



BCOMING



D2.3 Antibody detection protocols

Project acronym: BCOMING

Project title: Biodiversity Conservation to Mitigate the risks of emerging infectious diseases

Call: HORIZON-CL6-2021-BIODIV-01



Funded by the European Union



Project no.	101059483
Project acronym:	BCOMING
Project title:	Biodiversity Conservation to Mitigate the risks of emerging infectious diseases
Call:	HORIZON-CL6-2021-BIODIV-01
Start date of project:	01.08.2022
Duration:	48 months
Deliverable title:	D2.3 Antibody detection protocols
Due date of deliverable:	31.01.2023
Actual date of submission:	31.01.2023 then 03.05.2024
Deliverable Lead Partner:	IRD
Dissemination level:	Public

Author list

Name	Organization
Peeters M., Ayouba A, Ramassamy JL.	Institut de Recherche pour le Développement
Cappelle J.	CIRAD
Kaba D., Keita A.	CERFIG
Lagostina L.	HZI
Duong V.	IPC

Document History

Version	Date	Note	Revised by
01	24-07-2023	Draft version	WP leaders
02	03-05-2024	Updated version (clarifications included)	IRD and CIRAD





Disclaimer

The content of the publication herein is the sole responsibility of the publishers and it does not necessarily represent the views expressed by the European Commission or its services.

While BCOMING is funded by the European Union, views and opinions expressed are however those of the author(s) only and do not necessarily reflect those of the European Union or the European Research Executive Agency (REA). Neither the European Union nor the European Research Executive Agency (REA) can be held responsible for them.

While the information contained in the documents is believed to be accurate, the authors(s) or any other participant in the BCOMING consortium make no warranty of any kind with regard to this material including, but not limited to the implied warranties of merchantability and fitness for a particular purpose.

Neither the BCOMING Consortium nor any of its members, their officers, employees or agents shall be responsible or liable in negligence or otherwise howsoever in respect of any inaccuracy or omission herein.

Without derogating from the generality of the foregoing neither the BCOMING Consortium nor any of its members, their officers, employees or agents shall be liable for any direct or indirect or consequential loss or damage caused by or arising from any information advice or inaccuracy or omission herein.





Executive Summary

Multiplex serological assays

BCOMING is a multidisciplinary project that with partners and teams collecting samples from all terrestrial and aquatic ecosystems, from humans and animals, in Cambodia, Cote d'Ivoire, Guinea and Guadeloupe. It is therefore very important to standardize sampling collection and subsequent laboratory analysis. This deliverable concerns the serological analysis from filoviruses and coronaviruses to test for the presence of antibodies in humans and wildlife.

Multiplex assay to test antibodies against Ebolaviruses

The assay has been adapted and optimized based on the initial version of the assay published by Ayouba and colleagues (1). The current version includes 10 recombinant proteins representing different viral regions (nucleoprotein [NP], 40-kDa viral protein [VP40], and glycoprotein [GP]) from five of the six Ebolavirus species: Zaire Ebolavirus, EBOV; Sudanvirus, SUDV; Bundibugyo, BDBV; Reston, RESTV and Bombali virus, BOMV. The test is standardized to test samples collected as plasma, serum or dried blood spots from humans, bats and rodents. SOPs are available in French and English to be shared with all participating laboratories in BCOMING.

(1). Ayouba A, Touré A, Butel C, Keita AK, Binetruy F, Sow MS, Foulongne V, Delaporte E, Peeters M. Development of a Sensitive and Specific Serological Assay Based on Luminex Technology for Detection of Antibodies to Zaire Ebola Virus. *J Clin Microbiol.* 2016 Dec 28;55(1):165-176. doi: 10.1128/JCM.01979-16. PMID: 27795350; PMCID: PMC5228227.

Multiplex assay to test antibodies against Coronaviruses

The assay has been adapted and optimized based on the initial version of the assay published by Ayouba and colleagues (2). The current version includes 20 recombinant proteins representing spike (SP) and nucleoprotein (NP) from the three beta coronaviruses that are highly pathogenic for humans (SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 and MERS-COV), four coronaviruses that cause only mild disease (two beta coronaviruses, OC43, and HKU1; two alpha coronaviruses, 229E and NL63,) and three beta coronaviruses that circulate in bats (HKU9, nobecov subgenus isolated from Rousettus bats in China; HKU3, sarbecov subgenus isolated from Rhinolophus bats in China; 133/2005 merbecov subgenus from Tylonycteris bat in China). The test is standardized to test samples collected as plasma, serum





or dried blood spots from humans, bats and rodents. SOPs are available in French and English to be shared with all participating laboratories in BCOMING.

(2) Ayouba A, Thaurignac G, Morquin D, Tuailon E, Raulino R, Nkuba A, Lacroix A, Vidal N, Foulongne V, Le Moing V, Reynes J, Delaporte E, Peeters M. Multiplex detection and dynamics of IgG antibodies to SARS-CoV2 and the highly pathogenic human coronaviruses SARS-CoV and MERS-CoV. J Clin Virol. 2020 Aug;129:104521. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104521.

Transfer of technology and training

The protocols for screening of antibodies to Ebola and Coronaviruses have been transferred to CERFIG and staff from CERFIG has been trained. Additional training is planned in October on coupling of beads.

The protocols for coupling of beads and antibody detection against coronaviruses has been transferred to IPC.

Annexes:

Annex 1. SOP Couplage des antigènes – Luminex-FR

Annex 2. SOP Coupling of antigens to beads - Luminex EN

Annex 3. SOP Luminex detection anticorps Ebola-FR

Annex 4. SOP Luminex_Ebola antibody detection-EN

Annex 5. SOP Luminex_ detection anticorps Coronavirus-FR

Annex 6. SOP Luminex_Coronavirus antibody detection -EN

Explanations on the text highlighted in colors in the Annexes:

The text highlighted in yellow is to indicate that the volumes needed are related to a particular number of plates that can be tested. If the user wants to tests more plates he/she should multiply the volumes highlighted in yellow with the factor needed to prepare the plates needed. The text in blue or red colors are choices of style to draw the attention of the reader to the text.



SOP SC_25e	Luminex® - Couplage des Billes aux antigènes
OBJECTIFS	Instructions pour le couplage de protéines recombinantes aux billes pour la technologie xMAP (Luminex®).
PERSONNEL IMPLIQUÉ	Techniciens Chercheurs
DOCUMENTATION / REFERENCES	<p>Bio-Plex Amine Coupling Kit, Instruction Manual Bio-Rad Laboratories, Inc. 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547 USA</p> <p>Development of a Sensitive and Specific Serological Assay Based on Luminex Technology for Detection of Antibodies to Zaire Ebola Virus. Ayouba A et al. Journal of Clinical Microbiology. 2016.</p> <p>Multiplex detection and dynamics of IgG antibodies to SARS-CoV2 and the highly pathogenic human Coronaviruses SARS-CoV and MERS-CoV Ayouba A et al. 2020.</p>
RÉALISÉ PAR	Guillaume Thaurignac Signature : Date :
APPROUVÉ PAR	Martine Peeters et Ahidjo Ayouba Signature : Date :

I. DEFINITION

Luminex® : c'est un terme générique désignant un luminomètre permettant la mise en évidence d'une interaction entre ligands (antigène-anticorps, amorce-cible, hormone-récepteur, etc.).

BSA : Bovine Serum Albumin

PBS : Phosphate Buffered Saline

Principe

La technologie Luminex® fonctionne selon les principes combinés de l'ELISA et de cytométrie en flux grâce à l'utilisation de billes fluorescentes. Jusqu'à 100 interactions peuvent être étudiées simultanément. Les billes (numérotées de 1 à 100) ont chacune une couleur différente permettant d'identifier l'antigène auquel elles ont été couplées. C'est un anticorps secondaire biotynilé (dirigé contre les IgG humaines par exemple) qui, associé à de la streptavidine couplée à de la phycoérythrine (SAPE) permet de quantifier la présence ou l'absence d'interaction par valeur de MFI (Median Fluorescence Intensity).

Ce SOP décrit la procédure de couplage des billes aux Antigènes

II. INSTRUCTION ET PROCEDURE

1. Procédure de sécurité

Tout matériel biologique doit être considéré comme potentiellement infectieux. Par conséquent, le port de gants et de blouse est obligatoire pendant la manipulation.

2. Matériel et équipement

Matériels et réactifs

- Protéines recombinantes (Voir tableau en en partie 4)

Pour la reconstitution et la conservation des protéines recombinantes il est nécessaire de toujours vérifier les conditions décrites par les fournisseurs et de les respecter.

- EDC (réf. Pierce : 22980) (crain la lumière ! garder à -20°C)
- S-NHS (réf. Pierce : 24510) (crain la lumière ! garder à -20°C)
- Vortex
- Sonicateur à bain
- Pipettes (P10, P100-P200, P1000)
- Support magnétique (surebeads magnetic rack 16 tube holder)
- Tubes Eppendorf 1,5mL de qualité « Protein LoBind »
- Kit de couplage Amine Coupling Kit, Bio Rad
- Billes-COOH magnétiques de différentes couleurs, Bio-Rad/Luminex (toujours garder à l'abri de la lumière !) réf. MagPlex™ MC100XX-01

3. Manipulation

3. 1. Couplage des protéines recombinantes aux billes

3. 1. 1 *Activation des billes (pour un couplage permettant de réaliser 6 plaques)*

- a. Sélectionner les couleurs à activer ; identifier les tubes par le nom de la protéine recombinante à coupler et le numéro de billes
- b. Vortexer le flacon de billes pendant 30 sec, soniquer le flacon pendant 30 sec.
- c. Pipeter **100µl*** de billes dans un tube Eppendorf 1,5mL de qualité « Protein LoBind » qui évite aux billes de se coller aux parois et favorise ainsi la formation d'un culot net. Par défaut, utiliser un tube fourni dans le kit de couplage mais soyez très vigilant sur la dispersion des billes et sur leur système de fermeture peu hermétique (perte lors des vortex, évaporation lors du stockage).
- d. Placer sur le support magnétique pendant 1 minute.
- e. Doucement, éliminer le surnageant (avec une p100) ;
- f. Ajouter **100µl*** de « **bead wash buffer** » ; Vortexer 30 sec et soniquer 10 sec ;
- g. Placer sur le support magnétique pendant 1 minute.
- h. Puis éliminer le surnageant (avec une p100) ;
- i. Re-suspendre le culot de billes dans **80µl*** de « **bead activation buffer** » ; Vortexer 30 sec et soniquer 30 sec.
- j. Préparer extemporanément (ou décongeler les aliquots) l'**EDC** et le **S-NHS** ;
- k. En conservant le vortex en rotation, ajouter **10µl*** de EDC à 50mg/ml, Vortexer immédiatement après, puis très vite ajouter **10µl*** de S-NHS à 50mg/ml.
- l. Vortexer à nouveau immédiatement.
- m. Vortexer vigoureusement 30 sec puis laisser incuber sous agitation (roue), à T° ambiante et à l'obscurité (papier alu) pendant 20 minutes.
- n. Au bout des 20 min, ajouter 150µl de PBS (fournit dans le kit de couplage)

et Vortexer 10 sec. Placer sur le support magnétique pendant 1 minute.

- o. Eliminer le surnageant puis ajouter 500µl de PBS du kit. Vortexer 10 sec puis Placer sur le support magnétique pendant 1 minute.
- p. Eliminer doucement le surnageant et re-suspendre les billes dans 100µl* de PBS du kit. Vortexer à vitesse moyenne pendant 30 sec et soniquer pendant 15 sec.

3. 1. 2 *Couplage des protéines recombinantes*

- a) Ajouter la quantité optimale de protéines recombinantes (cf tableau couplage) aux billes activées (de l'étape précédente)

Ajuster le volume à 400 µl qsp avec du PBS 1X (du kit).

- b) Incuber pendant 2h à T° ambiante, sous agitation et à l'obscurité. (Alternativement, une incubation over night à +4°C est possible).
- c) Placer sur le support magnétique pendant 1 minute ; éliminer doucement le surnageant avec une p1000.
- d) Laver les billes avec 500 µl de PBS ; Vortexer 10 sec puis placer sur le support magnétique pendant 1 minute et éliminer doucement le surnageant (p1000). Ne pas soniquer.

3. 1. 3 *Saturation*

- a) Re-suspendre les billes obtenues (étape r ci-dessus) dans 250µl de « **blocking buffer**** » (fourni dans le kit) ; Vortexer à vitesse moyenne pendant 15 sec.
- b) Incuber 30 min à T° ambiante, sous agitation (roue) et à l'obscurité.
- c) Placer sur le support magnétique pendant 1 minute ; éliminer doucement le surnageant.
- d) Laver les billes couplées avec 500 µl de « **Storage buffer***** », préférentiellement avec du « **Storage buffer***** » fait maison afin d'économiser celui du Kit qui contient des antifongiques. Vortexer 10 sec puis placer sur le support magnétique pendant 2 minutes et éliminer délicatement le surnageant.
- e) Re-suspendre les billes couplées dans **150 µl*** de « **Storage buffer** » du Kit.

NB : il est possible de prévoir un volume « mort » supplémentaire (+15µL maximum) qui n'altèrera pas les réactions et qui permet d'anticiper les pertes de volume causées par les pipetages répétés. Dater chaque tube de billes couplées. Selon Biorad, elles peuvent être conservées à 4°C à l'abri de la lumière pendant 1 an. Il est toutefois conseillé de valider leur performance 3 mois après le couplage.

NB : * : les quantités des réactifs données pour le couplage correspondent à un couplage pour la réalisation de 6 plaques. Il est possible d'adapter ces quantités au nombre réel de plaques à réaliser. Dans ce cas, augmenter les volumes **surlignés en jaune** de façon proportionnelle. Le volume maximal de départ (Volume de billes non couplé) est 500µL (Volume permettant la réalisation de 30 plaques)

3. 2. Validation du Couplage

Avant toute utilisation du couplage il est nécessaire de le valider sur un panel de témoin négatif et positif en respectant les conditions d'utilisation décrites dans les SOPs décrivant les différents Screenings.

Cette validation est indispensable car elle seule garantit l'efficacité des manipulations qui seront réalisées ensuite.

4. Références des Antigènes et quantités requises pour Couplage

Pour la reconstitution et la conservation des protéines recombinantes il est nécessaire de toujours vérifier les conditions décrites par les fournisseurs et de les respecter.

Panel des protéines recombinantes - Ebola

Protéines recombinantes	Fournisseurs	références	Quantités pour un couplage pour 6 plaques
NP EBOV	Sino Biological	40443-V07E1	2µg
GP EBOV Kiss	Sino Biological	40442-V08B1	2µg
GP EBOV May	Sino Biological	40304-V08B1	2µg
VP40 EBOV	Sino Biological	40446-V07E	2µg
NP SUDV	Sino Biological	40444-V07E	2µg
GP1 SUDV	Sino Biological	40094-V08B	1µg
VP40 SUDV	Sino Biological	40447-V07E	2µg
GP BDBV	Sino Biological	40368-V08B	2µg
VP40 BDBV	Sino Biological	40448-V07E	2µg
GP RESTV	IBT Bioservice	0504-015	2µg
GP1 BOMV	Sino Biological	IT1-2	2µg

Panel des protéines recombinantes - Coronavirus

Protéines recombinantes	Fournisseurs	références	Quantités pour un couplage pour 6 plaques
NCP-CoV(2019-nCoV) nucleocapsid prot (His tag)	sino Biological	40588-V08B	2µg
SARS-CoV-2(2019-nCoV) Spike protein (RDFB, His tag)	sino Biological	40592-V08B	1µg
SARS-CoV Nucleoprotéin /NP protein (His Tag)	sino Biological	40143-V08B	2µg
SARS-CoV Spike protein (RDFB, His tag)	sino Biological	40150-V08B2	1µg
MERS-CoV Nucleoprotéin /NP protein (His Tag)	sino Biological	40068-V08B	2µg
MERS-CoV Spike/S1 protein (His Tag)	sino Biological	40069-V08B1	1µg
Human coronavirus (HCoV-229E) Spike/S1 protein (S1 Subunit His Tag)	sino Biological	40601-V08H	1µg
Human coronavirus HKU1 (isolate N5) (HCoV-HKU1) Spike/S1 protein (S1 Subunit His Tag)	sino Biological	40602-V08H	1µg
Human coronavirus (HCoV-OC43) Spike protein (S1ECD,His Tag)	sino Biological	4067-V08H1	1µg
Human coronavirus (HCoV-NL63) Spike protein (S1 Subunit His Tag)	sino Biological	40600-V08H	1µg
Recombinant human coronavirus 229E Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-EP322753HIT	2µg
Recombinant human coronavirus HKU1 Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-EP607323HIW	2µg
Recombinant human coronavirus OC43 Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-EP333798HIW	2µg
Recombinant human coronavirus NL63 Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-EP744150HIX	2µg
Recombinant Bat coronavirus 133/2005 Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-BP605318BFA	2µg
Recombinant Bat coronavirus 133/2005 Spikeglycoprotein (S) ,partial	Cusabio	CSB-BP610383BFA	1µg
Recombinant Bat coronavirus HKU3 Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-BP664686BFD	2µg
Recombinant Bat coronavirus HKU3 Spikeglycoprotein (S) ,partial	Cusabio	CSB-BP663395BFD	1µg
Recombinant Bat coronavirus HKU9 Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-BP385259BOV	2µg
Recombinant Bat coronavirus HKU9 Spikeglycoprotein (S) ,partial	Cusabio	CSB-BP385258BOV	1µg
SARS COV 2 Omicron B.1.1.529 NCP (sinobiological)	sino Biological	40588 v07e34	2µg
SARS COV 2 Omicron B.1.1.529 Spike S1 (Acrobiosystem)	Acrobiosystem	S1N-C52Ha	1µg

SOP SC	Luminex® - bead preparation – Coupling with Antigen
GOALS	Instructions for Coupling Recombinant Proteins to Beads with xMap technology
STAFF INVOLVED	Technicians Researchers
DOCUMENTATION AND REFERENCES	<p>Bio-Plex Amine Coupling Kit, Instruction Manual Bio-Rad Laboratories, Inc. 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547 USA</p> <p>Development of a Sensitive and Specific Serological Assay Based on Luminex Technology for Detection of Antibodies to Zaire Ebola Virus. Ayouba A et al. Journal of Clinical Microbiology. 2016.</p> <p>Multiplex detection and dynamics of IgG antibodies to SARS-CoV2 and the highly pathogenic human Coronaviruses SARS-CoV and MERS-CoV Ayouba A et al. 2020.</p>
EDITED BY	Guillaume Thaurignac Signature : Date :
APPROVED BY	Martine Peeters et Ahidjo Ayouba Signature : Date :

I. DEFINITION

Luminex®: *this is a generic term designating a luminometer allowing the demonstration of an interaction between ligands (antigen-antibody, primer-target, hormone-receptor, etc.).*

BSA : Bovine Serum Albumin

PBS : Phosphate Buffered Saline

II. PRINCIPLE

Luminex® technology works according to the combined principles of ELISA and flow cytometry through the use of fluorescent beads. With the MagPix up to 50 interactions can be studied simultaneously. The beads each have a different color to identify the antigen to which they have been coupled. It is a biotinylated secondary antibody (directed against human IgG for example) which, combined with streptavidin coupled to Phycoerythrin (SAPE), makes it possible to quantify the presence or absence of interaction by an MFI value (Median Fluorescence Intensity).

III. INSTRUCTIONS AND PROCEDURES

1. Security Procedures

All biological material should be considered potentially infectious. Therefore, wearing gloves and a lab coat is mandatory during handling.

2. Materials et equipment

A part of the manipulations is sensitive to light, a dark or light-controlled room is necessary.

Matériels et réactifs

- Recombinant protein (Panel description available in part 4)

For storage and resuspension condition respect supplier's recommendations.

- EDC (réf. Pierce: 22980) (sensitive to light! store at -20°C)
- S-NHS (réf. Pierce : 24510) (sensitive to light ! store at -20°C)
- Vortex
- Ultrasonic bath
- Pipets (P10, P100-P200, P1000)
- Magnetic rack (surebeads magnetic rack 16 tube holder)
- rotor
- Eppendorf 1,5mL « Protein LoBind »
- Amine Coupling Kit, Bio Rad
- MagPlex C microspheres (different region), Bio-Rad/Luminex (sensitive to light! store at +4°C) (réf. MagPlex™ MC100XX-01)

3. Manipulation

3. 1. Coupling of recombinant proteins to beads **(To do 6 plates)**

3. 1. 1 Beads *Activation*

- a. Select the colors to activate; identify the tubes by the name of the recombinant protein to be coupled and the bead number
- b. Vortexer beads during 30 sec, sonicate during 30 sec.
- c. Pipet **100 μ l*** of beads in a 1.5mL Eppendorf tube of "Protein LoBind" quality which prevents the beads from sticking to the walls and thus promotes the formation of a clear pellet. By default, use a tube provided in the coupling kit but be very careful about the dispersion of the beads and their not very hermetic closure system (loss during vortexing, evaporation during storage).
- d. Put on the magnetic rack during 1 min.
- e. Gently remove the supernatant (with a p100)
- f. Add 200 μ l of « **bead wash buffer** » ; Vortex 30 sec et sonicate 10 sec ;
- g. Put on the magnetic rack during 1 min.
- h. remove the supernatant (with a p100)
- i. Suspend beads with **80 μ l*** of « **bead activation buffer** » ; Vortex 30 sec and sonicate 30 sec.
- j. Keeping the vortex in rotation, add **10 μ l*** of EDC at 50mg/ml, Vortex immediately afterwards, then very quickly add **10 μ l*** of S-NHS at 50mg/ml. Next Vortex 10 sec.
- k. Vortex 30 sec and incubate (rotor), at 25 rotate by minute during 20min at room temperature. Protect from light during this step with aluminum
- l. After incubation add 150 μ l of PBS (provide with coupling kit)
- m. Vortex 10 sec.
- n. Put on the magnetic rack during 1 min.
- o. remove the supernatant then add 500 μ l of PBS. Vortex 10 sec and put on the magnetic rack during 1 min.
- p. Gently remove the supernatant and et suspend in 100 μ l of PBS Vortex gently during 30 sec and sonicate 15 sec.

3. 1. 2 *Antigen coupling*

- a) Add optimal quantity of antigen (cf panel tab in part 4) to the beads
Adjust volume to 400 µl qsp with PBS 1X.
- b) Incubate during 2h at room temperature at 25 rotate by minute during 2h at room temperature. Protect from light during this step with aluminum (rotor)
- c) Put on the magnetic rack during 1 min ; Gently remove the supernatant (with a p1000)
- d) Wash with 500 µl of PBS ; Vortex 10 sec Put on the magnetic rack during 1 min ; Gently remove the supernatant (with a p1000).
No sonicate.

3. 1. 3 *Saturation*

- a) Suspend in 250µl of « **blocking buffer** » Vortex carefully during 15 sec.
- b) Incubate (rotor), at 25 rotate by minute during 30min at room temperature. Protect from light durin this step with aluminium.
- c) Put on the magnetic rack during 1 min ; Gently remove the supernatant (with a p1000).
- d) Add 500 µl of « **Storage buffer** », Vortex 10 sec then put on the magnetic rack during 2 min ; Gently remove the supernatant (with a p1000).
- e) Suspend beads in **150 µl*** of « **Storage buffer** ».

NB: it is possible to provide an additional "dead" volume (+15µL maximum) which will not alter the reactions and which makes it possible to anticipate volume losses caused by repeated pipetting. Date each tube of paired beads. According to Biorad, they can be stored at 4°C away from light for 1 year. However, it is advisable to validate their performance 3 months after coupling.

The quantities of reagents given for the coupling correspond to a coupling to perform 6 plates. You can adapt those quantities to the real numbers of plate you need. In this case, increase the volumes highlighted in yellow proportionally. The maximum volume to start (volume of native Beads) is 500 (coupling to perform 30 plates)

3. 2. *Coupling Validation*

Before any use of the coupling, it must be validated on a panel of negative and positive controls, respecting the conditions of use described in the SOPs describing the various Screenings.

This validation is essential because it alone guarantees the effectiveness of the manipulations that will be carried out afterwards.

4. Antigen reference and quantity needed

For storage and resuspension condition respect supplier's recommendation.

Panel for Ebola Screening

Recombinant Protein	Supplier	reference	Quantities for coupling for 6 plate
NP EBOV	Sino Biological	40443-V07E1	2µg
GP EBOV Kiss	Sino Biological	40442-V08B1	2µg
GP EBOV May	Sino Biological	40304-V08B1	2µg
VP40 EBOV	Sino Biological	40446-V07E	2µg
NP SUDV	Sino Biological	40444-V07E	2µg
GP1 SUDV	Sino Biological	40094-V08B	1µg
VP40 SUDV	Sino Biological	40447-V07E	2µg
GP BDBV	Sino Biological	40368-V08B	2µg
VP40 BDBV	Sino Biological	40448-V07E	2µg
GP RESTV	IBT Bioservice	0504-015	2µg
GP1 BOMV	Sino Biological	IT1-2	2µg

Panel for Coronavirus Screening

Recombinant Protein	Supplier	reference	Quantities for coupling for 6 plate
NCP-CoV(2019-nCoV) nucleocapsid prot (His tag)	sino Biological	40588-V08B	2µg
SARS-CoV-2(2019-nCoV) Spike protein (RDFB, His tag)	sino Biological	40592-V08B	1µg
SARS-CoV Nucleoprotéin /NP protein (His Tag)	sino Biological	40143-V08B	2µg
SARS-CoV Spike protein (RDFB, His tag)	sino Biological	40150-V08B2	1µg
MERS-CoV Nucleoprotéin /NP protein (His Tag)	sino Biological	40068-V08B	2µg
MERS-CoV Spike/S1 protein (His Tag)	sino Biological	40069-V08B1	1µg
Human coronavirus (HCoV-229E) Spike/S1 protein (S1 Subunit His Tag)	sino Biological	40601-V08H	1µg
Human coronavirus HKU1 (isolate N5) (HCoV-HKU1) Spike/S1 protein (S1 Subunit His Tag)	sino Biological	40602-V08H	1µg
Human coronavirus (HCoV-OC43) Spike protein (S1ECD,His Tag)	sino Biological	4067-V08H1	1µg
Human coronavirus (HCoV-NL63) Spike protein (S1 Subunit His Tag)	sino Biological	40600-V08H	1µg
Recombinant human coronavirus 229E Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-EP322753HIT	2µg
Recombinant human coronavirus HKU1 Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-EP607323HIW	2µg
Recombinant human coronavirus OC43 Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-EP333798HIW	2µg
Recombinant human coronavirus NL63 Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-EP744150HIX	2µg
Recombinant Bat coronavirus 133/2005 Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-BP605318BFA	2µg
Recombinant Bat coronavirus 133/2005 Spikevglycoprotein (S) ,partial	Cusabio	CSB-BP610383BFA	1µg
Recombinant Bat coronavirus HKU3 Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-BP664686BFD	2µg
Recombinant Bat coronavirus HKU3 Spikevglycoprotein (S) ,partial	Cusabio	CSB-BP663395BFD	1µg
Recombinant Bat coronavirus HKU9 Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-BP385259BOV	2µg
Recombinant Bat coronavirus HKU9 Spikevglycoprotein (S) ,partial	Cusabio	CSB-BP385258BOV	1µg
SARS COV 2 Omicron B.1.1.529 NCP (sinobiological)	sino Biological	40588 v07e34	2µg
SARS COV 2 Omicron B.1.1.529 Spike S1 (Acrobiosystem)	Acrobiosystem	S1N-C52Ha	1µg

SOP SC_ 25c	Multiplex Immunoassay Luminex® Ebolavirus
OBJECTIFS	Instructions pour la réalisation du test sérologique multiplex utilisant la technologie xMAP MagPix® (Luminex®)
PERSONNEL IMPLIQUÉ	Techniciens Chercheurs
DOCUMENTATION / REFERENCES	Ayouba A, Touré A, Butel C, Keita AK, Binetruy F, Sow MS, Foulongne V, Delaporte E, Peeters M. Development of a Sensitive and Specific Serological Assay Based on Luminex Technology for Detection of Antibodies to Zaire Ebola Virus. J Clin Microbiol. 2016 Dec 28;55(1):165-176. doi: 10.1128/JCM.01979-16. PMID: 27795350; PMCID: PMC5228227.
RÉALISÉ PAR	Guillaume Thaurignac and Antoine NKuba Signature : Date :
Modifié par	
APPROUVÉ PAR	Martine Peeters et Ahidjo Ayouba Signature : Date :

I. DEFINITION

Luminex® : c'est un terme générique désignant un luminomètre permettant la mise en évidence d'une interaction entre ligands (antigène-anticorps, amorce-cible, hormone-récepteur, etc.).

BSA : Bovine Serum Albumin

PBS : Phosphate Buffered Saline

SVF : Sérum de veau foetal

II. PRINCIPE

La technologie Luminex® fonctionne selon les principes combinés de l'ELISA et de cytométrie en flux grâce à l'utilisation de billes fluorescentes. Avec le MagPix jusqu'à 50 interactions peuvent être étudiées simultanément. Les billes ont chacune une couleur différente permettant d'identifier l'antigène auquel elles ont été couplées. C'est un anticorps secondaire biotynilé (dirigé contre les IgG humaines par exemple) qui, associé à de la streptavidine couplée à de la phycoérythrine (SAPE) permet de quantifier la présence ou l'absence d'interaction par une valeur de MFI (Median Fluorescence Intensity).

III. INSTRUCTIONS ET PROCEDURES

1. Procédures de sécurité

Tout matériel biologique doit être considéré comme potentiellement infectieux. Par conséquent, le port de gants et de blouse est obligatoire pendant la manipulation.

2. Matériels et équipements

Une partie des manipulations étant sensible à la lumière une pièce obscure ou à luminosité contrôlée est nécessaire

Matériels et réactifs

- Un système **xMap** complet : le **MagPix et son ordinateur sur lequel le logiciel Xponent est installé**
- Laveur magnétique manuel compatible pour la plaque 96 puits
- Comprimés de PBS 1X ou flacon de PBS liquide 1X
- Tween-20 (polyoxysorbitane monolaurate)
- BSA (Réf SIGMA : A7906)
- SVF (décomplementé 30min 56°C), Gibco
- Biotin Mouse anti-human IgG (BD pharmigen réf. 555785)
- [Biotin goat anti-bat IgG H/L \(Bethyl A140-118B\)](#)
- [Biotin goat anti-mouse IgG Y-chain specific \(Sigma B7022\)](#)
- [Biotin goat anti-rat IgG \(whole molecule\) \(Sigma B7139\)](#)
- Streptavidin-R-phycoerythrin (SAPE) (Fisher Scientific/Life technologies)
- NaH₂PO₄ (poudre)
- Na₂HPO₄ (poudre)
- Na Cl (poudre)
- Plaques 96 puits à fond plat, Greiner (réf. 655906) avec couvercles

- Réservoirs à réactifs
- Vortex
- Agitateur de plaques
- Pipettes (P10, P100-P200, P1000) et pointes sans filtre compatibles
- Micropipettes Multicanaux 30 – 300 µL (8 et/ou 12 canaux)
- Tubes 5mL pour la préparation des mixes
- Tubes 1,4mL (micronic) pour les dilutions avec racks compatibles
- Kit de calibration MagPix
- Kit de vérification MagPix
- Drive fluide MagPix
- Billes magnétiques couplées aux Antigènes
- **(Toujours garder à l'abri de la lumière !)**
- Isopropanol 70% ou Éthanol 70%
- Soude 0.1N
- Eau de Javel
- Réfrigérateur et Congélateur
- Agitateur magnétique et barreau aimanté
- Bouteilles en verre de 0.5L, 1L et 2L
- Une source d'eau propre est nécessaire (distillateur, osmoseur)
- Equipements de protection individuel (Gants, blouses)
- Éthanol 70% (pour le nettoyage des paillasses)
- Un bain marie sec ou bloc chauffant et / ou une étuve
- Microtubes de 1.5mL et de 2mL (et boîtes de rangement compatibles)

Détail du panel d'antigènes

Nom de l'antigène	Fournisseur	Référence	Quantité pour couplage 1X
NP EBOV	Sino Biological	40443-V07E1	2µg
GP EBOV Kiss	Sino Biological	40442-V08B1	2µg
GP EBOV May	Sino Biological	40304-V08B1	2µg
VP40 EBOV	Sino Biological	40446-V07E	2µg
NP SUDV	Sino Biological	40444-V07E	2µg
GP1 SUDV	Sino Biological	40094-V08B	1µg
VP40 SUDV	Sino Biological	40447-V07E	2µg
GP BDBV	Sino Biological	40368-V08B	2µg
VP40 BDBV	Sino Biological	40448-V07E	2µg
GP RESTV	IBT Bioservice	0504-015	2µg
GP1 BOMV	Sino Biological	IT1-2	2µg

3. Procédure

3.1 Préparation des tampons

Noter le nom du produit et la date de préparation de chaque tampon.

- PBS Hypertonique : exemple pour 1 L de solution
NaH₂PO₄= 0,8g
Na₂HPO₄= 2,5g
Na Cl= 88g
Qsp 1L d'H₂O distillée / osmosée / autoclavée
Conserver à +4°C.
- PBS 1X : Mettre 1 cachet (comprimé) dans 500mL d'eau distillée / osmosée / autoclavée.
Conserver à +4°C.
- Tampon de lecture : PBS 1X + 1% de BSA (à conserver à +4°C)
Conserver à +4°C.
- Tampon de dilution (à conserver à +4°C) :
50% de PBS hypertonique
1% de BSA
5% SVF décomplémenté froid (soit inactivé à 56°C pendant 30min)
0.2% Tween-20
Qsp H₂O distillée / osmosée / autoclavée

3.2 Manipulation

3.2.1 Préparation des échantillons

Les échantillons à tester au Luminex ne doivent présenter aucun risque infectieux. Avant toute lecture, ils doivent être impérativement inactivés en laboratoire BSL3 selon les règles d'hygiène et de sécurité requises.

- Si nécessaire, aliquoter sous un PSM une quantité suffisante de matériel.

Pour les plasmas, 50µL est en général un bon volume qui permet de répéter plusieurs tests Luminex.

- Inactiver **30min à 56°C dans un bain marie sec** ou 1H dans une étuve à 56°C

Après inactivation, les aliquots doivent être stockés à -20°C

3.2.1 Sérologies en multiplex avec le Luminex

Cette procédure comprend une incubation overnight et se déroule donc sur deux jours.

3.2.1.1 Manipulation du premier jour

1 Dilution des échantillons

Les dilutions s'effectuent dans des tubes de 1.4mL. En premier lieu il faut donc apprêter un rack (portoir) avec autant de tube de 1.4ml que d'échantillons à tester. Il convient de réaliser lors de cette étape le plan de la plaque qui restera identique jusqu'à la fin de la manipulation.

Pour toute lecture, penser à inclure des **témoins positifs** et des **témoins négatifs** qui recouvriront au maximum les panels de protéines recombinantes utilisées et prévoir **un puits de blanc** (tampons seuls).

a) Dilution des plasmas et sera humains

-Les échantillons de plasma/séra humain sont testés dilués au **1/1000** dans le tampon de dilution d'échantillon.

b) Dilution des éluas (ou reprise) de DBS humain

Sur le même principe que ci-dessus, diluer les éluât de DBS au 1/1000 dans du tampon de dilution. Les éluas de DBS sont déjà diluées au **1/40** après élution ainsi seule une dilution au **1/25** est nécessaire

NB - Nous conseillons de déposer 5µL d'éluât dans 120µL de Tampon de dilution.

c) Dilution des plasma et sera de chauves-souris et de rongeurs

*Les échantillons de plasma/séra de chauves-souris sont testés dilués au **1/2000** dans le tampon de dilution d'échantillon.*

*Les échantillons de plasma/séra de rongeurs sont testés dilués au **1/200** dans le tampon de dilution d'échantillon.*

a) Dilution des reprises de DBS (Chauves-souris et rongeurs)

*Sur le même principe que ci-dessus, diluer les éluât de DBS de chauves-souris au **1/2000** dans du tampon de dilution. Les éluas de DBS de chauves-souris sont déjà diluées au **1/50** après élution ainsi seule une dilution au **1/40** est nécessaire*

NB - Nous conseillons de déposer 5µL d'éluât dans 195µL de Tampon de dilution.

*Pour les reprises de DBS des rongeurs se dilue au **1/200** comme décrits plus haut Les éluas de DBS de rongeurs sont déjà diluées au **1/50** après élution ainsi seule une dilution au **1/4** est nécessaire*

NB - Nous conseillons de déposer 30µL d'éluât dans 90µL de Tampon de dilution.

2 Préparation du mix de billes

Pour chacun des 11 antigènes (et donc chaque couleur de billes (# Numéro), il faut entre 5000 et 8000 billes par puits. Cela correspond à 0,25 µL de chaque bille couplée par puits le tout dans un volume final de 50 µL par puit

Par exemple, si on a couplé avec succès 11 protéines recombinantes différentes, le volume du mix de billes pour un puit sera de $11 \times 0,25 = 2,75\mu\text{L}$ pour un puits, que l'on complétera avec 47,25µL de tampon de dilution.

Calculer ensuite le volume à pipeter pour le nombre de puits à réaliser en incluant une marge.

Par exemple, pour une plaque (96 puits) il faut préparer un mix pour 100 puits.

Pour 100 puits il faudra déposer **25 µL de chaque bille couplée** par puits le tout dans un volume final de **5000 µl qsp de tampon de dilution**.

*Ainsi si on a couplé avec succès 11 protéines recombinantes différentes, le volume du mix de billes pour une plaque de 96 puits sera de $11 \times 25\mu\text{L} = 275\mu\text{L}$ que l'on complétera avec **4725µL** de tampon de dilution.*

Pour préparer le mix de billes, Vortexer 30 sec les flacons de billes couplées. Prélever le volume nécessaire de chaque bille et les déposer dans le tampon de dilution d'échantillon puis Vortexer le tout 30 sec.

Entourer d'aluminium le tube de mix afin de le protéger de la lumière. Le mix s'il est préparé à l'avance se conserve 2 heures maximum à 4°C à l'abri de la lumière.

3 Dépôt des billes et des échantillons

Au préalable placer l'agitateur de plaque à 4°C (chambres froides / réfrigérateur).

Une fois les dilutions des échantillons et le mix de billes prêts, prendre une plaque de 96 pour Luminex® avec puits à fond plat.

- Identifier et marquer la plaque.
- Vortexer le Mix de Billes 30sec et le verser dans un réservoir (prévu à ce seul effet)
- Ajouter 50µl de mix de billes/puits dans tous les puits avec une pipette multicanaux
- **Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement**
- Distribuer 100µl/puits d'échantillons diluées en mélangeant par aspiration/rejet avec la pipette multicanaux ou 100 µl de tampon pour le puits du blanc.
- Remettre le couvercle en plastique sur la plaque et la recouvrir de papier aluminium. La déposer sur l'agitateur qui a été placé à 4°C.
- Régler l'agitateur à 400rpm.
- **Laisser incuber au moins 16H (overnight) à 4°C (chambre froide/réfrigérateur).**

3.2.1.2 Manipulation du deuxième jour

Le lendemain matin sortir les tampons pour qu'ils soient à température ambiante.

1 Mise en route du MagPix

- Mettre l'interrupteur à l'arrière de l'appareil sur ON
- Allumer l'ordinateur et le MagPix (bouton face avant)
- Lancer l'application Xponent (raccourci sur le bureau) et s'identifier.
- Dans l'onglet AutoMaint sélectionner **Fluidics Prep**
- Remplir le réservoir avec de l'Isopropanol à 70% ou Ethanol à 70% dans les emplacements indiqués sur l'écran par la zone AF.
- Cliquer sur « Start » pour lancer le « Fluidics Prep » qui dure environ 2 minutes.

2 Lavage puis dépôt du conjugué anti IgG

L'anticorps anti-humain IgG-gamma chain specific biotynilé (500µg/mL) est utilisé à **4µg/mL final** (pour un volume final 50µL de solution de conjugué/puits).

*Pour les chauves-souris le conjugué est utilisé à 0.1µg/mL **final** (pour un volume final 50µL de solution de conjugué/puits).*

Pour les rongeurs un mix de deux conjugué est utilisé (anti-Rat et Anti-Souris) Les deux ont une dilution finale fixé à 1/4000 (pour un volume final 50µL de solution de conjugué/puits).

Exemple pour une plaque : il faut 100 puits x 50µL de solution à 4µg/ml = 5 ml de solution de conjugué à 4 µg/mL final (soit 40 µL d'anti-humain IgG à 500µg/mL dans 4960µL de tampon de dilution)

- Préparer la solution de conjugué diluée dans du tampon de dilution
- Enlever la plaque de l'agitateur et retirer l'aluminium (placer l'agitateur à température ambiante)
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 150µL/puits de tampon de dilution (**Lavage 1/5**)
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 100µL/puits de tampon de dilution (**Lavage 2/5**)
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 100µL/puits de tampon de dilution (**Lavage 3/5**)
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 100µL/puits de tampon de dilution (**Lavage 4/5**)
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 100µL/puits de tampon de dilution (**Lavage 5/5**)
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 50µL/puits de la solution de conjugué diluée.
- Remettre le couvercle en plastique sur la plaque et la déposer sur l'agitateur et la recouvrir de papier aluminium.
- En maintenant fermement la plaque, régler l'agitateur à **1200 RPM** pendant **1 minute** pour remettre les billes en suspension.
- Réduire la vitesse de l'agitateur à **400 RPM** et laisser incuber pendant **30 minutes à température ambiante.**

3 Vérification des performance et calibration du MagPix et création du batch

Ces étapes sont à réaliser durant l'incubation de 30 minutes.

- **La Calibration du MagPix est à réaliser de façon hebdomadaire lorsque le MagPix est utilisé.**

- Dans l'onglet **AutoMaint** sélectionner **Calibration Verification**
- Remplir le réservoir avec de l'Isopropanol à 70% ou l'Ethanol à 70% dans l'emplacement indiqué sur l'écran par la zone AF.
- Vortexer pendant 30s les 3 flacons de billes du kit de vérification et le flacon du kit de calibration
- Ajouter 5 à 6 gouttes de billes de chaque couleur dans les puits de la barrette indiqué sur l'écran qui est à placer sur le réservoir.
- Ouvrir la trappe à partir du logiciel grâce à la touche « eject/retract »
- Placer le réservoir et la barrette et re cliquer sur « eject/retract » pour fermer la trappe.
- Cliquer sur « Start » pour lancer la « **Calibration Vérification** » qui dure environ 12 minutes.

NB - Cette procédure comprend la vérification des performances du MagPix.

- **La Vérification des performances du MagPix est à réaliser de façon quotidienne lorsque le Magpix est utilisé.**

- Dans l'onglet AutoMaint sélectionner la **Performance Verification**
- Remplir le reservoir avec de l'Isopropanol à 70% ou l'Ethanol dans l'emplacement indiqué sur l'écran par la zone AF.
- Vortexer pendant 30s les 3 flacons de billes du kit de vérification
- Ajouter 5 à 6 gouttes de billes de chaque couleur dans les puits de la barrette indiqués sur l'écran placée sur le réservoir.
- Ouvrir la trappe à partir du logiciel grâce à la touche « eject/retract »
- Placer le réservoir et la barrette et re cliquer sur « eject/retract » pour fermer la trappe.
- Cliquer sur « Start » pour lancer le « Performance Verification » qui dure environ 5 minutes.

- **Création d'un protocole**

- dans l'onglet Protocols cliquer sur "Create new protocol"
- Dans le volet settings (1) identifier le nouveau protocole en remplissant les section « Name », « Version » et « Manufacturer ». Choisir le type de plaque et régler le volume d'acquisition sur 50µL. Ne rien modifier d'autre.
- Dans le volet Analytes (2) sélectionner les Analytes (n° Billes) puis compléter dans le tableau les colonnes « Names » et « Count » (Count devra être réglé sur 50).
- Dans le volet « Plate Layout » sélectionner la commande « post batch routine » dans le menu « Commands and routines ».
- Sauvegarder le Protocole

- **Préparation du batch (à partir d'un protocole existant)**

- dans l'onglet batches cliquer sur "new batch from an existing protocol" dans le premier volet nommer la manipulation et sélectionner le protocole à exécuter. Ensuite dans le volet « Plate layout » pour la suite de la création du batch
- Paramétrer le format de la plaque (position du blanc et des échantillons)

- Importer le plan de plaques (Format .txt lineaire) et compléter la colonne dilution
- menu « Commands and routines » vérifier que la commande « post batch routine » soit sélectionnée.
- Remplir le réservoir avec de l'eau distillé, de l'Isopropanol à 70% et de la soude (NaOH) à 0,1N dans les emplacements indiqués sur l'écran.
- Ouvrir la trappe à partir du logiciel grâce à la touche « eject/retract »
- Placer le réservoir et la barrette et cliquer sur « eject/retract » pour fermer la trappe.
- Sauvegarder le batch qui apparait alors comme en attente (Pending)

4 Dépôt du conjugué Streptavidin-PE (SAPE)

La Streptavidin-PE (1mg/mL) est utilisé à **4µg/mL final** (pour un volume final 50µL de solution de conjugué/puits).

Exemple pour une plaque : il faut 100 puits x 50µL de solution à 1µg/ml = 5 ml de solution de conjugué à 4µg/mL final (soit 20 µL de Streptavidin-PE à 1mg/mL) dans 4980µL de tampon de dilution)

À la fin de l'incubation avec le conjugué :

- Préparer la solution de Streptavidin-PE à **4 µg/mL final** dans du tampon de dilution
- Recouvrir d'aluminium le tube de Streptavidin-PE dilué afin de le protéger de la lumière.
- Enlever la plaque de l'agitateur et retirer l'aluminium
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 150µL/puits de tampon de dilution (**Lavage 1/5**)
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 100µL/puits de tampon de dilution (**Lavage 2/5**)
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 100µL/puits de tampon de dilution (**Lavage 3/5**)
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 100µL/puits de tampon de dilution (**Lavage 4/5**)
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 100µL/puits de tampon de dilution (**Lavage 5/5**)
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 50µL/puits de la solution de Streptavidin-PE à 4 µg/mL final
- Remettre le couvercle en plastique sur la plaque et la déposer sur l'agitateur et la recouvrir de papier aluminium.
- En maintenant fermement la plaque, régler l'agitateur à **1200 RPM** pendant **1 minute** pour remettre les billes en suspension.
- Réduire la vitesse de l'agitateur à **400 RPM** et laisser incuber pendant **10 minutes à température ambiante.**

5 Lecture de plaques

À la fin de l'incubation avec la Streptavidin-PE :

- Enlever la plaque de l'agitateur et retirer l'aluminium
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 150µL/puits de **tampon de lecture (Lavage 1/5)**
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 100µL/puits de **tampon de lecture (Lavage 2/5)**
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 100µL/puits de **tampon de lecture (Lavage 3/5)**
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 100µL/puits de **tampon de lecture (Lavage 4/5)**
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 100µL/puits de **tampon de lecture (Lavage 5/5)**
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 50µL/puits de **tampon de lecture**
- Remettre le couvercle en plastique sur la plaque et la déposer sur l'agitateur et la recouvrir de papier aluminium.
- En maintenant fermement la plaque, régler l'agitateur à **1200 RPM** pendant **1 minute** pour remettre les billes en suspension.
- Rajouter **50µl**/puits de tampon de lecture pour obtenir un volume final de **100µl**/puits.
- Ouvrir la trappe à partir du logiciel grâce à la touche « eject/retract »
- Enlever le couvercle et placer la plaque sur le support du MagPix et cliquer sur « eject/retract » pour fermer la trappe
- Ouvrir la batch le sélectionnant et en cliquant sur Edit
- Cliquer sur le bouton « **START** », et valider pour que la lecture de la plaque démarre

La lecture d'une plaque de 96 puits peut durer environ 60 minutes. La procédure Post batch routine se déclenche automatiquement à la fin de la plaque.

6 Récupération et validation des résultats

À la fin de la lecture une fois la procédure post batch routine terminée dans l'onglet « result » exporter les résultats au format CSV (.csv).

Ce fichier est à conserver tel quel et doit être sauvegardé dans un dossier résultats sur l'ordinateur du MagPix.

Utiliser une clé USB pour transférer une copie de ce fichier sur un autre ordinateur pour l'analyser.

Pour la validation de la plaque il faut vérifier plusieurs indicateurs :

- La cohérence des valeurs obtenues avec les témoins positifs et négatifs avec leurs valeurs de références
- Le nombre de billes uniques analysé pour chaque couleur de billes (chaque antigène) dans chaque puit (Count). Une erreur remonte si un count est inférieur à 50. Les résultats d'un échantillon qui présente au moins un count inférieur à 25 ne seront pas utilisables, l'échantillon sera à repasser.

Après validation de la plaque il est possible d'intégrer les résultats obtenus en Net MFI dans un fichier résultats global (base de données)

7 Arrêt du MagPix :

Dans l'onglet AutoMaint sélectionner « **shut down** »

- Remplir le réservoir avec l'eau mQ et de la javel diluée à 10% dans les emplacements indiqués sur l'écran.
- Ouvrir la trappe à partir du logiciel grâce à la touche « eject/retract »
- Placer le réservoir et la barrette et re cliquer sur « eject/retract » pour fermer la trappe.
- Cliquer sur « Start » pour lancer le shut down qui dure environ 5 minutes.

- Eteindre l'appareil via le logiciel puis se se dé-identifier
- Fermer le logiciel Xponent en cliquant sur Exit
- Mettre l'interrupteur à l'arrière de l'appareil sur off
- Eteindre l'ordinateur

Multiplex Immunoassay Luminex® Ebolavirus	
GOALS	Instructions for performing the multiplex serological test using xMAP MagPix® (Luminex®) technology
STAFF INVOLVED	Technicians Researchers
DOCUMENTATION AND REFERENCES	Ayouba A, Touré A, Butel C, Keita AK, Binetruy F, Sow MS, Foulongne V, Delaporte E, Peeters M. Development of a Sensitive and Specific Serological Assay Based on Luminex Technology for Detection of Antibodies to Zaire Ebola Virus. J Clin Microbiol. 2016 Dec 28;55(1):165-176. doi: 10.1128/JCM.01979-16. PMID: 27795350; PMCID: PMC5228227.
EDITED BY	Guillaume Thaurignac and Antoine Nkuba Signature : Date :
APPROVED BY	Martine Peeters et Ahidjo Ayouba Signature : Date :

I. DEFINITION

Luminex®: this is a generic term designating a luminometer allowing the demonstration of an interaction between ligands (antigen-antibody, primer-target, hormone-receptor, etc.).

BSA : Bovine Serum Albumin

PBS : Phosphate Buffered Saline

FBS : foetal bovine sera

II. PRINCIPLE

Luminex® technology works according to the combined principles of ELISA and flow cytometry through the use of fluorescent beads. With the MagPix up to 50 interactions can be studied simultaneously. The beads each have a different color to identify the antigen to which they have been coupled. It is a biotinylated secondary antibody (directed against human IgG for example) which, combined with streptavidin coupled to Phycoerythrin (SAPE), makes it possible to quantify the presence or absence of interaction by an MFI value (Median Fluorescence Intensity).

III. INSTRUCTIONS AND PROCEDURES

1. Security Procedures

All biological material should be considered potentially infectious. Therefore, wearing gloves and a lab coat is mandatory during handling.

2. Materials et équipement

A part of the manipulations are sensitive to light, a dark or light-controlled room is necessary.

Materials et reactive

- A complete **xMap** system : The **MagPix** and it computer with Xponent instaled
- Manual magnetic washer for 96 well plate
- Tablet of 1X PBS
- Tween-20 (polyoxysorbitane monolaurate)
- BSA (SIGMA : A7906)
- Foetal bovine sera (inactivated 30 min 56°C), Gibco
- Biotin Mouse anti-human IgG (BD pharmigen réf. 555785)
- *Biotin goat anti-bat IgG H/L (Bethyl A140-118B)*
- *Biotin goat anti-mouse IgG Y-chain specific (Sigma B7022)*
- *Biotin goat anti-rat IgG (whole molecule) (Sigma B7139)*
- Streptavidin-R-phycoerythrin (SAPE) (Fisher Scientific/Life technologies)
- NaH₂PO₄ (powder)
- Na₂HPO₄ (powder)
- Na Cl (powder)
- 96 well plate with flat bottom, Greiner (réf. 655906) with lid
- Reagent reservoirs
- Vortex

- Plate Agitator
- Pipets (P10, P100-P200, P1000) and without filter compatible tips
- Multichannel Pipets 30 – 300 µL (8 and/or 12 Channel)
- Tube 5mL for mixes preparation
- Tube 1,4mL (micronic) for dilutions with compatible racks
- MagPix calibration kit
- MagPix performance verification kit
- MagPix Drive fluid
- Magnetic bead coupled with antigen
(Avoid expose them to light)
- Isopropanol 70%
- Soude 0.1N
- Bleash
- Refrigerator and freezer
- Magnetic stirrer and bar magnet
- Glass bottle 0.5L, 1L et 2L
- A source of clean water is necessary (distillator, osmosis system)
- Personal protective equipment (gloves, lab coat)
- Ethanol 70% (for cleaning surface)
- heating block or / and laboratory oven
- Microtube 1.5mL and 2mL (and compatible cryoboxe)

List of Antigen

Ag name	suplier	reference	Quantity for size 1X
NP EBOV	Sino Biological	40443-V07E1	2µg
GP EBOV Kiss	Sino Biological	40442-V08B1	2µg
GP EBOV May	Sino Biological	40304-V08B1	2µg
VP40 EBOV	Sino Biological	40446-V07E	2µg
NP SUDV	Sino Biological	40444-V07E	2µg
GP1 SUDV	Sino Biological	40094-V08B	1µg
VP40 SUDV	Sino Biological	40447-V07E	2µg
GP BDBV	Sino Biological	40368-V08B	2µg
VP40 BDBV	Sino Biological	40448-V07E	2µg
GP RESTV	IBT Bioservice	0504-015	2µg
GP1 BOMV	Sino Biological	IT1-2	2µg

3. Procedures

3.1 Buffer preparation

Record the product name and preparation date of each buffer.

- Hypertonic PBS: example for 1 L
NaH₂PO₄= 0,8g
Na₂HPO₄= 2,5g
Na Cl= 88g
Qsp 1L DIH₂O
Store at +4°C.
- 1X PBS: Put 1 tablet in DIH₂O. (respect supplier recommendation)
Store at +4°C.
- Reading buffer: PBS 1X + 1% BSA
Store at +4°C.
- Dilution buffer: (Store at +4°C):
50% hypertonic PBS
1% BSA
5% inactivated FBS (incubate 56°C for 30min)
0.2% Tween-20
Qsp DIH₂O

3.2 Process

3.2.1 Sample preparation

The samples to be tested with Luminex must not present any infectious risk. Before any reading, they must be inactivated in the BSL3 laboratory according to the required health and safety rules.

- if necessary, aliquot in a biosafety atmosphere.

For plasma, 50µL is a good volume for performing several multiplex immunoassays.

- Inactivate **30min to 56°C in heating block** or 1H in a 56°C laboratory oven

After inactivation store aliquot to -20°C

3.2.1 Multiplex Immunoassay with Luminex MagPix

This procedure includes an overnight incubation and therefore takes place over two days.

3.2.1.1 Day 1

1 Sample dilution

Dilutions are carried out in 1.4mL tubes. First of all, it is therefore necessary to prepare a rack with as many 1.4mL tubes as samples to be tested. During this step, the plan of the plate should be produced, which remains identical until the end of the manipulation.

For any reading, remember to include positive controls and controls that will cover the recombinant protein panels used as much as possible and to provide a blank well (buffers alone).

a) Dilution of human plasma and sera

Human plasma/sera samples are tested diluted **1:1000** in sample dilution buffer.

b) Dilution of the eluates (or recovery) of human DBS

On the same principle as above, dilute the DBS eluates to 1/1000 in dilution buffer. The DBS eluates are already diluted to 1/40 after elution so only a 1/25 dilution is necessary

NB - We advise depositing 5µL of eluate in 120µL of dilution buffer.

c) Dilution of bat and rodent plasma and sera

*bat plasma/sera samples are tested diluted 1:2000 in sample dilution buffer.
rodent plasma/sera samples are tested diluted 1:200 in sample dilution buffer.*

d) Dilution of the eluates (or recovery) of bat and rodent DBS

On the same principle as above, dilute the bat's DBS eluates to 1/2000 in dilution buffer. The bat DBS eluates are already diluted to 1/50 after elution so only a 1/40 dilution is necessary

NB - We advise depositing 5µL of eluate in 195µL of dilution buffer.

For rodent dilute the DBS eluates to 1/200 in dilution buffer. The rodent DBS eluates are already diluted to 1/50 after elution so only a 1/4 dilution is necessary

NB - We advise depositing 30µL of eluate in 90µL of dilution buffer.

2 Beads mix preparation

For each of the antigens (and therefore each color of beads (# Number), between 5000 and 8000 beads are required per well. This corresponds to 0.25 µL of each paired bead per well, all in a final volume of 50 µL per well.

For example, if 11 different recombinant proteins have been successfully coupled, the volume of the bead mix for one well will be $11 \times 0.25 = 2.75 \mu\text{L}$ for one well, which will be completed with $47.25 \mu\text{L}$ of dilution buffer.

Then calculate the volume to be pipetted for the number of wells to be made, including a margin.

For example, for a plate (96 wells) it is necessary to prepare a mix for 100 wells.

For 100 wells, $25 \mu\text{L}$ of each paired bead must be deposited per well, all in a final volume of $5000 \mu\text{L}$ qsp of dilution buffer.

Thus, if 11 different recombinant proteins have been successfully coupled, the volume of the mix of beads for a 96-well plate will be $11 \times 25 \mu\text{L} = 275 \mu\text{L}$ which will be completed with $4725 \mu\text{L}$ of dilution buffer.

To prepare the mix of beads, Vortex the vials of coupled beads for 30 sec. Take the required volume of each bead and place them in the sample dilution buffer then Vortex for 30 sec.

Wrap the mix tube in aluminum to protect it from light. The mix, if prepared in advance, can be kept for a maximum of 2 hours at 4°C away from light.

3 Deposit of beads mix and sample dilution

Beforehand, place the plate shaker at 4°C (cold rooms / refrigerator).

Once the sample dilutions and bead mix are ready, take a 96 plate for Luminex® with flat bottom wells.

- Identify and mark the plate.
- Vortex the Mix of Marbles for 30 sec and pour it into a tank (provided for this purpose only)
- Add $50\mu\text{L}$ of bead mix/well to all wells with a multichannel pipette

- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion

- Distribute $100 \mu\text{L}$ /well of diluted samples by mixing by aspiration/discharge with the multichannel pipette or $100 \mu\text{L}$ of buffer for the blank well.

- Replace the plastic lid on the plate and cover it with aluminum foil. Place it on the stirrer which has been placed at 4°C .
- Set the agitator to 400rpm.

- Leave to incubate for at least 16 hours (overnight) at 4°C (cold room).

3.2.1.2 Day 2

The next morning take out the buffer at room temperature.

1 Getting Started the MagPix

- Put the switch on the back of the device to ON
- Switch on the computer and the MagPix (button on the front)
- Launch the Xponent application (shortcut on the desktop) and identify yourself.
- In the AutoMaint tab select Fluidics Prep
- Fill the tank with 70% Isopropanol in the locations indicated on the screen by the AF zone.
- Click on "Start" to launch the "Fluidics Prep" which lasts approximately 2 minutes.

2 Washing and depositing the anti IgG conjugate

Biotin anti-human IgG-gamma chain specific (500µg/mL) is used at **4µg/mL** (for a final volume of 50µL of conjugate solution/well).

For bat, the secondary antibody is used at 0.1µg/mL (for a final volume of 50µL of conjugate solution/well).

For rodent use a mix of two secondary antibody (anti Rat and anti-Mouse). Mix rat and mouse secondary antibody as a mix. Twice have a final dilution fixed at 1/4000(for a final volume of 50µL of conjugate solution/well).

- Prepare the final conjugate solution in dilution buffer.
- Remove the stirrer plate and remove the aluminum (place the stirrer at room temperature)
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Outside the support, add 150µL/well of dilution buffer (Washing 1/5)
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Outside the support, add 100µL/well of dilution buffer (2/5 wash)
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Outside the support, add 100µL/well of dilution buffer (3/5 wash)
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Outside the support, add 100µL/well of dilution buffer (4/5 wash)
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Outside the support, add 100µL/well of dilution buffer (5/5 wash)
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Off the support, deposit 50µL/well of the final conjugate solution
- Replace the plastic lid on the plate and place it on the stirrer and cover it with aluminum foil.
- Holding the plate firmly, set the stirrer at 1200 RPM for 1 minute to resuspend the beads.
- Reduce the stirrer speed to 400 RPM and incubate for **30 minutes at room temperature.**

3 Performance verification, Calibration and Batch creation

These steps are to be carried out during the 30-minute incubation.

- **MagPix Calibration should be performed weekly when the MagPix is in use.**
 - In the AutoMaint tab select Calibration Verification
 - Fill the tank with 70% Isopropanol in the locations indicated on the screen by the AF zone.
 - Vortex for 30s the 3 vials of beads from the verification kit and the vial from the calibration kit
 - Add 5 to 6 drops of beads of each color in the wells of the bar indicated on the screen
 - Open the hatch from the software using the "eject/retract" button
 - Place the tank and the bar and click again on "eject/retract" to close the hatch.
- Click on "Start" to launch the "Calibration Verification" which lasts about 12 minutes.

NB - This procedure includes checking the performance of the MagPix.

- **The MagPix Performance verification should be performed daily when the Magpix is in use**
 - In the AutoMaint tab select the Performance Verification
 - Fill the tank with 70% Isopropanol in the location indicated on the screen by the AF zone.
 - Vortex for 30s the 3 vials of beads from the verification kit
 - Add 5 to 6 drops of beads of each color in the wells of the bar indicated on the screen
 - Open the hatch from the software using the "eject/retract" button
 - Place the tank and the bar and click again on "eject/retract" to close the hatch.
 - Click on "Start" to launch the "Performance Verification" which lasts about 5 minutes.
- **batch preparation (with an existing protocol)**
 - in the batches tab click on "new batch from an existing protocol" and select "PanCoV protocol".
 - Set the plate format (position of blank and samples)
 - Import the plate plan (linear .txt format) and complete the dilution column
 - In the "post batch routine" pane, select the "post batch routine" command.
 - Fill the tank with distilled water, 70% Isopropanol and 0.1N soda (NaOH) in the locations indicated on the screen.
 - Open the hatch from the software using the "eject/retract" button
 - Place the tank and the bar and click again on "eject/retract" to close the hatch.
 - Save the batch which then appears as pending (Pending)

2 Washing and depositing the Streptavidin-PE (SAPE)

Streptavidin-PE (1mg/mL) is used at **4µg/mL final** (for a final volume of 50µL of solution/well).

Example for a plate: you need 100 wells x 50µL of solution at 4µg/ml = 5 ml of conjugate

solution at 4µg/ml final (i.e. 20 µL of Streptavidin-PE at 1mg/ml) in 4980µL of dilution buffer)

After the incubation with the conjugate:

- Prepare the Streptavidin-PE solution at 4 µg/mL final in dilution buffer
- Cover the tube of diluted Streptavidin-PE with aluminum to protect it from light.
- Remove the agitator plate and remove the aluminum
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Outside the support, add 150µL/well of dilution buffer (Washing 1/5)
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Outside the support, add 100µL/well of dilution buffer (2/5 wash)
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Outside the support, add 100µL/well of dilution buffer (3/5 wash)
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Outside the support, add 100µL/well of dilution buffer (4/5 wash)
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Outside the support, add 100µL/well of dilution buffer (5/5 wash)
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Off the support, deposit 50µL/well of the Streptavidin-PE solution at 4 µg/mL final
- Replace the plastic lid on the plate and place it on the stirrer and cover it with aluminum foil.
- Holding the plate firmly, set the stirrer at 1200 RPM for 1 minute to resuspend the beads.
- Reduce the stirrer speed to 400 RPM and incubate for 10 minutes at room temperature.

3 Finals wash and plate preparation for reading

After the incubation with the Streptavidin-PE:

- Remove the agitator plate and remove the aluminum
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Out of support, deposit 150µL/well of **reading buffer (Washing 1/5)**
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Out of support, deposit 100µL/well of **reading buffer (Washing 2/5)**
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Out of support, deposit 100µL/well of **reading buffer (3/5 wash)**
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Out of support, deposit 100µL/well of **reading buffer (4/5 wash)**
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Out of support, deposit 100µL/well of **reading buffer (5/5 wash)**
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Excluding support, deposit 50µL/well of reading buffer
- Replace the plastic lid on the plate and place it on the stirrer and cover it with aluminum foil.
- Holding the plate firmly, set the stirrer at 1200 RPM for 1 minute to resuspend the beads.
- Add 50µl/well of reading buffer to obtain a final volume of 100µl/well.
- Open the hatch from the software using the "eject/retract" button
- Remove the cover and place the plate on the MagPix support and click again on

"eject/retract" to close the hatch

- Open the batch selecting it and clicking on Edit
- Click on the "START" button, and validate so that the reading of the plate starts

Reading a 96-well plate can take approximately 60 minutes. The Post batch routine is triggered automatically at the end of the plate.

4 Result exportation and validation

At the end of the reading, once the post batch routine procedure is finished in the "result" tab, export the results in CSV format (.csv).

This file should be kept as is and should be saved in a results folder on the MagPix computer.

Use a USB flash drive to transfer a copy of this file to another computer for analysis.

For the validation of the plate, several indicators must be checked:

- The consistency of the values obtained with the positive and negative controls with their reference values
- The number of unique beads analyzed for each color of beads (each antigen) in each well (Count). An error is raised if a count is less than 50. The results of a sample that has at least a count less than 25 will not be usable and the sample will have to be ironed.

After validation of the plate, it is possible to integrate the results obtained in Net MFI into a global results file (database)

5 MagPix shut down

In the AutoMaint tab select "shut down"

- Fill the tank with mQ water and bleach diluted at 10% in the places indicated on the screen.
 - Open the hatch from the software using the "eject/retract" button
 - Place the tank and the bar and click again on "eject/retract" to close the hatch.
 - Click on "Start" to launch the shutdown which lasts about 5 minutes.
-
- Turn off the device via the software then de-identify
 - Close the Xponent software by clicking on Exit
 - Set the switch on the back of the device to off
 - Turn off the computer

SOP SC_ 25c	Multiplex Immunoassay Luminex® Coronavirus
OBJECTIFS	Instructions pour la réalisation du test sérologique multiplex utilisant la technologie xMAP MagPix® (Luminex®)
PERSONNEL IMPLIQUÉ	Techniciens Chercheurs
DOCUMENTATION / REFERENCES	Multiplex detection and dynamics of IgG antibodies to SARS-CoV2 and the highly pathogenic human Coronaviruses SARS-CoV and MERS-CoV Ayoub A et al. 2020.
RÉALISÉ PAR	Guillaume Thaurignac and Antoine NKuba Signature : Date :
Modifié par	
APPROUVÉ PAR	Martine Peeters et Ahidjo Ayouba Signature : Date :

I. DEFINITION

Luminex® : c'est un terme générique désignant un luminomètre permettant la mise en évidence d'une interaction entre ligands (antigène-anticorps, amorce-cible, hormone-récepteur, etc.).

BSA : Bovine Serum Albumin

PBS : Phosphate Buffered Saline

SVF : Sérum de veau foetal

II. PRINCIPE

La technologie Luminex® fonctionne selon les principes combinés de l'ELISA et de cytométrie en flux grâce à l'utilisation de billes fluorescentes. Avec le MagPix jusqu'à 50 interactions peuvent être étudiées simultanément. Les billes ont chacune une couleur différente permettant d'identifier l'antigène auquel elles ont été couplées. C'est un anticorps secondaire biotynilé (dirigé contre les IgG humaines par exemple) qui, associé à de la streptavidine couplée à de la phycoérythrine (SAPE) permet de quantifier la présence ou l'absence d'interaction par une valeur de MFI (Median Fluorescence Intensity).

III. INSTRUCTIONS ET PROCEDURES

1. Procédures de sécurité

Tout matériel biologique doit être considéré comme potentiellement infectieux. Par conséquent, le port de gants et de blouse est obligatoire pendant la manipulation.

2. Matériels et équipements

Une partie des manipulations étant sensible à la lumière une pièce obscure ou à luminosité contrôlée est nécessaire

Matériels et réactifs

- Un système **xMap** complet : le **MagPix et son ordinateur sur lequel le logiciel Xponent est installé**
- Laveur magnétique manuel compatible pour la plaque 96 puits
- Comprimés de PBS 1X ou flacon de PBS liquide 1X
- Tween-20 (polyoxysorbitane monolaurate)
- BSA (Réf SIGMA : A7906)
- SVF (décomplementé 30min 56°C), Gibco
- Biotin Mouse anti-human IgG (BD pharmigen réf. 555785)
- [Biotin goat anti-bat IgG H/L \(Bethyl A140-118B\)](#)
- [Biotin goat anti-mouse IgG Y-chain specific \(Sigma B7022\)](#)
- [Biotin goat anti-rat IgG \(whole molecule\) \(Sigma B7139\)](#)
- Streptavidin-R-phycoerythrin (SAPE) (Fisher Scientific/Life technologies)
- NaH₂PO₄ (poudre)
- Na₂HPO₄ (poudre)
- Na Cl (poudre)
- Plaques 96 puits à fond plat, Greiner (réf. 655906) avec couvercles

- Réservoirs à réactifs
- Vortex
- Agitateur de plaques
- Pipettes (P10, P100-P200, P1000) et pointes sans filtre compatibles
- Micropipettes Multicanaux 30 – 300 µL (8 et/ou 12 canaux)
- Tubes 5mL pour la préparation des mixes
- Tubes 1,4mL (micronic) pour les dilutions avec racks compatibles
- Kit de calibration MagPix
- Kit de vérification MagPix
- Drive fluide MagPix
- Billes magnétiques couplées aux Antigènes
- **(Toujours garder à l'abri de la lumière !)**
- Isopropanol 70% ou Éthanol 70%
- Soude 0.1N
- Eau de Javel
- Réfrigérateur et Congélateur
- Agitateur magnétique et barreau aimanté
- Bouteilles en verre de 0.5L, 1L et 2L
- Une source d'eau propre est nécessaire (distillateur, osmoseur)
- Equipements de protection individuel (Gants, blouses)
- Éthanol 70% (pour le nettoyage des paillasses)
- Un bain marie sec ou bloc chauffant et / ou une étuve
- Microtubes de 1.5mL et de 2mL (et boîtes de rangement compatibles)

Détail du panel d'antigène

Protéines recombinantes	Fournisseurs	références	Quantités pour un couplage pour 6 plaques
NCP-CoV(2019-nCoV) nucleocapsid prot (His tag)	sino Biological	40588-V08B	2µg
SARS-CoV-2(2019-nCoV) Spike protein (RDFB, His tag)	sino Biological	40592-V08B	1µg
SARS-CoV Nucleoprotéin /NP protein (His Tag)	sino Biological	40143-V08B	2µg
SARS-CoV Spike protein (RDFB, His tag)	sino Biological	40150-V08B2	1µg
MERS-CoV Nucleoprotéin /NP protein (His Tag)	sino Biological	40068-V08B	2µg
MERS-CoV Spike/S1 protein (His Tag)	sino Biological	40069-V08B1	1µg
Human coronavirus (HCoV-229E) Spike/S1 protein (S1 Subunit His Tag)	sino Biological	40601-V08H	1µg
Human coronavirus HKU1 (isolate N5) (HCoV-HKU1) Spike/S1 protein (S1 Subunit His Tag)	sino Biological	40602-V08H	1µg
Human coronavirus (HCoV-OC43) Spike protein (S1ECD,His Tag)	sino Biological	4067-V08H1	1µg
Human coronavirus (HCoV-NL63) Spike protein (S1 Subunit His Tag)	sino Biological	40600-V08H	1µg
Recombinant human coronavirus 229E Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-EP322753HIT	2µg
Recombinant human coronavirus HKU1 Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-EP607323HIW	2µg
Recombinant human coronavirus OC43 Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-EP333798HIW	2µg
Recombinant human coronavirus NL63 Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-EP744150HIX	2µg
Recombinant Bat coronavirus 133/2005 Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-BP605318BFA	2µg
Recombinant Bat coronavirus 133/2005 Spikevglycoprotein (S) ,partial	Cusabio	CSB-BP610383BFA	1µg
Recombinant Bat coronavirus HKU3 Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-BP664686BFD	2µg
Recombinant Bat coronavirus HKU3 Spikevglycoprotein (S) ,partial	Cusabio	CSB-BP663395BFD	1µg
Recombinant Bat coronavirus HKU9 Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-BP385259BOV	2µg
Recombinant Bat coronavirus HKU9 Spikevglycoprotein (S) ,partial	Cusabio	CSB-BP385258BOV	1µg

3. Procédure

3.1 Préparation des tampons

Noter le nom du produit et la date de préparation de chaque tampon.

- PBS Hypertonique : exemple pour 1 L de solution
NaH₂PO₄= 0,8g
Na₂HPO₄= 2,5g
Na Cl= 88g
Qsp 1L d'H₂O distillée / osmosée / autoclavée
Conserver à +4°C.
- PBS 1X : Mettre 1 cachet (comprimé) dans 500mL d'eau distillée / osmosée / autoclavée.
Conserver à +4°C.
- Tampon de lecture : PBS 1X + 1% de BSA (à conserver à +4°C)
Conserver à +4°C.
- Tampon de dilution (à conserver à +4°C) :
50% de PBS hypertonique
1% de BSA
5% SVF décomplémenté froid (soit inactivé à 56°C pendant 30min)
0.2% Tween-20
Qsp H₂O distillée / osmosée / autoclavée

3.2 Manipulation

3.2.1 Préparation des échantillons

Les échantillons à tester au Luminex ne doivent présenter aucun risque infectieux. Avant toute lecture, ils doivent être impérativement inactivés en laboratoire BSL3 selon les règles d'hygiène et de sécurité requises.

- Si nécessaire, aliquoter sous un PSM une quantité suffisante de matériel.

Pour les plasmas, 50µL est en général un bon volume qui permet de répéter plusieurs tests Luminex.

- Inactiver **30min à 56°C dans un bain marie sec** ou 1H dans une étuve à 56°C

Après inactivation, les aliquots doivent être stockés à -20°C

3.2.1 Sérologies en multiplex avec le Luminex

Cette procédure comprend une incubation overnight et se déroule donc sur deux jours.

3.2.1.1 Manipulation du premier jour

1 Dilution des échantillons

Les dilutions s'effectuent dans des tubes de 1.4mL. En premier lieu il faut donc apprêter un rack (portoir) avec autant de tube de 1.4ml que d'échantillons à tester. Il convient de réaliser lors de cette étape le plan de la plaque qui restera identique jusqu'à la fin de la manipulation.

Pour toute lecture, penser à inclure des **témoins positifs** et des **témoins négatifs** qui recouvriront au maximum les panels de protéines recombinantes utilisées et prévoir **un puits de blanc** (tampons seuls).

a) Dilution des plasmas et sera humains

-Les échantillons de plasma/séra humain sont testés dilués au **1/200** dans le tampon de dilution d'échantillon.

b) Dilution des éluas (ou reprise) de DBS humain

Sur le même principe que ci-dessus, diluer les éluât de DBS au **1/200** dans du tampon de dilution. Les éluas de DBS sont déjà dilués au **1/40** après élution ainsi seule une dilution au **1/5** est nécessaire

NB - Nous conseillons de déposer 30µL d'éluât dans 90µL de Tampon de dilution.

c) Dilution des plasma et sera de chauves-souris et de rongeurs

*Les échantillons de plasma/séra de chauves-souris sont testés dilués au **1/400** dans le tampon de dilution d'échantillon.*

*Les échantillons de plasma/séra de rongeurs sont testés dilués au **1/400** dans le tampon de dilution d'échantillon.*

d) Dilution des reprises de DBS (Chauves-souris et rongeurs)

*Sur le même principe que ci-dessus, diluer les éluât de DBS de chauves-souris au **1/400** dans du tampon de dilution. Les éluas de DBS de chauves-souris sont déjà dilués au **1/50** après élution ainsi seule une dilution au **1/8** est nécessaire*

NB - Nous conseillons de déposer 15µL d'éluât dans 105µL de Tampon de dilution.

*Pour les reprise de DBS des rongeurs se dilue au **1/400** comme décrit plus haut
Les éluas de DBS de rongeurs sont déjà dilués au **1/50** après élution ainsi seule une dilution au **1/8** est nécessaire*

NB - Nous conseillons de déposer 15µL d'éluât dans 105µL de Tampon de dilution.

2 Préparation du mix de billes

Pour chacun des 22 antigènes (et donc chaque couleur de billes (# Numéro), il faut entre 5000 et 8000 billes par puits. Cela correspond à 0,25 µL de chaque bille couplée par puits le tout dans un volume final de 50 µL par puit

Par exemple, si on a couplé avec succès 22 protéines recombinantes différentes, le volume du mix de billes pour un puit sera de $22 \times 0,25 = 5,5 \mu\text{L}$ pour un puits, que l'on complétera avec 44,5µL de tampon de dilution.

Calculer ensuite le volume à pipeter pour le nombre de puits à réaliser en incluant une marge.

Par exemple, pour une plaque (96 puits) il faut préparer un mix pour 100 puits.

Pour 100 puits il faudra déposer **25 µL de chaque bille couplée** par puits le tout dans un volume final de **5000 µl qsp de tampon de dilution**.

*Ainsi si on a couplé avec succès 22 protéines recombinantes différentes, le volume du mix de billes pour une plaque de 96 puits sera de $22 \times 25 \mu\text{L} = 550 \mu\text{L}$ que l'on complétera avec **4450µL** de tampon de dilution.*

Pour préparer le mix de billes, Vortexer 30 sec les flacons de billes couplées. Prélever le volume nécessaire de chaque bille et les déposer dans le tampon de dilution d'échantillon puis Vortexer le tout 30 sec.

Entourer d'aluminium le tube de mix afin de le protéger de la lumière. Le mix s'il est préparé à l'avance se conserve 2 heures maximum à 4°C à l'abri de la lumière.

3 Dépôt des billes et des échantillons

Au préalable placer l'agitateur de plaque à 4°C (chambres froides / réfrigérateur).

Une fois les dilutions des échantillons et le mix de billes prêts, prendre une plaque de 96 pour Luminex® avec puits à fond plat.

- Identifier et marquer la plaque.
- Vortexer le Mix de Billes 30sec et le verser dans un réservoir (prévu à ce seul effet)
- Ajouter 50µl de mix de billes/puits dans tous les puits avec une pipette multicanaux
- **Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement**
- Distribuer 100µl/puits d'échantillons dilués en mélangeant par aspiration/rejet avec la pipette multicanaux ou 100 µl de tampon pour le puits du blanc.
- Remettre le couvercle en plastique sur la plaque et la recouvrir de papier aluminium. La déposer sur l'agitateur qui a été placé à 4°C.
- Régler l'agitateur à 400rpm.
- **Laisser incuber au moins 16H (overnight) à 4°C (chambre froide/réfrigérateur).**

3.2.1.2 Manipulation du deuxième jour

Le lendemain matin sortir les tampons pour qu'ils soient à température ambiante.

1 Mise en route du MagPix

- Mettre l'interrupteur à l'arrière de l'appareil sur ON
- Allumer l'ordinateur et le MagPix (bouton face avant)
- Lancer l'application Xponent (raccourci sur le bureau) et s'identifier.
- Dans l'onglet AutoMaint sélectionner **Fluidics Prep**
- Remplir le réservoir avec de l'Isopropanol à 70% ou Ethanol à 70% dans l'emplacements indiqués sur l'écran par la zone AF.
- Cliquer sur « Start » pour lancer le « Fluidics Prep » qui dure environ 2 minutes.

2 Lavage puis dépôt du conjugué

L'anticorps anti-human IgG-gamma chain specific biotynilé (500µg/mL) est utilisé à **4µg/mL final** (pour un volume final 50µL de solution de conjugué/puits).

*Pour les chauves-souris le conjugué est utilisé à 0.1µg/mL **final** (pour un volume final 50µL de solution de conjugué/puits).*

Pour les rongeurs un mix de deux conjugué est utilisé (anti-Rat et Anti-Souris) Les deux ont une dilution finale fixé à 1/4000 (pour un volume final 50µL de solution de conjugué/puits).

Exemple pour une plaque : il faut 100 puits x 50µL de solution à 4µg/ml = 5 ml de solution de conjugué à 4 µg/mL final (soit 40 µL d'anti-human IgG à 500µg/mL dans 4960µL de tampon de dilution)

- Préparer la solution de conjugué diluée dans du tampon de dilution
- Enlever la plaque de l'agitateur et retirer l'aluminium (placer l'agitateur à température ambiante)
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 150µL/puits de tampon de dilution (**Lavage 1/3**)
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 100µL/puits de tampon de dilution (**Lavage 2/3**)
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 100µL/puits de tampon de dilution (**Lavage 3/3**)
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 50µL/puits de la solution de conjugué diluée.
- Remettre le couvercle en plastique sur la plaque et la déposer sur l'agitateur et la recouvrir de papier aluminium.
- En maintenant fermement la plaque, régler l'agitateur à **1200 RPM** pendant **1 minute** pour remettre les billes en suspension.
- Réduire la vitesse de l'agitateur à **400 RPM** et laisser incubé pendant **30 minutes à température ambiante.**

3 Vérification des performance et calibration du MagPix et création du batch

Ces étapes sont à réaliser durant l'incubation de 30 minutes.

- **La Calibration du MagPix est à réaliser de façon hebdomadaire lorsque le MagPix est utilisé.**

- Dans l'onglet **AutoMaint** sélectionner **Calibration Verification**
- Remplir le réservoir avec de l'Isopropanol à 70% ou l'Ethanol à 70% dans l'emplacement indiqué sur l'écran par la zone AF.
- Vortexer pendant 30s les 3 flacons de billes du kit de vérification et le flacon du kit de calibration
- Ajouter 5 à 6 gouttes de billes de chaque couleur dans les puits de la barrette indiqué sur l'écran qui est à placer sur le réservoir.
- Ouvrir la trappe à partir du logiciel grâce à la touche « eject/retract »
- Placer le réservoir et la barrette et re cliquer sur « eject/retract » pour fermer la trappe.
- Cliquer sur « Start » pour lancer la « **Calibration Vérification** » qui dure environ 12 minutes.

NB - Cette procédure comprend la vérification des performances du MagPix.

- **La Vérification des performances du MagPix est à réaliser de façon quotidienne lorsque le Magpix est utilisé.**

- Dans l'onglet AutoMaint sélectionner la **Performance Verification**
- Remplir le reservoir avec de l'Isopropanol à 70% ou l'Ethanol dans l'emplacement indiqué sur l'écran par la zone AF.
- Vortexer pendant 30s les 3 flacons de billes du kit de vérification
- Ajouter 5 à 6 gouttes de billes de chaque couleur dans les puits de la barrette indiqués sur l'écran placée sur le réservoir.
- Ouvrir la trappe à partir du logiciel grâce à la touche « eject/retract »
- Placer le réservoir et la barrette et re cliquer sur « eject/retract » pour fermer la trappe.
- Cliquer sur « Start » pour lancer le « Performance Verification » qui dure environ 5 minutes.

- **Création d'un protocole**

- dans l'onglet Protocols cliquer sur "Create new protocol"
- Dans le volet settings (1) identifier le nouveau protocole en remplissant les section « Name », « Version » et « Manufacturer ». Choisir le type de plaque et régler le volume d'acquisition sur 50µL. Ne rien modifier d'autre.
- Dans le volet Analytes (2) sélectionner les Analytes (n° Billes) puis compléter dans le tableau les colonnes « Names » et « Count » (Count devra être réglé sur 50).
- Dans le volet « Plate Layout » sélectionner la commande « post batch routine » dans le menu « Commands and routines ».
- Sauvegarder le Protocole

- **Préparation du batch (à partir d'un protocole existant)**

- dans l'onglet batches cliquer sur "new batch from an existing protocol" dans le premier volet nommer la manipulation et sélectionner le protocole à exécuter. Ensuite dans le volet « Plate layout » pour la suite de la création du batch
- Paramétrer le format de la plaque (position du blanc et des échantillons)

- Importer le plan de plaques (Format .txt lineaire) et compléter la colonne dilution
- menu « Commands and routines » vérifier que la commande « post batch routine » soit sélectionnée.
- Remplir le réservoir avec de l'eau distillé, de l'Isopropanol à 70% et de la soude (NaOH) à 0,1N dans les emplacements indiqués sur l'écran.
- Ouvrir la trappe à partir du logiciel grâce à la touche « eject/retract »
- Placer le réservoir et la barrette et cliquer sur « eject/retract » pour fermer la trappe.
- Sauvegarder le batch qui apparait alors comme en attente (Pending)

4 Dépôt du conjugué Streptavidin-PE (SAPE)

La Streptavidin-PE (1mg/mL) est utilisé à **1 µg/mL final** (pour un volume final 50µL de solution de conjugué/puits).

Exemple pour une plaque : il faut 100 puits x 50µL de solution à 1µg/ml = 5 ml de solution de conjugué à 4µg/mL final (soit 5 µL de Streptavidin-PE à 1mg/mL) dans 4995µL de tampon de dilution)

À la fin de l'incubation avec le conjugué :

- Préparer la solution de Streptavidin-PE à **1 µg/mL final** dans du tampon de dilution
- Recouvrir d'aluminium le tube de Streptavidin-PE dilué afin de le protéger de la lumière.
- Enlever la plaque de l'agitateur et retirer l'aluminium
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 150µL/puits de tampon de dilution (**Lavage 1/3**)
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 100µL/puits de tampon de dilution (**Lavage 2/3**)
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 100µL/puits de tampon de dilution (**Lavage 3/3**)
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 50µL/puits de la solution de Streptavidin-PE à 1 µg/mL final
- Remettre le couvercle en plastique sur la plaque et la déposer sur l'agitateur et la recouvrir de papier aluminium.
- En maintenant fermement la plaque, régler l'agitateur à **1200 RPM** pendant **1 minute** pour remettre les billes en suspension.
- Réduire la vitesse de l'agitateur à **400 RPM** et laisser incuber pendant **10 minutes à température ambiante.**

5 Lecture de plaques

À la fin de l'incubation avec la Streptavidin-PE :

- Enlever la plaque de l'agitateur et retirer l'aluminium
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 150µL/puits de **tampon de lecture (Lavage 1/3)**
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 100µL/puits de **tampon de lecture (Lavage 2/3)**
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 100µL/puits de **tampon de lecture (Lavage 3/3)**
- Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 min et laver par retournement
- Hors support déposer 50µL/puits de **tampon de lecture**
- Remettre le couvercle en plastique sur la plaque et la déposer sur l'agitateur et la recouvrir de papier aluminium.
- En maintenant fermement la plaque, régler l'agitateur à **1200 RPM** pendant **1 minute** pour remettre les billes en suspension.
- Rajouter **50µl**/puits de tampon de lecture pour obtenir un volume final de **100µl**/puits.
- Ouvrir la trappe à partir du logiciel grâce à la touche « eject/retract »
- Enlever le couvercle et placer la plaque sur le support du MagPix et cliquer sur « eject/retract » pour fermer la trappe
- Ouvrir la batch le sélectionnant et en cliquant sur Edit
- Cliquer sur le bouton « **START** », et valider pour que la lecture de la plaque démarre

La lecture d'une plaque de 96 puits peut durer environ 60 minutes. La procédure Post batch routine se déclenche automatiquement à la fin de la plaque.

6 Récupération et validation des résultats

A la fin de la lecture une fois la procédure post batch routine terminer dans l'onglet « result » exporter les résultats au format CSV (.csv).

Ce fichier est à conserver tel quel et doit être sauvegarder dans un dossier résultats sur l'ordinateur du MagPix.

Utiliser une clé USB pour transférer une copie de ce fichier sur un autre ordinateur pour l'analyser.

Pour la validation de la plaque il faut vérifier plusieurs indicateurs :

- La cohérence des valeurs obtenues avec les témoins positifs et négatifs avec leurs valeurs de références
- Le nombre de billes uniques analysé pour chaque couleur de billes (chaque antigène) dans chaque puit (Count). Une erreur remonte si un count est inférieur à 50. Les résultats d'un échantillon qui présente au moins un count inférieur à 25 ne seront pas utilisable est l'échantillon sera à repasser.

Après validation de la plaque il est possible d'intégrer les résultats obtenus en Net MFI dans un fichier résultats global (base de données)

7 Arrêt du MagPix:

Dans l'onglet AutoMaint sélectionner « **shut down** »

- Remplir le réservoir avec l'eau mQ et de la javel diluée à 10% dans les emplacements indiqués sur l'écran.
- Ouvrir la trappe à partir du logiciel grâce à la touche « eject/retract »
- Placer le réservoir et la barrette et cliquer sur « eject/retract » pour fermer la trappe.
- Cliquer sur « Start » pour lancer le shut down qui dure environ 5 minutes.

- Eteindre l'appareil via le logiciel puis se dé-identifier
- Fermer le logiciel Xponent en cliquant sur Exit
- Mettre l'interrupteur à l'arrière de l'appareil sur off
- Eteindre l'ordinateur

Multiplex Immunoassay Luminex® Coronavirus	
GOALS	Instructions for performing the multiplex serological test using xMAP MagPix® (Luminex®) technology
STAFF INVOLVED	Technicians Researchers
DOCUMENTATION AND REFERENCES	Multiplex detection and dynamics of IgG antibodies to SARS-CoV2 and the highly pathogenic human Coronaviruses SARS-CoV and MERS-CoV Ayoub A et al. 2020.
EDITED BY	Guillaume Thaurignac and Antoine Nkuba Signature : Date :
APPROVED BY	Martine Peeters et Ahidjo Ayoub Signature : Date :

I. DEFINITION

Luminex®: this is a generic term designating a luminometer allowing the demonstration of an interaction between ligands (antigen-antibody, primer-target, hormone-receptor, etc.).

BSA : Bovine Serum Albumin

PBS : Phosphate Buffered Saline

FBS : foetal bovine sera

II. PRINCIPLE

Luminex® technology works according to the combined principles of ELISA and flow cytometry through the use of fluorescent beads. With the MagPix up to 50 interactions can be studied simultaneously. The beads each have a different color to identify the antigen to which they have been coupled. It is a biotinylated secondary antibody (directed against human IgG for example) which, combined with streptavidin coupled to Phycoerythrin (SAPE), makes it possible to quantify the presence or absence of interaction by an MFI value (Median Fluorescence Intensity).

III. INSTRUCTIONS AND PROCEDURES

1. Security Procedures

All biological material should be considered potentially infectious. Therefore, wearing gloves and a lab coat is mandatory during handling.

2. Materials et équipement

A part of the manipulations are sensitive to light, a dark or light-controlled room is necessary.

Materials et reactive

- A complete **xMap** system : The **MagPix** and it computer with Xponent installed
- Manual magnetic washer for 96 well plate
- Tablet of 1X PBS
- Tween-20 (polyoxysorbitane monolaurate)
- BSA (SIGMA : A7906)
- Foetal bovine sera (inactivated 30 min 56°C), Gibco
- Biotin Mouse anti-human IgG (BD pharmigen réf. 555785)
- [Biotin goat anti-bat IgG H/L \(Bethyl A140-118B\)](#)
- [Biotin goat anti-mouse IgG Y-chain specific \(Sigma B7022\)](#)
- [Biotin goat anti-rat IgG \(whole molecule\) \(Sigma B7139\)](#)
- Streptavidin-R-phycoerythrin (SAPE) (Fisher Scientific/Life technologies)
- NaH₂PO₄ (powder)
- Na₂HPO₄ (powder)
- Na Cl (powder)
- 96 well plate with flat bottom, Greiner (réf. 655906) with lid
- Reagent reservoirs
- Vortex

- Plate Agitator
- Pipets (P10, P100-P200, P1000) and without filter compatible tips
- Multichannel Pipets 30 – 300 μ L (8 and/or 12 Channel)
- Tube 5mL for mixes preparation
- Tube 1,4mL (micronic) for dilutions with compatible racks
- MagPix calibration kit
- MagPix performance verification kit
- MagPix Drive fluid
- Magnetic bead coupled with antigen
(Avoid expose them to light)
- Isopropanol 70%
- Soude 0.1N
- Bleash
- Refrigerator and freezer
- Magnetic stirrer and bar magnet
- Glass bottle 0.5L, 1L et 2L
- A source of clean water is necessary (distillator, osmosis system)
- Personal protective equipment (gloves, lab coat)
- Ethanol 70% (for cleaning surface)
- heating block or / and laboratory oven
- Microtube 1.5mL and 2mL (and compatible cryoboxe)

Panel of antigens:

Recombinant Protein	supplier	references	Quantities to make a coupling for 6 plaque
NCP-CoV(2019-nCoV) nucleocapsid prot (His tag)	sino Biological	40588-V08B	2µg
SARS-CoV-2(2019-nCoV) Spike protein (RDFB, His tag)	sino Biological	40592-V08B	1µg
SARS-CoV Nucleoprotéin /NP protein (His Tag)	sino Biological	40143-V08B	2µg
SARS-CoV Spike protein (RDFB, His tag)	sino Biological	40150-V08B2	1µg
MERS-CoV Nucleoprotéin /NP protein (His Tag)	sino Biological	40068-V08B	2µg
MERS-CoV Spike/S1 protein (His Tag)	sino Biological	40069-V08B1	1µg
Human coronavirus (HCoV-229E) Spike/S1 protein (S1 Subunit His Tag)	sino Biological	40601-V08H	1µg
Human coronavirus HKU1 (isolate N5) (HCoV-HKU1) Spike/S1 protein (S1 Subunit His Tag)	sino Biological	40602-V08H	1µg
Human coronavirus (HCoV-OC43) Spike protein (S1ECD,His Tag)	sino Biological	4067-V08H1	1µg
Human coronavirus (HCoV-NL63) Spike protein (S1 Subunit His Tag)	sino Biological	40600-V08H	1µg
Recombinant human coronavirus 229E Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-EP322753HIT	2µg
Recombinant human coronavirus HKU1 Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-EP607323HIW	2µg
Recombinant human coronavirus OC43 Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-EP333798HIW	2µg
Recombinant human coronavirus NL63 Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-EP744150HIX	2µg
Recombinant Bat coronavirus 133/2005 Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-BP605318BFA	2µg
Recombinant Bat coronavirus 133/2005 Spikevglycoprotein (S),partial	Cusabio	CSB-BP610383BFA	1µg
Recombinant Bat coronavirus HKU3 Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-BP664686BFD	2µg
Recombinant Bat coronavirus HKU3 Spikevglycoprotein (S),partial	Cusabio	CSB-BP663395BFD	1µg
Recombinant Bat coronavirus HKU9 Nucleoprotein(N)	Cusabio	CSB-BP385259BOV	2µg
Recombinant Bat coronavirus HKU9 Spikevglycoprotein (S),partial	Cusabio	CSB-BP385258BOV	1µg
SARS COV 2 Omicron B.1.1.529 NCP (sinobiological)	sino Biological	40588 v07e34	2µg
SARS COV 2 Omicron B.1.1.529 Spike S1 (Acrobiosystem)	Acrobiosystem	S1N-C52Ha	1µg

3. Procedures

3.1 Buffer preparation

Record the product name and preparation date of each buffer.

- Hypertonic PBS: example for 1 L
NaH₂PO₄= 0,8g
Na₂HPO₄= 2,5g
Na Cl= 88g
Qsp 1L DIH₂O
Store at +4°C.
- 1X PBS: Put 1 tablet in DIH₂O. (respect supplier recommendation)
Store at +4°C.
- Reading buffer: PBS 1X + 1% BSA
Store at +4°C.
- Dilution buffer: (Store at +4°C):
50% hypertonic PBS
1% BSA
5% inactivated FBS (incubate 56°C for 30min)
0.2% Tween-20
Qsp DIH₂O

3.2 Process

3.2.1 Sample preparation

The samples to be tested with Luminex must not present any infectious risk. Before any reading, they must be inactivated in the BSL3 laboratory according to the required health and safety rules.

- if necessary, aliquot in a biosafety atmosphere.

For plasma, 50µL is a good volume for performing several multiplex immunoassays.

- Inactivate **30min to 56°C in heating block** or 1H in a 56°C laboratory oven

After inactivation store aliquot to -20°C

3.2.1 Multiplex Immunoassay with Luminex MagPix

This procedure includes an overnight incubation and therefore takes place over two days.

3.2.1.1 Day 1

1 Sample dilution

Dilutions are carried out in 1.4mL tubes. First of all, it is therefore necessary to prepare a rack with as many 1.4mL tubes as samples to be tested. During this step, the plan of the plate should be produced, which remains identical until the end of the manipulation.

For any reading, remember to include positive controls and controls that will cover the recombinant protein panels used as much as possible and to provide a blank well (buffers alone).

a) Dilution of human plasma and sera

Human plasma/sera samples are tested diluted **1:200** in sample dilution buffer.

b) Dilution of the eluates (or recovery) of human DBS

On the same principle as above, dilute the DBS eluates to **1/200** in dilution buffer. The DBS eluates are already diluted to 1/40 after elution so only a 1/5 dilution is necessary

NB - We advise depositing 25µL of eluate in 100µL of dilution buffer.

c) Dilution of bat and rodent plasma and sera

*bat plasma/sera samples are tested diluted **1:400** in sample dilution buffer.
rodent plasma/sera samples are tested diluted **1:400** in sample dilution buffer.*

d) Dilution of the eluates (or recovery) of bat and rodent DBS

On the same principle as above, dilute the bat's DBS eluates to 1/400 in dilution buffer. The bat DBS eluates are already diluted to 1/50 after elution so only a 1/8 dilution is necessary

NB - We advise depositing 15µL of eluate in 105µL of dilution buffer.

For rodent dilute the DBS eluates to 1/400 in dilution buffer. The rodent DBS eluates are already diluted to 1/50 after elution so only a 1/8 dilution is necessary

NB - We advise depositing 15µL of eluate in 105µL of dilution buffer.

2 Beads mix preparation

For each of the antigens (and therefore each color of beads (# Number), between 5000 and 8000 beads are required per well. This corresponds to 0.25 µL of each paired bead per well, all in a final volume of 50 µL per well.

For example, if 22 different recombinant proteins have been successfully coupled, the volume of the bead mix for one well will be $22 \times 0.25 = 5.5 \mu\text{L}$ for one well, which will be completed with 44.5 µL of dilution buffer.

Then calculate the volume to be pipetted for the number of wells to be made, including a margin.

For example, for a plate (96 wells) it is necessary to prepare a mix for 100 wells.

For 100 wells, 25 µL of each paired bead must be deposited per well, all in a final volume of 5000 µl qsp of dilution buffer.

Thus, if 22 different recombinant proteins have been successfully coupled, the volume of the mix of beads for a 96-well plate will be $22 \times 25 \mu\text{L} = 550 \mu\text{L}$ which will be completed with 4450 µL of dilution buffer.

To prepare the mix of beads, Vortex the vials of coupled beads for 30 sec. Take the required volume of each bead and place them in the sample dilution buffer then Vortex for 30 sec.

Wrap the mix tube in aluminum to protect it from light. The mix, if prepared in advance, can be kept for a maximum of 2 hours at 4°C away from light.

3 Deposit of beads mix and sample dilution

Beforehand, place the plate shaker at 4°C (cold rooms / refrigerator).

Once the sample dilutions and bead mix are ready, take a 96 plate for Luminex® with flat bottom wells.

- Identify and mark the plate.
- Vortex the Mix of Marbles for 30 sec and pour it into a tank (provided for this purpose only)
- Add 50µl of bead mix/well to all wells with a multichannel pipette

- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion

- Distribute 100 µl/well of diluted samples by mixing by aspiration/discharge with the multichannel pipette or 100 µl of buffer for the blank well.

- Replace the plastic lid on the plate and cover it with aluminum foil. Place it on the stirrer which has been placed at 4°C.
- Set the agitator to 400rpm.

- Leave to incubate for at least 16 hours (overnight) at 4°C (cold room).

3.2.1.2 Day 2

The next morning take out the buffer at room temperature.

1 Getting Started the MagPix

- Put the switch on the back of the device to ON
- Switch on the computer and the MagPix (button on the front)
- Launch the Xponent application (shortcut on the desktop) and identify yourself.
- In the AutoMaint tab select Fluidics Prep
- Fill the tank with 70% Isopropanol in the locations indicated on the screen by the AF zone.
- Click on "Start" to launch the "Fluidics Prep" which lasts approximately 2 minutes.

2 Washing and depositing the anti IgG conjugate

Biotin anti-human IgG-gamma chain specific (500µg/mL) is used at **4µg/mL** (for a final volume of 50µL of conjugate solution/well).

For bat, the secondary antibody is used at 0.1µg/mL (for a final volume of 50µL of conjugate solution/well).

For rodent use a mix of two secondary antibody (anti Rat and anti-Mouse). Mix rat and mouse secondary antibody as a mix. Twice have a final dilution fixed at 1/4000(for a final volume of 50µL of conjugate solution/well).

- Prepare the final conjugate solution in dilution buffer.
- Remove the stirrer plate and remove the aluminum (place the stirrer at room temperature)
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Outside the support, add 150µL/well of dilution buffer (Washing 1/3)
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Outside the support, add 100µL/well of dilution buffer (2/3 wash)
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Outside the support, add 100µL/well of dilution buffer (3/3 wash)
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Off the support, deposit 50µL/well of the final conjugate solution
- Replace the plastic lid on the plate and place it on the stirrer and cover it with aluminum foil.
- Holding the plate firmly, set the stirrer at 1200 RPM for 1 minute to resuspend the beads.
- Reduce the stirrer speed to 400 RPM and incubate for **30 minutes at room temperature.**

3 Performance verification, Calibration and Batch creation

These steps are to be carried out during the 30-minute incubation.

- **MagPix Calibration should be performed weekly when the MagPix is in use.**

- In the AutoMaint tab select Calibration Verification
- Fill the tank with 70% Isopropanol in the locations indicated on the screen by the AF zone.
- Vortex for 30s the 3 vials of beads from the verification kit and the vial from the calibration kit
- Add 5 to 6 drops of beads of each color in the wells of the bar indicated on the screen
- Open the hatch from the software using the "eject/retract" button
- Place the tank and the bar and click again on "eject/retract" to close the hatch.
- Click on "Start" to launch the "Calibration Verification" which lasts about 12 minutes.

NB - This procedure includes checking the performance of the MagPix.

- **The MagPix Performance verification should be performed daily when the Magpix is in use**

- In the AutoMaint tab select the Performance Verification
- Fill the tank with 70% Isopropanol in the location indicated on the screen by the AF zone.
- Vortex for 30s the 3 vials of beads from the verification kit
- Add 5 to 6 drops of beads of each color in the wells of the bar indicated on the screen
- Open the hatch from the software using the "eject/retract" button
- Place the tank and the bar and click again on "eject/retract" to close the hatch.
- Click on "Start" to launch the "Performance Verification" which lasts about 5 minutes.

- **batch preparation (with an existing protocol)**

- in the batches tab click on "new batch from an existing protocol" and select "PanCoV protocol".
- Set the plate format (position of blank and samples)
- Import the plate plan (linear .txt format) and complete the dilution column
- In the "post batch routine" pane, select the "post batch routine" command.
- Fill the tank with distilled water, 70% Isopropanol and 0.1N soda (NaOH) in the locations indicated on the screen.
- Open the hatch from the software using the "eject/retract" button
- Place the tank and the bar and click again on "eject/retract" to close the hatch.
- Save the batch which then appears as pending (Pending)

2 Washing and depositing the Streptavidin-PE (SAPE)

Streptavidin-PE (1mg/mL) is used at **1µg/mL final** (for a final volume of 50µL of solution/well).

Example for a plate: you need 100 wells x 50µL of solution at 1µg/ml = 5 ml of conjugate solution at 1µg/ml final (i.e. 5 µL of Streptavidin-PE at 1mg/ml) in 4995µL of dilution buffer)

After the incubation with the conjugate:

- Prepare the Streptavidin-PE solution at 1 µg/mL final in dilution buffer
- Cover the tube of diluted Streptavidin-PE with aluminum to protect it from light.
- Remove the agitator plate and remove the aluminum
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Outside the support, add 150µL/well of dilution buffer (Washing 1/3)
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Outside the support, add 100µL/well of dilution buffer (2/3 wash)
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Outside the support, add 100µL/well of dilution buffer (3/3 wash)
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Off the support, deposit 50µL/well of the Streptavidin-PE solution at 1 µg/mL final
- Replace the plastic lid on the plate and place it on the stirrer and cover it with aluminum foil.
- Holding the plate firmly, set the stirrer at 1200 RPM for 1 minute to resuspend the beads.
- Reduce the stirrer speed to 400 RPM and incubate for 10 minutes at room temperature.

3 Finals wash and plate preparation for reading

After the incubation with the Streptavidin-PE:

- Remove the agitator plate and remove the aluminum
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Out of support, deposit 150µL/well of **reading buffer (Washing 1/3)**
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Out of support, deposit 100µL/well of **reading buffer (Washing 2/3)**
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Out of support, deposit 100µL/well of **reading buffer (Washing 3/3)**
- Place the plate on the magnetic support for 2 min and wash by inversion
- Excluding support, deposit 50µL/well of reading buffer
- Replace the plastic lid on the plate and place it on the stirrer and cover it with aluminum foil.
- Holding the plate firmly, set the stirrer at 1200 RPM for 1 minute to resuspend the beads.
- Add 50µl/well of reading buffer to obtain a final volume of 100µl/well.
- Open the hatch from the software using the "eject/retract" button
- Remove the cover and place the plate on the MagPix support and click again on "eject/retract" to close the hatch
- Open the batch selecting it and clicking on Edit
- Click on the "START" button, and validate so that the reading of the plate starts

Reading a 96-well plate can take approximately 60 minutes. The Post batch routine is triggered automatically at the end of the plate.

4 Result exportation and validation

At the end of the reading, once the post batch routine procedure is finished in the "result" tab, export the results in CSV format (.csv).

This file should be kept as is and should be saved in a results folder on the MagPix computer.

Use a USB flash drive to transfer a copy of this file to another computer for analysis.

For the validation of the plate, several indicators must be checked:

- The consistency of the values obtained with the positive and negative controls with their reference values
- The number of unique beads analyzed for each color of beads (each antigen) in each well (Count). An error is raised if a count is less than 50. The results of a sample that has at least a count less than 25 will not be usable and the sample will have to be ironed.

After validation of the plate, it is possible to integrate the results obtained in Net MFI into a global results file (database)

5 MagPix shut down

In the AutoMaint tab select "shut down"

- Fill the tank with mQ water and bleach diluted at 10% in the places indicated on the screen.
- Open the hatch from the software using the "eject/retract" button
- Place the tank and the bar and click again on "eject/retract" to close the hatch.
- Click on "Start" to launch the shutdown which lasts about 5 minutes.

- Turn off the device via the software then de-identify
- Close the Xponent software by clicking on Exit
- Set the switch on the back of the device to off
- Turn off the computer