



EurobioPlex Monkeypox Screening Test

RT-PCR EN TEMPS REEL

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

REF

**EBX-060-25
EBX-060-50
EBX-060-100
EBX-060-200
EBX-060-600**



25/50/100/200/600 réactions

RUO

Version 2.01 du 22 08 2024

Validé sur :

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) avec analyse sur CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)
- T-COR 8®-IVD (Tetracore Inc.) avec T-COR 8 Per-well SmartCT™ (auto v1) software

Conditions de stockage :

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



Fiche technique

Disponible sur www.eurobio-scientific.com

Table des matières

1.	Informations générales	3
2.	Destination du dispositif	4
3.	Symboles	5
4.	Principe.....	6
5.	Composants du kit.....	6
6.	Conservation et stockage	7
7.	Matériel requis non fournis.....	7
8.	Instrument de PCR en temps réel	8
9.	Mises en garde et précautions.....	8
10.	Protocole.....	9
11.	Validation de l'expérimentation.....	12
12.	Analyse des données et interprétation.....	15
13.	Analyse des performances.....	16
14.	Particularités liées à l'instrument de PCR en temps réel T-COR 8-IVD.....	18
15.	Bibliographie	24
16.	Contrôle qualité.....	24
17.	Elimination des déchets.....	24
18.	Déclaration d'incident	24
19.	Assistance technique.....	24

1. Informations générales

La variole du singe, appelée également variole simienne est une maladie infectieuse virale causée par un orthopoxvirus: le Monkeypox (MPXV). Il s'agit d'un virus à ADN d'environ 200000 paires de bases. Le Monkeypox virus est divisé en deux clades: l'ouest africain et le bassin du Congo.

Cette zoonose, connue depuis les années 1970, est habituellement transmise à l'Homme dans les zones forestières d'Afrique du Centre et de l'Ouest par des rongeurs sauvages ou des primates. Une transmission inter-humaine est également possible, en particulier au sein du foyer familial ou en milieu de soins. Le virus Monkeypox peut être transmis par contact direct avec les lésions cutanées ou les muqueuses d'une personne malade, ainsi que par les gouttelettes (salive, éternuements, postillons...). Les symptômes sont comparables à ceux de la variole mais la maladie est moins sévère. Plusieurs cas d'infections autochtones à Monkeypox (MKP) ont été signalés depuis le mois de mai 2022 dans plusieurs pays d'Europe, notamment chez des hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes (HSH), des cas ont été également signalés aux États-Unis, au Canada, en Australie et Israël. Plusieurs cas ont été rapportés en France. Il n'existe pas de vaccin contre le monkeypox, cependant, la Haute Autorité de Santé a recommandé la mise en œuvre d'une stratégie vaccinale réactive en post-exposition avec les vaccins antivarioliques de 3ème génération.

Le virus de la rougeole (appelé également MV pour measles virus) est un virus à ARN appartenant au genre morbillivirus de la famille des Paramyxovirus. La rougeole est une infection virale des voies respiratoires parmi les plus contagieuses, aux complications pouvant être graves, et potentiellement éradicable grâce à une couverture vaccinale élevée. Au cours des deux premiers mois de 2022, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a constaté une augmentation significative des cas de rougeole à travers le monde. La vaccination contre la rougeole est obligatoire pour tous les enfants nés à partir du 1er janvier 2018. La première dose est administrée à 12 mois et la seconde entre 16 et 18 mois.

Le Varicella-Zoster Virus (VZV) est un alpha herpesvirus à ADN responsable de deux maladies : la varicelle et le zona, maladie invalidante des personnes âgées et de patients immunodéprimés. Il est transmissible par inhalation suivie de réplication dans la muqueuse du tractus respiratoire et de l'oropharynx donnant lieu à des pneumonies varicelleuses graves des enfants et des personnes âgées. Les complications neurologiques liées à VZV, outre l'encéphalite d'installation précoce après l'apparition des "rashes" cutanés, incluent le syndrome de Guillain-Barré et le syndrome de Reye. La vaccination contre la varicelle est recommandée à partir de l'âge de 12 ans pour les personnes qui n'ont pas eu la varicelle et ne sont donc pas naturellement immunisées, et qui exercent des professions en contact avec la petite enfance, ou des professions de santé en formation en contact avec des sujets à risque de varicelle grave.

L'EurobioPlex EBX-060 a été conçu pour détecter et différencier les virus Monkeypox, Measles et VZV dans les premiers stades de développement.

L'extrait d'acides nucléiques totaux est le matériel de départ pour le kit EurobioPlex Monkeypox Screening Test. Il revient à l'utilisateur d'utiliser des méthodes d'extraction adaptées aux prélèvements testés.

2. Destination du dispositif

L'EurobioPlex Monkeypox Screening Test est un test d'amplification par reverse transcription-réaction en chaîne de la polymérase (RT-PCR) en temps réel, pour un *usage in vitro* conçu pour la détermination qualitative de la présence ou de l'absence des virus Monkeypox, Measles et VZV dans un extrait d'acides nucléiques. Le test est indiqué pour aider à déterminer une présomption d'infection chez l'homme.

Le test EurobioPlex EBX-060, doit être utilisé par du personnel de laboratoire d'analyse de biologie médicale qualifié. Il est à usage unique, il ne doit pas être recyclé après utilisation.

3. Symboles



Référence



Numéro de lot



Limites de température de stockage



Date d'expiration



Contenu suffisant pour « N » réactions



Fabricant

RUO

Research Use Only



Mode d'emploi



Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé



Conserver à l'abri de la lumière du soleil



Attention

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

4. Principe

L'EurobioPlex Monkeypox Screening Test est un test d'amplification des acides nucléiques (AN) de Monkeypox, Measles et VZV basé sur 1 test de RT-PCR multiplex détectant les 3 virus dans un même puits.

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

La présence d'un gène de ménage humain servant de contrôle pour la qualité du prélèvement, pour l'extraction d'acides nucléiques et l'inhibition de RT-PCR permet de déterminer de possibles variations pouvant se produire au cours des étapes d'extraction d'acides nucléiques 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 et/ou à la présence d'inhibiteurs de RT-PCR en trop grande quantité.

Les acides nucléiques du Monkeypox, de la rougeole et du VZV sont détectés à l'aide de sondes spécifiques pour chaque gène/virus respectivement marquées en FAM (cible 1/Monkeypox), HEX (cible 2/Measles) et Texas Red (cible 3/VZV). Le Contrôle endogène est détecté à l'aide d'une sonde marquée CY5. Au cours de l'élongation du produit d'amplification, les sondes émettent une fluorescence spécifique suite à leur hydrolyse. La mesure de l'intensité de fluorescence en temps réel est relative à l'accumulation des produits d'amplification.

5. Composants du kit

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

La fluorescence est émise et mesurée de façon individuelle par un système optique au cours de la PCR. La détection des fragments amplifiés est réalisée par un fluorimètre en utilisant les canaux indiqués dans le Tableau 2.

Tableau 1: Composants du kit

Couleur de Bouchon	Contenu du kit	25 réactions	50 réactions	100 réactions	200 réactions	600 réactions	Reconstitution
Rouge	Enzymes	101,25 µL	195 µL	450 µL	750 µL	2 x 1237,5 µL	Prêt à l'emploi
Transparent	Oligomix	81 µL	156 µL	360 µL	660 µL	2 x 990 µL	Prêt à l'emploi
Jaune	Contrôle positif CP	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	350 µL	Prêt à l'emploi
Bleu	Eau = contrôle négatif (CN-H2O)	500 µL	500 µL	500 µL	1000 µL	3 x 1000 µL	Prêt à l'emploi

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

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

Tableau 2 : Détection des cibles selon les fluorophores

Cibles	Fluorophore	Excitation	Emission
Cible 1 Monkeypox	FAM	495 nm	515 nm
Cible 2 Measles	HEX	535 nm	555 nm
Cible 3 VZV	Texas Red	585 nm	605 nm
Contrôle interne endogène	Cy5	650 nm	670 nm

Canaux équivalents sur différents instruments de PCR:

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

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 Monkeypox Screening Test 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)
- T-COR 8®-IVD (Tetradcore Inc.) avec T-COR 8 Per-Well SmartCT™ (auto v1) software

9. Mises en garde et précautions



Lire attentivement ces instructions avant de débiter le protocole.

- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée par des techniciens de laboratoire d'analyse de biologie médicale.
- ◇ La réglementation de biosécurité locale et nationale en vigueur pour le dépistage du Monkeypox et de la rougeole doit être suivie scrupuleusement en toute circonstance, notamment dans des laboratoires et avec les équipements de laboratoire en accord.
- ◇ S'assurer que les instruments ont été installés, calibrés et maintenus en accord avec les recommandations du fabricant.
- ◇ Il est de la responsabilité de l'utilisateur d'utiliser un autre équipement que ceux validés, et dans ce cas, les performances ne sont pas garanties.
- ◇ Les échantillons cliniques doivent être considérés comme du matériel potentiellement infectieux et doivent être préparés sous une hotte à flux laminaire.
- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée selon les bonnes pratiques de laboratoire.
- ◇ Ne pas utiliser ce kit après la date de péremption indiquée.
- ◇ Le kit est expédié sous carboglace, et les composants du kit doivent arriver congelés. Si un ou plus des composants arrive décongelé, ou si les tubes ont été endommagés pendant le transport, contacter Eurobio Scientific.
- ◇ Eviter les cycles de congélation / décongélation des réactifs, cela peut conduire à une baisse de la sensibilité du test.
- ◇ Une fois les réactifs décongelés, centrifuger brièvement les tubes avant leur utilisation.
- ◇ L'utilisation de glace ou d'un bloc réfrigérant est conseillée en cas de longs délais du fait par exemple d'un important nombre d'échantillons à traiter ou de fortes températures.
- ◇ Il est recommandé de définir trois zones de travail distinctes : 1) Isolation de l'ARN, 2) Préparation du mélange réactionnel, et 3) Amplification/Détection des produits amplifiés.
- ◇ Les sondes fluorescentes contenues dans l'oligomix sont sensibles à la lumière. Toute exposition prolongée de l'oligomix à la lumière doit être limitée au temps technique nécessaire à la préparation de la plaque PCR.
- ◇ Il est recommandé d'ouvrir et de manipuler le contrôle positif à l'écart des échantillons biologiques à tester et des autres composants du kit afin d'éviter les contaminations croisées.
- ◇ Porter des blouses et des gants (sans talc) distincts dans chaque zone de travail.
- ◇ Les pipettes, les réactifs et autres matériels de travail ne doivent pas circuler entre ces zones.
- ◇ Une attention particulière doit être mise en œuvre pour conserver la pureté des réactifs et des mélanges réactionnels.
- ◇ Le contrôle interne endogène détecte une cible cellulaire détectable dans tous les échantillons d'origine humaine mais pas dans le contrôle négatif CN-H₂O fourni dans la trousse. L'absence de signal au niveau du contrôle négatif permet de prévenir la survenue de contaminations croisées.

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

- ◇ 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 DNases et RNases.
- ◇ Utiliser des embouts à filtre pour micropipettes, RNase-free et DNase-free.
- ◇ Ne pas pipeter avec la bouche. Ne pas manger, ni boire ou fumer dans le laboratoire.
- ◇ Eviter les aérosols.

10. Protocole

10.1 Collecte des échantillons

- ◇ Collecter les échantillons dans des tubes stériles.
- ◇ Il revient à l'utilisateur de maîtriser ses propres conditions de collecte, transport, conservation et extraction des échantillons pour que l'extraction d'ARN par des systèmes adaptés produise des ARN de qualité.



- ◇ Il est recommandé que les échantillons soient extraits immédiatement, ou conservés selon les recommandations de stockage des échantillons avant extraction (Tableau 3).

Tableau 3 : Recommandations de stockage avant utilisation

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

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

10.2 Extraction de l'ARN

Il revient aux utilisateurs de s'assurer que le système d'extraction des acides nucléiques utilisé est compatible avec la technologie de RT-PCR en temps réel.

Dans le kit EBX-060, 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.

10.3 Réalisation de la RT-PCR en temps réel

Remarque générale :

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

- 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.

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

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 CFX96

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

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

*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 CFX96.

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

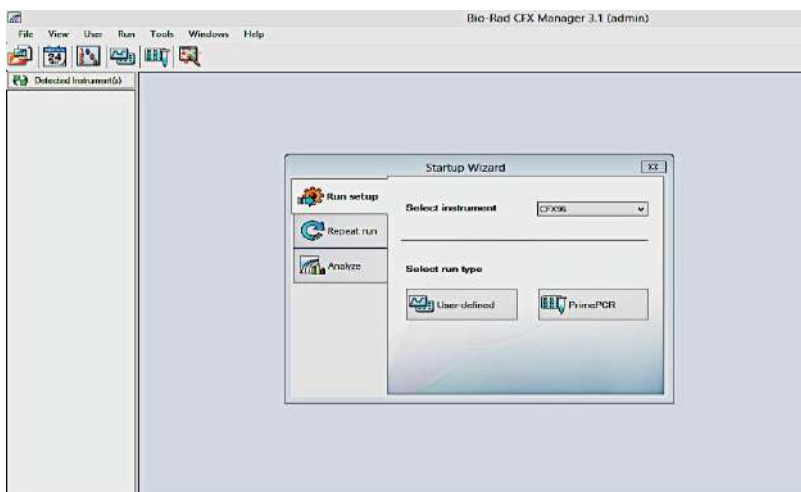
Note : Sur CFX96™ (Bio-Rad), lancer le run à partir de la version 1.6 ou postérieure, puis analyser avec la version 3.1 (voir § Validation de l'expérience).

11. Validation de l'expérimentation

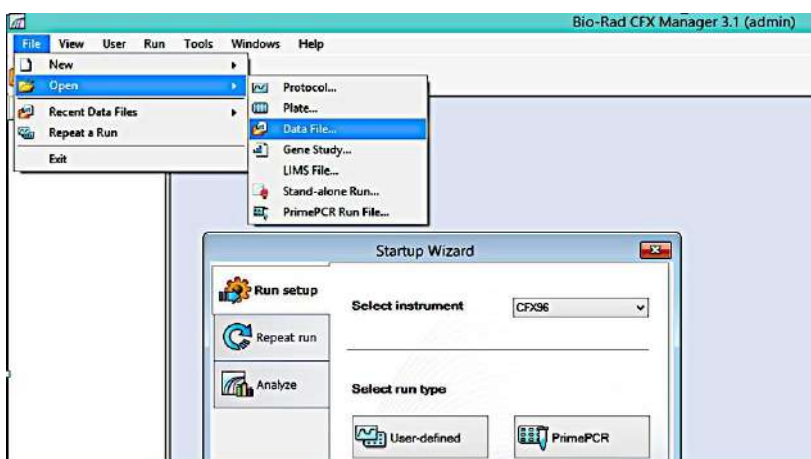
L'analyse des data post-acquisition sur un appareil de PCR CFX96 (Bio-Rad) doit être réalisée à l'aide de la version 3.1 du logiciel CFX Manager (Bio-Rad). Afin de passer sur cette version à partir d'un run lancé sur une version antérieure, veuillez suivre la procédure suivante : à la fin du run, le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

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

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.

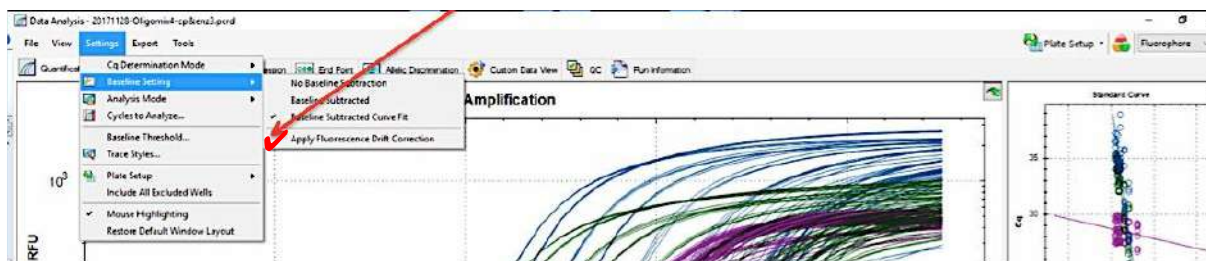


Cliquer sur « File » et sélectionner « Open » puis « Data File ».



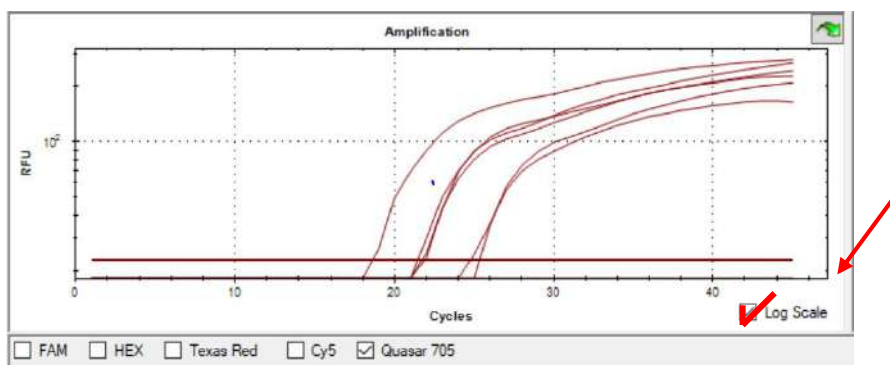
Sélectionner le fichier que vous souhaitez analyser et cliquer sur « Ouvrir ».

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 ».

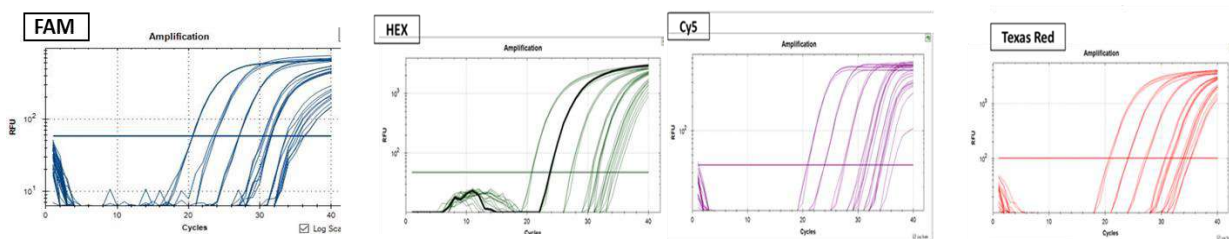


Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

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 4 canaux considérés **FAM, HEX, Texas Red, et CY5**.



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

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

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 ≤ 32
HEX	Ct ≤ 32
Texas Red	Ct ≤ 32
Cy5	Ct ≤ 32
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

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

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

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

Tous les cas de figures sont rassemblés dans le Tableau 5.

Pour les échantillons cliniques, et la détermination de la présence ou absence des virus Monkeypox, Measles et VZV



Cut-off de valeurs de CT pour la positivité :
Ct < 40

Sur T-COR 8®-IVD, l'interprétation est automatique avec les codes barres

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

Tableau 5 : Détection des virus Monkeypox, Measles et VZV

Cible 1 Monkey pox	Cible 2 Measles	Cible 3 VZV	Contrôle endogène	Vali- dité du test	Interprétation possible ou in- terprétation impossible (NI)
FAM	HEX	Texas Red	CY5		
+	-	-	+ / -	Oui	OUI : Présence du Monkeypox
-	+	-	+ / -	Oui	OUI : Présence du Measles (rou- geole)
-	-	+	+ / -	Oui	OUI : Présence du VZV
-	-	-	+	Oui	OUI : Absence des 3 virus testés
-	-	-	-	Non	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 :

- ❖ Tous les échantillons doivent être traités comme potentiellement infectés, 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 :

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

- 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.
 - ❖ Un résultat négatif de ce test n'exclut pas de façon absolue une possible infection aux Monkeypox, Measles ou VZV.

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-060 avec une analyse Probit qui a permis de déterminer le cut-off 95%.

Limite de détection/sensibilité analytique (cut-off 95%) sur CP:

Monkeypox (FAM) : 3,879 copies/ μ L

Measles (HEX) : 2,289 copies/ μ L

VZV (Texas Red) : 2,565 copies/ μ L

Alb (Cy5) : 4,862 copies/ μ L

Limite de détection/sensibilité analytique (cut-off 100%) sur CP:

Monkeypox (FAM) : 5 copies/ μ L

Measles (HEX) : 1 copies/ μ L

VZV (Texas Red) : 5 copies/ μ L

Alb (Cy5) : 10 copies/ μ L

La validation des performances a porté sur :

24 échantillons positifs	
22 échantillons VZV	Caractérisés par Biomnis Sample Library
1 échantillon de vaccin avec virus atténué	ROR = Rougeole Oreillons Rubéole

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

1 souche de Monkeypox clade IIb	Caractérisée par l'IRBA
---------------------------------	-------------------------

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).

9 échantillons négatifs	
9 échantillons négatifs	Caractérisés par Biomnis Sample Library

Echantillons positifs : sensibilité pour le VZV / Measles et spécificité pour virus d'intérêt

N=24 (+) positif / (-) négatif		Virus		
		Monkeypox	Measles	VZV
Echantillons VZV	N=22	-	-	+ (22/22)
Sensibilité vis-à-vis du VZV		N/A		
Spécificité vis-à-vis des virus		N/A	N/A	100%
Echantillons Measles (ROR)	N=1	-	+ (1/1)	-
Sensibilité vis-à-vis du Measles		N/A		
Spécificité vis-à-vis des mutations		N/A	100%	N/A
Echantillons Monkeypox	N=1	+ (1/1)	-	-
Sensibilité vis-à-vis du Monkeypox		N/A		
Spécificité vis-à-vis des mutations		100%	N/A	N/A

Sensibilité Measles : > 99% (1/1)

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

Spécificité Measles : > 99% (23/23)
Concordance Measles : > 99% (24/24)

Sensibilité Monkeypox : > 99% (1/1)
Spécificité Monkeypox: > 99% (23/23)
Concordance Monkeypox: > 99% (24/24)

Sensibilité VZV : > 99% (22/22)
Spécificité VZV: > 99% (2/2)
Concordance VZV: > 99% (24/24)

14. Particularités liées à l'instrument de PCR en temps réel 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 ».

Notes :

Déposer les 5 microlitres d'extrait d'échantillon délicatement dans le mélange réactionnel. Ne pas effectuer d'allers-retours de pipetage, afin d'éviter la formation de bulles dans le faible volume réactionnel, 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.

Bien appuyer sur le bouchon afin d'éviter toute évaporation du liquide de mélange réactionnel.

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 RT-PCR, et que celle-ci fonctionne correctement.

Fluorophores

Les fluorophores ont été présélectionnés avec les codes-barres.

Utilisation des Codes-Barres

- 1- Sélectionner Menu > Nouvelle analyse/New Run
- 2- Sélectionner Code-barres/Barcode,

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

3- Scanner sur la droite de l'appareil le Code-Barre désiré :

- soit pour le contrôle positif (Code-barre EBX-060 Pos Ctrl),
- soit pour le contrôle négatif (Code-barre EBX-060 Neg Ctrl),
- soit pour un échantillon (Code-Barre EBX-060)

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

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

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

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

7- Sélectionner « Suivant / Next »

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

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

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

Présentation et Interprétation des résultats

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

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

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

« Neg Ctrl Fail » : Non valide

« Neg Ctrl Valid » : Valide

« Pos Ctrl Fail » : Non valide

« Pos Ctrl Valid » : Valide

Détermination du statut pour les échantillons :

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

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

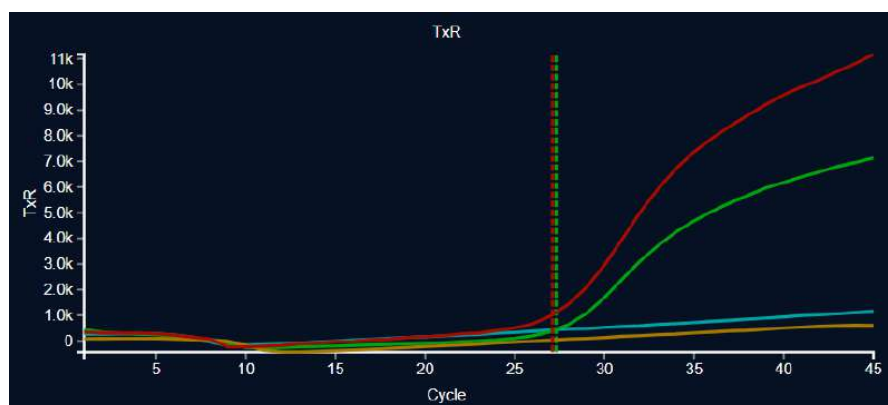
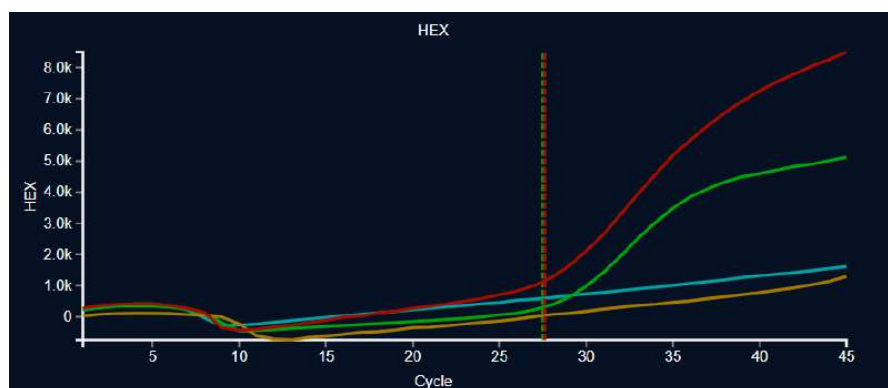
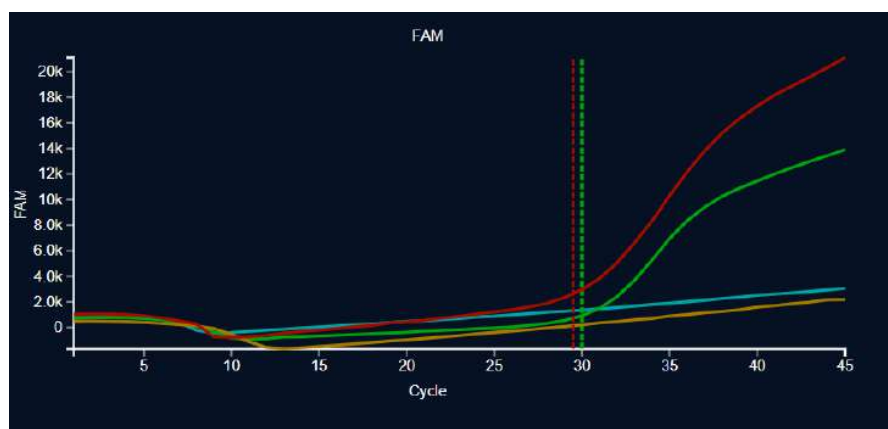
« Non Valide / Invalid » : Résultat non valide -> retester -> encadré jaune

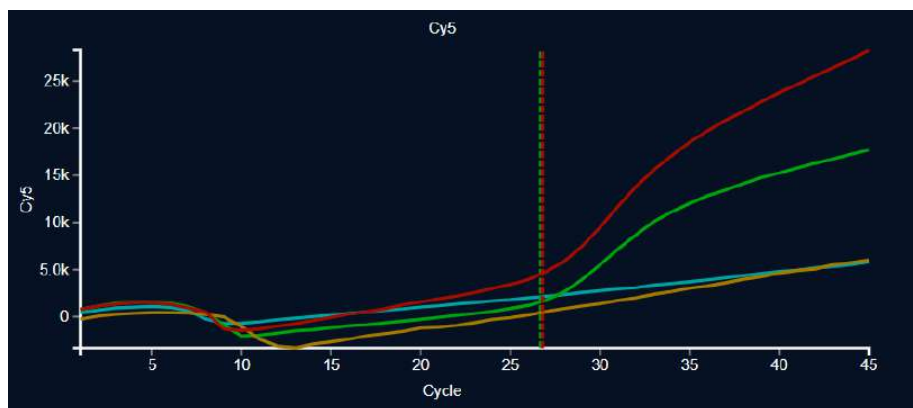
Exemple de présentation d'interprétation automatique des résultats

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

Summary						
Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5
1	CTRL NEG	EBX-060 Neg Ctrl				
2	CTRL NEG	EBX-060 Neg Ctrl	30.0	27.5	27.3	26.7
4	CTRL POS	EBX-060 Pos Ctrl				
5	POS SAMPLE	EBX-060	29.5	27.6	27.1	26.8
6	NEG SAMPLE	EBX-060				23.9
Call						
Note						
Detected						
• Neg Ctrl						
Neg Ctrl Valid						
Invalid						
Neg Ctrl Fail						
Invalid						
Pos Ctrl Fail						
Detected						
• MV						
• VZV						
• MKP						
MKP, MV and VZV positive						
Not Detected						
MKP, MV and VZV negative						

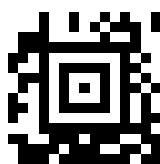
Exemple de courbes d'amplification



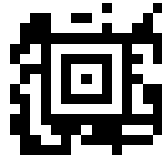


Codes-Barres sur T-COR8®-IVD pour EBX-060

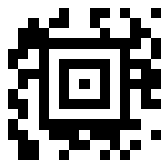
EBX-060 Pos Ctrl
Contrôle Positif CP



EBX-060 Neg Ctrl
Eau = contrôle négatif (CN-H2O)



EBX-060



15. Bibliographie

- Vanessa Zubach, Alberto Severini, Joanne Hiebert. Development of a rapid, internally controlled, two target, real-time RT-PCR for detection of measles virus. Journal of Virological Methods 299 (2022) 11434
- Yu Li, Victoria A. Olson, Thomas Laue, Miriam T. Laker, Inger K. Damon. Detection of monkeypox virus with real-time PCR assays. Journal of Clinical Virology 36 (2006) 194–203.
- Kimberly B. Hummel , Luis Lowe, William J. Bellini, Paul A. Rotal. Development of quantitative gene-specific real-time RT-PCR assays for the detection of measles virus in clinical specimens. Journal of Virological Methods 132 (2006) 166–173
- Rapport annuel d'activité 2019. Centre de national de référence Laboratoire Expert Orthopoxvirus Centre de national de référence Laboratoire Expert Orthopoxvirus

16. Contrôle qualité

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

17. Elimination des déchets

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

18. 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.

19. 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
Monkeypox Screening Test
REAL-TIME RT-PCR
For **qualitative** real-time RT-PCR



EBX-060-25
EBX-060-50
EBX-060-100
EBX-060-200
EBX-060-600

25/50/100/200/600 reactions

RUO

Version 2.01 of August 22th 2024

Validated on:

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) with analysis on CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)
- T-COR 8®-IVD (Tetradcore Inc.) with T-COR 8 Per-well SmartCT™ (auto v1) software

Storage conditions:

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



Instructions for use

Available on www.eurobio-scientific.com

Table of contents

1. Introduction.....	27
2. Purpose of the system.....	28
3. Symbols.....	29
4. Principle of detection.....	30
5. Content of the kit	30
6. Storage	31
7. Materials required not provided.....	31
8. Real-time PCR instrument	31
9. Cautions and note.....	32
10. Procedure	33
11. Validation of the experiment.....	36
12. Data analysis and interpretation.....	39
13. Performance analysis.....	40
15. Specificities of the real-time PCR T-COR 8-IVD instrument.....	42
16. Bibliography	49
17. Quality control	49
18. Waste disposal	49
19. Incident report.....	49
20. Technical assistance	49

1. Introduction

Monkeypox is a viral infectious disease caused by an orthopoxvirus (MPXV). It is a DNA virus of about 200,000 base pairs. The Monkeypox virus is divided into two clades: West Africa and the Congo Basin. This zoonosis, known since the 1970s, is usually transmitted to humans in the forest areas of Central and West Africa by wild rodents or primates. Human-to-human transmission is also possible, particularly within the family home or in a care setting. The Monkeypox virus can be transmitted by direct contact with the skin lesions or mucous membranes of a sick person, as well as by droplets (saliva, sneezing, postillons...). The symptoms are comparable to those of smallpox but the disease is less severe. Several cases of indigenous Monkeypox infections (MKP) have been reported since May 2022 in several European countries, including in men who have sex with men (MSM), cases have also been reported in the United States, Canada, Australia and Israel. Several cases have been reported in France. There is no vaccine against monkeypox, however, the High Authority of Health has recommended the implementation of a reactive vaccine strategy in post-exposure with smallpox vaccines of 3rd generation.

Measles virus (also called MV virus) is an RNA virus belonging to the genus Morbillivirus of the Paramyxovirus family. Measles is one of the most contagious viral infections of the respiratory tract, with complications that can be serious, and potentially eradicable due to high vaccination coverage. In the first two months of 2022, the World Health Organization (WHO) has seen a significant increase in measles cases worldwide. Measles vaccination is mandatory for all children born on or after 1 January 2018. The first dose is given at 12 months and the second at 16 to 18 months.

Varicella-Zoster Virus (VZV) is a DNA alpha herpesvirus responsible for two diseases: chickenpox and shingles, a disabling disease in the elderly and immunodepressed patients. It is transmissible by inhalation followed by replication in the mucosa of the respiratory tract and oropharynx, giving rise to severe varicella pneumonia in children and the elderly. Neurological complications related to VZV, in addition to early onset encephalitis after the onset of skin "rashes", include Guillain-Barré syndrome and Reye's syndrome. Vaccination against chickenpox is recommended from the age of 12 years for people who have not had chickenpox and are therefore not naturally immune, and who work in professions in contact with early childhood, or health professions in training in contact with subjects at risk of severe chickenpox.

The EurobioPlex EBX-060 has been designed to detect and differentiate Monkeypox, Measles and VZV viruses.

Extracted RNA is the starting material for the EurobioPlex Monkeypox Screening Test. It is the user's responsibility to choose extraction methods relevant to the type of samples tested.

2. Purpose of the system

EurobioPlex Monkeypox Screening Test is a test based on real-time reverse-transcription and amplification designed for *in vitro* use for qualitative determination of absence or presence of Monkeypox, Measles and VZV viruses in a RNA extract. This test is indicated to detect presumptive infection in humans.

The EurobioPlex EBX-060 must be used by qualified medical biology analysis laboratory personnel. It is for single use, it should not be recycled after use.

3. Symbols



Reference



Batch number



Limits of storage temperature



Expiration date



Content sufficient for « N » reactions



Manufacturer

RUO

Research Use Only



Store away from light



Do not use if packaging is damaged



Caution

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

4. Principle of detection

The EBX-060 is a test using reverse-transcription and real-time amplification of viral RNA of Monkeypox, VZV and viral DNA of Measles based on amplification of 3 viruses in the same well.

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

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

5. Content of the kit

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

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

Table 1: Content of the kit

ap color	Content of the kit	25 reactions	50 reactions	100 reactions	200 reactions	600 reactions	Reconstitution
Red	Enzymes	101,25 µL	195 µL	450 µL	750 µL	2 x 1237,5 µL	Ready to use
Transparent	Oligomix	81 µL	156 µL	360 µL	660 µL	2 x 990 µL	Ready to use
Yellow	Positive control CP	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	350 µL	Ready to use
Blue	Water = Negative control (CN-H2O)	500 µL	500 µL	500 µL	1000 µL	3 x 1000 µL	Ready to use

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

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

Table 2: Detection of targets by fluorophores

Targets	Fluorophore	Excitation	Emission
Target 1 / Monkeypox	FAM	495 nm	515 nm
Target 2 / Measles	HEX	535 nm	555 nm
Target 3 / VZV	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 **HEX** (Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx, T-COR 8-IVD, LC480), Canal VIC (Systèmes ABI), Canal Alexa532 (SmartCycler II), Canal Yellow (RotorGene),
- Channel **Texas Red** (Systems ABI, Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx, T-COR 8-IVD), LC Red 610 (LC480), Canal Orange (RotorGene)
- Channel **Cy5** (CFX96™/Chromo4, Systems ABI, Systems Mx, T-COR8-IVD, LC 480), Channel Alexa647 (Smart-Cycler II), Channel Red (RotorGene)

6. Storage

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

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



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

7. Materials required not provided

- ◇ Biological cabinet
- ◇ Real time PCR instrument
- ◇ Centrifuge for microtubes
- ◇ Vortex
- ◇ Plates / tubes for real-time PCR reaction
- ◇ Micropipettes
- ◇ DNase-free and RNase-free filter tips for micropipettes
- ◇ Sterile microtubes
- ◇ Gloves (talc-free)

8. Real-time PCR instrument

The EurobioPlex Monkeypox Screening Test kit has been developed and validated for use with the following real-time PCR instruments:

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

- CFX96TM Real Time PCR detection system (Bio-Rad) with analysis on CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)
- T-COR 8®-IVD (Tetracore Inc.) with T-COR 8 Per-Well SmartCTTM (auto v1) software

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 Monkeypox, Measles, VZV must be followed strictly at all times. Safety levels of laboratories and laboratory equipment must be in agreement.
- ◇ Ensure that instruments have been installed, calibrated and maintained in accordance with the manufacturer's recommendations.
- ◇ It is the responsibility of the user to use equipment other than that validated, and in such cases performance is not guaranteed.
- ◇ Clinical samples should be considered as potentially infectious material and should be prepared in a laminar flow cabinet.
- ◇ This experiment should be performed according to good laboratory practice.
- ◇ Do not use this kit after the stated expiration date.
- ◇ The kit is shipped in 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.

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

- ◇ Appropriate RNA preparation/extraction methods for quality RNA production and RT-PCR application should be used, especially to avoid contamination with DNases and RNases.
- ◇ Use filter tips for micropipettes, RNase-free and DNase-free.
- ◇ Do not pipette with the mouth. Do not eat, drink or smoke in the laboratory.
- ◇ Avoid aerosols.

10. Procedure

a. Samples collection

- ◇ Collect samples in sterile tubes.
- ◇ It is the responsibility of the user to control their own sample collection, transport, storage and extraction conditions to ensure that RNA extraction using appropriate systems produces RNA of high quality.



- ◇ It is recommended that samples are extracted immediately, or stored according to the sample storage recommendations before extraction (Table 3).

Table 3: Storage recommendations before use

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

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

b. RNA extraction

It is the responsibility of the user to ensure that the nucleic acid extraction system used is compatible with real-time RT-PCR technology.

c. Real-time RT-PCR

General notes:

- The positive control contains high concentrations of matrix. Handling must be done carefully to avoid contamination.

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

- To confirm that the RT-PCR is working correctly, it is necessary to test the positive control, as well as the negative control (water supplied = CN-H2O) (see II-2/6 of the real-time RT-PCR protocol).

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

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 CFX96

Program	Tempera-	Dura-	Cycle(s)	
Reverse Tran-	45°C	5 min	1	-
scription				
Denaturation	98°C	20 sec	1	-
Amplification	98°C	3 sec	40	-
	58°C	10 sec		Acquisition of fluorescence

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

d. Detailed procedure

- 1) Ensure that the reagents are completely thawed. Homogenize 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-COR-8).

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) Homogenize 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	Temperat	Durati	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

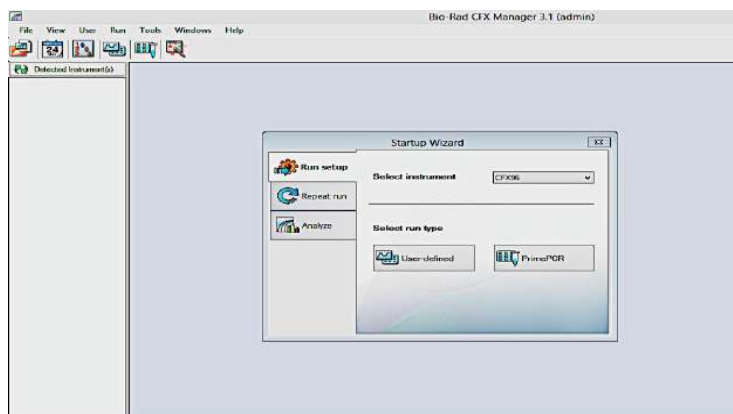
Note: On CFX96™ (Bio-Rad), start the run using the v1.6 or later version of CFX Manager Software, and analyze with v 3.1 (see § Validation of the Experiment)

11. Validation of the experiment

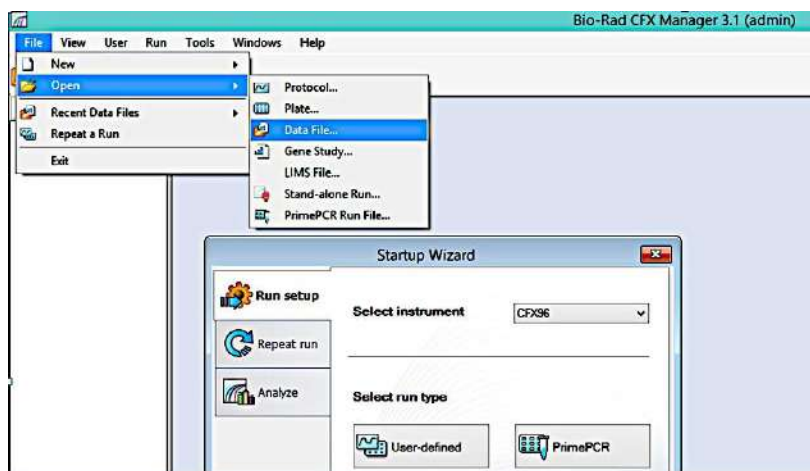
Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

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".



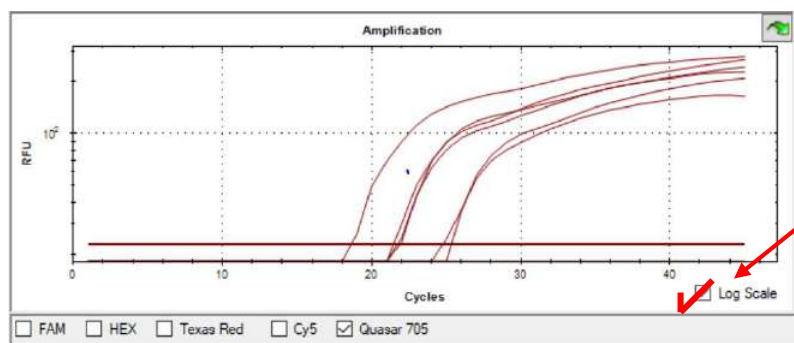
Select the file you need to analyze and click on "Open".

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".

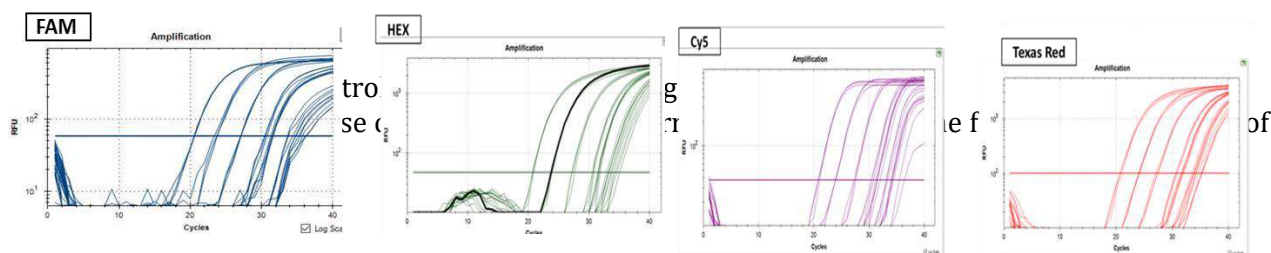


Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

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 4 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.



Once this step has been completed, the analysis can proceed for the 4 channels considered **FAM**, **HEX**, **Texas Red** and **CY5**.



To validate the assay, the Ct values for the controls must be the following (Table 4). Outside of these values, the experiment cannot be validated. On T-COR 8®-IVD, these controls must be performed at least during the first use of a new box of kit.

Table 4: Run validation

Positive Control	
FAM	Ct ≤ 32
HEX	Ct ≤ 32
Texas Red	Ct ≤ 32
Cy5	Ct ≤ 32
Negative Control	
FAM	Undetermined Ct
HEX	Undetermined Ct
Texas Red	Undetermined Ct
Cy5	Undetermined Ct

12. Data analysis and interpretation

RNA extraction and RT-PCR inhibition control in samples:

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

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

For clinical samples, and determination of presence or absence of Monkeypox, Measles or VZV



Cut-off Ct values for positivity: Ct < 40

For T-COR 8®-IVD automatic interpretation is provided with barcodes

The following results are possible:

Table 5: Detection of Monkeypox, Measles or VZV

Target 1 Monkey- pox	Target 2 Measles	Target 3 VZV	Endoge- nous con- trol	Validity of the test	Presence of one virus or no possible interpretation (NI)
FAM	HEX	Texas Red	CY5		
+	-	-	+ / -	Yes	YES : Presence of Monkeypox
-	+	-	+ / -	Yes	YES : Presence of Measles
-	-	+	+ / -	Yes	YES : Presence of VZV
-	-	-	+	Yes	YES : No virus detected
-	-	-	-	Limited	NI

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

Limitations of use and interpretation:

- ❖ All samples must be treated as potentially infected, and biosafety local regulations must be thoroughly followed.
- ❖ Interpretation of results must take into account the possibility of false negatives and false positives.
 - False negative can be due to:
 - Inappropriate collection of samples, or bad storage
 - Samples outside the viremic phase
 - Incorrect extraction methods or use of non-validated PCR instruments
 - Manipulations that do not rigorously follow all the indications of this manual.
 - False positive can be due to:

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

- A contamination related to wrong manipulation of highly positive samples, or from the positive control, or PCR products
- Procedures that do not rigorously follow precautions to avoid contamination described in this manual
- ❖ Results must be interpreted by medical professionals in the clinical context of the patient, its history and symptoms.
- ❖ This test does not exclude the presence of other pathogens.
- ❖ A negative result for this test does not absolutely exclude a possible infection with Monkeypox, Measles or VZV.

13. Performance analysis

Limit of detection/analytical sensitivity

A dilution range was performed from a plasmid mixture ranging from 10^5 to 1 copy/ μ L. This dilution range was used to determine the detection limit (LoD) of the kit with a Probit analysis which allowed the 95% cut-off to be determined.

Detection limit/analytical sensitivity (95% cut-off) of CP

Monkeypox (FAM) : 3,879 copies/ μ L

Measles (HEX) : 2,289 copies/ μ L

VZV (Texas Red) : 2,565 copies/ μ L

Alb (Cy5) : 4,862 copies/ μ L

Detection limit/analytical sensitivity (100% cut-off) of CP:

Monkeypox (FAM) : 5 copies/ μ L

Measles (HEX) : 1 copies/ μ L

VZV (Texas Red) : 5 copies/ μ L

Alb (Cy5) : 10 copies/ μ L

The validation of the performance was performed on:

24 positive samples	
22 VZV samples	Characterised by Biomnis Sample Library
1 vaccine sample with attenuated virus	ROR vaccine

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

1 Monkeypox strain IIb clade	Characterised by IRBA
------------------------------	-----------------------

9 negative samples	
9 negative sample	Characterised by Biomnis Sample Library

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

Positive samples :
sensitivity for VZV / Measles and specificity for virus of interest

		Virus		
		Mon-key-pox	Measles	VZV
N=24 (+) positif / (-) négatif				
VZV samples	N=22	-	-	+ (22/22)
Sensitivity to VZV		N/A		
Specificity to virus		N/A	N/A	100%
Measles sample (ROR)	N=1	-	+ (1/1)	-
Sensitivity to Measles		N/A		
Specificity to virus		N/A	100%	N/A
Monkeypox	N=1	+ (1/1)	-	-
Sensitivity to Monkeypox		N/A		
Specificity to virus		100%	N/A	N/A

Measles sensitivity : > 99% (1/1)
Measles specificity: > 99% (23/23)
Measles concordance: > 99% (24/24)

VZV sensitivity : > 99% (22/22)
VZV specificity: > 99% (2/2)
VZV concordance: > 99% (24/24)

Monkeypox sensitivity : > 99% (1/1)
Monkeypox specificity: > 99% (23/23)
Monkeypox concordance: > 99% (24/24)

15. Specificities of the real-time PCR T-COR 8-IVD instrument

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

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

Note: Add cautiously the 5 microliters of extract into the reaction mix and do not perform back and forth pipetting, in order to avoid the formation of bubbles in the small 15 microliter total volume.

Check that the volume of liquid is located at the bottom of the tube.

Close each tube tightly after each deposit of the control or sample to avoid contamination. Press firmly onto the cap in order to avoid any evaporation of reaction mix.

Controls

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

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

Fluorophores

The fluorophores are preselected with the barcodes.

Use of Barcodes

1- Select Menu > New Run

2- Select Barcode

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

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

- For the positive control (Barcode EBX-060 Pos Ctrl),
- For the negative control (Barcode EBX-060 Neg Ctrl),
- For a patient sample (Barcode EBX-060)

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

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

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

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

7- Select "Next"

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

9- Select "Start run".

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

Presentation and Interpretation of results

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

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

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

« Neg Ctrl Fail »: Not valid

« Neg Ctrl Valid »: Valid

« Pos Ctrl Fail »: Non valid

« Pos Ctrl Valid »: Valid

For patients status:

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

"Not detected": Negative → red box

« Invalid »: Invalid result → yellow box: retest

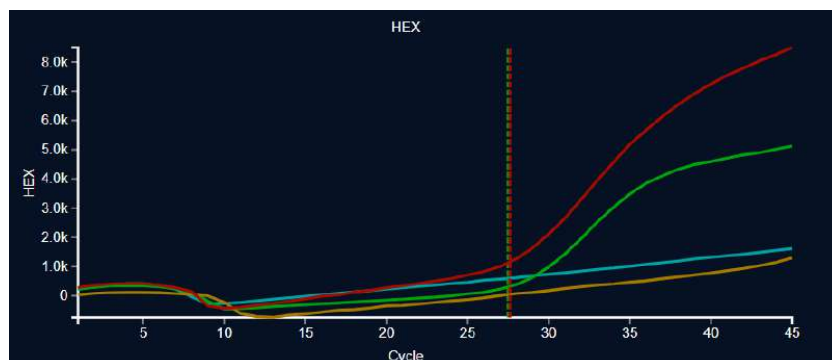
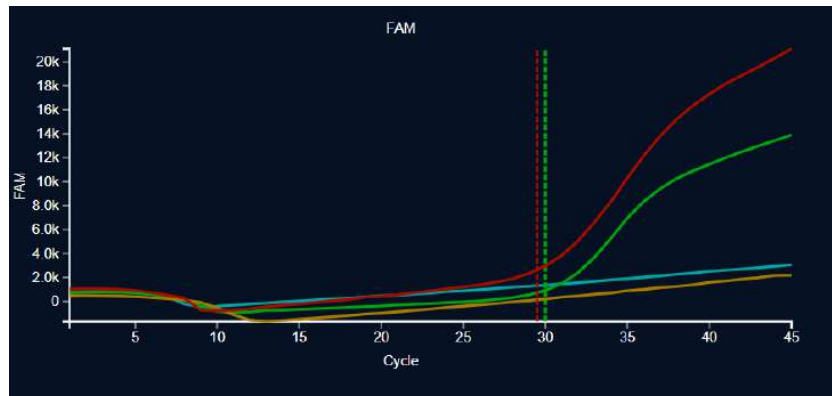
Example of automatic interpretation of results on T-COR 8®-IVD

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

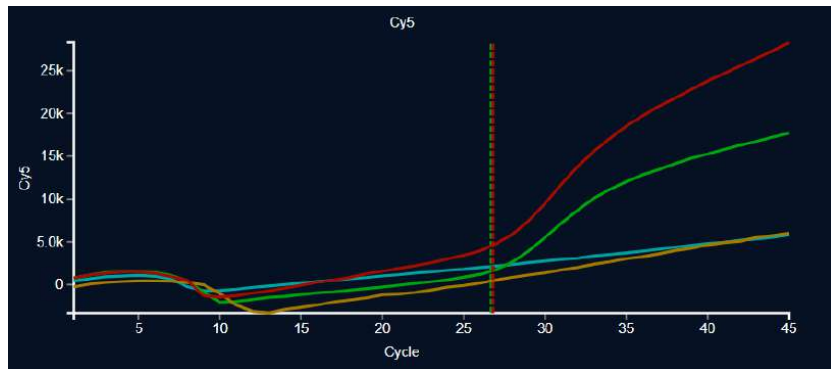
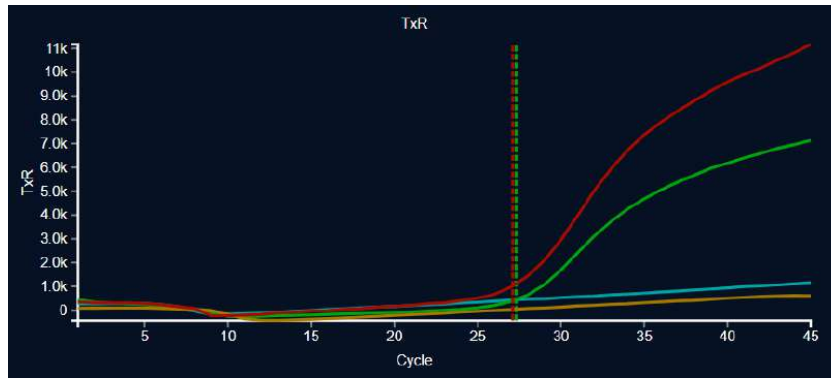
Summary						
Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5
1	CTRL NEG	EBX-060 Neg Ctrl				
2	CTRL NEG	EBX-060 Neg Ctrl	30.0	27.5	27.3	26.7
4	CTRL POS	EBX-060 Pos Ctrl				
5	POS SAMPLE	EBX-060	29.5	27.6	27.1	26.8
6	NEG SAMPLE	EBX-060				23.9

Call	Note
Detected • Neg Ctrl	Neg Ctrl Valid
Invalid	Neg Ctrl Fail
Invalid	Pos Ctrl Fail
Detected • MV • VZV • MKP	MKP, MV and VZV positive
Not Detected	MKP, MV and VZV negative

Exemple of amplification curves



Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test



Barcodes for EBX-060 for use on T-COR8®-IVD

EBX-060 Pos Ctrl
Positive control CP



EBX-60 Neg Ctrl

Water = Negative control (CN-H2O)



EBX-060



16. Bibliography

- Vanessa Zubach, Alberto Severini, Joanne Hiebert. Development of a rapid, internally controlled, two target, real-time RT-PCR for detection of measles virus. Journal of Virological Methods 299 (2022) 11434
- Yu Li, Victoria A. Olson, Thomas Laue, Miriam T. Laker, Inger K. Damon. Detection of monkeypox virus with real-time PCR assays. Journal of Clinical Virology 36 (2006) 194–203.
- Kimberly B. Hummel , Luis Lowe, William J. Bellini, Paul A. Rotal. Development of quantitative gene-specific real-time RT-PCR assays for the detection of measles virus in clinical specimens. Journal of Virological Methods 132 (2006) 166–173
- Rapport annuel d'activité 2019. Centre de national de référence Laboratoire Expert Orthopoxvirus Centre de national de référence Laboratoire Expert Orthopoxvirus

17. Quality control

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

18. Waste disposal

Eliminate all waste in accordance with the legislation on DASRI.

19. 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.

20. 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
91940 Les Ulis Cedex
FRANCE



EurobioPlex

Prueba de cribado de la viruela del mono RT-PCR EN TIEMPO REAL

Para RT-PCR **cualitativa** en tiempo real

EBX-060-25

EBX-060-50

EBX-060-100

EBX-060-200

EBX-060-600



25/50/100/200/600 reacciones

SUI /RUO

Versión 2.01 del 10 de agosto de 2024

Validado el:

- Sistema de detección CFX96™ mediante PCR en tiempo real (Bio-Rad) con análisis en CFX Manager versión 3.1 (Bio-Rad)
- T-COR 8®-IVD (Tetracore Inc.) con software T-COR 8 Per-well SmartCT™ (auto v1)

Condiciones de almacenamiento:

Mantener todos los reactivos entre -15 °C y -22 °C hasta su uso y después del primer uso



Instrucciones de uso

Disponible en www.eurobio-scientific.com

Índice

1.	Introducción	51
2.	Finalidad del sistema	53
3.	Símbolos	54
4.	Principio de detección	55
5.	Contenido del kit	55
6.	Almacenamiento	56
7.	Materiales necesarios no proporcionados	56
8.	Instrumento de PCR en tiempo real	56
9.	Precauciones y nota	57
10.	Procedimiento	58
11.	Validación del experimento	61
12.	Análisis e interpretación de los datos	65
13.	Análisis del rendimiento	66
15.	Especificidades del instrumento T-COR 8-IVD de PCR en tiempo real	68
16.	Bibliografía	75
17.	Control de calidad	75
18.	Eliminación de residuos	75
19.	Informe de incidente	75
20.	Asistencia técnica	75

1. Introducción

La viruela del mono es una enfermedad infecciosa vírica causada por un orthopoxvirus (MPXV). Es un virus de ADN de aproximadamente 200 000 pares de bases. El virus de la viruela del mono se divide en dos clados: África Occidental y la cuenca del Congo. Esta zoonosis, conocida desde la década de 1970, la suelen transmitir los roedores o primates salvajes a los seres humanos en las zonas de los bosques de África Central y Occidental. También es posible la transmisión de humano a humano, especialmente dentro del hogar familiar o en un entorno sanitario. El virus de la viruela del mono puede transmitirse por contacto directo con las lesiones cutáneas o las membranas mucosas de una persona enferma, así como por gotículas (saliva, estornudos, expectoración...). Los síntomas son similares a los de la viruela, pero la enfermedad es menos grave. Desde mayo de 2022 se han notificado varios casos de infecciones por la viruela del mono autóctonas (MKP) en varios países europeos; entre ellos, en hombres que tienen relaciones sexuales con hombres (HSH), y también se han notificado casos en Estados Unidos, Canadá, Australia e Israel. Se han notificado varios casos en Francia. No existe ninguna vacuna contra la viruela del mono; sin embargo, la Alta Autoridad Sanitaria ha recomendado la implementación de

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

una estrategia de vacuna reactiva posterior a la exposición con vacunas contra la viruela de tercera generación.

El virus del sarampión (VS) es un virus de ARN perteneciente al género morbillivirus de la familia de los paramixovirus. El sarampión es una de las infecciones víricas más contagiosas de las vías respiratorias, con complicaciones que pueden ser graves y potencialmente erradicables gracias a la elevada cobertura de vacunación. En los dos primeros meses de 2022, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha observado un aumento significativo de los casos de sarampión en todo el mundo. La vacunación contra el sarampión es obligatoria para todos los niños nacidos a partir del 1 de enero de 2018. La primera dosis se administra a los 12 meses y la segunda entre los 16 y 18 meses.

El virus de la varicela-zóster (VVZ) es un herpesvirus alfa de ADN responsable de dos enfermedades: la varicela y el herpes zóster, una enfermedad discapacitante en pacientes de edad avanzada e inmunodeprimidos. Es transmisible por inhalación seguida de replicación en la mucosa de las vías respiratorias y la orofaringe, lo que da lugar a neumonía grave por varicela en niños y ancianos. Entre las complicaciones neurológicas relacionadas con el VVZ, además de la encefalitis de inicio temprano después de la aparición de “erupciones cutáneas”, se encuentran el síndrome de Guillain-Barré y el síndrome de Reye. La vacunación contra la varicela se recomienda a partir de los 12 años de edad para las personas que no han tenido varicela y, por lo tanto, no son inmunes de forma natural, y que trabajan en profesiones en contacto con la primera infancia, o en profesiones de la salud en formación en contacto con sujetos con riesgo de varicela grave.

El EurobioPlex EBX-060 se ha diseñado para detectar y diferenciar los virus de la viruela del mono, el sarampión y el VVZ.

El ARN extraído es el material de partida para la prueba de cribado de la viruela del mono EurobioPlex.

Es responsabilidad del usuario elegir métodos de extracción pertinentes para el tipo de muestras analizadas.

13. Finalidad del sistema

La prueba de cribado de la viruela del mono EurobioPlex es una prueba basada en la transcripción inversa y la amplificación en tiempo real diseñada para el uso *in vitro* para la determinación cualitativa de la ausencia o presencia de los virus de la viruela del mono, el sarampión y el VVZ en una extracción de ARN. Esta prueba está indicada para detectar presuntas infecciones en humanos.

El EurobioPlex EBX-060 debe ser utilizado por personal cualificado de laboratorio clínico y biomédico. Es para un solo uso, no debe reciclarse después de su uso.

14. Símbolos



Referencia



Número de lote



Límites de temperatura de almacenamiento



Fecha de caducidad



Contenido suficiente para "N" reacciones



Fabricante

SUI

Solo para uso en investigación



Proteger de la luz solar



No utilizar si el envase está dañado



Precaución

15. Principio de detección

El EBX-060 es una prueba que utiliza transcripción inversa y amplificación en tiempo real de ARN viral de la viruela del mono y del VVZ, y ADN viral del sarampión en función de la amplificación de 3 virus en el mismo pocillo.

El kit contiene una oligomezcla para detectar las 3 dianas, así como un control de extracción de ARN e inhibición de RT-PCR. La prueba se realiza a partir de ARN extraído de una muestra, utilizando una reacción de RT-PCR en un único pocillo/tubo distinto.

Los patógenos se detectan con sondas específicas, marcadas respectivamente con FAM (diana 1/viruela del mono), HEX (diana 2/sarampión) y Texas Red (diana 3/VVZ). El control endógeno se detecta utilizando una sonda marcada con Cy5. Las sondas emiten una fluorescencia específica tras su hidrólisis durante la elongación del producto de amplificación. La medición de la intensidad de la fluorescencia en tiempo real se correlaciona con la acumulación de productos de amplificación.

16. Contenido del kit

El kit de prueba de cribado de la viruela del mono de EurobioPlex RT-PCR en tiempo real está listo para su uso y contiene todos los reactivos y enzimas para la detección de este virus (Tabla 1).

La fluorescencia se emite y registra individualmente mediante mediciones ópticas durante la PCR. La detección del fragmento amplificado se realiza mediante un fluorómetro utilizando los canales que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1: Contenido del kit

Color del tapón	Contenido del kit	25 reacciones	50 reacciones	100 reacciones	200 reacciones	600 reacciones	Reconstitución
Rojo	Enzimas	101,25 µl	195 µl	450 µl	750 µl	2 x 1237,5 µl	Listo para su uso
Transparente	Oligomezcla	81 µl	156 µl	360 µl	660 µl	2 x 990 µl	Listo para su uso
Amarillo	Control positivo CP	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	350 µl	Listo para su uso
Azul	Agua = control negativo (CN-H2O)	500 µl	500 µl	500 µl	1000 µl	3 x 1000 µl	Listo para su uso

Oligomezcla: contiene cebadores y sondas para las 3 dianas y para el control endógeno

Tabla 2: Detección de dianas mediante fluoróforos

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

Dianas	Fluoróforo	Excitación	Emisión
Diana 1/Viruela del mono	FAM	495 nm	515 nm
Diana 2/Sarampión	HEX	535 nm	555 nm
Diana 3/VVZ	Texas Red	585 nm	605 nm
Control interno endógeno	Cy5	650 nm	670 nm

Canales equivalentes en diferentes cicladores de PCR en tiempo real:

- Canal **FAM** (sistemas ABI, SmartCycler II, sistemas Mx, CFX96™/Chromo4, T-COR8-IVD, LC480), canal verde (RotorGene)
- Canal **HEX** (Chromo 4/CFX96, sistemas Mx, T-COR 8-IVD, LC480), canal VIC (sistemas ABI), canal Alexa532 (SmartCycler II), canal amarillo (RotorGene)
- Canal **Texas Red** (sistemas ABI, Chromo 4/CFX96, sistemas Mx, T-COR 8-IVD), LC Red 610 (LC480), canal naranja (RotorGene)
- Canal **Cy5** (CFX96™/Chromo4, sistemas ABI, sistemas Mx, T-COR8-IVD, LC 480), canal Alexa647 (SmartCycler II), canal rojo (RotorGene)

17. Almacenamiento

Todos los reactivos deben almacenarse a una temperatura de entre -15 °C y -22 °C.

Todos los reactivos pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit.



La sensibilidad del análisis puede disminuir si los componentes del kit se someten a múltiples ciclos de congelación/descongelación. El kit se puede utilizar después de la apertura inicial durante un máximo de 5 ciclos de congelación/descongelación.

18. Materiales necesarios no proporcionados

- ◇ Cabina de bioseguridad
- ◇ Instrumento de PCR en tiempo real
- ◇ Centrífuga para microtubos
- ◇ Vórtex
- ◇ Placas/tubos para reacción de PCR en tiempo real
- ◇ Micropipetas
- ◇ Puntas de filtro sin ADNasa ni ARNasa para micropipetas
- ◇ Microtubos estériles
- ◇ Guantes (sin talco)

19. Instrumento de PCR en tiempo real

El kit de prueba de cribado de la viruela del mono EurobioPlex se ha desarrollado y validado para su uso con los siguientes instrumentos de PCR en tiempo real:

- Sistema de detección CFX96™ mediante PCR en tiempo real (Bio-Rad) con análisis en CFX Manager versión 3.1 (Bio-Rad)

- T-COR 8®-IVD (Tetracore Inc.) con software T-COR 8 Per-Well SmartCTTM (auto v1)

20. Precauciones y nota



Lea detenidamente estas instrucciones antes de iniciar el procedimiento.

- ◇ Este experimento debe ser realizado por técnicos de laboratorio clínico y biomédico.
- ◇ Deben seguirse las normativas de bioseguridad locales y nacionales vigentes para la detección de la viruela del mono, el sarampión y el VVZ estrictamente en todo momento. Los niveles de seguridad de los laboratorios y los equipos de laboratorio deben estar en consonancia.
- ◇ Asegurarse de que los instrumentos se han instalado y calibrado y que su mantenimiento se ha realizado según las recomendaciones del fabricante.
- ◇ Es responsabilidad del usuario utilizar equipos que no estén validados y, en tales casos, el rendimiento no está garantizado.
- ◇ Las muestras clínicas deben considerarse como material potencialmente infeccioso y deben prepararse en una cabina de flujo laminar.
- ◇ Este experimento debe realizarse según las buenas prácticas de laboratorio.
- ◇ No utilizar este kit después de la fecha de caducidad indicada.
- ◇ El kit se envía en hielo seco y los componentes del kit deben llegar congelados. Si uno o más componentes llegan descongelados o si los tubos han sufrido daños durante el transporte, póngase en contacto con Eurobio Scientific.
- ◇ Evitar los ciclos de congelación/descongelación de los reactivos, ya que esto puede reducir la sensibilidad del análisis.
- ◇ Una vez descongelados los reactivos, centrifugar los tubos brevemente antes de usarlos.
- ◇ Se recomienda el uso de hielo o de una bolsa de gel refrigerante en caso de retrasos largos debido, por ejemplo, a un gran número de muestras que procesar o a altas temperaturas.
- ◇ Se recomienda definir tres áreas de trabajo separadas: 1) Aislamiento de ARN, 2) Preparación de la mezcla de reacción y 3) Amplificación/detección de los productos amplificados.
- ◇ Las sondas fluorescentes de la oligomezcla son fotosensibles. Cualquier exposición prolongada de la oligomezcla a la luz debe limitarse al tiempo técnico necesario para preparar la placa de PCR.
- ◇ Se recomienda abrir y manipular el control positivo por separado de las muestras biológicas que se van a analizar y los demás componentes del kit para evitar la contaminación cruzada.
- ◇ En cada zona de trabajo se deben llevar bata de laboratorio y guantes (sin talco).
- ◇ Las pipetas, los reactivos y otros materiales de trabajo no deben circular entre estas zonas.
- ◇ Se debe tener especial cuidado para mantener la pureza de los reactivos y las mezclas de reacción.
- ◇ El control endógeno interno detecta una diana celular detectable en todas las muestras de origen humano, pero no en el control negativo de CN-H2O que se proporciona en el kit. La

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

ausencia de una señal en el control negativo impide que se produzca contaminación cruzada.

- ◇ Se deben utilizar métodos adecuados de preparación/extracción de ARN para la producción de ARN de calidad y la aplicación de RT-PCR, especialmente para evitar la contaminación con ADNAsas y ARNAsas.
- ◇ Utilizar puntas de filtro para micropipetas, sin ARNasa y sin ADNasa.
- ◇ No pipetear con la boca. No comer, beber ni fumar en el laboratorio.
- ◇ Evitar los aerosoles.

21. Procedimiento

a. Recogida de muestras

- ◇ Recoger las muestras en tubos estériles.
- ◇ Es responsabilidad del usuario controlar sus propias condiciones de recogida, transporte, almacenamiento y extracción de muestras para garantizar que la extracción de ARN con sistemas adecuados produce ARN de alta calidad.



- ◇ Se recomienda extraer las muestras inmediatamente o almacenarlas según las recomendaciones de almacenamiento de muestras antes de la extracción (Tabla 3).

Tabla 3: Recomendaciones de almacenamiento antes de su uso

Recomendaciones para el almacenamiento máximo de muestras antes de la extracción	
Temperatura ambiente	2 h
4 °C	72 h
-20 °C (preferiblemente -80 °C)	Almacenamiento a largo plazo

Precaución	
	◇ El usuario puede consultar las recomendaciones emitidas por la Organización Mundial de la Salud o la Autoridad Nacional de Salud de Francia para el almacenamiento adecuado de las muestras. ◇ El ARN extraído debe almacenarse a -80 °C. ◇ El transporte de muestras clínicas está sujeto a las normativas locales para el transporte de agentes infecciosos.

b. Extracción de ARN

Es responsabilidad del usuario asegurarse de que el sistema de extracción de ácido nucleico utilizado sea compatible con la tecnología de RT-PCR en tiempo real.

c. RT-PCR en tiempo real

Notas generales:

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

- El control positivo contiene altas concentraciones de matriz. La manipulación debe realizarse con cuidado para evitar la contaminación.
- Para confirmar que la RT-PCR funciona correctamente, es necesario probar el control positivo, así como el control negativo (agua suministrada = CN-H2O) (consulte II-2/6 del protocolo de RT-PCR en tiempo real).

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

Diagrama del procedimiento:

1. PREPARACIÓN DE LA MEZCLA MAESTRA

Número de reacciones	N+3*
Enzimas	(N+3) x 3,75 µl
Agua	(N+3) x 3,25 µl
Oligomezcla	(N+3) x 3 µl
Volumen total Muestra maestra	(N+3) x 10 µl

*N+1 en T-COR-8®-IVD



2. PREPARACIÓN DE LAS REACCIONES

Muestra

10 µl de muestra maestra
+
5 µl de muestra de ARN

Control positivo

10 µl de muestra maestra
+
5 µl de CP

Control negativo

10 µl de muestra maestra
+
5 µl de agua de biología molecular (CN-H₂O)



3. INSTRUMENTO DE PCR EN TIEMPO REAL CFX96

Programa	Tempera-	Dura-	Ciclos	
Transcripción inversa	45 °C	5 min	1	-
Desnaturalización	98 °C	20 s	1	-
Amplificación	98 °C	3 s	40	-
	58 °C	10 s		Adquisición de fluorescencia

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

d. Procedimiento detallado

- 1) Asegúrese de que los reactivos están completamente descongelados. Homogeneice los tubos enzimáticos y agite en el vórtex la oligomezcla y el CP durante unos 15 segundos; a continuación, centrifugue brevemente.
- 2) Prepare la muestra maestra como se indica a continuación. N es el número de reacciones (incluidos los controles positivo y negativo). Planifique la preparación de suficientes reactivos para, al menos, N+3* reacciones (*N+1 en T-COR-8).

Número de reacciones	N+3*
Enzimas	(N+3) x 3,75 µl
Agua	(N+3) x 3,25 µl
Oligomezcla	(N+3) x 3 µl
Volumen total Muestra maestra	(N+3) x 10 µl

**Para series más pequeñas (≤ 10), la preparación para N+2 es suficiente.*

- 7) Homogeneice la muestra maestra preparada en el punto 2) y centrifugue brevemente.
- 8) Dispense 10 µl de muestra maestra en tubos/pocillos de microplaca separados utilizando una micropipeta y puntas de filtro.
- 9) Añada 5 µl de muestra de ARN extraído.
- 10) Paralelamente, realice los siguientes controles:
 - Control positivo:
 - 10 µl de muestra maestra + 5 µl de CP.
 - Control negativo:
 - 10 µl de muestra maestra + 5 µl de agua suministrada (CN-H2O).
- 11) Cierre inmediatamente los tubos o la placa con una película adhesiva para evitar la contaminación.
- 12) Centrifugue brevemente para recoger la mezcla de reacción en el fondo de los tubos o pocillos de microplacas.
- 9) Ejecute el siguiente programa en el instrumento de PCR en tiempo real.

Programa	Temperat	Duraci	Ciclos	
Transcripción inversa	45 °C	5 min	1	-
Desnaturalización	98 °C	20 s	1	-
Amplificación	98 °C	3 s	40	-
	58 °C	10 s		Adquisición de fluorescencia

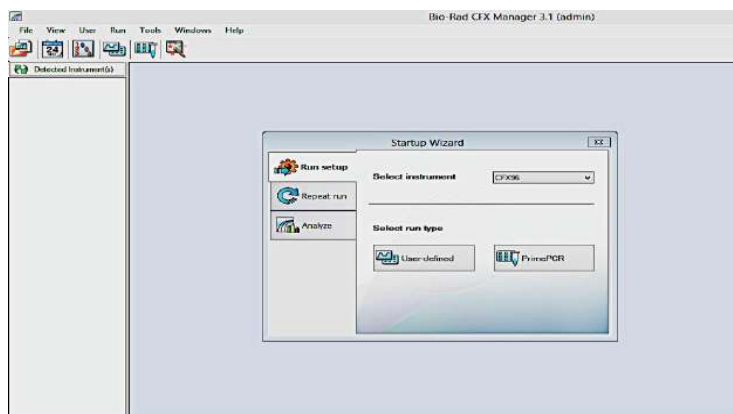
Nota: En CFX96™ (Bio-Rad), inicie la ejecución utilizando la versión 1.6 o posterior del software CFX Manager y analícela con la versión 3.1 (consulte el apartado “Validación del experimento”).

22. Validación del experimento

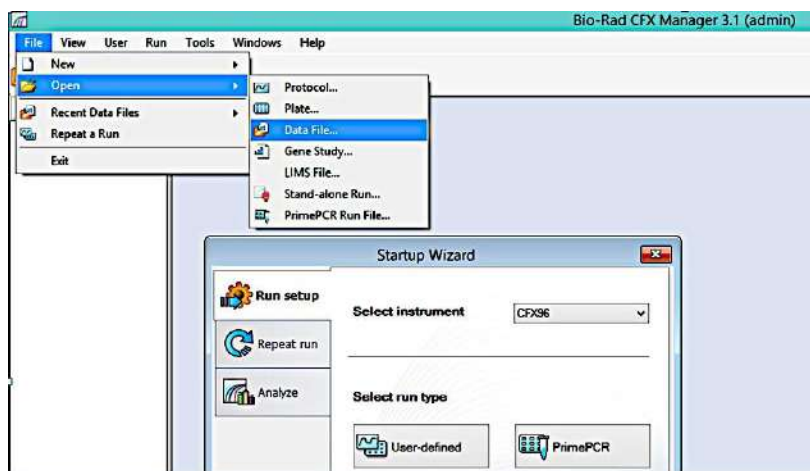
Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

El análisis de datos posterior a la adquisición en un instrumento de PCR CFX96 (Bio-Rad) debe realizarse utilizando la versión 3.1 del software CFX Manager (Bio-Rad). Para cambiar a esta versión desde una ejecución iniciada en una versión anterior, siga el procedimiento que se indica a continuación: Al final de la ejecución, el archivo de datos con la extensión .pcrd debe abrirse y procesarse con CFX Manager (Bio-Rad), versión 3.1.

Si la ejecución se inició con CFX Manager v1.6, por ejemplo, para abrir un archivo de datos con CFX Manager v3.1, haga clic en el icono CFX Manager v3.1. Aparece la pantalla de inicio.



Haga clic en “File” (Archivo) y seleccione “Open” (Abrir) y luego “Data File” (Archivo de datos).



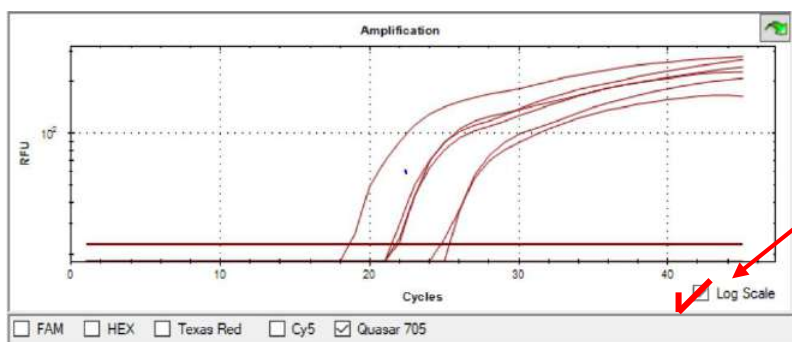
Seleccione el archivo que desea analizar y haga clic en “Open” (Abrir).

La opción “Drift correction” (Corrección de la desviación) debe aplicarse en la pestaña “Settings” (Configuración), tal como se muestra en la imagen a continuación. Haga clic en la pestaña “Settings” (Configuración), luego en “Baseline Setting” (Configuración inicial) y en “Apply Fluorescence Drift Correction” (Aplicar corrección de la desviación de fluorescencia).

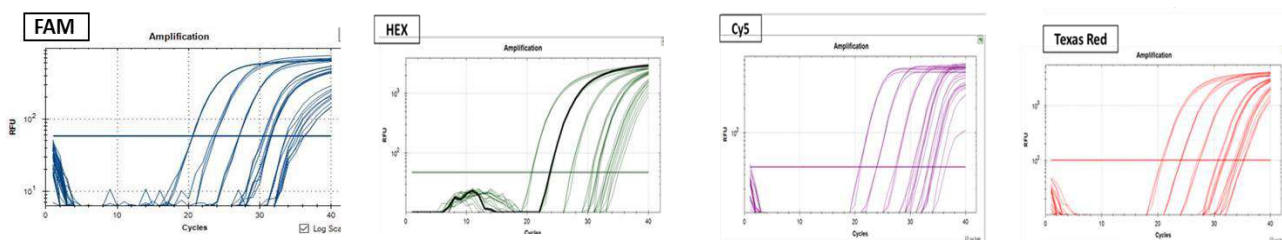


Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

Para optimizar el análisis de la ejecución, marque la casilla de verificación “Log Scale” (Escala logarítmica) para cada canal analizado. A continuación, coloque la barra de umbral por encima del ruido de fondo correspondiente al centro de la fase exponencial. Los 4 canales de interés tienen RFU altas y difieren según el canal considerado, por lo que la opción “Log Scale” (Escala logarítmica) permite una mejor lectura y análisis de la ejecución.



Una vez completado este paso, el análisis puede continuar para los 4 canales considerados: **FAM**, **HEX**, **Texas Red** y **Cy5**.



Los resultados para los controles deben ser los siguientes (Tabla 4).

En T-COR 8®-IVD, estos controles deben realizarse al menos durante el primer uso de una nueva caja de kit.

Para validar el ensayo, los valores de Ct para los controles deben ser los siguientes (Tabla 4). Fuera de estos valores, no se puede validar el experimento. En T-COR 8®-IVD, estos controles deben realizarse al menos durante el primer uso de una nueva caja de kit.

Tabla 4: Ejecutar validación

Control positivo	
FAM	Ct ≤32
HEX	Ct ≤32
Texas Red	Ct ≤32
Cy5	Ct ≤32
Control negativo	
FAM	Ct indeterminado
HEX	Ct indeterminado
Texas Red	Ct indeterminado
Cy5	Ct indeterminado

23. Análisis e interpretación de los datos

Extracción de ARN y control de la inhibición de la RT-PCR en muestras:

El funcionamiento adecuado de la reacción de la RT-PCR se puede evaluar en el canal Cy5 que mide el control endógeno.

En algunos casos, se recomienda repetir la extracción o diluir la muestra 5 veces, ya que el resultado no se puede interpretar (NI) (consulte la columna "Validez de la prueba" de la Tabla 5). Todos los casos que se pueden encontrar se describen en la Tabla 5.

Para muestras clínicas y la determinación de la presencia o ausencia de viruela del mono, sarampión o VVZ



Valores de corte del Ct para la positividad: Ct <40

Para T-COR 8®-IVD se proporciona interpretación automática con códigos de barras

Es posible obtener los siguientes resultados:

Tabla 5: Detección de viruela del mono, sarampión o VVZ

Diana 1 Viruela del mono	Diana 2 Saram- pión	Diana 3 VVZ	Control endógeno	Validez de la prueba	Presencia de un virus o no se puede interpretar (NI)
FAM	HEX	Texas Red	Cy5		
+	-	-	+ / -	Sí	SÍ: Presencia de viruela del mono
-	+	-	+ / -	Sí	SÍ: Presencia de sarampión
-	-	+	+ / -	Sí	SÍ: Presencia de VVZ
-	-	-	+	Sí	SÍ: No se detecta ningún virus
-	-	-	-	Limi- tada	NI

NI: no se puede interpretar debido a la inhibición de la RT-PCR o a la extracción fallida; no se puede extraer ninguna conclusión. **A continuación, se recomienda proceder a una nueva obtención de muestras o repetir la extracción o diluir 5 veces la muestra.**

Limitaciones de uso e interpretación:

- ❖ Todas las muestras deben tratarse como potencialmente infectadas y se deben seguir minuciosamente las normativas locales de bioseguridad.
- ❖ En la interpretación de los resultados se debe tener en cuenta la posibilidad de que aparezcan falsos negativos y falsos positivos.
Los falsos negativos pueden deberse a:
 - Recogida inadecuada de muestras o almacenamiento incorrecto
 - Muestras fuera de la fase virémica
 - Métodos de extracción incorrectos o uso de instrumentos de PCR no validados
 - Manipulaciones que no siguen rigurosamente todas las indicaciones de este manual

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

Los falsos positivos pueden deberse a:

- Una contaminación relacionada con la manipulación incorrecta de muestras altamente positivas, o del control positivo o de productos de PCR
 - Procedimientos que no siguen rigurosamente las precauciones para evitar la contaminación descritas en este manual
- ❖ Los resultados deben ser interpretados por profesionales médicos en el contexto clínico del paciente, teniendo en cuenta sus antecedentes y síntomas.
- ❖ Esta prueba no excluye la presencia de otros patógenos.
- ❖ Un resultado negativo en esta prueba no excluye absolutamente una posible infección por viruela del mono, sarampión o VVZ.

16. Análisis del rendimiento

Límite de detección/sensibilidad analítica

Se realizó un intervalo de dilución a partir de una mezcla de plásmidos que oscilaba entre 10^5 y 1 copia/ μ l. Este intervalo de dilución se utilizó para determinar el límite de detección (LD) del kit con un análisis Probit que permitió determinar el corte del 95 %.

Límite de detección/sensibilidad analítica (corte del 95 %) de CP

Viruela del mono (FAM): 3879 copias/ μ l

Sarampión (HEX): 2289 copias/ μ l

VVZ (Texas Red): 2565 copias/ μ l

Alb (Cy5): 4862 copias/ μ l

Límite de detección/sensibilidad analítica (corte del 100 %) de CP:

Viruela del mono (FAM): 5 copias/ μ l

Sarampión (HEX): 1 copia/ μ l

VVZ (Texas Red): 5 copias/ μ l

Alb (Cy5): 10 copias/ μ l

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

La validación del rendimiento se realizó en:

24 muestras positivas	
22 muestras para VVZ	Caracterizadas por Biomnis Sample Library (Biblioteca de muestras Biomnis)
1 muestra de vacuna con virus atenuado	Vacuna triple vírica
1 bocado de viruela del mono, clado IIb	Caracterizadas por IRBA

9 muestras negativas	
9 muestras negativas	Caracterizadas por Biomnis Sample Library (Biblioteca de muestras Biomnis)

Para este estudio, la extracción de muestras se realizó en Maelstrom 9600 (TANBead) con el kit OptiPure Viral Auto Plate (ref: W665A46) y RT-PCR en CFX96 (Bio-Rad).

Muestras positivas:

Sensibilidad para VVZ/sarampión y especificidad para el virus de interés

		Virus		
		Viruela del mono	Sarampión	VVZ
N = 24 (+) positivo/(-) negativo				
Muestras para VVZ	N = 22	-	-	+ (22/22)
Sensibilidad al VVZ		N/D		
Especificidad al virus		N/D	N/D	100 %
Muestra para sarampión (triple vírica)	N = 1	-	+ (1/1)	-

Sensibilidad al sarampión		N/D		
Especificidad al virus		N/D	100 %	N/D
Viruela del mono	N = 1	+ (1/1)	-	-
Sensibilidad al sarampión		N/D		
Especificidad al virus		100 %	N/D	N/D

Sensibilidad al sarampión: >99 % (1/1)
Especificidad al sarampión: >99 % (23/23)
Coincidencia con el sarampión: >99 % (24/24)

Sensibilidad al VVZ: >99 % (22/22)
Especificidad al VVZ: >99 % (2/2)
Coincidencia con el VVZ: >99 % (24/24)

Sensibilidad al Viruela del mono: >99 % (1/1)
Especificidad al Viruela del mono: >99 % (23/23)
Coincidencia con el Viruela del mono: >99 % (24/24)

18. Especificidades del instrumento T-COR 8-IVD de PCR en tiempo real

T-COR 8®-IVD es un instrumento de PCR en tiempo real con 8 pocillos independientes, que puede programarse de forma independiente, paciente por paciente, en relación con el protocolo térmico, los ensayos y la hora de inicio de la ejecución.

Los 8 pocillos también se pueden utilizar simultáneamente con el mismo ensayo.

Nota: Añada con cuidado los 5 microlitros de extracto a la mezcla de reacción y no realice el pipeteo hacia adelante y hacia atrás para evitar la formación de burbujas en el pequeño volumen total de 15 microlitros.

Compruebe que el volumen de líquido esté situado en la parte inferior del tubo.

Cierre bien cada tubo después de cada depósito del control o la muestra para evitar la contaminación. Presione el tapón firmemente para evitar la evaporación de la mezcla de reacción.

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

Controles

En T-COR 8®-IVD, los controles positivo y negativo deben analizarse al menos cuando se abre un nuevo kit.

Después de este control inicial, el control interno permite comprobar que la RT-PCR funciona correctamente y que no existe inhibición de la RT-PCR.

Fluoróforos

Los fluoróforos se preseleccionan con los códigos de barras.

Uso de códigos de barras

- 1- Seleccione “Menu” (Menú) > “New Run” (Nueva ejecución).
- 2- Seleccione un código de barras.
- 3- Escanee el código de barras adecuado en el lado derecho del instrumento:
 - Para el control positivo (código de barras EBX-060 Pos Ctrl)
 - Para el control negativo (código de barras EBX-060 Neg Ctrl)
 - Para una muestra de paciente (código de barras EBX-060)

El instrumento selecciona aleatoriamente uno de los 8 pocillos disponibles. Siga las instrucciones del instrumento.

- 4- Levante la tapa del pocillo seleccionado (pocillo x), compruebe que la luz LED azul esté encendida y seleccione “Yes” (Sí).
- 5- Coloque el tubo en el pocillo correspondiente y seleccione “Next” (Siguiente).
- 6- Si desea asignar un nombre a la muestra (opcional), seleccione “sample x” (muestra x), póngale un nombre y seleccione “Accept” (Aceptar).
- 7- Seleccione “Next” (Siguiente).
- 8- Para añadir o comprobar otro control o muestra, seleccione “Add well” (Añadir pocillo) y vuelva al punto 3.
- 9- Seleccione “Start run” (Iniciar ejecución).

***Nota:** No se puede modificar ni añadir el nombre de una muestra o de una ejecución después de que la ejecución haya finalizado. Debe realizarse antes o durante la ejecución.*

Presentación e interpretación de los resultados

Los valores de Ct y las curvas de amplificación están disponibles en la tabla SmartCT™ (valores de Ct en cada canal) y en los gráficos “Ct frente a ciclos de PCR”, ambos disponibles en tiempo real mientras la ejecución está en curso.

Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test

Un análisis automático para los controles positivo y negativo, así como para las muestras de los pacientes está disponible en “Interpretations” (Interpretaciones) al final de la ejecución, en la ventana “View” (Vista).

Para los controles positivo y negativo, pueden aparecer los siguientes resultados:

“Neg Ctrl Fail” (Error del control neg.): no válido

“Neg Ctrl Valid” (Control neg. válido): válido

“Pos Ctrl Fail” (Fallo del control pos.): no válido

“Pos Ctrl Valid” (Control pos. válido): válido

Para el estado de los pacientes:

“Detected” (Detectado): positivo para al menos una diana → casilla verde

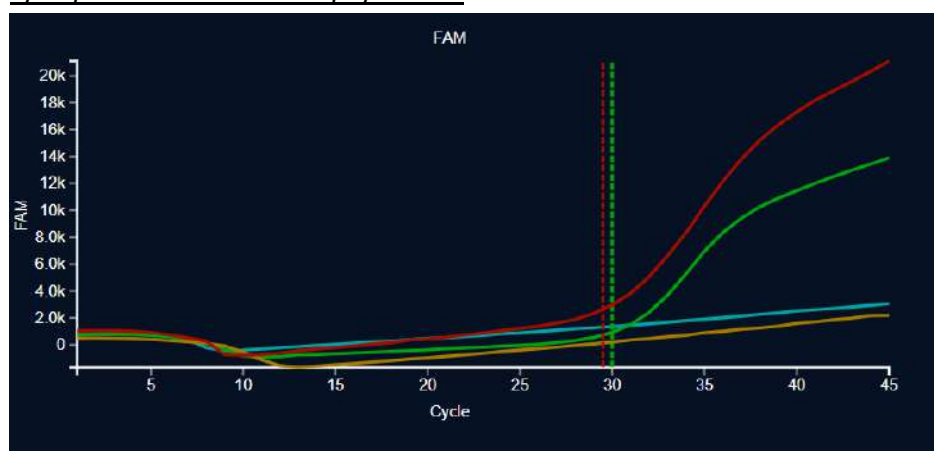
“Not detected” (No detectado): negativo → casilla roja

“Invalid” (No válido): resultado no válido → casilla amarilla: repetir la prueba

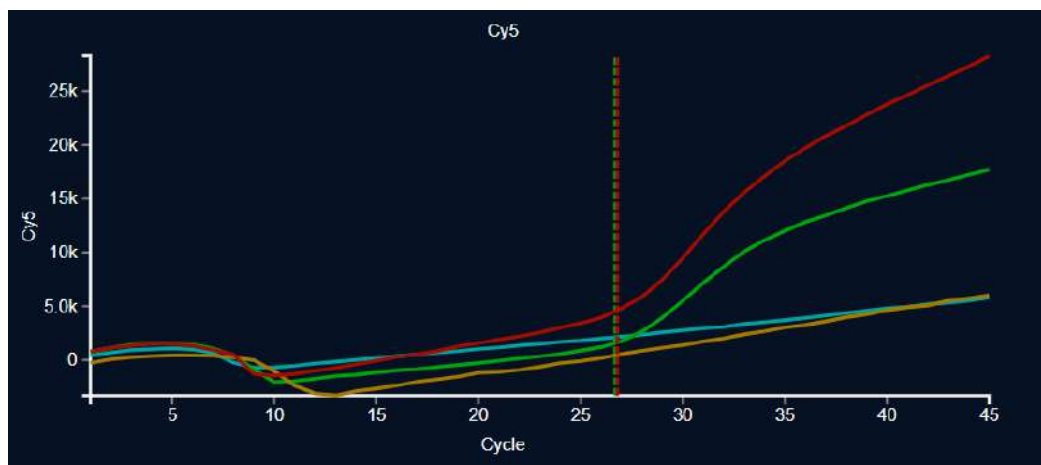
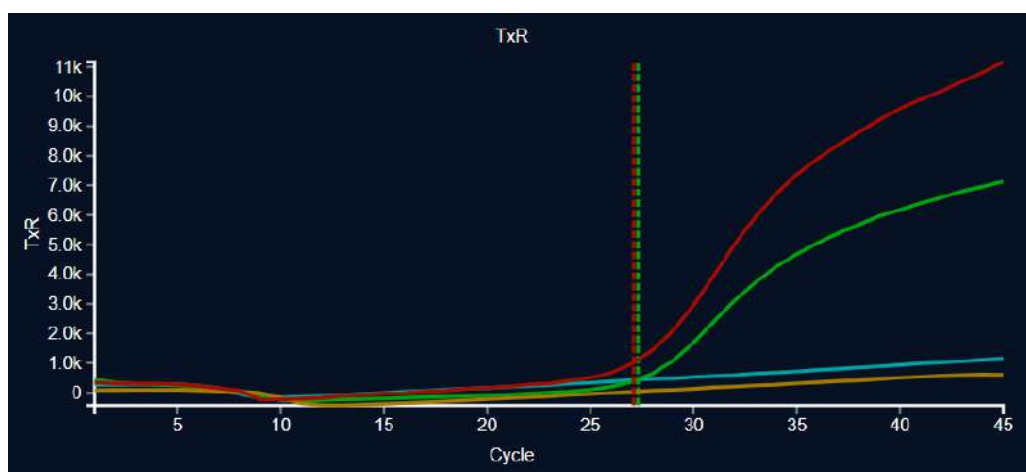
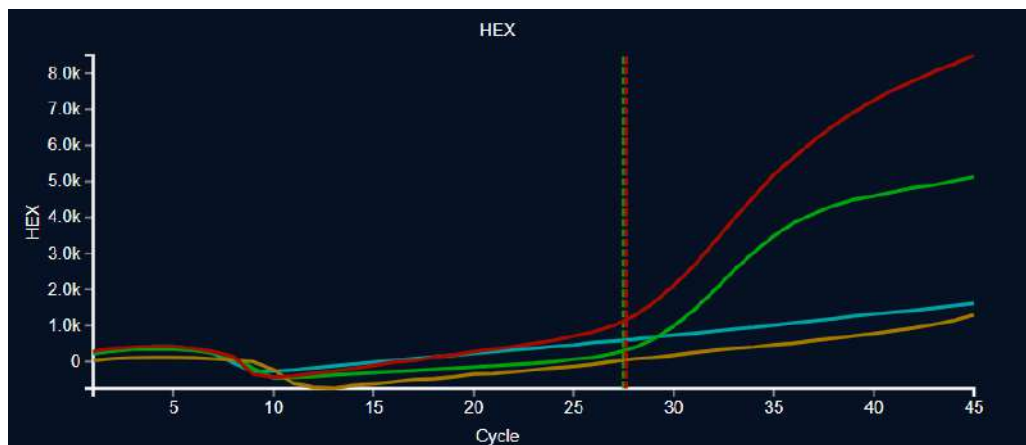
Ejemplo de interpretación automática de los resultados en T-COR 8®-IVD

Summary						
Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5
1	CTRL NEG	EBX-060 Neg Ctrl				
2	CTRL NEG	EBX-060 Neg Ctrl	30.0	27.5	27.3	26.7
4	CTRL POS	EBX-060 Pos Ctrl				
5	POS SAMPLE	EBX-060	29.5	27.6	27.1	26.8
6	NEG SAMPLE	EBX-060				23.9
			Call			Note
			Detected • Neg Ctrl			Neg Ctrl Valid
			Invalid			Neg Ctrl Fail
			Invalid			Pos Ctrl Fail
			Detected • MV • VZV • MKP			MKP, MV and VZV positive
			Not Detected			MKP, MV and VZV negative

Ejemplo de curvas de amplificación



Fiche technique EurobioPlex Monkeypox Screening Test



Códigos de barras para EBX-060 para su uso en T-COR8®-IVD

Control pos. EBX-060

Control positivo de CP



Control neg. EBX-60
Agua = control negativo (CN-H20)



EBX-060



16. Bibliografía

- Vanessa Zubach, Alberto Severini, Joanne Hiebert. Development of a rapid, internally controlled, two target, real-time RT-PCR for detection of measles virus. Journal of Virological Methods 299 (2022) 11434
- Yu Li, Victoria A. Olson, Thomas Laue, Miriam T. Laker, Inger K. Damon. Detection of monkeypox virus with real-time PCR assays. Journal of Clinical Virology 36 (2006) 194–203.
- Kimberly B. Hummel , Luis Lowe, William J. Bellini, Paul A. Rotal. Development of quantitative gene-specific real-time RT-PCR assays for the detection of measles virus in clinical specimens. Journal of Virological Methods 132 (2006) 166–173
- Rapport annuel d'activité 2019. Centre de national de référence Laboratoire Expert Orthopoxvirus Centre de national de référence Laboratoire Expert Orthopoxvirus

17. Control de calidad

De acuerdo con el sistema de gestión de calidad certificado ISO EN 13485 de Eurobio, cada lote de la prueba de cribado de la viruela del mono EurobioPlex se prueba según las especificaciones pre-definidas para garantizar la coherencia de la calidad del producto.

18. Eliminación de residuos

Eliminar todos los residuos de acuerdo con la legislación sobre los residuos de las actividades sanitarias con riesgo infeccioso (Déchets d'activités de soins à risques infectieux, DASRI).

19. Informe de incidente

Los incidentes graves relacionados con el sistema deben notificarse a Eurobio Scientific y a la autoridad competente de los Estados miembros en los que estén registrados el usuario o el paciente.

20. Asistencia técnica

Para obtener asistencia en relación con nuestros productos, póngase en contacto con nuestro servicio de asistencia técnica. Se puede contactar con el servicio de atención al cliente de Eurobio Scientific por correo electrónico a adv@eurobio-scientific.com o por teléfono al +33 (0)1.69.79.64.80.



7, avenue de Scandinavie
91940 Les Ulis Cedex
FRANCIA