	2 hrs
+2°C/+8°C	5 days
<-70°C (preferred to -20°C)	Long term storage (>5 days and maximum 2 months at -20°C)

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 : https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2010-02/cryopreservation_-_recommandations.pdf ◇ Extracted RNAs should be stored at <-70°C. After one year of storage of RNAs at <-70°C, the Ct obtained may increase. It is advisable to re-extract a biology sample that has been stored for more than one year. It is advisable to limit the number of times RNAs are thawed to 3. ◇ Transportation of clinical samples is subject to local regulations for the transportation of infectious agents.

10.2 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-043 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

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

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), Microlab Starlet IVD Hamilton, the OptiPure Viral Auto Plate kit (ref: W665A46) and the Starmag 96X4 kit.

10.3 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).

On T-COR 8®-IVD, these controls must be performed at least the first time a new kit is used.

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

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	-

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

	58°C	10 sec		Acquisition of fluorescence
--	------	--------	--	-----------------------------

10.4 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

- 3) Homogenise the Mastermix prepared in 2) and centrifuge briefly
- 4) Dispense 10 µL of Mastermix into separate microplate tubes/wells using a micropipette and filter tips.
- 5) Add 5 µL of extracted RNA sample.
- 6) In parallel perform the following controls:
 - Positive Control:
 - 10 µL of Mastermix + 5 µL of CP.
 - Negative Control:
 - 10 µL of Mastermix + 5 µL supplied water (CN-H2O).
- 7) Immediately close the tubes, or plate with an adhesive film to avoid contamination.
- 8) Centrifuge briefly to collect the reaction mixture at the bottom of the tubes or microplate wells.
- 9) Run the following program on the real-time PCR instrument.

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

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.**

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

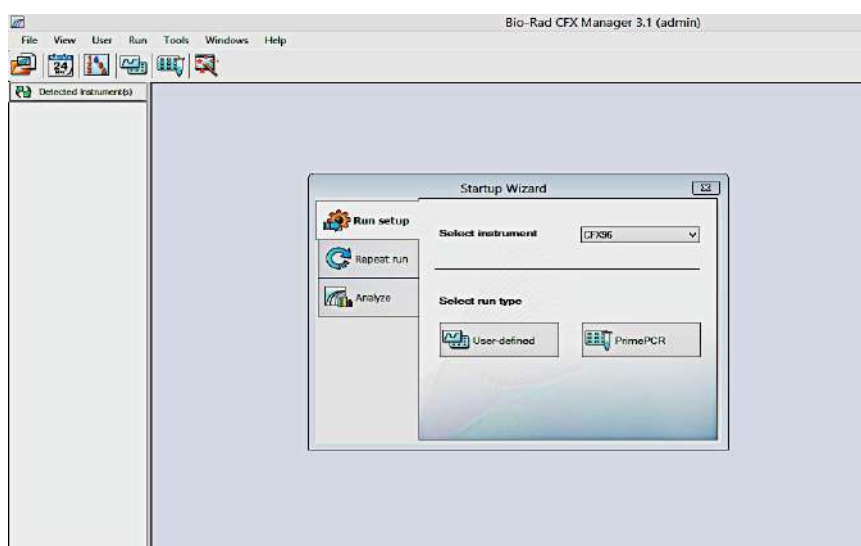
Note 2: On LightCycler® 480 (Roche), apply color compensation for the following channels: FAM/HEX-VIC/Texas Red/Cy5 (FAM : 483-533 / HEX-VIC : 523-568 /Texas Red : 558-610 / Cy5 : 615-670).

Note 3: When analyzing on LC480 Software release 1.5.0, do not leave the Noiseband (Auto) for Texas Red and HEX channels but apply the Fluor Noiseband manually at 0.43 for Texas Red and 5.5 for HEX.

11 Validation of the experiment

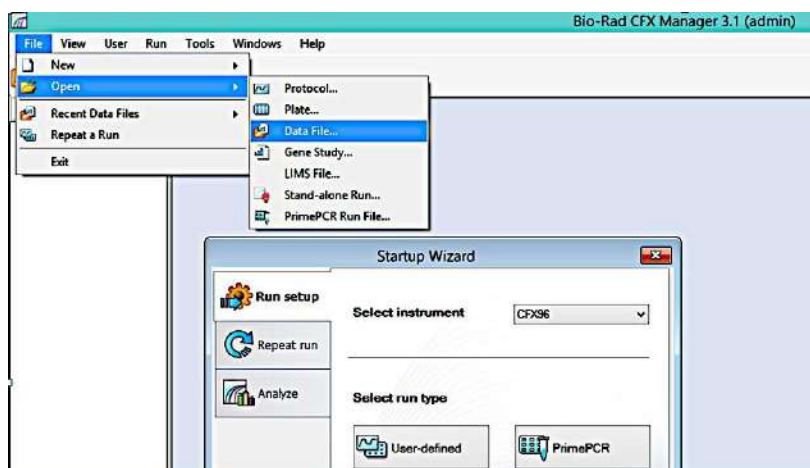
Post-acquisition data analysis on a CFX96 PCR instrument (Bio-Rad) must be performed using version 3.1 of the CFX Manager software (Bio-Rad). In order to change to this version from a run started on an earlier version, please follow the procedure below: At the end of the run, the data file with the extension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



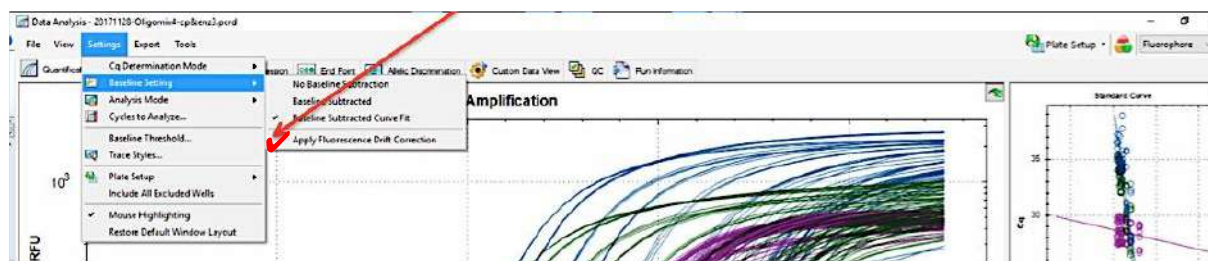
Click on "File" and select "Open" then "Data File".

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2



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

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

Cy5	Undetermined Ct
-----	-----------------

12 Data analysis and interpretation

For clinical samples, the following results are possible:

 *SARS-CoV-2 (Texas Red), Flu A (FAM) or Flu B (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.

Table 5:

PCR Signal Flu A and/or Flu B and/or SARS-CoV-2	Endogenous control	Presence of virus	Test validity/comment
FAM and/or HEX and/or Texas Red	Cy5	Flu A and/or Flu B and/or SARS-CoV-2	
+	+	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 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:

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

- 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-043 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.

Finally, the detection limit was verified on a plasmid that mimics the sequence of an H3N2 subtype that emerged in Denmark in March 2022 and whose mutations alter the efficiency of the detection system usually used on the M gene.

Jørgensen RL, Lerche CJ, Pedersen MS, Kirkby NS, Botnen AB, Trebbien R, Nilsson-Møller S, Pinholt M, Nielsen ACY, Westh H, Lisby JG, Schneider UV. Emergence of circulating influenza A H3N2 viruses with genetic drift in the matrix gene: be alert of false-negative test results. APMIS. 2022 Oct;130(10):612-617. doi: 10.1111/apm.13262. Epub 2022 Aug 10. PMID: 35836366; PMCID: PMC9544743.

Our primer and probe system used for influenza A detection targets an amplicon that is close to but offset from the design described in the Jørgensen paper.

Detection limitation/analytical sensitivity on CP:

SARS-CoV-2 : 10 copies/ μ L

Flu A : 5 copies/ μ L

Flu B : 50 copies/ μ L

CI Cy5 : 50 copies/ μ L

Detection limitation/analytical sensitivity on WHO 1st International Standard for SARS-CoV-2 RNA (cut-off 95%):

SARS-CoV-2: 5.31 copies/ μ L

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

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

SARS-CoV-2: 12.5 copies/ μ L

Detection limitation/analytical sensitivity on plasmid mimicking the Danish variant (influenza AH3N2):

SARS-CoV-2 : 10 copies/ μ L

Flu A : 10 copies/ μ L

Flu B : 50 copies/ μ L

CI Cy5 : 50 copies/ μ L

Sensitivity study on 107 known positive samples diluted in known samples Negatives at 3x LOD: 100% sensitivity (detection of 107 samples / 107)

- **Interfering substances:** 7 substances from the AcroMetrix™ 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 (%)	Flu A	Flu B	SARS-CoV-2	Endogenous ctrl Gene
CFX96™	0,26	0,67	0,52	1,11
T-COR-8® IVD	1,67	1,40	1,18	1,58
LC480®	0,25	0,56	0,50	0,25
MIC®	3,20	0,39	1,26	2,12

CV: coefficient of variation

- Inter-batch variability:

Average inter-batch CV (%)	Flu A	Flu B	SARS-CoV-2	Endogenous ctrl Gene
CFX96™	0,68	0,81	1,14	3,71
T-COR-8® IVD	3,44	3,17	1,09	2,80
LC480®	1,42	1,06	1,03	0,94

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

MIC®	2,66	4,77	5,78	6,98
------	------	------	------	------

CV: coefficient of variation

Diagnostic specificity

This validation included:

- 505 SARS-CoV-2 negative samples, pretested and characterized by CE approved tests.
- 32 samples negative for all known coronaviruses, including respiratory panel samples characterized for other viruses to test for cross-reactions.
- 1 sample positive for CoV NL63.

Number of samples	Positive sample for	Coronavirus	SARS-CoV-2 status with EBX-043
3	Adenovirus	Negative	Negative
2	Parainfluenzae	Negative	Negative
7	Rhinovirus	Negative	Negative
1	Legionella pneumoniae	Negative	Negative
1	Mycoplasma pneumoniae	Negative	Negative
3	Mycoplasma tuberculosis	Negative	Negative
1	ParaInfluenza Type 4	Negative	Negative
3	Enterovirus	Negative	Negative
3	Streptococcus pneumoniae	Negative	Negative
1	Staph.epiderm/oralis/mitis/sanguis	Negative	Negative
2	Candida albicans	Negative	Negative
2	Pseudomonas aeruginosa	Negative	Negative
1	CoV NL63	Negative	Negative
3	VRS	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.

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

Diagnostic sensibility and specificity

The validation of the performance was performed on:

538 negative samples	
505 SARS-CoV-2 negative samples	Characterised with EBX-041 kit, CE marked
33 positive respiratory samples	RSV-A/B, Parainfluenzae, Rhinovirus, Metapneumovirus, CoV NL63

305 positive samples	
140 SARS-CoV-2 positive samples	Characterized by EurobioPlex EBX-041 CE-IVD kit
59 Influenza B positive samples	Characterized with the Seegene Allplex SARS-Cov-2 Flu A / Flu B / RSV Assay
106 Influenza A 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).

Overall performances are:

		EBX-043		
		Flu A		
		POSITIVE	NEGATIVE	TOTAL
Pretested	POSITIVE	106	0	106
	NEGATIVE	2	707	709
		Flu B		
		POSITIVE	NEGATIVE	TOTAL
Pretested	POSITIVE	59	0	59
	NEGATIVE	3	753	756
		SARS-CoV-2		
		POSITIVE	NEGATIVE	TOTAL
Pretested	POSITIVE	140	0	140
	NEGATIVE	0	505	505

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

	Sensitivity %	Specificity %	Concordance %
FLU A	> 98%	> 99%	> 99%
FLU B	95.16%	> 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 independently programmable wells that can be used, patient by patient, independently of each other, in terms of the assays performed, the thermal programs, and the timing of the PCR run.

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

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

Controls

On T-COR 8®-IVD, the positive and negative controls should be tested at least the first time a new kit is used.

Thereafter, the endogenous control allows to ensure that the extraction has been performed correctly, and that within the tested sample, there is no inhibition of the PCR, and that the PCR is working correctly.

Fluorophores

There are 4 fluorophore combinations available on the T-COR 8®-IVD.

For all EBX, including EBX-043, the FAM/HEX/Texas Red/Cy5 combination is the one chosen. If some channels are not used in some kits, do not take this into account when analyzing the results.

Use of the barcodes

1- Select Menu > New Analysis/New Run

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

- 2- Select Barcode,
- 3- Scan the desired barcode on the right side of the instrument:
 - either for the positive control (Barcode EBX-043 Pos Ctrl),
 - or for the negative control (Barcode EBX-043 Neg Ctrl),
 - or for a sample (Barcode EBX-043)

The instrument automatically selects one of the 8 available wells. Follow the instructions given by the instrument.

- 4- Lift the flap of the well x selected by the instrument, and check that the blue LED light is on, then select "Yes".
- 5- Place the tube in the corresponding well and fold the valve back, then select " Next ".
- 6- If you wish to name it (optional), select " Sample x ", and name it. Select " Accept ".
- 7- Select " Next ".
- 8- To add/test another control or sample, select " Add well " and start again at point 3-.
- 9- Select " Start Run ".

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

Presentation and Interpretation of Results

Ct results and amplification curves are available from the SmartCTTM Values / SmartCTTM Table (Ct values assigned on each channel), and Ct vs. run graphs on each channel, both of which can be viewed in real time on the machine.

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

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

"Neg Ctrl Fail": Not valid
"Neg Ctrl Valid": Valid
"Pos Ctrl Fail": Not valid
"Pos Ctrl Valid": Valid

Determination of status for samples:

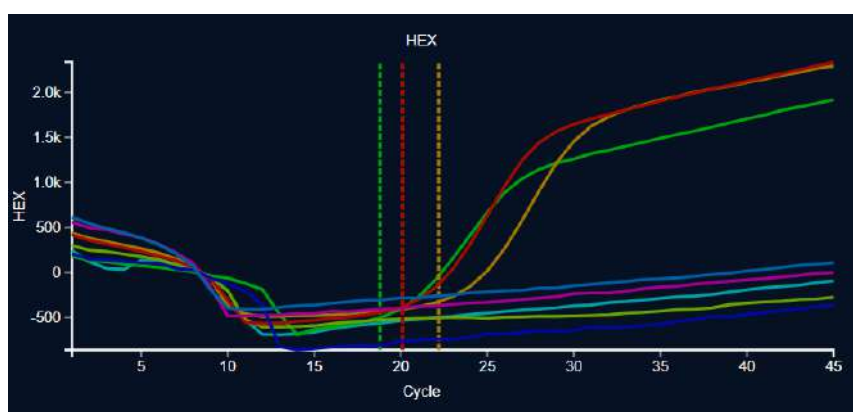
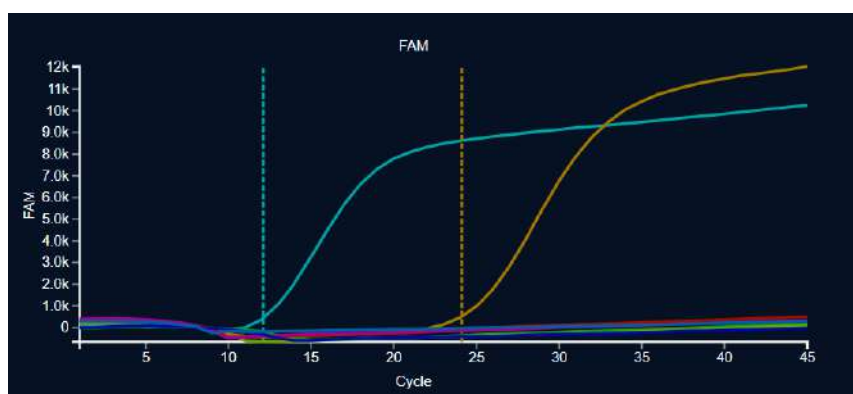
"Détecté(e-s) / Detected" : Positive → green box
"Not detected / Non détecté" : Negative → red box
"Non Valide / Invalid" : Invalid result -> retest -> yellow box

Example of a presentation of automatic interpretation of results

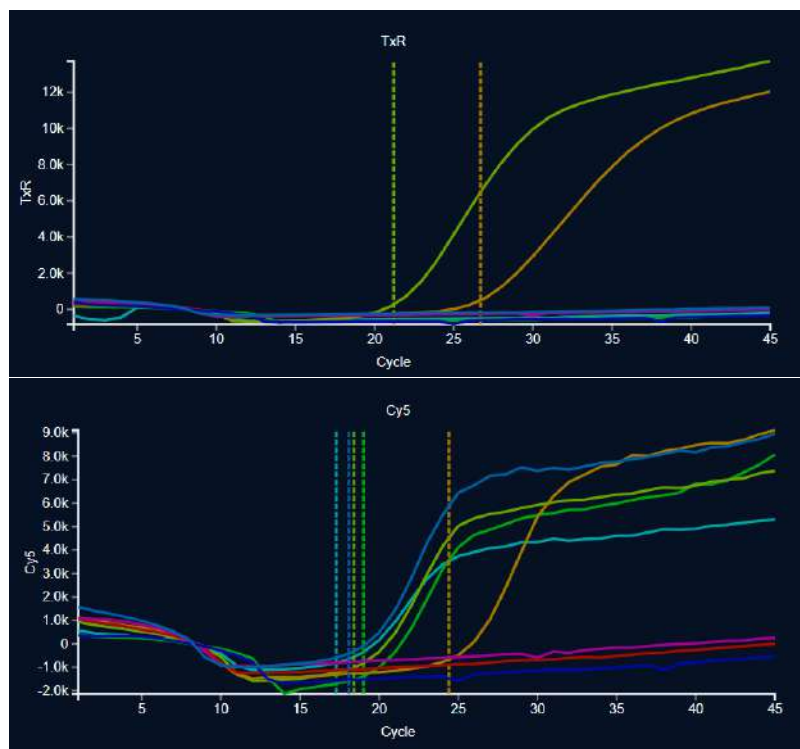
EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

Summary									
	Well	Sample	Assay	FAM HEX TxR Cy5			Call	Note	
	1	Sample 1	EBX-043	12.1		17.3	Detected • FLUA	FLUB, SARS-CoV-2 Negative	
	2	Sample 2	EBX-043		18.8	19.0	Detected • FLUB	FLUA, SARS-CoV-2 Negative	
	3	Sample 3	EBX-043			21.2 18.4	Detected • SARS-CoV-2	FLUA, FLUB Negative	
	4	Ctlr POS	EBX-043 Pos Ctrl	24.1	22.2	26.7 24.4	Detected • Pos Ctrl	Pos Ctrl Valid	
	5	Ctrl POS	EBX-043 Pos Ctrl	20.1			Invalid	Pos Ctrl Fail	
	6	Ctrl NEG	EBX-043 Neg Ctrl				Detected • Neg Ctrl	Neg Ctrl Valid	
	7	Sample 4	EBX-043				Invalid	Retest	
	8	Sample 5	EBX-043			18.1	Not Detected	FLUA, FLUB, SARS-CoV-2 Negative	

Example of amplification curves



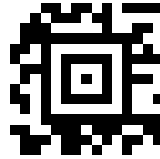
EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2



EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

Barcodes on T-COR8®-IVD for EBX-043

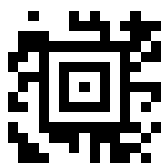
EBX-043 Pos Ctrl
Positive Control



EBX-043 Neg Ctrl
Water = Negative Control (CN-H2O)



EBX-043



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.

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

Jørgensen RL, Lerche CJ, Pedersen MS, Kirkby NS, Botnen AB, Trebbien R, Nilsson-M ller S, Pinholt M, Nielsen ACY, Westh H, Lisby JG, Schneider UV. Emergence of circulating influenza A H3N2 viruses with genetic drift in the matrix gene: be alert of false-negative test results. APMIS. 2022 Oct;130(10):612-617. doi: 10.1111/apm.13262. Epub 2022 Aug 10. PMID: 35836366; PMCID: PMC9544743.

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

15. Quality control

In accordance with Eurobio's ISO EN 13485 certified quality management system, each batch of EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2 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.

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.

Change tracking

Date	Version	Revision
2023/02/17	v2.00	Additional clinical study on influenza A and B samples. Validation of EBX-043 on a new instrument: MIC®. Study on the new FLU A H3N2 Danish variant.
2022/05/03	v1.00	Creation



eurobio
SCIENTIFIC

7, avenue de Scandinavie
91940 Les Ulis Cedex
FRANCE



EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

REAL-TIME-RT-PCR

Für **qualitative** Real-Time-RT-PCR

REF

EBX-043-25

EBX-043-50

EBX-043-100

EBX-043-200

EBX-043-600



25/50/100/200/600 Reaktionen

Version 2.00 vom 17/02/2023



Validiert für:

- CFX96™ Real-Time PCR-Detektionssystem (Bio-Rad) mit Analyse mittels CFX Manager Version 3.1 (Bio-Rad)
- LightCycler®480 mit Analyse mittels LightCycler® 480 Software v1.5 (Roche)
- T-COR 8®-IVD (Tetracore Inc.) mit T-COR 8 Per-Well SmartCT™ (auto v1) Software
- MIC® (Bio Molecular Systems) mit Analyse mittels MIC Software Version 2.12.6

Lagerung:

Bis zur Verwendung und nach der ersten Anwendung alle Reagenzien zwischen -15 °C und -22 °C lagern



Gebrauchsanweisung
Verfügbar auf: www.eurobio-scientific.com

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

Inhaltsverzeichnis

1.	Einführung	61
2.	Zweckbestimmung des Testsystems	62
3.	Symbole	63
4.	Nachweisprinzip.....	64
5.	Inhalt des Kits.....	65
6.	Lagerung	66
7.	Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien	66
8.	Real-Time-PCR-Gerät	66
9.	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	67
10.	Verfahren.....	68
11.	Validierung des Experiments.....	72
12.	Datenanalyse und Auswertung	73
13.	Leistungsanalyse.....	75
14.	Literatur.....	85
15.	Qualitätskontrolle.....	86
16.	Abfallentsorgung	86
17.	Vorfallmeldung.....	86
18.	Technische Unterstützung.....	86

1. Einführung

Influenza-A- und -B-Viren gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae*. Das SARS-CoV-2-Virus zählt zur Familie der *Coronaviridae* und zur Untergattung der *Sarbecoviren*. Letzteres trat Ende 2019 in China in der Stadt Wuhan auf und ist die Ursache für eine neuartige globale Pandemie in der ersten Hälfte des Jahres 2020. Alle drei sind RNA-Viren, die von Mensch zu Mensch übertragen werden und hauptsächlich die Lunge und die Atemwege infizieren (durch Tröpfchen, die von Infizierten durch Husten und Niesen freigesetzt werden).

Das SARS-CoV-2-Genom besteht aus 29 903 Basen der Ribonukleinsäure (RNA). SARS-CoV-2 ist das siebte den Menschen infizierende Coronavirus, das nach den humanen Coronaviren (HCoV) 229E, NL63, OC43, HKU1, SARS-CoV (Schweres-Akutes-Respiratorisches-Syndrom-Coronavirus) und MERS-CoV (Nahost-Atemwegssyndrom-Coronavirus) identifiziert wurde. Die Sequenzen des SARS-CoV-2 weisen Ähnlichkeiten mit denen der Betacoronaviren auf, die bei Fledermäusen vorkommen. SARS-CoV-2 unterscheidet sich genetisch von anderen humanen Coronaviren, wie denen, die mit SARS und MERS in Verbindung gebracht werden.

Diese 3 Viren stellen weltweit ein großes Problem für die öffentliche Gesundheit dar (Morbiditätsrate sowie Gesundheits- und Sozialkosten). Sie treten saisonal, hauptsächlich im Herbst und im Winter auf. Die Grippe löst Epidemien aus, die vor allem für ältere Menschen schwerwiegende Folgen haben können. SARS-CoV-2 ist die Ursache einer Pandemie. Die klinischen Symptome verschwinden gewöhnlich nach einigen Tagen, aber das klinische Bild ist vielfältig und umfasst in der Regel ein grippeähnliches Syndrom mit Fieber, Kopfschmerzen, Husten, laufender Nase, Rachenentzündung, Myalgie, Asthenie und Atembeschwerden. In den schwersten Fällen jedoch treten Komplikationen auf (Lungenentzündung, schweres respiratorisches Syndrom, Dehydrierung), die tödlich verlaufen können. Gegenwärtig sind antivirale Mittel für Grippe verfügbar, nicht jedoch für SARS-CoV-2, dessen Behandlung und Prophylaxe weltweit untersucht wird. Bis heute hat nur der jährliche Grippeimpfstoff eine Marktzulassung.

Im Juli 2020 lag der Fall-Verstorbenen-Anteil im Zusammenhang mit SARS-CoV-2 in Frankreich laut WHO zwischen 0,5 % und 1 %, was deutlich über dem Anteil bei saisonaler Grippe (0,1 %) liegt, jedoch in keiner Weise mit dem mit SARS-CoV-1 oder MERS assoziierten Anteil vergleichbar ist, der 10 % bzw. 30 % beträgt. SARS-CoV-2 ist mit weltweit mehr als 16 Millionen Fällen Ende Juli 2020 hoch ansteckend. Laut WHO-Berichten breitet sich die Pandemie in den USA, im Nahen Osten sowie in Zentral- und Südasien stark aus und ist in Ländern, in denen die Grippe zu dieser Jahreszeit normalerweise zirkuliert, auf dem Vormarsch (Südafrika, Australien).

Respiratorische Virusinfektionen werden im Allgemeinen klinisch auf der Grundlage der Symptome und der lokalen epidemischen Situation diagnostiziert. Alle 3 Virustypen, die mit dem

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

EBX-043 nachgewiesen werden, zirkulieren zur gleichen Zeit. Obwohl die spezifischen Erreger charakteristische klinische Manifestationen hervorrufen, kann jeder von ihnen zahlreiche virale Atemwegssyndrome verursachen, deren Schweregrad je nach Wirt variiert. Darüber hinaus ist die therapeutische Behandlung je nach den für die Infektion verantwortlichen Viren unterschiedlich. Es ist deshalb von entscheidender Bedeutung, im Rahmen von Epidemien und Pandemien unterscheiden zu können, welcher Virustyp für die beobachtete Symptomatik verantwortlich ist. Dies wird mit EBX-043 ermöglicht.

2. Zweckbestimmung des Testsystems

Der EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2 ist ein Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)-Assay in Echtzeit, der unter Verwendung von RNA-Extrakt *in vitro* durchgeführt wird und für den Nachweis der folgenden Atemwegsviren entwickelt wurde:

- Influenza-A-Virus (Influenza A oder Flu A),
- Influenza-B-Virus (Influenza B oder Flu B),
- SARS-CoV-2, ein sich ausbreitendes Virus, das Ende 2019 in China in der Stadt Wuhan auftrat.

Der EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2 wurde entwickelt, um Influenza-A- und -B-Viren ohne Differenzierung zwischen A H1N1 und H3N2 Virus-Subtypen, sowie alle bisher durch *In-silico*-Alignment bekannten SARS-CoV-2-Sequenzen nachzuweisen, was insbesondere den Ausschluss von harmlosen oder SARS-CoV-1 oder MERS-Coronaviren erlaubt. Die Bestimmung des SARS-CoV-2-Status basiert auf dem Nachweis von 2 Targets, die an dasselbe Fluorophor gekoppelt sind: eines im IP2-Gen (RdRp2) und ein weiteres im IP4-Gen (RdRp).

Der Test ist angezeigt, um die Verdachtsdiagnose einer Infektion mit diesen drei Viren zu stellen oder eine gesicherte oder unklare Diagnose zu präzisieren, wobei spezifisch zwischen dem SARS-CoV-2-Coronavirus und den beiden Grippeviren unterschieden wird. Die Diagnose sollte immer von medizinischem Personal und im Kontext der klinischen Situation des Patienten, seiner Vorgeschichte und seiner Symptome gestellt werden.

Der RNA-Extrakt aus einer respiratorischen Probe ist das Ausgangsmaterial für das EurobioPlex EBX-043 Kit. Es liegt in der Verantwortung der Anwender, Extraktionsmethoden zu verwenden, die für die zu testenden Proben geeignet sind.

Der EurobioPlex EBX-043 Test ist ein *in-vitro*-diagnostisches Medizinprodukt und muss von qualifiziertem medizinischen Laborpersonal durchgeführt werden.

Das Kit ist für Nasopharyngealabstriche validiert.

3. Symbole



Bestellnummer



Chargenbezeichnung



Temperaturbegrenzung



Verfallsdatum



Inhalt ausreichend für « N » Reaktionen



Hersteller



CE-gezeichnetes Produkt



In-vitro-diagnostisches Medizinprodukt



Gebrauchsanweisung



Vor Lichteinstrahlung schützen



Nicht verwenden, wenn die Verpackung
beschädigt ist



Vorsicht

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

4. Nachweisprinzip

Der EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2 ist ein Test zur Amplifikation der Ribonukleinsäure (RNA) der für Influenza A, Influenza B und SARS-CoV-2 verantwortlichen Viren und basiert auf 1 Multiplex-RT-PCR-Assay (ein Zielgen für Influenza-A-Virus, ein Zielgen für Influenza-B-Virus und zwei Zielgene für SARS-CoV-2: die Gene RdRp und RdRp2) in einer einzelnen Vertiefung.

Das Kit enthält einen Oligomix zum Nachweis der 3 Targets sowie eine endogene Kontrolle.

Das Anwesenheit eines humanen Housekeeping-Gens, das als Kontrolle für die Qualität der Probe, die RNA-Extraktion und die RT-PCR-Hemmung dient, erlaubt die Bestimmung möglicher Abweichungen, die während der Schritte der RNA-Extraktion aus biologischen Proben und der Amplifikation durch RT-PCR in Echtzeit auftreten können. Es stellt sicher, dass ein negatives Ergebnis nicht auf eine fehlerhafte RNA-Extraktion und/oder das Vorhandensein übermäßiger Mengen an RT-PCR-Inhibitoren zurückzuführen ist.

Durchgeführt wird der Test an der aus einer Probe extrahierten RNA, wobei eine Reaktion in einer Vertiefung/einem Röhrchen stattfindet. Die RNA des Influenza-A-Virus wird mit einer FAM-markierten Sonde nachgewiesen. Die RNA des Influenza-B-Virus wird mit einer HEX-markierten Sonde detektiert. Schließlich wird die RNA von SARS-CoV-2 mit spezifischen Sonden für jedes Gen (RdRp and RdRp2) nachgewiesen, die mit TEXAS RED markiert sind. Die endogene Kontrolle wird mit einer CY5-markierten Sonde detektiert. Während der Elongation des Amplifikationsprodukts emittieren die Sonden nach ihrer Hydrolyse eine spezifische Fluoreszenz. Die Messung der Fluoreszenzintensität in Echtzeit ist abhängig von der Akkumulation der Amplifikationsprodukte.

Tabelle 1: Detektion der Targets mit Fluorophoren

Targets	Fluorophor	Anregung	Emission
Target 1 / Flu A	FAM	495 nm	515 nm
Target 2 / Flu B	HEX	535 nm	555 nm
Target 3 / RdRP1-/RdRP2-Gene	Texas Red	585 nm	605 nm
Endogene interne Kontrolle	Cy5	650 nm	670 nm

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

Entsprechende Kanäle auf unterschiedlichen Real-Time-PCR-Cyclern:

- Kanal **FAM** (ABI Systems, SmartCycler II, Mx Systems, CFX96™/Chromo4, T-COR 8-IVD, LC480), Kanal Green (RotorGene), Kanal Green (MIC).
- Kanal **HEX** (Chromo 4/CFX96, Mx Systems, T-COR 8-IVD, LC480), Kanal VIC (ABI Systems), Kanal Alexa532 (SmartCycler II), Kanal Yellow (RotorGene), Kanal Yellow (MIC).
- Kanal **Texas Red** (ABI Systems, Chromo 4/CFX96, Mx Systems, T-COR 8-IVD), LC Red 610 (LC480), Kanal Orange (RotorGene), Kanal Orange (MIC).
- Kanal **Cy5** (CFX96™/Chromo4, ABI Systems, Mx Systems, T-COR 8-IVD, LC 480), Kanal Alexa647 (SmartCycler II), Kanal Red (RotorGene), Kanal Red (MIC).

Hinweis 1: Am LightCycler® 480 (Roche) muss eine Farbkompensation für folgende Kanäle stattfinden: FAM/HEX-VIC/Texas Red/Cy5 (FAM: 483-533 / HEX-VIC: 523-568 /Texas Red: 558-610 / Cy5: 615-670).

Hinweis 2: Wenn die Analyse mit der LC480 Software Release 1.5.0 erfolgt, nicht Noiseband Auto für Texas-Red- and HEX-Kanäle stehen lassen, sondern Noiseband Fluor manuell auf 0,43 für Texas Red und auf 5,5 für HEX setzen (der Anwender muss die Basislinie anpassen).

5. Inhalt des Kits

Das Real-Time-RT-PCR-Kit EBX-043 ist gebrauchsfertig und enthält die Reagenzien und Enzyme, die zum Nachweis dieser Viren (Tabelle 2) erforderlich sind.

Während des PCR-Verfahrens wird Fluoreszenz emittiert und von einem optischen System einzeln gemessen. Die Detektion der amplifizierten Fragmente erfolgt mit einem Fluorimeter unter Verwendung der in Tabelle 1 aufgeführten Kanäle.

Tabelle 2: Inhalt des Kits

Farbe des Deckels	Inhalt des Kits	25 Reaktionen	50 Reaktionen	100 Reaktionen	200 Reaktionen	600 Reaktionen	Rekonstitution
Rot	Enzyme	5x25 µl	10x25 µl	525 µl	800 µl	2 x 1200 µl	Gebrauchsfertig
Transparent	Oligomix	5x20 µl	10x20 µl	420 µl	700 µl	2 x 950 µl	Gebrauchsfertig
Gelb	Positivkontrolle CP	5x15 µl	10x15 µl	160 µl	320 µl	320 µl	Gebrauchsfertig
Blau	Wasser = Negativkontrolle (CN-H ₂ O)	1500 µl	1500 µl	1500 µl	1500 µl	2 x 1500 µl	Gebrauchsfertig

Oligomix: enthält Primer und Sonden für die 3 Targets und für die endogene Kontrolle.

6. Lagerung

Alle Reagenzien sollten zwischen -15 °C und -22 °C gelagert werden.

Alle Reagenzien können bis zum dem auf dem Etikett des Kits angegebenen Verfallsdatum verwendet werden.



Die Sensitivität des Assays kann abnehmen, wenn die Kit-Komponenten mehrere Gefrier-/Auftauzyklen durchlaufen. Das Kit kann nach dem erstmaligen Öffnen bis zu 5 Gefrier-/Auftauzyklen lang verwendet werden.

7. Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

- ◇ Biologische Sicherheitswerkbank
- ◇ Real-Time-PCR-Gerät
- ◇ Zentrifuge für Mikroröhrchen
- ◇ Vortex-Mischer
- ◇ Platten / Röhrchen für die Real-Time-PCR-Reaktion
- ◇ Mikropipetten
- ◇ DNase-freie und RNase-freie Filterspitzen für Mikropipetten
- ◇ Sterile Mikroröhrchen
- ◇ Handschuhe (puderfrei)

8. Real-Time-PCR-Gerät

Das EurobioPlex EBX-043 Kit wurde für die Verwendung mit folgenden Real-Time-PCR-Geräten entwickelt und validiert:

- CFX96™ Real-Time-PCR-Detektionssystem (Bio-Rad) mit Analyse mittels CFX Manager Version 3.1 (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 mit Analyse mittels LightCycler® 480 Software v1.5 (Roche)
- T-COR 8®-IVD (Tetracore Inc.) mit T-COR 8 Per-Well SmartCT™ (auto v1) Software
- MIC® (Bio Molecular Systems) mit Analyse mittels MIC Software Version 2.12.6

9. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen



Die Gebrauchsanweisung vor der Durchführung des Tests sorgfältig lesen.

- ◇ Dieses Experiment sollte von medizinischen Labortechnikern durchgeführt werden.
- ◇ Die lokalen und nationalen Vorschriften zur Biosicherheit für SARS-CoV-2-Tests müssen unter allen Umständen genauestens befolgt werden, wobei entsprechende Ausrüstung und Labors einzusetzen sind.
- ◇ Geräte müssen gemäß den Empfehlungen des Herstellers ordnungsgemäß installiert, kalibriert und gewartet werden.
- ◇ Es liegt in der Verantwortung der Anwender, wenn sie andere nicht validierte Geräte verwenden. In diesem Fall sind die Leistungen nicht garantiert.
- ◇ Klinische Proben sind potenziell infektiös und müssen unter einem Laminar-Flow-Abzug verarbeitet werden.
- ◇ Das Experiment muss nach den Grundsätzen der guten Laborpraxis durchgeführt werden.
- ◇ Dieses Kit nicht mehr nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- ◇ Das Kit wird mit Trockeneis verschickt und die Komponenten des Kits müssen gefroren geliefert werden. Wenn eine oder mehrere Komponenten aufgetaut ankommen oder wenn ein oder mehrere Röhrchen beim Transport beschädigt wurden, kontaktieren Sie Eurobio Scientific.
- ◇ Mehrmaliges Einfrieren und Auftauen der Reagenzien sollte vermieden werden, da dies zu einer Verringerung der Sensitivität des Assays führen kann.
- ◇ Nach dem Auftauen die Röhrchen vor dem Gebrauch kurz zentrifugieren.
- ◇ Die Verwendung von Eis oder Kühlblocks wird empfohlen, wenn es zu längeren Verzögerungen kommt, z. B. bei einer großen Anzahl von zu verarbeitenden Proben oder bei hohen Temperaturen.
- ◇ Es wird empfohlen, drei voneinander getrennte Arbeitsbereiche festzulegen: 1) Isolierung der RNA, 2) Zubereitung der Reaktionsgemische und 3) Amplifikation/Nachweis der amplifizierten Produkte.
- ◇ Die fluoreszierenden Sonden im Oligomix sind lichtempfindlich. Eine längere Lichtexposition des Oligomixes sollte auf die für die Vorbereitung der PCR-Platte erforderliche Zeit begrenzt werden.
- ◇ Die Positivkontrolle (CP) sollte getrennt von den zu testenden biologischen Proben und den anderen Kit-Komponenten geöffnet und gehandhabt werden, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- ◇ In jedem Arbeitsbereich eigene Laborkittel und Handschuhe (ohne Puder) tragen.
- ◇ Pipetten, Reagenzien und anderes Material nur in jeweils einem Bereich verwenden.
- ◇ Besondere Sorgfalt ist geboten, um die Reinheit der Reagenzien und Reaktionsgemische zu erhalten.

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

- ◇ Die interne endogene Kontrolle detektiert ein nachweisbares zelluläres Target in allen Proben menschlichen Ursprungs, nicht aber in der im Kit enthaltenen CN-H2O-Negativkontrolle. Durch das Fehlen eines Signals bei der Negativkontrolle wird das Auftreten von Kreuzkontaminationen verhindert.
- ◇ Es sollten geeignete RNA-Aufbereitungs-/Extraktionsmethoden für eine qualitativ hochwertige RNA-Gewinnung und RT-PCR-Anwendung eingesetzt werden, insbesondere um eine Kontamination mit RNAs zu vermeiden.
- ◇ RNase-freie und DNase-freie Filterspitzen für Mikropipetten verwenden.
- ◇ Nicht mit dem Mund pipettieren und in den Arbeitsbereichen nicht essen, trinken oder rauchen.
- ◇ Aerosole vermeiden.

10. Verfahren

10.1 Probenentnahme

- ◇ Die Proben werden in sterilen Röhrchen gesammelt.
- ◇ Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, die Bedingungen für die Entnahme, den Transport, die Lagerung und die Extraktion der Proben selbst zu kontrollieren, um sicherzustellen, dass bei der RNA-Extraktion mit geeigneten Systemen RNA von hoher Qualität gewonnen wird.
- ◇ Es wird empfohlen, die Proben sofort zu extrahieren oder sie vor der Extraktion gemäß den Empfehlungen zur Probenlagerung (Tabelle 3) aufzubewahren.
- ◇ Die Literaturhinweise in Abschnitt „14. Literatur“ enthalten orientierende Angaben zur Stabilität der Proben und RNAs.



Tabelle 3: Empfehlungen zur Lagerung vor Gebrauch

Empfehlungen für die maximale Lagerdauer der Proben vor Extraktion	
Umgebungstemperatur	2 h
+2 °C/+8 °C	5 Tage
<-70 °C (bevorzugt gegenüber -20 °C)	Langzeitlagerung (>5 Tage und maximal 2 Monate bei -20 °C)

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

Vorsicht	
	◇ Anwender können sich hinsichtlich der ordnungsgemäßen Lagerung von Proben an den Empfehlungen der Weltgesundheitsbehörde oder der französischen Hohen Behörde für Gesundheit (HAS) orientieren: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2010-02/cryopreservation_-_recommandations.pdf ◇ Extrahierte RNAs sollten bei <-70 °C gelagert werden. Bei einer Lagerung der RNAs bei <-70°C über ein Jahr hinaus können die erhaltenen Ct ansteigen. Es ist ratsam, eine biologische Probe, die länger als ein Jahr gelagert wurde, erneut zu extrahieren. Es wird empfohlen, die Anzahl der Auftauzyklen auf 3 zu begrenzen. ◇ Der Transport von klinischen Proben unterliegt den lokal geltenden Vorschriften für den Transport von Infektionserregern.

10.2 RNA-Extraktion

Es liegt in der Verantwortung des Anwenders sicherzustellen, dass das verwendete Nukleinsäure-Extraktionssystem mit der nachfolgenden Real-Time-RT-PCR-Technologie kompatibel ist. Für dieses Kit empfehlen wir, Methoden zur Virus-RNA-Extraktion zu verwenden, die für respiratorische Proben geeignet sind, und verweisen auf die Anweisungen des Herstellers des Extraktions-Kits.

Im EBX-043 Kit liegt die endogene interne Kontrolle, die auf dem CY5-Kanal nachgewiesen wird, bereits in der zu extrahierenden klinischen Probe vor. Deren Nachweis nach der Amplifikation ermöglicht es, die Qualität der Probe und der Extraktion zu überprüfen. Die in Abschnitt 13 in diesem Dokument beschriebene Leistung wurde mit der folgenden Extraktionsmethode erhalten: Maelstrom 9600 (TANBead), Microlab Starlet IVD Hamilton, das OptiPure Viral Auto Plate Kit (Bestellnr.: W665A46) und das Starmag 96X4 Kit.

10.3 Real-Time RT-PCR

Allgemeiner Hinweis:

- Die Positivkontrolle (CP) enthält hohe Konzentrationen an Matrix. Sie muss vorsichtig gehandhabt werden, um eine Kontamination zu vermeiden.
- Um zu bestätigen, dass die RT-PCR korrekt funktioniert, müssen sowohl die Positivkontrolle als auch die Negativkontrolle getestet werden (mitgeliefertes Wasser = CN-H₂O) (siehe II-2/6 des Real-Time-RT-PCR-Protokolls).
- Am T-COR 8®-IVD müssen diese Kontrollen zumindest bei der ersten Verwendung eines neuen Kits mitgeführt werden.

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

Verfahrensdiagramm:

1 – ZUBEREITUNG DES MASTERMIXES

Anzahl der Reaktionen	N+3*
Enzyme	(N+3) x 3,75 µl
Wasser	(N+3) x 3,25 µl
Oligomix	(N+3) x 3 µl
Gesamtvolumen Mastermix	(N+3) x 10 µl

* N+1 am T-COR 8®-IVD



2 – VORBEREITUNG DER REAKTIONEN

Probe

10 µl Mastermix
+
5 µl RNA-Probe

Positivkontrolle

10 µl Mastermix
+
5 µl CP

Negativkontrolle

10 µl Mastermix
+
5 µl molekularbiologisches Wasser (CN-H2O)



3 – REAL-TIME-PCR-Gerät

Programm	Temperatur	Dauer	Zyklen	
Reverse Transkription	45 °C	5 min	1	-
Denaturierung	98 °C	20 sec	1	-
Amplifikation	98 °C	3 sec	40	-
	58 °C	10 sec		Fluoreszenzerfassung

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

10.4 Verfahren im Detail

- 1) Sicherstellen, dass die Reagenzien vollständig aufgetaut sind. Enzymröhrchen homogenisieren und den Oligomix und die Positivkontrolle (CP) etwa 15 Sekunden vortexen, dann kurz zentrifugieren.
- 2) Den Mastermix wie unten aufgeführt zubereiten. N ist die Anzahl der Reaktionen (Positiv- und Negativkontrollen eingeschlossen). Genug Reagenzien für mindestens N+3 Reaktionen (*N+1 am T-COR 8[®]-IVD) vorbereiten.

Anzahl der Reaktionen	N+3*
Enzyme	(N+3) x 3,75 µl
Wasser	(N+3) x 3,25 µl
Oligomix	(N+3) x 3 µl
Gesamtvolumen Mastermix	(N+3) x 10 µl

- 3) Den unter 2) zubereiteten Mastermix homogenisieren und kurz zentrifugieren.
- 4) 10 µl Mastermix unter Verwendung von Mikropipette und Filterspitzen in die Vertiefungen einer Mikroplatte/in Röhrchen dispensieren.
- 5) 5 µl extrahierte RNA-Probe hinzugeben.
- 6) Parallel dazu folgende Kontrollen testen:
 - Positivkontrolle (CP):
 - 10 µl Mastermix + 5 µl CP.
 - Negativkontrolle:
 - 10 µl Mastermix + 5 µl mitgeliefertes Wasser (CN-H2O)
- 7) Die Röhrchen sofort verschließen oder die Platte mit Klebefolie versiegeln, um jedwede Kontamination zu vermeiden.
- 8) Kurz zentrifugieren, um das Reaktionsgemisch am Boden der Röhrchen oder der Mikroplattenvertiefungen zu sammeln.
- 9) Folgendes Programm am Real-Time-PCR-Gerät durchführen.

Programm	Temperatur	Dauer	Zyklen	
Reverse Transkription	45 °C	5 min	1	-
Denaturierung	98 °C	20 sec	1	-
Amplifikation	98 °C	3 sec	40	-
	58 °C	10 sec		Fluoreszenzserfassung

Hinweis 1: Am CFX96™ (Bio-Rad) den Lauf mit v1.6 oder neuerer Version der CFX Manager Software starten und mit v3.1 analysieren (siehe Abschnitt Validierung des Experiments). **Bitte stellen Sie sicher, dass weiße PCR-Platten verwendet werden, damit alle Kanäle korrekt abgelesen werden können.**

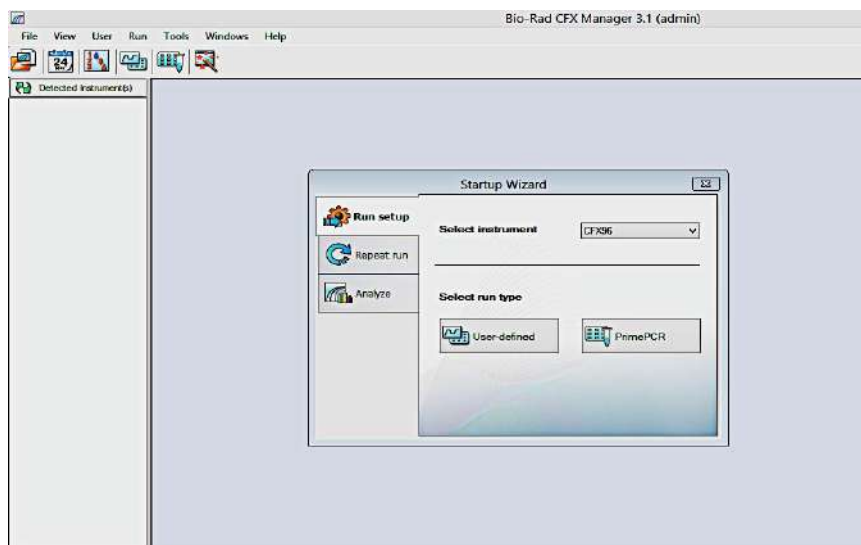
Hinweis 2: Am LightCycler® 480 (Roche) muss eine Farbkompensation für folgende Kanäle stattfinden: FAM/HEX-VIC/Texas Red/Cy5 (FAM: 483-533 / HEX-VIC: 523-568 /Texas Red: 558-610 / Cy5: 615-670).

Hinweis 3: Wenn die Analyse mit der LC480 Software Release 1.5.0 erfolgt, nicht Noiseband (Auto) für Texas-Red- und HEX-Kanäle stehen lassen, sondern Noiseband Fluor manuell auf 0,43 für Texas Red und auf 5,5 für HEX setzen.

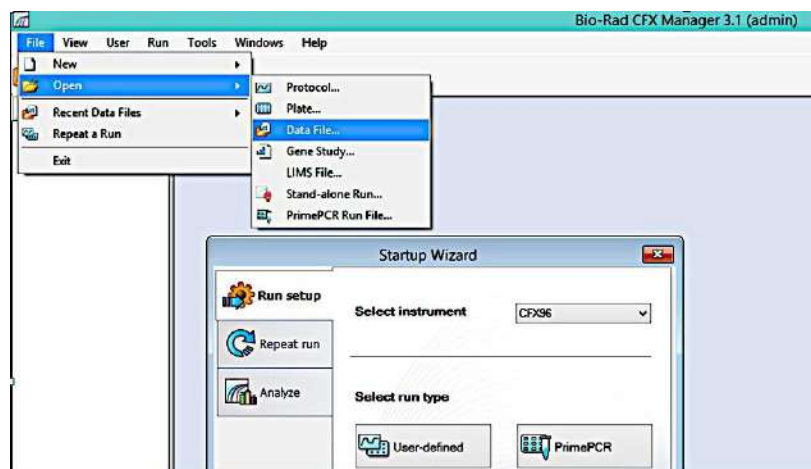
11. Validierung des Experiments

Die Analyse der Daten nach deren Erfassung an einem CFX96 PCR-Gerät (Bio-Rad) muss mit der Version 3.1 der CFX Manager Software (Bio-Rad) erfolgen. Um diese Version für einen Lauf zu verwenden, der mit einer früheren Version gestartet wurde, gehen Sie bitte wie folgt vor: Am Ende des Laufs muss die Datendatei mit der Dateiendung .pcrd geöffnet und mit der Version 3.1 des CFX Managers (Bio-Rad) bearbeitet werden.

Wenn beispielsweise der Lauf mit CFX Manager v1.6 gestartet wurde, klicken Sie auf das CFX-Manager-v1.6-Icon, um die Datendatei mit CFX Manager v3.1 zu öffnen. Der Startbildschirm wird angezeigt.



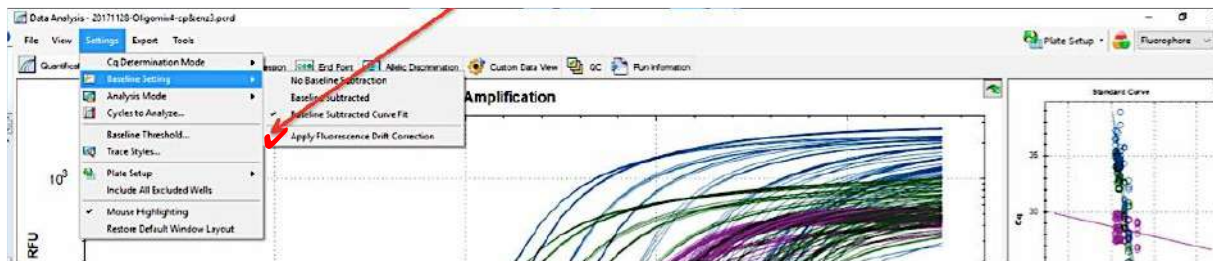
Klicken Sie auf „File“ und wählen Sie „Open“, anschließend „Data File“.



Wählen Sie die Datei aus, die analysiert werden soll, und klicken Sie „Open“ an.

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

Die Option „Drift Correction“ muss auf der Registerkarte „Settings“, wie im Bild unten angezeigt, ausgewählt werden: Klicken Sie die Registerkarte „Settings“ an, dann „Baseline Setting“ und „Apply Fluorescence Drift Correction“.



Wenn dies erfolgt ist, kann die Analyse beginnen.

Die Ergebnisse der Kontrollen müssen wie folgt lauten (Tabelle 4); anderenfalls ist das Experiment ungültig. Am T-COR 8®-IVD müssen diese Kontrollen zumindest bei der ersten Verwendung eines neuen Kits mitgeführt werden.

Tabelle 4: Validierung des Laufs

Positivkontrolle	
FAM	Ct ≤ 30
HEX	Ct ≤ 30
Texas Red	Ct ≤ 30
Cy5	Ct ≤ 30
Negativkontrolle	
FAM	Ct nicht bestimmt
HEX	Ct nicht bestimmt
Texas Red	Ct nicht bestimmt
Cy5	Ct nicht bestimmt

12. Datenanalyse und Auswertung

Bei klinischen Proben sind folgende Ergebnisse möglich:



***SARS-CoV-2 (Texas Red), Flu A (FAM) oder Flu B (HEX): Ct < 40**

* Der Ct-Schwellenwert für die Positivität von Proben am T-COR 8®-IVD ist wie folgt: + Positiv => Ct positiv (≤ 45) in allen 3 Kanälen, die automatische Auswertung erfolgt mit Barcodes.

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

Tabelle 5:

PCR-Signal Flu A und/oder Flu B und/o- der SARS-CoV-2	Endogene Kontrolle	Viruspräsenz Flu A und/oder Flu B und/oder SARS-CoV-2	Gültigkeit des Tests/Kommentar
FAM und/oder HEX und/oder Texas Red	Cy5		
+	+	Ja	GÜLTIG
-	+	Nein	GÜLTIG
+	-	Ja	GÜLTIG Mögliche Inhibition der RT-PCR oder ein Problem bei der Extraktion, wodurch der Nachweis der Viren nicht beeinträchtigt wird.
-	-	Keine Auswertung möglich	Inhibition der RT-PCR oder Problem bei der Extraktion → zuerst die Probe 5 x verdünnen und nochmals testen; gegebenenfalls eine Extraktion wiederholen

Grenzen der Verwendung und Interpretation:

- ❖ Alle Proben müssen als potenziell SARS-CoV-2-infiziert behandelt werden, und die lokalen Vorschriften zur Biosicherheit müssen genauestens befolgt werden.
- ❖ Bei der Interpretation der Ergebnisse muss die Möglichkeit falsch negativer oder falsch positiver Ergebnisse berücksichtigt werden.
Falsch negative Ergebnisse können folgende Ursachen haben:
 - fehlerhafte Gewinnung von Proben oder falsche Lagerung,
 - Proben außerhalb der Virämie-Phase,
 - ungeeignete Extraktionsmethoden oder Verwendung nicht validierter PCR-Geräte,
 - Experimente, bei denen nicht alle Hinweise in dieser Gebrauchsanweisung strikt befolgt werden.
 Falsch positive Ergebnisse können folgende Ursachen haben:
 - Kontamination durch falsche Handhabung von hochpositiven Proben, Positivkontrolle (CP) oder PCR-Amplifikationsprodukten,
 - Nichtbeachtung der in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Vorgehensweise, insbesondere zur Vermeidung von Kontaminationsquellen.
- ❖ Alle Ergebnisse müssen von medizinischem Fachpersonal im Zusammenhang mit der klinischen Situation des Patienten, seiner Vorgeschichte und seinen Symptomen interpretiert werden.

13. Leistungsanalyse

Unter Verwendung eines Plasmidgemischs (CP) wurde eine Verdünnungsreihe von 10^5 bis 1 Kopie/ μ l erstellt. Diese Verdünnungsreihe wurde eingesetzt, um die Nachweisgrenze (bei 100 % Nachweis) des EBX-043 Kits zu bestimmen.

Darüber hinaus wurde eine Nachweisgrenze für den 1. Internationalen Standard der WHO für SARS-CoV-2-RNA (NIBSC-Code 21/146) und für eine synthetische SARS-CoV-2-RNA von Twist Biosciences ermittelt.

Schließlich wurde die Nachweisgrenze an einem Plasmid überprüft, das die Sequenz eines H3N2-Subtyps nachahmt, der im März 2022 in Dänemark auftrat und dessen Mutationen die Effizienz des normalerweise für das M-Gen verwendeten Nachweissystems verändern.

Jørgensen RL, Lerche CJ, Pedersen MS, Kirkby NS, Botnen AB, Trebbien R, Nilsson-Møller S, Pinholt M, Nielsen ACY, Westh H, Lisby JG, Schneider UV. Emergence of circulating influenza A H3N2 viruses with genetic drift in the matrix gene: be alert of false-negative test results. APMIS. 2022 Oct;130(10):612-617. doi: 10.1111/apm.13262. Epub 2022 Aug 10. PMID: 35836366; PMCID: PMC9544743.

Unser Primer- und Sondensystem für den Influenza-A-Nachweis zielt auf ein Amplikon ab, das dem in der Veröffentlichung von Jørgensen beschriebenen Design ähnelt, aber eine Verschiebung aufweist.

Nachweisgrenze/analytische Sensitivität für CP:

SARS-CoV-2: 10 Kopien/ μ l

Flu A: 5 Kopien/ μ l

Flu B: 50 Kopien/ μ l

CI Cy5: 50 Kopien/ μ l

Nachweisgrenze/analytische Sensitivität für 1. Internationalen WHO-Standard für SARS-CoV-2-RNA (Cut-off 95 %):

SARS-CoV-2: 5,31 Kopien/ μ l

Nachweisgrenze/analytische Sensitivität für eine synthetische SARS-CoV-2-RNA (Twist Biosciences, USA):

SARS-CoV-2: 12,5 Kopien/ μ l

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

Nachweisgrenze/analytische Sensitivität für Plasmid, das die dänische Variante nachahmt (influenza AH3N2):

SARS-CoV-2: 10 Kopien/μl

Flu A: 10 Kopien/μl

Flu B: 50 Kopien/μl

CI Cy5: 50 Kopien/μl

Sensitivitätsstudie mit 107 bekannt positiven Proben, die in bekannt negativen Proben auf 3x LOD verdünnt wurden: 100 % Sensitivität (Nachweis von 107 Proben / 107)

- **Störsubstanzen:** 7 Substanzen aus dem AcroMetrix™ Inhibition Panel REF 956400 Kit, Oxymetazolin und Zanamivir. Der Positivprobe wurde vor der Extraktion eine hohe Konzentration zugesetzt, die in einigen Medikamenten enthalten sein kann: Es wurde kein Einfluss der getesteten Störsubstanzen auf das Ergebnis festgestellt.

Signalvariabilität auf FAM-, HEX-, Texas-Red- und Cy5-Kanälen

- Variabilität innerhalb eines Experiments:

Mittlerer VK innerhalb einer Charge (%)	Flu A	Flu B	SARS-CoV-2	Endogenes ctrl-Gen
CFX96™	0,26	0,67	0,52	1,11
T-COR 8®-IVD	1,67	1,40	1,18	1,58
LC480®	0,25	0,56	0,50	0,25
MIC®	3,20	0,39	1,26	2,12

VK: Variationskoeffizient

- Variabilität zwischen verschiedenen Produktionschargen:

Mittlerer VK zwischen verschiedenen Chargen (%)	Flu A	Flu B	SARS-CoV-2	Endogenes ctrl-Gen
CFX96™	0,68	0,81	1,14	3,71
T-COR 8®-IVD	3,44	3,17	1,09	2,80
LC480®	1,42	1,06	1,03	0,94
MIC®	2,66	4,77	5,78	6,98

VK: Variationskoeffizient

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

Diagnostische Spezifität

Diese Validierung umfasste:

- 505 SARS-CoV-2-negative Proben, die mit CE-gekennzeichneten Tests vorgetestet und als negativ charakterisiert wurden.
- 32 Proben, die negativ für alle bekannten Coronaviren waren, darunter auch Proben respiratorischer Panels, die für andere Viren charakterisiert worden waren, um auf Kreuzreaktionen zu testen.
- 1 Probe, die positiv für CoV NL63 war.

Anzahl der Proben	Positivprobe für	Coronavirus	SARS-CoV-2-Status mit EBX-043
3	Adenovirus	Negativ	Negativ
2	Parainfluenzae	Negativ	Negativ
7	Rhinovirus	Negativ	Negativ
1	Legionella pneumoniae	Negativ	Negativ
1	Mycoplasma pneumoniae	Negativ	Negativ
3	Mycoplasma tuberculosis	Negativ	Negativ
1	Parainfluenza Typ 4	Negativ	Negativ
3	Enterovirus	Negativ	Negativ
3	Streptococcus pneumoniae	Negativ	Negativ
1	Staph. epiderm/oralis/mitis/sanguis	Negativ	Negativ
2	Candida albicans	Negativ	Negativ
2	Pseudomonas aeruginosa	Negativ	Negativ
1	CoV NL63	Negativ	Negativ
3	VRS	Negativ	Negativ

Es wurde eine *In-silico*-Analyse durchgeführt, die die Spezifität der Primer und Sonden für SARS-CoV-2 belegt. So wurden beispielsweise bei den Sequenzen der MERS- und SARS-Viren keine signifikanten Homologien der SARS-CoV-2-Primer und -Sonden gefunden, die diese Viren amplifizieren könnten.

Es wurde keine Aspezifität oder Kreuzreaktion nachgewiesen.

Das Kit ist 100 % spezifisch.

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

Diagnostische Sensibilität und Spezifität

Die Validierung der Leistung erfolgte an:

538 negative Proben	
505 SARS-CoV-2-negative Proben	Mit EBX-041 Kit charakterisiert, CE-gekennzeichnet
33 positive respiratorische Proben	RSV-A/B, Parainfluenzae, Rhinovirus, Metapneumovirus, CoV NL63

305 positive Proben	
140 SARS-CoV-2-positive Proben	Mit EurobioPlex EBX-041 CE-IVD Kit charakterisiert
59 Influenza-B-positive Proben	Mit Seegene Allplex SARS-Cov-2 Flu A / Flu B / RSV Assay charakterisiert
106 Influenza-A-positive Proben	Mit Seegene Allplex SARS-Cov-2 Flu A / Flu B / RSV Assay charakterisiert

Für diese Studie wurde die Extraktion der Proben auf Maelstrom 9600 (TANBead) mit dem OptiPure Viral Auto Plate Kit (Bestellnr.: W665A46) und die RT-PCR auf CFX96 (Bio-Rad) durchgeführt.

Die Gesamtleistung ist wie folgt:

		EBX-043		
		Flu A		
		POSITIV	NEGATIV	GESAMT
Vorgetestet	POSITIV	106	0	106
	NEGATIV	2	707	709
		Flu B		
		POSITIV	NEGATIV	GESAMT
Vorgetestet	POSITIV	59	0	59
	NEGATIV	3	753	756
		SARS-CoV-2		
		POSITIV	NEGATIV	GESAMT
Vorgetestet	POSITIV	140	0	140
	NEGATIV	0	505	505

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

	Sensitivität %	Spezifität %	Übereinstimmung %
FLU A	> 98 %	> 99 %	> 99 %
FLU B	95,16 %	> 99 %	> 99 %
SARS-CoV-2	> 99 %	> 99 %	> 99 %

BESONDERHEITEN DES REAL-TIME-PCR-GERÄTS T-COR 8®-IVD

T-COR 8®-IVD ist ein Real-Time-PCR-Gerät mit 8 unabhängig voneinander programmierbaren Vertiefungen, die patientenspezifisch unabhängig voneinander in Bezug auf die durchgeführten Assays, die thermischen Programme und den zeitlichen Ablauf des PCR-Laufs verwendet werden können.

Alle 8 Vertiefungen können auch gleichzeitig mit demselben Assay verwendet werden.

Hinweis: Mischen Sie die Probe nach dem Einfüllen in das Röhrchen durch Auf- und Abpipetieren gut durch, vermeiden Sie dabei die Bildung von Blasen und stellen Sie sicher, dass sich das Flüssigkeitsvolumen am Boden des Röhrchens befindet. Verschließen Sie jedes Röhrchen nach dem Einfüllen der Kontrolle oder der Probe gut, um eine Kontamination zu vermeiden.

Kontrollen

Am T-COR 8®-IVD sollten die Positiv- und Negativkontrollen zumindest bei der ersten Verwendung eines neuen Kits mitgeführt werden.

Danach kann mit der endogenen Kontrolle sichergestellt werden, dass die Extraktion korrekt durchgeführt wurde und dass in der getesteten Probe keine PCR-Inhibition vorliegt und dass die PCR korrekt funktioniert.

Fluorophore

Am T-COR 8®-IVD sind 4 Fluorophor-Kombinationen verfügbar.

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

Für alle EBX, einschließlich EBX-043, wird die Kombination FAM/HEX/Texas Rot/Cy5 gewählt. Wenn einige Kanäle bei Gebrauch mancher Kits nicht verwendet werden, müssen Sie dies bei der Analyse der Ergebnisse nicht berücksichtigen.

Verwendung der Barcodes

- 1- Wählen Sie Menü > Neue Analyse/New Run
- 2- Wählen Sie Barcode
- 3- Scannen Sie den entsprechenden Barcode auf der rechten Seite des Geräts:
 - entweder für die Positivkontrolle (Barcode EBX-043 Pos Ctrl)
 - oder für die Negativkontrolle (Barcode EBX-043 Neg Ctrl)
 - oder für eine Probe (Barcode EBX-043)

Das Gerät wählt automatisch eine der 8 verfügbaren Vertiefungen. Befolgen Sie die Anweisungen am Gerät.

- 4- Öffnen Sie die Klappe der vom Gerät ausgewählten Vertiefung x und prüfen Sie, ob die blaue LED leuchtet, wählen Sie dann „Ja / Yes“.
- 5- Stellen Sie das Gefäß in die entsprechende Vertiefung und schließen Sie die Klappe wieder. Klicken Sie dann „Weiter / Next“ an.
- 6- Wenn Sie einen Namen eingeben möchten (optional), wählen Sie „Probe x / Sample x“ und geben Sie einen Namen ein. Wählen Sie „Annehmen / Accept“.
- 7- Wählen Sie „Weiter / Next“.
- 8- Um eine weitere Kontrolle oder Probe hinzuzufügen/zu testen, klicken Sie auf „Vertiefung hinzufügen / Add well“ und beginnen Sie erneut mit Punkt 3-.
- 9- Wählen Sie „Analyse starten / Start Run“.

Hinweis: Der Name einer Probe oder eines Laufs kann nicht nach dem Ende des Laufs geändert oder hinzugefügt werden. Dies muss vor oder während des Laufs geschehen.

Darstellung und Interpretation der Ergebnisse

Die Ct-Ergebnisse und Amplifikationskurven sind über die Tabelle „SmartCT™ Werte / Smart-CT™ Values“ (zugewiesene Ct-Werte auf jedem Kanal) und die Ct-vs.-Lauf-Diagramme auf jedem Kanal verfügbar; beides kann in Echtzeit auf der Maschine angesehen werden. Eine Analyse für die Negativ- und Positivkontrollen sowie für die Proben wird automatisch erstellt. Diese ist am Ende des Laufs im Fenster „Ansicht / View“ unter „Auswertungen / Interpretations“ abrufbar.

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

Bei Positiv- und Negativkontrollen sind folgende Ergebnisse möglich:

"Neg Ctrl Fail": nicht gültig

"Neg Ctrl Valid": gültig

"Pos Ctrl Fail": nicht gültig

"Pos Ctrl Valid": gültig

Statusbestimmung bei Proben:

„Detektiert / Detected“: positiv → grünes Kästchen

„Nicht detektiert / Non Detected“: negativ → rotes Kästchen

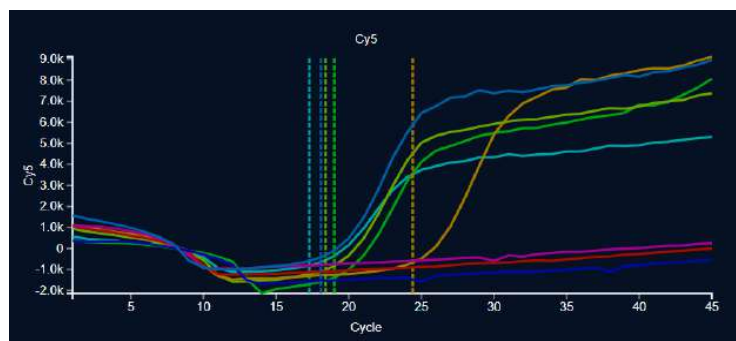
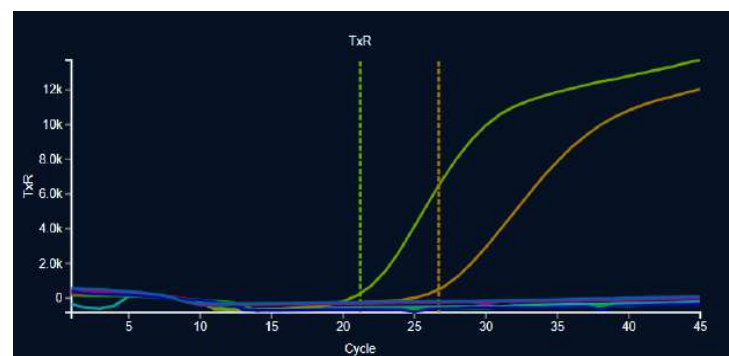
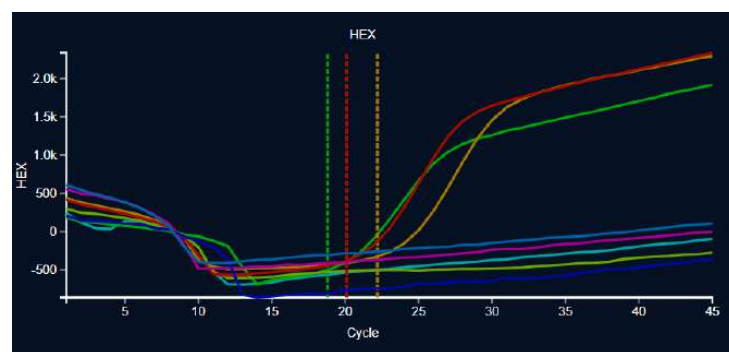
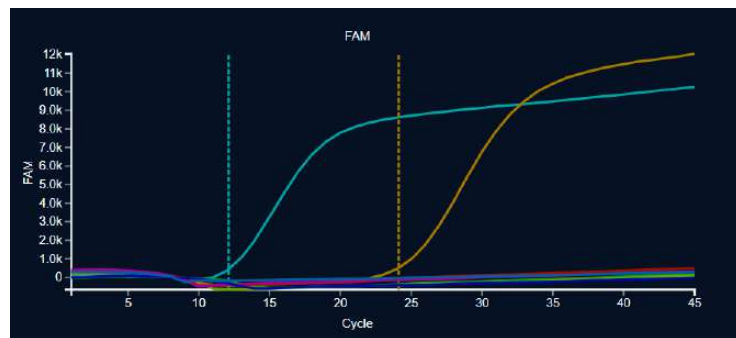
"Nicht gültig / Invalid": ungültiges Ergebnis -> erneut testen -> gelbes Kästchen

Beispiel für die Darstellung einer automatischen Interpretation der Ergebnisse

Summary									
Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5	Call	Note	
1	Sample 1	EBX-043	12.1			17.3	Detected • FLUA	FLUB, SARS-CoV-2 Negative	
2	Sample 2	EBX-043		18.8		19.0	Detected • FLUB	FLUA, SARS-CoV-2 Negative	
3	Sample 3	EBX-043			21.2	18.4	Detected • SARS-CoV-2	FLUA, FLUB Negative	
4	Ctrl POS	EBX-043 Pos Ctrl	24.1	22.2	26.7	24.4	Detected • Pos Ctrl	Pos Ctrl Valid	
5	Ctrl POS	EBX-043 Pos Ctrl	20.1				Invalid	Pos Ctrl Fail	
6	Ctrl NEG	EBX-043 Neg Ctrl					Detected • Neg Ctrl	Neg Ctrl Valid	
7	Sample 4	EBX-043					Invalid	Retest	
8	Sample 5	EBX-043				18.1	Not Detected	FLUA, FLUB, SARS-CoV-2 Negative	

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

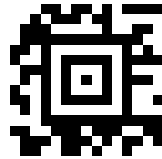
Beispiel für Amplifikationskurven



EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

Barcodes am T-COR8®-IVD für EBX-043

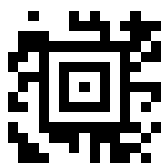
EBX-043 Pos Ctrl
Positivkontrolle



EBX-043 Neg Ctrl
Wasser = Negativkontrolle (CN-H2O)



EBX-043



14. Literatur

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.

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

Jørgensen RL, Lerche CJ, Pedersen MS, Kirkby NS, Botnen AB, Trebbien R, Nilsson-Møller S, Pinholt M, Nielsen ACY, Westh H, Lisby JG, Schneider UV. Emergence of circulating influenza A H3N2 viruses with genetic drift in the matrix gene: be alert of false-negative test results. *APMIS.* 2022 Oct;130(10):612-617. doi: 10.1111/apm.13262. Epub 2022 Aug 10. PMID: 35836366; PMCID: PMC9544743.

EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2

15. Qualitätskontrolle

In Übereinstimmung mit dem nach ISO EN 13485 zertifizierten Qualitätsmanagementsystem von Eurobio wird jede Charge des EurobioPlex Flu A/Flu B/SARS-CoV-2 Kits nach vordefinierten Spezifikationen getestet, um eine gleichbleibende Produktqualität zu gewährleisten.

16. Abfallentsorgung

Die Entsorgung des Abfalls hat gemäß den gesetzlichen Bestimmungen für die Beseitigung von klinisch infektiösem Material (DASRI = Déchets d'activité de soins à risques infectieux) zu erfolgen.

17. Vorfallmeldung

Jeder schwerwiegende Zwischenfall, der im Zusammenhang mit dem Testsystem auftritt, muss an Eurobio Scientific gemeldet werden.

18. Technische Unterstützung

Wenn Sie Hilfe zu unseren Produkten benötigen, wenden Sie sich bitte an unseren technischen Kundenservice.

Sie erreichen den Eurobio Scientific Kundenservice unter der E-Mail-Adresse adv@eurobio-scientific.com oder unter der Telefonnummer +33 (0)1.69.79.64.80.

Änderungsverfolgung

Datum	Version	Revision
17/02/2023	v2.00	Zusätzliche klinische Studie über Influenza-A- und -B-Proben. Validierung des EBX-043 an einem neuen Gerät: MIC®. Studie über eine neue FLU A H3N2 dänische Variante.
03/05/2022	v1.00	Erstellung



eurobio
SCIENTIFIC

7, avenue de Scandinavie
91940 Les Ulis Cedex
FRANCE