

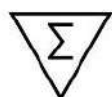


EurobioPlex

Leptospire

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

REF **EBX-005A**
 EBX-005-48
 EBX-005-24



96/48/24 réactions



Validé sur :

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) avec analyse sur CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)
- LightCycler®480 Instrument II (Roche) avec analyse sur LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- T-COR 8™-IVD (Tetracore Inc.) avec T-COR 8 SmartCT™ (auto v1) software



Notice d'utilisation

Disponible sur www.eurobio-scientific.com

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

Notice d'utilisation EurobioPlex Leptospire

Table des matières

1. INFORMATIONS GENERALES	3
2. DESTINATION DU DISPOSITIF	5
3. SYMBOLES.....	6
4. PRINCIPE	7
5. COMPOSANTS DU KIT	8
6. CONSERVATION ET STOCKAGE	8
7. MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI :	8
8. INSTRUMENT DE PCR EN TEMPS REEL	9
9. MISE EN GARDE ET PRECAUTIONS.....	9
10. PROTOCOLE.....	10
I. COLLECTE DES ECHANTILLONS.....	10
II. EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES	10
III. REALISATION DE LA RT-PCR EN TEMPS REEL	10
IV. PROCEDURE DETAILLEE	12
11. VALIDATION DE L'EXPERIMENTATION.....	13
12. ANALYSE DES DONNEES ET INTERPRETATION	14
13. ANALYSE DES PERFORMANCES	15
14. PARTICULARITES LIEES A L'INSTRUMENT DE PCR EN TEMPS REEL T-COR 8TM-IVD	16
15. CONTROLE QUALITE	23
16. BIBLIOGRAPHIE.....	23
17. ELIMINATION DES DECHETS.....	24
18. DECLARATION D'INCIDENT	24
19. ASSISTANCE TECHNIQUE.....	24

1. INFORMATIONS GENERALES

Les leptospiroses parfois appelées « *maladie du rat* » sont des maladies infectieuses d'origine bactérienne, dues à des leptospires. Les leptospires sont un groupe de bactéries souvent regroupées dans l'espèce *Leptospira interrogans*. Cette maladie est ubiquitaire. Il a récemment été constaté une forte augmentation du nombre de cas signalés. En tant que zoonose, elle touche des animaux vivant à proximité de l'homme tels le rat, ou le cochon. Le leptospire est un pathogène pour l'homme.

Dans la plupart des régions du monde, les micromammifères (rats, souris, etc.) sont présumés en être le réservoir sauvage. Leur urine semble presque toujours la source directe ou indirecte des infections humaines. Mais comme pour l'échinocoque, l'infection naturelle des chiens (*leptospirose canine*) et autres canidés existe aussi, probablement très sous-estimée, et constitue un risque pour les êtres humains. La leptospirose sévit dans différentes parties du monde, à l'île de la Réunion, Wallis et Futuna, aux Antilles, en Guyane, dans les pays tropicaux, l'Asie du sud-est, Cambodge, Vietnam, Laos. Le leptospire a même été détecté en Poitou Charente, dans le sud et sud-ouest de la France près d'élevage porcins en région humide.

Un large polymorphisme de symptômes non-spécifiques, et la diversité des organes touchés, rendent le diagnostic clinique très difficile. De plus, il existe des formes aiguës, subaiguës et chroniques de la maladie qui évoluent très différemment dans le temps, selon les individus infectés, et selon les sérovars (éventuellement nouveaux ou émergents), et qui peuvent être atténués par la vaccination. Il existe de nombreux sérovars (icterohaemorrhagiae, canicola, pomona, par exemple) qui ne présentent pas de signature antigénique homogène, ce qui rend difficile la conception de vaccins efficaces. Le test de PCR en temps réel présente un intérêt pour étudier l'épidémiologie de la leptospirose.

La leptospirose se manifeste sous des formes variées, qui rendent son diagnostic difficile car elle peut être confondue avec une forte grippe (forte fièvre et courbatures). Elle peut commencer par des douleurs diffuses, ou localisées (ex : douleurs méningées) qui, si elles ne sont pas diagnostiquées à temps, conduisent à une divagation de la parole et du raisonnement (à cause du taux élevé d'urée qui augmente dans le sang en raison de l'insuffisance rénale). Dans certains cas, elle est accompagnée de jaunisse (environ 40 % des cas dans les tranchées lors de la première guerre mondiale) et/ou néphrite. Après dialyse et antibiotiques, le patient récupère en 5 à 6 semaines si la maladie était modérée (bien que des bactéries puissent encore être trouvées dans l'urine du patient plusieurs semaines après la disparition des symptômes). Sinon, la leptospirose peut évoluer vers des hémorragies violentes - parfois létales - ou une maladie grave des reins. Des formes polyviscérales sont possibles sur terrain fragilisé.

D'après les recommandations de l'OMS, la confirmation biologique de la leptospirose, repose soit sur l'isolement de la bactérie, soit sur l'identification de ses acides nucléiques dans les échantillons biologiques, ou encore sur une sérologie positive dans un contexte clinique et épidémiologique évocateur. L'usage de la culture bactérienne est très limité en raison de ses difficultés de réalisation et du temps nécessaire pour la croissance des bactéries.

La sérologie est l'examen le plus utilisé pour poser le diagnostic de leptospirose. Il n'existe pas d'antigène standardisé ni au plan national, ni au plan international pour la détection des anticorps dirigés contre les leptospires.

De nombreux tests de détection de la leptospirose sont proposés ; ils peuvent être regroupés en deux types : les tests de détection directe (identification de la bactérie ou de molécules bactériennes dont l'ADN par PCR en temps réel) et les tests détectant la réponse humorale du patient (tests sérologiques). Le test de micro-agglutination (MAT) est la technique sérologique de référence pour la confirmation de la leptospirose. Le test sérologique est utilisé pour détecter des anticorps de classe IgM soit par ELISA soit sur bandelettes.

Notice d'utilisation EurobioPlex Leptospire

La détection précoce de la leptospirose peut se faire par PCR en temps réel, en général à partir du plasma préparé à partir du sang du patient, qui donne de meilleurs résultats que le sérum. Le moment optimal de prélèvement pour le sang est avant 8 jours de maladie. Il n'y a pas d'intérêt à pratiquer le test PCR en temps réel dans le sang au-delà de 10 jours après le début symptomatologique de la maladie (fin de la période de bactériémie). La Haute Autorité de Santé (HAS) a indiqué que le test PCR simple (non en temps réel) n'a pas d'intérêt dans le diagnostic biologique spécifique de la leptospirose. La HAS estime que la technique de PCR en temps réel est actuellement la plus intéressante pour le diagnostic biologique spécifique précoce de la leptospirose. Elle doit être réservée aux 8 premiers jours après l'apparition de fièvre, réalisée sur un échantillon de sang prélevé, de préférence avant la mise en œuvre de l'antibiothérapie. Du fait de la faible concentration habituelle des leptospires dans le sang, toute PCR en temps réel négative doit donner lieu à une exploration sérologique.

2. DESTINATION DU DISPOSITIF

L'EurobioPlex Leptospire est un test d'amplification par reverse transcription-réaction en chaîne de la polymérase (RT-PCR) en temps réel, conçu pour la détection qualitative de la présence ou l'absence de leptospire par amplification des acides nucléiques de ce pathogène dans un extrait d'acides nucléiques. Le test est indiqué pour poser un diagnostic de présomption d'infection par le leptospire chez l'homme, ou compléter un diagnostic avéré ou indéterminé. L'extrait est le matériel de départ pour le kit EurobioPlex Leptospire.

Ce système a été validé sur les types de prélèvements suivants :

- Plasma
- Serum
- Urine

Le test EurobioPlex Leptospire est un dispositif médical de diagnostic *In Vitro*, il doit être utilisé par du personnel de laboratoire d'analyse de biologie médicale qualifié. Ce dispositif ne doit pas être recyclé après utilisation.

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

3. SYMBOLES



Référence



Numéro de lot



Limite de température



Date d'expiration



Contenu suffisant pour « N » réactions



Fabricant



Date de fabrication



Produit marqué CE



In vitro Diagnostic



Mode d'emploi



Attention



Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé



A conserver à l'abri de la lumière

Notice d'utilisation EurobioPlex Leptospire

4. PRINCIPE

L'EurobioPlex Leptospire est un test d'amplification des acides nucléiques de leptospire, ainsi que d'un contrôle d'extraction et d'inhibition de RT-PCR, encapsidé, qui utilise l'amplification par RT-PCR en temps réel. Le test est réalisé à partir de l'extrait de l'échantillon au moyen d'une réaction unique dans un seul puits/tube.

Le contrôle d'extraction et d'inhibition de RT-PCR (CI-ARN) permet de déterminer de possibles variations pouvant se produire au cours des étapes d'extraction d'ARN et ADN d'échantillons biologiques et d'amplification par PCR en temps réel. Il permet ainsi de s'assurer qu'un résultat négatif ne peut être dû à une mauvaise extraction d'ADN et ARN et/ou à la présence d'inhibiteurs de PCR en trop grande quantité.

Les acides nucléiques de leptospire sont détectés à l'aide d'une sonde marquée TEXAS RED. Le contrôle d'extraction et d'inhibition de RT-PCR est détecté à l'aide d'une sonde marquée Cy5. Au cours de l'élongation du produit d'amplification, les sondes émettent une fluorescence spécifique suite à leur hydrolyse. La mesure des intensités de fluorescence en temps réel est relative à l'accumulation des produits d'amplification spécifiques.

Tableau 1 : Détection des cibles selon les fluorophores

Cible	Fluorophore	Excitation	Emission
Leptospire	Texas Red	485 nm	605 nm
Contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (CI-ARN)	Cy5	647 nm	667 nm

Canaux équivalents sur différents instruments de PCR :

- Canal **Texas Red** (Systèmes ABI, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96™, Systèmes Mx, T-COR 8™-IVD), LC Red 610 (LC480®), Canal Orange (RotorGene)
- Canal **Cy5** (Systèmes ABI, Chromo 4/CFX96™, Systèmes Mx, T-COR 8™-IVD), Canal Alexa647 (SmartCycler II), Canal 660 (LC 480), Canal Red (RotorGene)

Note : Sur LC480 instrument II : Appliquer une compensation de couleur pour les longueurs d'ondes TexasRed-Cy5 (533-610, 618-660).

Notice d'utilisation EurobioPlex Leptospire

5. COMPOSANTS DU KIT

Le kit de RT-PCR en temps réel EurobioPlex Leptospire est prêt à l'emploi pour la détection spécifique du leptospire.

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

Le kit contient les réactifs et les enzymes nécessaires à l'amplification des acides nucléiques de leptospire, et du contrôle d'extraction et d'inhibition de RT-PCR (Tableau 2).

Tableau 2 : Composants du kit

Couleur de Bouchon	Contenu du kit	EBX-005A (96 tests)	EBX-005-48 (48 tests)	EBX-005-24 (24 tests)	Reconstitution
Rouge	Enzymes	2 X 1100µl	1100µl	4 x 130µl	Prêt à l'emploi
Transparent	Oligomix	2 X 400µl	400µl	4 x 50µl	Prêt à l'emploi
Bleu	Eau = contrôle négatif (CN-H2O)	2 x 1 ml	1 ml	1 ml	Prêt à l'emploi
Jaune	Contrôle positif Leptospire (CP)	2 x 150 µl	150 µl	4 x 20 µl	Prêt à l'emploi
Blanc	Contrôle d'extraction et d'inhibition de RT-PCR (CI-ARN)	2 x 650 µl	650 µl	4 x 80 µl	Prêt à l'emploi

6. CONSERVATION ET STOCKAGE

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

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



Plusieurs cycles de congélation / décongélation (>3x) doivent être évités, cela pourrait réduire la sensibilité de l'analyse.

7. MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI :

- Hotte biologique
- Appareil de PCR en temps réel
- Centrifugeuse pour microtubes
- Vortex
- Plaques / tubes pour réaction de PCR en temps réel
- Micropipettes
- Embouts DNase-free et RNase-free à filtre pour micropipettes
- Microtubes stériles
- Gants (sans talc)
- Automate de pipetage type MICROLAB NIMBUS IVD® (Hamilton).

8. INSTRUMENT DE PCR EN TEMPS REEL

Le kit EurobioPlex Leptospire a été développé et validé pour être utilisé avec les instruments de PCR en temps réel suivants :

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) avec analyse sur CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)
- LightCycler®480 Instrument II (Roche) avec analyse sur LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- T-COR 8™-IVD (Tetracore Inc.) avec T-COR 8 SmartCT™ (auto v1) software

9. MISE EN GARDE ET PRECAUTIONS



Lire attentivement ces instructions avant de débiter la procédure.

- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée par des techniciens de laboratoire d'analyse de biologie médicale.
- ◇ S'assurer que les instruments ont été installés, calibrés et maintenus en accord avec les recommandations du fabricant.
- ◇ Il est de la responsabilité de l'utilisateur d'utiliser un autre équipement que ceux validés, et dans ce cas, les performances ne sont pas garanties.
- ◇ Les échantillons cliniques doivent être considérés comme du matériel potentiellement infectieux et doivent être préparés sous une hotte à flux laminaire.
- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée selon les bonnes pratiques de laboratoire.
- ◇ Ne pas utiliser ce kit après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- ◇ Eviter une exposition prolongée à la lumière des réactifs, limitée au temps technique nécessaire à la préparation de la plaque PCR, sans quoi les performances ne sont pas garanties.
- ◇ Le kit est expédié sous carboglace, et les composants du kit doivent arriver congelés. Si un ou plus des composants arrive décongelé, ou si les tubes ont été endommagés pendant le transport, contacter Eurobio Scientific.
- ◇ Une fois les réactifs décongelés, centrifuger brièvement les tubes avant leur utilisation.
- ◇ Il est recommandé de définir trois zones de travail distinctes : 1) Isolation de l'ARN/ADN, 2) Préparation du mélange réactionnel et 3) Amplification / Détection des produits amplifiés.
- ◇ Porter des blouses et des gants (sans talc) distincts dans chaque zone de travail.
- ◇ Les pipettes, les réactifs et autres matériels de travail ne doivent pas circuler entre ces zones.
- ◇ Une attention particulière doit être mise en œuvre pour conserver la pureté des réactifs et des mélanges réactionnels.
- ◇ Des méthodes appropriées de préparation/extraction des acides nucléiques pour une production d'ARN/ADN de qualité et une application de RT-PCR en temps réel doivent être utilisées, notamment afin d'éviter tout risque de contamination avec les RNases/DNases.
- ◇ Utiliser des embouts à filtre pour micropipettes, DNase-free et RNase-free.
- ◇ Ne pas pipeter avec la bouche. Ne pas manger, ni boire ou fumer dans le laboratoire.
- ◇ Ne pas utiliser le dispositif si l'emballage est endommagé.
- ◇ Eviter les aérosols.

Notice d'utilisation EurobioPlex Leptospire

10. PROTOCOLE

I. COLLECTE DES ECHANTILLONS

- ◇ Collecter les échantillons dans des tubes stériles.
- ◇  **L'utilisation d'héparine comme anticoagulant est proscrite.**
- ◇ Il revient à l'utilisateur de maîtriser ses propres conditions de collecte, transport, conservation et extraction des échantillons pour que l'extraction d'ARN/ADN par des systèmes adaptés produise des ARN/ADN de qualité.
- ◇ Il est recommandé que les échantillons soient extraits immédiatement, ou conservés selon les recommandations de stockage des échantillons avant extraction (Tableau 3).

Tableau 3 : recommandations de stockage

Recommandations de stockage maximum des échantillons avant extraction	
Température ambiante	2 h
+4°C	1 semaine
-20°C (de préférence -80°C)	Stockage à long terme

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

II. EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES

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

Dans le kit Leptospire, le CI-ARN sur le canal CY5 peut être ajouté avant l'extraction ou dans la réaction de PCR. Il permet de s'assurer qu'un résultat négatif ne peut être dû à un problème d'extraction ou à la présence d'inhibiteurs de RT-PCR en trop grande quantité pour valider le test. Nous recommandons l'ajout de 10 µl de CI-ARN par extraction et un volume d'élution de 50 µl. Si le CI-ARN n'est rajouté que pour contrôler la RT-PCR, il est ajouté au mélange réactionnel (1 microlitre par réaction de PCR). Voir Protocole de PCR en temps réel pour plus de détails.

Le CI-ARN est également disponible chez Eurobio Scientific (Ref EurobioPlex EBX-003).

III. REALISATION DE LA RT-PCR EN TEMPS REEL

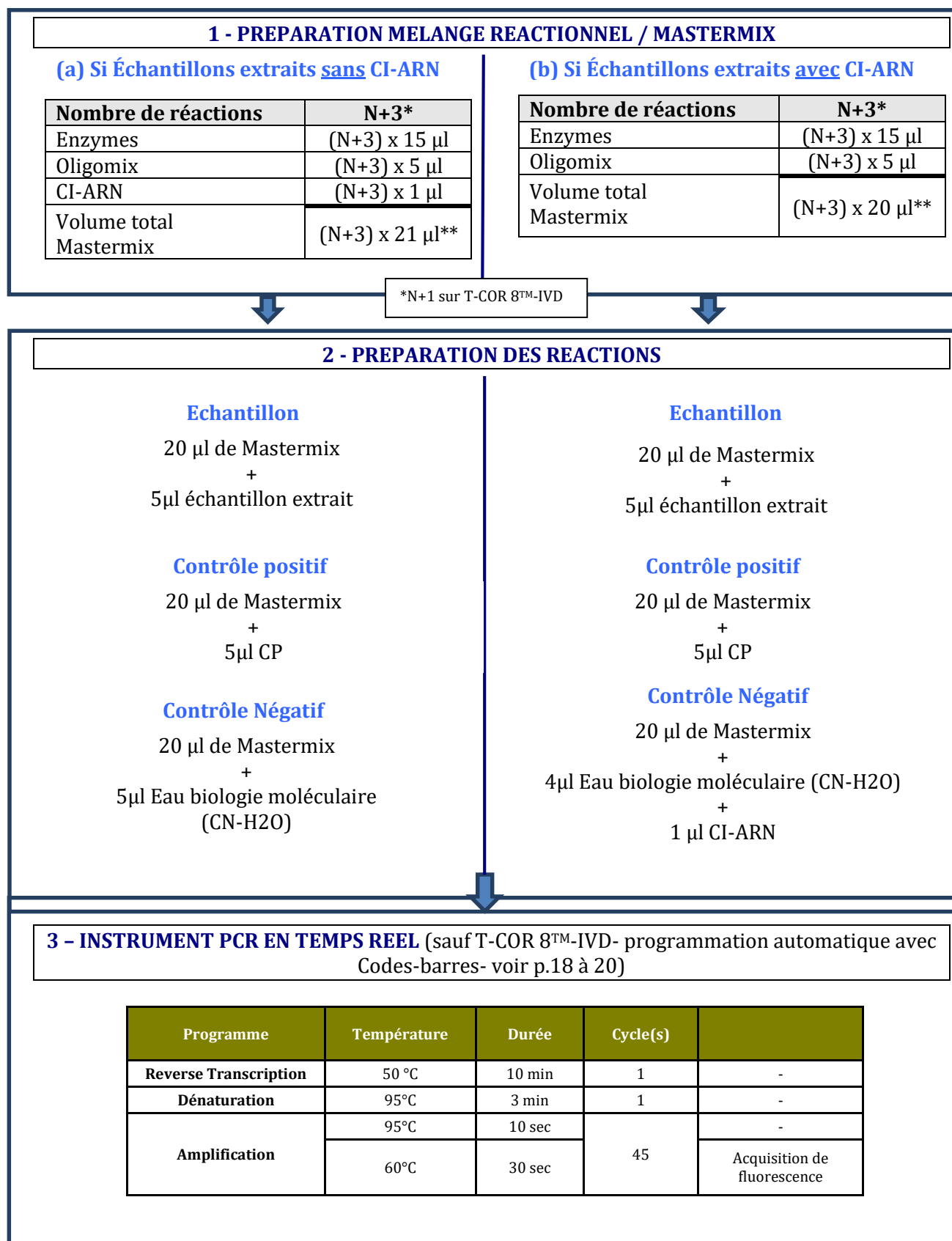
Remarque générale :

Le contrôle positif ainsi que le contrôle d'extraction et d'amplification par RT-PCR (CI-ARN) contiennent des concentrations élevées de matrice. Les manipulations doivent être réalisées précautionneusement pour éviter toute contamination. Pour contrôler le bon fonctionnement de la PCR, il est nécessaire de tester le contrôle positif CP ainsi qu'un contrôle négatif (eau fournie = CN-H₂O + CI-ARN) (voir II-2/6) du protocole de RT-PCR en temps réel).

Sur T-COR 8™-IVD, pour une bonne utilisation du coffret, il est nécessaire que ces contrôles soient réalisés lors de la première utilisation d'un nouveau kit seulement, des contrôles réguliers peuvent être effectués par la suite.

Notice d'utilisation EurobioPlex Leptospire

Schéma de la procédure :



Notice d'utilisation EurobioPlex Leptospire

IV. PROCEDURE DETAILLEE

- 1) Homogénéiser le tube d'Enzymes, et vortexer Oligomix, CP et CI-ARN, puis centrifuger.
- 2) Préparer le Mastermix comme ci-dessous, N étant le nombre de réactions (incluant les contrôles positif et négatif), prévoir la quantité de Mastermix pour N+3 réactions minimum* (se référer à la partie 1-a ou 1-b du schéma précédent selon le cas).

Cas (a) : Extraction de l'échantillon SANS ajout de CI-ARN

Nombre de Réaction(s)	1	N+3*
Enzymes	15 µl	(N+3) x 15 µl
Oligomix	5 µl	(N+3) x 5 µl
CI-ARN	1 µl	(N+3) x 1 µl
Volume total Mastermix	21 µl**	(N+3) x 21 µl

Cas (b) : Extraction de l'échantillon AVEC ajout de CI-ARN

Nombre de Réaction(s)	1	N+3*
Enzymes	15 µl	(N+3) x 15 µl
Oligomix	5 µl	(N+3) x 5 µl
Volume total Mastermix	20 µl**	(N+3) x 20 µl

* Pour une utilisation sur T-COR 8™-IVD, nous recommandons de faire un Mastermix pour N+1 réactions pour une utilisation au coup par coup du kit.

**La différence de volume réactionnel entre le cas (a) et le cas (b) est négligeable et n'a pas d'effet sur les performances.

- 3) Homogénéiser le Mastermix préparé en 2) et centrifuger brièvement.
- 4) Distribuer 20 µL du Mastermix** à l'aide d'une micropipette et d'embouts à filtre dans chaque tube/puits de microplaque pour PCR en temps réel.
- 5) Ajouter 5 µL des échantillons extraits
- 6) En parallèle réaliser les contrôles suivants (voir ce point spécifique pour T-COR 8™-IVD pages 14 à 17) :
 - Contrôle positif : 20 µL de Mastermix + 5 µL de contrôle positif CP
 - Contrôle négatif :
 - Cas (a) Extraction de l'échantillon SANS ajout de CI-ARN :
20µl de Mastermix + 5µl d'eau fournie (CN-H2O)
 - Cas (b) Extraction de l'échantillon AVEC ajout de CI-ARN :
20µl de Mastermix + 4µl d'eau fournie (CN-H2O) + 1µl de CI-ARN
- 7) Fermer immédiatement les tubes ou la plaque avec un film adhésif pour éviter toute contamination.
- 8) Centrifuger brièvement pour collecter le mélange réactionnel au fond des tubes ou des puits de microplaque.
- 9) Réaliser le programme suivant sur l'instrument de PCR en temps réel (sur T-COR 8™-IVD aucune programmation manuelle n'est nécessaire grâce aux Codes-barres- voir pages 18 à 20). Le programme dure environ 1h15.

Programme	Température	Durée	Cycle(s)	
Reverse Transcription	50 °C	10 min	1	-
Dénaturation	95°C	3 min	1	-
Amplification	95°C	10 sec	45	-
	60°C	30 sec		Acquisition de fluorescence

Notice d'utilisation EurobioPlex Leptospire

Note 1 : Sur LightCycler® 480 (Roche), deux systèmes optiques existent : seul le « System II » est compatible avec l'utilisation du kit. Appliquer une compensation de couleur pour les longueurs d'ondes Texas Red-Cy5 (533-610,618-660).

Note 2 : Pour les appareils de la gamme Applied Biosystems, sélectionner « NONE » dans « PASSIVE REFERENCE ».

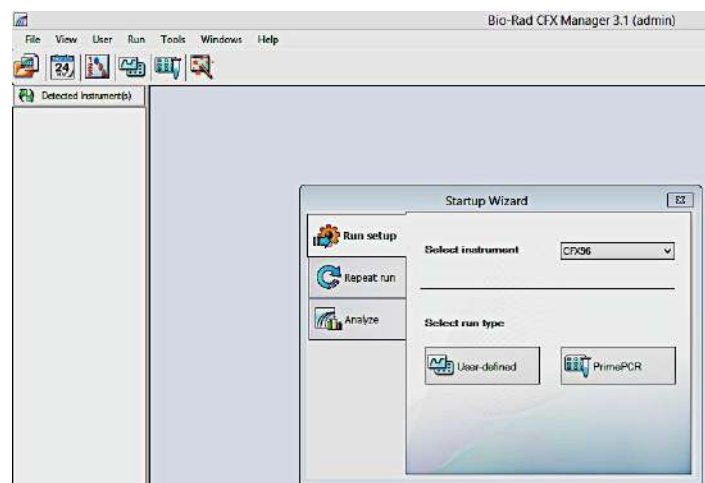
Note 3 : Sur Rotorgene™, calibrer le signal en cliquant sur « GAIN OPTIMISATION ».

Note 4 : Sur CFX96™ (Bio-Rad), lancer le run à partir de la version 1.6 ou postérieure, puis analyser avec la version 3.1 (voir § Validation de l'expérimentation).

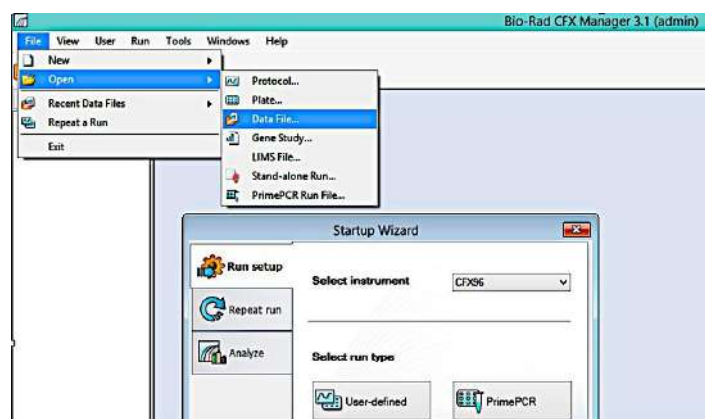
11. VALIDATION DE L'EXPERIMENTATION

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

Si le run a été lancé avec le logiciel CFX Manager v1.6 par exemple, pour ouvrir un fichier de data avec le logiciel CFX Manager v3.1, cliquer sur l'icône CFX Manager v3.1. L'écran d'accueil apparaît.



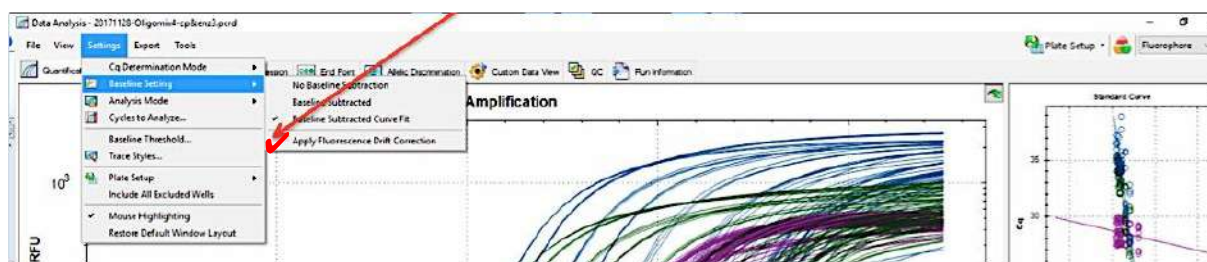
- Cliquer sur File et sélectionner Open puis Data File.



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

Notice d'utilisation EurobioPlex Leptospire

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



Une fois cette étape réalisée, l'analyse peut débuter.

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

Sur T-COR 8™-IVD, pour une bonne utilisation du coffret, il est nécessaire que ces contrôles soient réalisés lors de la première utilisation d'un nouveau kit seulement, des contrôles réguliers peuvent être effectués par la suite.

Tableau 4 :

Contrôle positif	
TEXAS RED	Ct < 27
Contrôle Négatif	
TEXAS RED	Ct non déterminé
CY5	Ct ≤ 45

Sur T-COR 8™-IVD, l'interprétation est automatiquement générée avec les codes-barres

12. ANALYSE DES DONNEES ET INTERPRETATION

Pour les échantillons cliniques, les résultats suivants sont possibles :



***Seuil de Ct pour positivité des échantillons :
Canal TEXAS RED Leptospire: + Positif => Ct ≤ 45**

Signal PCR		Validité du test/commentaire	
TEXAS RED	CY5	Leptospire	
+	+	Positif	Valide
-	+	Négatif	Valide
+	-	Positif	Possible inhibition d'extraction ou de RT-PCR qui n'empêche pas la détection de la bactérie; valide
-	-	Non interprétable	Problème d'extraction ou d'inhibition de RT-PCR - diluer 5 x l'échantillon ; si même résultat ré-extraire l'échantillon

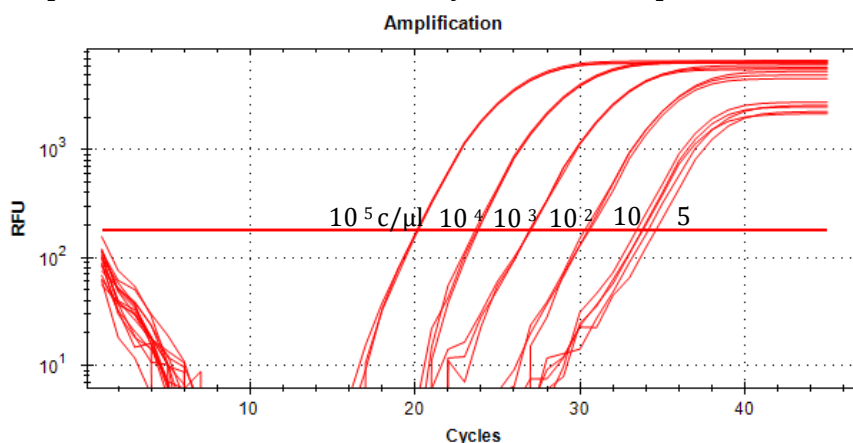
Notice d'utilisation EurobioPlex Leptospire

13. ANALYSE DES PERFORMANCES

Limite de détection/sensibilité analytique :

5 copies CP/μl (1 copie de leptospire= 5 équivalents copies génome (Bourhy et al. 2011)).
Sur la souche bactérienne *Leptospire interrogans* : 100 bactéries/ml dans le plasma
250 bactéries/ml dans le serum, et à 500 bactéries/ml dans l'urine.

Exemple d'expérience réalisée sur thermocycleur PCR temps réel CFX96™ (Bio-Rad) :



Reproductibilité du signal sur le canal de Leptospire (Texas Red)

Reproductibilité	Coefficient de Variation (%) sur le Contrôle positif	Coefficient de Variation (%) sur ARN
Intra-run	1,35	2,44
Inter-runs	5,15	2,04
Inter-lots	1,83	2,45

Spécificité : > 99 %

La spécificité a été évaluée sur un total de 98 échantillons extraits pre-testés et confirmés négatifs pour la leptospire. 45 de ces échantillons étaient connus pour être positifs pour :

- *Neisseria meningitidis* (n=5)
- *Streptococcus pneumoniae* (n=5)
- *Haemophilus influenzae b* (n=1)
- *Pseudomonas aeruginosa* (n=4)
- *Streptococcus agalactiae* (n=1)
- *Escherichia coli* (n=4)
- *Legionella pneumophila* (n=1)
- *Bartonella* (n=5)
- *Coxiella* (n=3)
- *Staphylococcus aureus* (n=1)
- *Mycobacterium avium* (n=1)
- *Staphylococcus oralis/mitis/sanguis* (n=1)
- *Francisella tularensis* (n=1)
- *Klebsiella kingae* (n=2)

Notice d'utilisation EurobioPlex Leptospire

- *Tropheryma whipplei* (n=1)
- *Chikungunya* (n=1)
- Dengue (n=1 Dengue 1+ n=1 Dengue 2+ n=1 Dengue 3+ n=1 Dengue 4+ n=3 de sérotype inconnu)
- Zikavirus (n=1)

Aucune réactivité croisée n'a donc été observée avec ces pathogènes.

Sensibilité : > 99 %

La sensibilité a été évaluée sur un total de 50 échantillons pre-testés et confirmés positifs pour la leptospire, dont 39 plasma issus de sang/EDTA, et 11 urine.

	PCR Eurobio		
	Positif	Négatif	Total
PCR Référence			
Positif	50	0	50
Négatif	0	98	98
Total	50	98	148

La concordance globale est > 99 %.

Les tests ont été réalisés sur CFX96™.

L'extraction a été réalisée avec l'extracteur NucliSENS easyMAG (Biomérieux) en suivant les instructions du fournisseur.

14. PARTICULARITES LIEES A L'INSTRUMENT DE PCR EN TEMPS REEL T-COR 8™-IVD

T-COR 8™-IVD est un instrument de PCR en temps réel avec 8 puits programmables de façon indépendante qui peuvent être utilisés, patient par patient, indépendamment les uns des autres, du point de vue des tests / « Dosage/Assay » réalisés, des programmes thermiques, et du moment du lancement de la PCR.

Les 8 puits peuvent également être utilisés simultanément avec le même « Dosage/Assay ».

Note : Bien mélanger après dépôt de l'échantillon dans le tube avec allers-retours de pipetage, en évitant la formation de bulles et s'assurer que le volume de liquide est bien situé au fond du tube. Bien refermer chaque tube après chaque dépôt du contrôle ou de l'échantillon pour éviter toute contamination.

Contrôles

Sur T-COR 8™-IVD, pour une bonne utilisation du coffret, il est nécessaire que ces contrôles soient réalisés lors de la première utilisation d'un nouveau kit seulement, des contrôles réguliers peuvent être effectués par la suite.

Notice d'utilisation EurobioPlex Leptospire

Par la suite, le contrôle d'inhibition de RT-PCR (CI-ARN) permet de s'assurer qu'au sein de l'échantillon testé, il n'y a pas d'inhibition de la RT-PCR, que l'extraction se soit bien déroulée et que la PCR fonctionne correctement.

Tests patients

<i>Avec validation des contrôles positif et négatif une seule fois lors de la première utilisation</i>	24 réactions
Nombre de tests patients possible patient par patient avec décongélation/congélation 12 fois maximum (3 fois par tubes/4 tubes par réactifs)	12 patients

Fluorophores

Il existe 4 combinaisons de fluorophores disponibles sur le T-COR 8™-IVD.

Pour tous les EBX, dont EBX-005, la combinaison FAM/HEX/Texas Red/Cy5 est celle choisie. Si certains canaux ne sont pas utilisés dans certains kits, ne pas en tenir compte lors de l'analyse des résultats.

Utilisation des Codes-barres (disponibles en pages 18 à 20)

1- Sélectionner Menu > Nouvelle Analyse/New Run

2- Sélectionner Code-barres/Barcode

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

- soit pour le contrôle positif (Code-barres EBX-005 Pos Ctrl),
- soit pour le contrôle négatif (Code-barres EBX-005 Neg Ctrl),
- soit pour un échantillon (Code-barres Assay : EBX-005)

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

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

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

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

7- Sélectionner « Suivant/Next »

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

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

Note: la nomination d'un échantillon ou du run ne peut être modifiée ou ajoutée après la fin du run.

Notice d'utilisation EurobioPlex Leptospire

Elle doit être réalisée avant ou pendant que le run se déroule.

Présentation et Interprétation des résultats

Les résultats de Ct et les courbes d'amplification sont disponibles, à partir du Tableau Valeurs SmartCT™/SmartCT™ Table (valeurs de Ct attribuées sur chaque canal), et des graphes de Ct en fonction des cycles sur chaque canal, les 2 étant visualisables en temps réel sur la machine.

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

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

- « Neg Ctrl Fail » : Non valide
- « Neg Ctrl Valid » : Valide
- « Pos Ctrl Fail » : Non valide
- « Pos Ctrl Valid » : Valide

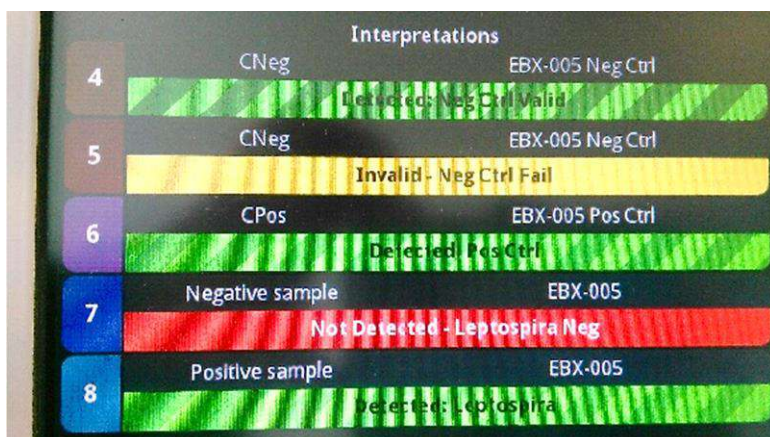
Détermination du statut pour les échantillons :

- « Détecté(e-s)/Detected »: Positif → encadré vert
- « Non détecté/Not detected »: Négatif → encadré rouge
- « Non valide/Invalid » -> retester → encadré orange

Exemple de présentation d'interprétation automatique des résultats sur l'instrument et dans le rapport:

- Exemple pour le contrôle négatif (puits 4) et le contrôle positif (puits 6) valides indiqués « Detected /Détecté(e-s)», pour le contrôle négatif Invalid/Non valide (puits 5), pour un échantillon négatif, indiqué « Not Detected/Non Détecté » (échantillon puits 7) et pour un échantillon positif détecté pour la cible Leptospira indiqué (Detected/Détecté(e-s) Leptospira) (échantillon puits 8):

❖ Sur l'écran de l'instrument :

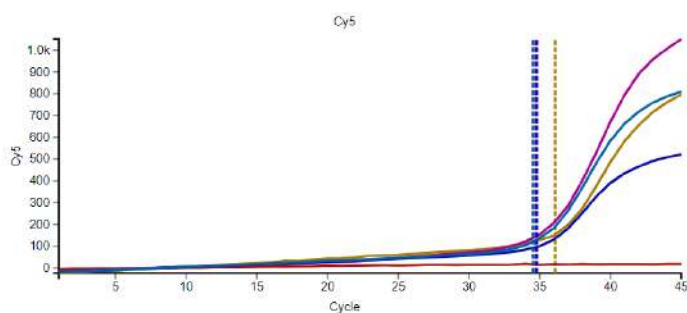
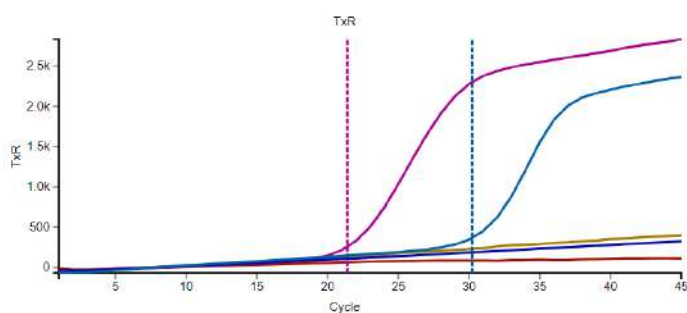


❖ Dans le rapport :

Notice d'utilisation EurobioPlex Leptospire

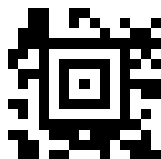
Summary							
Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5	Call
4	CNeg	EBX-005 Neg Ctrl				36.1	Detected • Neg Ctrl Valid
5	CNeg	EBX-005 Neg Ctrl					Invalid
6	CPos	EBX-005 Pos Ctrl			21.4	34.7	Detected • Pos Ctrl
7	Negative sample	EBX-005				34.8	Not Detected
8	Positive sample	EBX-005			30.2	34.5	Detected • Leptospira
							Leptospira Neg

Exemple de courbes d'amplification

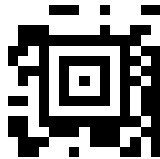


Codes-barres sur T-COR8™-IVD pour EBX-005

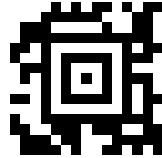
EBX-005 Pos Ctrl
Contrôle Positif CP



EBX-005 Neg Ctrl
Eau = contrôle négatif (CN-H2O)



Assay: EBX-005



15. CONTROLE QUALITE

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

16. BIBLIOGRAPHIE

- Giry C, Roquebert B, Li-Pat-Yuen G, Gasque P, Jaffar-Bandjee M.C. Simultaneous detection of chikungunya virus, dengue virus and human pathogenic *Leptospira* genomes using a multiplex TaqMan® assay. *BMC Microbiol.* 2017;17(1):105.
- Perez J, Goarant C. Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. *BMC Microbiol.* 2010;10:325.
- Goarant C, Laumond-Barny S, Perez J, Vernel-Pauillac F, Chanteau S, Guigon A. Outbreak of leptospirosis in New Caledonia: diagnosis issues and burden of disease. *Trop Med Int Health.* 2009;14(8):926-9.
- Tubiana S, Mikulski M, Becam J, Lacassin F, Lefèvre P, Gourinat AC, Goarant C, D'Ortenzio E. Risk factors and predictors of severe leptospirosis in New Caledonia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(1):e1991.
- van de Werve C, Perignon A, Jauréguiberry S, Bricaire F, Bourhy P, Caumes E. Travel-related leptospirosis: a series of 15 imported cases. *J Travel Med.* 2013;20(4):228-31.
- Hochedez P, Escher M, Decoussy H, Pasgrimaud L, Martinez R, Rosine J, Théodose R, Bourhy P, Picardeau M, Olive C, Ledrans M, Cabie A. Outbreak of leptospirosis among canyoning participants, Martinique, 2011. *Euro Surveill.* 2013;18(18):20472.
- Bourhy P, Herrmann Storck C, Theodose R, Olive C, Nicolas M, Hochedez P, Lamaury I, Zinini F, Brémont S, Landier A, Cassadou S, Rosine J, Picardeau M. Serovar diversity of pathogenic *Leptospira* circulating in the French West Indies. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(3):e2114.
- Bourhy P, Brémont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M. Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *J Clin Microbiol.* 2011;49(6):2154-60.
- Legkoby T, David DJ, Lee Robin SH. Diagnostic biologique de la leptospirose, Avis sur les actes, Haute autorité de santé, service évaluation des actes professionnels, www.has-santé.fr
- Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;249(1):139-47.
- Levett PN. Sequence-based typing of *leptospira*: epidemiology in the genomic era. *PLoS Negl Trop Dis.* 2007;1(2):e120.
- Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol.* 2005 Jan;54(Pt 1):45-9.
- Slack A. Leptospirosis. *Aust Fam Physician.* 2010 Jul;39(7):495-8. Review.

Notice d'utilisation EurobioPlex Leptospire

- Stoddard RA. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through real-time PCR (qPCR) targeting the LipL32 gene. *Methods Mol Biol.* 2013;943:257-66.
- Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu LF, Jiang HQ, Jia J, Tu YF, Jiang JX, Gu WY, Zhang YQ, Cai Z, Sheng HH, Yin HF, Zhang Y, Zhu GF, Wan M, Huang HL, Qian Z, Wang SY, Ma W, Yao ZJ, Shen Y, Qiang BQ, Xia QC, Guo XK, Danchin A, Saint Girons I, Somerville RL, et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature.* 2003;422(6934):888-93.
- Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, Recommandations de bonnes pratiques, www.has-santé.fr

17. ELIMINATION DES DECHETS

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

18. DECLARATION D'INCIDENT

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

19. ASSISTANCE TECHNIQUE

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

Le service clients d'EUROBIO SCIENTIFIC est joignable par voie électronique (mail), à l'adresse adv@eurobio-scientific.com ou par téléphone au +33 (0)1.69.07.94.77.





EurobioPlex *Leptospire*

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

REF **EBX-005A**
 EBX-005-48
 EBX-005-24



96/48/24 reactions



Approved on:

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) with analysis on CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)
- LightCycler®480 Instrument II (Roche) with analysis on LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- T-COR8™-IVD (Tetracore Inc.) with T-COR 8SmartCT™ (auto v1) software



Operating instructions

Available at www.eurobio-scientific.com

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

Instructions for use EurobioPlex Leptospire

Table of contents

1. GENERAL INFORMATION	27
2. PURPOSE OF THE DEVICE	29
3. SYMBOLS.....	30
4. PRINCIPLE.....	31
5. KIT COMPONENTS.....	32
6. CONSERVATION AND STORAGE	32
7. EQUIPMENT REQUIRED NOT PROVIDED:.....	32
8. REAL-TIME PCR INSTRUMENT	33
9. WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	33
10. PROTOCOL.....	34
i. COLLECTION OF SAMPLES.....	34
ii. NUCLEIC ACID EXTRACTION.....	34
iii. PERFORMING REAL-TIME RT-PCR.....	34
iv. DETAILED PROCEDURE.....	36
11. VALIDATION OF THE EXPERIMENT.....	37
12. DATA ANALYSIS AND INTERPRETATION.....	38
13. PERFORMANCE ANALYSIS.....	39
14. SPECIFICITIES OF THE T-COR 8™-IVD REAL-TIME PCR INSTRUMENT	40
15. QUALITY CONTROL	47
16. BIBLIOGRAPHY	47
17. WASTE DISPOSAL	48
18. INCIDENT DECLARATION.....	48
19. TECHNICAL SUPPORT	48

Instructions for use EurobioPlex Leptospire

1. GENERAL INFORMATION

Leptospirosis, sometimes called "*rat fever*", is an infectious disease of bacterial origin, caused by leptospires. Leptospires are a group of bacteria often grouped under the species *Leptospira interrogans*. This disease is ubiquitous. There has recently been a sharp increase in the number of reported cases. As a zoonosis it affects animals living in close proximity to humans, such as rats and pigs. The leptospire is a human pathogen.

In most parts of the world small mammals (rats, mice, etc.) are presumed to be the natural reservoir. Their urine almost always seems to be the direct or indirect source of human infections. But as with echinococcus, the natural infection of dogs (*canine leptospirosis*) and other canids and other canids also exists, probably very underestimated, and constitutes a risk for human beings. Leptospirosis occurs in different parts of the world, in Reunion, Wallis and Futuna Islands, the West Indies, French Guiana, tropical countries, South East Asia, Cambodia, Vietnam and Laos. Leptospires have even been detected in Western France, in the south and south-west of France near pig farms in humid regions.

A wide polymorphism of non-specific symptoms, and the diversity of organs affected, make clinical diagnosis very difficult. In addition, there are acute, sub-acute and chronic forms of the disease which evolve very differently over time, depending on the individuals infected, and on the serovars (possibly new or emerging), and which can be attenuated by vaccination. There are many serovars (e.g., icterohaemorrhagiae, canicola, pomona) that do not have a homogeneous antigenic signature, making it difficult to design effective vaccines. The real-time PCR test is of interest for studying the epidemiology of leptospirosis.

Leptospirosis manifests itself in a variety of forms, which makes its diagnosis difficult because it can be confused with a strong flu (high fever and aches). It may start with spread-out pain or localized pain (e.g., head pain) which, if not diagnosed in time, leads to a loss of speech and reasoning (due to high urea which increases in the blood due to kidney failure). In some cases, it is accompanied by jaundice (about 40% of cases in the trenches during the First World War) and/or nephritis. After dialysis and antibiotics, the patient recovers in 5-6 weeks if the disease was moderate (although bacteria can still be found in the patient's urine several weeks after the symptoms have disappeared). Otherwise, leptospirosis may progress to haemorrhaging haemorrhage - sometimes lethal - or severe kidney disease. Multi-organ forms are possible in weakened patients.

According to WHO recommendations, the biological confirmation of leptospirosis is based on either the isolation of the bacteria or the identification of its nucleic acids in biological samples, or on positive serology in an indicative clinical and epidemiological context. The use of bacterial culture is very limited due to the difficulty of creating it and the time needed for the bacteria to grow.

Serology is the most commonly used test for the diagnosis of leptospirosis. There is no standardised antigen either nationally or internationally for the detection of antibodies to leptospires.

Numerous tests for the detection of leptospirosis are available; they can be grouped into two types: direct detection tests (identification of the bacterium or bacterial molecules including DNA by real-time PCR) and tests detecting the patient's humoral response (serological tests). The microscopic agglutination test (MAT) is the reference serological technique for the confirmation of leptospirosis. The serological test is used to detect IgM class antibodies either by ELISA or on strips.

Early detection of leptospirosis can be done by real-time PCR, usually from plasma prepared from the patient's blood, which gives better results than serum. The optimal time to collect blood is before 8 days of illness. There is no point in performing the real-time PCR test in blood beyond 10 days after the symptomatological onset of the disease (end of the bacteremic period). The French

Instructions for use EurobioPlex Leptospire

National Authority for Health (HAS) has indicated that the simple PCR test (not in real time) is of no interest in the specific biological diagnosis of leptospirosis. The HAS considers that the real-time PCR technique is currently the most interesting for the early specific biological diagnosis of leptospirosis. It should be reserved for the first 8 days after the onset of fever and should be performed on a blood sample taken preferably before the start of antibiotic therapy. Because of the usual low concentration of leptospires in blood, any negative real-time PCR should be investigated serologically.

Instructions for use EurobioPlex Leptospire

2. PURPOSE OF THE DEVICE

The EurobioPlex Leptospire is a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay designed for the qualitative detection of the presence or absence of leptospires by amplification of leptospire nucleic acids in a nucleic acid extract. The test is indicated for making a presumptive diagnosis of leptospirosis infection in humans, or to complement a proven or undetermined diagnosis. The extract is the starting material for the EurobioPlex Leptospire kit.

This system has been approved on the following types of samples:

- Plasma
- Serum
- Urine

The EurobioPlex Leptospire test is a medical device for *in vitro* diagnosis and must be used by qualified medical laboratory personnel. This device should not be recycled after use.

This device is not intended for screening of leptospires in blood or organ banks.

Instructions for use EurobioPlex Leptospire

3. SYMBOLS



Reference



Batch number



Temperature limit



Expiry date



Sufficient content for "N" reactions



Manufacturer



Date of manufacture



CE marked product



In vitro Diagnostics



Instructions for use



Warning



Do not use if packaging is damaged



Store in a dark place

Instructions for use EurobioPlex Leptospire

4. PRINCIPLE

The EurobioPlex Leptospire is a leptospire nucleic acid amplification test, together with an encapsidated RT-PCR extraction and inhibition control, which uses real-time RT-PCR amplification. The test is performed on the sample extract by means of a single reaction in a single well/tube.

The RT-PCR Extraction and Inhibition Control (IC-RNA) is used to determine possible variations that may occur during the RNA and DNA extraction from biological samples and real-time PCR amplification steps. This ensures that a negative result cannot be due to poor DNA and RNA extraction and/or the presence of too many PCR inhibitors.

Leptospire nucleic acids are detected using a TEXAS RED labelled probe. The RT-PCR extraction and inhibition control is detected using a Cy5 labelled probe. During the elongation of the amplification product, the probes emit specific fluorescence following their hydrolysis. The measurement of fluorescence intensities in real time is related to the accumulation of specific amplification products.

Table 1: Detection of targets by fluorophores

Target	Fluorophore	Excitement	Emission
Leptospire	Texas Red	485 nm	605 nm
PCR extraction and inhibition control (IC-RNA)	Cy5	647 nm	667 nm

Equivalent channels on different PCR instruments:

- **Texas Red** Channel (ABI Systems, SmartCycler II, Chromo4/CFX96™, Mx Systems, T-COR8™-IVD), LC Red 610 (LC480®), Orange Channel (RotorGene)
- Channel **Cy5** (ABI Systems, Chromo4/CFX96™, Mx Systems, T-COR8™-IVD), Channel Alexa647 (SmartCycler II), Channel 660 (LC 480), Channel Red (RotorGene)

Note: On LC480 instrument II: Apply colour compensation for TexasRed-Cy5 wavelengths (533-610, 618-660).

Instructions for use EurobioPlex Leptospire

5. KIT COMPONENTS

The EurobioPlex Leptospire real-time RT-PCR kit is ready to use for the specific detection of leptospire.

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

The kit contains the reagents and enzymes required for the amplification of leptospire nucleic acids, and the RT-PCR extraction and inhibition control (Table 2).

Table 2: Kit components

Cap Colour	Contents of the kit	EBX-005A (96 tests)	EBX-005-48 (48 tests)	EBX-005-24 (24 tests)	Reconstruction
Red	Enzymes	2 X 1100µl	1100µl	4 x 130µl	Ready to use
Transparent	Oligomix	2 X 400µl	400µl	4 x 50µl	Ready to use
Blue	Water = negative control (CN-H2O)	2 x 1 ml	1 ml	1 ml	Ready to use
Yellow	Leptospire positive control (PC)	2 x 150 µl	150 µl	4 x 20 µl	Ready to use
White	RT-PCR extraction and inhibition control (IC-RNA)	2 x 650 µl	650 µl	4 x 80 µl	Ready to use

6. CONSERVATION AND STORAGE

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

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



Multiple freeze/thaw cycles (>3x) should be avoided as this may reduce the sensitivity of the analysis.

7. EQUIPMENT REQUIRED NOT PROVIDED:

- Biohazard hood
- Real-time PCR apparatus
- Centrifuge for microtubes
- Vortex
- Plates/tubes for real-time PCR reaction
- Micropipettes
- DNase-free and RNase-free filter tips for micropipettes
- Sterile microtubes
- Gloves (talc-free)
- MICROLAB NIMBUS IVD® pipetting machine (Hamilton).

Instructions for use EurobioPlex Leptospire

8. REAL-TIME PCR INSTRUMENT

The EurobioPlex Leptospire kit has been developed and approved for use with the following real-time PCR instruments:

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) with analysis on CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)
- LightCycler®480 Instrument II (Roche) with analysis on LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- T-COR8™-IVD (Tetracore Inc.) with T-COR 8SmartCT™ (auto v1) software

9. WARNINGS AND PRECAUTIONS



Read these instructions carefully before starting the procedure.

- ◇ This testing must be carried out by medical analysis laboratory technicians.
- ◇ Ensure that instruments have been installed, calibrated and maintained in accordance with the manufacturer's recommendations.
- ◇ It is the user's responsibility to use equipment other than those approved, and in this case, performance specifications are not guaranteed.
- ◇ Clinical specimens should be considered as potentially infectious material and should be prepared in a laminar flow hood.
- ◇ This testing must be carried out according to good laboratory practice.
- ◇ Do not use this kit after the expiry date indicated on the label.
- ◇ Avoid prolonged exposure of the reagents to light, which should be limited to the technical time needed to prepare the PCR plate, otherwise performance is not guaranteed.
- ◇ The kit is shipped in dry ice, and the kit components must arrive frozen. If one or more of the components arrives thawed, or if the tubes have been damaged during transport, contact Eurobio Scientific.
- ◇ Once the reagents have thawed, centrifuge the tubes briefly before use.
- ◇ It is recommended to define three distinct working areas: 1) Isolation of RNA/DNA, 2) Preparation of reaction mixture and 3) Amplification / Detection of amplified products.
- ◇ Wear separate gowns and gloves (without talc) in each work area.
- ◇ Pipettes, reagents and other working materials must not be moved between these areas.
- ◇ Particular care must be taken to maintain the purity of reagents and reaction mixtures.
- ◇ Appropriate nucleic acid preparation/extraction methods for quality RNA/DNA production and real-time RT-PCR application should be used, especially to avoid any risk of contamination with RNases/DNases.
- ◇ Use filter tips for micropipettes, DNase-free and RNase-free.
- ◇ Do not pipette by mouth. Do not eat, drink or smoke in the laboratory.
- ◇ Do not use the device if the packaging is damaged.
- ◇ Avoid aerosols.

Instructions for use EurobioPlex Leptospire

10. PROTOCOL

I. COLLECTION OF SAMPLES

- ◇ Collect the samples in sterile tubes.
- ◇  **The use of heparin as an anticoagulant is prohibited.**
- ◇ It is the responsibility of the user to control their own sample collection, transport, storage and extraction conditions to ensure that RNA/DNA extraction by suitable systems produces quality RNA/DNA.
- ◇ It is recommended that samples are extracted immediately, or stored according to the recommendations for sample storage before extraction (Table 3).

Table 3: Storage recommendations

Recommendations for maximum storage of samples before extraction	
Ambient temperature	2 h
+4°C	1 week
-20°C (preferably -80°C)	Long-term storage

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

II. NUCLEIC ACID EXTRACTION

It is the responsibility of users to ensure that the nucleic acid extraction system used is compatible with real-time RT-PCR technology. For this kit, we recommend using methods for extracting nucleic acids from plasma or urine samples and refer to the instructions of the supplier of the extraction kit used.

In the Leptospire kit, the IC-RNA on the CY5 channel can be added before extraction or in the PCR reaction. It ensures that a negative result cannot be due to an extraction problem or the presence of too much RT-PCR inhibitor to validate the test. We recommend the addition of 10 µl of IC-RNA per extraction and an elution volume of 50 µl. If the IC-RNA is only added to control the RT-PCR, it is added to the reaction mixture (1 microlitre per PCR reaction). See Real-time PCR Protocol for more details.

The IC-RNA is also available from Eurobio Scientific (Ref EurobioPlex EBX-003).

III. PERFORMING REAL-TIME RT-PCR

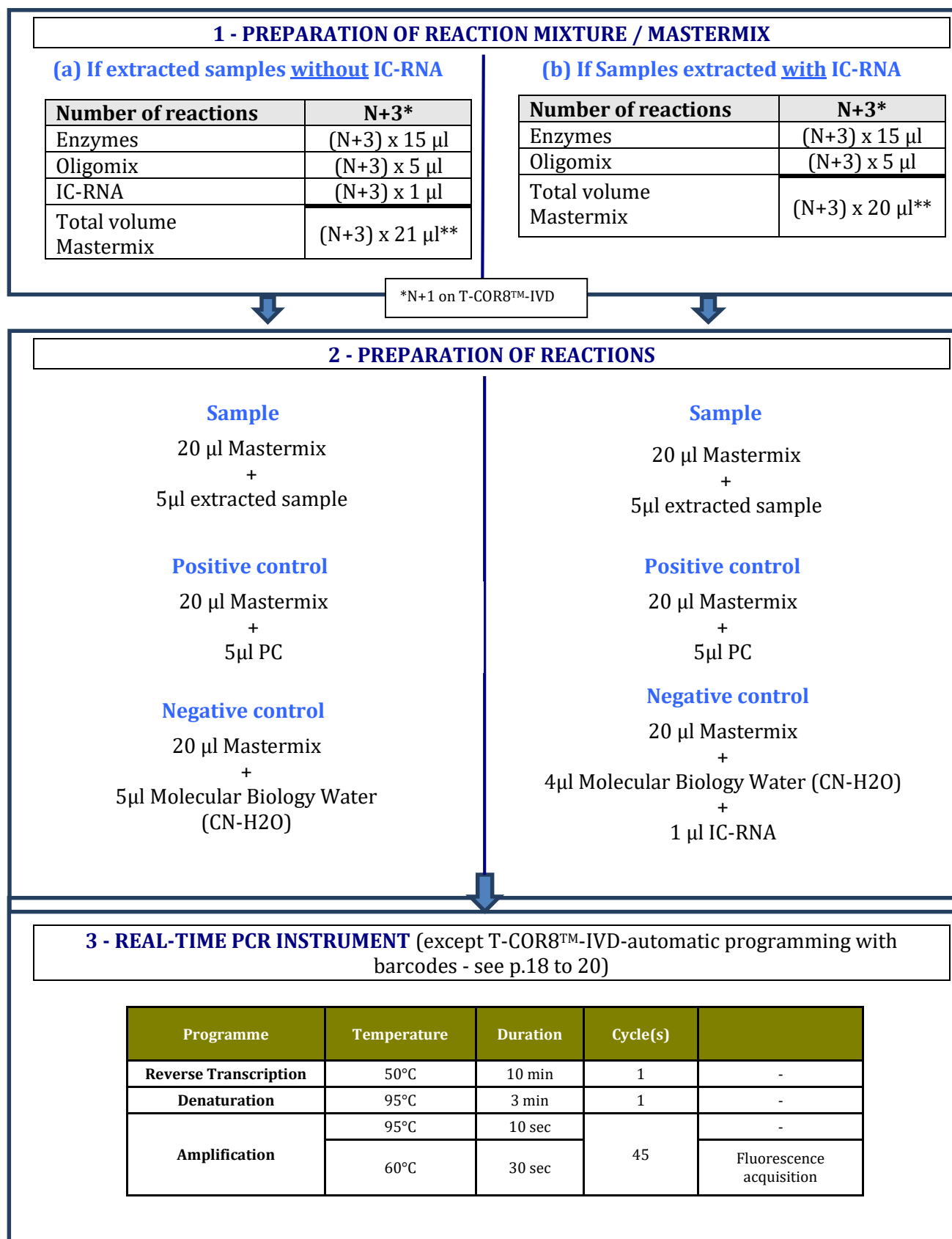
General remark:

The positive control as well as the extraction and RT-PCR amplification control (IC-RNA) contain high concentrations of template. Handling must be done carefully to avoid contamination. To check the correct functioning of the PCR, it is necessary to test the positive control PC as well as a negative control (supplied water = CN-H₂O + IC-RNA) (see II-2/6) of the real-time RT-PCR protocol).

On T-COR8™-IVD, for proper use of the kit, it is necessary that these checks are carried out the first time a new kit is used, only regular checks can be carried out thereafter.

Instructions for use EurobioPlex Leptospire

Diagram of the procedure:



Instructions for use EurobioPlex Leptospire

IV. DETAILED PROCEDURE

- 1) Homogenise the Enzyme tube, and vortex Oligomix, PC and IC-RNA, then centrifuge.
- 2) Prepare the Mastermix as follows, where N is the number of reactions (including positive and negative controls), allow for the amount of Mastermix for at least N+3 reactions* (refer to part 1-a or 1-b of the previous diagram as appropriate).

Case (a): Extraction of sample WITHOUT addition of IC-RNA

Number of Reaction(s)	1	N+3*
Enzymes	15 µl	(N+3) x 15 µl
Oligomix	5 µl	(N+3) x 5 µl
IC-RNA	1 µl	(N+3) x 1 µl
Total volume Mastermix	21 µl**	(N+3) x 21 µl

Case (b): Extraction of the sample with the addition of IC-RNA

Number of Reaction(s)	1	N+3*
Enzymes	15 µl	(N+3) x 15 µl
Oligomix	5 µl	(N+3) x 5 µl
Total volume Mastermix	20 µl**	(N+3) x 20 µl

* For use on the T-COR8™-IVD, we recommend making a Mastermix for N+1 reactions for a one-by-one usage of the kit.

**The difference in reaction volume between case (a) and case (b) is negligible and has no effect on performance.

- 10) Homogenise the Mastermix prepared in 2) and centrifuge briefly.
- 11) Dispense 20 µL of the Mastermix** using a micropipette and filter tips into each real-time PCR microplate tube/well.
- 12) Add 5 µL of the extracted samples
- 13) In parallel, carry out the following checks (see this specific point for T-COR8™-IVD pages 14 to 17):
 - Positive control: 20 µL Mastermix + 5 µL CP positive control
 - Negative control:
 - o Case (a) Extraction of sample WITHOUT addition of IC-RNA:
20µl Mastermix + 5µl supplied water (CN-H2O)
 - o Case (b) Extraction of sample WITH addition of IC-RNA:
20µl Mastermix + 4µl supplied water (CN-H2O) + 1µl IC-RNA
- 14) Immediately seal the tubes or plate with adhesive film to avoid contamination.
- 15) Briefly centrifuge to collect the reaction mixture at the bottom of the tubes or microplate wells.
- 16) Perform the following program on the real-time PCR instrument (on the T-COR8™-IVD no manual programming is required due to the barcodes - see pages 18 to 20). The programme lasts about 1 hour and 15 minutes.

Programme	Temperature	Duration	Cycle(s)	
Reverse Transcription	50°C	10 min	1	-
Denaturation	95°C	3 min	1	-
Amplification	95°C	10 sec	45	-
	60°C	30 sec		Fluorescence acquisition

Instructions for use EurobioPlex Leptospire

Note 1: Two optical systems are available for the LightCycler® 480 (Roche): only the "System II" is compatible with the use of the kit. Apply colour compensation for Texas Red-Cy5 wavelengths (533-610,618-660).

Note 2: For Applied Biosystems devices, select "NONE" in "PASSIVE REFERENCE".

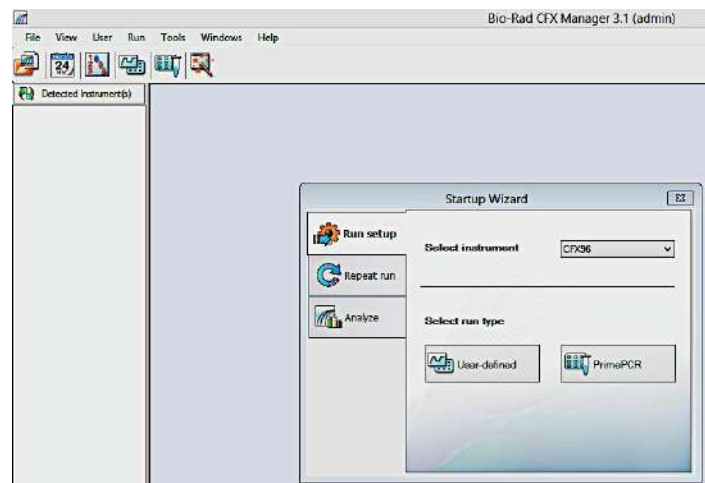
Note 3: In the Rotorgene™, calibrate the signal by clicking on "GAIN OPTIMIZATION".

Note 4: On CFX96™ (Bio-Rad), launch the run from version 1.6 or later, then analyse with version 3.1 (see § Validation of the experiment).

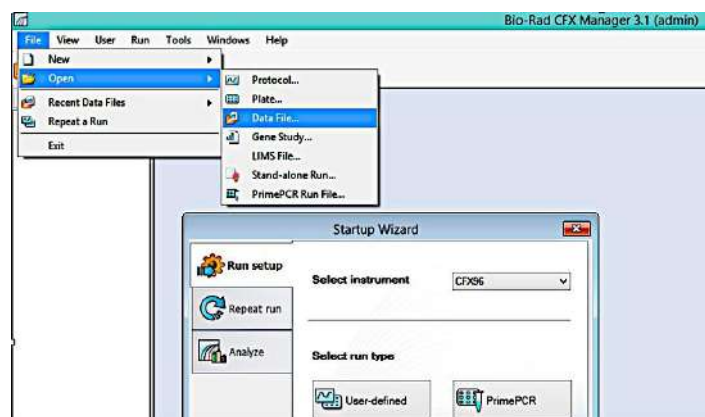
11. VALIDATION OF THE EXPERIMENT

Post-acquisition data analysis on a CFX96™ PCR instrument (Bio-Rad) must be performed using CFX Manager software version 3.1 (Bio-Rad). In order to upgrade to this version from a run started on an earlier version, please follow the following procedure: at the end of the run, the data file with the suffix .pcrd must be opened and processed with CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad).

If the run was started with the CFX Manager v1.6 software for example, to open a data file with the CFX Manager v3.1 software, click on the CFX Manager v3.1 icon. The home screen appears.



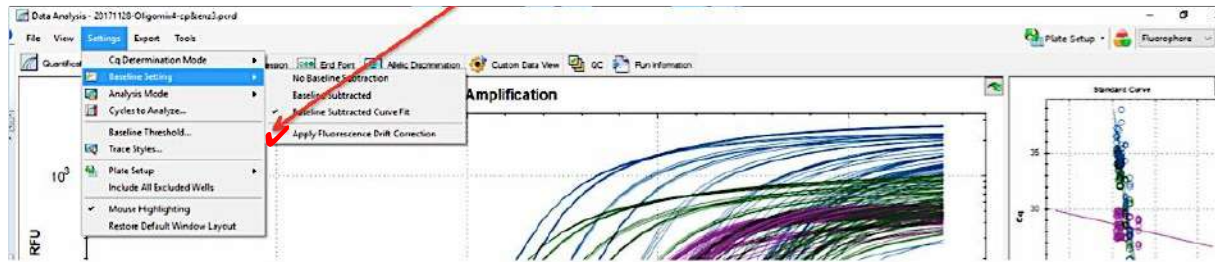
- Click on File and select Open then Data File.



- Select the file you wish to analyse and click Open.

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

Instructions for use EurobioPlex Leptospire



Once this is done, the analysis can begin.

For the assay to be valid, the Ct values for the controls must be as follows (Table 4); otherwise the experiment cannot be validated.

On T-COR8™-IVD, for proper use of the kit, it is necessary that these checks are carried out the first time a new kit is used only, regular checks can be carried out thereafter.

Table 4:

Positive control	
TEXAS RED	Ct < 27
Negative control	
TEXAS RED	Ct not determined
CY5	Ct ≤ 45

On T-COR8™-IVD, the interpretation is automatically generated with the barcodes

12. DATA ANALYSIS AND INTERPRETATION

For clinical samples, the following results are possible:



***Ct threshold for sample positivity:**
TEXAS RED Channel *Leptospire*: + Positive => Ct ≤ 45

PCR signal			Validity of the test/comment
TEXAS RED	CY5	Leptospire	
+	+	Positive	Valid
-	+	Negative	Valid
+	-	Positive	Possible extraction or RT-PCR inhibition that does not prevent detection of the bacteria; valid
-	-	Not interpretable	RT-PCR extraction or inhibition problem -dilute 5 x sample; if same result re-extract sample

Instructions for use EurobioPlex Leptospire

13. PERFORMANCE ANALYSIS

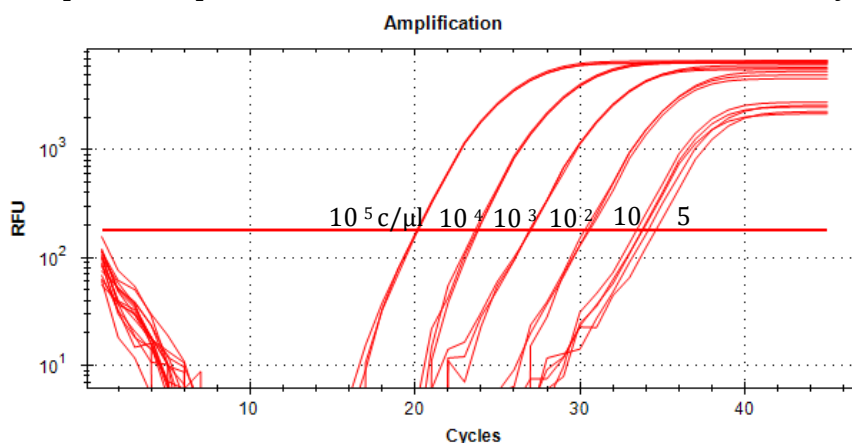
Detection limit/analytical sensitivity :

5 CP copies/ μ l (1 copy of leptospire = 5 genome copy equivalents (Bourhy et al. 2011)).

On the bacterial strain *Leptospire interrogans*: 100 bacteria/ml in plasma

250 bacteria/ml in serum, and 500 bacteria/ml in urine.

Example of an experiment performed on a CFX96™ real-time PCR thermocycler (Bio-Rad):



Signal reproducibility on the Leptospire channel (Texas Red)

Reproducibility	Coefficient of Variation (%) on the Positive Control	Coefficient of Variation (%) on RNA
Intra-run	1.35	2.44
Inter-runs	5.15	2.04
Inter-batch	1.83	2.45

Specificity: > 99 %

Specificity was assessed on a total of 98 extracted samples pre-tested and confirmed negative for leptospirosis. 45 of these samples were known to be positive for :

- *Neisseria meningitidis* (n=5)
- *Streptococcus pneumoniae* (n=5)
- *Haemophilus influenzae b* (n=1)
- *Pseudomonas aeruginosa* (n=4)
- *Streptococcus agalactiae* (n=1)
- *Escherichia coli* (n=4)
- *Legionella pneumophila* (n=1)
- *Bartonella* (n=5)
- *Coxiella* (n=3)
- *Staphylococcus aureus* (n=1)
- *Mycobacterium avium* (n=1)
- *Staphylococcus oralis/mitis/sanguis* (n=1)
- *Francisella tularensis* (n=1)
- *Klebsiella kingae* (n=2)

Instructions for use EurobioPlex Leptospire

- *Tropheryma whipplei* (n=1)
- *Chikungunya* (n=1)
- Dengue (n=1 Dengue 1+ n=1 Dengue 2+ n=1 Dengue 3+ n=1 Dengue 4+ n=3 of unknown serotype)
- Zikavirus (n=1)

No cross-reactivity was therefore observed with these pathogens.

Sensitivity: > 99 %

Sensitivity was assessed on a total of 50 pre-tested and confirmed leptospirosis-positive samples, of which 39 were plasma from blood/EDTA, and 11 were urine.

	Eurobio PCR		
	Positive	Negative	Total
Reference PCR			
Positive	50	0	50
Negative	0	98	98
Total	50	98	148

The overall concordance is > 99%.

The tests were performed on CFX96™.

The extraction was performed with the NucliSENS essayMAG extractor (Biomérieux) following the supplier's instructions.

14. SPECIFICITIES OF THE T-COR 8™-IVD REAL-TIME PCR INSTRUMENT

T-COR8™-IVD is a real-time PCR instrument with 8 independently programmable wells that can be used, patient by patient, independently of each other, in terms of the tests/assays performed, the thermal programs, and the timing of the PCR run.

All 8 wells can also be used simultaneously with the same "Test/Assay".

Note: Mix thoroughly after placing the sample in the tube with repeated pipetting, avoiding the formation of bubbles and ensuring that the volume of liquid is properly located at the bottom of the tube. Close each tube tightly after each deposit of control or sample to avoid contamination.

Checks

On the T-COR8™-IVD, for correct usage of the kit, it is necessary that these checks are carried out the first time a new kit is used only, regular checks can be carried out thereafter.

Instructions for use EurobioPlex Leptospire

Subsequently, the RT-PCR inhibition check (IC-RNA) ensures that within the sample tested, there is no RT-PCR inhibition, that the extraction has been successful and that the PCR is functioning correctly.

Patient tests

<i>With validation of positive and negative controls only once on first use</i>	24 reactions
Number of patient tests possible patient by patient with thawing/freezing 12 times maximum (3 times per tube/4 tubes per reagent)	12 patients

Fluorophores

There are 4 fluorophore combinations available on the T-COR8™-IVD.

For all EBX, including EBX-005, the FAM/HEX/Texas Red/Cy5 combination is the one chosen. If some channels are not used in some kits, disregard them when analysing the results.

Use of Barcodes (available on pages 18 to 20)

1- Select Menu > New Analysis/New Run

2- Select Barcode

3- Scan the desired barcode on the right side of the device:

- or for the positive control (Barcode EBX-005 Pos Ctrl),
- or for the negative control (Barcode EBX-005 Neg Ctrl),
- or for a sample (Barcode Assay: EBX-005)

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

4- Lift the valve of the well x selected by the device, and check that the blue LED light is on, then select "Yes".

5- Position the tube in the corresponding well and fold the valve back, then select "Next".

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

7- Select "Next"

8- To add/test another control or sample, select "Add well" and start again at point 3-

9- Select "Start run"

***Note:** the name of a sample or run cannot be changed or added to after the run has ended. It must be done before or during the run.*

Instructions for use EurobioPlex Leptospire

Presentation and Interpretation of Results

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

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

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

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

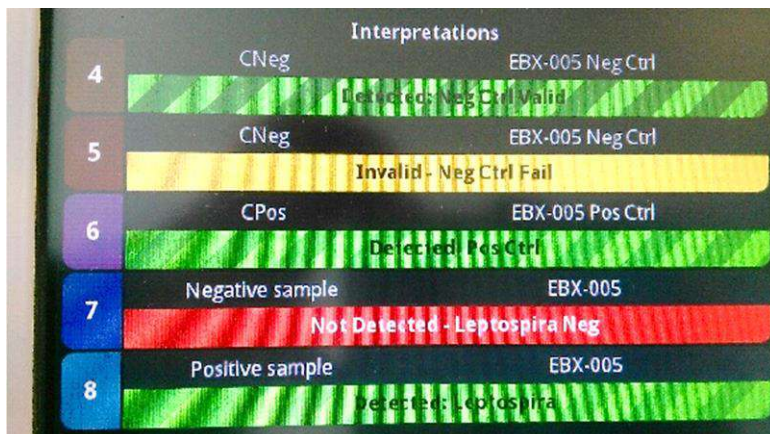
Determination of status for samples:

"Detected": Positive → green box
"Not detected": Negative → red box
"Invalid -> retest → orange box

Example of presentation of automatic interpretation of results on the instrument and in the report:

- Example for valid negative control (well 4) and positive control (well 6) indicated "Detected", for Invalid negative control (well 5), for a negative sample indicated "Not Detected" (sample well 7) and for a positive sample detected for the Leptospira target indicated (Detected Leptospira) (sample well 8)

❖ On the instrument display:

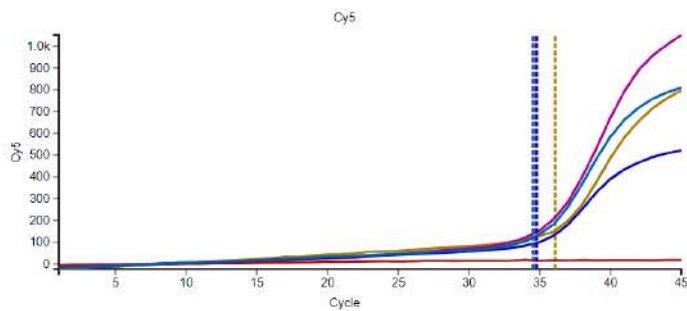
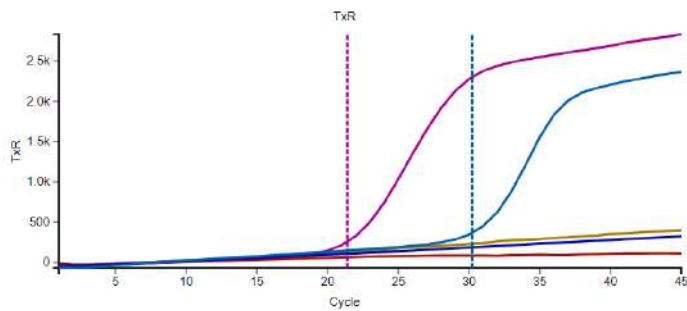


❖ In the report:

Instructions for use EurobioPlex Leptospire

Summary							
Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5	Call
4	CNeg	EBX-005 Neg Ctrl				36.1	Detected • Neg Ctrl Valid
5	CNeg	EBX-005 Neg Ctrl					Invalid
6	CPos	EBX-005 Pos Ctrl			21.4	34.7	Detected • Pos Ctrl
7	Negative sample	EBX-005				34.8	Not Detected
8	Positive sample	EBX-005			30.2	34.5	Detected • Leptospira
							Leptospira Neg

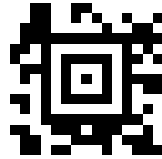
Example of amplification curves



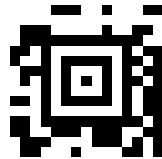
Instructions for use EurobioPlex Leptospire

Barcodes on T-COR8™-IVD for EBX-005

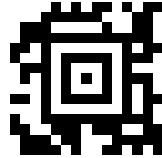
EBX-005 Pos Ctrl
Positive control PC



EBX-005 Neg Ctrl
Water = negative control (CN-H2O)



Assay: EBX-005



Instructions for use EurobioPlex Leptospire

15. QUALITY CONTROL

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

16. BIBLIOGRAPHY

- Giry C, Roquebert B, Li-Pat-Yuen G, Gasque P, Jaffar-Bandjee M.C. Simultaneous detection of chikungunya virus, dengue virus and human pathogenic *Leptospira* genomes using a multiplex TaqMan® assay. *BMC Microbiol.* 2017;17(1):105.
- Perez J, Goarant C. Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. *BMC Microbiol.* 2010;10:325.
- Goarant C, Laumond-Barny S, Perez J, Vernel-Pauillac F, Chanteau S, Guigon A. Outbreak of leptospirosis in New Caledonia: diagnosis issues and burden of disease. *Trop Med Int Health.* 2009;14(8):926-9.
- Tubiana S, Mikulski M, Becam J, Lacassin F, Lefèvre P, Gourinat AC, Goarant C, D'Ortenzio E. Risk factors and predictors of severe leptospirosis in New Caledonia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(1):e1991.
- van de Werve C, Perignon A, Jauréguiberry S, Bricaire F, Bourhy P, Caumes E. Travel-related leptospirosis: a series of 15 imported cases. *J Travel Med.* 2013;20(4):228-31.
- Hochedez P, Escher M, Decoussy H, Pasgrimaud L, Martinez R, Rosine J, Théodose R, Bourhy P, Picardeau M, Olive C, Ledrans M, Cabie A. Outbreak of leptospirosis among canyoning participants, Martinique, 2011. *Euro Surveill.* 2013;18(18):20472.
- Bourhy P, Herrmann Storck C, Theodose R, Olive C, Nicolas M, Hochedez P, Lamaury I, Zinini F, Brémont S, Landier A, Cassadou S, Rosine J, Picardeau M. Serovar diversity of pathogenic *Leptospira* circulating in the French West Indies. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(3):e2114.
- Bourhy P, Brémont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M. Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *J Clin Microbiol.* 2011;49(6):2154-60.
- Legkoby T, David DJ, Lee Robin SH. Biological diagnosis of leptospirosis, Avis sur les actes, Haute autorité de santé, service évaluation des actes professionnels, www.has-santé.fr
- Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;249(1):139-47.
- Levett PN. Sequence-based typing of *Leptospira*: epidemiology in the genomic era. *PLoS Negl Trop Dis.* 2007;1(2):e120.
- Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol.* 2005 Jan;54(Pt 1):45-9.
- Slack A. Leptospirosis. *Aust Fam Physician.* 2010 Jul;39(7):495-8. Review.

Instructions for use EurobioPlex Leptospire

- Stoddard RA. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through real-time PCR (qPCR) targeting the LipL32 gene. *Methods Mol Biol.* 2013;943:257-66.
- Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu LF, Jiang HQ, Jia J, Tu YF, Jiang JX, Gu WY, Zhang YQ, Cai Z, Sheng HH, Yin HF, Zhang Y, Zhu GF, Wan M, Huang HL, Qian Z, Wang SY, Ma W, Yao ZJ, Shen Y, Qiang BQ, Xia QC, Guo XK, Danchin A, Saint Girons I, Somerville RL, et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature.* 2003;422(6934):888-93.
- Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, Recommandations de bonnes pratiques, www.has-santé.fr

17. WASTE DISPOSAL

Dispose of all waste in accordance with the legislation on DASRI.

18. INCIDENT DECLARATION

Any serious incident occurring in connection with the device shall be notified to EUROBIO SCIENTIFIC and to the competent authority of the Member State in which the user and/or patient is established.

19. TECHNICAL SUPPORT

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

EUROBIO SCIENTIFIC's customer service can be reached by e-mail at adv@eurobio-scientific.com or by phone at +33 (0)1.69.07.94.77.

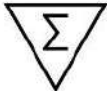




EurobioPlex *Leptospire*

Für **qualitative** RT-PCR in Echtzeit

REF **EBX-005A**
 EBX-005-48
 EBX-005-24

 **96/48/24 Reaktionen**



Validiert auf:

- CFX96™ Real Time PCR Detektionssystem (Bio-Rad) mit Analyse auf CFX Manager Version 3.1 (Bio-Rad)
- LightCycler®480 Instrument II (Roche) mit Analyse auf LightCycler® 480 Software v1.5 (Roche)
- T-COR 8™-IVD (Tetracore Inc.) mit Software T-COR 8 SmartCT™ (auto v1)



Gebrauchsanleitung
Verfügbar bei www.eurobio-scientific.com

Die Zusammenfassung der Sicherheits- und Leistungseigenschaften (RCSP) wird durch die benannte Zertifizierungsstelle auf der Datenbank EUDAMED, sobald diese in Funktion ist, bereitgestellt. Sie kann auch auf Anfrage erhalten werden.

Inhaltsverzeichnis

1.	ALLGEMEINE INFORMATIONEN	51
2.	BESTIMMUNG DES MEDIZINPRODUKTS	53
3.	SYMBOLS	54
4.	PRINZIP	55
5.	KOMPONENTEN DES KITS	56
6.	AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG.....	56
7.	NICHT GELIEFERTE BENÖTIGTE AUSRÜSTUNG.....	56
8.	ECHTZEIT-PCR-INSTRUMENT.....	57
9.	UNBEDINGT ZU BEACHTEN UND VORKEHRUNGEN	57
10.	PROTOKOLL.....	58
i.	SAMMELN DER PROBEN	58
ii.	EXTRAKTION DER NUKLEINSÄUREN	58
iii.	DURCHFÜHRUNG DER ECHTZEIT-RT-PCR	58
iv.	VERFAHREN IM EINZELNEN.....	61
11.	VALIDIERUNG DER EXPERIMENTE.....	62
12.	DATENANALYSE UND AUSWERTUNG	63
13.	LEISTUNGSANALYSE	64
14.	MIT DEM ECHTZEIT-PCR-INSTRUMENT T-COR 8TM-IVD VERBUNDENE BESONDERHEITEN	65
15.	QUALITÄTSKONTROLLE	72
16.	LITERATURVERZEICHNIS	72
17.	ENTSORGUNG VON ABFÄLLEN	73
18.	MELDUNG VON UNFÄLLEN ODER EREIGNISSEN	73
19.	TECHNISCHER BEISTAND	73

1. ALLGEMEINE INFORMATIONEN

Leptospirosen sind bakterielle Infektionskrankheiten, die durch *Leptospira*-Bakterien verursacht werden. Diese Erkrankungen verursachende *Leptospira* sind eine Gruppe von Bakterien, die meist unter der Art *Leptospira interrogans* zusammengefasst werden. Diese Krankheit ist überall verbreitet. In letzter Zeit konnte ein starker Anstieg gemeldeter Fälle beobachtet werden. Es handelt sich um eine Zoonose und sie befällt auch in der Nähe der Menschen lebende Tiere, wie Ratten oder Schweine. Die Leptospirose ist für Menschen pathogen.

Es wird angenommen, dass ihr in den meisten Regionen der Welt Kleinsäugetiere (Ratten, Mäuse usw.) als Wildwirte dienen. Direkte und indirekte Quelle für Infektionen beim Menschen scheint fast immer der Urin solcher Tiere zu sein. Wie bei den Echinokokken, existiert auch hier eine natürliche Infektion von Hunden (*canine Leptospirose*) und anderen Hundartigen, die wahrscheinlich stark unterschätzt wird und ein Risiko für Menschen darstellt. Die Leptospirose grassiert in verschiedenen Teilen der Welt, zum Beispiel auf der Insel Reunion, den Inselgruppen von Wallis und Futuna, und den Antillen, in Guayana, in tropischen Ländern, Südostasien, Kambodscha, Vietnam, Laos. *Leptospira* wurde sogar in der französischen Region Poitou Charente im Süden und Südwesten Frankreichs in feuchten Gebieten in der Nähe von Schweinehaltungen gefunden..

Die hohe Vielgestaltigkeit nicht-spezifischer Symptome und die Verschiedenartigkeit betroffener Organe erschweren eine klinische Diagnose beträchtlich. Zudem gibt es, je nach Art der infizierten Individuen und Serotypen (eventuell neuen oder neu auftretenden) akute, subakute und chronische Verlaufsformen dieser Krankheit, welche durch Impfung abgeschwächt werden können. Es gibt zahlreiche Serotypen (zum Beispiel *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *pomona*), die keine gleichartigen antigenen Marker aufweisen, was eine Herstellung wirksamer Impfstoffe erschwert. Echtzeit-PCR-Tests sind zur Untersuchung der Epidemiologie der Leptospirose von Interesse.

Die Leptospirose tritt in verschiedenartigen Formen auf, was ihre Diagnose erschwert, da sie mit einer starken Grippe (hohes Fieber und Muskelschmerzen) verwechselt werden kann. Sie kann mit diffusen oder auch lokalisierten Schmerzen (z. B.: Kopfschmerzen) beginnen, was bei nicht rechtzeitig erfolgender Diagnose zur Beeinträchtigung von Sprachfähigkeit oder Urteilskraft führen kann (wegen eines hohen Harnstoffspiegels auf Grund einer Niereninsuffizienz). In gewissen Fällen tritt gleichzeitig eine Gelbsucht (bei ungefähr 40 % der Fälle in den Schützengräben des ersten Weltkriegs) und/oder eine Nierenentzündung ein. Nach einer Dialyse und Verabreichung von Antibiotika erholt sich der Patient bei mäßiger Form der Krankheit innerhalb 5 bis 6 Wochen (wobei jedoch noch mehrere Wochen nach Verschwinden der Symptome Bakterien im Urin des Patienten gefunden werden können). Andernfalls kann sich die Leptospirose zu heftigen, manchmal letalen Blutungen steigern oder eine schwere Erkrankung der Nieren verursachen. Bei geschwächten Personen sind Angriffe mehrerer Organe möglich.

Nach den Empfehlungen der Weltgesundheitsorganisation beruht der biologische Nachweis einer Leptospirose auf einer Isolierung der Bakterie, auf der Identifizierung ihrer Nukleinsäuren in biologischen Proben oder auch auf einer positiven Serologie bei hinweisendem klinischem oder epidemiologischem Kontext. Der Einsatz einer Bakterienkultur ist nur sehr begrenzt möglich, da diese schwer durchführbar ist und ihr Wachstum zu viel Zeit beansprucht.

Am meisten wird die Serologie zur Diagnose verwendet. Es gibt weder auf nationaler noch internationaler Ebene ein standardisiertes Antigen für den Nachweis gegen *Leptospira* gerichteter Antikörper.

Die zahlreichen für den Nachweis der Leptospirose angebotenen Tests können zwei Typen zugeordnet werden: Tests mit direktem Nachweis (Identifizierung der Bakterie oder ihrer

Moleküle, wie ihrer DNA mittels Echtzeit-PCR) und Tests, in denen die humorale Antwort des Patienten geprüft wird (serologische Tests). Die serologische Bezugstechnik zur Bestätigung einer Leptospirose ist der Mikroagglutinationstest (MAT) . Der serologische Test wird verwendet, um Antikörper der Klasse IgM entweder durch ELISA oder auf Teststreifen nachzuweisen.

Eine frühzeitige Detektion der Leptospirose kann durch Echtzeit-PCR erfolgen, normalerweise ausgehend von einem aus dem Blut des Patienten erhaltenen Plasma, was bessere Ergebnisse als mit dem Serum liefert. Optimal erfolgt die Blutentnahme weniger als 8 Tage nach Ausbruch der Krankheit. Es ist nicht interessant, den Echtzeit-PCR-Test später als 10 Tage nach Beginn der ersten Symptome (Ende des Vorliegens der Bakterien im Blut) durchzuführen. Die französische Gesundheitsbehörde (HAS) hat darauf verwiesen, dass ein einfacher PCR-Test (nicht in Echtzeit) in der spezifischen biologischen Diagnose der Leptospirose nicht von Interesse ist. Nach Ansicht der HAS ist derzeit die Technik der Echtzeit-PCR für die frühzeitige spezifische biologische Diagnose der Leptospirose am vorteilhaftesten. Sie soll nur innerhalb der 8 ersten Tage nach Auftreten des Fiebers, möglichst vor Beginn der Antibiotikabehandlung an einer Blutprobe vorgenommen werden. Auf Grund der normalerweise sehr geringen Konzentration von Leptospira im Blut muss nach jeder negativen Echtzeit-PCR eine serologische Untersuchung erfolgen.

2. BESTIMMUNG DES MEDIZINPRODUKTS

EurobioPlex Leptospire ist ein in Echtzeit erfolgreicher Amplifikationstest mittels einer Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR), mit welchem qualitativ das Vorhandensein oder die Abwesenheit von *Leptospira* durch Vermehrung der Nukleinsäuren dieses Pathogens in einem Nukleinsäurenextrakt nachgewiesen werden soll. Dieser Test ist zur Vermutungsdiagnose einer Infektion durch *Leptospira* beim Menschen angezeigt, oder zur Ergänzung einer positiven oder unbestimmten Diagnose. Der Extrakt ist das Ausgangsmaterial für den Kit EurobioPlex Leptospire.

Dieses System wurde für folgende Arten von Entnahmen validiert:

- Plasma
- Serum
- Urin

Der Test EurobioPlex Leptospire ist ein Medizinprodukt zur *In-Vitro*-Diagnose, das nur von qualifiziertem Personal eines Labors für biomedizinische Analysen verwendet werden darf. Dieses Produkt darf nach Verwendung nicht wiederverwertet werden.

Dieses Produkt ist nicht für das Auffinden von *Leptospira* in einer Blut- oder Organbank vorgesehen.

3. SYMBOLE



Referenz



Chargen-Nummer



Temperaturgrenze



Verfallsdatum



Inhalt ausreichend für N Reaktionen



Hersteller



Herstellungsdatum



Mit Gütezeichen CE gekennzeichnetes Produkt



In-Vitro-Diagnostik



Gebrauchsanweisung



Achtung



Nicht verwenden, wenn Verpackung beschädigt ist.



Vor Licht geschützt aufbewahren

Gebrauchsanleitung EurobioPlex Leptospire

4. PRINZIP

EurobioPlex Leptospire ist ein Nukleinsäure-Amplifikationstest für Leptospira, sowie eine Extraktions- und Inhibitionskontrolle der RT-PCR, der die Amplifikation mittels Echtzeit-RT-PCR verwendet. Der Test wird ausgehend vom Extrakt der Probe mittels einer einzigen Reaktion in einem einzigen Well/Röhrchen ausgeführt.

Die Extraktions- und Inhibitionskontrolle von RT-PCR (CI-ARN) ermöglicht es, eventuelle Variationen festzustellen, die bei den Extraktionsschritten von RNA und DNA aus biologische Proben und bei der Amplifikation durch Echtzeit-PCR eintreten können. Hiermit kann sichergestellt werden, dass ein negatives Ergebnis nicht auf schlechte Extraktion von DNA und RNA und/oder die Gegenwart einer zu großen Menge von PCR-Inhibitoren zurückzuführen ist.

Die Nukleinsäuren von Leptospira werden mittels einer mit TEXAS RED markierten Sonde nachgewiesen. Die Extraktions- und Inhibitionskontrolle von RT-PCR werden mittels einer mit Cy5 markierten Sonde nachgewiesen. Bei der Elongation des Amplicons emittieren die Sonden infolge ihrer Hydrolyse eine spezielle Fluoreszenz. Die in Echtzeit gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten entsprechen der Anhäufung spezieller Amplifikationsprodukte.

Tabelle 1: Detektion von Targets je nach Fluorophor

Target	Fluorophor	Anregung	Emission
Leptospira	Texas Red	485 nm	605 nm
Extraktions- und Inhibitionskontrolle von PCR (CI-ARN)	Cy5	647 nm	667 nm

Gleichwertige Kanäle auf verschiedenen PCR-Instrumenten:

- Canal **Texas Red** (Systeme ABI, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96™, Systeme Mx, T-COR 8™-IVD), LC Red 610 (LC480®), Canal Orange (RotorGene)
- Canal **Cy5** (Systeme ABI, Chromo 4/CFX96™, Systeme Mx, T-COR 8™-IVD), Canal Alexa647 (SmartCycler II), Canal 660 (LC 480), Canal Red (RotorGene)

Hinweis: Am LC480 Instrument II: Eine Farbkompensation für die Wellenlängen TexasRed-Cy5 (533-610, 618-660) anwenden.

Gebrauchsanleitung EurobioPlex Leptospire

5. KOMPONENTEN DES KITS

Das Kit für Echtzeit-RT-PCR EurobioPlex Leptospire ist für den speziellen Leptospira-Nachweis einsatzbereit.

Die Fluoreszenz wird emittiert und einzeln während der PCR durch ein optisches System gemessen. Die Detektion amplifizierter Fragmente erfolgt mit einem Fluorimeter unter Verwendung der in Tabelle 1 angezeigten Kanäle.

Das Kit enthält die nötigen Reagenzien und Enzyme, die zur Amplifikation von Leptospira-Nukleinsäuren und zur Extraktions- und Inhibitionskontrolle der RT-PCR benötigt werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Komponenten des Kits

Farbe des Verschlusses	Inhalt des Kits	EBX-005A (96 Tests)	EBX-005-48 (48 Tests)	EBX-005-24 (24 Tests)	Rekonstitution
Rot	Enzyme	2 X 1100 µl	1100 µl	4 x 130 µl	Einsatzbereit
Transparent	Oligomix	2 x 400 µl	400 µl	4 x 50 µl	Einsatzbereit
Blau	Wasser = Negativkontrolle (CN-H ₂ O)	2 x 1 ml	1 ml	1 ml	Einsatzbereit
Gelb	Positivkontrolle Leptospira (CP)	2 x 150 µl	150 µl	4 x 20 µl	Einsatzbereit
Weiß	Extraktions- und Inhibitionskontrolle von RT-PCR (CI-ARN)	2 x 650 µl	650 µl	4 x 80 µl	Einsatzbereit

6. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG

Alle Reagenzien müssen bei Temperaturen zwischen -15 und -22°C gelagert werden.

Alle Reagenzien können bis zu dem auf dem Etikett genannten Verfallsdatum verwendet werden.



Mehrere Gefrier-/Auftauzyklen (>3x) sind zu vermeiden, da dies die Empfindlichkeit der Analyse beeinträchtigen könnte.

7. NICHT GELIEFERTE BENÖTIGTE AUSRÜSTUNG

- Biologische Sicherheitswerkbank
- Gerät für Echtzeit-PCR
- Röhrchen-Zentrifuge
- Vortex-Rührer
- Platten/ Röhrchen für Echtzeit-PCR-Reaktion
- Mikropipetten
- Spitzen für Mikropipetten, frei von Dnase und RNase
- Sterile Röhrchen
- Handschuhe (ohne Talk)
- Pipettierroboter MICROLAB NIMBUS IVD® (Hamilton).

8. ECHTZEIT-PCR-INSTRUMENT

Das Kit EurobioPlex Leptospire wurde zur Verwendung mit folgenden Echtzeit-PCR-Instrumenten entwickelt und validiert:

- CFX96™ Real Time PCR Detektionssystem (Bio-Rad) mit Analyse auf CFX Manager Version 3.1 (Bio-Rad)
- LightCycler®480 Instrument II (Roche) mit Analyse auf LightCycler® 480 Software v1.5 (Roche)
- T-COR 8™-IVD (Tetracore Inc.) mit Software T-COR 8 SmartCT™ (auto v1)

9. UNBEDINGT ZU BEACHTEN UND VORKEHRUNGEN



Vor Beginn des Verfahrens die vorliegenden Anweisungen aufmerksam durchlesen.

- ◇ Diese Experimente müssen von Labortechnikern, die für biomedizinische Verfahren ausgebildet sind, durchgeführt werden.
- ◇ Sicherstellen, dass die Instrumente gemäß den Empfehlungen ihrer Hersteller richtig installiert, kalibriert und gewartet wurden.
- ◇ Verwendet der Benutzer eine andere als die validierten Ausrüstungen, so ist er hierfür allein verantwortlich, und die Leistungen sind nicht gewährleistet.
- ◇ Klinische Proben sind als potentiell infektiös zu betrachten und müssen in einem Laminar-Flow-Schrank vorbereitet werden.
- ◇ Diese Experimente müssen nach den Grundsätzen guter Laborpraxis ausgeführt werden.
- ◇ Dieses Kit nicht nach Ablauf des auf seinem Etikett vermerkten Verfallsdatums verwenden.
- ◇ Die Reagenzien dürfen nicht zu lange dem Licht ausgesetzt werden, weshalb die Expositionszeit auf die zur technischen Vorbereitung der PCR-Platte nötige Zeit zu begrenzen ist. Andernfalls können die Leistungen nicht gewährleistet werden.
- ◇ Das Kit wird unter Trockeneis geliefert und seine Komponenten müssen gefroren eintreffen. Sollten eine oder mehrere Komponenten aufgetaut eintreffen oder wurden die Röhrchen beim Transport beschädigt, mit Eurobio Scientific in Verbindung treten.
- ◇ Nach Auftauen der Reagenzien die Röhrchen vor ihrer Verwendung kurz zentrifugieren.
- ◇ Es wird empfohlen, drei getrennte Arbeitsbereiche festzulegen: 1) Isolierung von RNA/DNA, 2) Vorbereitung des Reaktionsgemischs 3) Amplifikation / Detektion der amplifizierten Produkte.
- ◇ In jedem Arbeitsbereich sind andere Laborkittel und Handschuhe (ohne Talk) zu tragen.
- ◇ Die Pipetten, Reagenzien und andere Arbeitsausrüstungen dürfen nicht von einem Arbeitsbereich zu einem anderen übertragen werden.
- ◇ Es ist insbesondere darauf zu achten, die Reinheit der Reagenzien und der Reaktionsgemische zu bewahren.
- ◇ Es müssen geeignete Vorbereitungs- und Extraktionsverfahren für Nukleinsäuren verwendet werden, um eine qualitätsgerechte RNA-/DNA-Produktion und die Anwendung der Echtzeit-RT-PCR zu sichern, insbesondere zur Vermeidung jeglichen Kontaminations-Risikos durch RNasen/DNasen.
- ◇ DNase- und Rnase-freie Filterspitzen für Mikropipetten verwenden.
- ◇ Nicht mit dem Mund pipettieren. Im Labor nicht essen, trinken oder rauchen.
- ◇ Die Vorrichtung nicht verwenden, wenn ihre Verpackung beschädigt ist.
- ◇ Aerosole vermeiden.

10. PROTOKOLL

I. SAMMELN DER PROBEN

- ◇ Die Proben in sterilen Röhrchen sammeln.
- ◇  **Die Verwendung von Heparin als Gerinnungshemmer ist verboten.**
- ◇ Es obliegt dem Benutzer, seine eigenen Bedingungen zum Sammeln, Transportieren, Lagern und Extrahieren der Proben zu beherrschen, um sicherzustellen, dass bei der Extraktion von RNA/DNA mittels geeigneter Systeme RNA/DNA guter Qualität erhalten wird.
- ◇ Es wird empfohlen, die Proben unmittelbar zu extrahieren oder sie entsprechend den Empfehlungen zur Aufbewahrung der Proben vor der Extraktion zu lagern (Tabelle 3).

Tabelle 3: Empfehlungen zur Aufbewahrung

Empfehlungen zur maximalen Aufbewahrungszeit der Proben vor der Extraktion	
Umgebungstemperatur	2 Stunden
+4°C	1 Woche
-20°C (vorzugsweise -80°C)	Langfristige Lagerung

Achtung	
	◇ Der Benutzer kann auf die von der Weltgesundheitsorganisation oder von der französischen Gesundheitsbehörde herausgegebenen Empfehlungen zur richtigen Aufbewahrung der Proben Bezug nehmen. ◇ Extrahierte RNAs müssen bei -80°C gelagert werden. ◇ Der Transport klinischer Proben unterliegt den örtlichen Vorschriften für den Transport von Krankheitserregern.

II. EXTRAKTION DER NUKLEINSÄUREN

Es liegt in der Verantwortung des Benutzers, sicherzustellen, dass das verwendete Extraktionssystem für Nukleinsäuren mit der Technologie der Echtzeit-RT-PCR kompatibel ist. Wir empfehlen, im vorliegenden Fall Methoden zur Extraktion von Nukleinsäuren aus Plasma- oder Urinproben zu verwenden und die Anweisungen des Lieferanten des verwendeten Extraktions-Kits zu befolgen.

Im Leptospira-Kit kann vor der Extraktion oder in der PCR-Reaktion die CI-ARN auf Kanal CY5 beigefügt werden. Hiermit kann zur Validierung des Tests sichergestellt werden, dass ein negatives Ergebnis nicht auf Extraktionsprobleme oder die Gegenwart einer zu großen Menge von RT-PCR-Inhibitoren zurückzuführen ist. Wir empfehlen die Zugabe von 10 µl CI-ARN pro Extraktion und ein Elutionsvolumen von 50 µl. Wird die CI-ARN nur zur Kontrolle der RT-PCR beigefügt, so wird sie zum Reaktionsgemisch gegeben (1 Mikroliter pro PCR-Reaktion). Für weitere Einzelheiten siehe das Protokoll der Echtzeit-PCR.

Die CI-ARN kann auch bei Eurobio Scientific (Ref. EurobioPlex EBX-003) erhalten werden.

III. DURCHFÜHRUNG DER ECHTZEIT-RT-PCR

Allgemeine Anmerkung:

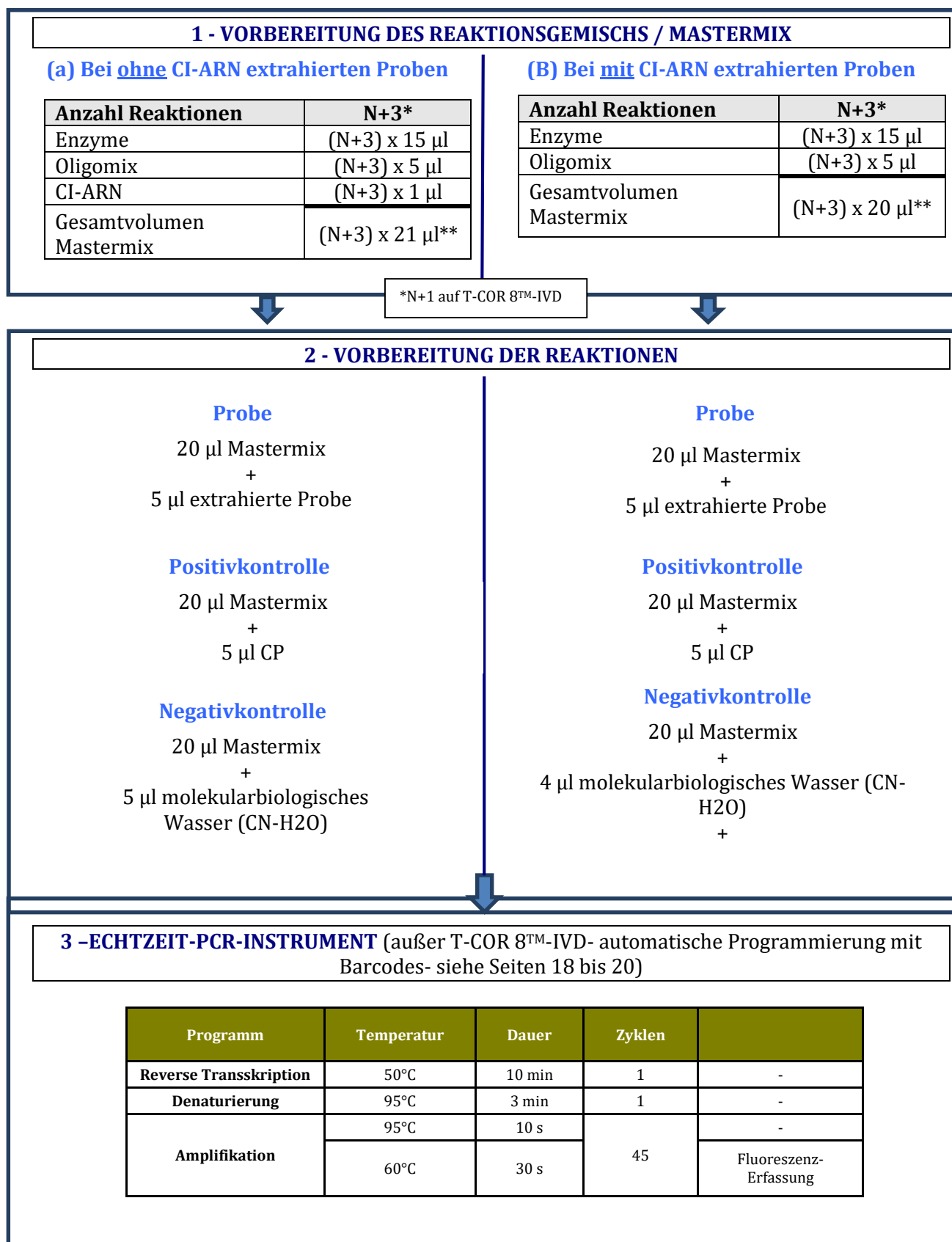
Die Positivkontrolle, sowie die Extraktions- und Amplifikationskontrolle von RT-PCR (CI-ARN) enthalten hohe Matrix-Konzentrationen. Zur Vermeidung jeglicher Kontamination müssen sie äußerst sorgsam gehandhabt werden. Zur Kontrolle der richtigen Funktionsweise der PCR müssen die Positivkontrolle CP, sowie eine Negativkontrolle (geliefertes Wasser = CN-H₂O + CI-ARN) (siehe II-2/6 des Protokolls der Echtzeit-RT-PCR) getestet werden.

Gebrauchsanleitung EurobioPlex Leptospire

Bei T-COR 8™-IVD ist es zur richtigen Verwendung nötig, die Kontrollen nur bei der ersten Verwendung eines neuen Kits durchzuführen, regelmäßige Kontrollen können in der Folge ausgeführt werden.

Gebrauchsanleitung EurobioPlex Leptospire

Verfahrensschema:



Gebrauchsanleitung EurobioPlex Leptospire

IV. VERFAHREN IM EINZELNEN

- 1) Enzymröhrchen homogenisieren, Oligomix, CP und CI-ARN Vortex-rühren und dann zentrifugieren.
- 2) Mastermix nach nachstehender Beschreibung zubereiten, N ist die Zahl der Reaktionen (einschließlich Positiv- und Negativkontrolle), die für mindestens N+3 Reaktionen ausreichende Menge Mastermix vorsehen* (je nach Fall auf Teil 1-a oder 1-b des vorangehenden Schemas Bezug nehmen).

Fall (a): Extraktion der Probe OHNE Zufügung von CI-ARN

Anzahl Reaktionen	1	N+3*
Enzyme	15 µl	(N+3) x 15 µl
Oligomix	5 µl	(N+3) x 5 µl
CI-ARN	1 µl	(N+3) x 1 µl
Mastermix-Gesamtvolumen	21 µl**	(N+3) x 21 µl

Fall (b): Extraktion der Probe MIT Zufügung von CI-ARN

Anzahl Reaktionen	1	N+3*
Enzyme	15 µl	(N+3) x 15 µl
Oligomix	5 µl	(N+3) x 5 µl
Mastermix-Gesamtvolumen	20 µl**	(N+3) x 20 µl

* Für eine Verwendung auf T-COR 8™-IVD empfehlen wir, ein Mastermix für N+1 Reaktionen für fallweise Verwendung des Kits zu bereiten.

**Die Differenz des Reaktionsvolumens zwischen Fall (a) und Fall (b) ist vernachlässigbar und hat keinen Einfluss auf die Leistungen.

- 17) Das bei 2) zubereitete Mastermix homogenisieren und kurz zentrifugieren.
- 18) 20 µl Mastermix** mittels einer Mikropipette und Filterspitzen in jedes Röhrchen / jeden Well einer Mikroplatte für Echtzeit-PCR zuteilen.
- 19) 5 µl der extrahierten Proben zufügen.
- 20) Gleichzeitig hierzu folgende Kontrollen durchführen (siehe diesen speziellen Punkt für T-COR 8™-IVD auf den Seiten 14 bis 17):
 - Positivkontrolle: 20 µl Mastermix + 5 µl Positivkontrolle CP
 - Negativkontrolle:
 - o Fall (a) Extraktion der Probe OHNE Zufügung von CI-ARN:
20 µl Mastermix + 5 µl mitgeliefertes Wasser (CN-H2O)
 - o Fall (b) Extraktion der Probe MIT Zufügung von CI-ARN
20 µl de Mastermix + 4 µl mitgeliefertes Wassers (CN-H2O) + 1µl CI-ARN
- 21) Zur Vermeidung jeglicher Kontamination die Röhrchen oder die Platte sofort mit Klebefolie verschließen.
- 22) Kurz zentrifugieren, um das Reaktionsgemisch auf dem Boden der Röhrchen oder den Wells der Platte zu sammeln.
- 23) Folgendes Programm auf dem Echtzeit-PCR-Instrument erstellen (auf T-COR 8™-IVD wird auf Grund der Barcodes keine manuelle Programmierung benötigt - siehe Seiten 18 bis 20). Das Programm dauert ungefähr 1h15.

Programm	Temperatur	Dauer	Zyklen	
Reverse Transskription	50°C	10 min	1	-
Denaturierung	95°C	3 min	1	-
Amplifikation	95°C	10 s	45	-
	60°C	30 s		Fluoreszenz-Erfassung

Gebrauchsanleitung EurobioPlex Leptospire

Hinweis 1: Auf LightCycler® 480 (Roche) existieren 2 optische Systeme, wobei nur das „System II“ mit der Verwendung des Kits kompatibel ist. Eine Farbkompensation für die Wellenlängen Texas Red-Cy5 (533-610, 618-660) anwenden.

Hinweis 2: Bei den Geräten von Applied Biosystems ist „NONE“ unter „PASSIVE REFERENCE“ zu wählen.

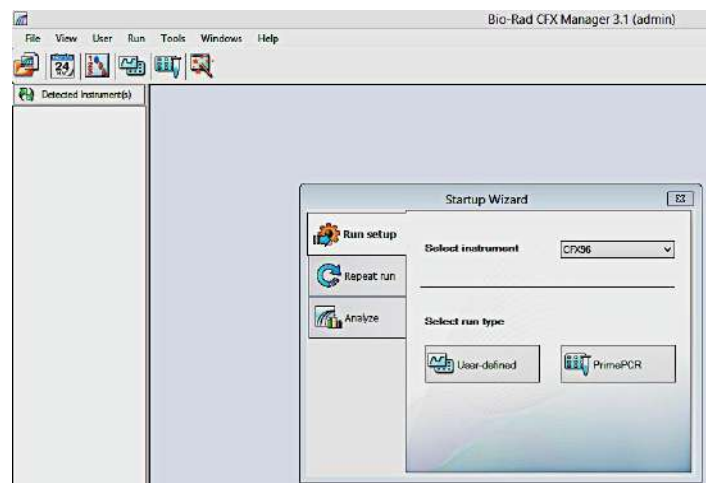
Hinweis 3: Bei Rotorgene™ nach Klicken auf „GAIN OPTIMISATION“ das Signal kalibrieren.

Hinweis 4: Bei CFX96™ (Bio-Rad) ab Version 1.6 oder einer späteren Version den Lauf starten, und dann mit der Version 3.1 analysieren (siehe § Validierung der Experimente).

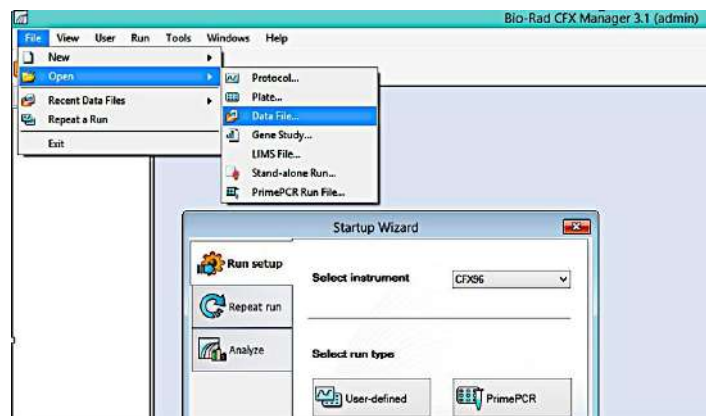
11. VALIDIERUNG DER EXPERIMENTE

Die Auswertung der erfassten Daten auf einem Gerät PCR CFX96™ (Bio-Rad) muss mit der Version 3.1 der Software CFX Manager (Bio-Rad) erfolgen. Um von einem auf einer früheren Version gestarteten Lauf auf diese Version überzuwechseln, folgendermaßen vorgehen: Nach Beenden des Laufs muss die Datei (des Typs .prcd) geöffnet und mit der Version 3.1 des CFX Manager (Bio-Rad) ausgewertet werden.

War der Lauf zum Beispiel mit der Software CFX Manager v1.6 gestartet worden, zum Öffnen einer Datei mit der Software CFX Manager v3.1 auf das Symbol von CFX Manager v3.1 klicken. Das Empfangsmenü kommt zur Anzeige.



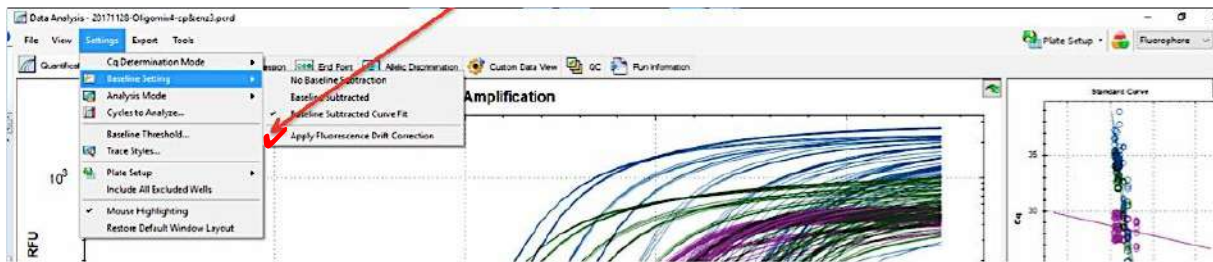
- Auf „File“ klicken und „Open“ und danach „Data File“ wählen.



- Die auszuwertende Datei wählen und auf „Open“ klicken.

Gebrauchsanleitung EurobioPlex Leptospire

Die Option „drift correction“ muss, wie im nachstehenden Bild im Tab „Settings“ angewendet werden: auf das Tab „Settings“ klicken, danach auf „Baseline Setting“ und auf „Apply Fluorescence Drift Correction“.



Nach Ausführung dieses Schritts kann die Auswertung beginnen.

Für eine gültige Dosierung müssen für die Kontrollen die nachfolgenden Werte von Ct erhalten werden (Tabelle 4), andernfalls können die Experimente nicht validiert werden.

Bei T-COR 8™-IVD ist es zur richtigen Verwendung nötig, die Kontrollen nur bei der ersten Verwendung eines neuen Kits durchzuführen, regelmäßige Kontrollen können in der Folge ausgeführt werden.

Tabelle 4:

Positivkontrolle	
TEXAS RED	Ct < 27
Negativkontrolle	
TEXAS RED	Ct unbestimmt
CY5	Ct ≤ 45

Bei T-COR 8™-IVD erfolgt die Auswertung automatisch mit den Barcodes.

12. DATENANALYSE UND AUSWERTUNG

Für klinische Proben sind folgende Ergebnisse möglich:



***Ct -Schwelle für positives Ergebnis der Proben:
Canal TEXAS RED Leptospire: + Positiv=> Ct ≤ 45**

PCR-Signal		Gültigkeit des Tests/Anmerkung	
TEXAS RED	CY5	Leptospira	
+	+	Positiv	Gültig
-	+	Negativ	Gültig
+	-	Positiv	Mögliche Inhibition von Extraktion oder RT-PCR, welche die Detektion der Bakterie nicht verhindert; gültig
-	-	Nicht interpretierbar	Problem bei Extraktion oder Inhibition von RT-PCR - die Probe fünffach verdünnen; bei gleichem Ergebnis die Probe erneut extrahieren.

Gebrauchsanleitung EurobioPlex Leptospire

13. LEISTUNGSANALYSE

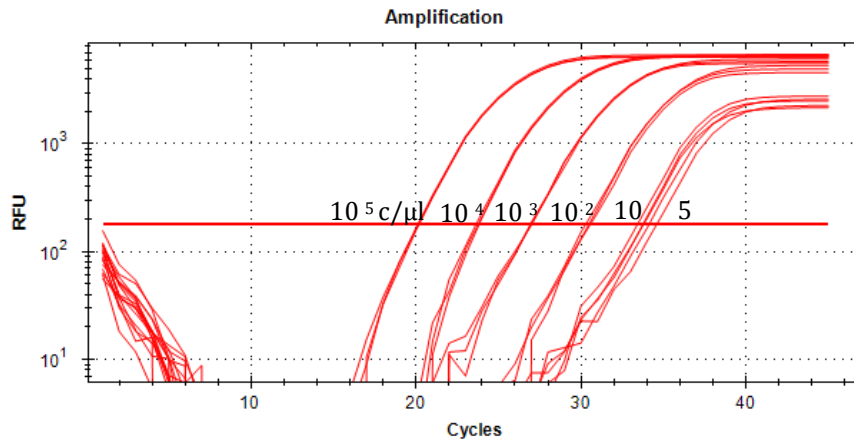
Nachweisgrenze/analytische Sensitivität:

5 CP-Kopien/µl (1 Kopie von *Leptospira* = 5 äquivalente Genomkopien (Bourhy et al. 2011)).

Auf dem Bakterienstamm *Leptospira interrogans*: 100 Bakterien/ml im Plasma

250 Bakterien/ml im Serum und 500 Bakterien/ml im Urin.

Beispiel eines auf dem Echtzeit-PCR-Thermocycler CFX96™ (Bio-Rad) durchgeführten Experiments:



Reproduzierbarkeit des Signals auf dem Leptospira-Kanal (Texas Red)

Reproduzierbarkeit	Variationskoeffizient (%) auf Positivkontrolle	Variationskoeffizient (%) auf RNA
Inter-Lauf	1,35	2,44
Inter-Läufe	5,15	2,04
Inter-Chargen	1,83	2,45

Spezifität: > 99 %

Die Spezifität wurde mit insgesamt 98 extrahierten, vorgetesteten und als negativ für *Leptospira* bestätigten Proben bewertet. 45 dieser Proben waren als positiv für folgende Erreger bekannt:

- *Neisseria meningitidis* (n=5)
- *Streptococcus pneumoniae* (n=5)
- *Haemophilus influenzae b* (n=1)
- *Pseudomonas aeruginosa* (n=4)
- *Streptococcus agalactiae* (n=1)
- *Escherichia coli* (n=4)
- *Legionella pneumophila* (n=1)
- *Bartonella* (n=5)
- *Coxiella* (n=3)
- *Staphylococcus aureus* (n=1)
- *Mycobacterium avium* (n=1)
- *Staphylococcus oralis/mitis/sanguis* (n=1)
- *Francisella tularensis* (n=1)
- *Klebsiella kingae* (n=2)

Gebrauchsanleitung EurobioPlex Leptospire

- *Tropheryma whipplei* (n=1)
- *Chikungunya* (n=1)
- Dengue (n=1 Dengue 1+ n=1 Dengue 2+ n=1 Dengue 3+ n=1 Dengue 4+ n=3 unbekannten Serotyps)
- Zikavirus (n=1)

Mit diesen Pathogenen wurden somit keine Kreuzreaktionen beobachtet.

Empfindlichkeit: > 99 %

Die Empfindlichkeit wurde mit insgesamt 50 vorgetesteten und als positiv für *Leptospira* bestätigten Proben bewertet, davon 39 von Plasma erhalten aus Blut/EDTA und 11 von Urin.

	PCR-Eurobio		
	Positiv	Negativ	Gesamt
PCR-Referenz			
Positiv	50	0	50
Negativ	0	98	98
Gesamt	50	98	148

Die insgesamte Konkordanz ist > 99 %.

Die Tests wurden auf CFX96™ durchgeführt.

Die Extraktion wurde mit dem Nukleinsäure-Extraktionsgerät NucliSENS easyMAG (Biomérieux) unter Befolgung der Anweisungen seines Lieferanten durchgeführt.

14. MIT DEM ECHTZEIT-PCR-INSTRUMENT T-COR 8™-IVD VERBUNDENE BESONDERHEITEN

Das T-COR 8™-IVD ist ein Echtzeit-PCR-Instrument mit 8 programmierbaren Wells, die unabhängig voneinander für einzelne Patienten mit verschiedenen Tests, Dosierungen pro Assay, thermischen Programmen und PCR-Startzeiten verwendet werden können.

Die 8 Wells können aber auch gleichzeitig mit der gleichen Dosierung pro Assay verwendet werden.

Hinweis: Nach Einbringen der Probe in das Röhrchen bei mehrfachem Hin- und Herpipettieren gut mischen, dabei Blasenbildung vermeiden und sicherstellen, dass sich das Flüssigkeitsvolumen richtig auf dem Boden des Röhrchens befindet. Jedes Röhrchen nach Einbringen der Kontrolle oder der Probe gut verschließen, um jegliche Kontamination zu vermeiden.

Kontrollen

Bei T-COR 8™-IVD ist es zur richtigen Verwendung nötig, die Kontrollen nur bei der ersten Verwendung eines neuen Kits durchzuführen, regelmäßige Kontrollen können in der Folge ausgeführt werden.

In der Folge ermöglicht die Kontrolle der RT-PCR-Inhibition (CI-ARN) sicherzustellen, dass in der geprüften Probe keine Inhibition der RT-PCR vorliegt, dass die Extraktion richtig abgelaufen ist und die PCR richtig funktioniert

Gebrauchsanleitung EurobioPlex Leptospire

Patiententests

<i>Mit einmaliger Validierung von Positiv- und Negativkontrollen bei der ersten Verwendung</i>	24 Reaktionen
Mögliche Anzahl von Patient auf Patient erfolgreicher Patiententests mit maximal 12 mal Auftauen und Einfrieren (3 mal pro Röhrchen /4 Röhrchen pro Reagenz)	12 Patienten

Fluorophore

Auf dem T-COR 8™-IVD sind 4 Fluorophor-Kombinationen möglich.

Für alle EBX, darunter EBX-005, wird die Kombination FAM/HEX/Texas Red/Cy5 gewählt. Wenn in gewissen Kits gewisse Kanäle nicht verwendet werden, sind diese bei der Analyse der Ergebnisse nicht zu berücksichtigen.

Verwendung von Bar-Codes (verfügbar auf Seiten 18 bis 20)

- 1- Das Menü > Neue Analyse/ New Run wählen
- 2- Barcode wählen
- 3- Auf der rechten Seite des Geräts den gewünschte Barcode einscannen:
 - für Positivkontrolle (Barcode EBX-005 Pos Ctrl) oder
 - für Negativkontrolle (Barcode EBX-005 Neg Ctrl) oder
 - für eine Probe (Assay-Barcode: EBX-005)

Das Instrument wählt automatisch einen der 8 verfügbaren Wells.. Die vom Instrument gegebenen Anweisungen befolgen.

- 4- Die Klappe des vom Gerät gewählten Wells x anheben und sicherstellen, dass die blaue LED leuchtet, dann „Ja“ oder „Nein“ wählen.
- 5- Das Röhrchen im entsprechenden Well positionieren, die Klappe schließen und „Weiter/Next“ wählen.
- 6- Soll eine Benennung (optional) vorgenommen werden, „Probe x/sample x“ wählen und die Probe benennen. „Akzeptieren/Accept“ wählen.
- 7- „Weiter/Next“ wählen.
- 8- Um eine weitere Kontrolle oder Probe zuzufügen/zu testen „Well zufügen/Add well“ wählen und wieder bei Punkt 3 beginnen.
- 9- „Lauf starten/Start run“ wählen.

Hinweis: Die Benennung einer Probe oder eines Laufs kann nicht nach dem Lauf geändert oder zugefügt werden. Sie muss vor dem Lauf oder bei dessen Ablauf erfolgen.

Darstellung und Interpretation der Ergebnisse

Die Ergebnisse für die Ct-Werte und die Amplifikationskurven sind unter „SmartCT™-Tabelle/SmartCT™ Table“ (jedem Kanal zugeteilte Ct-Werte) und den Ct-Diagrammen als Funktion der Zyklen auf jedem Kanal verfügbar. Beide werden in Echtzeit auf dem Gerät angezeigt.

Automatisch wird eine Analyse für die Negativ- und Positivkontrollen, sowie für die Proben erzeugt. Letztere ist unter „Interpretationen/Interpretations“ am Ende des Laufs im Fenster „Ansicht/View“ verfügbar.

Für die Positiv- und Negativkontrolle sind folgende Ergebnisse möglich:

„Neg Ctrl Fail“: Ungültig
„Neg Ctrl Valid“: Gültig
„Pos Ctrl Fail“: Ungültig
„Pos Ctrl Valid“: Gültig

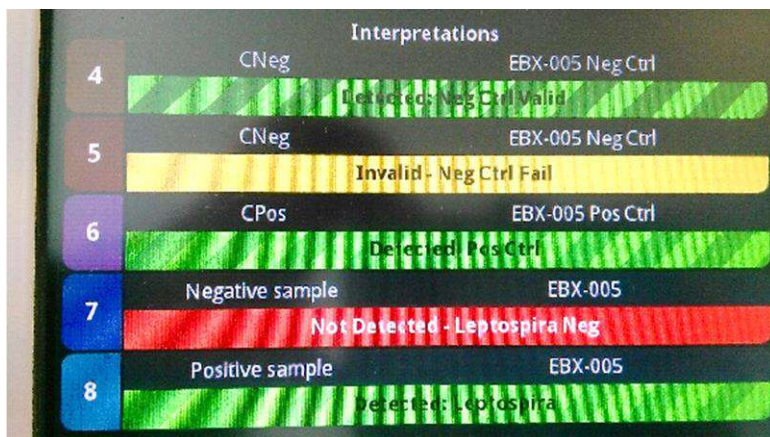
Bestimmung des Probenzustands:

„Nachgewiesen/Detected“: Positiv → grün gerahmt
„Nicht nachgewiesen/Not detected“: Negativ → rot gerahmt
„Ungültig/Invalid“ -> erneut testen → orange gerahmt

Darstellungsbeispiel der automatischen Präsentation der Ergebnisse auf dem Instrument und im Bericht:

- Beispiel für gültige Negativkontrolle (Well 4) und Positivkontrolle (Well 6) angezeigt als „Detected /Nachgewiesen“, für ungültige Negativkontrolle „Invalid/Ungültig“ (Well 5), für negative Probe „Not Detected/Nicht nachgewiesen“ (Probe Well 7) und für eine positive Probe für das genannte Ziel Leptospira (Detected/Nachgewiesen Leptospira) (Probe Well 8):

❖ Auf dem Bildschirm des Instruments:

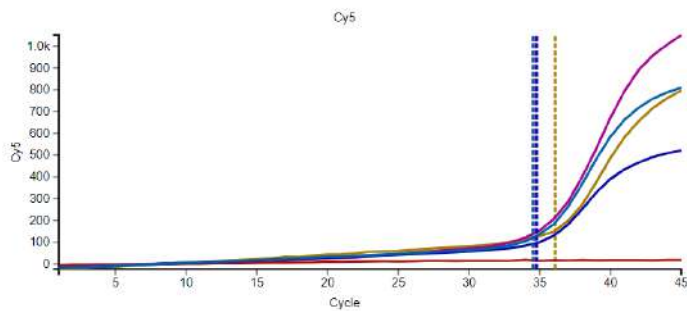
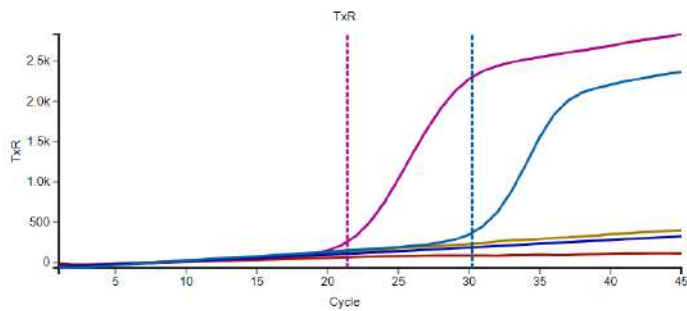


❖ Im Bericht:

Gebrauchsanleitung EurobioPlex Leptospire

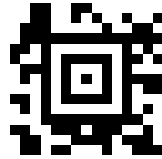
Summary							
Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5	Call
4	CNeg	EBX-005 Neg Ctrl				36.1	Detected • Neg Ctrl Valid
5	CNeg	EBX-005 Neg Ctrl					Invalid
6	CPos	EBX-005 Pos Ctrl				21.4 34.7	Detected • Pos Ctrl
7	Negative sample	EBX-005				34.8	Not Detected
8	Positive sample	EBX-005				30.2 34.5	Detected • Leptospira
							Leptospira Neg

Beispiel von Amplifikationskurven

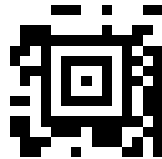


Barcodes auf T-COR8™-IVD für EBX-005

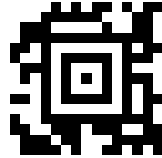
EBX-005 Pos Ctrl
Positivkontrolle CP



EBX-005 Neg Ctrl
Wasser = Negativkontrolle (CN-H2O)



Assay: EBX-005



15. QUALITÄTSKONTROLLE

In Einklang mit dem nach ISO EN 13485 zertifizierten Qualitätsmanagementsystems von Eurobio Scientific wird jede Charge von EurobioPlex Leptospire nach vordefinierten Spezifikationen getestet, um gleichbleibende Qualität der Produkte zu gewährleisten.

16. LITERATURVERZEICHNIS

- Giry C, Roquebert B, Li-Pat-Yuen G, Gasque P, Jaffar-Bandjee M.C. Simultaneous detection of chikungunya virus, dengue virus and human pathogenic *Leptospira* genomes using a multiplex TaqMan® assay. BMC Microbiol. 2017;17(1):105.
- Perez J, Goarant C. Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. BMC Microbiol. 2010;10:325.
- Goarant C, Laumond-Barny S, Perez J, Vernel-Pauillac F, Chanteau S, Guigon A. Outbreak of leptospirosis in New Caledonia: diagnosis issues and burden of disease. Trop Med Int Health. 2009;14(8):926-9.
- Tubiana S, Mikulski M, Becam J, Lacassin F, Lefèvre P, Gourinat AC, Goarant C, D'Ortenzio E. Risk factors and predictors of severe leptospirosis in New Caledonia. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(1):e1991.
- van de Werve C, Perignon A, Jauréguiberry S, Bricaire F, Bourhy P, Caumes E. Travel-related leptospirosis: a series of 15 imported cases. J Travel Med. 2013;20(4):228-31.
- Hochedez P, Escher M, Decoussy H, Pasgrimaud L, Martinez R, Rosine J, Théodose R, Bourhy P, Picardeau M, Olive C, Ledrans M, Cabie A. Outbreak of leptospirosis among canyoning participants, Martinique, 2011. Euro Surveill. 2013;18(18):20472.
- Bourhy P, Herrmann Storck C, Theodose R, Olive C, Nicolas M, Hochedez P, Lamaury I, Zinini F, Brémont S, Landier A, Cassadou S, Rosine J, Picardeau M. Serovar diversity of pathogenic *Leptospira* circulating in the French West Indies. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(3):e2114.
- Bourhy P, Brémont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M. Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. J Clin Microbiol. 2011;49(6):2154-60.
- Legkoby T, David DJ, Lee Robin SH. Diagnostic biologique de la leptospirose, Avis sur les actes, Haute autorité de santé, service évaluation des actes professionnels, www.has-santé.fr
- Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. FEMS Microbiol Lett. 2005;249(1):139-47.
- Levett PN. Sequence-based typing of *leptospira*: epidemiology in the genomic era. PLoS Negl Trop Dis. 2007;1(2):e120.
- Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. J Med Microbiol. 2005 Jan;54(Pt 1):45-9.
- Slack A. Leptospirosis. Aust Fam Physician. 2010 Jul;39(7):495-8. Review.

- Stoddard RA. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through real-time PCR (qPCR) targeting the LipL32 gene. *Methods Mol Biol.* 2013;943:257-66.
- Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu LF, Jiang HQ, Jia J, Tu YF, Jiang JX, Gu WY, Zhang YQ, Cai Z, Sheng HH, Yin HF, Zhang Y, Zhu GF, Wan M, Huang HL, Qian Z, Wang SY, Ma W, Yao ZJ, Shen Y, Qiang BQ, Xia QC, Guo XK, Danchin A, Saint Girons I, Somerville RL, et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature.* 2003;422(6934):888-93.
- Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, Recommandations de bonnes pratiques, www.has-santé.fr

17. ENTSORGUNG VON ABFÄLLEN

Alle Abfälle sind unter Einhaltung der Rechtsvorschriften für infektiöse klinische Abfälle zu entsorgen.

18. MELDUNG VON UNFÄLLEN ODER EREIGNISSEN

Jeder mit dem vorliegenden Produkt verbundene schwere Unfall muss EUROBIO SCIENTIFIC und der zuständigen Behörde des Mitgliedsstaats, in dem der Benutzer und/oder Patient ansässig ist, gemeldet werden.

19. TECHNISCHER BEISTAND

Zur technischen Unterstützung für unsere Produkte treten Sie bitte mit unserem technischen Support in Verbindung.

Der Kundendienst von EUROBIO SCIENTIFIC kann elektronisch (E-Mail) an der Adresse adv@eurobio-scientific.com oder telefonisch unter +33 (0)1.69.07.94.77 kontaktiert werden.



eurobio
SCIENTIFIC

7, avenue de Scandinavie
ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis
FRANKREICH



EurobioPlex *Leptospire*

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

REF **EBX-005A**
 EBX-005-48
 EBX-005-24



96/48/24 reacciones



Validado en:

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) con análisis en CFX Manager versión 3.1 (Bio-Rad)
- LightCycler®480 Instrument II (Roche) con análisis en LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- T-COR 8™-IVD (Tetracore Inc.) con T-COR 8 SmartCT™ (auto v1) software



Instrucciones de uso

Disponible en www.eurobio-scientific.com

El organismo notificado certificador pondrá a disposición el Resumen de las Características de Seguridad y Eficacia (RCSP) en EUDAMED, cuando éste se encuentre operativo. También se podrá obtener a petición.

Instrucciones de uso EurobioPlex Leptospire

Índice

1. INFORMACIÓN GENERAL	76
2. DESTINO DEL DISPOSITIVO	78
3. SÍMBOLOS.....	79
4. PRINCIPIO.....	80
5. COMPONENTES DEL KIT.....	81
6. CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO	81
7. MATERIAL NECESARIO NO SUMINISTRADO:	81
8. INSTRUMENTO DE PCR EN TIEMPO REAL	82
9. ADVERTENCIA Y PRECAUCIONES.....	82
10. PROTOCOLO	83
I. RECOGIDA DE MUESTRAS	83
II. EXTRACCIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS	83
III. REALIZACIÓN DE LA RT-PCR EN TIEMPO REAL.....	83
IV. PROCEDIMIENTO DETALLADO	85
11. VALIDACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	86
12. ANÁLISIS DE DATOS E INTERPRETACIÓN	87
13. ANÁLISIS DE EFICACIA	88
14. PECULIARIDADES RELACIONADAS CON EL INSTRUMENTO DE PCR EN TIEMPO REAL T-COR 8TM-IVD.....	89
15. CONTROL DE CALIDAD.....	96
16. BIBLIOGRAFÍA	96
17. ELIMINACIÓN DE RESIDUOS.....	97
18. NOTIFICACIÓN DE INCIDENTES.....	97
19. ASISTENCIA TÉCNICA	97

1. INFORMACIÓN GENERAL

Las leptospirosis, a veces denominadas « *enfermedad de las ratas* » son enfermedades infecciosas de origen bacteriano, causadas por leptospiros. Las leptospiros constituyen un grupo de bacterias a menudo agrupadas en la especie *Leptospira interrogans*. Esta enfermedad es ubicuitaria. Recientemente se ha registrado un considerable aumento del número de casos. En tanto que zoonosis, afecta a animales que viven cerca del hombre, tales como ratas o cerdos. La leptospira es un patógeno para el ser humano.

En la mayoría de las regiones del mundo, se supone que los micromamíferos (ratas, ratones, etc.) son su reservorio salvaje. Parece que su orina es casi siempre la fuente directa o indirecta de las infecciones humanas. Pero, al igual que ocurre con el equinococo, la infección natural de los perros (*leptospirosis canina*) y otros cánidos también existe, probablemente muy subestimada, y constituye un riesgo para el ser humano. La leptospirosis se da en distintas partes del mundo, en la isla de Reunión, Wallis y Futuna, las Antillas, la Guayana Francesa, países tropicales, el sudeste asiático, Camboya, Vietnam, Laos. La leptospira incluso se ha detectado en Poitou Charente, en el sur y suroeste de Francia, cerca de explotaciones porcinas en regiones húmedas.

El amplio polimorfismo de los síntomas no específicos, y la diversidad de los órganos a los que afecta, hacen que el diagnóstico clínico resulte muy difícil. Además, existen formas agudas, subagudas y crónicas de la enfermedad que evolucionan de forma muy diferente con el tiempo, según las personas infectadas y los serovares (eventualmente nuevos o emergentes), y que se pueden atenuar mediante la vacunación. Existen muchos serovares (por ejemplo, icterohaemorrhagiae, canicola, pomona) que no tienen una firma antigénica homogénea, lo que dificulta el desarrollo de vacunas eficaces. La prueba PCR en tiempo real es muy importante para estudiar la epidemiología de la leptospirosis.

La leptospirosis se manifiesta de diversas formas, lo que dificulta su diagnóstico, ya que se puede confundir con una gripe grave (fiebre alta y dolor muscular). Puede comenzar con dolores difusos o localizados (por ejemplo: dolores meníngeos) que, si no se diagnostican a tiempo, conducen a una forma de hablar confusa y a la alteración del raciocinio (debido al alto nivel de urea que aumenta en la sangre como consecuencia de la insuficiencia renal). En algunos casos, se acompaña de ictericia (aproximadamente el 40% de los casos en las trincheras durante la Primera Guerra Mundial) y/o nefritis. Tras la diálisis y los antibióticos, el paciente se recupera en 5-6 semanas, si la enfermedad ha sido leve (aunque se pueden detectar bacterias en la orina del paciente varias semanas después de la desaparición de los síntomas). En caso contrario, la leptospirosis puede evolucionar hacia hemorragias violentas - a veces letales - o una enfermedad grave de los riñones. Las formas poliviscerales se dan en "terrenos" debilitados.

Según las recomendaciones de la OMS, la confirmación biológica de la leptospirosis se basa en el aislamiento de la bacteria o en la identificación de sus ácidos nucleicos en muestras biológicas, o bien en una serología positiva en un contexto clínico y epidemiológico evocador. La utilización del cultivo bacteriano es muy limitado debido a las dificultades de realización y al tiempo necesario para el crecimiento de las bacterias.

La serología es la prueba más utilizada para el diagnóstico de la leptospirosis. No existe ningún antígeno estandarizado a nivel nacional ni internacional para la detección de anticuerpos contra las leptospiros.

Existen numerosas pruebas para la detección de la leptospirosis, que se pueden agrupar en dos tipos: pruebas de detección directa (identificación de la bacteria o de moléculas bacterianas, entre ellas el ADN, mediante PCR en tiempo real) y pruebas que detectan la respuesta humoral del paciente (pruebas serológicas). La prueba de microaglutinación (MAT) es la técnica serológica de

Instrucciones de uso EurobioPlex Leptospire

referencia para la confirmación de la leptospirosis. La prueba serológica se utiliza para detectar anticuerpos de clase IgM mediante ELISA o en tiras.

La detección precoz de la leptospirosis se puede realizar mediante PCR en tiempo real, generalmente utilizando el plasma preparado a partir de la sangre del paciente, que da mejores resultados que el suero. El momento óptimo para la extracción de la sangre es antes de que transcurran 8 días de la enfermedad. No tiene ningún interés realizar la prueba PCR en tiempo real en sangre más allá de 10 días después de la aparición de la sintomatología de la enfermedad (fin del período de bacteriemia). La Haute Autorité de Santé (HAS) (Alta Autoridad Sanitaria) ha indicado que la prueba PCR simple (no en tiempo real) no tiene ningún interés en el diagnóstico biológico específico de la leptospirosis. La HAS considera que la técnica de PCR en tiempo real es actualmente la más interesante para el diagnóstico biológico específico precoz de la leptospirosis. Se debe reservar para los primeros 8 días tras la aparición de la fiebre, y se debe realizar en una muestra de sangre tomada preferiblemente antes del inicio de la terapia antibiótica. Debido a la baja concentración habitual de leptospiras en sangre, en el caso de las PCR en tiempo real negativas se debe realizar una exploración serológica.

2. DESTINO DEL DISPOSITIVO

EurobioPlex Leptospire es una prueba de amplificación mediante transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en tiempo real, diseñada para la detección cualitativa de la presencia o la ausencia de leptospira mediante la amplificación de ácidos nucleicos de este patógeno en un extracto de ácidos nucleicos. La prueba está indicada para realizar un diagnóstico presuntivo de infección por leptospira en humanos, o para complementar un diagnóstico probado o indeterminado. El extracto es el material de partida para el kit EurobioPlex Leptospire.

Este sistema ha sido validado en los siguientes tipos de muestras:

- Plasma
- Suero
- Orina

El test EurobioPlex Leptospire es un dispositivo médico de diagnóstico *In Vitro*, y debe ser utilizado por personal cualificado de laboratorio de análisis de biología médica. Este dispositivo no debe reciclarse después de su uso.

Este dispositivo no está diseñado para ser utilizado para la detección de leptospira en bancos de sangre o de órganos.

Instrucciones de uso EurobioPlex Leptospire

3. SIMBOLOS



Referencia



Número de lote



Límite de temperatura



Fecha de caducidad



Contenido suficiente para «N» reacciones



Fabricante



Fecha de fabricación



Producto con marcado CE



Diagnóstico in vitro



Modo de empleo



Atención



No utilizar si el envase está dañado



Conservar protegido de la luz

Instrucciones de uso EurobioPlex Leptospire

4. PRINCIPIO

EurobioPlex Leptospire es un test de amplificación de ácidos nucleicos de leptospira, así como de un control de extracción e inhibición RT-PCR encapsulado, que utiliza la amplificación mediante RT-PCR en tiempo real. La prueba se realiza en el extracto de la muestra mediante una única reacción en un único pocillo/tubo.

El control de extracción e inhibición de RT-PCR (CI-ARN) permite determinar posibles variaciones que se pueden producir durante las etapas de extracción de ARN y ADN de muestras biológicas y de amplificación mediante PCR en tiempo real. De este modo, permite garantizar que un resultado negativo no pueda deberse a una extracción incorrecta de ADN y ARN y/o a la presencia de una cantidad excesiva de inhibidores de la PCR.

Los ácidos nucleicos de leptospira se detectan mediante una sonda marcada con rojo TEXAS (TEXAS RED). El control de extracción e inhibición de la RT-PCR se detecta mediante una sonda marcada con Cy5. Durante la elongación del producto de amplificación, las sondas emiten una fluorescencia específica tras su hidrólisis. La medición de las intensidades de fluorescencia en tiempo real se refiere a la acumulación de productos de amplificación específicos.

Tabla 1: Detección de objetivos según los fluoróforos

Objetivo	Fluoróforo	Excitación	Emisión
Leptospira	Texas Red	485 nm	605 nm
Control de extracción e inhibición de PCR (CI-ARN)	Cy5	647 nm	667 nm

Canales equivalentes en diferentes instrumentos de PCR:

- Canal **Texas Red** (Sistemas ABI, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96™, Sistemas Mx, T-COR 8™-IVD), LC Red 610 (LC480®), Canal Orange (RotorGene)
- Canal **Cy5** (Sistemas ABI, Chromo 4/CFX96™, Sistemas Mx, T-COR 8™-IVD), Canal Alexa647 (SmartCycler II), Canal 660 (LC 480), Canal Red (RotorGene)

Nota: En LC480 instrumento II: Aplicar una compensación de color para las longitudes de ondas TexasRed-Cy5 (533-610, 618-660).

Instrucciones de uso EurobioPlex Leptospire

5. COMPONENTES DEL KIT

El kit de RT-PCR en tiempo real EurobioPlex Leptospire está preparado para su uso para la detección específica de leptospira.

La fluorescencia es emitida y medida individualmente por un sistema óptico durante la prueba PCR. La detección de los fragmentos amplificados se realiza mediante un fluorómetro, utilizando los canales indicados en la Tabla 1.

El kit contiene los reactivos y las enzimas necesarios para la amplificación de los ácidos nucleicos de leptospira, y del control de extracción e inhibición de RT-PCR (Tabla 2).

Tabla 2: Componentes del kit

Color del tapón	Contenido del kit	EBX-005A (96 pruebas)	EBX-005-48 (48 pruebas)	EBX-005-24 (24 pruebas)	Reconstitución
Rojo	Enzimas	2 X 1100µl	1100µl	4 x 130µl	Preparado para su uso
Transparente	Oligomix	2 X 400µl	400µl	4 x 50µl	Preparado para su uso
Azul	Agua = control negativo (CN-H2O)	2 x 1 ml	1 ml	1 ml	Preparado para su uso
Amarillo	Control positivo Leptospira (CP)	2 x 150 µl	150 µl	4 x 20 µl	Preparado para su uso
Blanco	Control de extracción e inhibición de RT-PCR (CI-ARN)	2 x 650 µl	650 µl	4 x 80 µl	Preparado para su uso

6. CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Todos los reactivos se deben almacenar entre -15°C y -22°C.

Todos los reactivos se pueden utilizar hasta la fecha de caducidad que figura en la etiqueta del kit.



Se deben evitar varios ciclos de congelación / descongelación (>3x), ya que esto podría reducir la sensibilidad del análisis.

7. MATERIAL NECESARIO NO SUMINISTRADO:

- Cabina de bioseguridad
- Aparato de PCR en tiempo real
- Centrifugadora para microtubos
- Vórtex
- Placas/tubos para reacción PCR en tiempo real
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas con filtro sin RNAsa y DNAsa
- Microtubos estériles
- Guantes (sin talco)
- Pipeteador automático tipo MICROLAB NIMBUS IVD® (Hamilton).

Instrucciones de uso EurobioPlex Leptospire

8. INSTRUMENTO DE PCR EN TIEMPO REAL

El kit EurobioPlex Leptospire ha sido desarrollado y validado para ser utilizado con los siguientes instrumentos de PCR en tiempo real:

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) con análisis en CFX Manager versión 3.1 (Bio-Rad)
- LightCycler®480 Instrument II (Roche) con análisis en LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- T-COR 8™-IVD (Tetracore Inc.) con T-COR 8 SmartCT™ (auto v1) software

9. ADVERTENCIA Y PRECAUCIONES



Leer detenidamente estas instrucciones antes de iniciar el procedimiento.

- ◇ Este experimento debe ser realizado por técnicos de laboratorio de análisis de biología médica.
- ◇ Asegurarse de que los instrumentos han sido instalados, calibrados y mantenidos según las recomendaciones del fabricante.
- ◇ El usuario asume su responsabilidad a la hora de utilizar equipos distintos de los validados, en cuyo caso no se garantiza la eficacia.
- ◇ Las muestras clínicas deben considerarse material potencialmente infeccioso, y deben prepararse bajo una campana de flujo laminar.
- ◇ Este experimento se debe realizar de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio.
- ◇ No utilizar este kit después de la fecha de caducidad que figura en la etiqueta.
- ◇ Evitar la exposición prolongada de los reactivos a la luz, limitada al tiempo técnico necesario para la preparación de la placa PCR, de lo contrario no se garantiza la eficacia.
- ◇ El kit se envía con hielo seco, y los componentes del kit deben llegar congelados. Si uno o varios componentes llegan descongelados, o si los tubos se han dañado durante el transporte, póngase en contacto con Eurobio Scientific.
- ◇ Una vez descongelados los reactivos, centrifugar los tubos brevemente antes de utilizarlos.
- ◇ Se recomienda establecer tres zonas de trabajo distintas: 1) Aislamiento de ARN/ADN, 2) Preparación de la mezcla de reacción y 3) Amplificación/Detección de los productos amplificados.
- ◇ Se deben llevar batas y guantes (sin talco) distintos en cada zona de trabajo.
- ◇ Las pipetas, los reactivos y los demás materiales de trabajo no deben pasar de una zona a otra.
- ◇ Se debe prestar especial atención a la conservación de la pureza de los reactivos y las mezclas de reacción.
- ◇ Se deben utilizar métodos adecuados de preparación/extracción de los ácidos nucleicos para una producción de ARN/ADN de calidad y la aplicación de RT-PCR en tiempo real, especialmente para evitar la contaminación con RNasas/DNasas.
- ◇ Utilizar puntas para micropipetas con filtro, DNase-free y RNase-free.
- ◇ No pipetear con la boca. No comer, beber ni fumar en el laboratorio.
- ◇ No utilizar el dispositivo si el envase está dañado.
- ◇ Evitar los aerosoles.

Instrucciones de uso EurobioPlex Leptospire

10. PROTOCOLO

I. RECOGIDA DE MUESTRAS

- ◇ Recoger las muestras en tubos estériles.
- ◇  **Está prohibido el uso de heparina como anticoagulante.**
- ◇ El usuario debe asumir su responsabilidad de controlar sus propias condiciones de recogida, transporte, conservación y extracción de las muestras para garantizar que la extracción de ARN/ADN mediante sistemas adecuados produzca ARN/ADN de calidad.
- ◇ Se recomienda extraer las muestras inmediatamente o conservarlas según las recomendaciones de almacenamiento de muestras antes de la extracción (Tabla 3).

Tabla 3: recomendaciones de almacenamiento

Recomendaciones de almacenamiento máximo de las muestras antes de la extracción	
Temperatura ambiente	2 h
+4°C	1 semana
-20°C (preferiblemente -80°C)	Almacenamiento a largo plazo

Atención	
	◇ El usuario puede consultar las recomendaciones emitidas por la Organización Mundial de la Salud o la Haute Autorité de Santé a efectos del almacenamiento adecuado de las muestras. ◇ Los ARN extraídos se deben almacenar a -80°C ◇ El transporte de muestras clínicas está sujeto a la reglamentación local para el transporte de agentes infecciosos.

II. EXTRACCION DE LOS ACIDOS NUCLEICOS

Los usuarios son responsables de asegurarse de que el sistema de extracción de los ácidos nucleicos utilizado sea compatible con la tecnología RT-PCR en tiempo real. Para este kit, recomendamos la utilización de métodos de extracción de ácidos nucleicos a partir de muestras de plasma u orina, y la consulta de las instrucciones del proveedor del kit de extracción utilizado.

En el kit Leptospire, el CI-ARN en el canal CY5 se puede añadir antes de la extracción o en la reacción de PCR. Permite garantizar que un resultado negativo no pueda deberse a un problema de extracción o a la presencia de una cantidad excesiva de inhibidores de RT-PCR para validar la prueba. Recomendamos la adición de 10 µl de CI-ARN por extracción y un volumen de elución de 50 µl. Si el CI-ARN sólo se añade para controlar la RT-PCR, se añade a la mezcla de reacción (1 microlitro por reacción PCR). Para obtener más detalles consulte el Protocolo de PCR en tiempo real.

El CI-ARN también está disponible en Eurobio Scientific (Ref EurobioPlex EBX-003).

III. REALIZACION DE LA RT-PCR EN TIEMPO REAL

Observación general:

El control positivo, así como el control de extracción y amplificación mediante RT-PCR (CI-ARN) contienen elevadas concentraciones de matriz. Las manipulaciones se deben realizar cuidadosamente para evitar cualquier contaminación. Para controlar el correcto funcionamiento de la PCR, es necesario probar el control positivo CP, así como un control negativo (agua suministrada = CN-H2O + CI-ARN) (ver II-2/6) del protocolo de RT-PCR en tiempo real).

En T-COR 8™-IVD, para una correcta utilización del kit, es necesario que estos controles se realicen sólo en el primer uso de un nuevo kit, posteriormente se pueden realizar controles regulares.

Instrucciones de uso EurobioPlex Leptospire

Esquema del procedimiento:

1 - PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE REACCIÓN / MASTERMIX

(a) En caso de Muestras extraídas sin CI-

Número de reacciones	N+3*
Enzimas	(N+3) x 15 µl
Oligomix	(N+3) x 5 µl
CI-ARN	(N+3) x 1 µl
Volumen total Mastermix	(N+3) x 21 µl**

(b) En caso de Muestras extraídas con CI-

Número de reacciones	N+3*
Enzimas	(N+3) x 15 µl
Oligomix	(N+3) x 5 µl
Volumen total Mastermix	(N+3) x 20 µl**

*N+1 en T-COR 8™-IVD

2 - PREPARACIÓN DE LAS REACCIONES

Muestra

20 µl de Mastermix
+
5µl muestra extraída

Control positivo

20 µl de Mastermix
+
5µl CP

Control negativo

20 µl de Mastermix
+
5µl Agua de biología molecular
(CN-H₂O)

Muestra

20 µl de Mastermix
+
5µl muestra extraída

Control positivo

20 µl de Mastermix
+
5µl CP

Control negativo

20 µl de Mastermix
+
4µl Agua de biología molecular (CN-H₂O)
+
1 µl CI-ARN

3 - INSTRUMENTO PCR EN TIEMPO REAL (excepto T-COR 8™-IVD- programación automática con códigos de barras - ver p. 18 a 20)

Programa	Temperatura	Duración	Ciclo(s)	
Transcripción inversa	50 °C	10 min	1	-
Desnaturalización	95°C	3 min	1	-
Amplificación	95°C	10 s	45	-
	60°C	30 s		Adquisición de fluorescencia

Instrucciones de uso EurobioPlex Leptospire

IV. PROCEDIMIENTO DETALLADO

- 1) Homogeneizar el tubo de Enzimas, y agitar en vórtex Oligomix, CP y CI-ARN, a continuación centrifugar.
- 2) Preparar la Mastermix tal como se indica a continuación, siendo N el número de reacciones (incluidos los controles positivo y negativo), prever la cantidad de Mastermix para N+3 reacciones como mínimo* (consultar la parte 1-a o 1-b del esquema anterior según el caso).

Caso (a): Extracción de la muestra SIN adición de CI-ARN

Número de reacciones	1	N+3*
Enzimas	15 µl	(N+3) x 15 µl
Oligomix	5 µl	(N+3) x 5 µl
CI-ARN	1 µl	(N+3) x 1 µl
Volumen total Mastermix	21 µl**	(N+3) x 21 µl

Caso (b): Extracción de la muestra CON adición de CI-ARN

Número de reacciones	1	N+3*
Enzimas	15 µl	(N+3) x 15 µl
Oligomix	5 µl	(N+3) x 5 µl
Volumen total Mastermix	20 µl**	(N+3) x 20 µl

* Para una utilización en T-COR 8TM-IVD, recomendamos realizar un Mastermix para N+1 reacciones para una utilización por partes del kit.

**La diferencia de volumen de reacción entre el caso (a) y el caso (b) es insignificante y no afecta a la eficacia.

- 24) Homogeneizar el Mastermix preparado en el punto 2) y centrifugar brevemente.
- 25) Dispensar 20 µL del Mastermix** con una micropipeta y puntas con filtro en cada tubo/pocillo de microplaca para PCR en tiempo real.
- 26) Añadir 5 µL de las muestras extraídas.
- 27) Simultáneamente realizar los siguientes controles (ver este punto específico para T-COR 8TM-IVD páginas 14 a 17):
 - Control positivo: 20 µL de Mastermix + 5 µL de control positivo CP
 - Control negativo:
 - Caso (a) Extracción de la muestra SIN adición de CI-ARN:
20µL de Mastermix + 5µL de agua suministrada (CN-H2O)
 - Caso (b) Extracción de la muestra CON adición de CI-ARN:
20µL Mastermix + 4µL agua suministrada (CN-H2O) + 1µL IC-ARN
- 28) Sellar inmediatamente los tubos o la placa con film adhesivo para evitar cualquier contaminación.
- 29) Centrifugar brevemente para recoger la mezcla de reacción en el fondo de los tubos o de los pocillos de la microplaca.
- 30) Realizar el siguiente programa en el instrumento de PCR en tiempo real (en T-COR 8TM-IVD no se necesita ninguna programación manual gracias a los códigos de barras - ver páginas 18 a 20). El programa dura aproximadamente 1 hora 15 minutos.

Programa	Temperatura	Duración	Ciclo(s)	
Transcripción inversa	50 °C	10 min	1	-
Desnaturalización	95°C	3 min	1	-
Amplificación	95°C	10 s	45	-
	60°C	30 s		Adquisición de fluorescencia

Instrucciones de uso EurobioPlex Leptospire

Nota 1: En LightCycler® 480 (Roche), existen dos sistemas ópticos: únicamente el «System II» es compatible con la utilización del kit. Aplicar una compensación de color para las longitudes de ondas TexasRed-Cy5 (533-610,618-660).

Nota 2: Para los aparatos de la gama Applied Biosystems, seleccionar «NONE» en «PASSIVE REFERENCE».

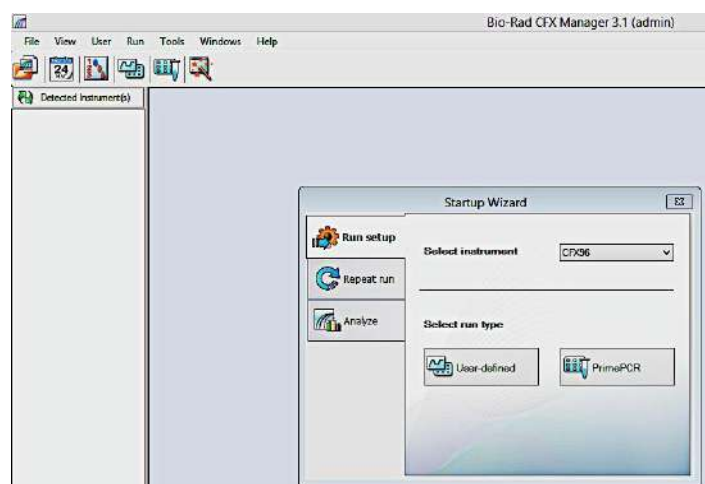
Nota 3: En Rotorgene™ calibrar la señal haciendo clic en «GAIN OPTIMISATION».

Nota 4: En CFX96™ (Bio-Rad) iniciar el run a partir de la versión 1.6 o posterior, a continuación analizar con la versión 3.1 (ver § Validación del experimento).

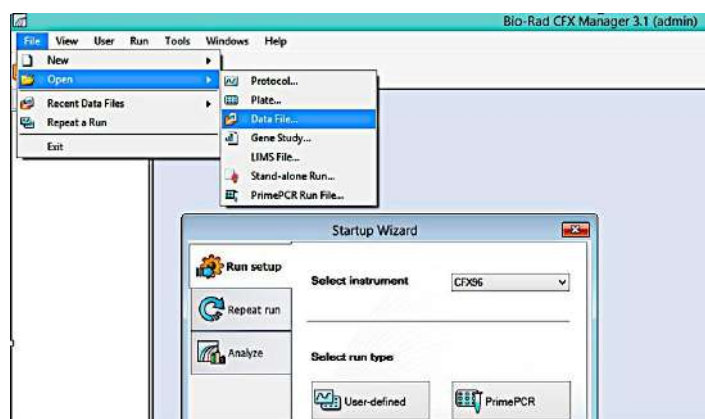
11. VALIDACIÓN DEL EXPERIMENTO

En análisis de los datos posterior a la adquisición en un aparato de PCR CFX96™ (Bio-Rad) se debe realizar con la versión 3.1 del software CFX Manager (Bio-Rad). Para pasar a esta versión a partir de un run iniciado en una versión anterior, realice el siguiente procedimiento: al final del run, el archivo de datos con el sufijo .pcrd debe abrirse y procesarse con la versión 3.1 del CFX Manager (Bio-Rad).

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



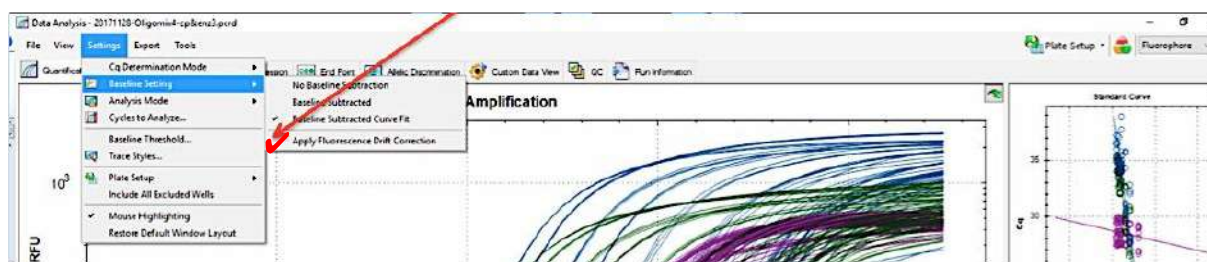
- Haga clic en Archivo y seleccione Open y a continuación Data File.



- Seleccione el archivo que desea analizar y haga clic en Abrir.

Instrucciones de uso EurobioPlex Leptospire

La opción «drift correction» se debe aplicar en la pestaña «Settings» tal como se indica en la siguiente imagen: haga clic en la pestaña Settings, a continuación en Baseline Setting y en Apply Fluorescence Drift Correction.



Una vez completada esta etapa, puede comenzar el análisis.

Para que la dosificación sea válida, los valores de Ct para los controles deben ser los siguientes (Tabla 4); de lo contrario el experimento no se podrá validar.

En T-COR 8™-IVD, para una correcta utilización del kit, es necesario que estos controles se realicen sólo en el primer uso de un nuevo kit, posteriormente se pueden realizar controles regulares.

Tabla 4:

Control positivo	
TEXAS RED	Ct < 27
Control negativo	
TEXAS RED	Ct no determinado
CY5	Ct ≤ 45

En T-COR 8™-IVD, la interpretación se genera automáticamente con los códigos de barras

12. ANÁLISIS DE DATOS E INTERPRETACIÓN

Para las muestras clínicas, son posibles los siguientes resultados:



***Umbral de Ct para positividad de las muestras:
Canal TEXAS RED *Leptospira*: + Positivo => Ct ≤ 45**

Señal PCR			Validez de la prueba/comentario
TEXAS RED	CY5	<i>Leptospira</i>	
+	+	Positivo	Válido
-	+	Negativo	Válido
+	-	Positivo	Posible inhibición de la extracción o de RT-PCR que no impide la detección de la bacteria; válido
-	-	No interpretable	Problema de extracción o inhibición de RT-PCR - diluir 5 x la muestra; si el resultado es el mismo, volver a extraer la muestra

Instrucciones de uso EurobioPlex Leptospire

13. ANÁLISIS DE EFICACIA

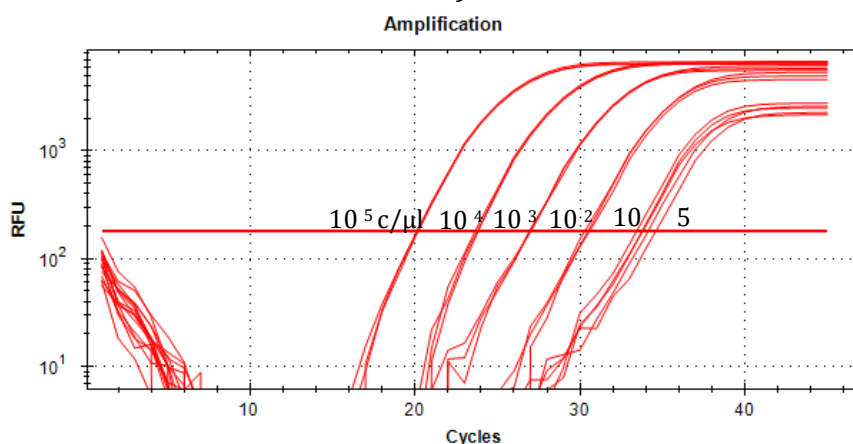
Límite de detección/sensibilidad analítica:

5 copias CP/μl (1 copia de leptospira= 5 equivalentes de copia del genoma (Bourhy et al. 2011)).

En la cepa bacteriana *Leptospire interrogans* : 100 bacterias/ml en el plasma

250 bacterias/ml en el suero, y 500 bacterias/ml en la orina.

Ejemplo de experimento realizado en termociclador de PCR en tiempo real CFX96™ (Bio-Rad) :



Reproducibilidad de la señal en el canal Leptospira (Texas Red)

Reproducibilidad	Coeficiente de variación (%) en el control positivo	Coeficiente de variación (%) en ARN
Intra-run	1,35	2,44
Inter-runs	5,15	2,04
Inter-lotes	1,83	2,45

Especificidad: > 99 %

La especificidad se evaluó en un total de 98 muestras extraídas previamente sometidas a prueba y confirmadas negativas para la leptospira. Se constató que 45 de estas muestras eran positivas para :

- *Neisseria meningitidis* (n=5)
- *Streptococcus pneumoniae* (n=5)
- *Haemophilus influenzae b* (n=1)
- *Pseudomonas aeruginosa* (n=4)
- *Streptococcus agalactiae* (n=1)
- *Escherichia coli* (n=4)
- *Legionella pneumophila* (n=1)
- *Bartonella* (n=5)
- *Coxiella* (n=3)
- *Staphylococcus aureus* (n=1)
- *Mycobacterium avium* (n=1)
- *Staphylococcus oralis/mitis/sanguis* (n=1)
- *Francisella tularensis* (n=1)

Instrucciones de uso EurobioPlex Leptospire

- *Klebsiella kingae* (n=2)
- *Tropheryma whipplei* (n=1)
- *Chikungunya* (n=1)
- Dengue (n=1 Dengue 1+ n=1 Dengue 2+ n=1 Dengue 3+ n=1 Dengue 4+ n=3 de serotipo desconocido)
- *Zikavirus* (n=1)

Por lo tanto, no se observó reactividad cruzada con estos patógenos.

Sensibilidad: > 99 %

La sensibilidad se evaluó en un total de 50 muestras sometidas previamente a prueba y confirmadas positivas a la leptospira, de las cuales 39 eran de plasma procedente de sangre/EDTA y 11 de orina.

PCR Referencia	PCR Eurobio			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	50	0	50
	Negativo	0	98	98
	Total	50	98	148

La concordancia global es > 99%.

Las pruebas se realizaron en CFX96™.

La extracción se realizó con el extractor NucliSENS essayMAG (Biomérieux) según las instrucciones del proveedor.

14. PECULIARIDADES RELACIONADAS CON EL INSTRUMENTO DE PCR EN TIEMPO REAL T-COR 8™-IVD

T-COR 8™-IVD es un instrumento de PCR en tiempo real con 8 pocillos programables de forma independiente que se pueden utilizar, paciente por paciente, independientemente unos de otros, desde el punto de vista de las pruebas / «Dosificación/Assay» realizadas, de los programas térmicos y del momento de inicio de la PCR.

Los 8 pocillos también se pueden utilizar simultáneamente con la misma «Dosificación/Assay».

Nota: Mezclar bien tras depositar la muestra en el tubo con repetidos pipeteos, evitando la formación de burbujas y asegurándose de que el volumen de líquido quede en el fondo del tubo. Cerrar bien cada tubo después de cada depósito del control o de la muestra para evitar cualquier contaminación.

Controles

En T-COR 8™-IVD, para una correcta utilización del kit, es necesario que estos controles se realicen sólo en el primer uso de un nuevo kit, posteriormente se pueden realizar controles regulares.

Instrucciones de uso EurobioPlex Leptospire

Posteriormente, el control de la inhibición de RT-PCR (CI-ARN) permite garantizar que dentro de la muestra analizada no haya inhibición de la RT-PCR, que la extracción se desarrolle correctamente y que la PCR funcione correctamente.

Pruebas en pacientes

<i>Con validación de los controles positivo y negativo una sola vez en la primera utilización</i>	24 reacciones
Número posible de pruebas paciente por paciente con descongelación/congelación 12 veces como máximo (3 veces por tubo/4 tubos por reactivo)	12 pacientes

Fluoróforos

Existen 4 combinaciones de fluoróforos disponibles en el T-COR 8™-IVD.

Para todos los EBX, entre ellos el EBX-005, se elige la combinación FAM/HEX/Texas Red/Cy5. Si algunos canales no se utilizan en algunos kits, no tenerlos en cuenta al analizar los resultados.

Utilización de los códigos de barras (disponibles en las páginas 18 a 20)

1- Seleccione Menú > Nuevo análisis/New Run

2- Seleccione Código de barras/Barcode

3- Escanee el código de barras deseado en la parte derecha del aparato:

- para el control positivo (Código de barras EBX-005 Pos Ctrl),
- o para el control negativo (Código de barras EBX-005 Neg Ctrl),
- o bien para una muestra (Código de barras Assay: EBX-005)

El instrumento selecciona automáticamente uno de los 8 pocillos disponibles. Siga las instrucciones dadas por el instrumento.

4- Levante la tapa del pocillo x seleccionado por el aparato, y compruebe que la luz LED azul está encendida, a continuación seleccione «Sí/Yes».

5- Coloque el tubo en el pocillo correspondiente y vuelva a cerrar la tapa, a continuación seleccione «Siguiente/Next».

6- Si desea darle nombre (opcional), seleccione «muestra x/sample x », y dele nombre. Seleccione «Accept».

7- Seleccione «Siguiente/Next»

8- Para añadir/probar otro control o muestra, seleccione «Añadir un pocillo/Add well» y vuelva a comenzar en el punto 3-

9- Seleccione «Iniciar el análisis/Start run»

Nota: el nombre dado a una muestra o a un run no se puede modificar ni añadir una vez finalizado el run. Se debe realizar antes o durante el run.

Instrucciones de uso EurobioPlex Leptospire

Presentación e interpretación de los resultados

Los resultados de Ct y las curvas de amplificación están disponibles en la Tabla Valores SmartCT™/SmartCT™ Tabla (valores de Ct asignados en cada canal), y en los gráficos de Ct en función de los ciclos en cada canal, pudiendo visualizarse los 2 en tiempo real en la máquina.

Se genera automáticamente un análisis para los controles negativo y positivo, al igual que para las muestras. Éste está disponible en «Interpretaciones/Interpretations», al final del run, en la ventana «Vista/View».

Para los controles positivo y negativo son posibles los siguientes resultados:

«Neg Ctrl Fail»: No válido

«Neg Ctrl Valid»: Válido

«Pos Ctrl Fail»: No válido

«Pos Ctrl Valid»: Válido

Determinación del estado para las muestras:

«Detectado(a-s)/Detected»: Positivo → **recuadro verde**

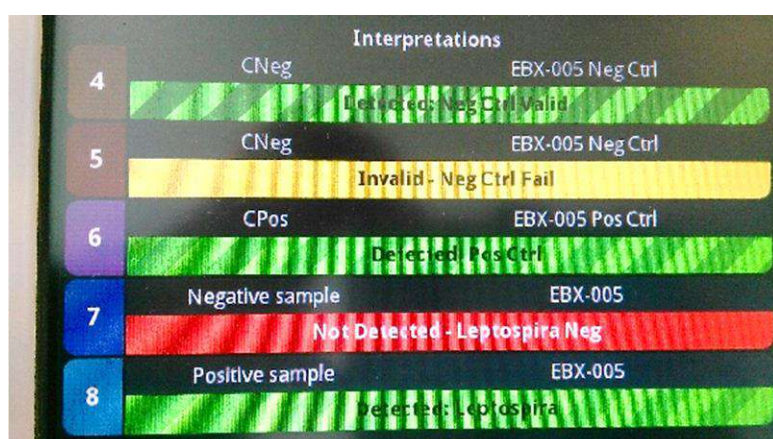
«No detectado/Not detected»: Negativo → **recuadro rojo**

«No válido/Invalid» -> volver a realizar la prueba → **recuadro naranja**

Ejemplo de presentación de la interpretación automática de los resultados en el instrumento y en el informe:

- Ejemplo para el control negativo (pocillo 4) y el control positivo (pocillo 6) válidos indicados «Detected /Detectado(a-s)», para el control negativo Invalid/No válido (pocillo 5), para una muestra negativa, indicada «Not Detected/No Detectado» (muestra pocillo 7) y para una muestra positiva detectada para el objetivo Leptospira indicado (Detected/Detectado(a-s) Leptospira) (muestra pocillo 8):

❖ En la pantalla del instrumento:

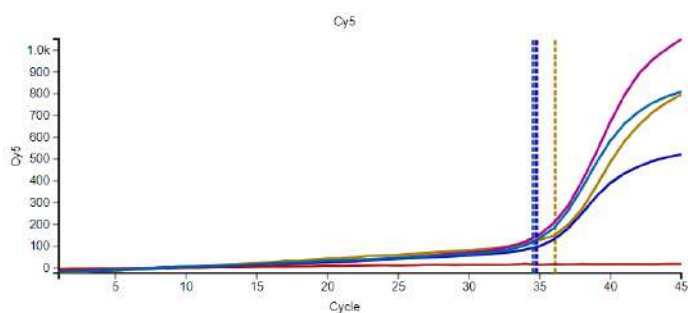
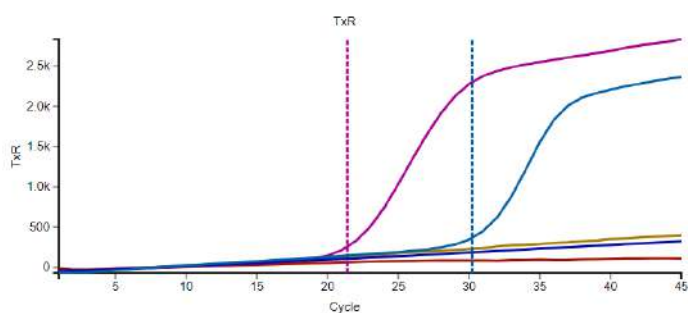


❖ En el informe:

Instrucciones de uso EurobioPlex Leptospire

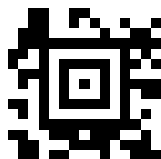
Summary							
Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5	Call
4	CNeg	EBX-005 Neg Ctrl				36.1	Detected • Neg Ctrl Valid
5	CNeg	EBX-005 Neg Ctrl					Invalid
6	CPos	EBX-005 Pos Ctrl			21.4	34.7	Detected • Pos Ctrl
7	Negative sample	EBX-005				34.8	Not Detected
8	Positive sample	EBX-005			30.2	34.5	Detected • Leptospira
							Leptospira Neg

Ejemplo de las curvas de amplificación



Códigos de barras en T-COR8™-IVD para EBX-005

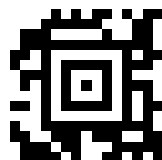
EBX-005 Pos Ctrl
Control positivo CP



EBX-005 Neg Ctrl
Agua = control negativo (CN-H2O)



Assay: EBX-005



15. CONTROL DE CALIDAD

De acuerdo con el sistema de gestión de calidad de Eurobio S científic, certificado ISO EN 13485, cada lote de EurobioPlex Leptospire se prueba según especificaciones predefinidas para garantizar la calidad constante del producto.

16. BIBLIOGRAFÍA

- Giry C, Roquebert B, Li-Pat-Yuen G, Gasque P, Jaffar-Bandjee M.C. Simultaneous detection of chikungunya virus, dengue virus and human pathogenic *Leptospira* genomes using a multiplex TaqMan® assay. *BMC Microbiol.* 2017;17(1):105.
- Perez J, Goarant C. Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. *BMC Microbiol.* 2010;10:325.
- Goarant C, Laumond-Barny S, Perez J, Vernel-Pauillac F, Chanteau S, Guigon A. Outbreak of leptospirosis in New Caledonia: diagnosis issues and burden of disease. *Trop Med Int Health.* 2009;14(8):926-9.
- Tubiana S, Mikulski M, Becam J, Lacassin F, Lefèvre P, Gourinat AC, Goarant C, D'Ortenzio E. Risk factors and predictors of severe leptospirosis in New Caledonia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(1):e1991.
- van de Werve C, Perignon A, Jauréguiberry S, Bricaire F, Bourhy P, Caumes E. Travel-related leptospirosis: a series of 15 imported cases. *J Travel Med.* 2013;20(4):228-31.
- Hochedez P, Escher M, Decoussy H, Pasgrimaud L, Martinez R, Rosine J, Théodose R, Bourhy P, Picardeau M, Olive C, Ledrans M, Cabie A. Outbreak of leptospirosis among canyoning participants, Martinique, 2011. *Euro Surveill.* 2013;18(18):20472.
- Bourhy P, Herrmann Storck C, Theodose R, Olive C, Nicolas M, Hochedez P, Lamaury I, Zinini F, Brémont S, Landier A, Cassadou S, Rosine J, Picardeau M. Serovar diversity of pathogenic *Leptospira* circulating in the French West Indies. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(3):e2114.
- Bourhy P, Brémont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M. Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *J Clin Microbiol.* 2011;49(6):2154-60.
- Legkoby T, David DJ, Lee Robin SH. Diagnostic biologique de la leptospirose, Avis sur les actes, Haute autorité de santé, service evaluation des actes professionnels, www.has-santé.fr
- Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;249(1):139-47.
- Levett PN. Sequence-based typing of *leptospira*: epidemiology in the genomic era. *PLoS Negl Trop Dis.* 2007;1(2):e120.
- Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol.* 2005 Jan;54(Pt 1):45-9.
- Slack A. Leptospirosis. *Aust Fam Physician.* 2010 Jul;39(7):495-8. Review.

Instrucciones de uso EurobioPlex Leptospire

- Stoddard RA. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through real-time PCR (qPCR) targeting the LipL32 gene. *Methods Mol Biol.* 2013;943:257-66.
- Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu LF, Jiang HQ, Jia J, Tu YF, Jiang JX, Gu WY, Zhang YQ, Cai Z, Sheng HH, Yin HF, Zhang Y, Zhu GF, Wan M, Huang HL, Qian Z, Wang SY, Ma W, Yao ZJ, Shen Y, Qiang BQ, Xia QC, Guo XK, Danchin A, Saint Girons I, Somerville RL, et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature.* 2003;422(6934):888-93.
- Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, Recommandations de bonnes pratiques, www.has-santé.fr

17. ELIMINACIÓN DE RESIDUOS

Eliminar todos los residuos de conformidad con la legislación DASRI.

18. NOTIFICACIÓN DE INCIDENTES

Cualquier incidente grave relacionado con el dispositivo se deberá comunicar a EUROBIO SCIENTIFIC y a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido el usuario y/o paciente.

19. ASISTENCIA TÉCNICA

Para obtener asistencia relacionada con nuestros productos, póngase en contacto con nuestro soporte técnico.

Puede dirigirse al servicio de atención al cliente de EUROBIO SCIENTIFIC por correo electrónico (e-mail) en la dirección adv@eurobio-scientific.com o por teléfono en el +33 (0)1.69.07.94.77.





EurobioPlex *Leptospire*

Per la RT-PCR **qualitativa** in tempo reale

REF **EBX-005A**
 EBX-005-48
 EBX-005-24



96/48/24 reazioni



Convalidato su:

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) con analisi su CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)
- LightCycler®480 Instrument II (Roche) con analisi su LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- T-COR 8™-IVD (Tetracore Inc.) con software T-COR 8 SmartCT™ (Auto v1)



Istruzioni per l'uso

Disponibili su www.eurobio-scientific.com

Il Riassunto delle Caratteristiche di Sicurezza e di Prestazioni (RCSP) sarà messo a disposizione dall'organismo di certificazione notificato su EUDAMED quando sarà operativo. Può anche essere ottenuto su richiesta.

Sommario

1. INFORMAZIONI GENERALI	100
2. Destinazione del dispositivo	102
3. Simboli	103
4. PRINCIPIO.....	104
5. COMPONENTI DEL KIT	105
6. CONSERVAZIONE E STOCCAGGIO	105
7. Materiale necessario non fornito:.....	105
8. Strumento per PCR in tempo reale	106
9. AVVERTENZE E PRECAUZIONI.....	106
10. PROTOCOLLO.....	107
i. Raccolta dei campioni.....	107
ii. Estrazione di acidi nucleici.....	107
iii. Esecuzione della RT-PCR in tempo reale	107
iv. Procedura dettagliata	109
11. convalida della sperimentazione	110
12. analisi dei dati e interpretazione	111
13. Analisi delle prestazioni.....	112
14. SPECIFICITÀ LEGATE ALLO STRUMENTO PER PCR in tempo reale T-COR 8TM-IVD.....	113
15. controllo qualità.....	120
16. Bibliografia.....	120
17. SMALTIMENTO DEI RESIDUI	121
18. DICHIARAZIONE DI INCIDENTE	121
19. ASSISTENZA TECNICA.....	121

1. INFORMAZIONI GENERALI

Le leptospirosi, a volte chiamate «*malattia del ratto*» sono malattie infettive di origine batterica, dovute a leptospire. Le leptospire sono un gruppo di batteri spesso raggruppate nella specie *Leptospira interrogans*. Questa malattia è onnipresente. Recentemente, si è registrato un forte aumento del numero di casi segnalati. In quanto zoonosi, colpisce gli animali che vivono in prossimità dell'uomo, come il ratto o il maiale. La leptospira è un patogeno per l'uomo.

Nella maggior parte delle parti del mondo, i micromammiferi (ratti, topi, ecc.) se ne presumono essere il serbatoio selvatico. La loro urina sembra quasi sempre essere la fonte diretta o indiretta delle infezioni umane. Ma come per l'echinococco, esiste anche l'infezione naturale dei cani (*leptospirosi canina*) e altri canidi, probabilmente molto sottostimata, e anche questa costituisce un rischio per l'uomo. La leptospirosi imperversa in diverse parti del mondo, sull'isola di Réunion, Wallis e Futuna, nelle Indie Occidentali, in Guiana Francese, in paesi tropicali, come quelli del Sud-Est asiatico: Cambogia, Vietnam, Laos. La leptospira è stata rilevata anche nel Poitou Charente, nel sud e sud-ovest della Francia, vicino ad allevamenti di suini in una regione umida.

Un ampio polimorfismo di sintomi non specifici, e la diversità degli organi colpiti, rendono la diagnosi clinica molto difficile. Inoltre, esistono forme acute, subacute e croniche della malattia che si evolvono molto diversamente nel tempo, a seconda degli individui infetti, e a seconda dei sierotipi (eventualmente nuove o emergenti), e che possono essere attenuate dalla vaccinazione. Esistono numerosi sierotipi (ad esempio itterohemorragiae, canicola, pomona) che non hanno una firma antigenica omogenea, il che rende difficile la progettazione di vaccini efficaci. Il test di PCR in tempo reale presenta un interesse per studiare l'epidemiologia della leptospirosi.

La leptospirosi si manifesta in varie forme, che ne rendono difficile la diagnosi dal momento che essa può essere confusa con una forte influenza (febbre alta e dolori). Può iniziare con dolori diffusi o localizzati (ad es.: dolore meningeo) che, se non diagnosticati tempestivamente, portano a divagazione della parola e del ragionamento (a causa del tasso elevato di urea che aumenta nel sangue a motivo dell'insufficienza renale). In alcuni casi, è accompagnata da ittero (circa il 40% dei casi nelle trincee durante la prima guerra mondiale) e/o nefrite. Dopo dialisi e antibiotici, il paziente recupera in 5-6 settimane se la malattia era moderata (anche se si possono ancora riscontrare batteri nelle urine del paziente varie settimane dopo la scomparsa dei sintomi). Altrimenti, la leptospirosi può progredire verso emorragie violente - a volte letali - o grave insufficienza renale. Forme poliviscerali sono possibili su terreno fragile.

Secondo le raccomandazioni dell'OMS, la conferma biologica della leptospirosi si basa sull'isolamento del batterio o sull'identificazione dei suoi acidi nucleici nei campioni biologici, oppure su una sierologia positiva in un contesto clinico ed epidemiologico indicativo. L'uso della coltura batterica è molto limitato a causa delle sue difficoltà di realizzazione e del tempo necessario per la crescita dei batteri.

La sierologia è il test più comunemente utilizzato per stabilire la diagnosi di leptospirosi. Non esiste un antigene standardizzato, a livello nazionale o internazionale, per la rilevazione di anticorpi contro le leptospire.

Sono disponibili molti test per la rivelazione della leptospirosi; essi possono essere raggruppati in due tipi: test di rivelazione diretta (identificazione del batterio o delle molecole batteriche, tra cui il DNA, mediante PCR in tempo reale) e test per la rivelazione della risposta umorale del paziente (test sierologici). Il test di micro-agglutinazione (MAT) è la tecnica sierologica di riferimento per la conferma della leptospirosi. Il test sierologico viene utilizzato per rilevare anticorpi di classe IgM o mediante ELISA o su strisce reattive.

L'individuazione precoce della leptospirosi può essere effettuata mediante PCR in tempo reale, solitamente dal plasma preparato a partire dal sangue del paziente, che fornisce risultati migliori rispetto al siero. Il momento ottimale per il campionamento del sangue è prima di 8 giorni di malattia. Non vi è interesse a eseguire il test PCR in tempo reale nel sangue oltre i 10 giorni successivi all'insorgenza sintomatologica della malattia (fine del periodo di batteriemia). La Haute Autorité de Santé (HAS) ha indicato che il semplice test PCR (non in tempo reale) non ha alcun interesse per la diagnosi biologica specifica della leptospirosi. La HAS ritiene che la tecnica di PCR in tempo reale sia attualmente la più interessante per la diagnosi biologica specifica precoce della leptospirosi. Essa deve essere riservata ai primi 8 giorni dopo l'insorgenza della febbre, realizzata su un campione di sangue prelevato, preferibilmente prima dell'inizio della terapia antibiotica. A causa della bassa concentrazione abituale di leptospire nel sangue, qualsiasi PCR in tempo reale negativa deve dar luogo a un'esplorazione sierologica.

2. DESTINAZIONE DEL DISPOSITIVO

EurobioPlex Leptospire è un test di amplificazione per trascrizione inversa-reazione a catena della polimerasi (RT-PCR) in tempo reale, progettato per la rilevazione qualitativa della presenza o assenza di leptospire mediante amplificazione degli acidi nucleici di questo patogeno in un estratto di acidi nucleici. Il test è indicato per diagnosticare una presunta infezione da leptospire nell'uomo o per completare una diagnosi accertata o indeterminata. L'estratto è il materiale di partenza per il kit EurobioPlex Leptospire.

Questo sistema è stato convalidato per i seguenti tipi di campione:

- Plasma
- Siero
- Urina

Il test EurobioPlex Leptospire è un dispositivo medico di diagnostica *in vitro* destinato all'uso da parte di personale di laboratorio di analisi di biologia medica qualificata. Questo dispositivo non deve essere riciclato dopo l'uso.

Questo dispositivo non è destinato allo screening delle leptospire in una banca del sangue o degli organi.

3. SIMBOLI



Riferimento



Numero di lotto



Limite di temperatura



Data di scadenza



Contenuto sufficiente per «N» reazioni



Produttore



Data di fabbricazione



Prodotto con marcatura CE



Diagnosi in vitro



Istruzioni per l'uso



Attenzione



Non utilizzare se la confezione è danneggiata



Conservare al riparo dalla luce

4. PRINCIPIO

EurobioPlex Leptospire è un test di amplificazione degli acidi nucleici di leptospira, nonché un controllo di estrazione e inibizione della RT-PCR, impaccato, che utilizza l'amplificazione mediante RT-PCR in tempo reale. Il test viene effettuato a partire dall'estratto del campione per mezzo di una reazione unica in un solo pozzetto/provetta.

Il controllo di estrazione e inibizione di RT-PCR (CI-RNA) viene utilizzato per determinare possibili variazioni che possono verificarsi durante le fasi di estrazione di RNA e DNA da campioni biologici e di amplificazione mediante PCR in tempo reale. Permette così di assicurarsi che un risultato negativo non possa essere dovuto a una cattiva estrazione di DNA e RNA e/o alla presenza di inibitori di PCR in quantità troppo grandi.

Gli acidi nucleici di leptospira vengono rilevati utilizzando una sonda marcata TEXAS RED. Il controllo di estrazione e di inibizione di RT-PCR viene rilevato utilizzando una sonda marcata Cy5. Nel corso dell'allungamento del prodotto di amplificazione, le sonde emettono una fluorescenza specifica a seguito della loro idrolisi. La misura delle intensità di fluorescenza in tempo reale è relativa all'accumulo di prodotti di amplificazione.

Tabella 1: Rilevazione dei target secondo i fluorofori

Target	Fluoroforo	Eccitazione	Emissione
Leptospira	Texas Red	485 nm	605 nm
Controllo di estrazione e di inibizione di PCR (CI-RNA)	Cy5	647 nm	667 nm

Canali equivalenti su diversi strumenti PCR:

- Canale **Texas Red** (Sistemi ABI, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96™, Sistemi Mx, T-COR 8™-IVD), LC Red 610 (LC480®), Canale Orange (RotorGene)
- Canale **Cy5** (Sistemi ABI, Chromo 4/CFX96™, Sistemi Mx, T-COR 8™-IVD), Canale Alexa647 (SmartCycler II), Canale 660 (LC 480), Canale Red (RotorGene)

Nota: Su LC480 strumento II: Applicare una compensazione di colore per le lunghezze d'onda TexasRed-Cy5 (533-610, 618-660).

5. COMPONENTI DEL KIT

Il kit per RT-PCR in tempo reale EurobioPlex Leptospire è pronto per l'uso per la rilevazione specifica della leptospira.

La fluorescenza viene emessa e misurata in modo individuale da un sistema ottico nel corso della PCR. La rivelazione dei frammenti amplificati viene effettuata mediante un fluorimetro utilizzando i canali indicati in Tabella 1.

Il kit contiene i reagenti e gli enzimi necessari per l'amplificazione di acidi nucleici di leptospira, e per il controllo di estrazione e di inibizione di RT-PCR (Tabella 2).

Tabella 2: Componenti del kit

Colore del tappo	Contenuto del kit	EBX-005A (96 test)	EBX-005-48 (48 test)	EBX-005-24 (24 test)	Ricostituzione
Rosso	Enzimi	2 × 1100µl	1100µl	4 × 130µl	Pronto all'uso
Trasparente	Oligomix	2 × 400µl	400µl	4 × 50µl	Pronto all'uso
Blu	Acqua = controllo negativo (CN-H ₂ O)	2 × 1 ml	1 ml	1 ml	Pronto all'uso
Giallo	Controllo positivo Leptospira (CP)	2 × 150 µl	150 µl	4 × 20 µl	Pronto all'uso
Bianco	Controllo di estrazione e di inibizione di RT-PCR (CI-RNA)	2 × 650 µl	650 µl	4 × 80 µl	Pronto all'uso

6. CONSERVAZIONE E STOCCAGGIO

Tutti i reagenti devono essere stoccati a una temperatura compresa tra -15 °C e 22 °C.

Tutti i reagenti possono essere utilizzati fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta del kit.



Evitare cicli multipli di congelamento/scongelamento (>3×), in quanto ciò potrebbe ridurre la sensibilità dell'analisi.

7. MATERIALE NECESSARIO NON FORNITO:

- Cappa biologica
- Apparecchiatura per PCR in tempo reale
- Centrifuga per microprovette
- Vortex
- Piastre/provette per reazione di PCR in tempo reale
- Micropipette
- Puntali con filtro esenti da DNasi e RNasi per micropipette
- Microprovette sterili
- Guanti (senza talco)
- Sistema di pipettaggio automatico tipo MICROLAB NIMBUS IVD® (Hamilton).

8. STRUMENTO PER PCR IN TEMPO REALE

Il kit EurobioPlex Leptospire è stato sviluppato e convalidato per l'uso con i seguenti strumenti per PCR in tempo reale:

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) con analisi su CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)
- LightCycler®480 Instrument II (Roche) con analisi su LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- T-COR 8™-IVD (Tetacore Inc.) con software T-COR 8 SmartCT™ (Auto v1)

9. AVVERTENZE E PRECAUZIONI



Leggere attentamente queste istruzioni prima di iniziare la procedura.

- ◇ Questa sperimentazione deve essere effettuata da tecnici di laboratorio di analisi di biologia medica.
- ◇ Assicurarsi che gli strumenti siano stati installati, calibrati e sottoposti a manutenzione in conformità alle raccomandazioni del fabbricante.
- ◇ L'uso di apparecchiature diverse da quelle convalidate ricade sotto la responsabilità dell'utilizzatore e, in questo caso, le prestazioni non sono garantite.
- ◇ I campioni clinici devono essere considerati materiali potenzialmente infettivi e devono essere preparati sotto cappa a flusso laminare.
- ◇ Questa sperimentazione deve essere effettuata secondo le buone pratiche di laboratorio.
- ◇ Non utilizzare questo kit dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta.
- ◇ Evitare un'esposizione prolungata alla luce dei reagenti, limitata al tempo tecnico necessario per preparare la piastra PCR, altrimenti le prestazioni non sono garantite.
- ◇ Il kit viene spedito sotto ghiaccio secco e i componenti del kit devono arrivare congelati. Se uno o più componenti arrivano scongelati o se le provette sono rimaste danneggiate durante il trasporto, contattare Eurobio Scientific.
- ◇ Dopo aver scongelato i reagenti, centrifugare brevemente le provette prima dell'uso.
- ◇ Si raccomanda di definire tre aree di lavoro separate: 1) Isolamento dell'RNA/DNA, 2) Preparazione della miscela di reazione e 3) Amplificazione/Rilevazione di prodotti amplificati.
- ◇ Indossare abiti e guanti (privi di talco) diversi per ogni area di lavoro.
- ◇ Pipette, reagenti e altri materiali di lavoro non devono circolare tra queste aree.
- ◇ Prestare particolare attenzione al mantenimento della purezza dei reagenti e delle miscele di reazione.
- ◇ Devono essere utilizzati metodi appropriati di preparazione/estrazione degli acidi nucleici per la produzione di RNA/DNA di qualità e l'applicazione di RT-PCR in tempo reale, in particolare per evitare il rischio di contaminazione con le RNasi/DNasi.
- ◇ Utilizzare puntali con filtro per micropipette, esenti da DNasi e RNasi.
- ◇ Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere o fumare in laboratorio.
- ◇ Non utilizzare il dispositivo se la confezione è danneggiata.
- ◇ Evitare gli aerosol.

10. PROTOCOLLO

I. RACCOLTA DEI CAMPIONI

- ◇ Raccogliere i campioni in provette sterili.
- ◇  **È vietato l'uso di eparina come anticoagulante.**
- ◇ Spetta all'utilizzatore controllare le proprie condizioni di raccolta, trasporto, conservazione ed estrazione dei campioni in modo che l'estrazione di RNA/DNA da sistemi adatti produca RNA/DNA di qualità.
- ◇ Si consiglia di estrarre immediatamente i campioni o di conservarli in base alle raccomandazioni per lo stoccaggio dei campioni prima dell'estrazione (Tabella 3).

Tabella 3: raccomandazioni di stoccaggio

Raccomandazioni di stoccaggio massimo dei campioni prima dell'estrazione	
Temperatura ambiente	2 ore
+4 °C.	1 settimana
-20 °C (preferibilmente -80 °C)	Stoccaggio a lungo termine

Attenzione	
	◇ L'utilizzatore può fare riferimento alle raccomandazioni emesse dall'Organizzazione Mondiale della Sanità o dalla Haute Autorité de Santé per la corretta conservazione dei campioni. ◇ Gli RNA estratti devono essere conservati a -80 °C. ◇ Il trasporto dei campioni clinici è soggetto alle normative locali per il trasporto di agenti infettivi.

II. ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI

È responsabilità degli utilizzatori assicurarsi che il sistema di estrazione degli acidi nucleici utilizzato sia compatibile con la tecnologia di RT-PCR in tempo reale. Per il presente pacchetto, si consiglia di utilizzare metodi per l'estrazione di acidi nucleici a partire da campioni di plasma o di urina e fare riferimento alle istruzioni del fornitore del kit di estrazione utilizzato.

Nel kit Leptospire, il CI-RNA sul canale CY5 può essere aggiunto prima dell'estrazione o nella reazione di PCR. Permette di assicurare che un risultato negativo non sia dovuto a un problema di estrazione o alla presenza di inibitori di RT-PCR in quantità troppo elevate per convalidare il test. Si raccomanda l'aggiunta di 10 µl di CI-RNA per estrazione e un volume di eluizione di 50 µl. Se il CI-RNA è aggiunto solo per controllare la RT-PCR, viene aggiunto alla miscela di reazione (1 microlitro per reazione di PCR). Per ulteriori informazioni, si veda il Protocollo PCR in tempo reale.

Il CI-RNA è disponibile anche presso Eurobio Scientific (Rif EurobioPlex EBX-003).

III. ESECUZIONE DELLA RT-PCR IN TEMPO REALE

Nota generale:

Il controllo positivo e il controllo di estrazione e di amplificazione RT-PCR (CI-RNA) contengono concentrazioni elevate di matrice. Le manipolazioni devono essere eseguite con cautela per evitare qualsiasi contaminazione. Per verificare il corretto funzionamento della PCR, è necessario testare il controllo positivo CP e anche un controllo negativo (acqua fornita = CN-H₂O + CI-RNA) (si veda II-2/6) del protocollo di RT-PCR in tempo reale).

Sul T-COR 8™-IVD, per un corretto utilizzo del kit, è necessario che questi controlli vengano effettuati solo quando si utilizza per la prima volta un kit nuovo; in seguito, possono essere effettuati controlli regolari.

Manuale d'uso EurobioPlex Leptospire

Schema della procedura:

1 - PREPARAZIONE MISCELA DI REAZIONE / MASTERMIX

(a) Se campioni estratti senza CI-RNA

Numero di reazioni	N+3*
Enzimi	$(N+3) \times 15 \mu\text{l}$
Oligomix	$(N+3) \times 5 \mu\text{l}$
CI-RNA	$(N+3) \times 1 \mu\text{l}$
Volume totale Mastermix	$(N+3) \times 21 \mu\text{l}^{**}$

(b) Se campioni estratti con CI-RNA

Numero di reazioni	N+3*
Enzimi	$(N+3) \times 15 \mu\text{l}$
Oligomix	$(N+3) \times 5 \mu\text{l}$
Volume totale Mastermix	$(N+3) \times 20 \mu\text{l}^{**}$

*N+1 su T-COR 8™-IVD

2 - PREPARAZIONE DELLE REAZIONI

Campione

20 μl di Mastermix
+
5 μl di campione estratto

Controllo positivo

20 μl di Mastermix
+
5 μl CP

Controllo negativo

20 μl di Mastermix
+
5 μl Acqua biologia molecolare (CN-H2O)

Campione

20 μl di Mastermix
+
5 μl di campione estratto

Controllo positivo

20 μl di Mastermix
+
5 μl CP

Controllo negativo

20 μl di Mastermix
+
4 μl Acqua biologia molecolare (CN-H2O)
+
1 μl CI-RNA

3 - STRUMENTO PER PCR IN TEMPO REALE (eccetto T-COR 8™-IVD- programmazione automatica con codici a barre - si veda da p. 18 a p. 20)

Programma	Temperatura	Durata	Ciclo/i	
Reverse Transcription	50 °C	10 min	1	-
Denaturazione	95 °C	3 min	1	-
Amplificazione	95 °C	10 sec	45	-
	60 °C	30 sec		Acquisizione di fluorescenza

Manuale d'uso EurobioPlex Leptospire

IV. PROCEDURA DETTAGLIATA

- 1) Omogeneizzare la provetta di enzimi, e mescolare nel vortex Oligomix, CP e CI-RNA, quindi centrifugare.
- 2) preparare il Mastermix come segue, dove N è il numero di reazioni (compresi i controlli positivi e negativi), prevedere la quantità di Mastermix per N+3* reazioni come minimo (fare riferimento alla parte 1-a o alla parte 1-b dello schema precedente, secondo i casi).

Caso (a): Estrazione del campione SENZA aggiunta di CI-RNA

Numero di Reazione/i	1	N+3*
Enzimi	15 µl	(N+3) × 15 µl
Oligomix	5 µl	(N+3) × 5 µl
CI-RNA	1 µl	(N+3) × 1 µl
Volume totale Mastermix	21 µl**	(N+3) × 21 µl

Caso (b): Estrazione del campione CON aggiunta di CI-RNA

Numero di Reazione/i	1	N+3*
Enzimi	15 µl	(N+3) × 15 µl
Oligomix	5 µl	(N+3) × 5 µl
Volume totale Mastermix	20 µl**	(N+3) × 20 µl

* Per l'uso con T-COR 8™-IVD, si consiglia di preparare un Mastermix per N+1 reazioni per l'uso ad hoc del kit.

**La differenza di volume di reazione tra il caso (a) e il caso (b) è trascurabile e non ha alcun effetto sulle prestazioni.

- 31) Omogeneizzare il Mastermix preparato in 2) e centrifugare brevemente.
- 32) Distribuire 20 µL di Mastermix** utilizzando una micropipetta e puntali filtranti in ciascuna provetta/pozzetto della micropiastra per PCR in tempo reale.
- 33) Aggiungere 5 µL dei campioni estratti
- 34) In parallelo, effettuare i seguenti controlli (si veda questo punto specifico per T-COR 8™-IVD pagine da 14 a 17):
 - Controllo positivo: 20 µL di Mastermix + 5 µL di controllo positivo CP
 - Controllo negativo:
 - Caso (a) estrazione del campione SENZA aggiunta di CI-ARN:
20µl di Mastermix + 5µl di acqua fornita (CN-H2O)
 - Caso (b) estrazione del campione CON aggiunta di CI-ARN
20µl Mastermix + 4µl di acqua fornita (CN-H2O) + 1µl CI-ARN
- 35) Sigillare immediatamente le provette o la piastra con una pellicola adesiva per evitare ogni contaminazione.
- 36) Centrifugare brevemente per raccogliere la miscela di reazione dal fondo delle provette o dei pozzetti di micropiastra.
- 37) Eseguire il seguente programma sullo strumento per PCR in tempo reale (su T-COR 8™-IVD non è necessaria alcuna programmazione manuale grazie ai codici a barre - si vedano le pagine da 18 a 20). Il programma dura circa 1h15.

Programma	Temperatura	Durata	Ciclo/i	
Reverse Transcription	50 °C	10 min	1	-
Denaturazione	95 °C	3 min	1	-
Amplificazione	95 °C	10 sec	45	-
	60 °C	30 sec		Acquisizione di fluorescenza

Manuale d'uso EurobioPlex Leptospire

Nota 1: Su LightCycler® 480 (Roche) esistono due sistemi ottici: solo il «System II» è compatibile con l'uso del kit. Applicare una compensazione di colore per le lunghezze d'onda Texas Red-Cy5 (533-610.618-660).

Nota 2: Per gli apparecchi della gamma Applied Biosystems, selezionare «NONE» in «PASSIVE REFERENCE».

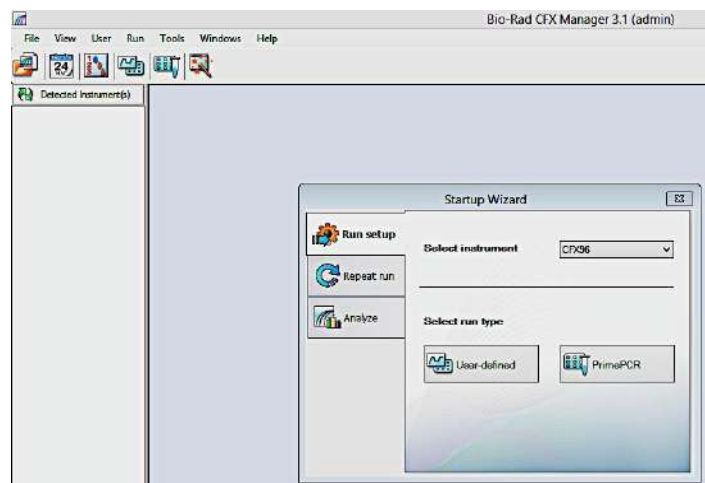
Nota 3: Su Rotorgene™, calibrare il segnale cliccando su «GAIN OPTIMISATION».

Nota 4: Su CFX96™ (Bio-Rad), avviare il run a partire dalla versione 1.6 o successiva, quindi analizzare con la versione 3.1 (si veda § Convalida della sperimentazione).

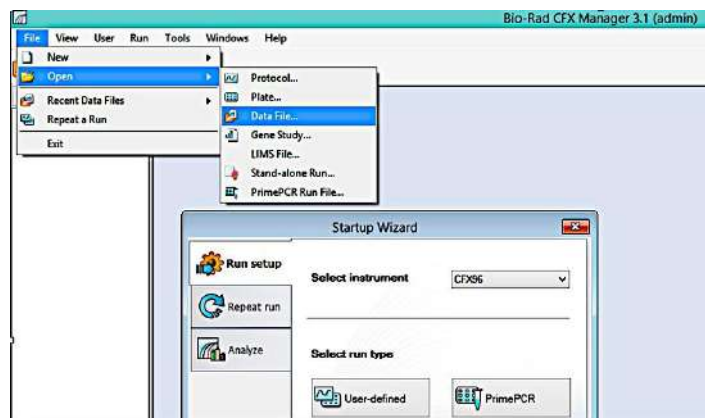
11. CONVALIDA DELLA SPERIMENTAZIONE

L'analisi dei dati post-acquisizione su uno strumento per PCR CFX96™ (Bio-Rad) deve essere eseguita utilizzando la versione 3.1 del software CFX Manager (Bio-Rad). Per passare a questa versione a partire da un run lanciato su una versione precedente, seguire questa procedura: al termine del run, il file di dati con il suffisso .pcrd deve essere aperto ed elaborato con la versione 3.1 di CFX Manager (Bio-Rad).

Se il run è stato lanciato con il software CFX Manager v1.6, ad esempio per aprire un file di dati con il software CFX Manager v3.1, cliccare sull'icona CFX Manager v3.1. Viene visualizzata la schermata iniziale.



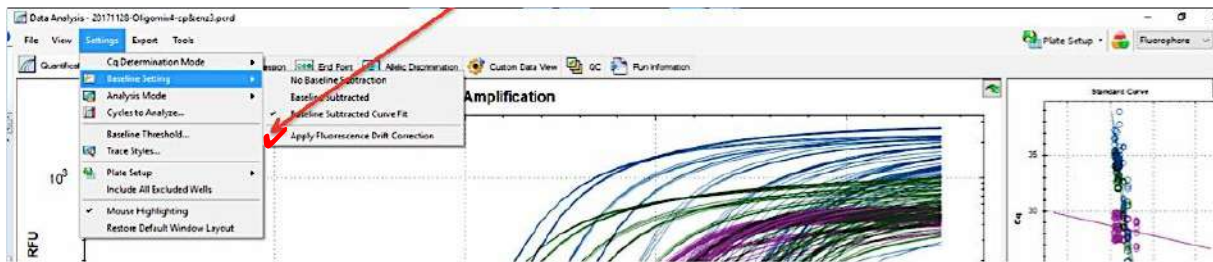
- Cliccare su File e selezionare Open, quindi Data File.



- Selezionare il file che si desidera analizzare e cliccare su Open.

Manuale d'uso EurobioPlex Leptospire

L'opzione «drift correction» deve essere applicata nella tab «Settings» come nell'immagine seguente: cliccare sulla tab Settings, poi su Baseline Setting e su Apply Fluorescence Drift Correction.



Una volta completata questa fase, l'analisi può avere inizio.

Affinché il dosaggio sia valido, i valori Ct per i controlli devono essere i seguenti (Tabella 4); in caso contrario, la sperimentazione non potrà essere convalidata.

Su T-COR 8™-IVD, per un corretto utilizzo del pacchetto, è necessario che questi controlli vengano eseguiti solo durante il primo utilizzo di un nuovo kit; in seguito, è possibile eseguire controlli regolari.

Tabella 4:

Controllo positivo	
TEXAS RED	Ct < 27
Controllo negativo	
TEXAS RED	Ct non determinato
CY5	Ct ≤ 45

Su T-COR 8™-IVD, l'interpretazione viene generata automaticamente con i codici a barre

12. ANALISI DEI DATI E INTERPRETAZIONE

Per i campioni clinici sono possibili i seguenti risultati:



***Soglia di Ct per positività dei campioni:
Canale TEXAS RED *Leptospira*: + Positivo => Ct ≤ 45**

Segnale PCR			Validità del test/commento
TEXAS RED	CY5	<i>Leptospira</i>	
+	+	Positivo	Valido
-	+	Negativo	Valido
+	-	Positivo	Possibile inibizione di estrazione o di RT-PCR che non impedisce la rilevazione del batterio; valido
-	-	Non interpretabile	Problema di inibizione o di estrazione di RT-PCR - diluire 5 × il campione; se si ottiene lo stesso risultato; estrarre nuovamente il campione

13. ANALISI DELLE PRESTAZIONI

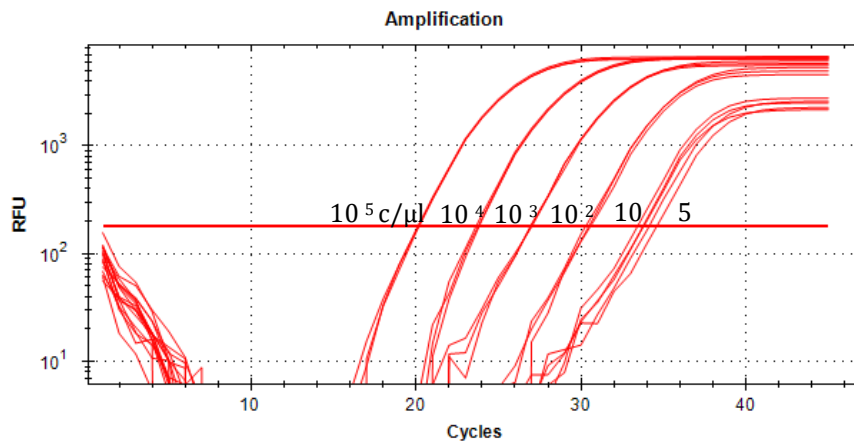
Limite di rilevazione/sensibilità analitica:

5 copie CP/μl (1 copia di leptospira= 5 equivalenti di copie genoma (Bourhy et al. 2011)).

Sul ceppo batterico *Leptospire interrogans*: 100 batteri/ml nel plasma

250 batteri/ml nel siero e 500 batteri/ml nelle urine.

Esempio di esperimento eseguito su termociclatore PCR in tempo reale CFX96™ (Bio-Rad):



Riproducibilità del segnale sul canale di Leptospira (Texas Red)

Riproducibilità	Coefficiente di Variazione (%) sul controllo positivo	Coefficiente di Variazione (%) su ARN
Intra-run	1,35	2,44
Inter-run	5,15	2,04
Inter-lotto	1,83	2,45

Specificità: > 99%

La specificità è stata valutata su un totale di 98 campioni estratti pre-testati e confermati negativi per la leptospira. 45 di questi campioni erano notoriamente positivi per:

- *Neisseria meningitidis* (n=5)
- *Streptococcus pneumoniae* (n=5)
- *Haemophilus influenzae b* (n=1)
- *Pseudomonas aeruginosa* (n=4)
- *Streptococcus agalactiae* (n=1)
- *Escherichia coli* (n=4)
- *Legionella pneumophila* (n=1)
- *Bartonella* (n=5)
- *Coxiella* (n=3)
- *Staphylococcus aureus* (n=1)
- *Mycobacterium avium* (n=1)
- *Staphylococcus oralis/mitis/sanguis* (n=1)
- *Francisella tularensis* (n=1)
- *Klebsiella kingae* (n=2)

Manuale d'uso EurobioPlex Leptospire

- *Tropheryma whipplei* (n=1)
- *Chikungunya* (n=1)
- Dengue (n=1 Dengue 1+ n=1 Dengue 2+ n=1 Dengue 3+ n=1 Dengue 4+ n=3 di sierotipo sconosciuto)
- *Zikavirus* (n=1)

Non è stata osservata alcuna reattività crociata con questi agenti patogeni.

Sensibilità: > 99%

La sensibilità è stata valutata su un totale di 50 campioni pre-testati e confermati positivi per la leptospira, di cui 39 di plasma sanguigno/EDTA e 11 di urina.

PCR di riferimento	PCR EuroBio			
		Positivo	Negativo	Totale
	Positivo	50	0	50
	Negativo	0	98	98
	Totale	50	98	148

La concordanza globale è > 99%.

I test sono stati realizzati su CFX96™.

L'estrazione è stata effettuata con estrattore NucliSENS easyMAG (Biomérieux) secondo le istruzioni del fornitore.

14. SPECIFICITÀ LEGATE ALLO STRUMENTO PER PCR IN TEMPO REALE T-COR 8™-IVD

T-COR 8™-IVD è uno strumento per PCR in tempo reale con 8 pozzetti programmabili indipendentemente che possono essere utilizzati, paziente per paziente, indipendentemente gli uni dagli altri, dal punto di vista dei test / «Dosaggio/Assay» eseguiti, dai programmi termici, e dal momento del lancio della PCR.

I 8 pozzetti possono anche essere utilizzati contemporaneamente con lo stesso «Dosaggio/Assay»

Nota: Miscelare bene dopo aver depositato il campione nella provetta pipettando avanti e indietro, evitando la formazione di bolle e assicurandosi che il volume del liquido sia ben situato sul fondo della provetta. Richiudere bene ogni provetta dopo ogni deposito del controllo o del campione per evitare qualsiasi contaminazione.

Controlli

Su T-COR 8™-IVD, per un corretto utilizzo del pacchetto, è necessario che questi controlli vengano eseguiti solo durante il primo utilizzo di un nuovo kit; in seguito, è possibile eseguire controlli regolari.

Manuale d'uso EurobioPlex Leptospire

Successivamente, il controllo di inibizione di RT-PCR (CI-ARN) permette di assicurarsi che nel campione testato non vi sia inibizione di RT-PCR, che l'estrazione si sia svolta come dovuto e che la PCR funzioni correttamente.

Test pazienti

<i>Con validazione dei controlli positivi e negativi solo una volta al primo utilizzo</i>	24 reazioni
Numero di test paziente possibile paziente per paziente con scongelo/congelamento 12 volte al massimo (3 volte per provetta/4 provette per reagente)	12 pazienti

Fluorofori

Sul T-COR 8™-IVD sono disponibili 4 combinazioni di fluorofori.

Per tutti gli EBX, incluso EBX-005, la combinazione FAM/HEX/Texas Red/Cy5 è quella scelta. Se certi canali non vengono utilizzati in alcuni kit, non ne va tenuto conto durante l'analisi dei risultati.

Utilizzo dei codici a barre (disponibili alle pagine 18-20)

1- Selezionare Menu > Nuova Analisi /New Run

2- selezionare Codice a barre/Barcode

3- Eseguire la scansione sulla destra dell'apparecchio del codice a barre desiderato:

- o per il controllo positivo (Codice a barre EBX-005 Pos Ctrl),
- o per il controllo negativo (Codice a barre EBX-005 NEG Ctrl),
- o per un campione (Codice a barre Saggio: EBX-005)

Lo strumento seleziona automaticamente uno degli 8 pozzetti disponibili. Seguire le istruzioni fornite dallo strumento.

4- Sollevare la valvola dal pozzetto x selezionato dall'apparecchio e verificare che il LED blu sia acceso, quindi selezionare «Sì/Yes».

5- Collocare la provetta nel pozzetto corrispondente, chiudere la valvola e poi selezionare «Successivo/Next».

6- Se si desidera assegnare un nome (facoltativo), selezionare «campione x/sample x» e denominarlo. Selezionare «Accetta/Accept».

7- Selezionare «Successivo/Next»

8- Per aggiungere/testare un altro controllo o campione, selezionare «Aggiungi pozzetto/Add well» e ricominciare al punto 3-

9- Selezionare «Avvio analisi/Start run»

Manuale d'uso EurobioPlex Leptospire

***Nota:** non è possibile modificare o aggiungere il nome di un campione o di un run al termine del run. Lo si deve fare prima o durante lo svolgimento del run.*

Presentazione e interpretazione dei risultati

Sono disponibili i risultati di Ct e le curve di amplificazione, a partire dalla T Valori SmartCT™/SmartCT™ Table (valori di Ct attribuiti su ciascun canale) e dai grafici di Ct in funzione dei cicli su ciascun canale, essendo i 2 visualizzabili in tempo reale sulla macchina.

Viene generata automaticamente un'analisi per i controlli negativi e positivi e anche per i campioni. Questa è disponibile in «Interpretazioni/Interpretations», alla fine del run, nella finestra «Vista/View».

Per il controllo positivo e il controllo negativo, sono possibili i seguenti risultati:

«Neg Ctrl Fail»: Non valido
«Neg Ctrl Valid»: Valido
«Pos Ctrl Fail»: Non valido
«Pos Ctrl Valid»: Valido

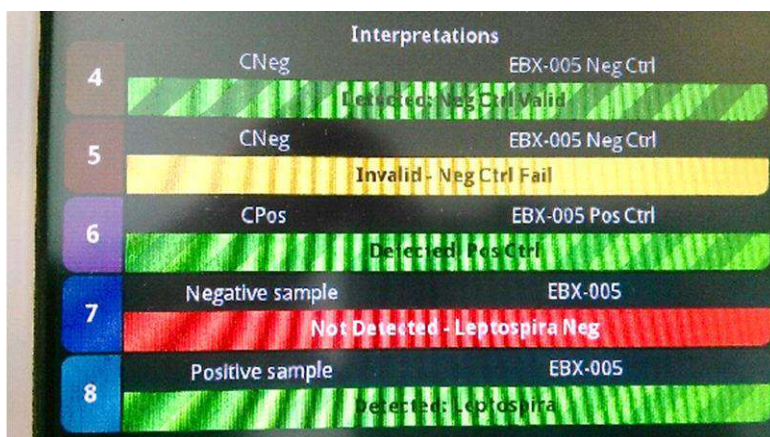
Determinazione dello stato per i campioni:

«Rilevato/i/Detected»: Positivo → riquadro verde
«Non rilevato/i/Not detected»: Negativo → riquadro rosso
«Non valido/Invalid» → ritestare → riquadro arancione

Esempio di presentazione di interpretazione automatica dei risultati sullo strumento e nel referto:

- Esempio per il controllo negativo valido (pozzetto 4) e il controllo positivo (pozzetto 6) validi indicati «Rilevato/Detected», per controllo negativo Non valido/Invalid (pozzetto 5), per un campione negativo indicato «Non rilevato/Not detected» (campione pozzetto 7) e per un campione positivo rilevato per il target Leptospira indicato (Rilevato/Detected Leptospira) (campione pozzetto 8):

❖ Sullo schermo dello strumento:

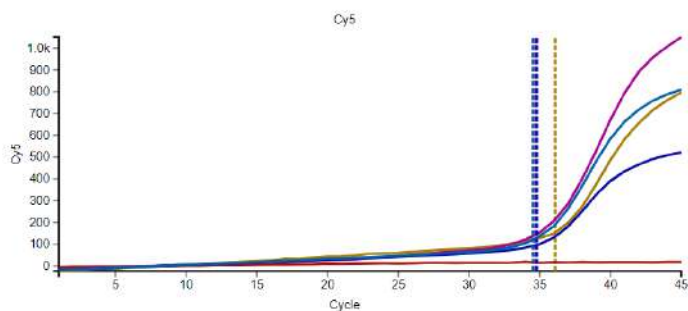
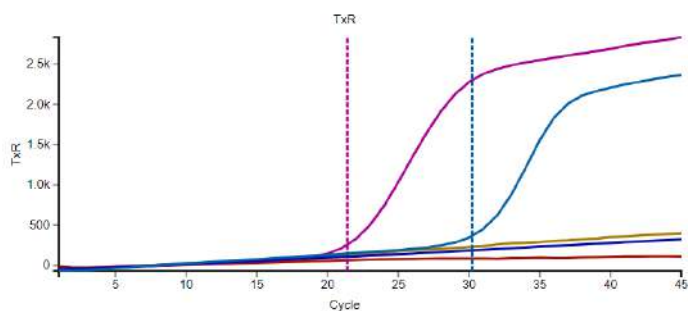


❖ Nel rapporto:

Manuale d'uso EurobioPlex Leptospire

Summary							
Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5	Call
4	CNeg	EBX-005 Neg Ctrl				36.1	Detected • Neg Ctrl Valid
5	CNeg	EBX-005 Neg Ctrl					Invalid
6	CPos	EBX-005 Pos Ctrl				21.4 34.7	Detected • Pos Ctrl
7	Negative sample	EBX-005				34.8	Not Detected
8	Positive sample	EBX-005				30.2 34.5	Detected • Leptospira
							Leptospira Neg

Esempio di curve di amplificazione

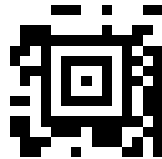


Codici a barre **SU T-COR8™-IVD** per **EBX-005**

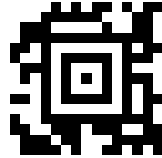
EBX-005 Pos Ctrl
Controllo positivo CP



EBX-005 Neg Ctrl
Acqua = controllo negativo (CN-H2O)



Saggio: EBX-005



15. CONTROLLO QUALITÀ

In conformità al sistema di gestione della qualità di Eurobio Scientific, certificato ISO EN 13485, ciascun lotto di EurobioPlex Leptospire viene testato secondo specifiche predefinite per garantire una qualità costante dei prodotti.

16. BIBLIOGRAFIA

- Giry C, Roquebert B, Li-Pat-Yuen G, Gasque P, Jaffar-Bandjee M.C. Simultaneous detection of chikungunya virus, dengue virus and human pathogenic *Leptospira* genomes using a multiplex TaqMan® assay. *BMC Microbiol.* 2017;17(1):105.
- Perez J, Goarant C. Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. *BMC Microbiol.* 2010;10:325.
- Goarant C, Laumond-Barny S, Perez J, Vernel-Pauillac F, Chanteau S, Guigon A. Outbreak of leptospirosis in New Caledonia: diagnosis issues and burden of disease. *Trop Med Int Health.* 2009;14(8):926-9.
- Tubiana S, Mikulski M, Becam J, Lacassin F, Lefèvre P, Gourinat AC, Goarant C, D'Ortenzio E. Risk factors and predictors of severe leptospirosis in New Caledonia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(1):e1991.
- van de Werve C, Perignon A, Jauréguiberry S, Bricaire F, Bourhy P, Caumes E. Travel-related leptospirosis: a series of 15 imported cases. *J Travel Med.* 2013;20(4):228-31.
- Hochedez P, Escher M, Decoussy H, Pasgrimaud L, Martinez R, Rosine J, Théodose R, Bourhy P, Picardeau M, Olive C, Ledrans M, Cabie A. Outbreak of leptospirosis among canyoning participants, Martinique, 2011. *Euro Surveill.* 2013;18(18):20472.
- Bourhy P, Herrmann Storck C, Theodose R, Olive C, Nicolas M, Hochedez P, Lamaury I, Zinini F, Brémont S, Landier A, Cassadou S, Rosine J, Picardeau M. Serovar diversity of pathogenic *Leptospira* circulating in the French West Indies. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(3):e2114.
- Bourhy P, Brémont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M. Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *J Clin Microbiol.* 2011;49(6):2154-60.
- Legkoby T, David DJ, Lee Robin SH. Diagnostic biologique de la leptospirose, Avis sur les actes, Haute autorité de santé, service evaluation des actes professionnels, www.has-santé.fr
- Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;249(1):139-47.
- Levett PN. Sequence-based typing of *leptospira*: epidemiology in the genomic era. *PLoS Negl Trop Dis.* 2007;1(2):e120.
- Levett PN, Morey re, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer, LW. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol.* 2005 Jan;54(Pt 1):45-9.
- Slack A. Leptospirosis. *Aust Fam Physician.* 2010 Jul;39(7):495-8. Review.

- Stoddard RA. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through real-time PCR (qPCR) targeting the LipL32 gene. *Methods Mol Biol.* 2013;943:257-66.
- Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu LF, Jiang HQ, Jia J, Tu YF, Jiang JX, Gu WY, Zhang YQ, Cai Z, Sheng HH, Yin HF, Zhang Y, Zhu GF, Wan M, Huang HL, Qian Z, Wang SY, Ma W, Yao ZJ, Shen Y, Qiang BQ, Xia QC, Guo XK, Danchin A, Saint Girons I, Somerville RL, et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature.* 2003;422(6934):888-93.
- Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, Recommandations de bonnes pratiques, www.has-santé.fr

17. SMALTIMENTO DEI RESIDUI

Smaltire tutti i residui in conformità alla legislazione sui DASRI.

18. DICHIARAZIONE DI INCIDENTE

Qualsiasi incidente grave che coinvolga il dispositivo deve essere notificato a EUROBIO SCIENTIFIC e all'autorità competente dello Stato membro in cui risiede l'utilizzatore e/o il paziente.

19. ASSISTENZA TECNICA

Per assistenza sui nostri prodotti, si prega di contattare il nostro supporto tecnico.

Il servizio clienti di EUROBIO SCIENTIFIC è contattabile per posta elettronica all'indirizzo adv@eurobio-scientific.com o telefonicamente al numero +33 (0)1.69.07.94.77.





EurobioPlex *Leptospira*

Para RT-PCR **qualitativa** em tempo real

REF **EBX-005A**
 EBX-005-48
 EBX-005-24



96/48/24 reações



Validade para :

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) com análise em CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)
- LightCycler®480 Instrument II (Roche) com análise em LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- T-COR 8™-IVD (Tetracore Inc.) com T-COR 8 SmartCT™ (auto v1) software



Instruções de utilização

Disponível em www.eurobio-scientific.com

O Resumo da Segurança e do Desempenho (RSD) será disponibilizado pelo Organismo Notificado certificador no EUDAMED assim que estiver operacional. Pode também ser obtido mediante pedido.

Instruções de utilização EurobioPlex Leptospire

Índice

1. INFORMAÇÕES GERAIS.....	124
2. UTILIZAÇÃO PREVISTA	126
3. SÍMBOLOS.....	127
4. PRINCÍPIO.....	128
5. COMPONENTES DO KIT	129
6. CONSERVAÇÃO E ARMAZENAMENTO	129
7. MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS:	129
8. INSTRUMENTO DE PCR EM TEMPO REAL	130
9. AVISOS E PRECAUÇÕES	130
10. PROTOCOLO	131
I. COLHEITA DAS AMOSTRAS	131
II. EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS	131
III. REALIZAÇÃO DA RT-PCR EM TEMPO REAL	131
IV. PROCEDIMENTO DETALHADO	133
11. VALIDAÇÃO DA EXPERIÊNCIA.....	134
12. ANÁLISE DOS DADOS E INTERPRETAÇÃO.....	135
13. ANÁLISE DO DESEMPENHO.....	136
14. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DO INSTRUMENTO DE PCR EM TEMPO REAL T-COR 8™-IVD	137
15. CONTROLO DA QUALIDADE	144
16. BIBLIOGRAFIA	144
17. ELIMINAÇÃO DE RESÍDUOS.....	145
18. DECLARAÇÃO DE INCIDENTE.....	145
19. ASSISTÊNCIA TÉCNICA.....	145

1. INFORMAÇÕES GERAIS

A leptospirose, por vezes chamada «doença do rato» é uma doença infecciosa de origem bacteriana, causada pelas leptospiros. As leptospiros são um grupo de bactérias frequentemente agrupadas na espécie *Leptospira interrogans*. Esta doença é ubíqua. Recentemente, registou-se um forte aumento no número de casos sinalizados. Como zoonose, ela afeta os animais que vivem na proximidade do ser humano, tais como ratos ou porcos. A leptospira é um patógeno para o homem.

Na maior parte das regiões do mundo, presume-se que os micromamíferos (roedores, etc.) são o reservatório selvagem. A sua urina parece ser quase sempre a fonte direta ou indireta das infeções humanas. Mas como no caso da equinococose, a infeção natural dos cães (*leptospirose canina*) e outros canídeos também existe, provavelmente muito subestimada, e constitui um risco para os seres humanos. A leptospirose ocorre em diferentes partes do mundo, na Ilha da Reunião, Wallis e Futuna, Antilhas, Guiana Francesa, países tropicais, Sudeste Asiático, Camboja, Vietname, Laos. A leptospira até já foi detetada em Poitou Charente, no sul e sudoeste da França, junto de explorações suínícolas em regiões húmidas.

Um amplo polimorfismo de sintomas não específicos, e a diversidade dos órgãos afetados, tornam o diagnóstico clínico muito difícil. Além disso, existem formas agudas, subagudas e crónicas da doença que evoluem de forma muito diferente ao longo do tempo, dependendo dos indivíduos infetados, e também dos serovares (possivelmente novos ou emergentes), e que podem ser atenuados pela vacinação. Existem muitos serovares (icterohaemorrhagiae, canicola, pomona, por exemplo) que não têm uma assinatura antigénica homogénea, o que dificulta a conceção de vacinas eficazes. O teste PCR em tempo real tem interesse para o estudo da epidemiologia da leptospirose.

A leptospirose manifesta-se sob várias formas, que tornam difícil o seu diagnóstico, pois pode ser confundida com uma forte gripe (febre alta e dores). Pode começar com dores difusas ou localizadas (ex.: dores meníngeas) que, se não forem diagnosticadas a tempo, conduzem a uma perturbação na fala e no raciocínio (por causa da taxa elevada de ureia que aumenta no sangue em razão da insuficiência renal). Em certos casos, é acompanhada por icterícia (cerca de 40 % dos casos nas trincheiras durante a primeira guerra mundial) e/ou nefrite. Após diálise e antibióticos, o doente recupera em 5 a 6 semanas, se a doença tiver sido moderada (ainda que possam ainda ser encontradas bactérias na urina do doente várias semanas depois do desaparecimento dos sintomas). Caso contrário, a leptospirose pode evoluir para hemorragias violentas, por vezes letais, ou uma doença grave nos rins. As formas polisviscerais são possíveis em terreno fragilizado.

De acordo com as recomendações da OMS, a confirmação biológica da leptospirose baseia-se quer no isolamento da bactéria quer na identificação dos seus ácidos nucleicos em amostras biológicas, ou ainda na serologia positiva, num contexto clínico e epidemiológico sugestivo. O uso da cultura bacteriana é muito limitado devido às dificuldades da sua realização e do tempo necessário para o crescimento das bactérias.

A serologia é o exame mais frequentemente utilizado para o diagnóstico da leptospirose. Não existe antígeno normalizado, nem no plano nacional ou nem internacional, para a deteção de anticorpos dirigidos contra as leptospiros.

Existem numerosos testes para a deteção da leptospirose; podem ser agrupados em dois tipos: testes de deteção direta (identificação da bactéria ou moléculas bacterianas, incluindo ADN por PCR em tempo real) e testes que detetam a resposta humoral do paciente (testes serológicos). O teste de microaglutinação (MAT) é a técnica serológica de referência para a confirmação da leptospirose. O teste serológico é utilizado para detetar anticorpos de classe IgM quer por ELISA quer por tiras.

A deteção precoce da leptospirose pode fazer-se por PCR em tempo real, em geral a partir do plasma preparado a partir do sangue do doente, que obtém melhores resultados do que o soro. O tempo

Instruções de utilização EurobioPlex Leptospire

ideal para a colheita do sangue é antes de a doença atingir os 8 dias. Não vale a pena realizar o teste PCR em tempo real no sangue mais de 10 dias após o início sintomatológico da doença (fim do período bacteriémico). A Alta Autoridade da Saúde (HAS - França) indicou que o teste PCR simples (não em tempo real) não tem interesse para o diagnóstico biológico específico da leptospirose. A HAS considera que a técnica de PCR em tempo real é atualmente a mais interessante para o diagnóstico biológico específico precoce da leptospirose. Deve ser reservada para os primeiros 8 dias após o aparecimento de febre, realizada numa amostra de sangue colhida, de preferência, antes do início da antibioterapia. Devido à baixa concentração habitual de leptospiras no sangue, qualquer PCR negativo em tempo real deve ser investigado serologicamente.

Instruções de utilização EurobioPlex Leptospire

2. UTILIZAÇÃO PREVISTA

O EurobioPlex Leptospira é um ensaio de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) concebido para a deteção qualitativa da presença ou ausência de leptospira, por amplificação dos ácidos nucleicos deste patógeno num extrato de ácidos nucleicos. O teste é indicado para fazer um diagnóstico presuntivo de infeção por leptospira em seres humanos, ou para complementar um diagnóstico provado ou indeterminado. O extrato é o material de partida para o kit EurobioPlex Leptospira.

Este sistema foi validado nos seguintes tipos de amostras:

- Plasma
- Soro
- Urina

O teste EurobioPlex Leptospire é um dispositivo médico de diagnóstico *In Vitro*, que deve ser utilizado por pessoal de laboratório de análise de biologia médica qualificado. Este dispositivo não pode ser reciclado depois de ser utilizado.

Este dispositivo não se destina à despistagem das leptospirosas em banco de sangue ou de órgãos.

3. SÍMBOLOS



Referência



Número de lote



Limite de temperatura



Data de validade



Conteúdo suficiente para «N» reações



Fabricante



Data de fabrico



Marcação CE de conformidade



Diagnóstico in vitro



Instruções de utilização



Atenção



Não utilizar se a embalagem estiver danificada



Conservar ao abrigo da luz

Instruções de utilização EurobioPlex Leptospire

4. PRINCÍPIO

O EurobioPlex Leptospira é um teste de amplificação dos ácidos nucleicos de leptospira, bem como de um controlo de extração e inibição de RT-PCR, encapsulado, que utiliza a amplificação por RT-PCR em tempo real. O teste é realizado a partir do extrato da amostra por meio de uma reação única num único poço/tubo.

O controlo de extração e inibição de RT-PCR (CI-ARN) permite determinar possíveis variações que podem ocorrer durante as etapas de extração de ARN e ADN a partir de amostras biológicas e de amplificação por PCR em tempo real. Permite assegurar que um resultado negativo não é devido a uma extração incorreta de ADN e ARN e/ou à presença de inibidores de RT-PCR em quantidade demasiado grande.

Os ácidos nucleicos de leptospira são detetados através de uma sonda marcada TEXAS RED. O controlo de extração e inibição de RT-PCR é detetado através de uma sonda marcada Cy5. No decorrer do alongamento do produto amplificado, as sondas emitem uma fluorescência específica, no seguimento da sua hidrólise. A medição das intensidades de fluorescência em tempo real é relativa à acumulação dos produtos de amplificação específicos.

Tabela 1: Detecção de alvos por fluoróforos

Alvo	Fluoróforo	Excitação	Emissão
Leptospira	Texas Red	485 nm	605 nm
Controlo de extração e inibição de PCR (CI-ARN)	Cy5	647 nm	667 nm

Canais equivalentes nos diferentes instrumentos de PCR:

- Canal **Texas Red** (Sistemas ABI, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96™, Sistemas Mx, T-COR 8™-IVD), LC Red 610 (LC480®), Canal Orange (RotorGene)
- Canal **Cy5** (Sistemas ABI, Chromo 4/CFX96™, Sistemas Mx, T-COR 8™-IVD), Canal Alexa647 (SmartCycler II), Canal 660 (LC 480), Canal Red (RotorGene)

Nota: No LC480 instrument II: Aplicar uma compensação de cor para os comprimentos de ondas TexasRed-Cy5 (533-610, 618-660).

Instruções de utilização EurobioPlex Leptospire

5. COMPONENTES DO KIT

O kit de RT-PCR em tempo real EurobioPlex Leptospira está pronto a usar para a deteção específica da leptospira.

A fluorescência é emitida e medida de maneira individual por um sistema ótico durante o PCR. A deteção dos fragmentos amplificados é efetuada por um fluorómetro utilizando os canais mostrados na Tabela 1.

O kit contém os reagentes e enzimas necessários para a amplificação dos ácidos nucleicos de leptospira e do controlo de extração e inibição de RT-PCR (Tabela 2).

Tabela 2: Componentes do kit

Cor da tampa	Conteúdo do kit	EBX-005A (96 testes)	EBX-005-48 (48 testes)	EBX-005-24 (24 testes)	Reconstituição
Vermelho	Enzimas	2 X 1100µl	1100µl	4 x 130µl	Pronto a usar
Transparente	Oligomix	2 X 400µl	400µl	4 x 50µl	Pronto a usar
Azul	Água = controlo negativo (CN-H ₂ O)	2 x 1 ml	1 ml	1 ml	Pronto a usar
Amarelo	Controlo positivo Leptospira (CP)	2 x 150 µl	150 µl	4 x 20 µl	Pronto a usar
Branco	Controlo de extração e inibição de RT-PCR (CI-ARN)	2 x 650 µl	650 µl	4 x 80 µl	Pronto a usar

6. CONSERVAÇÃO E ARMAZENAMENTO

Todos os reagentes devem ser conservados entre -15 °C e -22 °C.

Todos os reagentes podem ser utilizados até à data de validade indicada no rótulo do kit.



Devem ser evitados vários ciclos de congelação / descongelação (>3x), pois isso poderá reduzir a sensibilidade da análise.

7. MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS:

- Câmara de segurança biológica
- Aparelho de PCR em tempo real
- Centrífuga para microtubos
- Agitador Vortex
- Placas / tubos para reação de PCR em tempo real
- Micropipetas
- Pontas DNase-free e RNase-free com filtro para micropipetas
- Microtubos estéreis
- Luvas (sem talco)
- Autómato de pipetagem tipo MICROLAB NIMBUS IVD® (Hamilton).

Instruções de utilização EurobioPlex Leptospire

8. INSTRUMENTO DE PCR EM TEMPO REAL

O kit EurobioPlex Leptospira foi desenvolvido e validado para ser utilizado com os seguintes instrumentos de PCR em tempo real:

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) com análise em CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)
- LightCycler®480 Instrument II (Roche) com análise em LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- T-COR 8™-IVD (Tetracore Inc.) com T-COR 8 SmartCT™ (auto v1) software

9. AVISOS E PRECAUÇÕES



Ler atentamente estas instruções antes de iniciar o procedimento.

- ◇ Esta experiência deve ser realizada por técnicos de laboratórios de análise de biologia médica.
- ◇ Assegurar-se de que os instrumentos foram instalados, calibrados e mantidos em conformidade com as recomendações do fabricante.
- ◇ É da responsabilidade do utilizador a utilização de outro equipamento que não o validado e, neste caso, o desempenho não é garantido.
- ◇ As amostras clínicas devem ser consideradas como material potencialmente infeccioso e devem ser preparadas numa câmara de fluxo laminar.
- ◇ Esta experiência deve ser realizada de acordo com as boas práticas laboratoriais.
- ◇ Não utilizar este kit após a data de validade indicada no rótulo.
- ◇ Evitar a exposição prolongada dos reagentes à luz, limitada ao tempo técnico necessário à preparação da placa PCR, caso contrário, o desempenho não é garantido.
- ◇ O kit é expedido sob gelo seco, e os componentes do kit devem chegar congelados. Se um ou mais dos componentes chegar descongelado, ou se os tubos tiverem sido danificados durante o transporte, contactar a Eurobio Scientific.
- ◇ Uma vez descongelados os reagentes, centrifugar brevemente os tubos antes da sua utilização.
- ◇ É recomendada a definição de três zonas de trabalho distintas: 1) Isolamento do ARN/ADN, 2) Preparação da mistura reagente e 3) Amplificação / Detecção dos produtos amplificados.
- ◇ Usar batas e luvas (sem talco) diferentes em cada zona de trabalho.
- ◇ As pipetas, reagentes e outros materiais de trabalho não devem circular entre estas zonas.
- ◇ Deve haver um cuidado especial para conservar a pureza dos reagentes e das misturas reacionais.
- ◇ Devem ser utilizados métodos adequados de preparação/extração dos ácidos nucleicos para uma produção de ARN/ADN de qualidade e uma aplicação de RT-PCR em tempo real, nomeadamente para evitar qualquer risco de contaminação com os RNases/DNases.
- ◇ Utilizar pontas de filtro DNase-free e RNase-free para micropipetas,
- ◇ Não pipetar com a boca. Não comer, beber ou fumar no laboratório.
- ◇ Não utilizar o dispositivo se a embalagem estiver danificada.
- ◇ Evitar os aerossóis.

Instruções de utilização EurobioPlex Leptospire

10. PROTOCOLO

I. COLHEITA DAS AMOSTRAS

- ◇ Colher as amostras em tubos estéreis.
- ◇  **É proibida a utilização de heparina como anticoagulante.**
- ◇ É da responsabilidade do utilizador controlar as suas próprias condições de colheita, transporte, armazenamento e extração de amostras para assegurar que a extração de ARN/ADN por sistemas adequados produz ARN/ADN de qualidade.
- ◇ Recomenda-se que as amostras sejam extraídas imediatamente, ou conservadas de acordo com as recomendações de armazenamento das amostras antes da extração (Tabela 3).

Tabela 3: recomendações de armazenamento

Recomendações de armazenamento máximo das amostras antes da extração	
Temperatura ambiente	2 h
+4°C	1 semana
-20°C (de preferência -80°C)	Armazenamento de longa duração

Atenção	
	◇ O utilizador pode consultar as recomendações publicadas pela Organização Mundial da Saúde das entidades de saúde competentes para a boa conservação das amostras. ◇ Os ARN extraídos devem ser armazenados a -80°C ◇ O transporte de amostras clínicas está sujeito à regulamentação local para o transporte de agentes infecciosos.

II. EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

É responsabilidade dos utilizadores assegurar-se de que o sistema de extração dos ácidos nucleicos utilizado é compatível com a tecnologia de RT-PCR em tempo real. Para este kit, recomendamos a utilização de métodos de extração de ácidos nucleicos a partir de amostras de plasma ou urina, e consultar as instruções do fornecedor do kit de extração utilizado.

No kit Leptospira, o CI-ARN no canal CY5 pode ser adicionado antes da extração ou na reação de PCR. Permite assegurar que um resultado negativo não é devido a um problema de extração ou à presença de inibidores de RT-PCR em quantidade demasiado grande para validar o teste. Recomendamos a adição de 10 µl de CI-ARN por extração e um volume de eluição de 50 µl. Se o CI-ARN for apenas adicionado para controlar o RT-PCR, é adicionado à mistura reacional (1 microlitro por reação PCR). Ver Protocolo de PCR em tempo real para mais informações.

O CI-ARN também está disponível na Eurobio Scientific (Ref. EurobioPlex EBX-003).

III. REALIZAÇÃO DA RT-PCR EM TEMPO REAL

Observação geral:

O controlo positivo bem como o controlo de extração e amplificação por RT-PCR (CI-ARN) contêm concentrações elevadas de matriz. As manipulações devem ser feitas cuidadosamente para evitar qualquer contaminação. Para controlar o bom funcionamento da PCR, é necessário testar o controlo positivo CP bem como um controlo negativo (água fornecida = CN-H₂O + CI-ARN) (ver II-2/6) do protocolo de RT-PCR em tempo real).

No T-COR 8™-IVD, para uma boa utilização do kit, é necessário que estes controlos sejam realizados durante a primeira utilização de um novo kit apenas, os controlos regulares podem ser efetuados posteriormente.

Instruções de utilização EurobioPlex Leptospire

Esquema do procedimento

1 - PREPARAÇÃO DA MISTURA REAGENTE / MASTERMIX

(a) Se amostras extraídas sem CI-ARN

Número de reações	N+3*
Enzimas	(N+3) x 15 µl
Oligomix	(N+3) x 5 µl
CI-ARN	(N+3) x 1 µl
Volume total Mastermix	(N+3) x 21 µl**

(b) Se amostras extraídas com CI-ARN

Número de reações	N+3*
Enzimas	(N+3) x 15 µl
Oligomix	(N+3) x 5 µl
Volume total Mastermix	(N+3) x 20 µl**

*N+1 em T-COR 8™-IVD

2 - PREPARAÇÃO DAS REAÇÕES

Amostra

20 µl de Mastermix
+
5µl amostra extraída

Controlo positivo

20 µl de Mastermix
+
5 µl CP

Controlo negativo

20 µl de Mastermix
+
5µl Água biologia molecular (CN-H₂O)

Amostra

20 µl de Mastermix
+
5µl amostra extraída

Controlo positivo

20 µl de Mastermix
+
5 µl CP

Controlo negativo

20 µl de Mastermix
+
4µl Água biologia molecular (CN-H₂O)
+
1 µl CI-ARN

3 - INSTRUMENTO PCR EM TEMPO REAL (exceto T-COR 8™-IVD- programação automática com Código de barras - ver p.18 a 20)

Programa	Temperatura	Duração	Ciclo(s)	
Transcrição reversa	50 °C	10 min	1	-
Desnaturação	95 °C	3 min	1	-
Amplificação	95 °C	10 s	45	-
	60°C	30 s		Aquisição de fluorescência

Instruções de utilização EurobioPlex Leptospire

IV. PROCEDIMENTO DETALHADO

- 1) Homogeneizar o tubo de enzimas e agitar Oligomix, CP e CI-ARN no vortex, e depois centrifugar.
- 2) Preparar o Mastermix como abaixo, sendo N o número de reações (incluindo os controlos positivo e negativo), prever a quantidade de Mastermix para N+3 reações mínimo* (consultar a parte 1-a ou 1-b do esquema precedente, conforme o caso).

Caso (a): Extração da amostra SEM adição de CI-ARN

Número de reação(ões)	1	N+3*
Enzimas	15 µl	(N+3) x 15 µl
Oligomix	5 µl	(N+3) x 5 µl
CI-ARN	1 µl	(N+3) x 1 µl
Volume total Mastermix	21 µl**	(N+3) x 21 µl

Caso (b): Extração da amostra COM adição de CI-ARN

Número de reação(ões)	1	N+3*
Enzimas	15 µl	(N+3) x 15 µl
Oligomix	5 µl	(N+3) x 5 µl
Volume total Mastermix	20 µl**	(N+3) x 20 µl

* Para uma utilização no T-COR 8TM-IVD, recomendamos fazer um Mastermix para N+1 reações para uma utilização um a um do kit.

**A diferença de volume reagente entre o caso (a) e o caso (b) é negligenciável e não tem efeito sobre o desempenho.

- 38) Homogeneizar o Mastermix preparado em 2) e centrifugar brevemente.
- 39) Distribuir 20 µL de Mastermix** através de uma micropipeta e pontas de filtro em cada tubo/poço da microplaca para PCR em tempo real.
- 40) Adicionar 5 µL das amostras extraídas
- 41) Paralelamente, realizar os seguintes controlos (ver este ponto específico para T-COR 8TM-IVD páginas 14 a 17):
 - Controlo positivo: 20 µL de Mastermix + 5 µL de controlo positivo CP
 - Controlo negativo:
 - o Caso (a) Extração da amostra SEM adição de CI-ARN:
20 µl de Mastermix + 5 µl de água fornecida (CN-H2O)
 - o Caso (b) Extração da amostra COM adição de CI-ARN
20µl de Mastermix + 4µl de água fornecida (CN-H2O) + 1µl de CI-ARN
- 42) Fechar imediatamente os tubos ou a placa com uma película adesiva para evitar qualquer contaminação.
- 43) Centrifugar brevemente para recolher a mistura reacional no fundo dos tubos ou dos poços da microplaca.
- 44) Realizar o programa de acordo com o instrumento de PCR em tempo real (no T-COR 8TM-IVD não é necessária nenhuma programação manual devido aos Códigos de barras - ver páginas 18 a 20). O programa dura cerca de 1h15.

Programa	Temperatura	Duração	Ciclo(s)	
Transcrição reversa	50 °C	10 min	1	-
Desnaturação	95°C	3 min	1	-
Amplificação	95°C	10 s	45	-
	60°C	30 s		Aquisição de fluorescência

Instruções de utilização EurobioPlex Leptospire

Nota 1: No LightCycler® 480 (Roche), existem dois sistemas óticos: apenas o « System II » é compatível com a utilização do kit. Aplicar uma compensação de cor para os comprimentos de ondas Texas Red-Cy5 (533-610,618-660).

Nota 2: Para os aparelhos da gama Applied Biosystems, seleccionar « NONE » em « PASSIVE REFERENCE ».

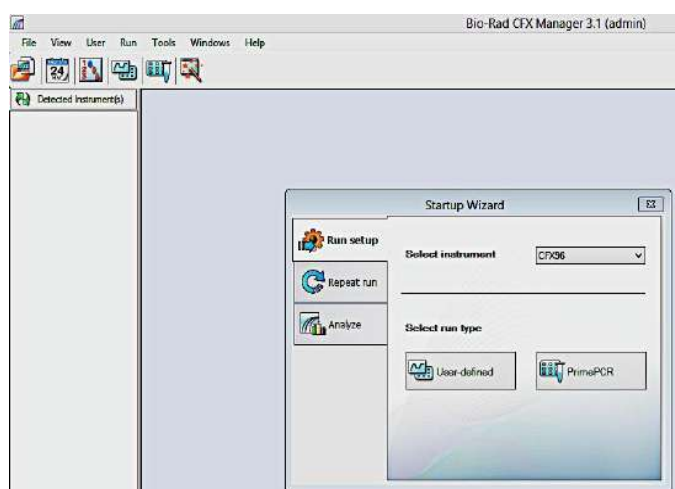
Nota 3: No Rotorgene™, calibrar o sinal clicando em « GAIN OPTIMISATION ».

Nota 4: No CFX96™ (Bio-Rad), lançar a run a partir da versão 1.6 ou posterior e, a seguir, analisar com a versão 3.1 (ver § Validação da experiência).

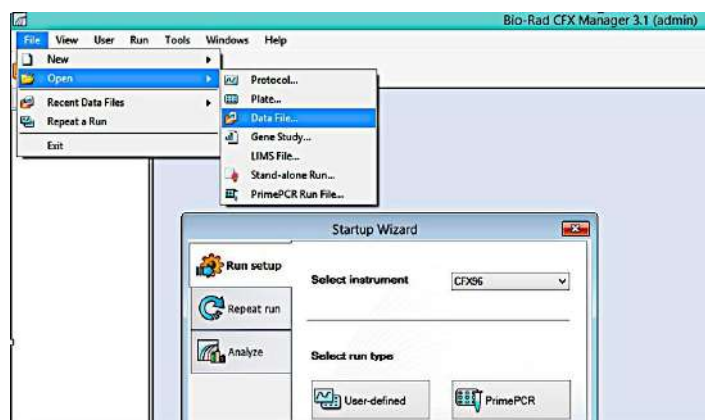
11. VALIDAÇÃO DA EXPERIÊNCIA

A análise dos data post-acquisition num aparelho de PCR CFX96™ (Bio-Rad) deve ser realizada através da versão 3.1 do software CFX Manager (Bio-Rad). A fim de atualizar para esta versão a partir de uma run iniciada numa versão anterior, siga o seguinte procedimento: no final da run, o ficheiro de dados com o sufixo .pcrd deve ser aberto e processado com a versão 3.1 do CFX Manager (Bio-Rad).

Se a run foi iniciada com o software CFX Manager v1.6, por exemplo, para abrir um ficheiro de dados com software CFX Manager v3.1, clicar no ícone CFX Manager v3.1. Aparece o ecrã de início.



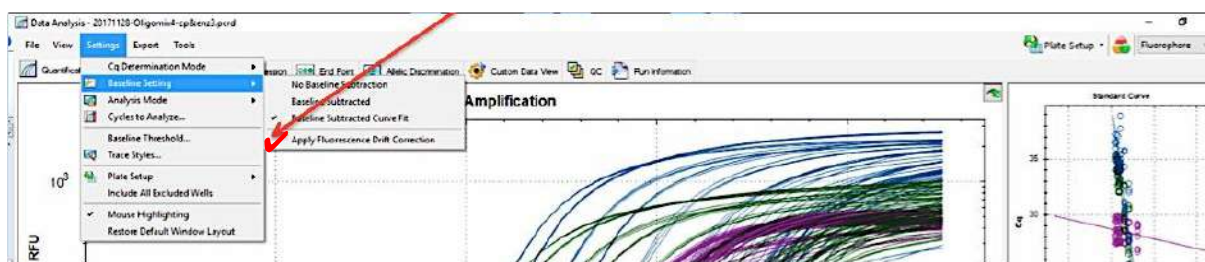
- Clicar em File e seleccionar Open e depois Data File.



- Seleccionar no ficheiro que deseja analisar e clicar em Abrir.

Instruções de utilização EurobioPlex Leptospire

A opção « drift correction » deve ser aplicada no separador « Settings » como mostra a imagem abaixo: clicar no separador Settings, depois em Baseline Setting e em Apply Fluorescence Drift Correction.



Uma vez realizada esta etapa, a análise pode começar.

Para que a dosagem seja válida, os valores de Ct para os controlos devem ser as seguintes (Tabela 4); de outro modo, a experiência não pode ser validada.

No T-COR 8™-IVD, para uma boa utilização do kit, é necessário que estes controlos sejam realizados durante a primeira utilização de um novo kit apenas, os controlos regulares podem ser efetuados posteriormente.

Tabela 4:

Controlo positivo	
TEXAS RED	Ct < 27
Controlo negativo	
TEXAS RED	Ct não determinado
CY5	Ct ≤ 45

No T-COR 8™-IVD, a interpretação é gerada automaticamente com os códigos de barras

12. ANÁLISE DOS DADOS E INTERPRETAÇÃO

Para as amostras clínicas, são possíveis os seguintes resultados:



***Limiar de Ct para a positividade das amostras:
Canal TEXAS RED *Leptospira*: + Positivo => Ct ≤ 45**

Sinal PCR			Validade do teste/comentário
TEXAS RED	CY5	Leptospira	
+	+	Positivo	Válido
-	+	Negativo	Válido
+	-	Positivo	Possível inibição de extração ou de RT-PCR que não impede a deteção da bactéria: válido
-	-	Não interpretável	Problema de extração ou inibição de RT-PCR - diluir 5 x a amostra; se o resultado for o mesmo, fazer nova extração da amostra

Instruções de utilização EurobioPlex Leptospire

13. ANÁLISE DO DESEMPENHO

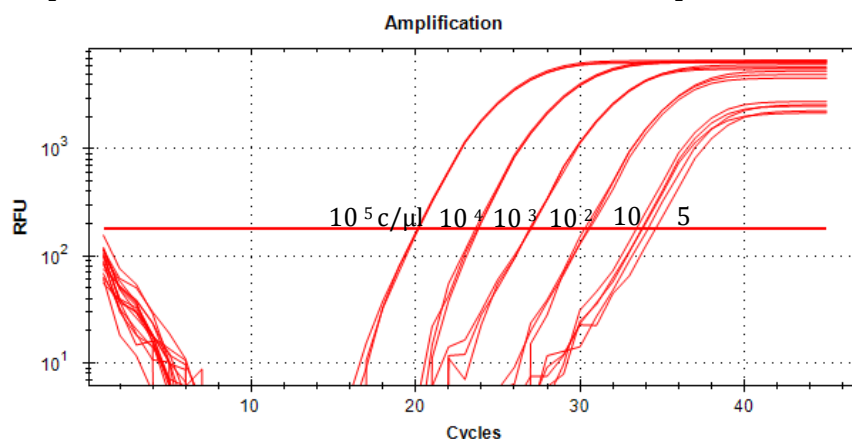
Limite de detecção/sensibilidade analítica:

5 cópias CP/μl (1 cópia de leptospira = 5 equivalentes cópias genoma (Bourhy et al. 2011)).

Na estirpe bacteriana *Leptospire interrogans* : 100 bactérias/ml em plasma

250 bactérias/ml em soro, e a 500 bactérias/ml em urina.

Exemplo de experiência realizada em termociclador PCR tempo real CFX96™ (Bio-Rad):



Reprodutibilidade do sinal no canal de Leptospira (Texas Red)

Reprodutibilidade	Coeficiente de Variação (%) no Controlo positivo	Coeficiente de Variação (%) no ARN
Intra-run	1,35	2,44
Inter-runs	5,15	2,04
Inter-lotes	1,83	2,45

Especificidade: > 99 %

A especificidade foi avaliada num total de 98 amostras extraídas pré-testadas e confirmadas negativas para leptospira. 45 destas amostras eram conhecidas por serem positivas para:

- *Neisseria meningitidis* (n=5)
- *Streptococcus pneumoniae* (n=5)
- *Haemophilus influenzae b* (n=1)
- *Pseudomonas aeruginosa* (n=4)
- *Streptococcus agalactiae* (n=1)
- *Escherichia coli* (n=4)
- *Legionella pneumophila* (n=1)
- *Bartonella* (n=5)
- *Coxiella* (n=3)
- *Staphylococcus aureus* (n=1)
- *Mycobacterium avium* (n=1)
- *Staphylococcus oralis/mitis/sanguis* (n=1)
- *Francisella tularensis* (n=1)
- *Klebsiella kingae* (n=2)

Instruções de utilização EurobioPlex Leptospire

- *Tropheryma whipplei* (n=1)

- *Chikungunya* (n=1)

- *Dengue* (n=1 *Dengue* 1+ n=1 *Dengue* 2+ n=1 *Dengue* 3+ n=1 *Dengue* 4+ n=3 de serotipo desconhecido)

- *Zikavirus* (n=1)

Por conseguinte, não foi observada nenhuma reatividade cruzada com estes agentes patogénicos.

Sensibilidade: > 99 %

A sensibilidade foi avaliada para um total de 50 amostras pré-testadas e confirmadas positivas para leptospira, das quais 39 de plasma provenientes de sangue/EDTA e 11 de urina.

PCR Referência	PCR Eurobio			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	50	0	50
	Negativo	0	98	98
	Total	50	98	148

A concordância global é de > 99 %

Os testes foram realizados em CFX96™.

A extração foi realizada com o extrator NucliSENS essayMAG (Biomérieux) seguindo as instruções do fornecedor.

14. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS AO INSTRUMENTO DE PCR EM TEMPO REAL T-COR 8™-IVD

O T-COR 8™-IVD é um instrumento de PCR em tempo real com 8 poços programáveis independentemente que podem ser utilizados, doente a doente, independentemente um do outro, em termos dos testes/«Dosagem/Assay» realizados, dos programas térmicos, e do momento de execução da PCR.

Os 8 poços podem ser igualmente utilizados simultaneamente com a mesma «Dosagem/Assay».

Nota: Misturar completamente após colocar a amostra no tubo, pipetando para trás e para a frente, evitando a formação de bolhas e assegurando que o volume de líquido se encontra no fundo do tubo. Fechar bem cada tubo após cada colocação do controlo ou amostra, para evitar qualquer contaminação.

Controlos

No T-COR 8™-IVD, para uma boa utilização do kit, é necessário que estes controlos sejam realizados durante a primeira utilização de um novo kit apenas, os controlos regulares podem ser efetuados posteriormente.

Instruções de utilização EurobioPlex Leptospire

A seguir, o controlo de inibição de RT-PCR (CI-ARN) permite assegurar que dentro da amostra testada, não há inibição da RT-PCR, que a extração foi bem-sucedida e que a PCR funciona corretamente.

Testes de doentes

<i>Com validação dos controlos positivo e negativo uma única vez durante a primeira utilização</i>	24 reações
Número de testes de doentes possíveis, doente por doente com descongelamento/congelamento 12 vezes no máximo (3 vezes por tubos/4 tubos por reagentes)	12 doentes

Fluoróforos

Existem 4 combinações de fluoróforos disponíveis no T-COR 8™-IVD.

Para todos os EBX, entre os quais o EBX-005, a combinação FAM/HEX/Texas Red/Cy5 foi a escolhida. Se alguns canais não forem utilizados em alguns kits, ignore-os ao analisar os resultados.

Utilização dos Códigos de barras (disponíveis nas páginas 18 a 20)

1- Selecionar Menu > Nova Análise/New Run

2- Selecionar Código de barras/Barcode

3- Ler à direita do aparelho o Código de barras desejado:

- quer para o controlo positivo (Código de barras EBX-005 Pos Ctrl),
- quer para o controlo negativo (Código de barras EBX-005 Neg Ctrl),
- quer para uma amostra (Código de barras Assay: EBX-005)

O instrumento seleciona automaticamente um dos 8 poços disponíveis. Seguir as instruções dadas pelo instrumento.

4- Levantar a tampa do poço x selecionado pelo aparelho e verificar se a luz LED azul está acesa e, depois, selecionar « Sim/Yes ».

5- Posicionar o tubo no poço correspondente e baixar a tampa e, a seguir, selecionar « Seguinte/Next ».

6- Se desejar dar-lhe um nome (opcional), selecionar « amostra x /sample x », e dar-lhe um nome. Selecionar « Accept ».

7- Selecionar « Seguinte/Next »

8- Para adicionar/testar um outro controlo ou amostra, selecionar « Adicionar poço/Add well » e recomeçar no ponto 3-

9- Selecionar « Iniciar análise/Start run »

***Nota:** o nome de uma mostra ou da run não pode ser modificada ou adicionada depois do fim da run. O nome deve ser dado antes ou durante o desenrolar da run.*

Instruções de utilização EurobioPlex Leptospire

Apresentação e interpretação dos resultados

Os resultados de Ct e as curvas de amplificação estão disponíveis, a partir do Tabela de Valores SmartCT™/SmartCT™ Table (valores de Ct atribuídos em cada canal), e os gráficos de Ct em função dos ciclos em cada canal, sendo as 2 visualizáveis em tempo real na máquina.

Uma análise para os controlos negativo e positivo, bem como para as amostras, é gerada automaticamente. Ela está disponível em « Interpretações/Interpretations », no final da run, na janela « Vista/View ».

Para o controlo positivo e o controlo negativo, são possíveis os seguintes resultados:

- « Neg Ctrl Fail » : Não válido
- « Neg Ctrl Valid » : Válido
- « Pos Ctrl Fail » : Não válido
- « Pos Ctrl Valid » : Válido

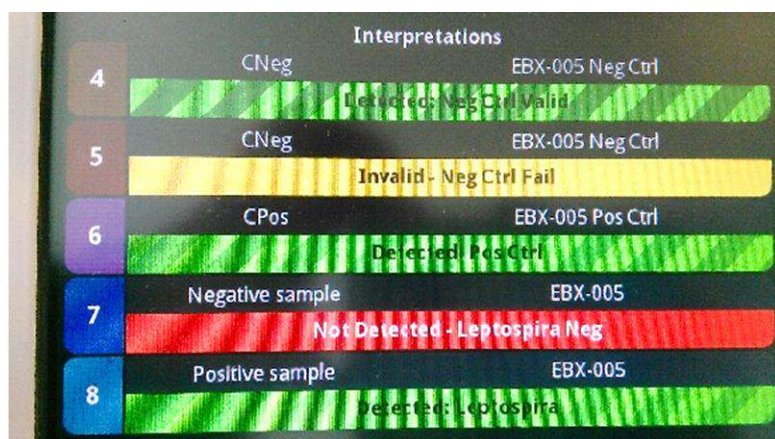
Determinação do estado para as amostras:

- « Detetado(s)/Detected »: Positivo → moldura verde
- « Não detetado/Not detected »: Negativo → moldura vermelha
- « Não válido/Invalid » -> voltar a testar → moldura laranja

Exemplo de apresentação de interpretação automática dos resultados no instrumento e no relatório:

- Exemplo para o controlo negativo (poço 4) e o controlo positivo (poço 6) válidos indicado « Detected /Detetado(s)», para o controlo negativo Invalid/Não válido (poço 5), para uma amostra negativa, indicado « Not Detected/Não Detetado » (amostra poço 7) e para uma amostra positiva detetada para o alvo Leptospira indicada (Detected/Detetado(s) Leptospira) (amostra poço 8):

❖ No ecrã do instrumento:

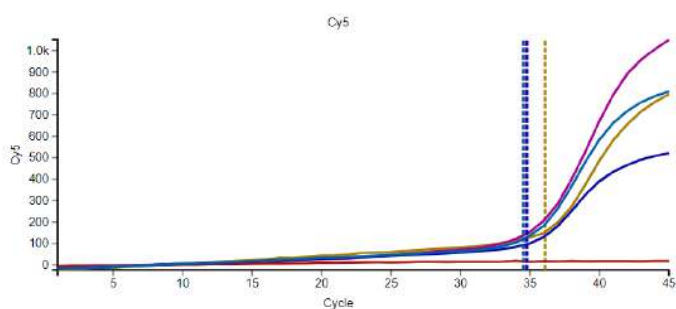
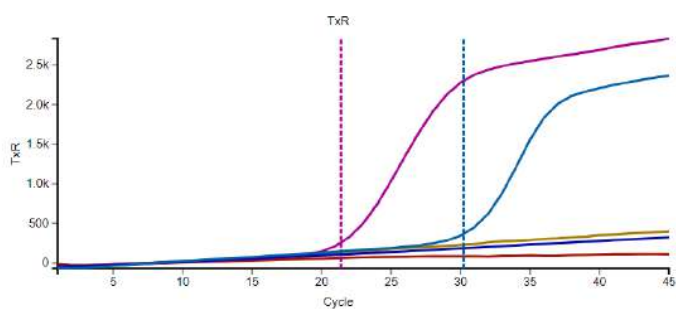


❖ No relatório:

Instruções de utilização EurobioPlex Leptospire

Summary							
Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5	Call
4	CNeg	EBX-005 Neg Ctrl				36.1	Detected • Neg Ctrl Valid
5	CNeg	EBX-005 Neg Ctrl					Invalid
6	CPos	EBX-005 Pos Ctrl				21.4 34.7	Detected • Pos Ctrl
7	Negative sample	EBX-005				34.8	Not Detected
8	Positive sample	EBX-005				30.2 34.5	Detected • Leptospira
							Leptospira Neg

Exemplo de curvas de amplificação



Códigos de barras no T-COR8™-IVD para EBX-005

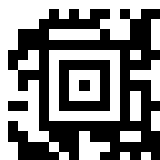
EBX-005 Pos Ctrl
Controlo positivo (CP)



EBX-005 Neg Ctrl
Água = controlo negativo (CN-H2O)



Assay: EBX-005



15. CONTROLO DA QUALIDADE

De acordo com o sistema de gestão da qualidade da Eurobio Scientific, certificado ISO EN 13485, cada lote de EurobioPlex Leptospira é testado em conformidade com as especificações pré-definidas para assegurar uma qualidade consistente do produto.

16. BIBLIOGRAFIA

- Giry C, Roquebert B, Li-Pat-Yuen G, Gasque P, Jaffar-Bandjee M.C. Simultaneous detection of chikungunya virus, dengue virus and human pathogenic *Leptospira* genomes using a multiplex TaqMan® assay. *BMC Microbiol.* 2017;17(1):105.
- Perez J, Goarant C. Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. *BMC Microbiol.* 2010;10:325.
- Goarant C, Laumond-Barny S, Perez J, Vernel-Pauillac F, Chanteau S, Guigon A. Outbreak of leptospirosis in New Caledonia: diagnosis issues and burden of disease. *Trop Med Int Health.* 2009;14(8):926-9.
- Tubiana S, Mikulski M, Becam J, Lacassin F, Lefèvre P, Gourinat AC, Goarant C, D'Ortenzio E. Risk factors and predictors of severe leptospirosis in New Caledonia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(1):e1991.
- van de Werve C, Perignon A, Jauréguiberry S, Bricaire F, Bourhy P, Caumes E. Travel-related leptospirosis: a series of 15 imported cases. *J Travel Med.* 2013;20(4):228-31.
- Hochedez P, Escher M, Decoussy H, Pasgrimaud L, Martinez R, Rosine J, Théodose R, Bourhy P, Picardeau M, Olive C, Ledrans M, Cabie A. Outbreak of leptospirosis among canyoning participants, Martinique, 2011. *Euro Surveill.* 2013;18(18):20472.
- Bourhy P, Herrmann Storck C, Theodose R, Olive C, Nicolas M, Hochedez P, Lamaury I, Zinini F, Brémont S, Landier A, Cassadou S, Rosine J, Picardeau M. Serovar diversity of pathogenic *Leptospira* circulating in the French West Indies. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(3):e2114.
- Bourhy P, Brémont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M. Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *J Clin Microbiol.* 2011;49(6):2154-60.
- Legkoby T, David DJ, Lee Robin SH. Diagnostic biologique de la leptospirose, Avis sur les actes, Haute autorité de santé, service evaluation des actes professionnels, www.has-santé.fr
- Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;249(1):139-47.
- Levett PN. Sequence-based typing of *leptospira*: epidemiology in the genomic era. *PLoS Negl Trop Dis.* 2007;1(2):e120.
- Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol.* 2005 Jan;54(Pt 1):45-9.
- Slack A. Leptospirosis. *Aust Fam Physician.* 2010 Jul;39(7):495-8. Review.

Instruções de utilização EurobioPlex Leptospire

- Stoddard RA. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through real-time PCR (qPCR) targeting the LipL32 gene. *Methods Mol Biol.* 2013;943:257-66.
- Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu LF, Jiang HQ, Jia J, Tu YF, Jiang JX, Gu WY, Zhang YQ, Cai Z, Sheng HH, Yin HF, Zhang Y, Zhu GF, Wan M, Huang HL, Qian Z, Wang SY, Ma W, Yao ZJ, Shen Y, Qiang BQ, Xia QC, Guo XK, Danchin A, Saint Girons I, Somerville RL, et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature.* 2003;422(6934):888-93.
- Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, Recommandations de bonnes pratiques, www.has-santé.fr

17. ELIMINAÇÃO DE RESÍDUOS

Eliminar todos os resíduos em conformidade com a legislação sobre resíduos de atividades de cuidados de saúde com riscos infecciosos.

18. DECLARAÇÃO DE INCIDENTE

Qualquer incidente grave relacionado com o dispositivo deve ser comunicado à EUROBIO SCIENTIFIC e à autoridade competente do Estado-membro em que o utilizador e/ou o doente se encontra estabelecido.

19. ASSISTÊNCIA TÉCNICA

Para obter assistência para os nossos produtos, contactar o nosso apoio técnico.

O serviço a clientes da EUROBIO SCIENTIFIC pode ser contactado por via eletrónica (mail) para o endereço adv@eurobio-scientific.com ou por telefone pelo +33 (0)1.69.07.94.77.



eurobio
SCIENTIFIC

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