



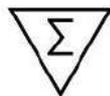
EurobioPlex

Zika Virus

RT-PCR EN TEMPS REEL

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

REF EBX-012



24/48/96 réactions



Version 6.00 du 26/09/2019

Validé sur :

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Biorad) avec analyse sur CFX Manager version 3.1 (Biorad)
- 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 Per-Well SmartCT™ software*

*Pour une utilisation sur T-COR 8®-IVD, seule l'utilisation qualitative est validée.

Conditions de stockage :

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



Mode d'emploi

SOMMAIRE

Utilisation	3
Introduction	3
Principe de la détection	4
Description et contenu du kit	4
Conservation	5
Précautions et notes	5
Collecte des échantillons, transport et conservation	6
Procédure	7
I-Extraction d'ARN	7
II-Réalisation de la qRT-PCR	7
II-1/ Pour une utilisation en RT-PCR qualitative	7
II-2/ Pour une utilisation en RT-PCR quantitative	8
II-3/ Protocole de qRT-PCR	8
Schéma de la procédure.....	9
Procédure détaillée	10
Validation de l'expérimentation	11
Analyse des données et interprétation	13
Analyse quantitative et conversion des copies/microlitre en IU/microlitre.....	13
Analyse des performances	14
Particularités liées à l'instrument de PCR en temps réel T-COR 8®-IVD	17
Codes-Barres pour EBX-012 sur T-COR 8®-IVD	21
Bibliographie	24
Elimination des déchets	24
Symboles	25

UTILISATION

Le test Zika Virus est un test d'amplification par reverse transcription-réaction en chaîne de la polymérase (RT-PCR) en temps réel, conçu pour la détection qualitative et quantitative de la présence ou l'absence de Zika Virus dans un extrait d'acides nucléiques ARN. Le test est indiqué pour 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 Zika Virus.

Ce système a été validé sur les prélèvements suivants :

- Serum
- Urine
- Salive

Ce système d'amplification a été validé sur des échantillons biologiques (sérum, urine et salive), sur le « 1st zika WHO International standard » (Paul Ehrlich Institut- code : 11468/16), ainsi que sur un bactériophage à ARN encapsidé (CI-ARN).

Pour une utilisation sur T-COR 8®-IVD, seule l'utilisation qualitative est validée.

INTRODUCTION

Le Zika Virus est un Arthropod-Borne virus (Arbovirus), transmis par les arthropodes (moustiques, tiques, phlébotomes etc.). Le génome du Zika Virus est un ARN simple brin. Le virus appartient à la famille virale des *Flaviviridae*. Ils sont transmis par diverses espèces de moustiques du genre *Aedes* tel que *aegypti*, *africanus*, *vitattus*, *furcifer*, etc. Il existe 3 lignées virales : en Afrique de l'ouest, de l'est et en Asie. La première apparition du virus a été chez un macaque rhésus dans la forêt de Zika en Ouganda. Des cas isolés chez l'homme en Asie et Afrique ont été rapportés depuis 1952, puis 2 épidémies majeures ont eu lieu dans l'île de Yap en Micronésie en 2007, puis en Polynésie française en 2013/2014. Les régions tropicales sont des cibles potentielles car le vecteur *Aedes aegypti*, vecteur de la Dengue, est aussi un vecteur potentiel du Zika Virus. Le risque existe donc dans toutes les régions contaminées par la Dengue et le Chikungunya. Quelques cas issus de l'importation ont été décrits en Norvège, en France ou au Japon. Des modes de transmission par voie sexuelle ou allaitement maternel ont également été reportés.

La maladie débute avec une fièvre, une éruption cutanée, une conjonctivite, et des douleurs musculaires et articulaires, de façon quasi identique à la Dengue, ce qui rend le diagnostic compliqué.

Dans la majorité des cas, l'infection ne présente pas de complications mais lors de l'épidémie en Polynésie française, un nombre 20 fois supérieur de cas de syndrome de Guillain Barré (affection nerveuse périphérique) a été constaté. Dans l'épidémie de 2015 au Brésil, Zika Virus a été responsable de microcéphalies chez le fœtus et nouveau-né. Aucun vaccin ou traitement curatif n'existe actuellement, seul un traitement des symptômes est prodigué.

Le diagnostic doit se faire dans la première semaine suivant l'apparition des symptômes. Des patients asymptomatiques toutefois se sont avérés porteurs du Zika Virus. Il n'existe pas de diagnostic d'antigène du Zika Virus. La sérologie IgG et IgM ainsi que la culture sont utilisables. Toutefois, il existe des réactions croisées entre les

membres de la famille des flavivirus, ce qui rend difficile l'interprétation de la sérologie en phase aiguë.

La technique de biologie moléculaire RT-PCR en temps réel est une technique reconnue pour la détection du virus. Les amorces et sondes du kit permettent ici la détection et la quantification (en Unités Internationales) de l'ARN du Zika Virus.

Le test de RT-PCR est un test permettant le diagnostic direct dès la phase précoce de la maladie.

PRINCIPE DE LA DETECTION

Le test Zika Virus est un test d'amplification de l'acide ribonucléique (ARN) du Zika Virus, 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 puits/tube.

Le contrôle interne 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 Zika Virus est détecté à l'aide d'une sonde marquée FAM et le contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR est détecté à l'aide d'une sonde marquée CY5. Tous émettent une fluorescence spécifique suite à l'hydrolyse de leur sonde respective au cours de l'élongation du produit d'amplification. La mesure des intensités de fluorescence en temps réel est relative à l'accumulation des produits d'amplification spécifiques.

DESCRIPTION ET CONTENU DU KIT

Le kit de PCR en temps réel Eurobioplex Zika Virus est prêt à l'emploi pour la détection spécifique de ce virus, et sa quantification en Unités Internationales.

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 ci-dessous.

Le kit contient les réactifs et les enzymes nécessaires à l'amplification de l'ARN viral du Zika Virus, et du contrôle d'extraction et d'amplification par RT-PCR (Tableau 2).

Tableau 1 :

Cible	Fluorophore	Excitation	Emission
Zika Virus	FAM	495 nm	515 nm
Contrôle ARN (CI-ARN)	Cy5	647 nm	667 nm

Canaux équivalents sur différents instruments de PCR:

- Canal **FAM** (Systèmes ABI, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96 Systèmes Mx, T-COR 8®-IVD), Canal 530 (LC 480), Canal Green (RotorGene)

- Canal **Cy5** (Systèmes ABI, Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx, T-COR 8®-IVD), Canal Alexa647 (SmartCycler II), Canal 670 (LC 480), Canal Red (RotorGene)

Tableau 2 :

Couleur de Bouchon	Contenu du kit	EBX-012 (96 tests)	EBX-012-48 (48 tests)	EBX-012-24 (24 tests)	Reconstitution
Rouge	Enzymes	4 x 430 µl	2 x 430 µl	4 x 100 µl	Prêt à l'emploi
Transparent	Oligomix	4 x 140 µl	2 x 140 µl	4 x 60 µl	Prêt à l'emploi
Bleu	Eau = contrôle négatif (CN-H2O)	1 ml	1 ml	1 ml	Prêt à l'emploi
Jaune	4 Standards Zika Virus : CP-1: 10 ⁸ copies/µl CP-2: 10 ⁶ copies/µl CP-3: 10 ⁴ copies/µl CP-4: 10 ² copies/µl	4 x 75 µl de chaque CP	2 x 75 µl de chaque CP	4 x 75 µl de CP-1 1 x 75 µl de CP-2, CP-3, CP-4	Prêt à l'emploi
Blanc	Contrôle ARN (CI-ARN)	4 x 300 µl	2 x 300 µl	4 x 75 µl	Prêt à l'emploi

Matériel nécessaire non fourni:

- ◇ Hotte biologique
- ◇ Appareil de qPCR
- ◇ Centrifugeuse pour microtubes
- ◇ Vortex
- ◇ Plaques / tubes pour réaction de qPCR
- ◇ Micropipettes
- ◇ Embouts DNase et RNase-free à filtres pour micropipettes
- ◇ Microtubes stériles
- ◇ Gants (sans talc)

CONSERVATION

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.

PRECAUTIONS ET NOTES

Lire attentivement ces instructions avant de débiter la procédure.

- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée par du personnel compétent.
- ◇ 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.
- ◇ Une fois les réactifs décongelés, centrifuger brièvement les tubes avant leur utilisation.
- ◇ Il est recommandé de définir trois zones de travail distincts : 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.

COLLECTE DES ECHANTILLONS, TRANSPORT ET CONSERVATION

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

Tableau 3 :

Recommandations de stockage maximum des échantillons avant extraction	
Température ambiante	2 h
4°C	16 h
-20°C (de préférence -80°C)	Stockage à long terme

- ◇ L'utilisateur peut se référer aux recommandations émises par la World Health Organization 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.

PROCEDURE

I-Extraction d'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 sérum, urine, salive et de se référer aux instructions du fournisseur du kit d'extraction utilisé.

Dans le kit Zika Virus, 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 stock 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 qRT-PCR pour plus de détails.

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

II- Réalisation de la qRT-PCR

Remarque générale:

Les standards Zika Virus, 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 un contrôle positif CP-1 et un contrôle négatif (eau PCR fournie= CN-H₂O+CI-ARN) (voir II-3/ 6 du protocole de qRT-PCR).

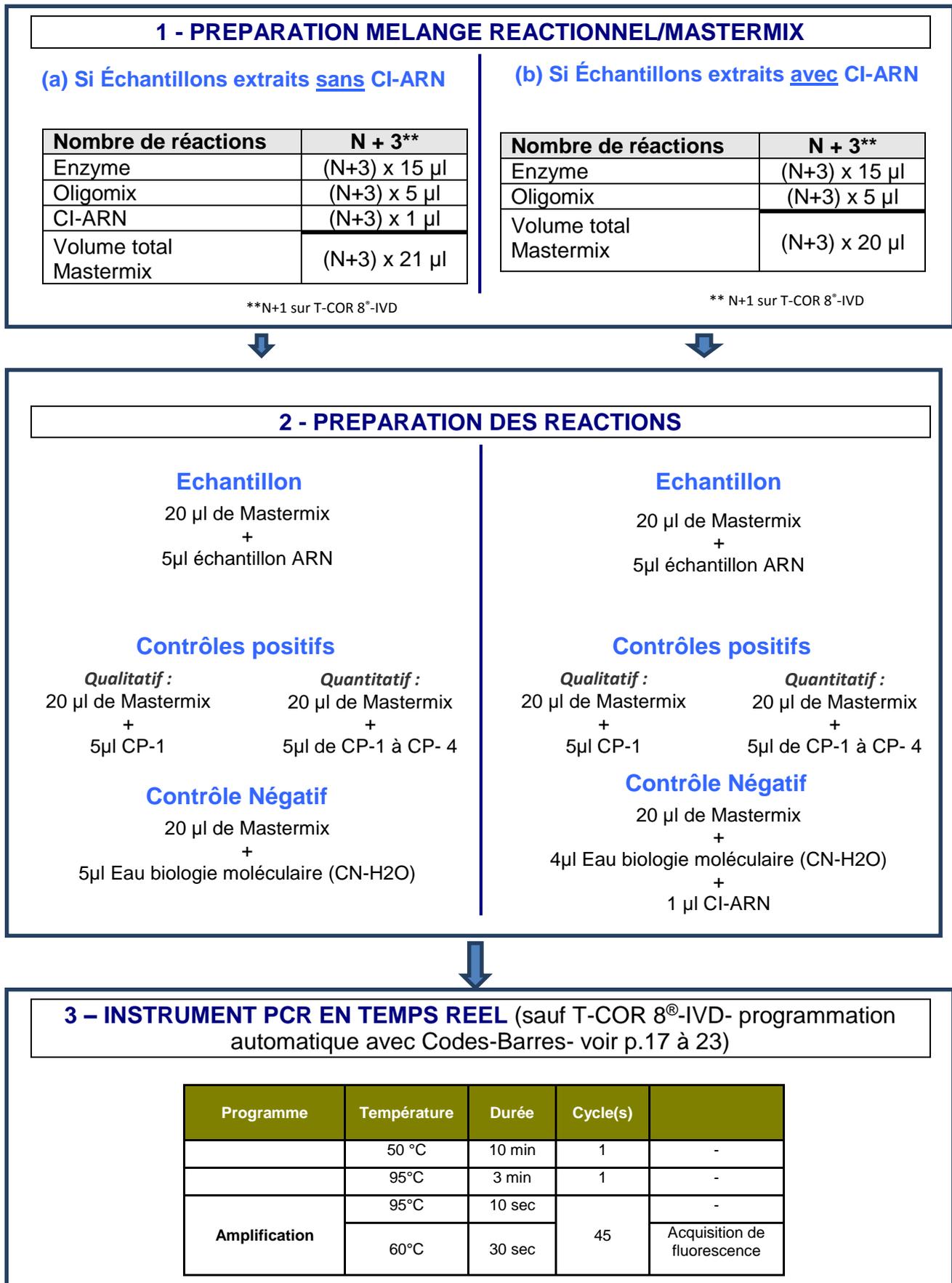
II-1/ Pour une utilisation en RT-PCR qualitative en temps réel, aucune gamme standard n'est réalisée. Seul le contrôle positif CP-1 et le contrôle négatif sont testés.

II-2/ Pour une utilisation en RT-PCR quantitative, en plus du contrôle négatif, il faut réaliser une courbe standard à l'aide des quatre tubes contrôles-standards CP-1 à CP-4, prêts à l'emploi. Pour générer une courbe standard sur un système de PCR en temps réel, les concentrations 10^8 , 10^6 , 10^4 , 10^2 copies/ μ l doivent être utilisées et définies comme standard en spécifiant le nombre de copies/ μ l correspondant. Afin de pouvoir corriger une éventuelle variation liée à l'expérimentation, nous recommandons de tester les CP Standards en triplicats.

Standards	Concentration
CP-1	10^8 copies/ μ l
CP-2	10^6 copies/ μ l
CP-3	10^4 copies/ μ l
CP-4	10^2 copies/ μ l

II-3/ Protocole de qRT-PCR

Schéma de la procédure



Procédure détaillée

- 1) Homogénéiser le tube d'Enzymes, et vortexer Oligomix, CP standards 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 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

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

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

Si l'échantillon a été extrait avec ajout de CI-ARN lors de l'extraction, alors ce dernier ne doit pas être rajouté au mélange réactionnel. Le volume total du mélange réactionnel sera alors de 20 µl.

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 des échantillons d'ARN extraits
- 6) En parallèle réaliser les contrôles suivants :
 - Contrôle positif :
 - Test qualitatif :
 - 20 µL de Mastermix + 5 µL de contrôle positif CP-1
 - Test quantitatif :
 - 20 µL de Mastermix + 5 µL de CP-1 à CP-4 pour la gamme standard 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 + 1µL de CI-ARN + 4µL d'eau fournie (CN-H2O)

- 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.
- 9) Réaliser le programme suivant sur l'instrument de qPCR. La durée est d'environ 1h10.

Programme	Température	Durée	Cycle(s)	
	50 °C	10 min	1	-
	95°C	3 min	1	-
Amplification	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.

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

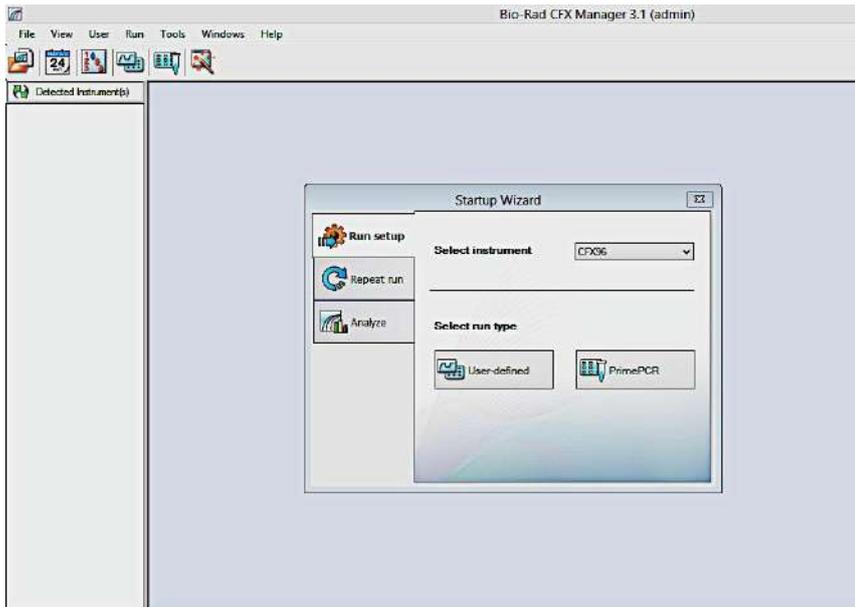
Note 3 : Sur Rotorgene™, calibrer le signal en cliquant sur « GAIN OPTIMISATION ».

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

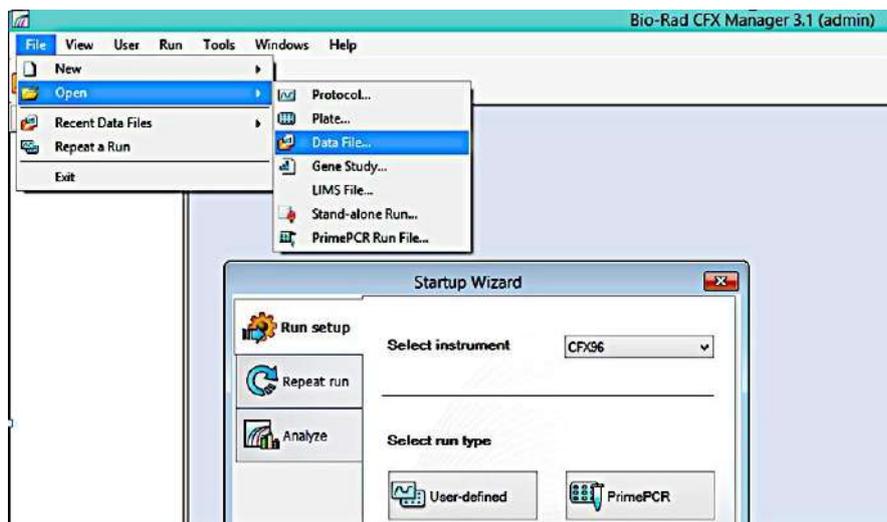
VALIDATION DE L'EXPERIMENTATION

L'analyse des data post-acquisition sur un appareil de PCR CFX96 (Biorad) doit être réalisée à l'aide de la version 3.1 du logiciel CFX Manager (Biorad). 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 (Biorad).

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

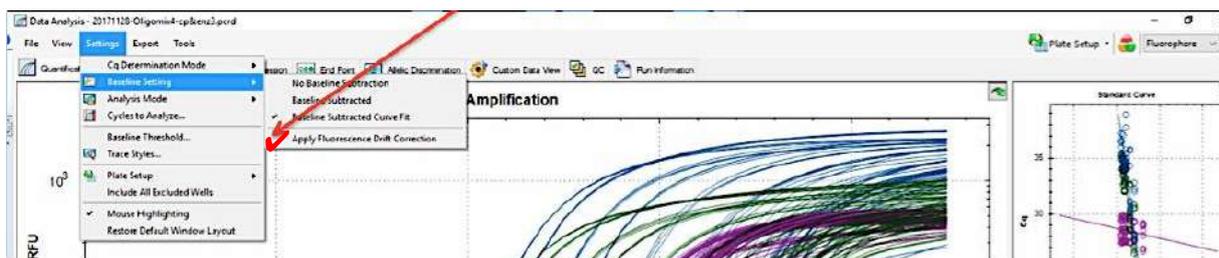


- Cliquer sur File et sélectionner Open puis Data File



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

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



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 3). En dehors de ces valeurs, l'expérimentation ne peut être validée.

Tableau 3 :

Contrôle Positif	
FAM	Ct ≤ 30
Contrôle Négatif	
FAM	Non déterminé
CY5	Ct ≤ 45

En PCR quantitative, en plus des contrôles valides du Tableau 3, l'efficacité sur le canal FAM doit être comprise entre 80 et 120% et le coefficient de corrélation >0,95.

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

ANALYSE DES DONNEES ET INTERPRETATION

Contrôle interne dans les échantillons :

Deux résultats peuvent être obtenus :

1/ le test du contrôle interne ARN (CI-ARN) est positif : 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 interne ARN (CI-ARN) est négatif : 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.

Pour les échantillons cliniques, les résultats suivants sont possibles :

***Seuil pour échantillon : + Positif => Ct positif (≤ 45)**

Signal PCR		Présence de Zika Virus	Validité du test/commentaire
FAM	CY5		
+*	+	Oui	valide
-	+	Non	valide
+*	-	Oui	Possible inhibition d'extraction ou de RT-PCR qui n'empêche pas la détection du virus ; valide
-	-	Non interprétable	Problème d'extraction ou d'inhibition de RT-PCR -diluer 5 x l'échantillon ; si même résultat ré-extraire l'échantillon

ANALYSE QUANTITATIVE ET CONVERSION DES COPIES/MICROLITRE EN IU/MICROLITRE

Pour tracer la courbe étalon, renseigner les concentrations en copies/microl de la gamme de linéarité de quantification des standards de Zika Virus (canal FAM) (10^8 - 10^6 - 10^4 - 10^2 copies/ μ L). Le logiciel affichera une courbe standard et calculera pour les échantillons le nombre de copies/ μ L correspondant.

Après extraction de l'étalon international Zika Virus (1st WHO International standard ; Paul Ehrlich Institut- code : 11468/16) sur QiaAmp viral RNA mini kit (Qiagen, 140 microlitres d'échantillon et élution dans 60 microlitres), la correspondance entre le nombre de copies/microlitre du contrôle positif du kit Eurobioplex Zika Virus et le nombre d'unité internationale de l'Etalon international Zika Virus a été établie et les résultats se trouvent dans le tableau suivant.

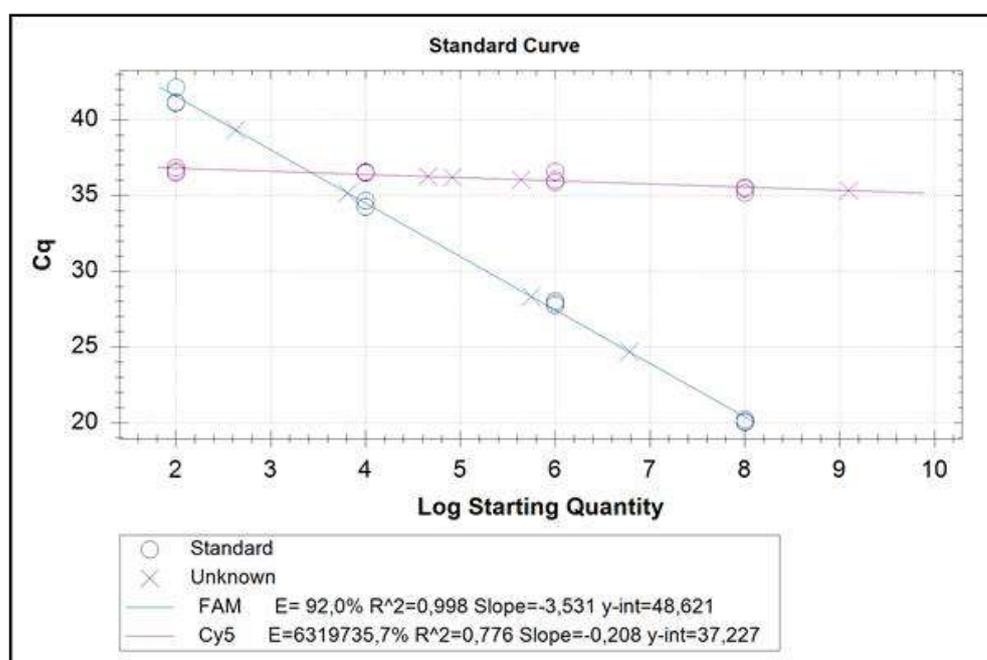
CP copies/microl	IU/microl
10^8	53800
10^6	538
10^4	5,38
10^2	0,0538

ANALYSE DES PERFORMANCES

Limite de détection/sensibilité analytique : 0,05 IU/ μ l

Linéarité: 100 à 10⁸ copies plasmide/ μ l ; 0,05 à 0,54 10⁶ IU/ μ l

Exemple d'expérience réalisée en triplicata sur thermocycleur qPCR CFX96 (Biorad) :



Note : Au-delà de 10⁵ copies/ μ l Zika Virus, la valeur de Ct de CI-ARN peut être affectée ou l'amplification inhibée.

Efficacité moyenne sur 3 lots= 100,8 % avec un coefficient de variation de 2,87 %

Coefficient de corrélation moyen sur 3 lots : R²=0,996+/-0,003

Variabilité du signal sur le canal du Zika Virus (FAM)

Coefficient Variation Moyen	%
Intra-expérience	2.92
Inter-expériences (n=36 mesures)	7.55
Inter-lots (n=36 mesures)	7.2

Spécificité : 98,9 %

La spécificité a été évaluée sur un total de 92 échantillons négatifs dont :

- 9 échantillons positifs pour le Chikungunya (provenant d'un Centre National de Référence), et confirmés positifs avec le kit Eurobioplex Chikungunya/Dengue (EBX-009)
- 10 échantillons positifs pour les sérotypes 1, 2, 3 ou 4 de la Dengue ; provenant d'un Centre National de Référence) et confirmés positifs avec le kit Eurobioplex Dengue 1234 (EBX-018)
- 73 échantillons pré-testés négatifs avec la méthode de Lanciotti utilisant les amorces aux positions Sens 1086, Reverse 1162c et une sonde à la position 1107 (provenant d'un Institut Pasteur).

Sensibilité : 96,9 %

Les tests ont été réalisés sur 96 échantillons biologiques positifs pour Zika Virus : 51 sérum issus de prélèvements sanguins au cours d'épidémies de Zika Virus en Polynésie Française (2013) et en Amérique centrale (2016), 20 échantillons d'urine et 25 échantillons de salive. Les tests ont été réalisés sur CFX96.

Prétest	Eurobioplex EBX-012 Zika Virus	
	POSITIF	NEGATIF
POSITIF (n=96)	93	3*
NEGATIF (n=92)	1	91
TOTAL (n=188)		

* Les valeurs de Ct de 2 des 3 discordants est >37 dans les pré-tests ayant comme critère de positivité un Ct < 38.

Pour cette étude, l'extraction de sérum ou d'urine a été réalisée sur les systèmes NucliSens® EasyMag® (Biomérieux), NucleoSpin 96 (Macherey Nagel) et l'extraction de salive sur EasyMag®.

La concordance globale est de 97,9 %.

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 pipettage, en évitant la formation de bulles.

Contrôles

Sur T-COR 8®-IVD, nous recommandons que le contrôle positif et le contrôle négatif soient testés lors de la première utilisation d'un nouveau kit.

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

Avec test des contrôles positifs uniquement lors de la première utilisation d'un nouveau kit, et avec 3 décongélations maximum de chaque tube.	24 réactions
Nombre maximum de tests patients	22 patients
Nombre maximum de tests patients, avec un patient à chaque run.	12 patients

Fluorophores

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

Pour tous les EBX, dont EBX-012, 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 21 à 23)

- 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-012 Pos Ctrl),
 - soit pour le contrôle négatif (Code-barre EBX-012 Neg Ctrl),
 - soit pour un échantillon (Code-Barre Assay : EBX-012)

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.

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

« 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 contrôle négatif Invalid/Non valide à retester, pour un échantillon négatif, indiqués « Not Detected/Non Détecté » (échantillon B106) et pour quatres échantillons détectés pour la cible Zika virus des cibles indiqués (Detected/Détecté(e-s) Zika) (échantillons IS/488/491/967):

❖ Sur l'écran de l'instrument :



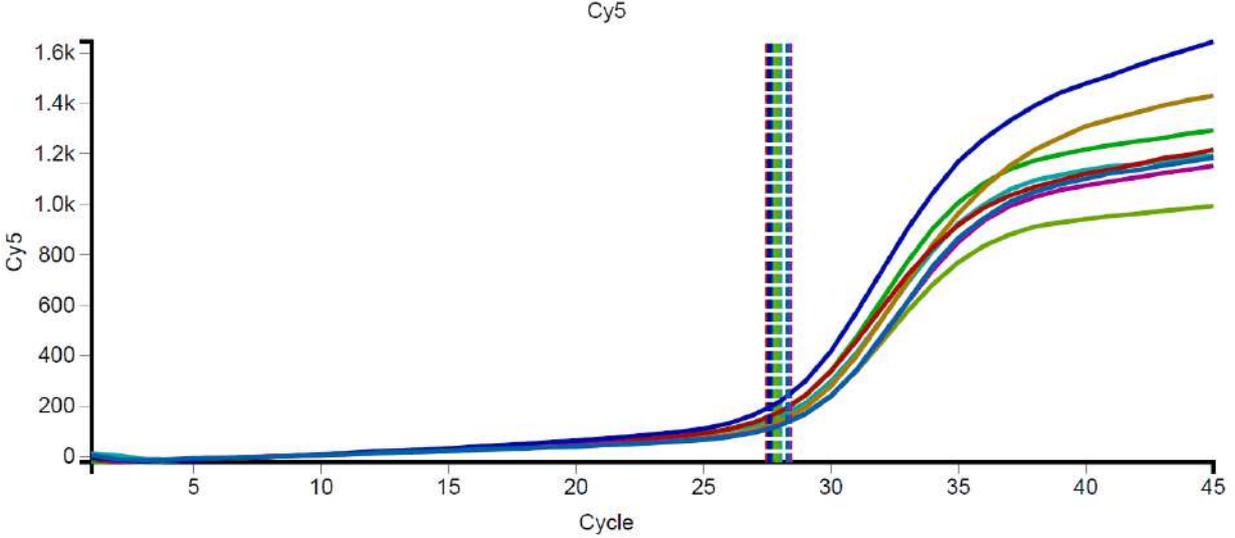
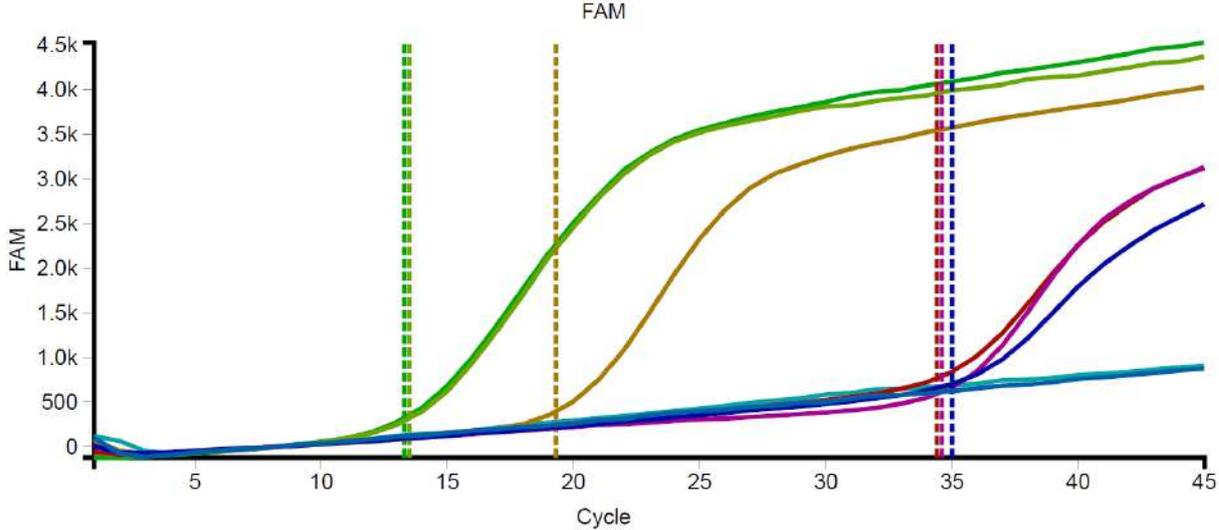
❖ Dans le rapport

Résumé

	Puits	Échantillon	Dosage	FAM	HEX	TxR	Cy5	Appeler	Remarque
■	1	NTC	EBX-012 Neg Ctrl				28.0	Detected • Neg Ctrl	
■	2	CP	EBX-012 Pos Ctrl	13.3			27.7	Detected • Pos Ctrl	
■	3	NTC	EBX-012 Neg Ctrl	13.5			27.9	Invalid	Neg Ctrl Fail
■	4	IS	EBX-012	19.3			28.4	Detected • Zika	
■	5	488	EBX-012	34.4			27.5	Detected • Zika	
■	6	491	EBX-012	34.6			28.4	Detected • Zika	
■	7	967	EBX-012	35.0			27.6	Detected • Zika	
■	8	B106	EBX-012				28.3	Not Detected	Zika Neg

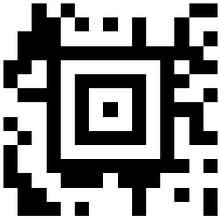
Exemple de courbes d'amplification

Graphiques

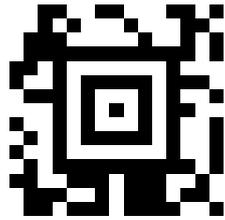


Codes-Barres sur T-COR8®-IVD pour EBX-012

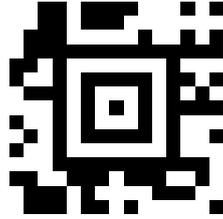
EBX-012 Pos Ctrl
Contrôle Positif CP



EBX-012 Neg Ctrl
Eau = contrôle négatif (CN-H2O)



Assay: EBX-012



BIBLIOGRAPHIE

Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM, Rapid spread of emerging Zika Virus in the Pacific area, Clin Microbiol Infect. 2014 Oct;20(10):O595-6.

Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, Shan Yan A, Cao-Lormeau VM, Broult J. Potential for Zika Virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. Euro Surveill. 2014 Apr 10;19(14).

Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, et al. Zika outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. N Engl J Med 2009; 360: 2536–43.

Diallo D, Sall AA, Diagne CT, Faye O, Ba Y, Hanley KA, Buenemann M, Weaver SC, Diallo M. Zika Virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. PLoS One. 2014 Oct 13;9(10).

Faye O, Diallo D, Diallo M, Weidmann M, Sall AA. Quantitative real-time PCR detection of Zika Virus and evaluation with field-caught mosquitoes. Virol J. 2013 Oct 22;10:311.

Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, Recommandations de bonnes pratiques, www.has-santé.fr

Laboratory testing for Zika Virus infection : <http://www.who.int/csr/resources/publications/zika/laboratory-testing/en/> - WHO reference number: WHO/ZIKV/LAB/16.1

ELIMINATION DES DECHETS

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

SYMBOLES

	Référence
	Numéro de lot
	Limite supérieure de température de conservation
	Date d'expiration
	Contenu suffisant pour « N » réactions
	Conserver à l'abri de la lumière
	Fabricant
	Produit marqué CE
	In vitro Diagnostic
	Mode d'emploi



eurobio
SCIENTIFIC

7, avenue de Scandinavie
91940 Les Ulis Cedex
FRANCE



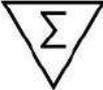
EurobioPlex

Zika Virus

REAL-TIME RT-PCR

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

REF EBX-012

 24/48/96 reactions



Version 6.00 of 2019/09/26

Validated on:

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Biorad) with analysis on CFX Manager v 3.1 (Biorad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche) with analysis on LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) with analysis on 7500 Software v2
- T-COR 8®-IVD (Tetracore Inc.) with T-COR 8 Per-Well SmartCT™ software*

* For use with the T-COR 8®-IVD, only qualitative use is validated.

Storage conditions:

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



Instructions for use

TABLE OF CONTENTS

Intended Use	28
Introduction	28
Principle of detection	29
Description and content of the kit	29
Storage	30
Cautions and notes	31
Sample collection, transport and storage	32
Procedure	33
I- RNA extraction	33
II- qRT PCR procedure	33
II-1/ For qualitative real-time PCR	33
II-2/ For quantitative real-time PCR	33
II-3/ Protocol of qPCR - Diagram of the procedure	34
II-4/ Protocol of qPCR - Detailed procedure	35
Validation of the experiment	36
Data analysis and Interpretation	38
Quantitative analysis and conversion of copies/microl to IU/microliter.....	39
Performances analysis.....	40
Specificities of the Real-Time PCR T-COR 8®-IVD instrument	42
Barcodes for EBX-012 for use on T-COR8®-IVD.....	46
Bibliography	49
Waste disposal	49
Symbols	50

INTENDED USE

The Zika Virus test uses reverse transcription-real time polymerase chain reaction (PCR) amplification and is designed for the qualitative and quantitative detection of Zika Virus from a messenger RNA extract. This test is indicated to diagnose the occurrence of that infection in humans in which case the extract can come from blood of patients, or complement a proven or indeterminate serological diagnosis. Extracted RNA is the starting material for the Eurobioplex Zika Virus kit.

The Eurobioplex Zika Virus has been validated on the following specimen:

- Serum
- Urine
- Saliva

This amplification system has been validated on biological samples (urine, serum, saliva), the 1st Zika WHO International standard (Paul Erlich Institute- code: 11468/16) and on a RNA bacteriophage (CI-ARN).

For use with the T-COR 8®-IVD, only qualitative use is validated.

INTRODUCTION

The Zika Virus is an Arthropod-Borne virus (Arbovirus), transmitted by arthropods (mosquitoes, ticks, sandflies etc.). The virus belongs to the *Flaviviridae* virus family. They are transmitted by various species of the *Aedes* genus mosquitoes, like *aegypti*, *africanus*, *vitattus*, *furcifer* etc. There are 3 lines in the West and East Africa and Asia. The first appearance of the virus has been in a rhesus macaque in the forest of Zika in Uganda. Isolated cases in humans in Asia and Africa have been reported since 1952, and then 2 major epidemics have occurred in the French island of Yap in Micronesia in 2007, then in French Polynesia in 2013/2014. The Zika Virus genome is RNA single-stranded. The tropics are potential targets as the vector of the Dengue is *Aedes aegypti*, which is also a potential vector for the Zika Virus. The risk therefore exists in all areas contaminated by *Dengue* and *Chikungunya*. A few cases from the import have been described in Norway, France and Japan. The modes of transmission by sexual contact or breastfeeding have also been postponed.

The disease begins with fever, a rash, conjunctivitis, and muscle and joint pains, almost identically to Dengue, thus it is difficult to establish a sure diagnosis.

In the majority of cases, the infection has no complications but in the French epidemic in French Polynesia, a number 20 times higher for cases of Guillain Barré syndrome (peripheral nerve disease) has been found. Zika Virus has been responsible for microcephaly in the fetus and neonates in the 2015 epidemic in Brazil. No vaccine or curative treatment currently exists, only treatment of symptoms is provided.

The diagnosis must be done in the first week after the onset of symptoms. Asymptomatic patients however were found to be carriers of the Zika Virus. There is no diagnosis of the Zika Virus antigen. IgG and IgM serologies as well as culture are usable. However, cross-reactions between the members of the *flavivirus* family are possible, which makes difficult the interpretation of serology in acute phase.

The real time RT-PCR is a molecular biology technique known for the detection of the virus. Primers and probes of this kit specifically allow the detection and quantification (in International Units) of Zika Virus RNA.

This RT-PCR test allows direct diagnosis in the early phase of the disease.

PRINCIPLE OF DETECTION

The Eurobioplex Zika Virus is a test of amplification of ribonucleic acid (RNA) of Zika Virus as well as an encapsulated control of RNA extraction and RT-PCR inhibition, using PCR amplification in real-time and in one step. The test is performed from RNA extracted from a sample using a single reaction in a single tube/well.

This control allows for checks of variations that may occur during the steps of RNA extraction of biological samples and PCR amplification in real-time, and ensures that a negative result may not be due to a bad RNA extraction and/or the presence of PCR inhibitors in too large quantities.

Zika Virus RNA is detected using a labeled probe FAM. Control of extraction and PCR inhibition is detected using a labeled probe CY5. All emit a specific fluorescence following their hydrolysis during the elongation of the amplification product. The measurement of the intensities of real-time fluorescence correlates with the accumulation of specific amplification products.

DESCRIPTION AND CONTENT OF THE KIT

The real-time PCR Zika Virus kit is ready to use for the specific detection of this virus and its quantification expressed as International Units.

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

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

Table 1:

Target	Fluorophore	Excitation	Emission
Zika Virus	FAM	495 nm	515 nm
RNA control (CI-ARN)	Cy5	647 nm	667 nm

Equivalent channels on different real time PCR cyclers:

- Channel **FAM** (ABI Systems, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96, Systems Mx, T-COR8®-IVD), Channel 530 (LC 480), Channel Green (RotorGene)
- Channel **Cy5** (ABI Systems, Chromo 4/CFX96, Mx Systems, T-COR8®-IVD), Channel 670 (LC 480), Channel Alexa647 (SmartCyclerII), Channel Red (RotorGene)

Table 2:

Cap color	Components of the kit	EBX-012 (96 tests)	EBX-012-48 (48 tests)	EBX-012-24 (24 tests)	Reconstitution
Red	Enzymes	4 x 430 µl	2 x 430 µl	4 x 100 µl	Ready to use
Transparent	Oligomix	4 x 140 µl	2 x 140 µl	4 x 60 µl	Ready to use
Blue	Water = negative control (CN-H2O)	1 ml	1 ml	1 ml	Ready to use
Yellow	4 Zika Virus Standards: CP-1: 10 ⁸ copies/µl CP-2: 10 ⁶ copies/µl CP-3: 10 ⁴ copies/µl CP-4: 10 ² copies/µl	4 x 75 µl each CP	2 x 75 µl each CP	4 x 75 µl de CP-1 1 x 75 µl de CP-2, CP-3, CP-4	Ready to use
White	RNA control (CI-ARN)	4 x 300 µl	2 x 300 µl	4 x 75 µl	Ready to use

Required material not provided:

- ◇ Biological Hood
- ◇ qPCR instrument
- ◇ Micro centrifuge
- ◇ Vortex
- ◇ Plates / tubes for qPCR
- ◇ Micropipettes
- ◇ DNase-free RNase-free tips for micropipettes
- ◇ Sterile microtubes
- ◇ Gloves (powder free)

STORAGE

All reagents must be stored between -15 and -22°C. Storage at +4°C is not recommended.

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

Many freezing/thawing cycles (> 3x) must be avoided, and could lead to decrease in sensitivity.

CAUTIONS AND NOTES

Read carefully instructions before starting.

- ◇ The experiment must be performed by competent staff.
- ◇ Instruments must have been properly installed, calibrated and maintained according to the manufacturer's recommendations.
- ◇ Clinical samples are potentially infectious and must be processed under a laminar flow hood.
- ◇ The experiment must be performed according to good laboratory practices.
- ◇ Do not use this kit after expiration date.
- ◇ The kit is shipped with dry ice, and the components of the kits must arrive frozen. If one or more components are defrosted, or of the tubes have been damaged, contact Eurobio Scientific.
- ◇ Once defrosted, spin down briefly the tubes before use.
- ◇ Use of ice or cooling block is advised in case of long delay du for instance to large number of samples or high temperature.
- ◇ It is recommended to define three working areas: 1) Isolation of RNA, 2) Preparation of the reaction mix and 3) Amplification / Detection of amplified products.
- ◇ Pipettes, reagents and other materials must not cross each area.
- ◇ Use specific lab coat and gloves (powder free) in each working area.
- ◇ Pipettes, reagents and other materials must not cross each area.
- ◇ Specific caution is required to preserve the purity of the reagents and reaction mixtures.
- ◇ Appropriate methods of preparation/extraction of RNA to produce high quality RNA, and to be followed by an RT-PCR application, should be used, particularly avoiding all sources of RNase contamination.
- ◇ Always use DNase-free and RNase-free filtered tips for micropipettes.
- ◇ Do not pipette with mouth and do not eat, drink or smoke in the area.
- ◇ Avoid sprays.

SAMPLE COLLECTION, TRANSPORT AND STORAGE

- ◇ Collect samples in sterile tubes. **The use of heparin as an anticoagulant is prohibited.**
- ◇ It is the responsibility of the user to master its own conditions of collection, transport and conservation of samples, and extraction of RNA by suitable systems to produce RNA of good quality.
- ◇ The samples should be extracted immediately or stored following the recommendations in the table below (Table 3).

Table 3 :

Recommandations of maximum storage of samples before extraction	
Room temperature	Room temperature
4°C	4°C
<-20°C	<-20°C

- ◇ The user can refer to the World Health Organization or High Health Authority for storing samples.
- ◇ Extracted RNAs have to be stored at -80°C.
- ◇ Transport of clinical samples must obey local regulations for this type of infectious agents.

PROCEDURE

I- RNA Extraction

It is the user's responsibility that the extraction system used be compatible with downstream real time RT-PCR technology. For this kit, we recommend to use extraction methods of viral RNA for serum, urine, saliva and refer to manufacturer's instructions of the extraction kit.

In the Zika Virus kit, CI-ARN on the CY5 channel can be added before extraction or in the PCR reaction. It ensures that a negative result is not due to an extraction problem or due to the presence of RT-PCR inhibitors at high quantity.

We recommend the addition of 10 µl of stock CI-ARN per extraction and to test by PCR reaction 5 µl of elution of 50 µl end of the extraction volume. If the CI-ARN is added to control the RT-PCR, CI-ARN is added to the reaction mix (1 µl per PCR reaction). See q RT-PCR protocol for details.

CI-ARN is available from Eurobio (Ref Eurobioplex EBX-003).

II- qRT-PCR Procedure

General comment:

Zika Virus Standards and the control of extraction and RT-PCR inhibition (CI-ARN) contain a very high concentration of matrix. Manipulations must be performed carefully to avoid contamination.

To control the functioning of the PCR and steps of extraction and real-time RT-PCR amplification, it is necessary to test a positive control (CP-1) and a negative control (water supplied = CN-H₂O + CI-ARN). (see II-3/6 of qRT-PCR protocol for details).

II-1/ Qualitative PCR

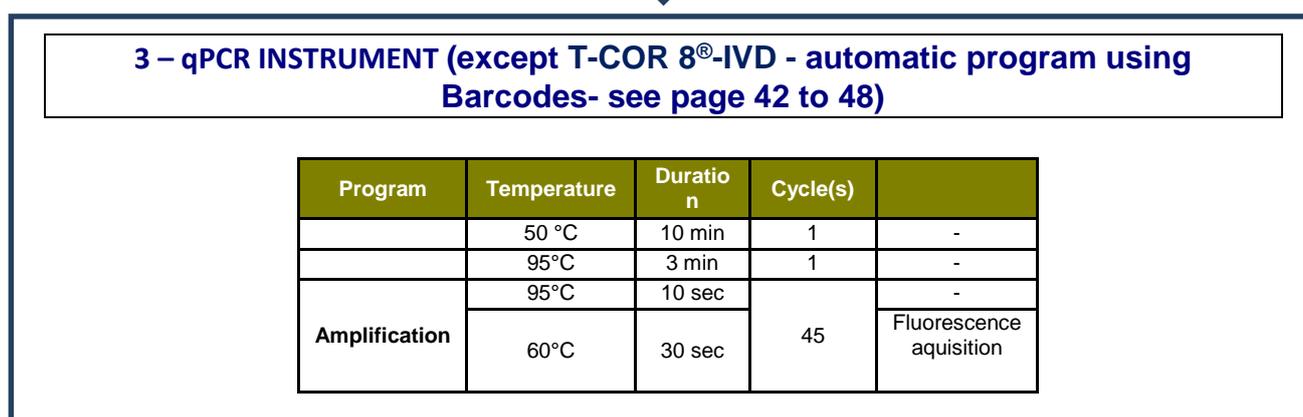
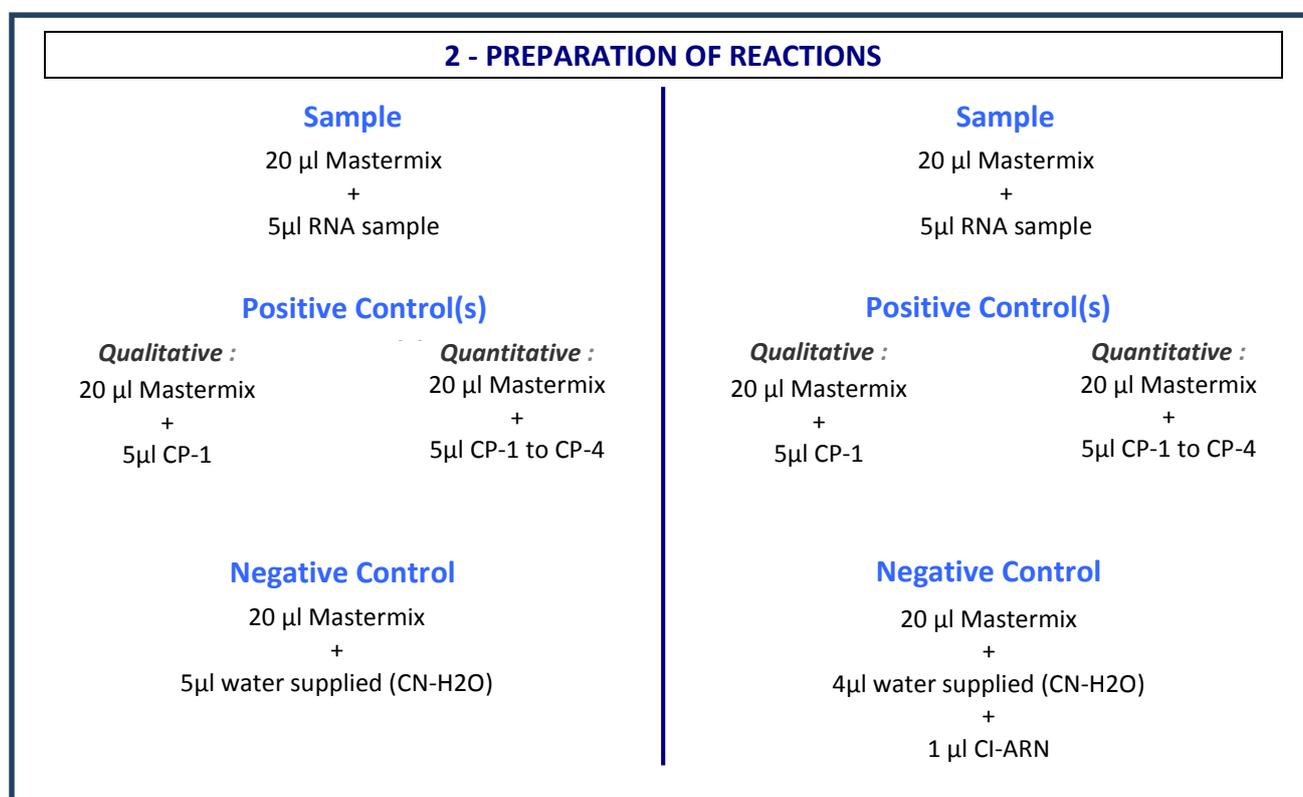
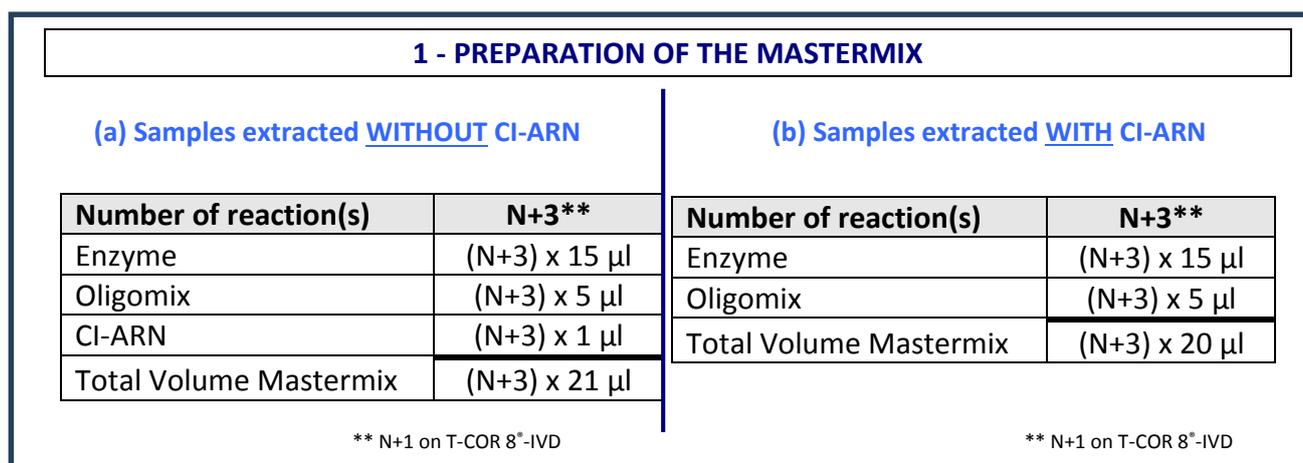
No standard range is performed. Only Positive control CP-1 and negative control are tested.

II-2/ Quantitative PCR

For quantitative real-time PCR, it is necessary to perform a standard curve using the four ready to use standards tubes CP-1 to CP-4. To generate a standard curve on a real-time PCR System, the concentrations of 10⁸, 10⁶, 10⁴ and 10² copies/µl must be used and defined as standard for CP by specifying the corresponding number of copies/µl. In order to correct for possible experimental variation, we recommend to test CP standards in triplicates.

Standards	Concentration
CP-1	10 ⁸ copies/µl
CP-2	10 ⁶ copies/µl
CP-3	10 ⁴ copies/µl
CP-4	10 ² copies/µl

II-3/ Protocol of qRT-PCR - Diagram of the procedure



II-4/ Protocol of qRT-PCR - Detailed Procedure

- 1) Homogenize the tube of Enzymes, and vortex Oligomix, CP standards and CI-ARN tubes before starting, and centrifuge briefly.
- 2) Prepare a Mastermix as below. N is the number of PCR reactions. Plan to prepare enough reagents for at least N+3 reactions.

Condition (a): Extraction of samples without CI-ARN

N reaction(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
Total Volume of Mastermix	21 µL	(N+3) x 21 µL

Condition (b): Extraction of samples with CI-ARN

N reaction(s)	1	N+3**
Enzymes	15 µL	(N+3) x 15 µL
Oligomix	5 µL	(N+3) x 5 µL
Total Volume of Mastermix	20 µL*	(N+3) x 21 µL

* if CI-ARN has been added before extraction, do not add it at this time. The total volume of Mastermix is then 20 µL. The volume difference between condition (a) or (b) has no effect on performance.

** For use on T-COR 8®-IVD, we recommend a Master Mix for N + 1 reactions for one-shot use of the kit

- 3) Homogenize the Mastermix prepared in 2) and centrifuge briefly.
- 4) Distribute 20 µL of Mastermix with a micropipette and filtered sterile tips in each tube or well of a microplate for real time PCR.
- 5) Add 5 µL of extracted RNA sample
- 6) In parallel test the positive et negative controls:
 - Positive control:
 - Qualitative test: 20µL Mastermix + 5µL CP-1
 - Quantitative test: 20µL Mastermix + 5µL CP-1 to CP-4 to generate CP standard range.
 - Negative control:
 - *Condition (a): CI-ARN was not added before samples extraction, but to the reaction mix:*
 - 20µL Master mix + 5µL water supplied (CN-H2O)
 - *Condition (b): CI-ARN was added during extraction and not to the PCR mix:*
 - 20µL Master mix + 1µL CI-ARN + 4µL water supplied (CN-H2O)
- 7) Close immediately with an adhesive film or transparent caps to avoid all contamination.
- 8) Centrifuge briefly to collect all the PCR reaction mix at the bottom of the tubes or plate.
- 9) Program the qPCR instrument as follows. A run takes about 1h 10 minutes.

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

Note 1: On LightCycler ® 480 systems, two optical systems are available: only "System II" is compliant with use of the kit.

Note 2: For the Applied Biosystems systems, select "ROX" in "PASSIVE REFERENCE".

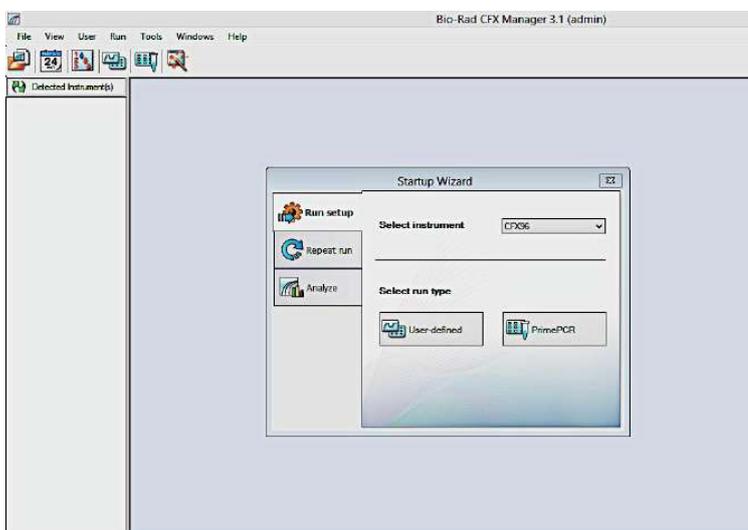
Note 3: On Rotorgene™, please calibrate the signal by clicking on "GAIN optimization".

Note 4: On CFX96 (Biorad), start the run using the v1.6 or later version of CFX Manager software, and analyse with v 3.1 (see § Validation of the Experiment)

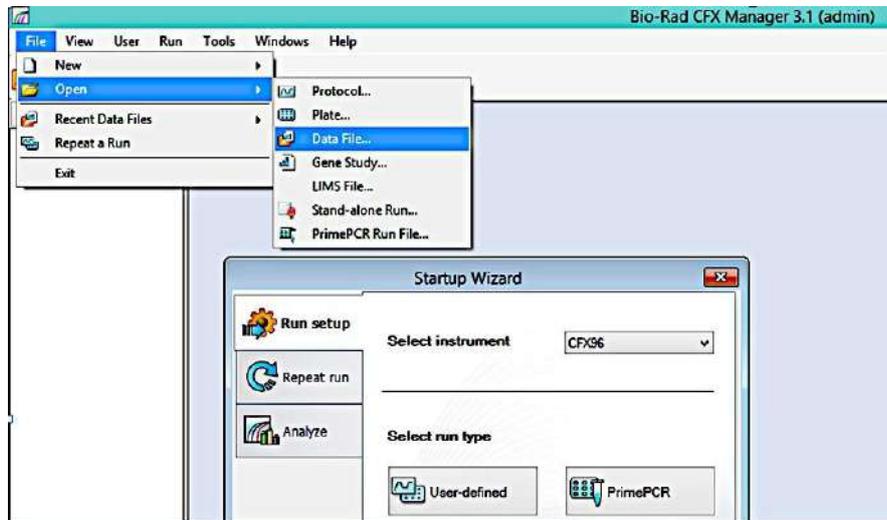
VALIDATION OF THE EXPERIMENT

The analysis of data post-acquisition on a CFX96 PCR instrument (Biorad) must be done with version 3.1 of CFX Manager software (Biorad). In order to use this v3.1 version from a run started with an older version, follow the procedure below: at the end of the run, the data file with.pcrd suffix must be open and treated with version 3.1 of CFX Manager (Biorad).

- If the run was done with CFX Manager v1.6 for instance, to open the data file with CFX Manager v3.1, click on CFX Manager v3.1 icone. The screen below appears.

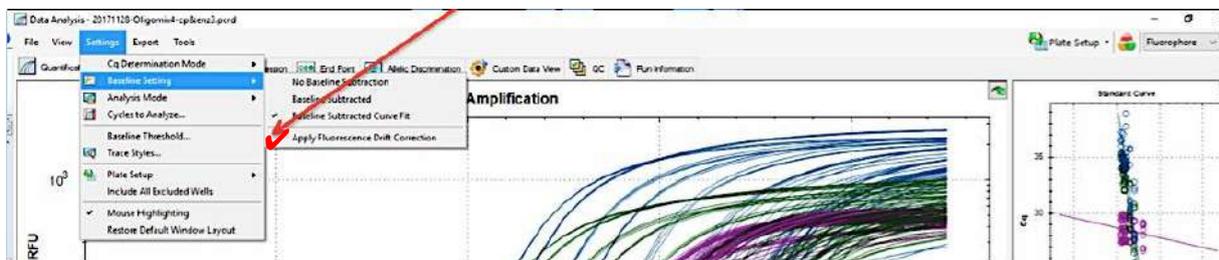


- Click on File and select Open, then Data File



- Select the file you want to analyze and click on Open

The « drift correction » option must be selected from the « Settings » Tab, as indicated on the image below : click on « Settings », then « Baseline Setting » then on « Apply Fluorescence Drift Correction ».



Once this is done, the analysis can start.

For the assay to be valid, the Ct values for the controls must be the following (Table 3). Outside of these values, the experiment is not valid.

Table 3:

Positive control	
FAM	Ct ≤ 30
Negative control	
FAM	Undetermined
CY5	Ct ≤ 45

Moreover, for quantitative analysis of PCR, efficiency should be between 80 and 120% on the FAM channel and the coefficient of correlation > 0.95.

On T-COR 8[®]-IVD, interpretation is automatically generated with Barcodes.

DATA ANALYSIS AND INTERPRETATION

Internal control in biological samples:

Two results can be obtained:

1/ the internal control RNA (CI-ARN) test is positive: RNA has been properly extracted, and there is no inhibitor of RT-PCR. The result can be validated.

2/ the internal control RNA test (CI-ARN) is negative: either RNA was not extracted, or the RT did not work well, either the presence of PCR inhibitors inhibits the PCR reaction. It is then recommended to repeat the extraction or dilute the sample, especially if the sample is negative for Zika Virus.

For clinical samples, the following results are possible:

***Sample cut off : + Positive => Positive Ct (≤ 45)**

PCR Signal		Presence of Zika Virus	Test validity/comment
FAM	CY5		
+	+	Yes	Valid
-	+	No	Valid
+	-	Yes	Possible PCR inhibition or RT-PCR inhibition that does not prevent the detection of virus; valid
-	-	No possible interpretation	PCR or RT-PCR inhibition -dilute first 5 x the sample and repeat PCR; if necessary redo an extraction

QUANTITATIVE ANALYSIS AND CONVERSION OF COPIES/MICROLITER TO IU/MICROLITER

To draw a standard curve, enter the concentrations of the standards on the FAM channel (10^8 - 10^6 - 10^4 - 10^2 copies/ μ l). The software will draw the standard curve and will calculate the corresponding number of copies/ μ l for the samples.

Following extraction of the Zika Virus International Standard (IS-ZIKA: 1st WHO International standard; Paul Erlich Institute- code: 11468/16) using QiaAmp viral RNA mini kit (Qiagen, 140 μ l sample and elution with 60 μ l), the equivalence between the copies/ μ l of the Eurobioplex Zika Virus Positive Control and the number of International Units/ μ l IS-ZIKA was established as in the table below:

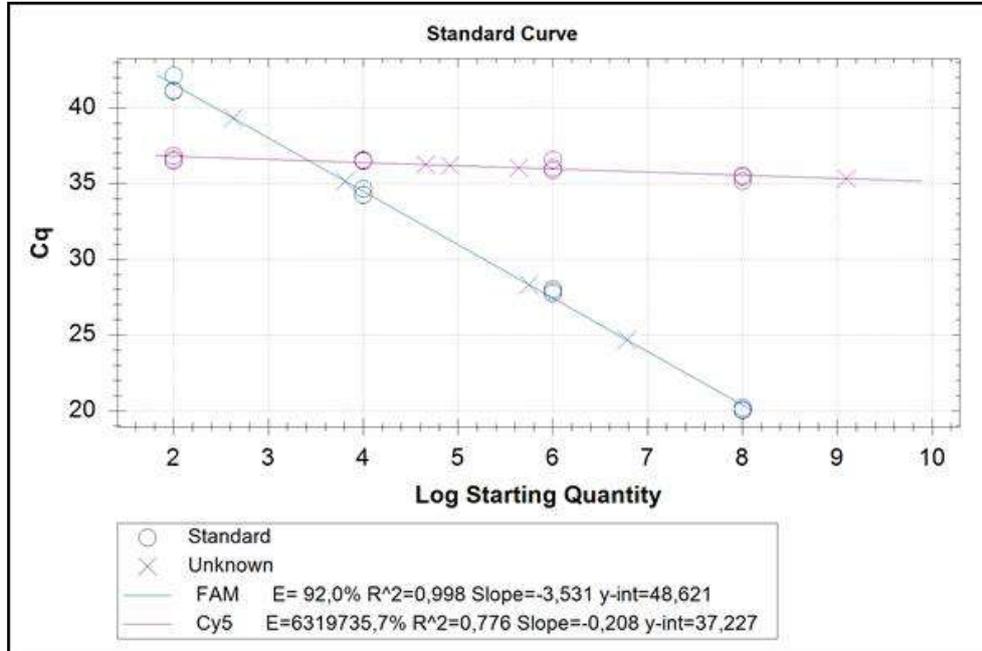
CP copies/microl	IU/microl
10^8	53800
10^6	538
10^4	5,38
10^2	0,0538

PERFORMANCE ANALYSIS

Limit of detection/Analytical sensitivity: 0,05 IU/ μ l

Linearity: 10^2 to 10^8 copies of plasmid/ μ l. 0,05- $0,54 \cdot 10^6$ IU/ μ l

Example of experiment performed on qPCR thermocycler CFX96 (Biorad):



Note: Beyond 10^5 copies/ μ l Zika Virus, the Ct value of CI-ARN can be decreased or highly inhibited.

Mean Efficiency on 3 batches: 100,8 % with coefficient of variation of 2,87%

Mean coefficient of variation on 3 batches: $R^2=0,996 \pm 0,003$

Variability of the signal on the Zkavirus Channel (FAM):

Mean Coefficient of variation	%
Within experiment	2.92
Between experiments (n=36 measurements)	7.55
Between batches (n=36 measurements)	7.2

Specificity: 98,9 %

Specificity has been evaluated on a total of 92 negative samples, of which:

-9 positive samples for Chikungunya (from French National Reference Center), and confirmed positive with the Eurobioplex Chikungunya/Dengue kit (EBX-009)

-10 positive samples for Dengue of the serotypes 1, 2, 3 and 4 (from French National Reference Center) and confirmed positive with the kit Eurobioplex Dengue 1234 (EBX-018).

-73 samples pre-tested negative with the method of Lanciotti using sense primer at position 1086, Reverse primer at position 1162c and a probe at position 1107 (from a Pasteur Institute).

Sensitivity: 96,9 %

Tests were conducted on 96 Zika Virus positive biological samples: 51 sera from blood samples during outbreaks of Zika Virus in Polynesia French (2013) and Central America (2016), 20 urine samples and 25 saliva samples. The tests were performed on CFX96.

	Eurobioplex EBX-012 Zika Virus	
Pre Test	POSITIVE	NEGATIVE
POSITIVE (n=96)	93	3*
NEGATIVE (n=92)	1	91
TOTAL (n=188)		

* 2 of the discordant 3 Ct values are > 37 in the pre tests with a Ct < 38 as a criterion of positivity.

Extraction of serum or urine was validated on NucliSens® EasyMag® (Biomérieux) and NucleoSpin 96 (Macherey Nagel), and extraction of saliva on EasyMag.

Overall concordance is 97,9 %.

SPECIFICITIES OF THE REAL-TIME PCR T-COR 8®-IVD INSTRUMENT

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

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

Note: Mix the sample by pipetting up and down, and always check that there is no bubble, and that the liquid is all located at the bottom of the tube.

Controls

On T-COR 8®-IVD, we recommend that the positive and negative controls be tested when a new kit is being opened.

After this initial control, the cellular control/Human DNA allows to check that the PCR is working properly, without PCR inhibition and that sample extraction work well.

Patients' Tests

With testing of negative and positive controls only when first opening the kit and with thawing 3 times maximum each tube.	24 reactions
Maximum total number of patient tests	22 patients
Maximum total number of patient tests, one patient at a time in each run	12 patients

Fluorophores

Four combinations of fluorophores are available on T-COR 8®-IVD.

For all EBX, such as EBX-012, FAM/HEX/Texas Red/Cy5 combination is used. If some channels are not used, do not consider this channel for results analysis.

Use of Barcodes (available on page 46 to 48)

- 1- Select Menu > New Run
- 2- Select Barcode
- 3- Scan the appropriate Barcode on the right side of the instrument:
 - For the positive control (Barcode EBX-012 Pos Ctrl),
 - For the negative control (Barcode EBX-012 Neg Ctrl),
 - For a patient sample (Barcode Assay: EBX-012)

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

- 4- Lift up the lid of the selected well (well x), check that the blue LED light is on, and select "Yes"
- 5- Place the tube in the corresponding well and select "Next".
- 6- If you wish to name the sample (optional), select "sample x", name it and select "Accept".
- 7- Select "Next"
- 8- To add/test another control or sample, select « Add well » and go back to point 3-.
- 9- Select "Start run".

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

Presentation and Interpretation of results

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

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

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

- « Neg Ctrl Fail »: Not valid
- « Neg Ctrl Valid »: Valid
- « Pos Ctrl Fail »: Non valid
- « Pos Ctrl Valid »: Valid

For patients status:

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

"Not detected": Negative → red box

"Invalid": Invalid result -> retest → orange box

Example of automatic interpretation of results on T-COR 8®-IVD instrument screen and associated report:

- For valid positive and negative controls, « Detected », for an invalid negative control to retest, for two negative samples for the target mentioned as “Not Detected” (samples U12 and S9) and for three positive controls detected for the Leptospira target mentioned as “Detected Leptospira” (samples 18/307/180):

❖ On the instrument screen:

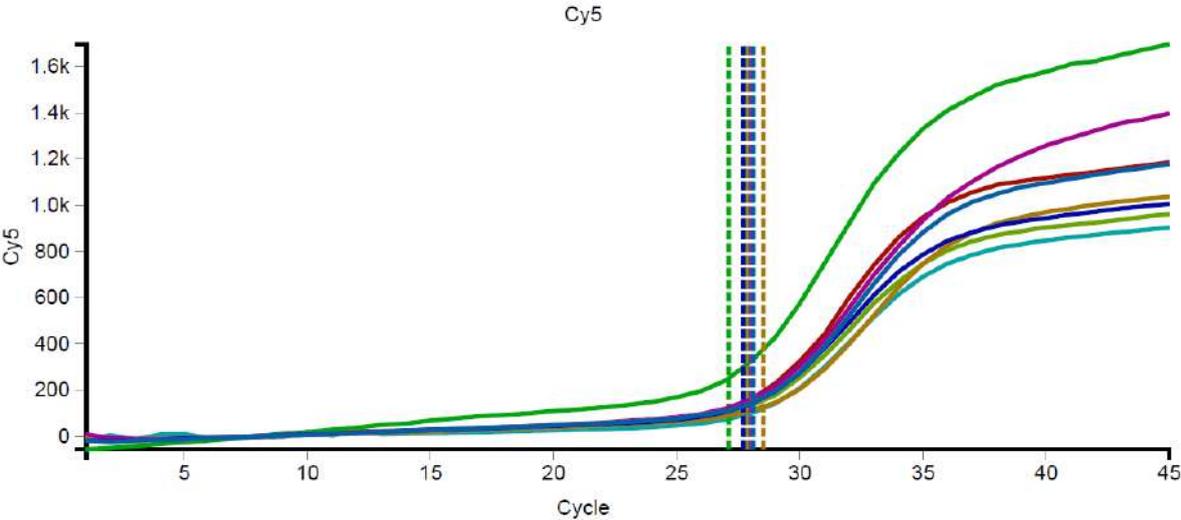
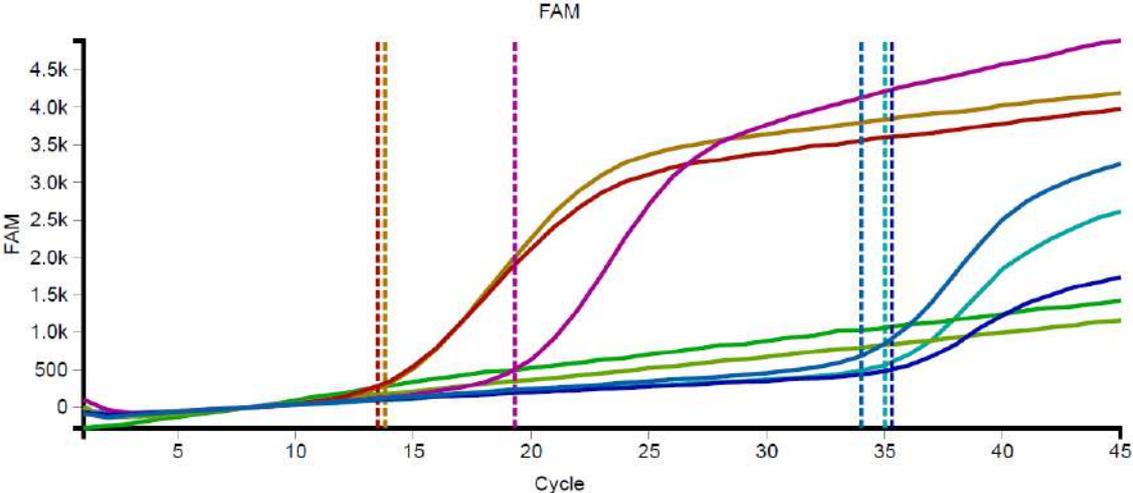


❖ On the report:

Summary

	Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5	Call	Note
	1	967	EBX-012	35.0			27.9	Detected • Zika	
	2	B106	EBX-012				27.1	Not Detected	Zika Neg
	3	NTC	EBX-012 Neg Ctrl				27.8	Detected • Neg Ctrl	
	4	CP	EBX-012 Pos Ctrl	13.8			28.5	Detected • Pos Ctrl	
	5	NTC	EBX-012 Neg Ctrl	13.5			27.7	Invalid	Neg Ctrl Fail
	6	IS	EBX-012	19.3			28.0	Detected • Zika	
	7	488	EBX-012	35.3			27.7	Detected • Zika	
	8	491	EBX-012	34.0			28.1	Detected • Zika	

Example of amplification curves:



Barcodes for EBX-012 for use on T-COR8®-IVD

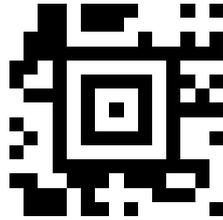


EBX-012 Neg Ctrl

Water = Negative Control (CN-H2O)



Assay: EBX-012



BIBLIOGRAPHY

Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM, Rapid spread of emerging Zika Virus in the Pacific area, Clin Microbiol Infect. 2014 Oct;20(10):O595-6.

Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, Shan Yan A, Cao-Lormeau VM, Broult J. Potential for Zika Virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in french polynesia, november 2013 to february 2014. euro surveill. 2014 apr 10;19(14).

Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, et al. Zika outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. N Engl J Med 2009; 360: 2536–43.

Diallo D, Sall AA, Diagne CT, Faye O, Ba Y, Hanley KA, Buenemann M, Weaver SC, Diallo M. Zika Virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. PLoS One. 2014 Oct 13;9(10).

Faye O, Diallo D, Diallo M, Weidmann M, Sall AA. Quantitative real-time PCR detection of Zika Virus and evaluation with field –caught mosquitoes. Virol J. 2013 Oct 22;10:311.

Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, Recommandations de bonnes pratiques, has-santé.fr

Laboratory testing for Zika Virus infection : <http://www.who.int/csr/resources/publications/zika/laboratory-testing/en/> - WHO reference number: WHO/ZIKV/LAB/16.1

WASTE DISPOSAL

Be in accordance with the law on the elimination of waste of clinical infectious material.

SYMBOLS

	Reference
	Batch number
	Highest storage temperature
	Expiration Date
	Content sufficient for « N » reactions
	Keep protected from light
	Manufacturer
	CE labelled product
	In vitro Diagnostic
	Instructions for use



eurobio
SCIENTIFIC

7, avenue de Scandinavie
91940 Les Ulis Cedex
FRANCE