

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

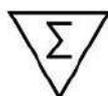


## **EurobioPlex** *Chikungunya/Dengue*

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

**REF**

**EBX-009**  
**EBX-009-48**  
**EBX-009-24**  
**EBX-009A**  
**EBX-009A-48**



**24/48/96 réactions**



**EBX-009 FT v.12.00 du 17/09/2024**

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

## 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)
- Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) avec analyse sur 7500 Software v2
- T-COR 8®-IVD (Tetracore Inc.) avec T-COR 8 SmartCT™ (auto v1) software



Notice d'utilisation

Disponible sur [www.eurobio-scientific.com](http://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 Chikungunya/Dengue

---

## Table des matières

Table des matières.....	3
1. Informations générales.....	4
2. Destination du dispositif.....	5
3. Symboles.....	6
4. Principe.....	7
5. Composants du kit.....	8
6. Conservation et stockage.....	9
7. Matériel requis non fournis.....	9
8. Instrument de PCR en temps réel.....	9
9. Mises en garde et précautions.....	10
10. Protocole.....	11
11. Validation de l'expérimentation.....	15
12. Analyse des données et interprétation.....	17
13. Analyse des performances.....	18
14. Particularités liées à l'instrument de PCR en temps réel T-COR 8®-IVD.....	21
15. Contrôle qualité.....	29
16. Bibliographie.....	29
17. Elimination des déchets.....	29
18. Déclaration d'incident.....	29
19. Assistance technique.....	30

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

## 1. Informations générales

Les virus du Chikungunya et de la Dengue sont des Arthropod-Borne virus (Arbovirus), transmis par les arthropodes (moustiques, tiques, phlébotomes etc.). Le virus de la Dengue appartient à la famille des *Flaviviridae* et celui du Chikungunya aux *Alphaviridae* de la famille des *Togaviridae*. Ils sont transmis par diverses espèces de moustiques du genre *Aedes* tel que *aegypti* (principalement en Amérique tropicale et subtropicale, et sud des Etats-Unis) et *albopictus* (principalement en Asie), *furcifer*, *africanus*, *taylori* et *luteopha-lus* avec une répartition mondiale, en particulier dans les régions tropicales. Les deux premières espèces sont identifiées à ce jour comme les principaux vecteurs épidémiques, à cause de leur adaptation aux zones d'habitat humain. En France, les régions du sud sont plus particulièrement concernées.

**Dengue**: Il existe 4 sérotypes de la Dengue (DENV 1-4). Le génome de la Dengue est un ARN simple brin. La réplication du virus et la transcription se produit dans le cytoplasme de la cellule hôte. La maladie débute avec une fièvre, et des douleurs musculaires et articulaires. Dans la majorité des cas, l'infection ne présente pas de complications mais dans 20% des cas elle peut être plus sévère et parfois engager un pronostic vital, surtout dans le cas d'infections secondaires, avec un choc hémorragique, puisqu'une infection par une souche ne protège pas l'hôte d'une infection par une autre souche.

**Chikungunya**: Le virus du Chikungunya (CHIKV) est un petit virus enveloppé de forme sphérique d'ARN simple brin d'approximativement 12 kbp. La phase virémique de l'infection par le Chikungunya dure en moyenne de 3 à 10 jours. Les signes cliniques majeurs sont l'apparition brutale d'une forte fièvre (> 40 °C), qui dure de 24 à 48 heures, accompagnée d'arthralgies et de myalgies, des polyarthralgies très douloureuses qui touchent particulièrement les articulations des extrémités telles que les poignets, les chevilles ou les phalanges, avec un gonflement articulaire prononcé, des manifestations cutanées de type de rash maculo-papuleux, érythémateux ou d'œdèmes. Les infections par le CHIKV peuvent évoluer en maladie chronique. Les symptômes sont similaires à ceux de la malaria, de l'infection par la dengue, et il n'est pas rare de trouver les 2 simultanément. Pour un certain nombre de patients (10 à 70 %), des récurrences cliniques de la maladie sont observées à une distance de plusieurs mois de la phase aiguë. Il n'existe pas de traitement spécifique du chikungunya.

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

## 2. Destination du dispositif

Le test Chikungunya/Dengue 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 des virus Chikungunya et des 4 sérotypes de Dengue, sans différenciation, dans un extrait d'acides nucléiques ARN.

Le test Chikungunya/Dengue est indiqué pour aider à poser un diagnostic de présomption d'infection chez l'homme, ou compléter un diagnostic sérologique avéré ou indéterminé. L'extrait d'ARN est le matériel de départ pour le kit Eurobioplex Chikungunya/Dengue. L'ARN est extrait à partir du plasma, ou du sérum de patients.

Ce système d'amplification a été validé sur des échantillons de plasma, et de sérum ainsi que sur un bactériophage à ARN encapsidé (CI-ARN).

Le test EurobioPlex Chikungunya/Dengue est un dispositif médical de diagnostic *In Vitro*, il doit être utilisé par du personnel de laboratoire d'analyse de biologie médicale qualifié. Il est à usage unique, il ne doit pas être recyclé après utilisation.

Ce dispositif n'est pas destiné au dépistage du chikungunya / dengue en banque de sang ou d'organes.

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

## 3. Symboles

	Référence
	Numéro de lot
	Limites inférieure et supérieure de température de conservation
	Date d'expiration
	Contenu suffisant pour « N » réactions
	Fabricant
	Produit marqué CE
	In vitro Diagnostic
	Mode d'emploi
	Attention
	Date de fabrication
	A conserver à l'abri de la lumière
	Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

## 4. Principe

Le test Chikungunya/Dengue est un test d'amplification de l'acide ribonucléique (ARN) de Chikungunya et des 4 sérotypes de Dengue, sans différenciation, ainsi que d'un contrôle d'extraction d'ARN 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'ARN extrait de l'échantillon au moyen d'une réaction unique dans un seul puit.

Les amorces et sondes du kit permettent la détection de l'ARN des 4 sérotypes (screening) sans typage.

Le contrôle d'extraction d'ARN 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 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'ARN et/ou à la présence d'inhibiteurs de PCR en trop grande quantité.

L'ARN du virus Chikungunya est détecté à l'aide d'une sonde marquée FAM et celui de la Dengue est détecté à l'aide d'une sonde marquée HEX. Le contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR est détecté à l'aide d'une sonde marquée CY5. Tous émettent une fluorescence spécifique.

**Tableau 1 : Détection des cibles selon les fluorophores**

Cible	Fluorophore	Excitation	Emission
CHIKUNGUNYA	FAM	495 nm	515 nm
DENGUE	HEX	535 nm	555 nm
Contrôle ARN (CI-ARN)	Cy5	650 nm	670 nm

Canaux équivalents sur différents instruments de PCR :

- Canal FAM (Systèmes ABI, SmartCycler II, Systèmes Mx, Chromo4/CFX96, T-COR 8®-IVD), Canal 510 (LC 480), Canal Green (RotorGene)
- Canal HEX (Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx, T-COR 8®-IVD), Canal VIC (Systèmes ABI), Canal Alexa532 (SmartCycler II), Canal 580 (LC 480), Canal Yellow (RotorGene),
- Canal Cy5 (Systèmes ABI, Systèmes Mx, Chromo4/CFX96, 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 FAM-HEX/VIC-Cy5 (465-510,533-580,618-660).

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

## 5. Composants du kit

Le kit de RT-PCR en temps réel Eurobioplex Chikungunya/Dengue est prêt à l'emploi pour la détection spécifique de ces virus.

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 de l'ARN viral de Chikungunya et de Dengue, et du contrôle d'extraction et d'amplification par RT-PCR (Tableau 2).

Les formats EBX-009A (96 tests) et EBX-009A-48 (48 tests) sont adaptés à une utilisation sur l'automate de pipetage MICROLAB NIMBUS IVD (Hamilton) car ils prévoient un volume suffisant, volume mort inclus, pour réaliser 96 ou 48 tests respectivement, sur ce type d'automate.

**Tableau 2: Composants du kit**

Couleur de Bouchon	Contenu du kit	EBX-009A (96 tests)	EBX-009A-48 (48 tests)	EBX-009 (96 tests)	EBX-009-48 (48 tests)	EBX-009-24 (24 tests)	Reconstitution
<b>Rouge</b>	Enzymes	2 X 1080µl	1080µl	4 x 410 µl	2 x 410 µl	4 x 100 µl	Prêt à l'emploi
<b>Transparent</b>	Oligomix	2 X 360µl	360µl	4 x 135 µl	2 x 135 µl	4 x 60 µl	Prêt à l'emploi
<b>Bleu</b>	Eau = contrôle négatif (CN-H2O)	2 x 1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	Prêt à l'emploi
<b>Jaune</b>	Contrôle positif Chikungunya et Dengue (CP-ChikDeng)	2 x 145 µl	145 µl	4 x 40 µl	2 x 40 µl	4 x 40 µl	Prêt à l'emploi
<b>Blanc</b>	Contrôle ARN (CI-ARN)	2 x 625 µl	625 µl	4 x 300 µl	2 x 300 µl	4 x 75 µl	Prêt à l'emploi

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

## 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. Matériel requis non fournis

- Hotte biologique
- Appareil de PCR temps réel
- Centrifugeuse pour microtubes
- Vortex
- Plaques / tubes pour réaction de PCR temps réel
- Micropipettes
- Embouts DNase-free et RNase-free à filtre pour micropipettes
- Microtubes stériles
- Gants (sans talc)
- Automate de pipetage MICROLAB NIMBUS IVD (Hamilton) si utilisation en version automatisée des formats EBX-009A (96 tests) et EBX-009A-48 (48 tests)

## 8. Instrument de PCR en temps réel

Le kit EurobioPlex Chikungunya/Dengue 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)
- Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) avec analyse sur 7500 Software v2
- T-COR 8®-IVD (Tetracore Inc.) avec T-COR 8 SmartCT™ (auto v1) software

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

## 9. Mises en garde et précautions



**Lire attentivement ces instructions avant de débiter le protocole.**

- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée par des techniciens de laboratoire d'analyse de biologie médicale.
- ◇ S'assurer que les instruments ont été installés, calibrés et maintenus en accord avec les recommandations du fabricant.
- ◇ Les échantillons cliniques doivent être considérés comme du matériel potentiellement infectieux et doivent être préparés sous une hotte à flux laminaire.
- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée selon les bonnes pratiques de laboratoire.
- ◇ Ne pas utiliser ce kit après la date de péremption indiquée.
- ◇ Le kit est expédié sous carboglace, et les composants du kit doivent arriver congelés. Si un ou plus des composants arrive décongelé, ou si les tubes ont été endommagés pendant le transport, contacter Eurobio Scientific.
- ◇ Eviter les cycles de congélation / décongélation des réactifs, cela peut conduire à une baisse de la sensibilité du test.
- ◇ 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.
- ◇ 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, 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 d'ARN pour une production d'ARN de qualité et une application de RT-PCR doivent être utilisées, notamment afin d'éviter tout risque de contamination avec les RNases.
- ◇ Utiliser des embouts à filtre pour micropipettes, RNase-free et DNase-free.
- ◇ Ne pas pipeter avec la bouche. Ne pas manger, ni boire ou fumer dans le laboratoire.
- ◇ Eviter les aérosols.
- ◇ Le kit n'est pas destiné à un usage unique. Lors de la réutilisation du dispositif, il est nécessaire de suivre les recommandations concernant les cycles de congélation-décongélation autorisés, et les précautions pour prévenir la contamination des réactifs.
- ◇ Les composants du kit ne doivent pas être utilisés séparément (ni avec d'autres réactifs, ni avec les réactifs d'autres lots).

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

- ◇ La décongélation des réactifs doit être ménagée afin de ne pas altérer les performances du dispositif (à +2°C/+8°C ou à température ambiante).

## 10. Protocole

### 10.1 Collecte des échantillons

- ◇ Collecter les échantillons dans des tubes stériles. Pour une extraction de l'ARN à partir de sérum, collecter les échantillons sur tubes sec, pour une extraction de l'ARN à partir de plasma, collecter les échantillons sur tubes EDTA.
-  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 par des systèmes adaptés produise des ARN de qualité.
- ◇ Il est recommandé que les échantillons soient extraits immédiatement, ou conservés selon les recommandations de stockage des échantillons avant extraction (Tableau 3).
- ◇ Les références bibliographiques dans la section « 6. Bibliographie » fournissent des données indicatives sur la stabilité des échantillons et des ARNs.

**Tableau 3 : recommandations de stockage du sang avant préparation, du plasma ou du sérum avant extraction**

Recommandations de stockage avant préparation du plasma et sérum à partir de sang	
<24h	
Recommandations de stockage maximum des échantillons avant extraction	
Température ambiante	2h
+2°C/+8°C	5 jours
<-70°C (préféré par rapport à -20°C)	Stockage à long terme (>5 jours et maximum 2 mois à -20°C)

<b>Attention</b>	
	<ul style="list-style-type: none"><li>◇ 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.</li><li>◇ Les ARNs extraits doivent être stockés à &lt;-70°C afin d'assurer leur stabilité. Au-delà d'une année de stockage des ARNs à &lt;-70°C, les Ct obtenus peuvent augmenter. Il est conseillé de ré-extraire un échantillon biologique stocké depuis plus d'un an. Il est conseillé de limiter à 3 le nombre de décongélation des ARNs.</li><li>◇ Le transport des échantillons cliniques est soumis à la réglementation locale pour le transport des agents infectieux.</li></ul>

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

## 10.2 Extraction de l'ARN

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

Se référer aux recommandations du tableau 3 pour le stockage des ARNs.

Dans le kit Chikungunya/Dengue, 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 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 à la fin de l'extraction. 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 temps réel pour plus de détails.

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

Les performances telles que décrites au § 13 du présent document ont été obtenues avec les techniques d'extraction suivantes : colonnes Qiagen (QIAamp Ultrasens Virus kit Ref : 53704), ou extracteur EZ1 (Qiagen) ou Maelstrom TANbeads (Taiwan Adadvanced Nanotech).

## 10.3 Réalisation de la RT-PCR en temps réel

### 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-ChikDeng ainsi qu'un contrôle négatif (eau fournie = CN-H<sub>2</sub>O + 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, des contrôles réguliers peuvent être effectués par la suite.

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

## Schéma de la procédure :

### 1 - PREPARATION MELANGE REACTIONNEL / MASTERMIX

(a) Si Échantillons extraits sans CI-ARN    (b) Si Échantillons extraits avec CI-ARN

Nombre de réactions	N+3**	Nombre de réactions	N+3**
Enzymes	(N+3) x 15 µl	Enzymes	(N+3) x 15 µl
Oligomix	(N+3) x 5 µl	Oligomix	(N+3) x 5 µl
CI-ARN	(N+3) x 1 µl		
Volume total Mastermix	(N+3) x 21 µl*	Volume total Mastermix	(N+3) x 20 µl*

\*\* N+1 sur T-COR 8<sup>®</sup>-IVD

### 2 - PREPARATION DES REACTIONS

#### Echantillon

20 µl de Mastermix  
+  
5µl échantillon ARN

#### Contrôle positif

20 µl de Mastermix  
+  
5µl CP-ChikDeng

#### Contrôle Négatif

20 µl de Mastermix  
+  
5µl Eau biologie moléculaire  
(CN-H2O)

#### Echantillon

20 µl de Mastermix  
+  
5µl échantillon ARN

#### Contrôle positif

20 µl de Mastermix  
+  
5µl CP-ChikDeng

#### Contrôle Négatif

20 µl de Mastermix  
+  
4µl Eau biologie moléculaire (CN-H2O)  
+  
1 µl CI-ARN

### 3 - INSTRUMENT PCR EN TEMPS REEL (sauf T-COR 8<sup>®</sup>-IVD- programmation automatique avec Codes-Barres- voir p.26 à 27)

Programme	Température	Durée	Cycle(s)	
Reverse	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 Chikungunya/Dengue

## 10.4 Protocole détaillé

- 1) Homogénéiser le tube d'Enzymes, et vortexer Oligomix, CP-ChikDeng et CI-ARN, puis centrifuger.
- 2) Préparer le Mastermix comme ci-dessous, N étant le nombre de réaction(s), prévoir la quantité de Mastermix pour N+3 réactions minimum (Se référer à la partie 1-a ou 1-b du schéma précédent selon la condition).

*Condition (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

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

*Condition (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 Master Mix pour N+1 réactions pour une utilisation au coup par coup du kit.

- 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 d'échantillon d'ARN extraits.
- 6) En parallèle réaliser les contrôles suivants :
  - Contrôle positif : 20 µl Mastermix + 5 µl de contrôle positif CP-ChikDeng.
  - Contrôle négatif :
    - Condition (a) Extraction de l'échantillon SANS ajout de CI-ARN :
      - 20µl de Mastermix + 5µl d'eau fournie (CN-H2O)
    - Condition (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 avec un film adhésif ou bouchons transparents pour éviter toute contamination.
- 8) Centrifuger brièvement pour collecter le mélange réactionnel au fond des tubes ou des puits de microplaque.

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

- 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 page 22).
- 10)Durée approximative : 1h10.

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

**Note 1 :** Sur LightCycler® 480, 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 FAM-HEX/VIC-Cy5 (465-510,533-580,618-660).

**Note 2 :** Pour les appareils de la gamme Applied Biosystems, sélectionner « ROX » dans «PASSIVE REFERENCE ».

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

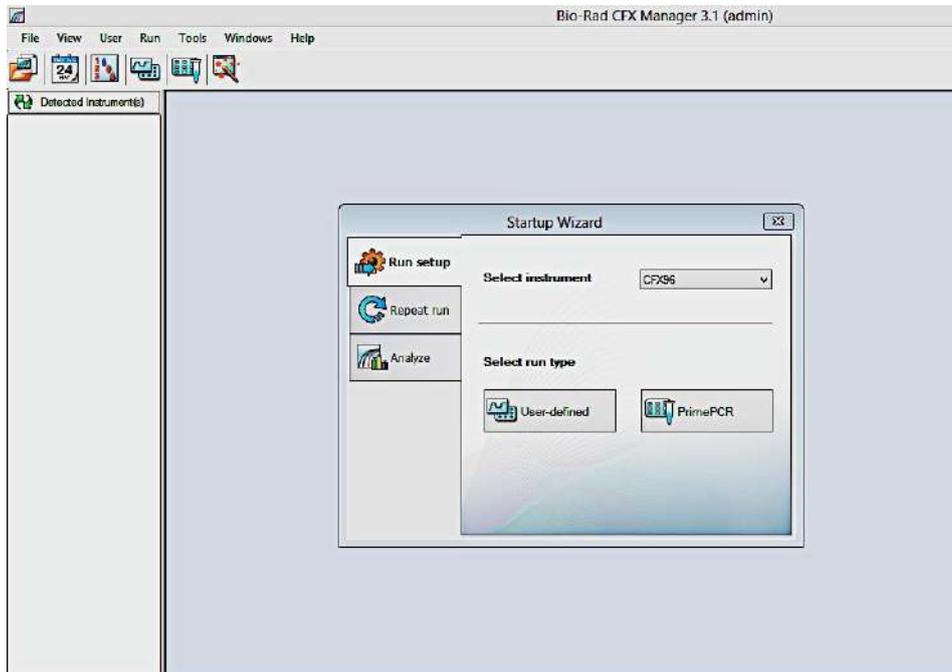
**Note 4 :** Sur CFX96 (Bio-Rad), lancer le run à partir de la version 1.6 ou postérieure, puis analyser avec la version 3.1 (voir § Validation de l'expérimentation).

## 11. Validation de l'expérimentation

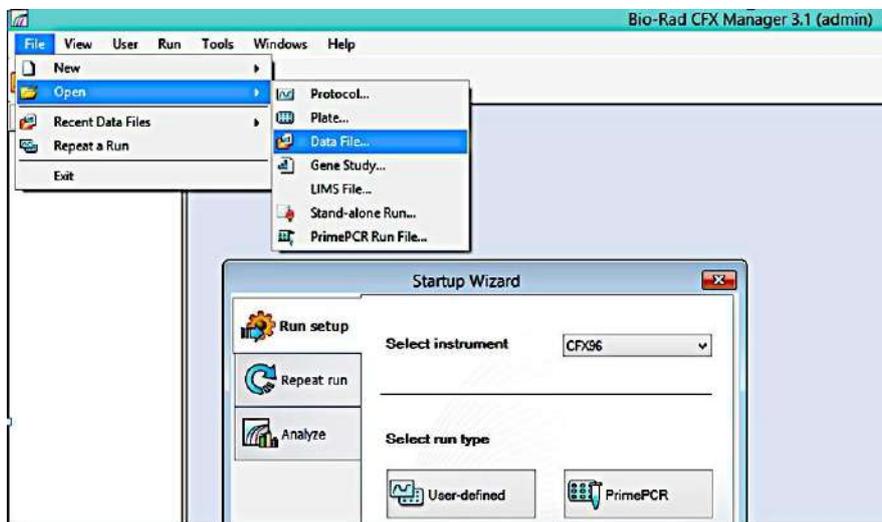
L'analyse des data post-acquisition sur un appareil de PCR CFX96 (Bio-Rad) doit être réalisée à l'aide de la version 3.1 du logiciel CFX Manager (Bio-Rad). Afin de passer sur cette version à partir d'un run lancé sur une version antérieure, veuillez suivre la procédure suivante : à la fin du run, le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

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

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue



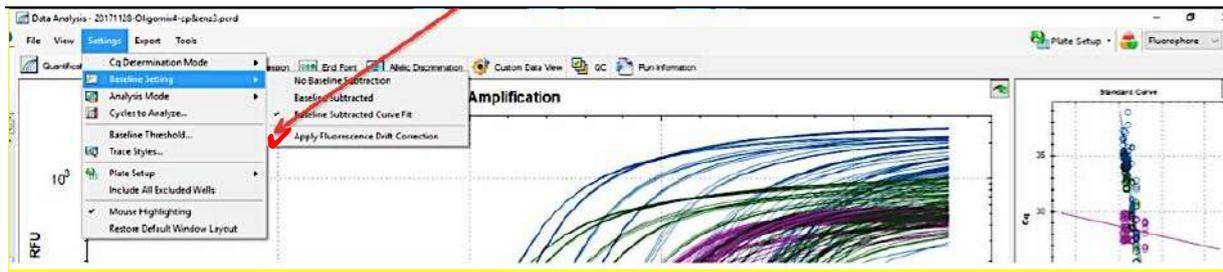
- Cliquer sur File et sélectionner Open puis Data File.



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

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

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue



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). En dehors de ces valeurs, 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	
Canal FAM	Ct ≤ 30
Canal HEX	Ct ≤ 30
Contrôle négatif	
Canal FAM	Ct ≥ 40 ou non déterminé
Canal HEX	Ct ≥ 40 ou non déterminé
Canal CY5	Ct ≤ 45

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

## 12. Analyse des données et interprétation

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

Deux résultats peuvent être obtenus :

1/ le test du contrôle d'extraction d'ARN et d'inhibition de RT-PCR (CI-ARN) est positif (Ct ≤ 45): l'ARN a été correctement extrait, et il n'y a pas d'inhibiteurs de RT-PCR. Le résultat peut être validé.

2/ le test du contrôle d'extraction d'ARN et d'inhibition de RT-PCR (CI-ARN) est négatif (Ct ≥ 45): soit l'ARN n'a pas été extrait, soit la RT n'a pas bien fonctionné, soit la présence d'inhibiteurs de PCR inhibe la réaction de PCR. Il est alors recommandé de répéter l'extraction ou de diluer l'échantillon, sauf si un signal spécifique apparaît dans le canal FAM ou HEX.

**Pour les échantillons cliniques**, les résultats suivants sont possibles :

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

**\*Seuil de Ct pour échantillon : + Positif FAM => Ct positif < 40**

**+ Positif HEX => Ct positif < 40**

**\*\*Seuil de Ct CI-ARN :**

**+ Positif CY5 => Ct positif ≤ 45**

Signal PCR			Présence de virus		Validité du test/commentaire
FAM	HEX	CY5	CHIKUNGUNYA	DENGUE	
+	-	+	Oui	Non	Valide
-	+	+	Non	Oui	Valide
+	+	+	Oui	Oui	Valide
+	+	-	Oui	Oui	Valide ; possible inhibition d'extraction ou de RT-PCR ou forte compétition qui n'empêche pas la détection des virus
-	-	+	Non	Non	Valide
+	-	-	Oui	Non interprétable	Non valide ; problème d'extraction ou d'inhibition de RT-PCR ou forte compétition -diluer 5 x l'échantillon ; si même résultat ré-extraire l'échantillon
-	+	-	Non interprétable	Oui	Non valide ; problème d'extraction ou d'inhibition de RT-PCR ou forte compétition -diluer 5 x l'échantillon ; si même résultat ré-extraire l'échantillon
-	-	-	Non interprétable	Non interprétable	Non valide ; problème d'extraction ou d'inhibition de RT-PCR -diluer 5 x l'échantillon ; si même résultat ré-extraire l'échantillon

## 13. Analyse des performances

**Limite de détection/sensibilité analytique sur CP :**

Chikungunya et Dengue	CFX-96™ (Bio-Rad)	LightCycler®480 Instrument II (Roche)	Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems)	T-COR 8®-IVD (Tetracore)
<b>LOD<sub>100%</sub> sur CP</b>	20 copies/μl	200 copies/μl	200 copies/μl	20 copies/μl

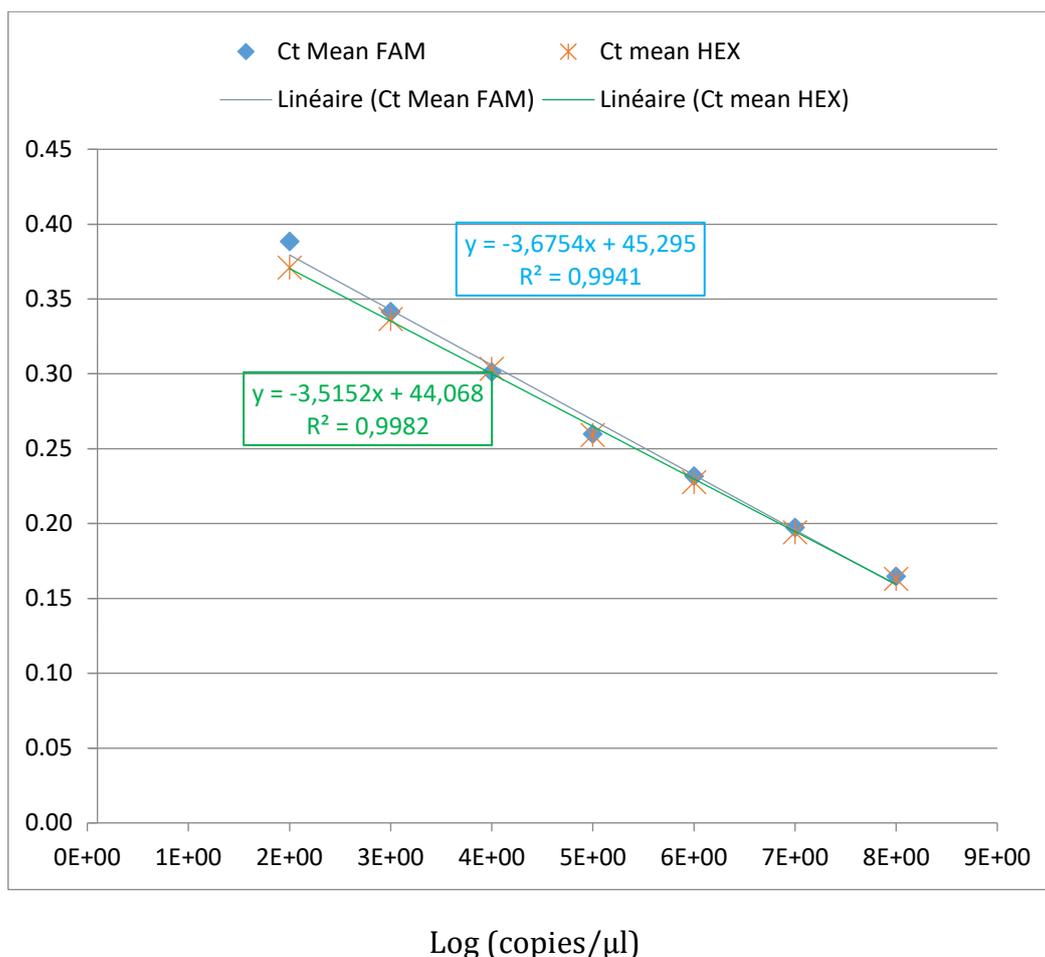
# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

**Sur CFX-96 (Bio-rad):**

**Limite de detection sur Etalon international Chikungunya** (1st World Health Organization International Standard for Chikungunya virus RNA for Nucleic acid amplification techniques (NAT)-based assays (PEI code 11785/16) :

385 IU/ml de serum ou plasma, et 2,5 IU/microl d'éluat

**Linéarité** : CHIKUNGUNYA et DENGUE : 20 à 2.107 copies/ $\mu$ l de CP



## Variabilité du signal sur les canaux du Virus Chikungunya (FAM) et de la Dengue (HEX)

	Coefficient de variation (CV %) intra-run	Coefficient de variation (CV %) inter-run	Coefficient de variation (CV %) inter-lots
<b>Chikungunya</b>	2,31	3,97	1,28
<b>Dengue</b>	2,82	6,13	2,41

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

## Performances cliniques

**Les essais ont été menés sur des échantillons pré caractérisés positifs ou négatifs**

<b>EBX-009 Chikungunya</b>				
		POS	NEG	TOTAL
<b>Caractérisés pré test chikungunya</b>	POS	26	0	26
	NEG	2	74	76
<b>TOTAL</b>		28	74	102
<b>EBX-009 Dengue</b>				
		POS	NEG	TOTAL
<b>Caractérisés pré test Dengue</b>	POS	71	2	73
	NEG	0	52	52
<b>TOTAL</b>		71	54	125

Les tests ont été réalisés sur CFX96 (Bio-Rad).

Pour cette étude, l'extraction des échantillons a été réalisée sur colonnes Qiagen (QIAamp Ultrasens Virus kit Ref : 53704), ou extracteur EZ1 (Qiagen) ou Maelstrom TANbeads (Taiwan Adavanced Nanotech).

**Les performances de sensibilité et spécificité sont donc :**

<b>Sensibilité diagnostique</b>	<b>Chikungunya</b>	<b>&gt;99%</b>
<b>Spécificité diagnostique</b>	<b>Chikungunya</b>	<b>97,4% [95% confidence interval (CI) : 98,8%-101%]</b>
<b>Sensibilité diagnostique</b>	<b>Dengue</b>	<b>97,2% [95% confidence interval (CI) : 93,5%-101%]</b>
<b>Spécificité diagnostique</b>	<b>Dengue</b>	<b>&gt;99%</b>

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

Aucune réactivité croisée n'a été observée entre le Chikungunya et la Dengue, ou avec le Zikavirus. Par ailleurs, une analyse *in silico* a démontré une spécificité des amorces et des sondes pour les deux virus, et une absence de réaction croisée potentielle pour, par exemple, les virus Usutu, les virus du Nil Occidental/West Nile virus, de l'encéphalite japonaise/Japanese encephalitis virus, de l'encéphalite à tique/Tick encephalitis virus, de la fièvre jaune/Yellow fever virus, de l'encéphalite de Saint Louis/Saint Louis encephalitis virus, de l'hépatite A/Hepatitis A virus, de l'hépatite C/Hepatitis C virus.

## 14. Particularités liées à l'instrument de PCR en temps réel T-COR 8®-IVD

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

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

**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.

### **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.

Par la suite, le CI-ARN permet de s'assurer qu'au sein de l'échantillon testé, il n'y a pas d'inhibition de la PCR et que la PCR fonctionne correctement.

### **Tests patients**

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

### **Fluorophores**

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

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

Pour tous les EBX, dont EBX-009, 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 26 à 28)**

1- Sélectionner Menu > Nouvelle Analyse/New Run

2- Sélectionner Code-barres/Barcode

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

- soit pour le contrôle positif (Code-barre EBX-009 Pos Ctrl),
- soit pour le contrôle négatif (Code-barre EBX-009 Neg Ctrl),
- soit pour un échantillon (Code-Barre Assay : EBX-009)

*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. 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.

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

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 pour au moins une cible \* → encadré vert

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

\* Les bactéries détectées ou non détectées sont spécifiées.

**ATTENTION !**

**Lorsque l'encadré est vert, il est important de lire le statut pour chaque cible dans la mesure où certaines cibles peuvent être négatives.**

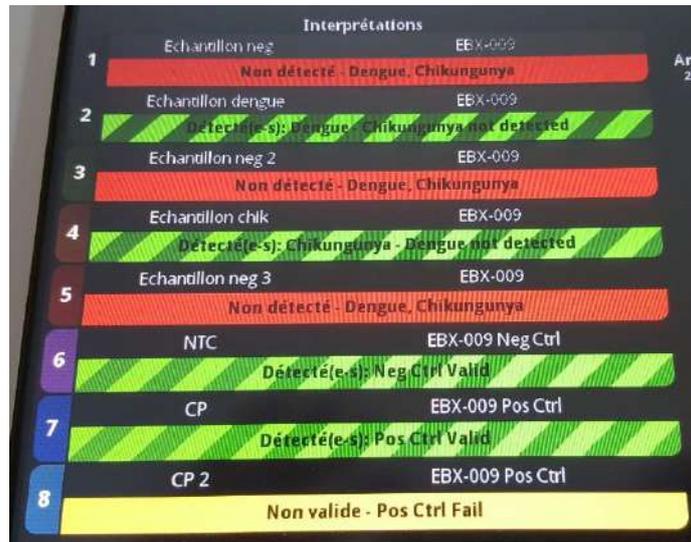
« Non valide/Invalid »: Résultat non valide -> retester → encadré Orange

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

- Pour les contrôles négatif et positif valides indiqués « Detected /Détecté(e-s)», pour un CP Invalid/Non valide à retester, pour trois échantillons négatifs pour les deux cibles, indiqués « Not Detected/Non Détecté » (échantillon 1 à 3) et pour deux échantillons détectés pour l'une des cibles indiqués (Detected/Détecté(e-s) Dengue/ Chikungunya not detected/non détecté (e-s) (échantillon dengue)) et (Detected/Détecté(e-s) Chikungunya/ Dengue not detected/non détecté (e-s) (échantillon chikungunya)) :

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

❖ Sur l'écran de l'instrument :

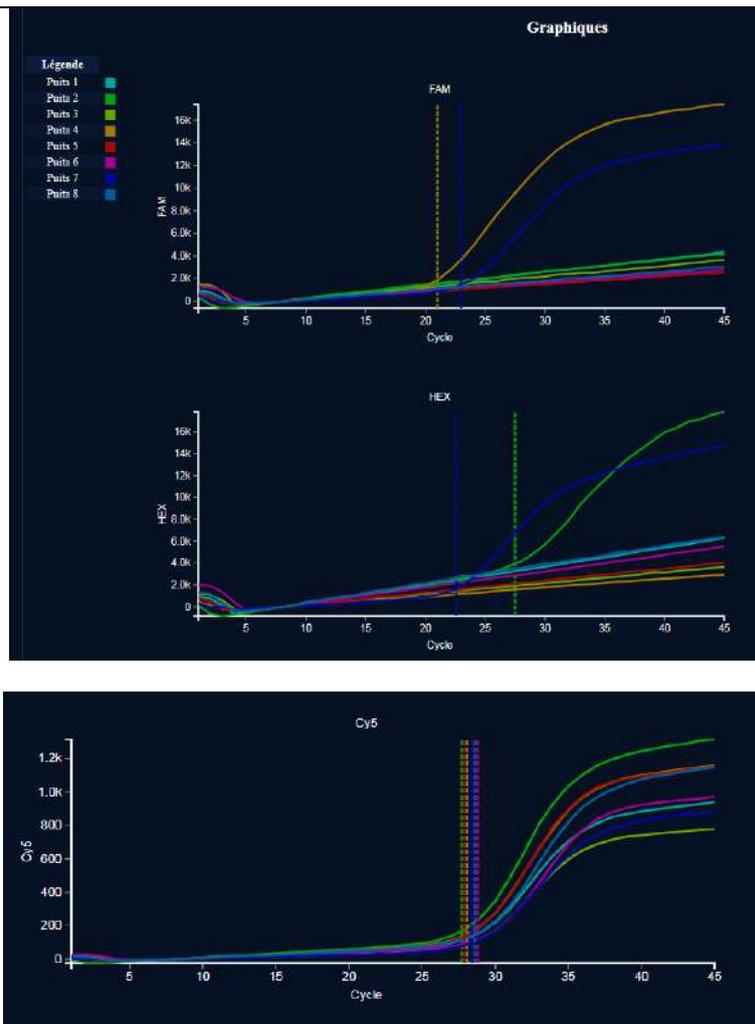


❖ Dans le rapport

Résumé								
Puits	Échantillon	Dosage	FAM	HEX	TxR	Cy5	Appeler	Remarque
1	Echantillon neg	EBX-009				28.0	Not Detected	Dengue, Chikungunya
2	Echantillon dengue	EBX-009		27.5		27.7	Detected • Dengue	Chikungunya not detected
3	Echantillon neg 2	EBX-009				28.1	Not Detected	Dengue, Chikungunya
4	Echantillon chik	EBX-009	21.0			28.1	Detected • Chikungunya	Dengue not detected
5	Echantillon neg 3	EBX-009				27.9	Not Detected	Dengue, Chikungunya
6	NTC	EBX-009 Neg Ctrl				28.8	Detected • Neg Ctrl Valid	
7	CP	EBX-009 Pos Ctrl	23.0	22.6		28.4	Detected • Pos Ctrl Valid	
8	CP 2	EBX-009 Pos Ctrl				28.6	Invalid	Pos Ctrl Fail

Exemple de courbes d'amplification

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue



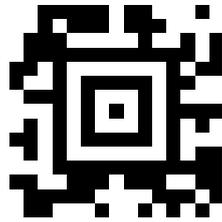
# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

**Codes-Barres sur T-COR8®-IVD pour EBX-009**

**EBX-009 Pos Ctrl**

**Contrôle Positif CP**

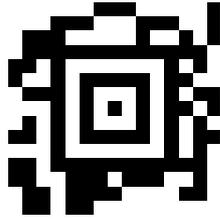


# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

**EBX-009 Neg Ctrl**

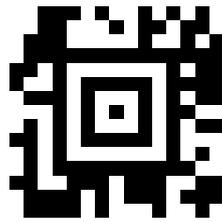
**Eau = contrôle négatif (CN-H2O)**



# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

**Assay: EBX-009**



# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

## 15. Contrôle qualité

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

## 16. Bibliographie

- Haute Autorité de Santé : Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, Recommandations de bonnes pratiques, HAS / Service des bonnes pratiques professionnelles / Septembre 2009 ; [www.has-santé.fr](http://www.has-santé.fr).
- Organisation mondiale de la Santé. <https://apps.OMS.int/iris/handle/10665/334254> . Test de diagnostic du SARS-CoV-2/Diagnostic testing for SARS-CoV-2: conseils provisoires/interim guidance, 11 septembre 2020. Licence : CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- Fleige Simone, Pfaffl Michael W. Molecular Aspects of Medicine 27 (2006) 126–139. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance (review).
- Alfaro-Núñez Alonzo,Stephanie Crone, Shila Mortensen, Maiken Worsøe Rosenstjerne, Anders Fomsgaard, Ellinor Marving, Sofie Holdflod Nielsen, Michelle Grace Pinto Jørgensen, Charlotta Polacek, Arieh S. Cohen, Claus Nielsen, Transbound Emerg Dis. 2022;69:189–194SARS-CoV-2 RNA stability in dry swabs for longer storage and transport at different temperatures
- Yu Keke, Jie Xing , Jie Zhang, Ruiying Zhao , Ye Zhang , Lanxiang Zhao, Effect of multiple cycles of freeze-thawing on the RNA quality of lung cancer tissues Cell Tissue Bank 2017 Sep;18(3):433-44

## 17. Élimination des déchets

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

## 18. Déclaration d'incident

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

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

## 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](mailto:adv@eurobio-scientific.com) ou par téléphone au +33 (0)1.69.07.94.77.



**eurobio**  
**SCIENTIFIC**

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

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

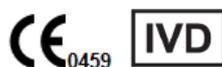


## **EurobioPlex** *Chikungunya/Dengue*

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

**REF**      **EBX-009**  
                 **EBX-009-48**  
                 **EBX-009-24**  
                 **EBX-009A**  
                 **EBX-009A-48**

 **24/48/96 reactions**



**EBX-009 FT v.12.00 - 17/09/2024**

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

## Validated on:

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) and analysis with the CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)
- LightCycler®480 Instrument II (Roche) and analysis with the LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) and analysis with the 7500 Software v2
- T-COR 8®-IVD (Tetracore Inc.) with a T-COR 8 SmartCT™ (auto v1) software



Instructions for use

Available at [www.eurobio-scientific.com](http://www.eurobio-scientific.com)

*A Summary of Safety and Performance Characteristics (SSCP/RCSP) will be made available by the Notified Body on EUDAMED once the later is operational. It can also be obtained upon request.*

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

## Contents

1.	General informations .....	34
2.	Intended purpose .....	35
3.	Symbols .....	36
4.	Principle of the test.....	37
5.	Kit components.....	38
6.	Storage .....	39
7.	Materials required but not provided.....	39
8.	Real time PCR Instrument.....	39
9.	General precautions.....	40
10.	Protocol.....	41
11	Experiment validation .....	47
12	Data analysis and interpretation .....	48
13	Analytical Performance.....	49
14	T-COR 8®-IVD real-time PCR instrument related specificities.....	52
15	Quality control.....	60
16	References .....	60
17	Waste disposal.....	60
18	Incident report.....	60
19	Technical assistance.....	61

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

## 1. General informations

Chikungunya and Dengue viruses are Arthropod-Borne viruses (Arbovirus), transmitted by arthropods (mosquitoes, ticks, sandflies, etc).

Dengue virus belongs to the *Flaviviridae* family and Chikungunya virus to the *Alphaviridae* from the *Togaviridae* family. They are transmitted by various mosquitoes species of the genus *Aedes* such as *aegypti* (mainly in tropical and sub-tropical America and in the south of the United States), *albopictus* (mainly in Asia), *furcifer*, *africanus*, *taylori* and *luteocephalus* (with a worldwide distribution, especially in the tropical regions). The first two species are identified to date as the main epidemic vectors, because of their adaptation to the human settlement areas. In France, the southern regions are more particularly concerned.

**Dengue:** There are 4 serotypes of Dengue (DENV 1-4). The Dengue genome is a single-stranded RNA. The virus replication and virus transcription occur in the cytoplasm of the host cell. The illness begins with fever, muscle and joint pain. In most of the cases, the infection do not present complications, but in 20% of the cases it can be more severe and sometimes life-threatening, especially in the case of secondary infections, with haemorrhagic shock, as an infection by one strain does not protect the host from being infected by another strain.

**Chikungunya:** The Chikungunya virus (CHIKV) is a small enveloped spherical single-stranded virus of about 12 kbp. The viraemic phase of the Chikungunya infection usually last 3 to 10 days. The major clinical signs are the sudden onset of high fever (> 40 °C), which lasts 24 to 48 hours, with arthralgia and myalgia, very painful polyarthralgia that mainly affect the joint of the extremities such as wrists, ankles or phalanges, with a pronounced joint swelling, cutaneous symptoms such as maculo-papular or erythematous rash or oedema. Infections with CHIKV can evolve into a chronic disease. Symptoms are similar to those of malaria, of dengue infection, and it is not unusual to find them both simultaneously. For a certain number of patients (10 to 70 %), clinical recurrences of the disease are observed several months after the acute phase. There is no specific treatment for chikungunya.

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

## 2. Intended purpose

The Chikungunya/Dengue test is a real-time amplification test by reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR), designed for the qualitative detection of the presence or absence of Chikungunya and of the 4 Dengue virus serotypes, without differentiation, in an RNA nuclear acid extract.

The Chikungunya/Dengue test is indicated to assist in making a diagnosis of suspected infection in humans, or to complete a proven or undetermined serological diagnosis. The RNA extract is the starting material for the Eurobioplex Chikungunya/Dengue kit. The RNA is extracted from the patient's plasma, or serum.

This amplification system has been validated on plasma and serum samples, as well as on encapsulated RNA bacteriophage (CI-ARN).

The EurobioPlex Chikungunya/Dengue test is an in vitro diagnostic medical device. It must be used by qualified medical analysis laboratory personnel. For single use only, it should not be recycled after use.

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

## 3. Symbols

	Reference
	Batch number
	Lower and upper limits of storage temperature
	Expiry date
	Enough content for « N » reactions
	Manufacturer
	CE marked product
	In Vitro Diagnostic
	Instruction for use
	Caution
	Date of manufacture
	Keep away from sunlight
	Do not use in case of damaged packaging

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

## 4. Principle of the test

The Chikungunya/Dengue test is a ribonucleic acid (RNA) amplification test for Chikungunya and for the 4 Dengue serotypes, without any differentiation, as well as for an RNA extraction and RT-PCR inhibition control, encapsulated, which uses the real-time RT-PCR amplification. The test is performed on the RNA extracted from a sample with a single reaction, in a single well.

The primers and probes of the kit allow for the RNA detection of the 4 serotypes (screening) without typing.

The RNA extraction and RT-PCR inhibition control (CI-ARN) allows to determine possible variations that may occur during the course of RNA extraction steps from biological samples and real-time PCR amplification. It is a way to check that a negative result cannot be the consequence of a bad RNA extraction and/or the presence of PCR inhibitors in too high quantities.

The Chikungunya virus RNA is detected using a FAM labeled probe and the Dengue one using an HEX labeled probe. The extraction and PCR inhibition control is detected with a Cy5 labeled probe. They all emit a specific fluorescence.

**Table 1: Target detection according to the fluorophores**

Target	Fluorophore	Excitation	Emission
CHIKUNGUNYA	FAM	495 nm	515 nm
DENGUE	HEX	535 nm	555 nm
RNA Control (CI-ARN)	Cy5	650 nm	670 nm

Alternative channels on different PCR instruments:

- Channel FAM (Systems ABI, SmartCycler II, Systems Mx, Chromo4/CFX96, T-COR 8@-IVD), Channel 510 (LC 480), Channel Green (RotorGene)
- Channel HEX (Chromo 4/CFX96, Systems Mx, T-COR 8@-IVD), Channel VIC (Systems ABI), Channel Alexa532 (SmartCycler II), Channel 580 (LC 480), Channel Yellow (RotorGene)
- Channel Cy5 (Systems ABI, Systems Mx, Chromo4/CFX96, T-COR 8@-IVD), Channel Alexa647 (SmartCycler II), Channel 660 (LC 480), Channel Red (RotorGene)

**Note:** On the LC480 instrument II, apply a color compensation for the wavelengths FAM-HEX/VIC-Cy5 (465-510,533-580,618-660).

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

## 5. Kit components

The Eurobioplex Chikungunya/Dengue real-time RT-PCR kit is ready to use for these viruses specific detection.

The fluorescence is emitted and measured individually by an optical system during the PCR. The detection of the amplified fractions is performed by a fluorimeter using the channels as mentioned in Table 1.

The kit contains the reagents and enzymes necessary for the viral RNA amplification from Chikungunya and Dengue, and for the extraction and amplification by RT-PCR of the control (Table 2).

Both EBX-009A (96 tests) and EBX-009A-48 (48 tests) formats are suitable for use with the pipetting system MICROLAB NIMBUS IVD (Hamilton) as they provide sufficient volume, including dead volume, to carry out respectively 96 or 48 tests, on that type of machine.

**Table 2 : Kit components**

Cap colour	Kit content	EBX-009A (96 tests)	EBX-009A-48 (48 tests)	EBX-009 (96 tests)	EBX-009-48 (48 tests)	EBX-009-24 (24 tests)	Reconstitution
<b>Red</b>	Enzymes	2 X 1080 µl	1080 µl	4 x 410 µl	2 x 410 µl	4 x 100 µl	Ready to use
<b>Transparent</b>	Oligomix	2 X 360 µl	360 µl	4 x 135 µl	2 x 135 µl	4 x 60 µl	Ready to use
<b>Blue</b>	Water = Negative control (CN-H2O)	2 x 1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	Ready to use
<b>Yellow</b>	Positive control for Chikungunya and Dengue (CP- chikDeng)	2 x 145 µl	145 µl	4 x 40 µl	2 x 40 µl	4 x 40 µl	Ready to use
<b>White</b>	RNA control (CI-ARN)	2 x 625 µl	625 µl	4 x 300 µl	2 x 300 µl	4 x 75 µl	Ready to use

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

## 6. Storage

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

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



Several freeze / thaw cycles (>3x) should be avoided, as it could decrease the analysis sensitivity.

## 7. Materials required but not provided

- Biological hood
- Real-time PCR instrument
- Centrifuge suitable for microtubes
- Vortex
- Plates / tubes for real-time PCR
- Micropipettes
- DNase-free and RNase-free tips containing filters for micropipettes
- Sterile microtubes
- Disposable gloves (talc-free)
- Automatic pipetting machine MICROLAB NIMBUS IVD (Hamilton) if EBX-009A (96 tests) and EBX-009A-48 (48 tests) are used in an automated version

## 8. Real time PCR Instrument

The EurobioPlex Chikungunya/Dengue kit has been developed and validated for use with the following real-time PCR instruments:

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) and analysis with the CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)
- LightCycler®480 Instrument II (Roche) and analysis with the LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) and analysis with the 7500 Software v2
- T-COR 8®-IVD (Tetracore Inc.) with the T-COR 8 SmartCT™ (auto v1) software

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

## 9. General precautions



**Carefully read these instructions before starting the procedure.**

- ◇ This experimentation should be carried out by qualified medical analysis laboratory technicians.
- ◇ Check that the instruments have been installed, calibrated and maintained according to the manufacturer's instructions.
- ◇ Clinical samples should be considered as potentially infectious material and should be prepared under a laminar air flow cabinet.
- ◇ This experimentation must be performed according to good laboratory practice
- ◇ Do not use this kit after the expiration date mentioned on the label.
- ◇ The kit is shipped under dry ice and the kit components should stay frozen. If one or more of these components arrive unfrozen, or if the tubes are damaged during transportation, please contact Eurobio Scientific.
- ◇ Several freeze / thaw cycles should be avoided, as it could decrease the analysis sensitivity.
- ◇ Avoid prolonged exposure of reagents to light. It should be limited to the technical time necessary to prepare the PCR plate, otherwise performances are not guaranteed.
- ◇ Once the reagents are thawed, briefly centrifuge the tubes before use.
- ◇ It is recommended to perform the activities in three separate areas: 1) RNA isolation,  
2) Preparation of the reaction mixture and 3) Amplification/Detection of the amplified products
- ◇ Wear separate lab coats and gloves (talc-free) in each working area.
- ◇ Pipettes, reagents and other materials should not be moved around between these areas.
- ◇ Special care must be taken to maintain the purity of reagents and reaction mixtures.
- ◇ Appropriate nucleic acids preparation/extraction methods for quality RNA production and RT-PCR application should be used, in order to avoid any risk of contamination with RNases.
- ◇ Use disposable tips with filters for the micropipettes, RNase-free and DNase-free.
- ◇ Do not pipette by mouth. Do not eat, drink or smoke in the laboratory.
- ◇ Avoid aerosols.

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

- ◇ This kit is not intended for single use only. When re-using the device, it is necessary to follow the recommendations concerning the authorised freeze/thaw cycles, and the precautions to prevent reagents contamination.
- ◇ The kit components should not be used separately (neither with other reagents nor with reagents from other batches).
- ◇ Thawing of the reagents should be done carefully in order not to impair the system performance (at +2°C/+8°C or room temperature).

## 10. Protocol

### 10.1 Sample collection

- ◇ Collect samples in sterile tubes.
  - For an RNA extraction from serum, collect samples on dry tubes
  - For an RNA extraction from plasma, collect samples on EDTA tubes.
  -  - Use of heparin as an anticoagulant is prohibited.
- ◇ It is up to the user to control his own conditions of collection, transport, storage and extraction of samples, so that RNA extraction by suitable systems produces quality RNA.
- ◇ It is recommended that samples be extracted immediately or stored according to samples storage recommendations before extraction (Table 3).
- ◇ Bibliographic references in Section "16. References" provide guidelines on samples and RNA stability.

**Table 3: Blood storage recommendations, before plasma or serum preparation and before extraction**

Recommendations for storage before plasma and serum preparation from blood	
<24h	
Recommendations for maximum sample storage before extraction	
Room temperature	2h
+2°C/+8°C	5 days
<-70°C (preferred over -20°C)	Long term storage (>5days and maximum 2 months at -20°C)

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

<b>Caution</b>	
	<ul style="list-style-type: none"><li>◇ The user can refer to the recommendations issued by the World Health Organization or the 'Haute Autorité de Santé' for the proper storage of samples.</li><li>◇ The extracted RNA must be stored at &lt;-70°C in order to ensure their stability. After one year storage of the RNA at &lt;-70°C, an increase of the Ct obtained may be observed. It is recommended to re-extract a biological sample which has been stored for more than one year. It is recommended to limit to 3 the number of RNA thawings.</li><li>◇ Clinical samples transport should follow local regulations for infectious agents.</li></ul>

## 10.2 RNA extraction

It is the user responsibility to ensure that the nucleic acids extraction system used is compatible with the real-time RT-PCR technology. For this kit, we recommend using virus RNA extraction methods from plasma or serum samples and referring to the manufacturer instructions for the extraction kit used.

Please refer to Table 3 recommendations for the RNA storage.

In the Chikungunya/Dengue kit, the CI-ARN on channel CY5 can be added before the extraction or in the PCR reaction. It is a way to check that a negative result cannot be the consequence of an extraction problem or of the presence of RT-PCR inhibitors in too high quantities to validate the test.

We recommend adding 10 µl of CI-ARN per extraction and using a 50 µl elution volume at the end of the extraction. If the CI-ARN is only added in order to check the RT-PCR, it is added to the reaction mixture (1 microlitre per PCR reaction). See the real-time PCR Protocol for more details.

The CI-ARN is also available at Eurobio Scientific (Ref EurobioPlex EBX-003).

Performances, as described in Section 13 of this document, have been obtained with the following extraction techniques: Qiagen columns (QIAamp Ultrasens Virus kit Ref: 53704), or extractor EZ1 (Qiagen) or Maelstrom TANbeads (Taiwan Adadvanced Nanotech).

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

## 10.3 Real-time PCR procedure

### General remark:

The positive control as well as the extraction and RT-PCR amplification control (CI-ARN) contain high matrix concentrations. Handling must be done with care in order to prevent contamination. In order to check the proper PCR functioning, it is necessary to test the positive control CP-ChikDeng as well as a negative control (water supplied = CN-H2O + CI-ARN)

(See II-2/6 in the real time RT-PCR protocol). On the T-COR 8™-IVD, for a proper use of the kit, it is necessary that these controls checks are performed when a new kit is first used, regular checks can be done later on.

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

## Procedure summary:

### 1 - PREPARATION OF REACTION MIXTURE / MASTERMIX

(a) If samples extracted without CI-ARN (b) If samples extracted with CI-ARN

Number of reactions	N+3**	Number of reactions	N+3**
Enzymes	(N+3) x 15 µl	Enzymes	(N+3) x 15 µl
Oligomix	(N+3) x 5 µl	Oligomix	(N+3) x 5 µl
CI-ARN	(N+3) x 1 µl		
Total volume Mastermix	(N+3) x 21 µl*	Total volume Mastermix	(N+3) x 20 µl*

\*\* N+1 on T-COR 8®-IVD

### 2 - PREPARATION OF REACTIONS

#### Sample

20 µl Mastermix  
+5 µl RNA sample

#### Positive control

20 µl Mastermix + 5 µl CP-ChikDeng

#### Negative control

20 µl Mastermix  
+ 5 µl Water molecular biology (CN-H2O)

#### Sample

20 µl Mastermix+  
5 µl RNA sample

#### Positive control

20 µl Mastermix+ 5 µl CP-ChikDeng

#### Negative control

20 µl Mastermix  
+ 4 µl Molecular biology grade water (CN-H2O) +1 µl CI-ARN

### 3 - REAL-TIME PCR INSTRUMENT (except T-COR 8®-IVD - automatic programming with barcodes - see p.26 to 27)

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

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

## 10.4 Procedure in details

- 3) Homogenize the enzymes tube, vortex Oligomix, CP-ChikDeng and CI-ARN, then centrifuge.
- 4) Prepare Mastermix as indicated below: N being the reaction number, provide the amount of Mastermix for at least N+3 reactions

(Refer to part 1a or 1b from the previous table according to condition).

*Condition (a): Sample extraction WITHOUT adding CI-ARN*

Number of reactions	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
Total volume Mastermix	21 µl*	(N+3) x 21 µl

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

*Condition (b): Sample extraction WITH addition of CI-ARN*

Number of reactions	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-COR 8®-IVD, we recommend preparing a Master Mix for N+1 reactions for a single sample utilization.

- 3) Homogenize the Mastermix prepared in 2) and briefly centrifuge.
- 11) Distribute 20 µl of Mastermix\* with a micropipette and filter tips into each real time PCR tube/microplate well.

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

12) Add 5 µl extracted RNA samples.

13) In parallel, prepare the following controls:

- Positive Control : 20 µl Mastermix + 5 µl Positive Control CP-ChikDeng.
- Negative Control :
  - Condition (a) Sample extraction WITHOUT adding CI-ARN:
    - 20 µl Mastermix + 5 µl water provided (CN-H2O)
  - Condition (b) Sample extraction WITH addition of CI-ARN
    - 20 µl Mastermix + 4µl water provided (CN-H2O) + 1 µl CI-ARN

14) Close immediately with an adhesive foil or transparent caps in order to prevent any contamination.

15) Briefly centrifuge to collect the reaction mixture at the bottom of the tubes or microplate wells.

16) Prepare the following program on the real-time PCR device (on the T-COR 8®-IVD no manual programming required due to the barcodes - see page 23).

17) Approximative duration: 1h10.

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

**Note 1:** On the LightCycler® 480, two optical systems exist. Only the “System II” is compatible with the kit use. Apply a color compensation for the wavelengths FAM-HEX/VIC-Cy5 (465-510,533-580,618-660).

**Note 2:** For the Applied Biosystems devices, select “ROX” in “PASSIVE REFERENCE”.

**Note 3:** On the Rotorgene™, calibrate the signal by clicking on “GAIN OPTIMISATION”.

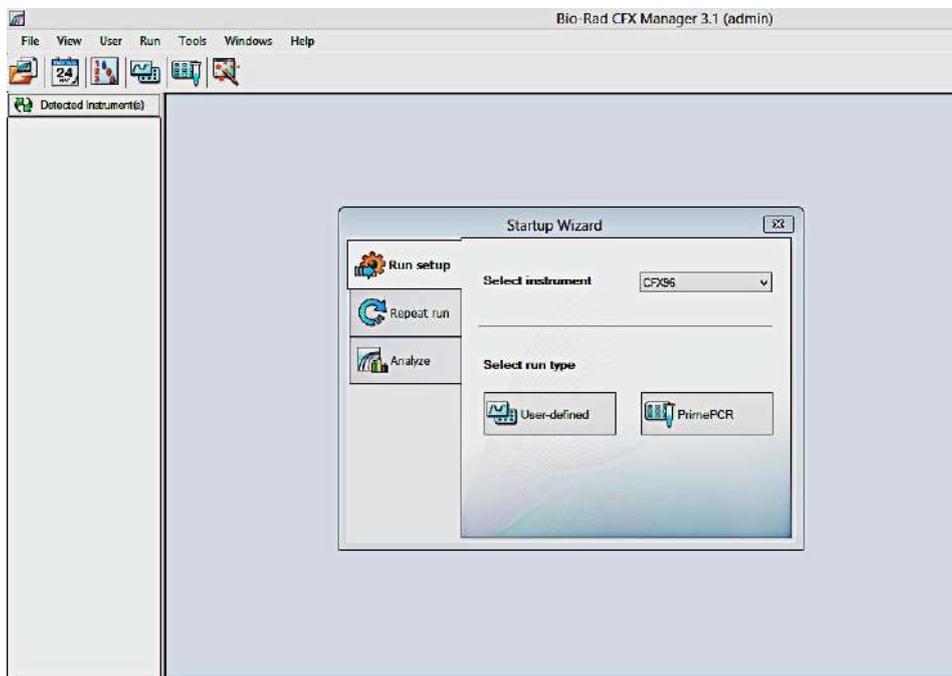
**Note 4:** On the CFX96 (Bio-Rad), launch the run from version 1.6 or later, then analyze with version 3.1 (See Section “Experiment validation”).

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

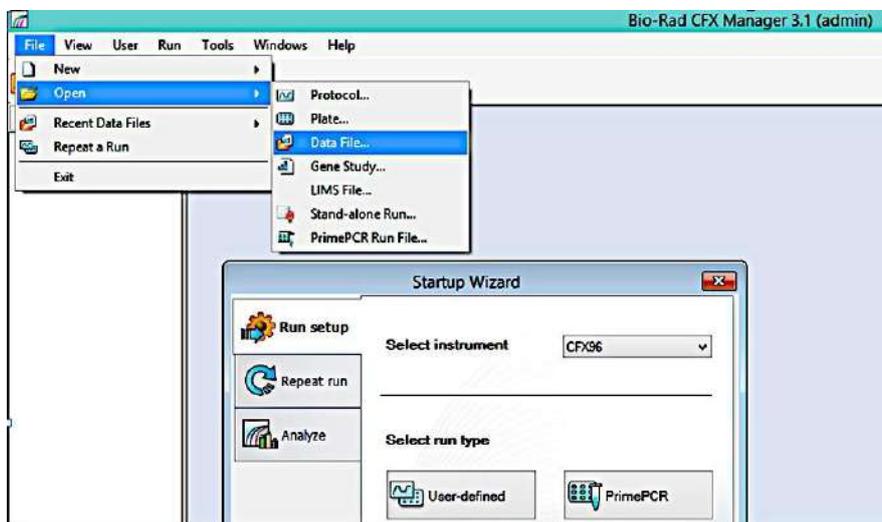
## 11 Experiment validation

Post-acquisition data analysis on the CFX96 PCR device (Bio-Rad) must be done with the CFX Manager software version 3.1 (Bio-Rad). In order to switch to this version from a run launched on a previous version, please follow the following procedure: at the end of the run, open and treat the data file with the .pcrd suffix with the CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad).

If the run has been launched with the CFX Manager Software v1.6 for example, in order to open a data file with the CFX Manager Software v3.1, click on the CFX Manager v3.1 icon. The homepage appears.



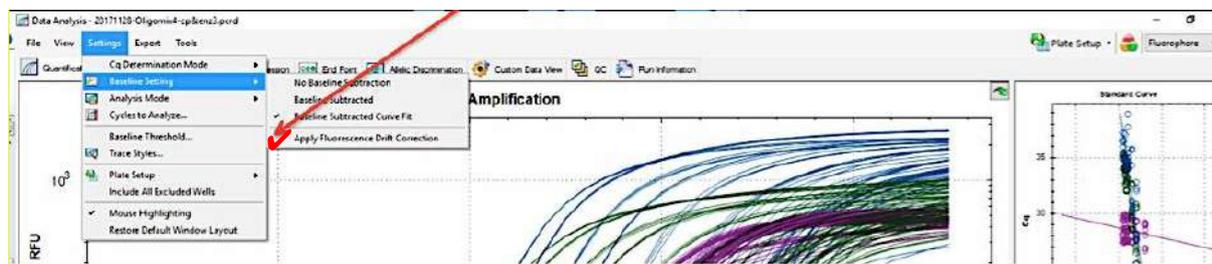
- Click on "File", select "Open" then "Data File".



# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

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

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



Once this step is completed, the analysis can start.

**In order for the test to be valid**, Ct values for the controls should be as mentioned in Table 4. Outside of these values, the experiment cannot be validated.

On the T-COR 8<sup>TM</sup>-IVD, for a proper use of the kit, it is necessary that these controls checks are performed when a new kit is first used, regular checks can be done later on.

**Table 4:**

Positive control	
Channel FAM	Ct ≤ 30
Channel HEX	Ct ≤ 30
Negative control	
Channel FAM	Ct ≥ 40 or not defined
Channel HEX	Ct ≥ 40 or not defined
Channel CY5	Ct ≤ 45

On the T-COR 8<sup>®</sup>-IVD, interpretation is automatically generated with the barcodes.

## 12 Data analysis and interpretation

RNA extraction and RT-PCR inhibition control in the samples:

Two results may be obtained:

1/ The RNA extraction and RT-PCR inhibition control (CI-ARN) test is positive (Ct ≤45): The RNA has been properly extracted and there are no RT-PCR inhibitors. The result can be validated.

2/ The RNA extraction and RT-PCR inhibition control (CI-ARN) test is negative (Ct ≥45): either the RNA has not been extracted, or the RT-PCR did not work well, or the presence of PCR inhibitors inhibit the PCR reaction. It is recommended to repeat the extraction or to dilute the sample, unless a specific signal appears in channel FAM or HEX.

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

For clinical samples, the following results are possible:

\*Ct threshold for sample: + FAM Positive => Ct positive < 40

+ HEX Positive => Ct positive < 40

\*\*Ct threshold for CI-ARN: + CY5 Positive => Ct positive ≤ 45

PCR signal			Presence of virus		Validity of the test/comment
FAM	HEX	CY5	CHIKUNGUNYA	DENGUE	
+	-	+	Yes	No	Valid
-	+	+	No	Yes	Valid
+	+	+	Yes	Yes	Valid
+	+	-	Yes	Yes	Valid; possible extraction or RT-PCR inhibition or high competition which does not prevent the virus detection
-	-	+	No	No	Valid
+	-	-	Yes	Uninterpretable	Invalid; extraction or RT-PCR inhibition problem or high competition – dilute the sample 5x; if same results, re-extract the sample
-	+	-	Uninterpretable	Yes	Invalid; extraction or RT-PCR inhibition problem or high competition - dilute the sample 5x; if same results, re-extract the sample
-	-	-	Uninterpretable	Uninterpretable	Invalid; extraction or RT-PCR inhibition problem - dilute the sample 5x; if same results, re-extract the sample

## 13 Analytical Performance

Detection limit/analytical sensitivity on CP:

Chikungunya and Dengue	CFX-96™ (Bio-Rad)	LightCycler®480 Instrument II (Roche)	Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems)	T-COR 8®-IVD (Tetracore)
LOD <sub>100%</sub> on CP	20 copies/μl	200 copies/μl	200 copies/μl	20 copies/μl

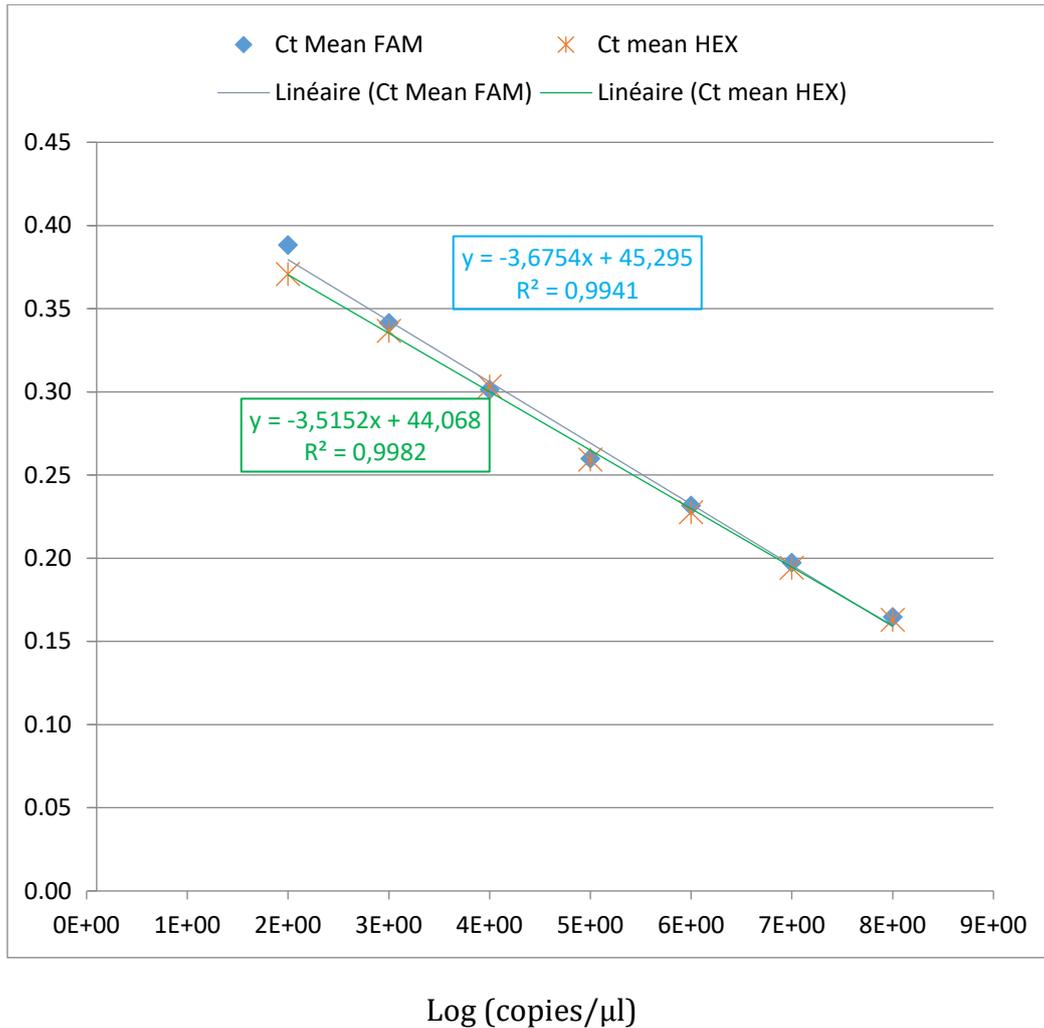
# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

**On the CFX-96 (Bio-rad):**

**Detection limit on the Chikungunya International Standard** (1st World Health Organization International Standard for Chikungunya virus RNA for Nucleic acid amplification techniques (NAT)-based assays) (PEI code 11785/16):

385 IU/ml of serum or plasma, and 2,5 IU/μl eluate

**Linearity:** CHIKUNGUNYA and DENGUE: 20 to 2.107 copies/μl CP



## Signal variability in the Chikungunya (FAM) and Dengue (HEX) viruses channels

	Variation coefficient (CV %) intra-run	Variation coefficient (CV %) inter-runs	Variation coefficient (CV %) inter-lots
<b>Chikungunya</b>	2,31	3,97	1,28
<b>Dengue</b>	2,82	6,13	2,41

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

## Clinical performances

**Trials have been carried out on pre-characterised positive or negative samples**

<b>EBX-009 Chikungunya</b>				
		POS	NEG	TOTAL
Pre-characterised chikungunya	POS	26	0	26
	NEG	2	74	76
TOTAL		28	74	102
<b>EBX-009 Dengue</b>				
		POS	NEG	TOTAL
Pre-characterised dengue	POS	71	2	73
	NEG	0	52	52
TOTAL		71	54	125

These tests have been performed on CFX96 (Bio-Rad).

For this study, samples extraction was performed using Qiagen columns (QIAamp Ultra-sens Virus kit Ref: 53704), or Extractor EZ1 (Qiagen) or Maelstrom TANbeads (Taiwan Adadvanced Nanotech).

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

The sensitivity and specificity performances are:

<b>Diagnostic specificity</b>	<b>Chikungunya</b>	<b>&gt;99%</b>
<b>Diagnostic specificity</b>	<b>Chikungunya</b>	<b>97,4% [95% confidence interval (CI): 98,8% - 101%]</b>
<b>Diagnostic sensitivity</b>	<b>Dengue</b>	<b>97,2% [95% confidence interval (CI): 93,5% - 101%]</b>
<b>Diagnostic sensitivity</b>	<b>Dengue</b>	<b>&gt;99%</b>

No cross-reactivity has been observed between Chikungunya and Dengue, or with Zika virus. Furthermore, an *in silico* analysis has shown the primers and probes specificity for the two viruses, and no potential cross-reactivity for, by example, Usutu viruses, West Nile virus, Japanese encephalitis virus, Tick encephalitis virus, Yellow fever virus, Saint Louis encephalitis virus, Hepatitis A virus, or Hepatitis C virus.

## 14T-COR 8®-IVD real-time PCR instrument related specificities

The T-COR 8®-IVD is a real time PCR device with 8 independently programmable wells which can be used, patient per patient, independently from each other, in terms of performed tests, thermal programs and PCR launch time.

The 8 wells may also be used simultaneously with the same 'Dosage' (Assay).

Note: Mix well after depositing the sample in the tube, by pipetting up and down, avoiding bubbles, and check that the liquid volume is well located at the bottom of the tube.

### **Controls**

On the T-COR 8™-IVD, for a proper use of the kit, it is necessary that the controls are performed only when a new kit is first used.

Later on, the CI-ARN ensures that within the tested sample, there is no PCR inhibition and that the PCR is working properly.

### **Patients tests**

<b><i>With a positive and negative controls validation, only once when used for the first time</i></b>	<b>24 tests</b>
<b>Number of patients tests possible patient per patient with a maximum of 12 freeze/thaw cycles (3 times per tube/4 tubes per reagents)</b>	<b>12 patients</b>

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

## **Fluorophores**

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

For all EBX, including EBX-009, the FAM/HEX/Texas Red/Cy5 combination is selected. If some of the channels are not used in some kits, ignore them in the results analysis.

## **Using the barcodes (available in pages 27 to 29)**

1- Select 'Menu' > 'Nouvelle Analyse' (New Run)

2- Select 'Code-barres' (Barcode)

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

- Either for the Positive Control (Barcode EBX-009 Pos Ctrl),
- Or for the Negative Control (Barcode EBX-009 Neg Ctrl),
- Or for a sample (Barcode Assay: EBX-009)

*The device will automatically select one out of the 8 available wells. Follow the instructions given by the device.*

4- Lift the flap of the well x selected by the device, and check that the blue LED light is on, then select 'Oui' (Yes).

5- Place the tube in the corresponding well and fold down the flap, then select 'Suivant' (Next).

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

7- Select 'Suivant' (Next).

8- In order to add/test another control or sample, select 'Ajouter un puits' (Add well) and start again at point 3-

9- Select 'Démarrer l'analyse' (Start the run)

*Note: Naming of a sample or a run cannot be modified or added after the end of the run. It has to be done before, or during the run.*

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

## **Presentation and Interpretation of the results**

Ct results and amplification curves are available in the Table 'Valeurs SmartCT™' (Ct values attributed for each channel), as well as the Ct graphs according to the cycles in each channels, both being viewable in real-time on the instrument.

An analysis for the negative and positive controls, and for the samples as well, is automatically generated. It is available in 'Interprétations', at the end of the run, in the window 'Vue'.

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

"Neg Ctrl Fail" : Invalid

"Neg Ctrl Valid" : Valid

"Pos Ctrl Fail" : Invalid

"Pos Ctrl Valid" : Valid

### **Sample status determination:**

'DéTECTÉ' (Detected): Positive for at least one target \* → **framed in green**

'Non DÉTECTÉ' (Not detected): Negative → **framed in red**

\* Detected or non-detected bacteria are specified.

### **CAUTION!**

**When the frame is green, it is important to check the status for each target, as some of the targets may be negative.**

'Non valide' (Invalid): Invalid result -> to be retested → framed in **Orange**

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

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

- For the valid negative and positive controls stated as “Detected” (Détecté), for a CP “Invalid” (Invalide) to be retested, for three negative samples for the two targets, stated “Not Detected” (Non détecté) (Samples 1 to 3) and for two samples detected for one of the targets stated as:
  - “Detected Dengue” (Dengue détecté)/ “Chikungunya Not detected” (Chikungunya Non détecté) for the sample Dengue and
  - “Detected Chikungunya” (Chikungunya Détecté)/ “Dengue Not detected” (Dengue Non détecté) for the sample Chikungunya

❖ On the instrument screen :

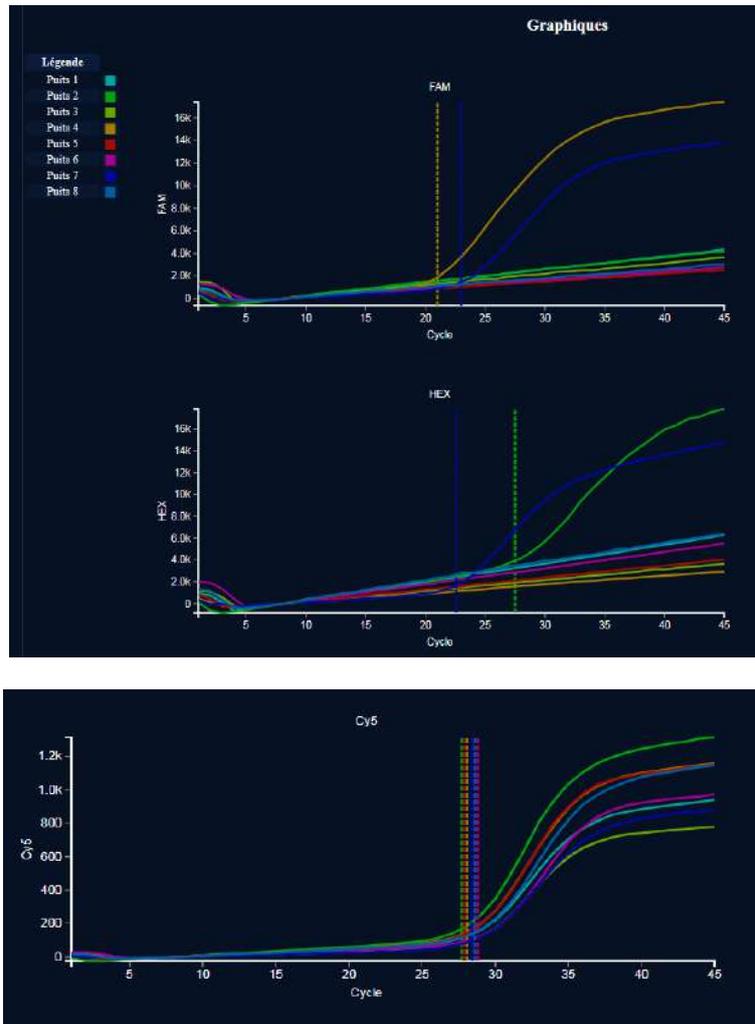
Interprétations		
1	Echantillon neg	EBX-009
Non détecté - Dengue, Chikungunya		
2	Echantillon dengue	EBX-009
Détecté(e-s): Dengue - Chikungunya not detected		
3	Echantillon neg 2	EBX-009
Non détecté - Dengue, Chikungunya		
4	Echantillon chik	EBX-009
Détecté(e-s): Chikungunya - Dengue not detected		
5	Echantillon neg 3	EBX-009
Non détecté - Dengue, Chikungunya		
6	NTC	EBX-009 Neg Ctrl
Détecté(e-s): Neg Ctrl Valid		
7	CP	EBX-009 Pos Ctrl
Détecté(e-s): Pos Ctrl Valid		
8	CP 2	EBX-009 Pos Ctrl
Non valide - Pos Ctrl Fail		

❖ In the report

Résumé								
Puits	Échantillon	Dosage	FAM	HEX	TxR	Cy5	Appeler	Remarque
1	Echantillon neg	EBX-009				28.0	Not Detected	Dengue, Chikungunya
2	Echantillon dengue	EBX-009		27.5		27.7	Detected • Dengue	Chikungunya not detected
3	Echantillon neg 2	EBX-009				28.1	Not Detected	Dengue, Chikungunya
4	Echantillon chik	EBX-009	21.0			28.1	Detected • Chikungunya	Dengue not detected
5	Echantillon neg 3	EBX-009				27.9	Not Detected	Dengue, Chikungunya
6	NTC	EBX-009 Neg Ctrl				28.8	Detected • Neg Ctrl Valid	
7	CP	EBX-009 Pos Ctrl	23.0	22.6		28.4	Detected • Pos Ctrl Valid	
8	CP 2	EBX-009 Pos Ctrl				28.6	Invalid	Pos Ctrl Fail

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

## Example of amplification curves



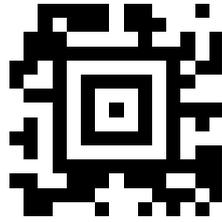
# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

**Barcodes on T-COR8®-IVD for EBX-009**

**EBX-009 Pos Ctrl**

**Positive control CP**

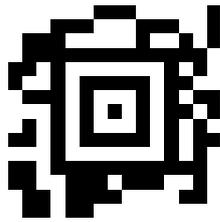


# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

**EBX-009 Neg Ctrl**

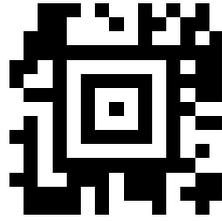
**Water = Negative control (CN-H2O)**



# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

**Assay : EBX-009**



# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

## 15 Quality control

According to the quality management system from Eurobio, which is certified ISO EN 13485, each batch of EurobioPlex Chikungunya /Dengue is tested according to defined specifications, in order to guarantee a constant quality of the products.

## 16 References

- Haute Autorité de Santé : Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, Recommandations de bonnes pratiques, HAS / Service des bonnes pratiques professionnelles / Septembre 2009 ; [www.has-santé.fr](http://www.has-santé.fr).
- Organisation mondiale de la Santé. <https://apps.OMS.int/iris/handle/10665/334254>. Test de diagnostic du SARS-CoV-2/Diagnostic testing for SARS-CoV-2 : conseils provisoires/interim guidance, 11 septembre 2020. Licence : CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- Fleige Simone, Pfaffl Michael W. *Molecular Aspects of Medicine* 27 (2006) 126–139. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance (review).
- Alfaro-Núñez Alonzo, Stephanie Crone, Shila Mortensen, Maiken Worsøe Rosenstjerne, Anders Fomsgaard, Ellinor Marving, Sofie Holdflod Nielsen, Michelle Grace Pinto Jørgensen, Charlotta Polacek, Arieh S. Cohen, Claus Nielsen, *Transbound Emerg Dis.* 2022;69:189–194 SARS-CoV-2 RNA stability in dry swabs for longer storage and transport at different temperatures
- Yu Keke, Jie Xing , Jie Zhang, Ruiying Zhao , Ye Zhang , Lanxiang Zhao, Effect of multiple cycles of freeze-thawing on the RNA quality of lung cancer tissues *Cell Tissue Bank* 2017 Sep;18(3):433-44

## 17 Waste disposal

All the waste should be disposed of according to DASRI regulations.

## 18 Incident report

Any serious incident that has occurred in relation with the product shall be reported to EUROBIO SCIENTIFIC and the competent authority of the country in which the user and/or the patient is established.

# Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue

---

## 19 Technical assistance

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

You can contact EUROBIO SCIENTIFIC Customer Service:

- by mail at: [adv@eurobio-scientific.com](mailto:adv@eurobio-scientific.com)

or

- by phone at: +33 (0)1.69.07.94.77.



7, avenue de Scandinavie

ZA de Courtabœuf

91940 Les Ulis

FRANCE