



EurobioPlex
Dengue 1234
RT-PCR EN TEMPS REEL

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

REF EBX-018



24/48/96 réactions



Version 3.00 du 13/09/2018

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

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	2
Introduction	2
Principe de la détection	3
Description et contenu du kit	4
Conservation	4
Précautions et notes	4
Collecte des échantillons, transport et conservation	6
Procédure	6
I-Extraction d'ARN	6
II-Réalisation de la RT-PCR en temps réel.....	7
II-1/ Protocole de qRT-PCR	8
II-2/ Procédure détaillée	9
Validation de l'expérimentation	10
Analyse des données et interprétation	12
Analyse des performances	13
Bibliographie	14
Elimination des déchets	14
Symboles	15

UTILISATION

L'Eurobioplex Dengue 1234 est un test d'amplification par reverse transcription-réaction en chaîne de la polymérase (RT-PCR) en temps réel, conçu pour la détection qualitative de la présence ou l'absence de virus de la DENGUE et l'identification des sérotypes 1, 2, 3, 4, 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 Dengue 1234.

L'Eurobioplex EBX-018 a été validé sur le type de prélèvement suivant :

- Plasma

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

INTRODUCTION

Le virus de la Dengue est un Arthropod-Borne virus (Arbovirus), transmis par les arthropodes (moustiques, tiques, phlébotomes etc.). Le virus de la Dengue appartient à la famille virale des *Flaviviridae*. Il est transmis par diverses espèces de moustiques du genre *Aedes* tel qu'*aegypti* (principalement en Amérique tropicale et subtropicale, et sud des Etats-Unis) et *albopictus* (principalement en Asie), *furcifer*, *africanus*, *taylori* et *luteophalus* 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.

Il existe 4 sérotypes de la Dengue (DENV 1-4). Le génome de la Dengue est un ARN simple brin. L'enveloppe virale possède une protéine E responsable de la liaison à un récepteur et qui constitue l'antigène principal reconnu par le système immunitaire. La réplication du virus et la transcription se produisent 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. Aucun vaccin ou traitement curatif n'existe actuellement, seul un traitement des symptômes est prodigué. La dengue hémorragique a été reconnue en 1950 aux Philippines et en Thaïlande. Il est estimé qu'aujourd'hui 100 millions de personnes sont infectées chaque année, et ce nombre continue de croître. Dans plusieurs pays d'Asie, les 4 sérotypes coexistent.

La stratégie de diagnostic de la Dengue de la Haute Autorité de Santé (HAS) repose sur la détection par RT-PCR à partir d'échantillons de sang ou sérum entre le début et le 7^{ème} jour et la sérologie des IgM et IgG à partir du 5^{ème} jour. 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.

Le rapport de l'HAS de janvier 2013 indique que le diagnostic de la maladie est d'une grande importance pour la prise en charge clinique, les mesures de surveillance et de contrôle des épidémies. Le diagnostic biologique dépend du moment où le prélèvement est réalisé par rapport à la date de début des signes cliniques.

Pour l'OMS, l'isolement viral est le test de référence. La détection du virus se fait par culture cellulaire. La détection du virus peut être effectuée entre le 1er et le 7ème jour de la maladie.

La détection du génome du virus se fait par RT-PCR. Le test de RT-PCR est un des tests qui permettrait le diagnostic direct dès la phase précoce de la maladie.

Le diagnostic sérologique repose sur la détection des IgM identifiées en moyenne à partir du 5ème jour après l'apparition des signes cliniques. Les IgG sont positives entre le 7ème et le 10ème jour et atteignent un maximum vers J15.

PRINCIPE DE LA DETECTION

L'Eurobioplex Dengue 1234 est un test d'amplification de l'acide ribonucléique (ARN) de la Dengue, 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 double réaction dans deux puits/tubes.

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.

Il s'agit d'un kit composé de deux oligomixes différents permettant chacun de détecter les différents sérotypes de la Dengue indiqués ci-dessous :

Oligomix 1 : Dengue 1 et Dengue 4 (D14) + contrôle d'extraction et d'inhibition de RT-PCR (CI-ARN),

Oligomix 2 : Dengue 2 et Dengue 3 (D23) + contrôle d'extraction et d'inhibition de RT-PCR (CI-ARN),

L'ARN de D1 et celui de D4 sont respectivement détectés à l'aide d'une sonde marquée FAM et HEX. L'ARN de D2 et celui de D3 sont également respectivement détectés à l'aide d'une sonde marquée FAM et HEX. Pour les deux multiplexes, le contrôle d'extraction et d'inhibition de RT-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 RT-PCR en temps réel Eurobioplex Dengue 1234 est prêt à l'emploi pour la détection spécifique de ce virus et le typage de ses quatre sérotypes.

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 de chaque sérotype du virus de la Dengue, et du contrôle d'extraction et d'inhibition de RT-PCR (Tableau 2).

Tableau 1 : Sérotypes de la Dengue détectés par chaque oligomix

Cible	Oligomix 1	Oligomix 2	Fluorophore	Excitation	Emission
Dengue 1	X	-	FAM	495 nm	515 nm
Dengue 4	X	-	HEX	535 nm	555 nm
Dengue 2	-	X	FAM	495 nm	515 nm
Dengue 3	-	X	HEX	535 nm	555 nm
Contrôle ARN (CI-ARN)	X	X	Cy5	647 nm	667 nm

Canaux équivalents sur différents instruments de PCR :

- Canal **FAM** (Systèmes ABI, SmartCycler II, Systèmes Mx, Chromo4/CFX96), Canal 510 (LC 480), Canal Green (RotorGene)
- Canal **HEX** (Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx), Canal VIC (Systèmes ABI), Canal Alexa532 (SmartCycler II), Canal 580 (LC 480), Canal Yellow (RotorGene),
- Canal **Cy5** (Systèmes ABI, Systèmes Mx, Chromo4/CFX96), 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).

Tableau 2 :

Couleur de Bouchon	Contenu du kit	96 réactions	48 réactions	24 réactions	Reconstitution
Rouge	Enzymes	4 x 410 µl	2 x 410 µl	410 µl	Prêt à l'emploi
Transparent	Oligomix 1	4 x 70 µl	2 x 70 µl	70 µl	Prêt à l'emploi
Vert	Oligomix 2	4 x 70 µl	2 x 70 µl	70 µl	Prêt à l'emploi
Bleu	Eau = contrôle négatif (CN-H2O)	1 ml	1 ml	1 ml	Prêt à l'emploi
Jaune	Contrôle Positif Dengue 1 et 4 (CP-D14)	4 x 50 µl	2 x 50 µl	50 µl	Prêt à l'emploi
Orange	Contrôle Positif Dengue 2 et 3 (CP-D23)	4 x 50 µl	2 x 50 µl	50 µl	Prêt à l'emploi
Blanc	Contrôle ARN (CI-ARN)	4 x 300 µl	2 x 300 µl	300 µl	Prêt à l'emploi

Oligomix 1 : contient les amorces et sondes du triplex (D1 + D4 + CI-ARN).

Oligomix 2 : contient les amorces et sondes du triplex (D2 + D3 + CI-ARN).

Matériel nécessaire non fourni:

- ◇ 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)

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-Ingen.
- ◇ Une fois les réactifs décongelés, centrifuger brièvement les tubes avant leur utilisation.
- ◇ L'utilisation de glace ou d'un bloc réfrigérant est conseillée en cas de longs délais du fait par exemple d'un nombre important d'échantillons à traiter ou de fortes températures.
- ◇ Il est recommandé de définir trois zones de travail distinctes : 1) Isolation de l'ARN ; 2) Préparation du mélange réactionnel et 3) Amplification / Détection des produits amplifiés.
- ◇ 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 les 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 en temps réel doivent être utilisées, notamment afin d'éviter tout risque de contamination avec les RNases.
- ◇ Utiliser des embouts à filtre pour micropipettes, DNase-free et RNase-free.
- ◇ Ne pas pipeter avec la bouche. Ne pas manger, ni boire ou fumer dans le laboratoire.
- ◇ 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 l'Organisation Mondiale de la Santé ou par la Haute Autorité de Santé pour la bonne conservation des échantillons
- ◇ Les ARNs extraits doivent être stockés à -80°C.
- ◇ Le transport des échantillons cliniques est soumis à la réglementation locale pour le transport des agents infectieux.

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 plasma, et de se référer aux instructions du fournisseur du kit d'extraction utilisé.

Dans le kit Dengue 1234, 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 (Ref EurobioPlex EBX-003).

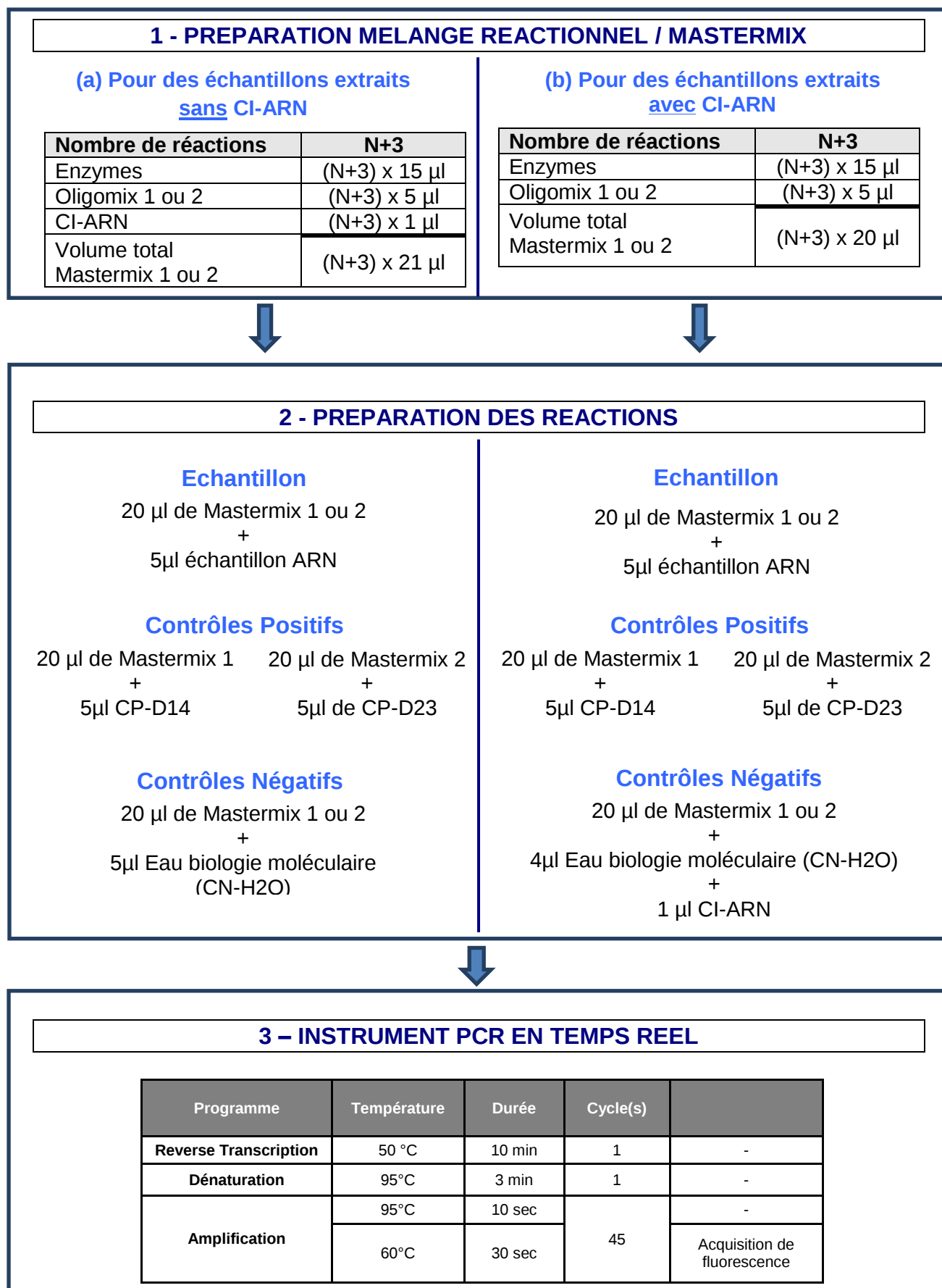
II- Réalisation de la RT-PCR en temps réel

Remarque générale:

Le contrôle positif ainsi que le contrôle d'extraction et d'inhibition de 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 RT-PCR, il est nécessaire de tester les contrôles positifs CP-D14 et CP-D23 selon le multiplex utilisé, ainsi que les contrôles négatifs (eau fournie= CN-H2O + CI-ARN) (voir II-2/ 6) du protocole de RT-PCR en temps réel).

II-1/ Protocole de qRT-PCR

Schéma de la procédure



II-2/ Procédure détaillée

- 1) Homogénéiser le tube d'Enzymes, et vortexer Oligomixes 1 et 2, CP-D14 et CP-D23, et CI-ARN, puis centrifuger.
- 2) Préparer les Mastermixes 1 et 2 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).

Cas (a) : Pour des échantillons extraits SANS CI-ARN

Nombre de Réaction(s)	1	N+3
Enzymes	15 µl	(N+3) x 15 µl
Oligomix 1 ou 2	5 µl	(N+3) x 5 µl
CI-ARN	1 µl	(N+3) x 1 µl
Volume total Mastermix 1 ou 2	21 µl*	(N+3) x 21 µl

Cas (b) : Pour des échantillons extraits AVEC CI-ARN

Nombre de Réaction(s)	1	N+3
Enzymes	15 µl	(N+3) x 15 µl
Oligomix 1 ou 2	5 µl	(N+3) x 5 µl
Volume total Mastermix 1 ou 2	20 µl*	(N+3) x 20 µl

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

- 3) Homogénéiser les Mastermixes préparés en 2) et centrifuger brièvement.
- 4) Distribuer 20 µL de Mastermix* 1 ou 2 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 extrait.
- 6) En parallèle réaliser les contrôles suivants :

- Contrôles positifs :

20 µl de Mastermix 1 + 5 µl de contrôle positif CP-D14

20 µl de Mastermix 2 + 5 µl de contrôle positif CP-D23

- Contrôles négatifs :

Cas (a) : Pour des échantillons extraits SANS CI-ARN

- 20µL de Mastermix 1 + 5µL d'eau fournie (CN-H2O)

- 20µL de Mastermix 2 + 5µL d'eau fournie (CN-H2O)

Cas (b) : Pour des échantillons extraits AVEC CI-ARN

- 20µL de Mastermix 1 + 1µL de CI-ARN + 4µL d'eau fournie (CN-H2O)

- 20µL de Mastermix 2 + 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 PCR temps réel.

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

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 ».

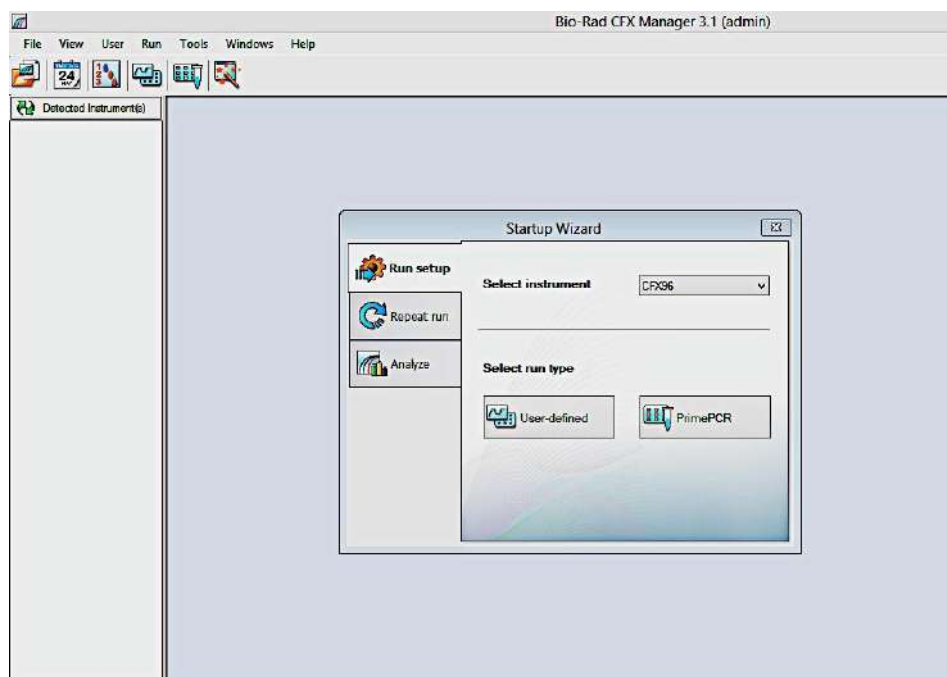
Note 3 : Sur Rotorgene™, calibrer le signal en cliquant sur « GAIN OPTIMISATION ».

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

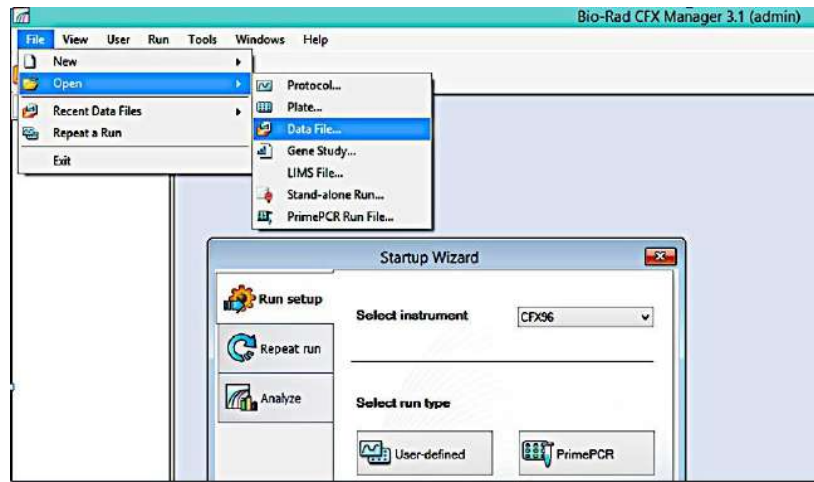
VALIDATION DE L'EXPERIMENTATION

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 résultats pour les contrôles doivent être les suivants (Tableau 4) ; autrement, l'expérimentation ne peut être validée.

Tableau 4 :

Contrôles Positifs		
Canal	CP-D14	CP-D23
FAM	Ct ≤ 30	Ct ≤ 30
HEX	Ct ≤ 30	Ct ≤ 30
Contrôles Négatifs		
Canal	Contrôle Négatif Mastermix 1	Contrôle Négatif Mastermix 2
FAM	Ct ≥ 40 ou non déterminé	Ct ≥ 40 ou non déterminé
HEX	Ct ≥ 40 ou non déterminé	Ct ≥ 40 ou non déterminé
CY5	Ct ≤ 45	Ct ≤ 45

CP-D14: Contrôle positif Dengue sérotypes 1 et 4
CP-D23: Contrôle positif Dengue sérotypes 2 et 3

ANALYSE DES DONNEES ET INTERPRETATION

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 : 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 : 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 cible (FAM ou HEX).

Pour les échantillons cliniques, les résultats suivants sont possibles : exemple pour les sérotypes 1 et 4 dans le tableau ci-dessous. Le même principe s'applique pour Dengue 2 (FAM) et 3 (HEX).

***Seuil de Ct pour la positivité des échantillons :**

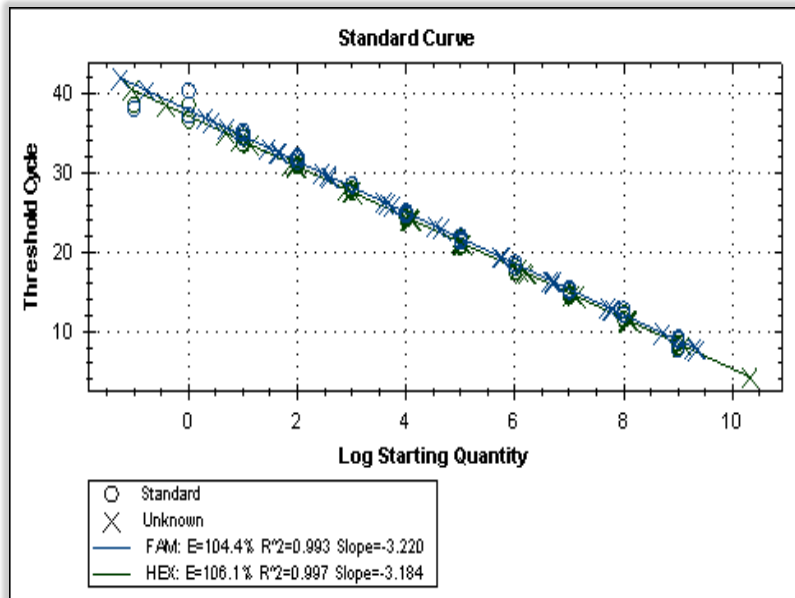
Sur tous les canaux (FAM ou HEX): + Positif => Ct positif < 40

Signal PCR			Présence de virus		Validité du test/commentaire
FAM	HEX	CY5	DENGUE 1	DENGUE 4	
+	-	+	Oui	Non	VALIDE
-	+	+	Non	Oui	VALIDE
+	+	+	Oui	Oui	VALIDE
-	-	+	Non	Non	VALIDE
+	+	-	Oui	Oui	VALIDE Problème d'extraction ou d'inhibition de RT-PCR ou forte compétition qui n'empêche pas la détection du virus
+	-	-	Oui	Non interprétable	Possible inhibition de RT-PCR ou problème d'extraction ou forte compétition → diluer 5 x l'échantillon ; si même résultat ré-extraire l'échantillon
-	+	-	Non interprétable	Oui	Possible inhibition de RT-PCR ou problème d'extraction ou forte compétition → diluer 5 x l'échantillon ; si même résultat ré-extraire l'échantillon
-	-	-	Non interprétable	Non interprétable	Possible inhibition de RT-PCR ou problème d'extraction ou forte compétition → diluer 5 x l'échantillon ; si même résultat ré-extraire l'échantillon

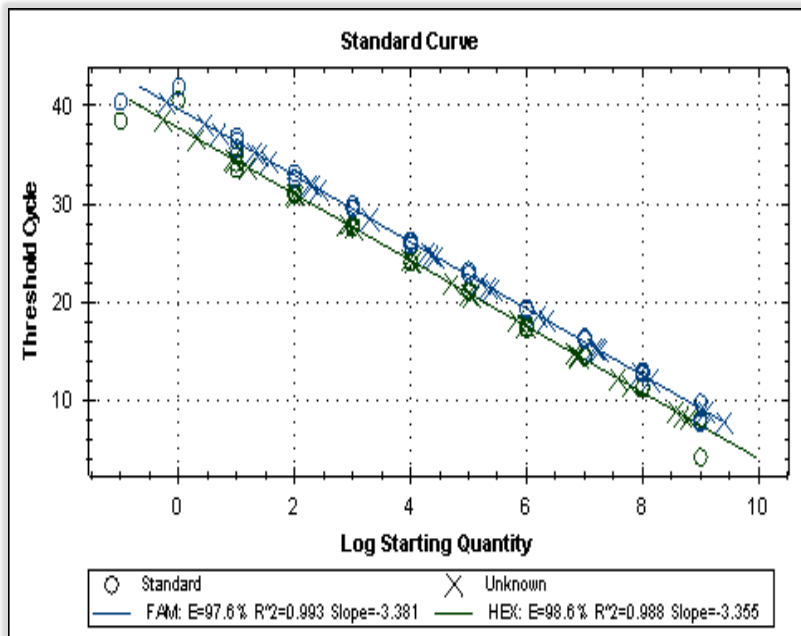
ANALYSE DES PERFORMANCES

**Exemple d'expérience réalisée sur thermocycleur PCR temps réel CFX96
(Biorad) :**

Dengue sérotype 1 (FAM) et sérotype 4 (HEX)



Dengue sérotype 2 (FAM) et sérotype 3 (HEX)



Sensibilité analytique : chaque sérotype de DENGUE: 10 copies/μL de CP
Linéarité de quantification: chaque sérotype de DENGUE: 10 copies/μL à 10⁹ copies/μL de CP

Variabilité du signal

Sérotype	Coefficient de Variation intra expérience (%)	Coefficient de Variation inter expériences (%)
Dengue 1	2,02	3,32
Dengue 2	2,32	1,65
Dengue 3	0,90	5,19
Dengue 4	1,84	1,31

Sensibilité et spécificité

12 échantillons positifs pour le virus de la Dengue, dont le sérotype a été identifié, ont été analysés. Les résultats suivants ont été obtenus :

- Sensibilité : > 99%
- Spécificité : > 99%
- Concordance : > 99%

Aucune cross-réactivité entre sérotypes ou avec le Chikungunya n'a été observée. L'extraction des échantillons a été réalisée sur colonnes Qiagen : QIAamp Ultrasens Virus kit (Ref : 53704).

Les tests ont été réalisés sur CFX96 (Biorad).

BIBLIOGRAPHIE

Diagnostic biologique direct précoce de la dengue par détection génomique du virus avec RT-PCR (transcription inverse et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne) Rapport de la haute autorité de santé, Janvier 2013

Callahan et al. Development and evaluation of serotype and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for Dengue virus, J Clin. Microbiol, 2001; 41:19-4124.

Leparc-Goffart I, Baragatti M, Temmam S, Tuiskunen A, Moureau G, Charrel R, de Lamballerie X. Development and validation of real-time one-step reverse transcription-PCR for the detection and typing of dengue viruses. J Clin Virol. 2009;45(1):61-6.

Cecilia D, Kakade M, Alagarasu K, Patil J, Salunke A, Parashar D, Shah PS. Development of a multiplex real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of dengue and chikungunya viruses. Arch Virol. 2015;160(1):323-7.

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

ELIMINATION DES DECHETS

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

SYMBOLES

	Référence
	Numéro de lot
	Limites 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 ingen

7, avenue de Scandinavie
91953 Les Ulis Cedex
FRANCE

EurobioPlex *Dengue 1234*

REAL-TIME RT-PCR

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

REF **EBX-018**



24/48/96 reactions



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

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	18
Introduction	18
Principle of detection	19
Description and content of the kit	19
Storage	21
Cautions and notes	21
Samples collection, transport and storage	22
Procedure	22
I- RNA extraction	22
II- Real-time RT-PCR procedure	22
II-1/ Protocol of real-time PCR	23
II-2/ Detailed procedure	24
Validation of the experiment	25
Data analysis and Interpretation	27
Performance analysis.....	28
Bibliography	29
Waste disposal	29
Symbols	30

INTENDED USE

The EBX-018 test uses reverse transcription-real time polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification and is designed for the qualitative detection of DENGUE virus and the identification of serotypes 1, 2, 3 and 4 from a RNA nucleic acids extract. This test is indicated to confirm a diagnosis of presumption of infection in patients or to complete a proven or indetermined serological diagnosis. Extracted RNA is the starting material for the Eurobioplex Dengue 1234 kit.

The Eurobioplex Dengue 1234 has been validated on the following specimen

- Plasma

This amplification system has been validated on biological samples (plasma), and on a RNA bacteriophage (CI-ARN).

INTRODUCTION

Dengue virus is an Arthropod-Borne virus (Arboviruses), transmitted by arthropods (mosquitoes, ticks, sandflies, etc.). The Dengue virus belongs to the *Flaviviridae* virus family. They are transmitted by various species of mosquitoes of the *Aedes* genus as *aegypti* (mainly in tropical and subtropical America, and the South of the United States) and *albopictus* (mainly in Asia), *furcifer*, *africanus*, *taylori* and *luteophaeus* with a worldwide distribution, especially in the tropics. The first two species are identified to this day as the main vectors of epidemic, because of their adaptation to human habitat areas. In France, the southern regions are more particularly affected.

There are 4 serotypes of Dengue (DENV 1-4). The genome of Dengue is a RNA single-strand. The viral envelope has an E protein responsible for binding to a receptor and which constitutes the main antigen recognized by the immune system. Virus replication and transcription occurs in the cytoplasm of the host cell. The disease begins with fever and muscle and joint pains. In general case pathological complications don't occur but in 20% of cases infection can be more severe and sometimes take a life-threatening, particularly in the case of secondary infections with hemorrhagic shock. Keep in mind that infection by a strain does not protect the host from infection with another strain. No vaccine or curative treatment currently exists. Only a treatment of symptoms is provided. Dengue hemorrhagic fever has been recognized in 50's in the Philippines and Thailand. It is estimated that 100 million people are infected each year, and this number continues to be continuously growing. In several Asian countries, 4 serotypes coexist.

Diagnosis of Dengue strategy of the Haute Autorité de santé (HAS) is based on the detection by RT-PCR from blood samples or serum between the beginning and the 7th day and IgM and IgG serology from the 5th day. However, there are cross-reactions between the members of the family of *flaviviruses*, which makes difficult the analysis of serological data in the acute phase.

The HAS report of January 2013 indicates that the diagnosis of the disease is of great importance for the clinical management, surveillance and epidemic control measures. Biological diagnosis depends when sampling is performed to the date of onset of clinical signs. For OMS, viral isolation is the reference test. Detection of the virus is by viral isolation by cell culture. Detection of the virus can be made between the 1st and

the 7th day of the illness. The detection of the virus genome is done by RT-PCR that allows direct diagnosis in the early phase of the disease. Serological diagnosis is based on detection of IgM identified on average from the 5th day after the onset of clinical signs. IgG are positive between the 7th and 10th day and reached a maximum to J15.

PRINCIPLE OF DETECTION

The Eurobioplex Dengue 1234 kit is a test using reverse-transcription and real-time amplification of viral RNA of Dengue, as well as an encapsidated control of RNA extraction and RT-PCR inhibition. The test is performed from extracted RNA from a sample using two reactions in two wells/tubes.

The RNA extraction and RT-PCR inhibition control allows to check for variations that may occur during the RNA extraction step of biological samples and real-time PCR amplification. Thus, it ensures that a negative result may not be due to a bad RNA extraction, and/or due to the presence of PCR inhibitors in too large quantities.

This kit contains two different oligomixes which permit to detect the different serotypes listed below:

Oligomix 1: Dengue 1 and Dengue 4 (D14) + control of RNA extraction and RT-PCR inhibition (CI-ARN);

Oligomix 2: Dengue 2 and Dengue 3 (D23) + control of RNA extraction and RT-PCR inhibition (CI-ARN);

RNA of D1 and D4 is respectively detected using FAM and HEX labeled probes. RNA of D2 and D3 is also respectively detected using FAM and HEX labeled probes. For the two multiplexes, RNA extraction and RT-PCR inhibition control is detected using a CY5 labeled probe. All probes 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 RT-PCR Dengue 1234 kit is ready to use for the specific detection of this virus and the typing of its four serotypes.

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

The kit contains reagents and enzymes for the amplification of each serotype of Dengue viral RNA, and the RNA extraction and RT-PCR inhibition control (Table 2).

Table 1: Serotypes of the Dengue virus detected by each oligomix

Target	Oligomix 1	Oligomix 2	Fluorophore	Excitation	Emission
Dengue 1	X	-	FAM	495 nm	515 nm
Dengue 4	X	-	HEX	535 nm	555 nm
Dengue 2	-	X	FAM	495 nm	515 nm
Dengue 3	-	X	HEX	535 nm	555 nm
RNA control (CI-ARN)	X	X	Cy5	647 nm	667 nm

Equivalent channels on different real time PCR cyclers:

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

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

Table 2 :

Cap color	Components of the kit	96 reactions	48 reactions	24 reactions	Reconstitution
Red	Enzymes	4 x 410 µl	2 x 410 µl	410 µl	Ready to use
Transparent	Oligomix 1	4 x 70 µl	2 x 70 µl	70 µl	Ready to use
Green	Oligomix 2	4 x 70 µl	2 x 70 µl	70 µl	Ready to use
Blue	Water = negative control (CN-H2O)	1 ml	1 ml	1 ml	Ready to use
Yellow	Dengue 1 and 4 Positive Control (CP-D14)	4 x 50 µl	2 x 50 µl	50 µl	Ready to use
Orange	Dengue 2 and 3 Positive Control (CP-D23)	4 x 50 µl	2 x 50 µl	50 µl	Ready to use
White	RNA control (CI-ARN)	4 x 300 µl	2 x 300 µl	300 µl	Ready to use

Oligomix 1 : contains the primers and probes of the triplex (D1 + D4 + CI-ARN)

Oligomix 2: contains the primers and probes of the triplex (D2 + D3 + CI-ARN)

Required material not provided:

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

STORAGE

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

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

Many freezing / defrosting 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 if the tubes have been damaged, contact Eurobio-Ingen.
- ◇ Once defrosted, spin down briefly the tubes before use.
- ◇ Use of ice or cooling block is advised in case of long delay due 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.
- ◇ 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 a real-time RT-PCR application should be used, particularly avoiding all sources of RNase contamination.
- ◇ Always use RNase-free DNase-free filtered tips for micropipettes.
- ◇ Do not pipette with mouth and do not eat, drink or smoke in the area.
- ◇ Avoid sprays.

SAMPLES 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 storage 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 :

Recommendations of maximum storage of samples before extraction	
Room temperature	2 h
4°C	16h
-20°C (preferentially -80°C)	Long term storage

- ◇ 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 follow local regulations for this type of infectious agents.

PROCEDURE

I- RNA extraction

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

In the Dengue 1234 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 CI-ARN per extraction. 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 real-time RT-PCR protocol for details.

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

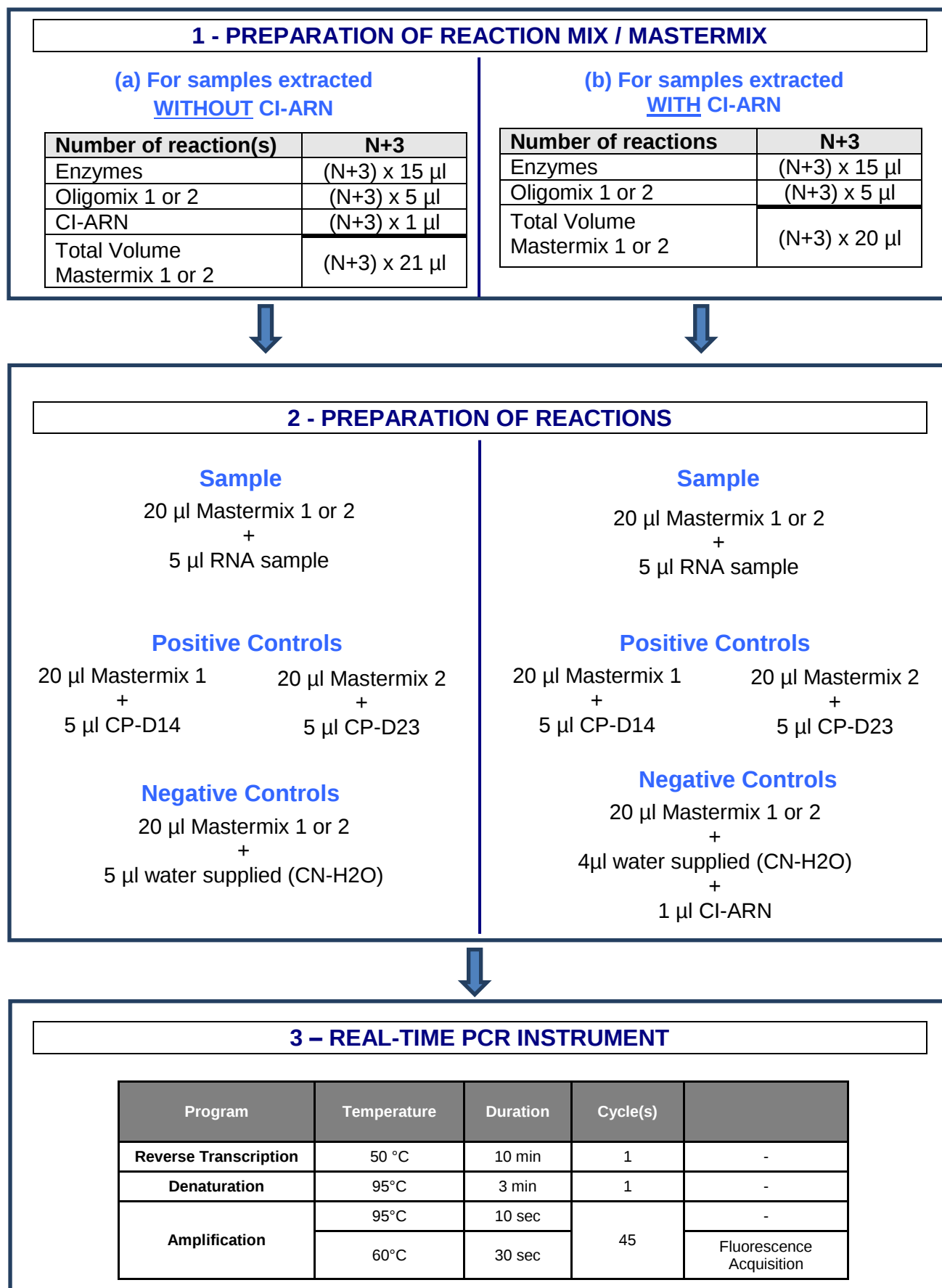
II- Real-time RT-PCR Procedure

General comment:

The positive control and the RNA extraction and RT-PCR inhibition control (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 the CP-D14 and CP-D23 positive controls, as well as the negative controls (water supplied = CN-H₂O + CI-ARN), with the corresponding oligomix. See II-2/6) of real-time RT-PCR protocol for details.

II-1/ Protocol of real-time PCR

Diagram of the procedure



II-2/ Detailed Procedure

- 1) Homogenize the tube of Enzymes, and vortex Oligomixes 1 and 2, CP-D14 and CP-D23, and CI-ARN tubes before starting, and centrifuge.
- 2) Prepare the Mastermixes 1 and 2 as below. N is the number of PCR reactions. Plan to prepare enough reagents for at least N+3 reactions. (Refer to part 1-(a) or 1-(b) of the previous diagram according to the condition).

Case (a): For samples extracted without CI-ARN

Number of reaction(s)	1	N+3
Enzymes	15 µl	(N+3) x 15 µl
Oligomix 1 or 2	5 µl	(N+3) x 5 µl
CI-ARN	1 µl	(N+3) x 1 µl
Total Volume of Mastermix 1 or 2	21 µl*	(N+3) x 21 µl

Case (b): For samples extracted with CI-ARN

Number of reaction(s)	1	N+3
Enzymes	15 µl	(N+3) x 15 µl
Oligomix 1 or 2	5 µl	(N+3) x 5 µl
Total Volume of Mastermix 1 or 2	20 µl*	(N+3) x 20 µl

* The volume difference between condition (a) or (b) has no effect on performance.

- 3) Homogenize the Mastermixes prepared in 2) and centrifuge briefly.
- 4) Distribute 20 µL of the Mastermix* 1 or 2 with a micropipette and filtered 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 following controls:

- Positive controls:

20 µl Mastermix 1 + 5 µl CP-D14

20 µl Mastermix 2 + 5 µl CP-D23

- Negative controls:

Case (a): For samples extracted without CI-ARN

- 20 µl Mastermix 1 + 5 µl water supplied (CN-H2O)
- 20 µl Mastermix 2 + 5 µl water supplied (CN-H2O)

Case (b): For samples extracted with CI-ARN

- 20 µl Mastermix 1 + 1 µl CI-ARN + 4 µl water supplied (CN-H2O)
- 20 µl Mastermix 2 + 1 µl CI-ARN + 4 µl 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 real-time PCR instrument as follows.

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

Note 1: On LightCycler ® 480 systems (Roche), two optical systems are available: only "System II" is compliant with use of the kit. Apply color compensation for the following channels: FAM-HEX/VIC-Cy5 (465-510,533-580,618-660).

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

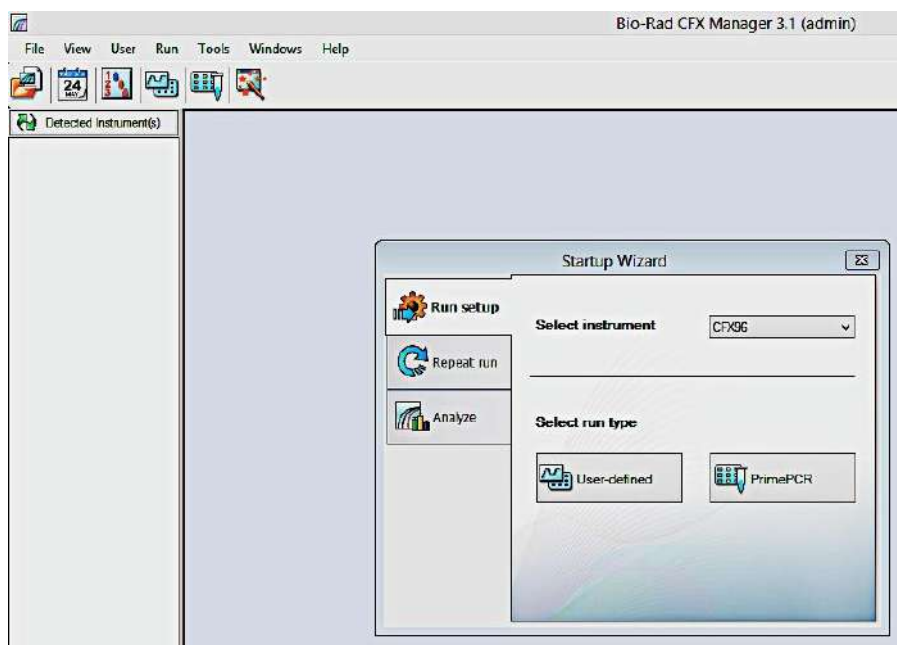
Note 3: On Rotorgene ™, please calibrate the signal by clicking on "GAIN optimization".

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)

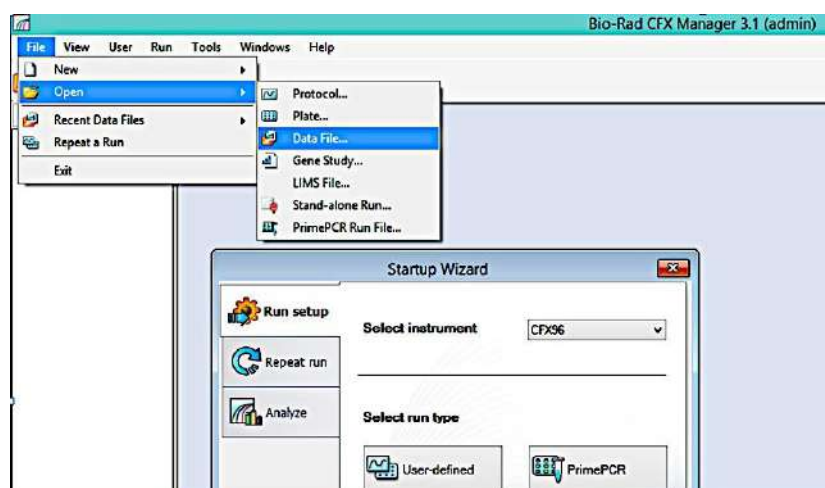
VALIDATION OF THE EXPERIMENT

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 icon. The screen below appears.

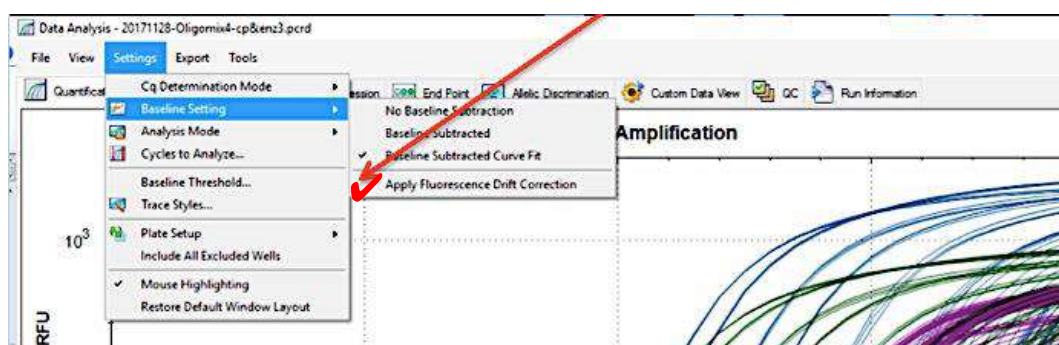


- Click on File and select Open, then Data File



- 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 4). Otherwise, the experiment is not valid.

Table 4:

Positive Controls		
Channel	CP-D14	CP-D23
FAM	Ct ≤ 30	Ct ≤ 30
HEX	Ct ≤ 30	Ct ≤ 30
Negative Controls		
Channel	Negative Control Mastermix 1	Negative Control Mastermix 2
FAM	Ct ≥ 40 or undetermined	Ct ≥ 40 or undetermined
HEX	Ct ≥ 40 or undetermined	Ct ≥ 40 or undetermined
CY5	Ct ≤ 45	Ct ≤ 45

CP-D14: Positive control for Dengue, serotypes 1 and 4

CP-D23: Positive control for Dengue, serotypes 2 and 3

DATA ANALYSIS AND INTERPRETATION

RNA extraction and RT-PCR inhibition control in samples:

Two results can be obtained:

1/ the RNA extraction and RT-PCR inhibition control (CI-ARN; channel Cy5) test is positive: RNA has been properly extracted, and there is no inhibitor of RT-PCR. The result can be validated.

2/ the RNA extraction and RT-PCR inhibition control (CI-ARN; channel Cy5) test is negative: either RNA was not extracted, the reverse transcription did not work well, or the presence of PCR inhibitors inhibits the PCR reaction. It is then recommended to repeat the extraction or dilute the sample, unless a specific signal appears in the targeted channel (FAM, HEX).

For clinical samples, the following results are possible: example for serotypes 1 and 4 in the table below. The same principle applies to serotypes 2 (FAM) and 3 (HEX).

***Ct cut off for positivity of samples:**

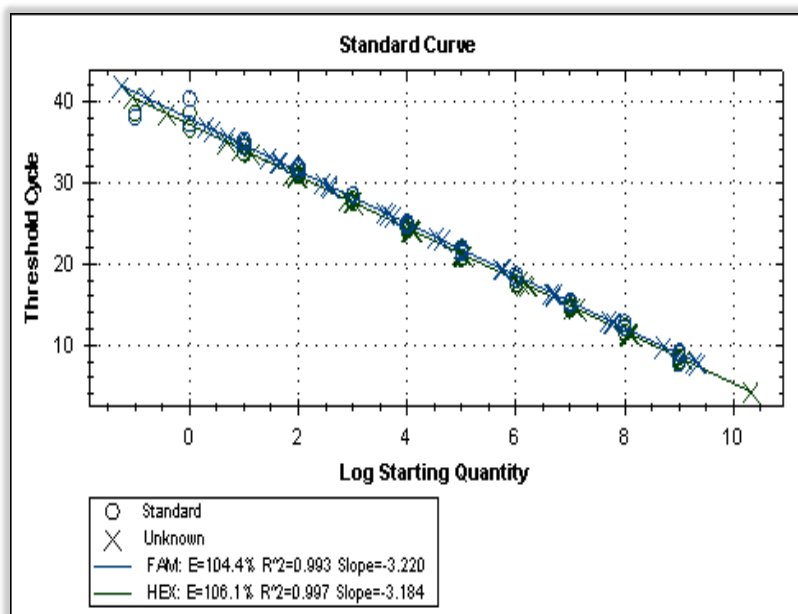
On all channels (FAM or HEX) : + Positive => Positive Ct and < 40

PCR Signal			Presence of virus		Test validity/comment
FAM	HEX	CY5	DENGUE 1	DENGUE 4	
+	-	+	Yes	No	VALID
-	+	+	No	Yes	VALID
+	+	+	Yes	Yes	VALID
-	-	+	No	No	VALID
+	+	-	Yes	Yes	VALID Inhibition of RT-PCR or problem with extraction or strong competition that does not prevent the detection of virus.
+	-	-	Yes	No possible interpretation	Inhibition of RT-PCR or problem with extraction → dilute 5 x the sample; otherwise extract once again the sample
-	+	-	No possible interpretation	Yes	Inhibition of RT-PCR or problem with extraction → dilute 5 x the sample; otherwise extract once again the sample
-	-	-	No possible interpretation	No possible interpretation	Inhibition of RT-PCR or problem with extraction → dilute 5 x the sample; otherwise extract once again the sample

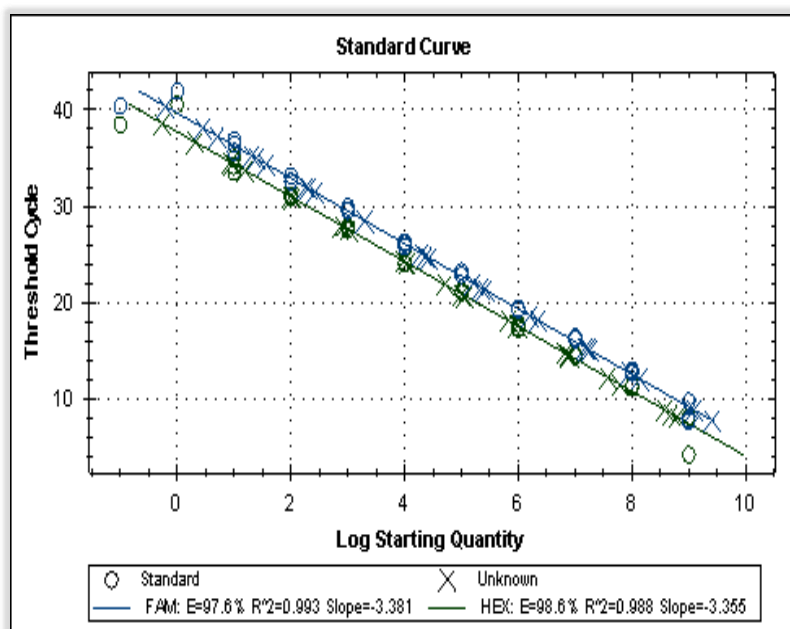
PERFORMANCE ANALYSIS

Example of experiment performed on real-time PCR thermocycleur CFX96 (Biorad):

Dengue serotype 1 (FAM) and serotype 4 (HEX)



Dengue serotype 2 (FAM) and serotype 3 (HEX)



Analytical sensitivity: each DENGUE serotype: 10 copies/ μ l CP

Linearity of quantification: each DENGUE serotype: 10 to 10⁹ copies/ μ l CP

Variability of the signal

Serotype	Coefficient of Variation Within experiment (%)	Coefficient of Variation Between experiments (%)
Dengue 1	2.02	3.32
Dengue 2	2.32	1.65
Dengue 3	0.90	5.19
Dengue 4	1.84	1.31

Sensitivity and Specificity

12 Dengue samples, characterized for their serotype, were analyzed and the following results were obtained.

- Sensitivity: > 99%
- Specificity: > 99%
- Concordance: > 99%

No cross-reactivity between serotype or with Chikungunya virus has been detected.

The extraction of the samples was performed on Qiagen columns: QIAamp Ultrasens Virus kit (Ref: 53704).

The tests were performed on CFX96 (Biorad).

BIBLIOGRAPHY

Diagnostic biologique direct précoce de la Dengue par détection génomique du virus avec RT-PCR (transcription inverse et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne) Rapport haute autorité de santé, Janvier 2013

Callahan et al. Development and evaluation of serotype and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for Dengue virus, J Clin. Microbiol, 2001;41:19-4124.

Leparc-Goffart I, Baragatti M, Temmam S, Tuiskunen A, Moureau G, Charrel R, de Lamballerie X. Development and validation of real-time one-step reverse transcription-PCR for the detection and typing of dengue viruses. J Clin Virol. 2009;45(1):61-6.

Cecilia D, Kakade M, Alagarasu K, Patil J, Salunke A, Parashar D, Shah PS. Development of a multiplex real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of dengue and chikungunya viruses. Arch Virol. 2015;160(1):323-7.

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

WASTE DISPOSAL

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

SYMBOLS

	Reference
	Batch number
	Limits of storage temperature
	Expiration Date
	Content sufficient for « N » reactions
	Keep protected from light
	Manufacturer
	CE labeled product
	In Vitro Diagnostic
	Instructions for use



eurobio ingen

7, avenue de Scandinavie
91953 Les Ulis Cedex
FRANCE