

Instructions for Use EurobioPlex Multi-Fast STI



EurobioPlex Multi-Fast STI

REAL-TIME RT-PCR

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

REF

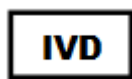
EBX-051-100

EBX-051-200

EBX-051-600



100/200/600 reactions



Reference EBX-051 Version 2.02 – 29/10/2024

Validated on:

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) with analysis on CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)



Instructions for use

Available on request from info@eurobio-scientific.com

The Summary of Safety and Performance Characteristics (SSPC) will be made available by the Notified Body on EUDAMED once it is operational. It can also be obtained on request.

Instructions for Use EurobioPlex Multi-Fast STI

ENGLISH.....1

FRANÇAIS.....24

Table of contents

1. Introduction 3

2. Purpose of the system 4

3. Symbols..... 5

4. Principle of detection 6

5. Content of the kit..... 7

6. Storage..... 7

7. Materials required not provided 8

8. Real-time PCR instrument 8

9. Cautions and note..... 8

10. Procedure 10

11. Validation of the experiment 14

12. Data analysis and interpretation 17

13. Performance analysis 18

14. Bibliography..... 22

15. Quality control..... 22

16. Waste disposal..... 23

17. Incident report..... 23

18. Technical assistance 23

Instructions for Use EurobioPlex Multi-Fast STI

1. Introduction

Sexually transmitted infections (STIs) are a major public health problem worldwide. This is particularly true in the developing countries of South-East Asia, Africa and Latin America, where STIs are one of the most common causes of illness and death. These diseases have a heavy impact on health but also have serious social and economic consequences.

More than 30 sexually transmitted pathogens are known worldwide, including bacteria, viruses, fungi, protozoa and ectoparasites. Among the best known and most important are chlamydia, trichomoniasis, gonorrhoea, diseases resulting from infections with the bacterium *Mycoplasma genitalium* or infections with the human papilloma virus and herpes virus.

According to a WHO estimate, bacterial STIs account for over 300 million cases per year worldwide.

In Europe, there has been a significant increase in these diseases over the last ten years. This is particularly true of chlamydia, which is often asymptomatic and therefore not diagnosed. The same applies to gonorrhoea in women.

Reliable, sensitive and rapid diagnosis is very important because these conditions can be treated effectively with antibiotics in the early stages of infection without leaving any sequelae.

Late diagnosis and treatment of STIs can lead to significant health consequences, such as chronic pelvic pain, ascending infection or ectopic pregnancy. In addition, the transmission of these pathologies to the foetus or child can lead to serious neurological sequelae as well as infertility in women and men.

The EurobioPlex EBX-051 has been designed to detect four of the main bacteria causing sexually transmitted infections: *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Nesseria gonorrhoeae* and *Trichomonas vaginalis*. In order to greatly improve diagnostic sensitivity, certain targets are detected on several genes of interest (3 genes of interest for *chlamydia trachomatis*, 2 genes of interest for *Nesseria gonorrhoeae*, 1 gene of interest for *Mycoplasma genitalium* and 1 gene of interest for *Trichomonas vaginalis*)

The diagnosis should always be made by medical personnel and in the clinical, historical and symptomatic context of the patient.

The kit can test 98 patients (100 tests) or 198 patients (200 tests) in addition to the required positive and negative control.

The RNA/DNA extract is the starting material for the EurobioPlex Multi-Fast STI kit. It is the responsibility of the user to use extraction methods appropriate to the samples tested.

The kit has been tested on the following types of samples:

- Urine
- Vaginal swabs
- Cervical swabs

Instructions for Use EurobioPlex Multi-Fast STI

2. Purpose of the system

The EurobioPlex Multi-Fast STI is a nucleic acid (RNA/DNA) amplification test for four bacteria causing sexually transmitted infections based on 1 multiplex RT-PCR assay (3 target genes for *Chlamydia trachomatis*; 2 target genes for *Nisseria gonorrhoeae*; 1 target gene for *Mycoplasma genitalium* and 1 target gene for *Trichomonas vaginalis*), in a single well. If only one of the target gene sequences is amplified, the diagnosis can be made directly positive for the given pathogen (see Data Analysis and Interpretation of Results).

Qualified medical laboratory personnel must use the EurobioPlex Multi-Fast STI test.

This device is not intended for the screening of sexually transmitted infections in blood or organ banks.

Instructions for Use EurobioPlex Multi-Fast STI

3. Symbols



Reference



Batch number



Limits of storage temperature



Expiration date



Content sufficient for « N » reactions



Manufacturer



Manufacturing date



CE marked product



In Vitro Diagnostic Medical Device



Instructions for use



Store away from light



Do not use if packaging is damaged



Caution

Instructions for Use EurobioPlex Multi-Fast STI

4. Principle of detection

The EurobioPlex Multi-Fast STI is a nucleic acid (RNA/DNA) amplification test for four bacteria causing sexually transmitted infections based on 1 multiplex RT-PCR assay (3 target genes for *Chlamydia trachomatis*; 2 target genes for *Nisseria gonorrhoeae*; 1 target gene for *Mycoplasma genitalium* and 1 target gene for *Trichomonas vaginalis*), in a single well. If only one of the target gene sequences is amplified, the diagnosis can be made directly positive for the given pathogen (see Data Analysis and Interpretation of Results).

The kit contains 1 oligomix to detect the 4 bacterial targets, plus an endogenous control. The test is performed on RNA/DNA extracted from samples using a 1-well/tube reaction.

The detection of several genes of interest bacteria as well as the Reverse Transcription step ensure the sensitivity and specificity of the test. The presence of a human housekeeping gene as a control for sample quality, DNA extraction and RT-PCR inhibition allows for the identification of possible variations that may occur during the DNA extraction from biological samples and real-time RT-PCR amplification steps. This ensures that a negative result cannot be due to poor extraction of NAs and/or the presence of too many RT-PCR inhibitors.

The RNA/DNA of the 4 bacterial targets is detected using gene-specific probes labelled with FAM (target 1/*Chlamydia trachomatis*), HEX (target 2/*Nisseria gonorrhoeae*), Texas Red (target 3/*Mycoplasma genitalium*) and Quasar705 (target 4/*Trichomonas vaginalis*) respectively. Endogenous control is detected using a CY5-labelled probe. During elongation of the amplification product, the probes emit specific fluorescence following their hydrolysis. The measurement of fluorescence intensity in real time is relative to the accumulation of amplification products.

Fluorescence is emitted and individually recorded through optical measurements during the PCR. The detection of the amplified fragment is performed by a fluorimeter using the channels shown in the Table 1.

Table 1: Detection of targets by fluorophores

Cible	Fluorophore	Excitation	Emission
Target 1/ <i>Chlamydia trachomatis</i>	FAM	495 nm	515 nm
Target 2/ <i>Nisseria gonorrhoeae</i>	HEX	535 nm	555 nm
Target 3/ <i>Mycoplasma genitalium</i>	Texas red	585 nm	605 nm
Target 4/ <i>Trichomonas vaginalis</i>	Quasar705	681 nm	698 nm
Endogenous control	Cy5	650 nm	670 nm

Instructions for Use EurobioPlex Multi-Fast STI

Recommended equivalent channels on different PCR instruments:

- **FAM channel** (CFX96, QuantStudio 5, QuantStudio 6), Green channel (Rotor-Gene Q),
- **HEX channel** (CFX96), VIC channel (QuantStudio 5, QuantStudio 6), Yellow channel (Rotor-Gene Q),
- **Texas Red channel** (CFX96, QuantStudio 6), Orange channel (Rotor-Gene Q), Rox channel (QuantStudio 5),
- **Cy5 channel** (CFX96, QuantStudio 5, QuantStudio 6), Red channel (Rotor-Gene Q),
- **Quasar 705 channel** (CFX96, QuantStudio 5, QuantStudio 6), Purple channel (Rotor-Gene Q).

5. Content of the kit

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

Table 2: Content of the kit

Cap color	Content of the kit	100 reactions	200 reactions	600 reactions	Reconstitution
Red	Enzymes	540 µl	1080 µl	2 x 1275 µl	Ready to use
Transparent	Oligomix	432 µl	864 µl	2 x 1020 µl	Ready to use
Yellow	Positive Control CP	160 µl	320 µl	2 x 160 µl	Ready to use
Blue	Water = negative control (CN-H ₂ O)	1500 µl	1500 µl	2 x 1500 µl	Ready to use

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

6. Storage

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

All reagents can be used until the expiration date indicated on the kit label.



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

Instructions for Use EurobioPlex Multi-Fast STI

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 Multi-Fast STI kit has been developed and validated for use with the following real-time PCR instruments:

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) with analysis on CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)

9. Cautions and note



Read these instructions carefully before starting the procedure.

- ◇ This experimentation should be performed by medical laboratory technicians.
- ◇ The local and national biosafety regulations in place for the detection of STIs must be followed strictly at all times, especially in laboratories and with laboratory equipment in agreement.
- ◇ Ensure that instruments have been installed, calibrated and maintained in accordance with the manufacturer's recommendations.
- ◇ It is the responsibility of the user to use equipment other than that validated, and in such cases performance is not guaranteed.
- ◇ Clinical samples should be considered as potentially infectious material and should be prepared in a laminar flow cabinet.
- ◇ This experiment should be performed according to good laboratory practice.
- ◇ Do not use this kit after the stated expiration date.

Instructions for Use EurobioPlex Multi-Fast STI

- ◇ 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.
- ◇ The kit is not intended for single use. When reusing the device, it is necessary to follow the recommendations concerning authorized freeze-thaw cycles, and precautions to prevent contamination of the reagents. Once reagents have thawed, centrifuge tubes briefly before use.
- ◇ Reagents must be thawed carefully so as not to affect device performance (at +2°C/+8°C or room temperature)
- ◇ Kit components must not be used separately (neither with other reagents, nor with reagents from other batches).
- ◇ 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 (talco-free) should be worn in each work area.
- ◇ Pipettes, reagents and other working materials should not be moved between these areas.
- ◇ Special care should be taken to maintain the purity of reagents and reaction mixtures.
- ◇ The internal endogenous control detects a detectable cell target in all samples of human origin but not in the CN-H2O negative control provided in the kit. The absence of a signal in the negative control prevents cross-contamination from occurring.
- ◇ Appropriate RNA preparation/extraction methods for quality RNA production and RT-PCR application should be used, especially to avoid contamination with RNAs.
- ◇ Use filter tips for micropipettes, RNase-free and DNase-free.
- ◇ Do not pipette with the mouth. Do not eat, drink or smoke in the laboratory.
- ◇ Avoid aerosols.

Instructions for Use EurobioPlex Multi-Fast STI

10. Procedure

a. Samples collection

- ◇ Collect samples in sterile tubes.
- ◇ It is the responsibility of the user to control their own sample collection, transport, storage and extraction conditions to ensure that RNA/DNA extraction using appropriate systems produces RNA/DNA of high quality.
- ! It is recommended that samples are extracted immediately, or stored according to the sample storage recommendations before extraction (Table 3).

Table 3: Storage recommendations before use

Recommendations for maximum storage of samples before extraction	
Ambient temperature	2 h
4°C	72 h
-20°C (preferably -80°C)	Long-term storage

Caution	
	◇ The user may refer to the recommendations issued by the World Health Organization or the French National Authority for Health for the proper storage of samples. ◇ Extracted RNA should be stored at -80°C. ◇ The transport of clinical samples is subject to local regulations for the transport of infectious agents.

b. RNA/DNA 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 RNA/DNA extraction methods suitable to the samples used, and to refer to the instructions of the supplier of the extraction kit used.

In the EBX-051 kit, the endogenous internal control on the Cy5 channel is already present in the clinical sample. Properly detected after amplification, the endogenous internal control is used to ensure the quality of the sample and the extraction. The performance described in this document was obtained with the following extraction technique: Maelstrom 9600 (TanBEAD) and the OptiPure Viral Auto Plate kit (ref: W665A46).

Instructions for Use EurobioPlex Multi-Fast STI

c. Real-time RT-PCR

General note:

- The positive control contains high concentrations of matrix. Handling must be done carefully to avoid contamination.
- To confirm that the RT-PCR is working correctly, it is necessary to test the positive control, as well as the negative control (water supplied = CN-H₂O) (see II-2/6 of the real-time RT-PCR protocol).

Instructions for Use EurobioPlex Multi-Fast STI

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

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	45	-
	60°C	10 sec		Acquisition of fluorescence

Instructions for Use EurobioPlex Multi-Fast STI

d. Detailed procedure

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

Number of reactions	N+3
Enzymes	(N+3) x 3,75 µl
Water	(N+3) x 3,25 µl
Oligomix	(N+3) x 3 µl
Total Volume Mastermix	(N+3) x 10 µl

**For smaller series (≤ 10): preparing for N+2 is sufficient.*

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

Program	Temperature	Duration	Cycle(s)	
Reverse Transcription	45°C	5 min	1	-
Denaturation	98°C	20 sec	1	-
Amplification	98°C	3 sec	45	-
	60°C	10 sec		Acquisition of fluorescence

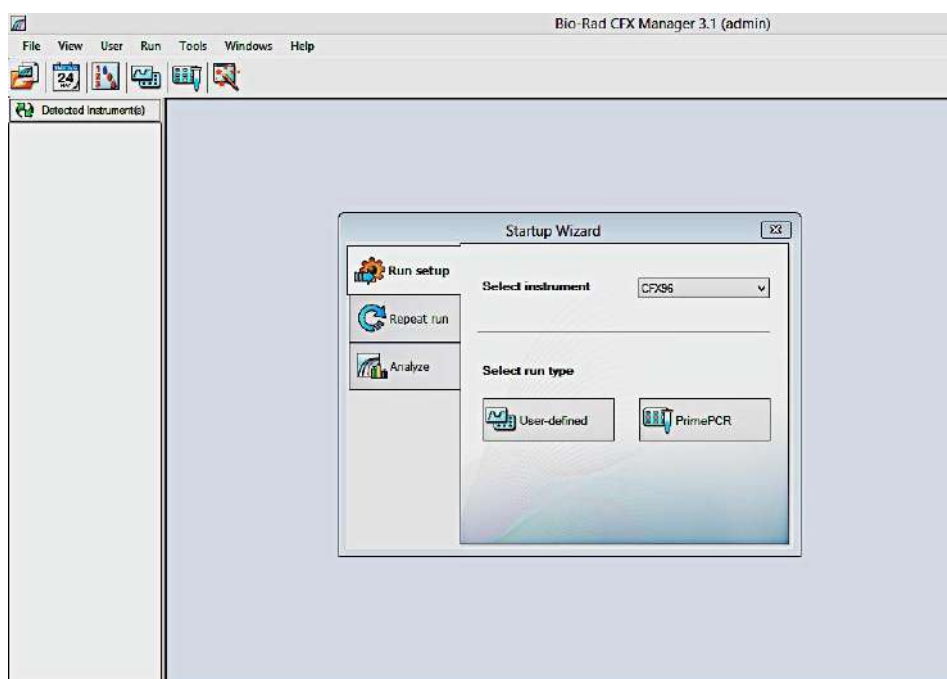
Note 1: On the CFX96™ (Bio-Rad), start the run from version 1.6 or later, then analyse with version 3.1 (see § Validation of the experiment). **Please ensure that white PCR plates are used for appropriate reading in all channels.**

Instructions for Use EurobioPlex Multi-Fast STI

11. Validation of the experiment

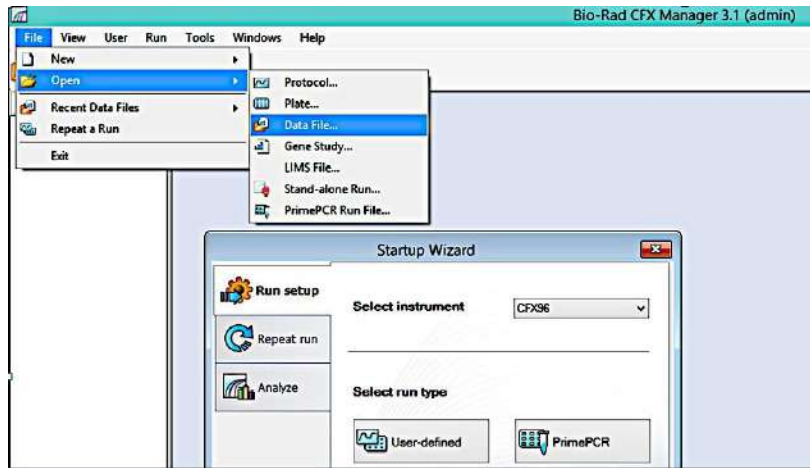
Post-acquisition data analysis on a CFX96 PCR instrument (Bio-Rad) must be performed using version 3.1 of the CFX Manager software (Bio-Rad). In order to change to this version from a run started on an earlier version, please follow the procedure below: At the end of the run, the data file with the extension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



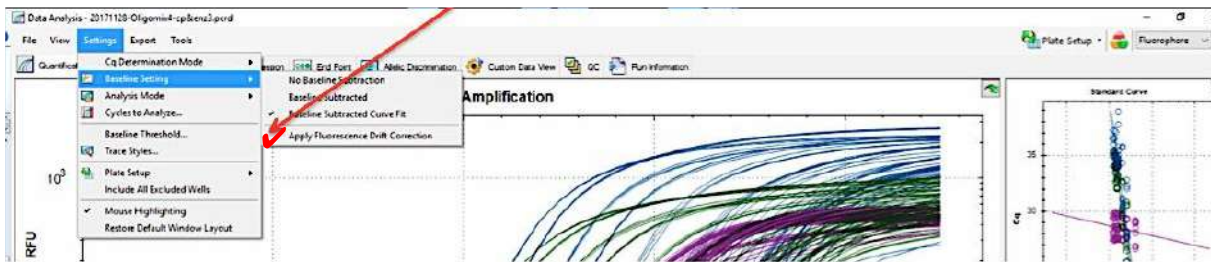
Click on "File" and select "Open" then "Data File".

Instructions for Use EurobioPlex Multi-Fast STI

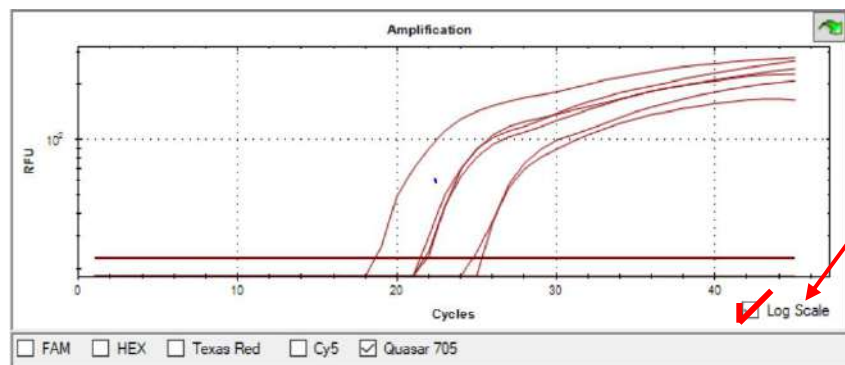


Select the file you need to analyse and click on "Open".

The "Drift correction" option must be applied in the "Settings" tab as shown in the image below: click on the "Settings" tab, then on "Baseline Setting" and on "Apply Fluorescence Drift Correction".

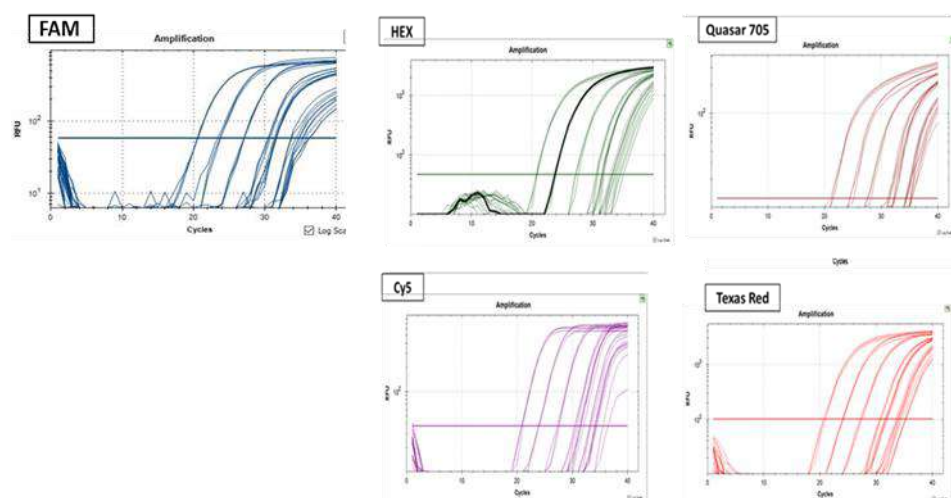


To optimise the run analysis, select the "Log Scale" checkbox for each channel analysed. Then place the threshold bar above the background noise corresponding to the middle of the exponential phase. The 5 channels of interest have high RFUs and differ according to the channel considered, so the "Log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



Instructions for Use EurobioPlex Multi-Fast STI

Once this step has been completed, the analysis can proceed for the 5 channels considered **FAM**, **HEX**, **Texas Red**, **CY5** and **Quasar 705**.



To validate the assay, the Ct values for the controls must be the following (Table 4). Outside of these values, the experiment cannot be validated.

Table 4: Run validation

Positive Control	
FAM	Ct ≤ 30
HEX	Ct ≤ 30
Texas Red	Ct ≤ 30
Cy5	Ct ≤ 30
Quasar 705	Ct ≤ 30
Negative Control	
FAM	Ct not determined
HEX	Ct not determined
Texas Red	Ct not determined
Cy5	Ct not determined
Quasar 705	Ct not determined

Instructions for Use EurobioPlex Multi-Fast STI

12. Data analysis and interpretation

For clinical samples, the following results are possible:

* Ct threshold for sample: + Positive → positive Ct < 45


<i>Mycoplasma genitalium</i> (Texas Red), <i>Chlamydia trachomatis</i> (FAM), <i>Nisseria gonorrhoeae</i> (HEX), <i>Trichomonas vaginalis</i> (Quasar 705), Contrôle interne endogène (Cy5) : Ct < 45

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

Table 5: Detection of targets of interest

PCR signal CT and/or NG and/or MG and/or TV	Endogenous control	Presence of bacteria	Validité du test/commentaire
FAM and/or HEX and/or Texas Red and/or Quasar705	Cy5		
+	+	Yes	VALIDATE
-	+	NO	VALIDATE
+	-	Yes	VALIDATE Possible PCR inhibition or extraction problem that does not prevent bacteria detection.
-	-	NI*	NI*

*NI : not interpretable because of RT-PCR inhibition or extraction problems: no conclusion can be given. It is then recommended to collect a new sample and/or repeat the extraction and/or dilute the sample 5 times.

Limitations on use and interpretation:

- ❖ The EurobioPlex Multi-Fast STI kit is used for first-line diagnostic purposes.
- ❖ All samples should be treated as potentially infected with bacteria of interest, 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,
- Inappropriate extraction conditions or use of non-validated PCR instruments,
- Experimentation not respecting all elements of these instructions for use.

False positives may be due to:

- Contamination due to mishandling of high positive samples, the positive control, or the PCR amplification products,

Instructions for Use EurobioPlex Multi-Fast STI

- Failure to follow the procedure described in these instructions for use, especially to avoid sources of contamination.
- ❖ All results should be interpreted by medical professionals in the context of the patient's clinical situation, history and symptoms.
- ❖ This assay does not exclude the presence of pathogens other than those targeted in the kit.
- ❖ A negative result of this assay does not absolutely exclude a possible infection with the bacteria targeted in this kit.

13. Performance analysis

Detection limit / analytical sensitivity

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

Detection limitation/analytical sensitivity on CP:

Chlamydia trachomatis (CT): 2.5 copies/ μ L

Nisseria gonorrhoeae (NG): 5 copies/ μ L

Mycoplasma genitalium (MG) : 5 copies/ μ L

Trichomonas vaginalis (TV) : 5 copies/ μ L

CI Cy5 : 10 copies/ μ L

In addition, a Probit analysis was performed to determine the 95% cut-off, the results are as follows:

95% detection/sensitivity limit on CP:

Chlamydia trachomatis (CT) : 1.2 copies/ μ L

Nisseria gonorrhoeae (NG): 2.8 copies/ μ L

Mycoplasma genitalium (MG) : 3.3 copies/ μ L

Trichomonas vaginalis (TV) : 3.2 copies/ μ L

CI Cy5 : 4.6 copies/ μ L

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

- Intra-experimental variability:

	EBX-051				
	CY 5	FAM	HEX	Quasar705	Texas Red
Moyenne CV intralot CP en %	0.53	0.22	0.29	0.55	0.34

CV: coefficient of variation

Instructions for Use EurobioPlex Multi-Fast STI

- Inter-batch variability:

	EBX-051				
	CY 5	FAM	HEX	Quasar705	Texas Red
CV moyen inter lots CP en %	4.76	3.40	0.37	0.39	0.69

CV: coefficient of variation

Diagnostic specificity

This validation was carried out on:

- 458 negative samples, pretested and characterized by CE approved tests.
- 16 samples negative for all target pathogens in the EBX-051 kit but positive for other bacteria, to test for cross-reactions

Référence	Bactérie	Forme	Fournisseur
01036P	Candida tropicalis derived from ATCC® 1369™	KWIK-STIK	ATCC®
01172P	Cryptococcus neoformans derived from ATCC® 13690™	KWIK-STIK	ATCC®
01169P	Citrobacter freundii derived from ATCC® 8454™	KWIK-STIK	ATCC®
0405P	Neisseria lactamica derived from ATCC® 23970™	KWIK-STIK	ATCC®
0410P	Gardnerella vaginalis derived from ATCC® 14018™	KWIK-STIK	ATCC®
01262P	Lactobacillus brevis derived from ATCC® 14869™	KWIK-STIK	ATCC®
0120P	Bacillus subtilis subsp. subtilis derived from ATCC® 6051™	KWIK-STIK	ATCC®
0885P	Lactobacillus acidophilus derived from ATCC® 314™	KWIK-STIK	ATCC®
01018P	Enterobacter cloacae subsp. cloacae derived from ATCC® BAA-1143™	KWIK-STIK	ATCC®
0737P	Candida glabrata derived from ATCC® 15126™	KWIK-STIK	ATCC®
01089P	Enterococcus faecalis derived from ATCC® 51575™	KWIK-STIK	ATCC®
0475P	Moraxella osloensis derived from ATCC® 10973™	KWIK-STIK	ATCC®
0468P	Acinetobacter lwoffii derived from ATCC® 15309™	KWIK-STIK	ATCC®
0404P	Neisseria meningitidis derived from ATCC® 13102™	KWIK-STIK	ATCC®
0911P	Alcaligenes faecalis subsp. faecalis derived from ATCC® 35655™	KWIK-STIK	ATCC®
0870P	Aeromonas hydrophila derived from ATCC® 7966™	KWIK-STIK	ATCC®

RNA extraction was performed on the following systems:

- Maelstrom 9600 (TANBead) et le kit OptiPure Viral Auto Plate (réf : W665A46).

Instructions for Use EurobioPlex Multi-Fast STI

	Bacteria	EBX-051
	Candida tropicalis derived from ATCC® 1369™	NEGATIVE
	Cryptococcus neoformans derived from ATCC® 13690™	NEGATIVE
	Citrobacter freundii derived from ATCC® 8454™	NEGATIVE
	Neisseria lactamica derived from ATCC® 23970™	NEGATIVE
	Gardnerella vaginalis derived from ATCC® 14018™	NEGATIVE
	Lactobacillus brevis derived from ATCC® 14869™	NEGATIVE
	Bacillus subtilis subsp. subtilis derived from ATCC® 6051™	NEGATIVE
	Lactobacillus acidophilus derived from ATCC® 314™	NEGATIVE
	Enterobacter cloacae subsp. cloacae derived from ATCC® BAA-1143™	NEGATIVE
	Candida glabrata derived from ATCC® 15126™	NEGATIVE
	Enterococcus faecalis derived from ATCC® 51575™	NEGATIVE
	Moraxella osloensis derived from ATCC® 10973™	NEGATIVE
	Acinetobacter lwoffii derived from ATCC® 15309™	NEGATIVE
	Neisseria meningitidis derived from ATCC® 13102™	NEGATIVE
	Alcaligenes faecalis subsp. faecalis derived from ATCC® 35655™	NEGATIVE
	Aeromonas hydrophila derived from ATCC® 7966™	NEGATIVE
Extraction positive control	Neisseria gonorrhoeae derived from ATCC® 31426™	POSITIVE (for NG)

In addition to this study, an *in silico* analysis was used which demonstrates the specificity of the primers and probes for all targeted pathogens in EBX-051.

No aspecificity or cross reaction was detected.

The kit is 100% specific.

Diagnostic sensibility

The validation of the performance was performed on:

474 negative samples	
458 samples negative for all pathogens targeted in the EBX-051 kit	Characterised with the Seegene SD9400X_FT_CT-NG-MG-TV Assay marqué CE-IVD kit
16 samples positive for pathogens other than those targeted in the EBX-051 kit	Controlled by the endogenous internal control and a control strain of <i>Nesseria gonorrhoeae</i>

Instructions for Use EurobioPlex Multi-Fast STI

206 positive samples	
108 <i>Chlamydia trachomatis</i> (CT) samples	Characterised with the Seegene SD9400X_FT_CT-NG-MG-TV Assay CE-IVD kit
10 <i>Nisseria gonorrhoeae</i> (NG) samples	Characterised with the Seegene SD9400X_FT_CT-NG-MG-TV Assay CE-IVD kit
57 <i>Mycoplasma genitalium</i> (MG) samples	Characterised with the Seegene SD9400X_FT_CT-NG-MG-TV Assay CE-IVD kit
9 <i>Trichomonas vaginalis</i> (TV) samples	Characterised with the Seegene SD9400X_FT_CT-NG-MG-TV Assay CE-IVD kit
16 <i>Chlamydia trachomatis</i> (CT) and <i>Mycoplasma genitalium</i> (MG) samples	Characterised with the Seegene SD9400X_FT_CT-NG-MG-TV Assay CE-IVD kit
4 <i>Chlamydia trachomatis</i> (CT) and <i>Nisseria gonorrhoeae</i> (NG) samples	Characterised with the Seegene SD9400X_FT_CT-NG-MG-TV Assay CE-IVD kit
2 <i>Chlamydia trachomatis</i> (CT) and <i>Trichomonas vaginalis</i> (TV) sample	Characterised with the Seegene SD9400X_FT_CT-NG-MG-TV Assay CE-IVD kit

For this study, sample extraction was performed on Maelstrom 9600 (TANBead) with the OptiPure Viral Auto Plate kit (ref: W665A46), and RT-PCR on CFX96 (Bio-Rad).

Overall performances are :

		EBX-051		Total
		CT +	CT -	
Seegene	CT +	130	0	130
	CT -	0	550	550

		EBX-051		Total
		MG +	MG -	
Seegene	MG +	73	0	73
	MG -	0	607	607

		EBX-051		Total
		NG +	NG -	
Seegene	NG +	14	0	14
	NG -	0	666	666

		EBX-051		Total
		TV +	TV -	
Seegene	TV +	10	1	11
	TV -	0	669	669

Sensibility *Chlamydia trachomatis* (CT) : > 99% (130/130)
Specificity *Chlamydia trachomatis* (CT) : > 99% (550/550)
Concordance *Chlamydia trachomatis* (CT) : > 99% (680/680)

Sensibility *Mycoplasma genitalium* (MG) : > 99% (73/73)
Specificity *Mycoplasma genitalium* (MG) : > 99% (607/607)
Concordance *Mycoplasma genitalium* (MG) : > 99% (680/680)

Sensibility *Nisseria gonorrhoeae* (NG) : > 99% (14/14)

Instructions for Use EurobioPlex Multi-Fast STI

Specificity *Nisseria gonorrhoeae* (NG) : > 99% (666/666)
Concordance *Nisseria gonorrhoeae* (NG) : > 99% (680/680)

Sensibility *Trichomonas vaginalis* (TV) : 91% (10/11)
Specificity *Trichomonas vaginalis* (TV) : > 99% (669/669)
Concordance *Trichomonas vaginalis* (TV) : > 99% (679/680)

14. Bibliography

Anke Schaeffer and Birgit Henrich* "Rapid Detection of Chlamydia trachomatis and Typing of the Lymphogranuloma venereum associated L-Serovars by TaqMan PCR" BMC Infectious Diseases 2008.

Yuying Liang^{1†}, Xin Jin^{2†}, Fang Yuan^{2†}, Zhanjia Li² and Shuiping Chen^{1*} "Comparison of rRNA-based and DNA-based nucleic acid amplifications for detection of Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, and Ureaplasma urealyticum in urogenital swabs" Liang et al. BMC Infectious Diseases (2018).

Ling Qing¹, Qi-Xiang Song², Jian-Li Feng³, Hai-Yan Li¹, Guiming Liu⁴ and Hai-Hong Jiang^{1*} "Prevalence of Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Mycoplasma genitalium and Ureaplasma urealyticum infections using a novel isothermal simultaneous RNA amplification testing method in infertile males" Qing et al. Ann Clin Microbiol Antimicrob (2017).

A Pillay, F Radebe, G Fehler, Y Htun, R C Ballard "Comparison of a TaqMan-based real-time polymerase chain reaction with conventional tests for the detection of Trichomonas vaginalis" Sex Transm Infect 2007;83:126–129.

Xiao-Mei Hu^{1,2†}, Jiang-Xia Xu^{3†}, Li-Xia Jiang^{1†}, Lian-Rui Deng³, Zhen-Mei Gu⁴, Xiao-Ying Xie⁵, Hui Cai Ji⁴, Wei-Hua Wang^{1,2}, Li-Ming Li⁶, Cheng-Nan Tian⁷, Fang-Li Song⁸, Shao Huang^{8*}, Lei Zheng^{4*} and Tian-Yu Zhong^{1,2*} « Design and Evaluation of a Novel Multiplex Real-Time PCR Melting Curve Assay for the Simultaneous Detection of Nine Sexually Transmitted Disease Pathogens in Genitourinary Secretions » Frontiers in cellular and infection microbiology, 2019.

Rochelle P. Walensky, MD, MPH, Director « Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021 » Centers for disease control and prevention MMWR, 2021.

15. Quality control

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

Instructions for Use EurobioPlex Multi-Fast STI

16. Waste disposal

Eliminate all waste in accordance with the legislation on DASRI.

17. Incident report

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

18. Technical assistance

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

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



7 avenue de Scandinavie
ZA de Courtabœuf
91940 Les Ulis
FRANCE



EurobioPlex

Multi-Fast STI

RT-PCR EN TEMPS REEL

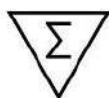
Pour la RT-PCR **qualitative** en temps réel

REF

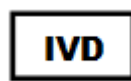
EBX-051-100

EBX-051-200

EBX-051-600



100/200/600 réactions



Référence EBX-051 Version 2.02 – 29/10/2024

Validé sur :

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) avec analyse sur CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)



Fiche technique

Disponible sur demande à l'adresse suivante : info@eurobio-scientific.com

Le Résumé des Caractéristiques de Sécurité et Performance (RCSP) sera mis à disposition par l'organisme notifié certificateur sur EUDAMED une fois ce dernier fonctionnel. Il peut également être obtenu sur demande.

Notice d'utilisation EurobioPlex Multi-Fast STI

ENGLISH.....1

FRANÇAIS.....24

Table des matières

1.	Informations générales.....	26
2.	Destination du dispositif.....	27
3.	Symboles.....	28
4.	Principe	29
5.	Composants du kit	30
6.	Conservation et stockage	30
7.	Matériel requis non fournis.....	31
8.	Instrument de PCR en temps réel.....	31
9.	Mises en garde et précautions	31
10.	Protocole	33
11.	Validation de l'expérimentation.....	37
12.	Analyse des données et interprétation	40
13.	Analyse des performances	41
14.	Bibliographie.....	45
15.	Contrôle qualité.....	45
16.	Elimination des déchets	46
17.	Déclaration d'incident	46
18.	Assistance technique.....	46

Notice d'utilisation EurobioPlex Multi-Fast STI

1. Informations générales

Les Infections sexuellement transmissibles (IST), représentent un problème majeur de santé publique dans le monde. Notamment dans les pays en court de développement de l'Asie du Sud-Est, de l'Afrique et de l'Amérique latine où les IST sont une des causes les plus fréquentes de maladie et de décès. Ces maladies ont un lourd impact sur la santé mais ont aussi des conséquences sociales et économiques graves.

Plus de 30 agents pathogènes sexuellement transmissibles sont connus dans le monde, comprenant des bactéries, des virus, des champignons, des protozoaires et des ectoparasites. Parmi les plus connues et les plus importantes se trouvent les chlamydias, les trichomonases, les gonorrhées, les maladies résultantes d'infections à la bactérie *Mycoplasma genitalium* ou encore les infections à virus du papillome humain et à virus herpétique.

D'après une estimation de l'OMS, les IST d'origine bactériennes représentent plus de 300 millions de cas par an dans le monde.

En Europe, ces pathologies ont connu une recrudescence importante ces dix dernières années. Notamment pour les chlamydias, qui sont souvent asymptomatiques et échappent donc au diagnostic. Il en est de même pour les gonorrhées chez la femme. Réaliser un diagnostic fiable, sensible et rapide est très important car ces pathologies peuvent être traitées efficacement, à l'aide d'antibiotiques, en début d'infection, sans laisser de séquelles.

Le diagnostic et le traitement tardif des IST peut mener à des conséquences importantes pour la santé, telles que des douleurs pelviennes chroniques, l'infection ascendante ou encore une grossesse extra-utérine. De plus, la transmission de ces pathologies au fœtus ou à l'enfant, peut entraîner des séquelles neurologiques lourdes ainsi que la stérilité des femmes et des hommes.

L'EurobioPlex EBX-051 a été conçu pour détecter quatre des principales bactéries causant des infections sexuellement transmissibles : *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Nisseria gonorrhoeae* et *Trichomonas vaginalis*.

Afin d'améliorer grandement la sensibilité du diagnostic, certaines cibles sont détectées sur plusieurs gènes d'intérêt (3 gènes d'intérêts pour *chlamydia trachomatis*, 2 gènes d'intérêts pour *Nisseria gonorrhoeae*, 1 gène d'intérêt pour *Mycoplasma genitalium* et 1 gène d'intérêt pour *Trichomonas vaginalis*).

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

Le kit permet de tester 98 patients (100 tests) ou 198 patients (200 tests) en plus du contrôle positif et du contrôle négatif nécessaires.

L'extrait d'ARN/ADN est le matériel de départ pour le kit EurobioPlex Multi-Fast STI. Il revient à l'utilisateur d'utiliser des méthodes d'extraction adaptées aux prélèvements testés.

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

- Urines
- Prélèvements vaginaux
- Ecouvillons cervicaux

Notice d'utilisation EurobioPlex Multi-Fast STI

2. Destination du dispositif

L'EurobioPlex Multi-Fast STI est un test d'amplification de l'acide nucléique (ARN/ADN) de quatre bactéries causant des infections sexuellement transmissibles basé sur 1 test de RT-PCR multiplex (3 gènes cibles pour *Chlamydia trachomatis*; 2 gènes cibles pour *Nisseria gonorrhoeae*; 1 gène cible pour *Mycoplasma genitalium* et 1 gène cible pour *Trichomonas vaginalis*), dans un même puits. Il suffit qu'une des séquences des gènes ciblés soit amplifiée pour que le diagnostic puisse être directement rendu positif pour le pathogène donné (voir Analyse des données et Interprétation des résultats).

Le test EurobioPlex Multi-Fast STI doit être utilisé par du personnel de laboratoire d'analyse de biologie médicale qualifié.

Ce dispositif n'est pas destiné au dépistage des infections sexuellement transmissibles en banque de sang ou d'organes.

Notice d'utilisation EurobioPlex Multi-Fast STI

3. Symboles



Référence



Numéro de lot



Limite de température



Date d'expiration



Contenu suffisant pour « N » réactions



Fabricant



Date de fabrication



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

Notice d'utilisation EurobioPlex Multi-Fast STI

4. Principe

L'EurobioPlex Multi-Fast STI est un test d'amplification de l'acide nucléique (ARN/ADN) de quatre bactéries causant des infections sexuellement transmissibles basé sur 1 test de RT-PCR multiplex (3 gènes cibles pour *Chlamydia trachomatis*; 2 gènes cibles pour *Nisseria gonorrhoeae*; 1 gène cible pour *Mycoplasma genitalium* et 1 gène cible pour *Trichomonas vaginalis*), dans un même puits. Il suffit qu'une des séquences des gènes ciblés soit amplifiée pour que le diagnostic puisse être directement rendu positif pour le pathogène donné (voir Analyse des données et Interprétation des résultats).

Le kit contient 1 oligomix pour détecter les 4 cibles bactériennes, ainsi qu'un contrôle endogène. Le test est réalisé à partir de l'ARN/ADN extrait de prélèvement au moyen d'une réaction dans 1 puits/tube.

La détection de plusieurs gènes d'intérêts pour certaines bactéries ainsi que l'étape de Reverse transcription permettent de garantir la sensibilité, et la spécificité du test. La présence d'un gène de ménage humain servant de contrôle pour la qualité du prélèvement, pour l'extraction d'AN et l'inhibition de RT-PCR permet de déterminer de possibles variations pouvant se produire au cours des étapes d'extraction d'AN 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 des AN et/ou à la présence d'inhibiteurs de RT-PCR en trop grande quantité.

L'ARN/ADN des 4 cibles bactériennes est détecté à l'aide de sondes spécifiques pour chaque gène respectivement marquées en FAM (cible 1/*Chlamydia trachomatis*), HEX (cible 2/*Nisseria gonorrhoeae*), Texas Red (cible 3/*Mycoplasma genitalium*) et Quasar705 (cible 4/*Trichomonas vaginalis*). 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 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.

Notice d'utilisation EurobioPlex Multi-Fast STI

Tableau 1 : Détection des cibles selon les fluorophores

Cible	Fluorophore	Excitation	Emission
Cible 1/ <i>Chlamydia trachomatis</i>	FAM	495 nm	515 nm
Cible 2/ <i>Nisseria gonorrhoeae</i>	HEX	535 nm	555 nm
Cible 3/ <i>Mycoplasma genitalium</i>	Texas red	585 nm	605 nm
Cible 4/ <i>Trichomonas vaginalis</i>	Quasar705	681 nm	698 nm
Contrôle Endogène	Cy5	650 nm	670 nm

Canaux équivalents recommandés sur différents instruments de PCR :

- Canal **FAM** (CFX96, QuantStudio 5, QuantStudio 6), Canal Vert (Rotor-Gene Q),
- Canal **HEX** (CFX96), Canal VIC (QuantStudio 5, QuantStudio 6), Canal Jaune (Rotor-Gene Q),
- Canal **Texas Red** (CFX96, QuantStudio 6), Canal Orange (Rotor-Gene Q), Canal Rox (QuantStudio 5),
- Canal **Cy5** (CFX96, QuantStudio 5, QuantStudio 6), Canal Rouge (Rotor-Gene Q),
- Canal **Quasar 705** (CFX96, QuantStudio 5, QuantStudio 6), Canal Pourpre (Rotor-Gene Q).

5. Composants du kit

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

Tableau 2: Composants du kit

Couleur de Bouchon	Contenu du kit	100 réactions	200 réactions	600 réactions	Reconstitution
Rouge	Enzymes	540 µl	1080 µl	2 x 1275 µl	Prêt à l'emploi
Transparent	Oligomix	432 µl	864 µL	2 x 1020 µl	Prêt à l'emploi
Jaune	Contrôle positif CP	160 µl	320 µl	2 x 160 µl	Prêt à l'emploi
Bleu	Eau = contrôle négatif (CN-H2O)	1500µl	1500 µl	2 x 1500 µl	Prêt à l'emploi

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

6. Conservation et stockage

Tous les réactifs doivent être stockés entre -15°C et -22°C.

Tous les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du kit.

Notice d'utilisation EurobioPlex Multi-Fast STI



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 Multi-Fast STI a été développé et validé pour être utilisé avec les instruments de PCR en temps réel suivants :

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) avec analyse sur CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)

9. Mises en garde et précautions



Lire attentivement ces instructions avant de débiter le protocole.

- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée par des techniciens de laboratoire d'analyse de biologie médicale.
- ◇ La réglementation de biosécurité locale et nationale en vigueur pour le dépistage des IST 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.

Notice d'utilisation EurobioPlex Multi-Fast STI

- ◇ Les échantillons cliniques doivent être considérés comme du matériel potentiellement infectieux et doivent être préparés sous une hotte à flux laminaire.
- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée selon les bonnes pratiques de laboratoire.
- ◇ Ne pas utiliser ce kit après la date de péremption indiquée.
- ◇ Le kit est expédié sous carboglace, et les composants du kit doivent arriver congelés. Si un ou plus des composants arrive décongelé, ou si les tubes ont été endommagés pendant le transport, contacter Eurobio Scientific.
- ◇ Le kit n'est pas destiné à un usage unique. Lors de la réutilisation du dispositif, il est nécessaire de suivre les recommandations concernant les cycles de congélation-décongélation autorisés, et les précautions pour prévenir la contamination des réactifs. Une fois les réactifs décongelés, centrifuger brièvement les tubes avant leur utilisation.
- ◇ La décongélation des réactifs doit être ménagée afin de ne pas altérer les performances du dispositif (à +2°C/+8°C ou à température ambiante).
- ◇ Les composants du kit ne doivent pas être utilisés séparément (ni avec d'autres réactifs, ni avec les réactifs d'autres lots).
- ◇ L'utilisation de glace ou d'un bloc réfrigérant est conseillée en cas de longs délais du fait par exemple d'un important nombre d'échantillons à traiter ou de fortes températures.
- ◇ Il est recommandé de définir trois zones de travail distinctes : 1) Isolation de l'ARN, 2) Préparation du mélange réactionnel, et 3) Amplification/Détection des produits amplifiés.
- ◇ Les sondes fluorescentes contenues dans l'oligomix sont sensibles à la lumière. Toute exposition prolongée de l'oligomix à la lumière doit être limitée au temps technique nécessaire à la préparation de la plaque PCR.
- ◇ Il est recommandé d'ouvrir et de manipuler le contrôle positif à l'écart des échantillons biologiques à tester et des autres composants du kit afin d'éviter les contaminations croisées.
- ◇ Porter des blouses et des gants (sans talc) distincts dans chaque zone de travail.
- ◇ Les pipettes, les réactifs et autres matériels de travail ne doivent pas circuler entre ces zones.
- ◇ Une attention particulière doit être mise en œuvre pour conserver la pureté des réactifs et des mélanges réactionnels.
- ◇ Le contrôle interne endogène détecte une cible cellulaire détectable dans tous les échantillons d'origine humaine mais pas dans le contrôle négatif CN-H2O fourni dans la trousse. L'absence de signal au niveau du contrôle négatif permet de prévenir la survenue de contaminations croisées.
- ◇ Des méthodes appropriées de préparation/extraction d'ARN pour une production d'ARN de qualité et une application de RT-PCR doivent être utilisées, notamment afin d'éviter tout risque de contamination avec les RNAses.
- ◇ Utiliser des embouts à filtre pour micropipettes, RNase-free et DNase-free.
- ◇ Ne pas pipeter avec la bouche. Ne pas manger, ni boire ou fumer dans le laboratoire.
- ◇ Eviter les aérosols.

Notice d'utilisation EurobioPlex Multi-Fast STI

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/ADN par des systèmes adaptés produise des ARN/ADN de qualité.
- ! ◇ Il est recommandé que les échantillons soient extraits immédiatement, ou conservés selon les recommandations de stockage des échantillons avant extraction (Tableau 3).

Tableau 3 : Recommandations de stockage avant utilisation

Recommandations de stockage maximum des échantillons avant extraction	
Température ambiante	2 h
4°C	72 h
-20°C (de préférence -80°C)	Stockage à long terme

Attention	
	◇ L'utilisateur peut se référer aux recommandations émises par l'Organisation Mondiale de la Santé ou par la Haute Autorité de Santé pour la bonne conservation des échantillons ◇ Les ARN/ADN extraits doivent être stockés à -80°C. ◇ Le transport des échantillons cliniques est soumis à la réglementation locale pour le transport des agents infectieux.

10.2 Extraction de l'ARN/ADN

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

Dans le kit EBX-051, le contrôle interne endogène lu sur le canal Cy5 est déjà présent dans l'échantillon clinique à extraire. Sa détection après amplification permet de vérifier la qualité du prélèvement et de l'extraction.

Les performances telles que décrites dans la partie 13 du présent document ont été obtenues avec la technique d'extraction suivante : Maelstrom 9600 (TANBead) et le kit OptiPure Viral Auto Plate (réf : W665A46).

Notice d'utilisation EurobioPlex Multi-Fast STI

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).

Notice d'utilisation EurobioPlex Multi-Fast STI

Schéma de la procédure :

1 - PREPARATION MELANGE REACTIONNEL / MASTERMIX

Nombre de réactions	N+3
Mix enzymatique	$(N+3) \times 3,75 \mu\text{L}$
Eau	$(N+3) \times 3,25 \mu\text{L}$
Oligomix	$(N+3) \times 3 \mu\text{L}$
Volume total Mastermix	$(N+3) \times 10 \mu\text{L}$



2 - PREPARATION DES REACTIONS

Echantillon

10 μL de Mastermix
+
5 μL échantillon ARN

Contrôle Positif

10 μL de Mastermix
+
5 μL 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	45	-
	60°C	10 sec		Acquisition de fluorescence

Notice d'utilisation EurobioPlex Multi-Fast STI

10.4 Protocole détaillé

- 7) Vérifier que les réactifs soient entièrement décongelés. Homogénéiser les tubes d'enzymes, et vortexer environ 15 secondes l'Oligomix et le CP, puis centrifuger brièvement.
- 8) Préparer les Mastermix comme ci-dessous, N étant le nombre de réactions (incluant les contrôles positif et négatif). Prévoir la quantité de Mastermix pour N+3 réactions minimum.

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

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

- 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	45	-
	60°C	10 sec		Acquisition de fluorescence

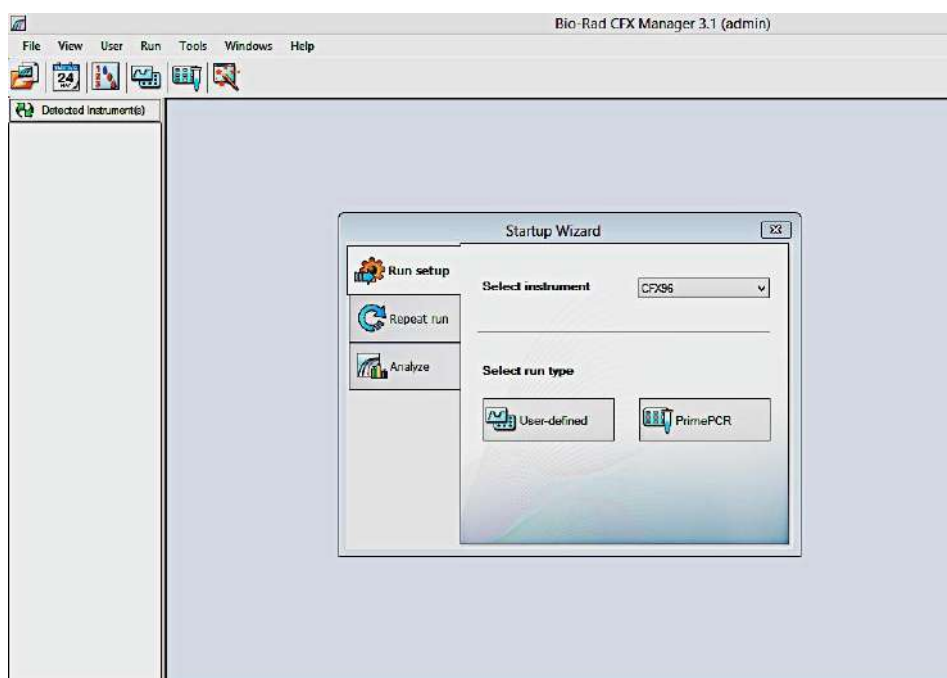
Note 1 : Sur CFX96™ (Bio-Rad), lancer le run à partir de la version 1.6 ou postérieure, puis analyser avec la version 3.1 (voir § Validation de l'expérience). **Veillez à bien utiliser des plaques PCR blanches jupées ou non jupées pour une lecture appropriée dans tous les canaux.**

Notice d'utilisation EurobioPlex Multi-Fast STI

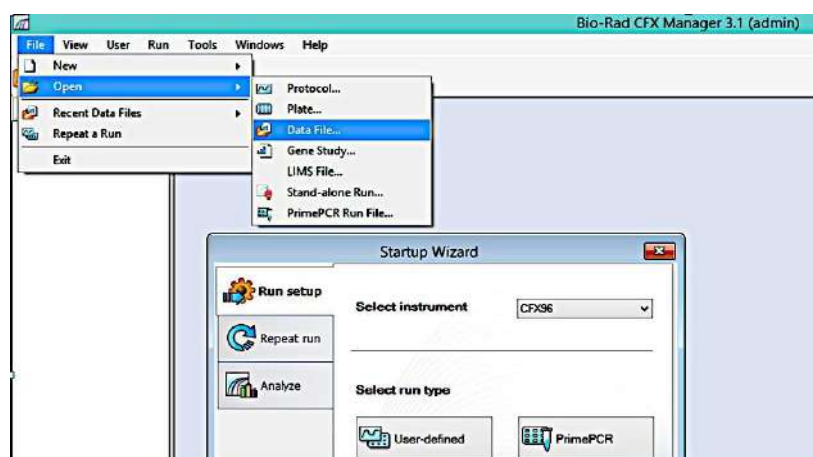
11. Validation de l'expérimentation

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.



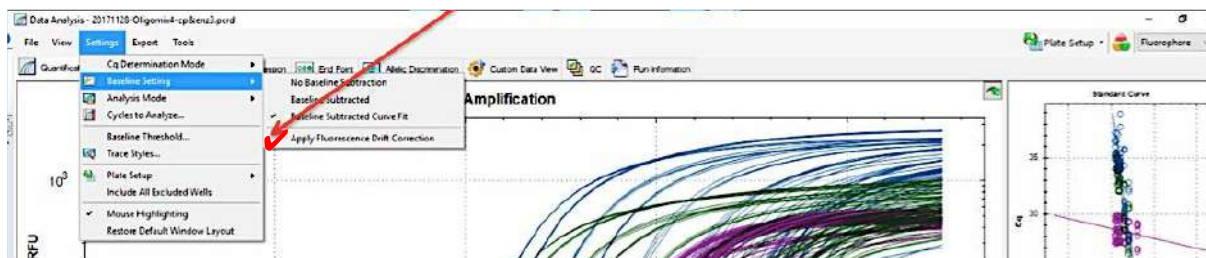
Cliquer sur « File » et sélectionner « Open » puis « Data File ».



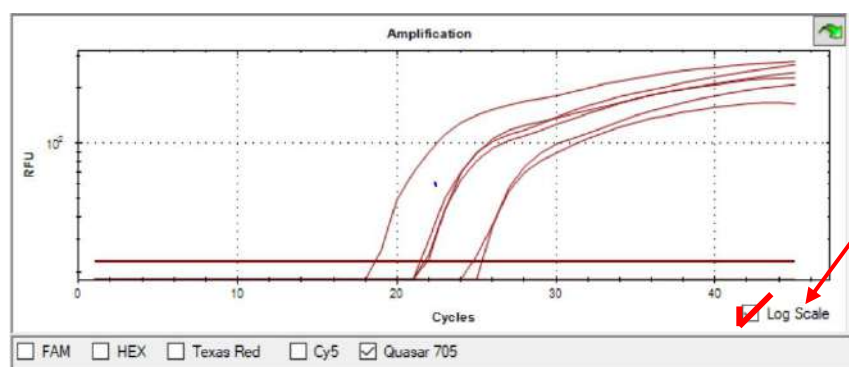
Notice d'utilisation EurobioPlex Multi-Fast STI

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

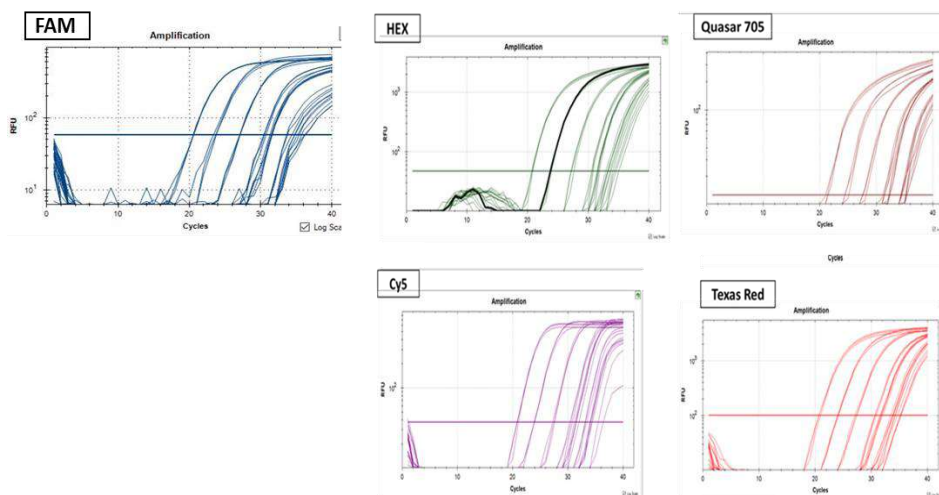
L'option « Drift correction » doit être appliquée dans l'onglet « Settings » comme sur l'image ci-dessous : cliquer sur l'onglet « Settings », puis sur « Baseline Setting » et sur « Apply Fluorescence Drift Correction ».



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



Une fois cette étape réalisée, l'analyse peut débuter pour les 5 canaux considérés **FAM**, **HEX**, **Texas Red**, **CY5** et **Quasar 705**.



Notice d'utilisation EurobioPlex Multi-Fast STI

Pour que le dosage soit valide, les valeurs de Ct pour les contrôles doivent être les suivantes (Tableau 4). En dehors de ces valeurs, l'expérimentation ne peut être validée.

Tableau 4: Validation du run

Contrôle Positif	
FAM	Ct ≤ 30
HEX	Ct ≤ 30
Texas Red	Ct ≤ 30
Cy5	Ct ≤ 30
Quasar 705	Ct ≤ 30
Contrôle Négatif	
FAM	Ct non déterminé
HEX	Ct non déterminé
Texas Red	Ct non déterminé
Cy5	Ct non déterminé
Quasar 705	Ct non déterminé

Notice d'utilisation EurobioPlex Multi-Fast STI

12. Analyse des données et interprétation

Pour les échantillons cliniques, les résultats suivants sont possibles :

*Seuil de Ct pour échantillon : + Positif → Ct positif < 45



***Mycoplasma genitalium* (Texas Red), *Chlamydia trachomatis* (FAM), *Nisseria gonorrhoeae* (HEX), *Trichomonas vaginalis* (Quasar 705), Contrôle interne endogène (Cy5) : Ct < 45**

Les résultats sont analysés dans les canaux FAM, HEX, Texas Red, Quasar 705 et Cy5 (Tableau 5).

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

Signal PCR CT et/ou NG et/ou MG et/ou TV	Contrôle endogène		
FAM et/ou HEX et/ou Texas Red et/ou Quasar705	Cy5	Présence de bactéries	Validité du test/commentaire
+	+	Oui	VALIDE
-	+	NON	VALIDE
+	-	Oui	VALIDE Possible inhibition de PCR ou problème d'extraction qui n'empêche pas la détection des bactéries.
-	-	NI*	NI*

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

Limites d'utilisation et d'interprétation :

- ❖ Le kit EurobioPlex Multi-Fast STI est utilisé à des fins de diagnostic de première intention.
- ❖ Tous les échantillons doivent être traités comme potentiellement infectés par les bactéries d'intérêts, 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,

Notice d'utilisation EurobioPlex Multi-Fast STI

- Des conditions d'extraction inadaptées ou l'utilisation d'instruments de PCR non validés,
- Une expérimentation non respectueuse de tous les éléments de ce mode d'emploi.

Les faux positifs peuvent être dus à :

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

13. Analyse des performances

Limite de détection/sensibilité analytique

Une gamme de dilution a été réalisée à partir d'un mélange plasmidique allant de 10^5 à 1 copie/ μ L. Cette gamme de dilution a été utilisée pour déterminer la limite de détection du kit EBX-051.

Limite de détection/sensibilité analytique sur CP :

Chlamydia trachomatis (CT): 2.5 copies/ μ L

Nisseria gonorrhoeae (NG): 5 copies/ μ L

Mycoplasma genitalium (MG) : 5 copies/ μ L

Trichomonas vaginalis (TV) : 5 copies/ μ L

CI Cy5 : 10 copies/ μ L

De plus, une analyse Probit a été réalisée, afin de déterminer le cut-off 95%, les résultats sont les suivants :

Limite de détection/sensibilité à 95% sur CP :

Chlamydia trachomatis (CT) : 1.2 copies/ μ L

Nisseria gonorrhoeae (NG): 2.8 copies/ μ L

Mycoplasma genitalium (MG) : 3.3 copies/ μ L

Trichomonas vaginalis (TV) : 3.2 copies/ μ L

CI Cy5 : 4.6 copies/ μ L

Notice d'utilisation EurobioPlex Multi-Fast STI

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

- Variabilité intra-expérience :

	EBX-051				
	CY 5	FAM	HEX	Quasar705	Texas Red
Moyenne CV intralot CP en %	0.53	0.22	0.29	0.55	0.34

CV: coefficient de variation

- Variabilité inter-lots :

	EBX-051				
	CY 5	FAM	HEX	Quasar705	Texas Red
CV moyen inter lots CP en %	4.76	3.40	0.37	0.39	0.69

CV: coefficient de variation

Spécificité diagnostique

Cette validation a porté sur :

- 458 échantillons négatifs pré-testés et caractérisés négatifs par des tests marqués CE.
- 16 échantillons négatifs pour tous les pathogènes ciblés dans le kit EBX-051 mais positifs pour d'autres bactéries, afin de tester les réactions croisées.

Référence	Bactérie	Forme	Fournisseur
01036P	Candida tropicalis derived from ATCC® 1369™	KWIK-STIK	ATCC®
01172P	Cryptococcus neoformans derived from ATCC® 13690™	KWIK-STIK	ATCC®
01169P	Citrobacter freundii derived from ATCC® 8454™	KWIK-STIK	ATCC®
0405P	Neisseria lactamica derived from ATCC® 23970™	KWIK-STIK	ATCC®
0410P	Gardnerella vaginalis derived from ATCC® 14018™	KWIK-STIK	ATCC®
01262P	Lactobacillus brevis derived from ATCC® 14869™	KWIK-STIK	ATCC®
0120P	Bacillus subtilis subsp. subtilis derived from ATCC® 6051™	KWIK-STIK	ATCC®
0885P	Lactobacillus acidophilus derived from ATCC® 314™	KWIK-STIK	ATCC®
01018P	Enterobacter cloacae subsp. cloacae derived from ATCC® BAA-1143™	KWIK-STIK	ATCC®
0737P	Candida glabrata derived from ATCC® 15126™	KWIK-STIK	ATCC®
01089P	Enterococcus faecalis derived from ATCC® 51575™	KWIK-STIK	ATCC®
0475P	Moraxella osloensis derived from ATCC® 10973™	KWIK-STIK	ATCC®
0468P	Acinetobacter lwoffii derived from ATCC® 15309™	KWIK-STIK	ATCC®
0404P	Neisseria meningitidis derived from ATCC® 13102™	KWIK-STIK	ATCC®
0911P	Alcaligenes faecalis subsp. faecalis derived from ATCC® 35655™	KWIK-STIK	ATCC®
0870P	Aeromonas hydrophila derived from ATCC® 7966™	KWIK-STIK	ATCC®

Notice d'utilisation EurobioPlex Multi-Fast STI

Les extractions des AN ont été réalisées sur les systèmes suivants :

- Maelstrom 9600 (TANBead) et le kit OptiPure Viral Auto Plate (réf : W665A46).

	Bactérie	EBX-051
	<i>Candida tropicalis</i> derived from ATCC® 1369™	NEGATIF
	<i>Cryptococcus neoformans</i> derived from ATCC® 13690™	NEGATIF
	<i>Citrobacter freundii</i> derived from ATCC® 8454™	NEGATIF
	<i>Neisseria lactamica</i> derived from ATCC® 23970™	NEGATIF
	<i>Gardnerella vaginalis</i> derived from ATCC® 14018™	NEGATIF
	<i>Lactobacillus brevis</i> derived from ATCC® 14869™	NEGATIF
	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> derived from ATCC® 6051™	NEGATIF
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> derived from ATCC® 314™	NEGATIF
	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> derived from ATCC® BAA-1143™	NEGATIF
	<i>Candida glabrata</i> derived from ATCC® 15126™	NEGATIF
	<i>Enterococcus faecalis</i> derived from ATCC® 51575™	NEGATIF
	<i>Moraxella osloensis</i> derived from ATCC® 10973™	NEGATIF
	<i>Acinetobacter lwoffii</i> derived from ATCC® 15309™	NEGATIF
	<i>Neisseria meningitidis</i> derived from ATCC® 13102™	NEGATIF
	<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i> derived from ATCC® 35655™	NEGATIF
	<i>Aeromonas hydrophila</i> derived from ATCC® 7966™	NEGATIF
Contrôle positif d'extraction	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> derived from ATCC® 31426™	POSITIF (Pour NG)

En renforcement à cette étude, une analyse in silico a été employée et démontre la spécificité des amorces et sondes pour tous les pathogènes ciblés dans l'EBX-051.

Aucune aspécificité ou cross-réaction n'a été détectée.

Le kit est 100 % spécifique.

Sensibilité diagnostique

La validation des performances a porté sur :

474 échantillons négatifs	
458 échantillons négatifs pour tous les pathogènes ciblés dans le kit EBX-051	Caractérisés avec le kit Seegene SD9400X_FT_CT-NG-MG-TV Assay marqué CE-IVD
16 échantillons positifs pour d'autres pathogènes que ceux ciblés dans le kit EBX-051	Contrôlés par le contrôle interne endogène et une souche contrôle <i>Neisseria gonorrhoeae</i>

Notice d'utilisation EurobioPlex Multi-Fast STI

206 échantillons positifs	
108 échantillons <i>Chlamydia trachomatis</i> (CT)	Caractérisés avec kit Seegene SD9400X_FT_CT-NG-MG-TV Assay CE-IVD
10 échantillons <i>Nisseria gonorrhoeae</i> (NG)	Caractérisés avec kit Seegene SD9400X_FT_CT-NG-MG-TV Assay CE-IVD
57 échantillons <i>Mycoplasma genitalium</i> (MG)	Caractérisés avec kit Seegene SD9400X_FT_CT-NG-MG-TV Assay CE-IVD
9 échantillons <i>Trichomonas vaginalis</i> (TV)	Caractérisés avec kit Seegene SD9400X_FT_CT-NG-MG-TV Assay CE-IVD
16 échantillons <i>Chlamydia trachomatis</i> (CT) et <i>Mycoplasma genitalium</i> (MG)	Caractérisés avec kit Seegene SD9400X_FT_CT-NG-MG-TV Assay CE-IVD
4 échantillons <i>Chlamydia trachomatis</i> (CT) et <i>Nisseria gonorrhoeae</i> (NG)	Caractérisés avec kit Seegene SD9400X_FT_CT-NG-MG-TV Assay CE-IVD
2 échantillon <i>Chlamydia trachomatis</i> (CT) et <i>Trichomonas vaginalis</i> (TV)	Caractérisés avec kit Seegene SD9400X_FT_CT-NG-MG-TV Assay CE-IVD

Pour cette étude, l'extraction des échantillons a été réalisée sur Maelstrom 9600 (TANBead) avec le kit OptiPure Viral Auto Plate (réf : W665A46), et la RT-PCR sur CFX96 (Bio-Rad).

Les performances globales sont donc les suivantes:

		EBX-051		Total attendu
		CT +	CT -	
Seegene	CT +	130	0	130
	CT -	0	550	550

		EBX-051		Total attendu
		MG +	MG -	
Seegene	MG +	73	0	73
	MG -	0	607	607

		EBX-051		Total attendu
		NG +	NG -	
Seegene	NG +	14	0	14
	NG -	0	666	666

		EBX-051		Total attendu
		TV +	TV -	
Seegene	TV +	10	1	11
	TV -	0	669	669

Sensibilité *Chlamydia trachomatis* (CT) : > 99% (130/130)
Spécificité *Chlamydia trachomatis* (CT) : > 99% (550/550)
Concordance *Chlamydia trachomatis* (CT) : > 99% (680/680)

Sensibilité *Mycoplasma genitalium* (MG) : > 99% (73/73)
Spécificité *Mycoplasma genitalium* (MG) : > 99% (607/607)
Concordance *Mycoplasma genitalium* (MG) : > 99% (680/680)

Notice d'utilisation EurobioPlex Multi-Fast STI

Sensibilité *Nisseria gonorrhoeae* (NG) : > 99% (14/14)
Spécificité *Nisseria gonorrhoeae* (NG) : > 99% (666/666)
Concordance *Nisseria gonorrhoeae* (NG) : > 99% (680/680)

Sensibilité *Trichomonas vaginalis* (TV) : 91% (10/11)
Spécificité *Trichomonas vaginalis* (TV) : > 99% (669/669)
Concordance *Trichomonas vaginalis* (TV) : > 99% (679/680)

14. Bibliographie

Anke Schaeffer and Birgit Henrich* "Rapid Detection of Chlamydia trachomatis and Typing of the Lymphogranuloma venereum associated L-Serovars by TaqMan PCR" BMC Infectious Diseases 2008.

Yuying Liang^{1†}, Xin Jin^{2†}, Fang Yuan^{2†}, Zhanjia Li² and Shuiping Chen^{1*} "Comparison of rRNA-based and DNA-based nucleic acid amplifications for detection of Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, and Ureaplasma urealyticum in urogenital swabs" Liang et al. BMC Infectious Diseases (2018).

Ling Qing¹, Qi-Xiang Song², Jian-Li Feng³, Hai-Yan Li¹, Guiming Liu⁴ and Hai-Hong Jiang^{1*} "Prevalence of Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Mycoplasma genitalium and Ureaplasma urealyticum infections using a novel isothermal simultaneous RNA amplification testing method in infertile males" Qing et al. Ann Clin Microbiol Antimicrob (2017).

A Pillay, F Radebe, G Fehler, Y Htun, R C Ballard "Comparison of a TaqMan-based real-time polymerase chain reaction with conventional tests for the detection of Trichomonas vaginalis" Sex Transm Infect 2007;83:126–129.

Xiao-Mei Hu^{1,2†}, Jiang-Xia Xu^{3†}, Li-Xia Jiang^{1†}, Lian-Rui Deng³, Zhen-Mei Gu⁴, Xiao-Ying Xie⁵, Hui Cai⁴, Wei-Hua Wang^{1,2}, Li-Ming Li⁶, Cheng-Nan Tian⁷, Fang-Li Song⁸, Shao Huang^{8*}, Lei Zheng^{4*} and Tian-Yu Zhong^{1,2*} « Design and Evaluation of a Novel Multiplex Real-Time PCR Melting Curve Assay for the Simultaneous Detection of Nine Sexually Transmitted Disease Pathogens in Genitourinary Secretions » Frontiers in cellular and infection microbiology, 2019.

Rochelle P. Walensky, MD, MPH, Director « Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021 » Centers for disease control and prevention MMWR, 2021.

15. Contrôle qualité

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

Notice d'utilisation EurobioPlex Multi-Fast STI

16. Elimination des déchets

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

17. Déclaration d'incident

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

18. Assistance technique

Pour obtenir une assistance sur nos produits, merci de contacter notre support technique.

Le service clients d'Eurobio Scientific est joignable par voie électronique (mail), à l'adresse adv@eurobio.scientific.com ou par téléphone au +33 (0)1.69.79.64.80



7 avenue de Scandinavie
ZA de Courtabœuf
91940 Les Ulis
FRANCE