

Instructions For Use EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire



eurobio
SCIENTIFIC

EurobioPlex *Chikungunya/Dengue/Leptospire* **REAL TIME RT-PCR**

For real time **qualitative** RT-PCR

EBX-050-25 (for 25 reactions)

EBX-050-50 (for 50 reactions)



EBX-050-100 (for 100 reactions)

EBX-050-200 (for 200 reactions)

EBX-050-600 (for 600 reactions)



25/50/100/200/600 reactions



EBX-050 V 1.02 – 16/12/2024

Validated by:

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) based on analysis by CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)



Instructions For Use

Available on request at info@eurobio-scientific.com

As soon as it is operational, this *Résumé des Caractéristiques de Sécurité and Performance* (RCSP – Summary of Safety and Performance Characteristics) will be made available by the notified certifying organisation on EUDAMED. This Summary is also available on request.

Instructions For Use EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

Table of contents

ENGLISH.....	1
FRANCAIS.....	24
ESPANOL.....	48
ITALIANO	68
1. General Information.....	3
2. Test procedure	5
3. Symbols	6
4. Principles of Operation.....	7
5. Kit Components	8
6. Conservation and storage	8
7. Required materials not provided	8
8. Real time PCR instrument	9
9. Important preliminary instructions and precautions	9
10. Protocol	10
10.1 Sample collection	10
10.2 Nucleic acid extraction	11
10.3 Performance of real time RT-PCR procedures	11
10.4 Detailed protocol.....	13
11. Experimental validation.....	14
12. Data analysis and interpretation.....	16
13. Analysis of performance.....	17
14. Quantity control	22
15. Bibliography.....	22
16. Elimination of waste	22
17. Declaration of incident.....	22
18. Technical assistance	23

Instructions For Use EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

1. General Information

Chikungunya and Dengue Fever viruses are Arthropod-Borne viruses (aka Arbovirus), that is, they are transmitted by arthropods such as mosquitoes, ticks, sandflies, etc. The Dengue virus belongs to the *Flaviviridae* family and the Chikungunya virus to the *Togaviridae* family. These viruses are transmitted by various species of mosquito of the *Aedes* genus, among others *aegypti* (principally in tropical and subtropical America and in the south of the United States) and *albopictus* (principally found in Asia), *furcifer*, *africanus*, *taylori* and *luteophaeus* which are globally prevalent, but especially so in the tropics. To date, the two first-mentioned species have been identified as the major vectors of epidemics, this being due to their adaptability to zones of human settlement. France's southern regions are more particularly affected.

There are 4 serotypes for Dengue Fever (DENV 1-4), whose genome is a single strand RNA. Virus replication and transcription take place in the cytoplasm of the host cell. Initial clinical signs are fever associated with muscular and joint pain. In the majority of cases, there are no complications, but in 20% of cases Dengue symptoms may be severe to the point of life-threatening, particularly when secondary infections occur involving haemorrhagic shock, since infection by one strain does not protect the host from infection by another strain.

The Chikungunya (CHIKV) virus is a small, spherical, enveloped virus whose genome is a single strand RNA of approximate size 12 Kbp. The viraemic phase of Chikungunya infection lasts from 3 to 10 days. Major clinical signs are the rapid onset of high fever (> 40 °C) lasting from 24 to 48 hours, associated with severe often multiple joint pain and myalgia, particularly affecting the extremities, such as wrists, ankles or fingers, where joint swelling may be pronounced, associated with maculopapular or erythematous skin rash and subacute oedema. CHIKV infections may evolve into a chronic condition. The symptoms are similar to those of malaria or dengue, and not infrequently two infections may be present simultaneously. In a proportion varying from 10% to 70 % of cases, clinical relapse may be observable several months after the acute phase. There is no specific treatment for chikungunya.

Leptospire bacteria are often categorised as belonging to the *Leptospira interrogans* species and are the cause of the condition known as leptospirosis, which is considered to be an ubiquitous zoonosis. The number of reported cases has significantly risen in recent times. As a zoonosis, Leptospirosis affects animals such as rat or pig living in proximity to and infecting humans. Leptospire is a pathogen for humans.

Leptospirosis is prevalent in a number of parts of the world, such as the islands of La Réunion and Wallis and Futuna, as well as in the Caribbean, in French Guyana, in the tropics, and in South-East Asia, Cambodia, Vietnam and Laos. The leptospire has even been detected in the Poitou Charente region of France, and elsewhere in the country's south and south-west, in humid environments close to pig raising farms.

Leptospire is a spiral bacteria whose motility depends on their endoflagellae. The extremely wide range of non-specific symptoms of leptospirosis and the diversity of the organs affected make clinical diagnosis difficult, since the condition can be mistaken for a severe bout of influenza. Symptoms may

Instructions For Use EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

begin with diffuse or localised aches and pains, which, if not diagnosed in good time, may lead to impaired speech and mental faculties. In some cases, symptoms include jaundice and/or nephritis. Recovery is possible thanks to kidney dialysis and treatment by antibiotics, provided the condition remains moderately or less severe, in 5 or 6 weeks (although bacteria may still be found in urine several weeks after patients have become asymptomatic). Leptospirosis may develop into a severe form causing violent and even life-threatening haemorrhaging or severe renal dysfunction. There are numerous serovars (for example *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira canicola*, *Leptospira pomona*) which present no homogenous antigenic signatures. This makes it difficult to design effective vaccines.

The World Health Organisation recommends that the biological confirmation of leptospirosis takes place by means, either of isolation of the bacteria involved, or of the identification of nucleic acids in biological samples, or again, in the clinical context, by reliance on positive serological indicators taking into consideration epidemiological factors. The usefulness of bacteriological culture is extremely limited, given the long bacterial growth time. Early leptospirosis detection is possible in real time by PCR, generally using patient blood plasma or serum. Optimum time for taking blood samples is after 8 days of illness. There is no interest in real time PCR blood testing after 10 days from the onset of symptoms (end of bacterial period). The Haute Autorité de Santé (HAS – High Authority for Healthcare in France) has indicated that simple (i.e., NON-real time) PCR testing is of no interest for the specific biological diagnosis of leptospirosis. The HAS places the greatest value on real time PCR testing for the early specific biological diagnosis of leptospirosis. Testing requires blood samples taken within 8 days of onset of fever, preferably before the administration of antibiotics. But because of the normally low levels of leptospires in the blood, negative real time PCR results need to be confirmed by further serological investigation.

Instructions For Use EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

2. Test procedure

EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire testing relies on inverse transcription amplification followed by real time polymerase chain reaction (RT-PCR), designed for the qualitative detection of the presence or absence of the Chikungunya and Dengue viruses and of the Leptospire in an extract of nucleic acids.

The EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire test procedure is indicated for the diagnosis of suspected infection in humans, or alternatively, as an adjunct to serological diagnosis both determined and indeterminate. Extract of nucleic acids is the basic material required for the EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire procedure. Nucleic acids are extracted from patient blood plasma, serum or urine.

This amplification system has been validated on samples of plasma, serum and urine, and by means of endogenous internal controls.

The EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire diagnostic procedure relies on *in vitro* analysis and must be undertaken by qualified analytical medical laboratory personnel. The test package must not be recycled for further use. It is not intended for chikungunya / dengue/ leptospire blood or organ bank screening.

Instructions For Use EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

3. Symbols



Reference catalogue



Batch code



Maximum Temperature



Use-by date



Content for n number of tests



Manufacturer



Date of Manufacture



CE-marked product



Dispositif Médical de Diagnostic *in vitro*



Consult User Instructions



Beware!



Do not use if packaging is damaged



Store away from sunlight

Instructions For Use EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

4. Principles of Operation

The EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire kit provides a test procedure based on the amplification of the ribonucleic acid (RNA) of the Chikungunya and Dengue viruses and on the amplification of the deoxyribonucleic acid (DNA) coding for ribosomal RNA and ribosomal RNA of the Leptospire, including the endogenous internal control of RT-PCR extraction and inhibition, using RT-PCR enabled real time amplification. Testing takes place of the nucleic acids extracted from a given sample by means of a single reaction in a single well. The kit's primers and probes have the capability of detecting (screening) the RNA of the 4 serotypes of Dengue without typing.

The RT-PCR endogenous internal control process ensures that a negative result cannot be caused by poor extraction and/or by excess of PCR inhibitors.

Chikungunya virus RNA is detected by an FAM marked probe. Dengue virus is detected by a HEX marked probe. The ribosomal RNA and DNA coding for the ribosomal RNA of the leptospire are detected by a Texas Red marked probe. The endogenous internal control of RT-PCR extraction and inhibition is detected by a CY5 marked probe. All probes emit specific fluorescent spectra.

The apparatus is not automated. Users may under their responsibility use other devices than those validated, in which case performance is not guaranteed.

Table 1: Target detection by fluorophore

Target	Fluorophore	Excitation	Emission
CHIKUNGUNYA	FAM	495 nm	515 nm
DENGUE	HEX	535 nm	555 nm
LEPTOSPIRE	TEXAS RED	585 nm	605 nm
Endogenous internal control	Cy5	650 nm	670 nm

Equivalent channels on different PCR instruments:

- FAM channel (ABI Systems, SmartCycler II, Mx Systems, Chromo4/CFX96, T-COR 8®-IVD), Channel 510 (LC 480), Green Channel (RotorGene)
- HEX channel (Chromo 4/CFX96, Mx Systems, T-COR 8®-IVD), Canal VIC (ABI Systems), Alexa532 Channel (SmartCycler II), 580 Channel (LC 480), Yellow Channel (RotorGene)
- Texas Red Channel (ABI Systems, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96™, Mx Systems, T-COR 8™-IVD), LC Red 610 (LC480®), Orange Channel (RotorGene)
- Canal Cy5 (ABI Systems, Mx Systems, Chromo4/CFX96, T-COR 8®-IVD), Alexa647 Channel (SmartCycler II), 660 Channel (LC 480), Red Channel (RotorGene)

Note : On LC480 instrument II : Apply colour compensation for wavelengths FAM-HEX/VIC-Cy5 (465-510,533-580,618-660).

Instructions For Use EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

5. Kit Components

The Chikungunya/Dengue/Leptospire real time RT-PCR test package is delivered ready for use as a specific detector of the afore-named pathogens.

Fluorescence is emitted in the course of the PCR process and individually measured by an optical system. Amplified fragment detection is by a fluorimeter using the channels shown in Table 1.

The kit contains the reagents and enzymes required for the amplification of the viral RNA of Chikungunya and Dengue and for the amplification of the DNA coding for ribosomal RNA and ribosomal RNA of the Leptospire; as well as the reagents and enzymes required for the endogenous control of RT-PCR extraction and inhibition (Table 2).

Table 2 : Kit Components

Colour of Cap	Kit Content	EBX-050 (25 tests)	EBX-050 (50 tests)	EBX-050 (100 tests)	EBX-050 (200 tests)	EBX-050 (600 tests)	Reconstitution
Red	Enzymes	225 µl	450 µl	900 µl	2x900 µl	4x1350 µl	Ready for use
Transparent	Oligomix	80 µL	160 µL	320 µL	2X320 µL	3x640 µL	Ready for use
Blue	Water = Negative Control (NC-H ₂ O)	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	Ready for use
Yellow	Positive Control (PC) Chikungunya/ Dengue/ Leptospire/ endogenous CI	75 µl	150 µl	300 µl	2 x 300 µl	3x300 µL	Ready for use

6. Conservation and storage

All reagents must be stored at temperatures in the range of -15°C to -22°C.

All reagents may be used prior to the use-by date shown on label.



Take care to avoid more than five repeated cycles of freezing/thawing (>5x) as this may impair analytical sensitivity.

7. Required materials not provided

- ◇ Biological extractor hood
- ◇ Real time PCR machine
- ◇ Centrifuge for microtubes

Instructions For Use EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

- ◇ Vortex
- ◇ Plates / tubes for PCR reactions in real time
- ◇ Micropipettes
- ◇ DNase-free tips and RNase-free filter tips for micropipettes
- ◇ Sterile microtubes
- ◇ Talc-free gloves

8. Real time PCR instrument

The EurobioPlex kit has been developed and validated for use with the Bio-Rad CFX96™ Real Time PCR detection system with analysis by Bio-Rad CFX Manager version 3.1 applying drift correction, between 15 and 45 cycles (cf. §11.).

9. Important preliminary instructions and precautions



Carefully read instructions before starting protocol

- ◇ Kit is delivered in a dry ice package, and its constituents in frozen condition. If any part arrives unfrozen, or if tubes have been damaged in transport, the technician must not use the kit.
- ◇ This experimental procedure must be carried out by medical biology analytical laboratory technicians.
- ◇ Ensure that instruments have been installed, calibrated and properly maintained in accordance with manufacturer's recommendations.
- ◇ Clinical samples must be considered as potentially infectious materials and must be prepared under a laminar flow extractor hood.
- ◇ Experimentation must be performed in accordance with good laboratory practice.
- ◇ Do not use this kit after its use-by date.
- ◇ Avoid cycles of reagent thawing and refreezing, as this may impair test sensitivity.
- ◇ Avoid prolonged exposure of reagents to light, and limit exposure to the time required for preparation of the PCR plate, failing which performance cannot be guaranteed.
- ◇ Once the reagents are unfrozen, briefly centrifuge tubes before use.
- ◇ For very heavy viral loads ($Ct < 15$), bell curve shaped amplification may be observed. This is a positive signal. From 15 cycles onward, a classic exponential amplification curve is presented.
- ◇ It is recommended to separate out three distinct zones of work: 1) Isolation of nucleic acids, 2) Preparation of reaction mixture, and 3) Amplification / Detection of amplified products.
- ◇ In each zone of work, wear separate sets of lab coats and talc-free gloves.
- ◇ Pipettes, reagents and other work materials must not circulate from one zone to another.
- ◇ Special attention is required to protect the purity of reagents and reaction mixtures.
- ◇ Appropriate methods of nucleic acid preparation / extraction must be adopted to ensure high quality RNA/DNA production and RT-PCR operation, and in particular to avoid any risk of contamination of RNases/DNases.

Instructions For Use EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

- ◇ Use filter tips for micropipettes, RNase-free and DNase-free.
- ◇ No use of mouth for pipetting. No food, drink or smoking to be allowed in the laboratory.
- ◇ Avoid aerosols.
- ◇ The kit is not designed for once only use. When reused, recommendations must be followed, notably in regard to authorized thawing/refreezing cycles and precautions to prevent contamination of reagents.
- ◇ Kit constituents must not be used separately, i.e. with other reagents, or with reagents from other batches.
- ◇ The package is not automated. Users make use of other procedures than those validated under their sole responsibility, in which case performance is not guaranteed.
- ◇ Reagent temperatures after thawing must be carefully managed (+COC/+COC or room temperature) in order not to adversely affect performance.

10. Protocol

10.1 Sample collection

- ◇ Use sterile tubes for sample collection. When nucleic acid is extracted from serum, collect samples in dry tubes. When extracting from plasma, collect samples in EDTA tubes.
- ◇ Lipemic plasma may induce PCR inhibition and prevent pathogen detection

Use of heparin as anti-coagulant is prohibited.



Users must properly manage and control their own conditions of sample collection, transport, storage and extraction, and must use suitable means to ensure high quality nucleic acid extraction.

- ◇ It is recommended that samples be extracted immediately, or if kept, then in accordance with the recommendations for the storage of samples prior to extraction (Table 3).
- ◇ The bibliographical recommendations of section “15. Bibliography” provide indicative data on the stability of samples and RNAs.

Table 3: Recommendations for the storage of blood prior to the preparation of plasma or serum, and for the storage of plasma, serum and urine before extraction

Recommendations for whole blood storage (before plasma and serum preparation)	
<24h	
Recommendations for maximum sample storage times of urine, plasma or serum before extraction	
Room temperature	2h
+2°C/+8°C	5 days
<-70°C (preferable to -20°C)	Long term storage (>5 days and no more than 2 months at -COC)

Instructions For Use EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

Attention	
	◇ Users may take into consideration the sample storage recommendations of the World Health Organisation or of the Haute Autorité de Santé (High Authority for Healthcare in France) ◇ Nucleic acids after extraction must be stored at <-70°C to ensure their stability. If RNAs are stored at <-70°C for more than a year, or if they are stored at -20°C, the Ct readings obtained may increase. Re-extraction is advised if a biological sample has been stored for more than one year. It is advisable to limit to 3 the number of times RNAs are unfrozen. ◇ The transportation of clinical samples is governed by local regulations on the transportation of infectious materials.

10.2 Nucleic acid extraction

Users of the real time RT-PCR technology are responsible for ensuring its compatibility with the nucleic acid extraction system used. In regard to this package, we recommend methods of nucleic acid extraction from samples of plasma, serum or urine, and adherence to the instructions of the supplier of the extraction kit used.

Performance levels, including the interfering pathogens described in §13 of this document, were obtained using the following extraction techniques: Qiagen columns (QIAamp Ultrasens Virus kit Ref : 53704), or EZ1 extractor (Qiagen) or Maelstrom TANbeads (Taiwan Advanced Nanotech).

10.3 Performance of real time RT-PCR procedures

General comment:

Positive controls and the endogenous internal controls of RT-PCR extraction and inhibition high levels of matrix concentration. Great care must be taken when handling to avoid contamination. PCR operational controls involve testing Positive Control (PC) and Negative Control (water supplied = NC-H₂O) (see II-2/6) of RT-PCR protocol in real time.

Instructions For Use EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

Outline of procedure:

1 - REACTION MIX / MASTERMIX PREPARATION

Number of reactions	N+3
Enzymes	(N+3) x 7.5 µl
Oligomix	(N+3) x 2.5 µl
Total volume Mastermix	(N+3) x 10µl



2 - PREPARATION OF REACTIONS

Sample

10 µl Mastermix
+
5µl extracted sample

Positive control (PC)

10 µl de Mastermix
+
5µl CP

Negative control (NC-H2O)

10 µl de Mastermix
+
5µl Biological molecular water (NC-H2O)



3 – REAL TIME PCR INSTRUMENT

Programme	Temperature	Duration	Cycle(s)	
Reverse Transcription	45 °C	5 min	1	-
Denaturation	98°C	20 sec	1	-
Amplification	98°C	3 sec	45	-
	58°C	45 sec		Acquisition of fluorescence

See 11. Experimental validation for detailed Settings with drift correction and analysis between 15 and 45 cycles.

Instructions For Use EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

10.4 Detailed protocol

- 1) Homogenise the Enzyme tube and vortex the Oligomix before centrifuging
- 2) Prepare Mastermix as shown below, N being the number of reaction(s), prepare Mastermix quantity for minimum of N+3 reactions.

Number of reactions	N+3
Enzymes	(N+3) x 7.5 µl
Oligomix	(N+3) x 2.5 µl
Total volume Mastermix	(N+3) x 10µl

- 3) Homogenise Mastermix as prepared in 2) above and briefly centrifuge.
 - 4) Using micropipette and filter tips distribute 10 µL Mastermix into each microplate to set up real time PCR.
 - 5) Add 5 µL extracted sample.
 - 6) Perform following controls in parallel:
 - Positive Control: 10 µl Mastermix + 5 µl PC positive control
 - Negative Control: 10µl Mastermix + 5µl water supplied (NC-H2O)
 - 7) Prevent contamination by immediately sealing off under adhesive film or isolate under transparent stoppers.
 - 8) Briefly collect reaction mixture at bottom of tubes or microplate wells.
 - 9) Initiate and follow programme shown below on the real time PCR instrument.
- Approximate duration: 1h10

Programme	Temperature	Duration	Cycle(s)	
Reverse Transcription	45 °C	5 min	1	-
Denaturation	98°C	20 sec	1	-
Amplification	98°C	3 sec	45	-
	58°C	45 sec		Acquisition of fluorescence

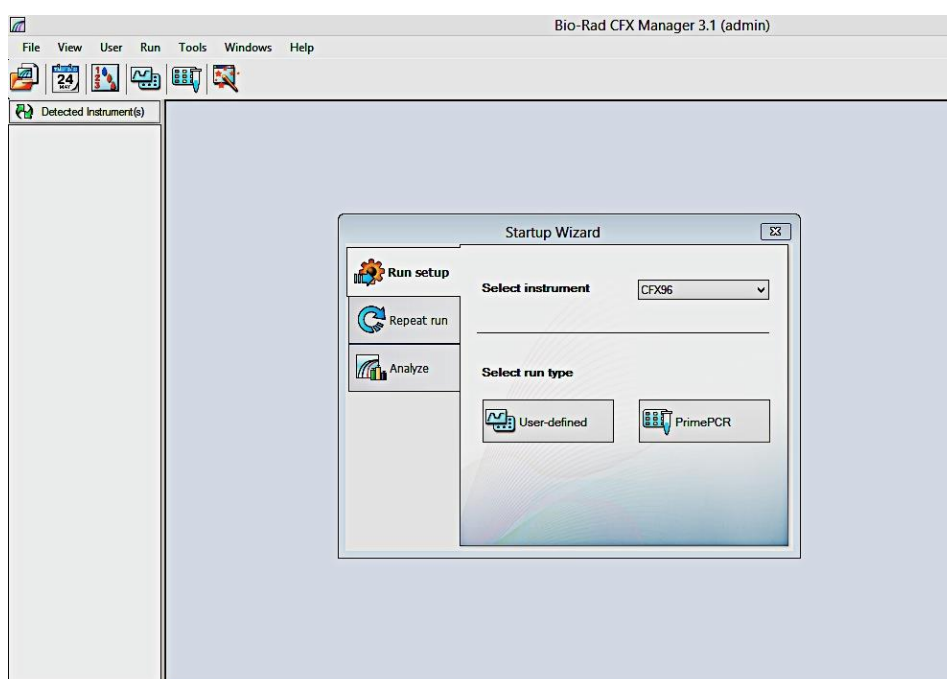
Note: On Bio-Rad CFX96, initiate run using release 1.6 or later, followed by analysis on release 3.1 (see **11 Experimental validation for detailed Settings with drift correction and analysis between 15 and 45 cycles**).

Instructions For Use EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

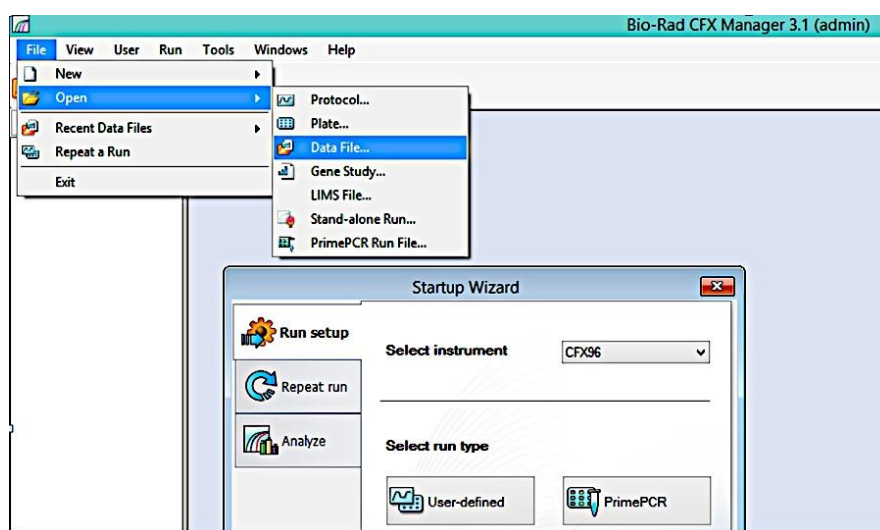
11. Experimental validation

Analysis of post-acquisition data on Bio-Rad PCR CFX96 requires running release 3.1 of Bio-Rad CFX Manager software. To switch to this release from an earlier-versioned run, following procedure should be followed: at end of run, first open data file with suffix < .pcrd > to process by means of Bio-Rad CFX Manager release 3.1.

If running CFX Manager v1.6 software, for example, click on CFX Manager v3.1 icon to open data file running CFX Manager v3.1 software. Welcome screen appears.



- Click on File, select Open then Data File.



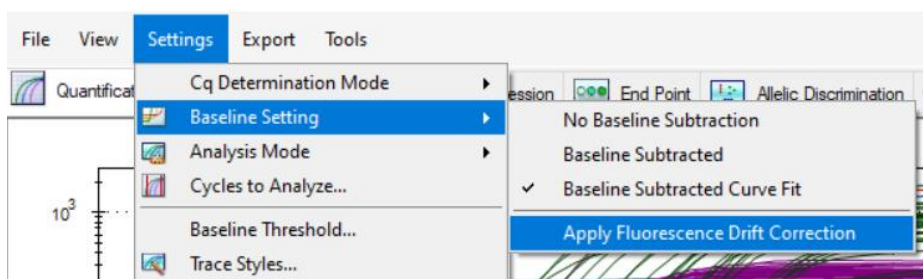
Instructions For Use EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

- Select file it is wished to analyse and click on Open.



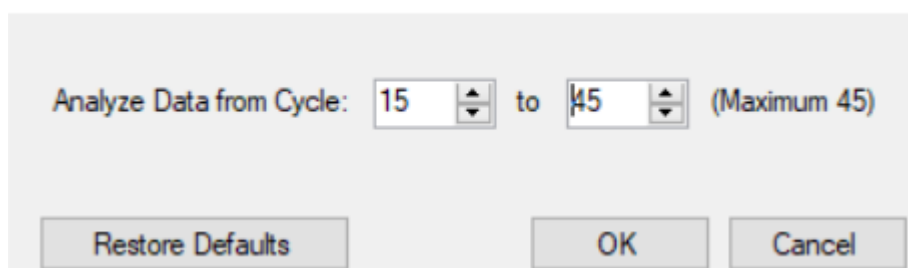
Dans l'onglet « Settings » :

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



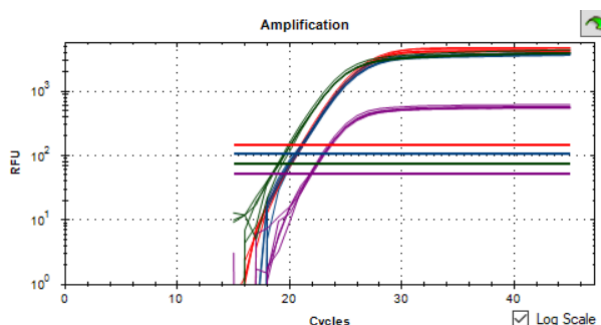
- ➔ Pour « cycles to analyze », l'analyse est faite entre 15 and 45 cycles, comme sur le schéma ci-dessous :

Cycles to Analyze



In Settings tab -> Drift Correction option must be applied as shown below. Click on Settings tab, then on Baseline Setting and on Apply Fluorescence Drift Correction. -> Under Cycles to Analyze, analysis takes place between 15 and 45 cycles, as shown below.

- **Analysis:** using Log Scale, position thresholds between low and middle of PC positive control exponential curves, as shown below. On completion of this stage, analysis may begin on the FAM, HEX, Texas Red and Cy5 channels.



Instructions For Use EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

For dosage validation, control Ct values must be as shown in Table 4 below. Outlier values, if apparent, invalidate experimentation.

Table 4: Positive and Negative Control specifications to be validated

Positive Control	
Canal FAM	Ct ≤ 28
Canal HEX	Ct ≤ 28
Canal Texas Red	Ct ≤ 28
Canal CY5	Ct ≤ 30
Negative Control	
Canal FAM	Indeterminate Ct
Canal HEX	Indeterminate Ct
Canal Texas Red	Indeterminate Ct
Canal CY5	Indeterminate Ct or > 35

12. Data analysis and interpretation

As regards endogenous extraction and inhibition control of RT-PCR samples, evaluation of the correct operation of the RT-PCR reaction may take place on the Cy5 channel measuring endogenous control. A number of different situations may arise:

1/ Positive outcome from test of RT-PCR internal endogenous control of extraction and inhibition, when $Ct \leq 35$. In this case, the nucleic acids have been correctly extracted, there are no RT-PCR inhibitors and the result can be validated.

2/ Negative/indeterminate outcome from test of RT-PCR internal endogenous control of extraction and inhibition, when $Ct > 35$. In this case, the nucleic acids have not been correctly extracted, or reverse transcription is impaired, or the presence of PCR inhibitors has adversely affected the PCR reaction. This situation may arise with lipemic plasma. Repeat of the extraction process is recommended, or if not, dilution of the sample, except if a specific signal appears in the 3 FAM, HEX or Texas Red channels.

In regard to clinical samples, the outcomes shown in Table 5 are possible.

Instructions For Use EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

Table 5 : Analysis and interpretation of clinical sample results

Positivity threshold for FAM/HEX/Texas Red: Ct ≤ 45

Chikungunya	Dengue	Leptospire	Endogenous internal control	Test/Interpretation validity
FAM	HEX	Texas Red	CY5	
+	-	-	Ct ≤ 35	YES : Presence of Chikungunya nucleic acids, Negative for Dengue and Leptospire
-	+	-	Ct ≤ 35	YES : Presence of Dengue nucleic acids, Negative for Chikungunya and Leptospire
-	-	+	Ct ≤ 35	YES : Presence of Leptospire nucleic acids; Negative for Chikungunya and Dengue
+	+	-	Ct ≤ 35	YES : Presence of Chikungunya and Dengue nucleic acids, Negative for Leptospire
-	+	+	Ct ≤ 35	YES : Presence Dengue and Leptospire nucleic acids, Negative for Chikungunya
+	-	+	Ct ≤ 35	YES : Presence of Chikungunya and Leptospire nucleic acids, Negative for Dengue
+	+	+	Ct ≤ 35	YES : Presence of 3 targets
-	-	-	Ct ≤ 35	YES : Absence of 3 targets
-/+	-/+	- /+	Ct ND or- > 35	Yes for positive targets. NI for all negative samples

NI: Not Interpretable either because of RT-PCR inhibition or because of extraction problem: no definitive conclusion is possible for the 3 targets. **The recommendation is then to take a new sample and/or repeat extraction and/or dilute sample by factor of 5.**

ND: Non Determinate

13. Analysis of performance

Limits of detection/analytical sensitivity

EBX-050 sensitivity for Chikungunya was determined by the International Standard 1st World Health Organization International Standard for Chikungunya virus RNA for Nucleic acid amplification techniques (NAT)-based assays PEI code : 11785/16, extracted on Maelstrom TANbeads8, and by Amplirun Chikungunya virus RNA control (Vircell) on 3 batches of EurobioPlex kits.

Instructions For Use EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

EBX-050 sensitivity for the 4 serotypes of Dengue was determined by quantified Amplirun Dengue 1, Dengue 2, Dengue 3 and Dengue 4 virus RNA control (Vircell) on 3 batches of EurobioPlex kits.

EBX-050 for leptospire was determined by titrated bacterial culture *Leptospira interrogans* serovar *Canicola* extracted by Maelstrom TANbeads8 on 3 batches of EurobioPlex kits.

To determine LOD_{95%}, Probit analysis was performed: dilution within given ranges performed by a plasmidic mixture of the 3 targets, tested on 24 replicata for each concentration.

Table 6: Analytical Sensitivity

	LOD _{100%} for PC	LOD _{95%} for PC		LOD _{100%} for RNA
Chikungunya	50 copies/μl	8.8 copies/μl	Chikungunya by WHO Standard	7.5 IU/μl eluate
			Chikungunya by RNAcontrol	55 copies/μl eluate
Dengue	5 copies/μl	3 copies/μl	Dengue 1 by RNAcontrol	3 copies/μl eluate
			Dengue 2 by RNAcontrol	10 copies/μl eluate
			Dengue 3 by RNAcontrol	30 copies/μl eluate
			Dengue 4 by RNAcontrol	30 copies/μl eluate
Leptospire	50 copies/μl	7.8 copies/μl	Leptospire by titrated bacterial culture	500 bacteria/μl eluate (95% for 250 bacteria/μl eluate)

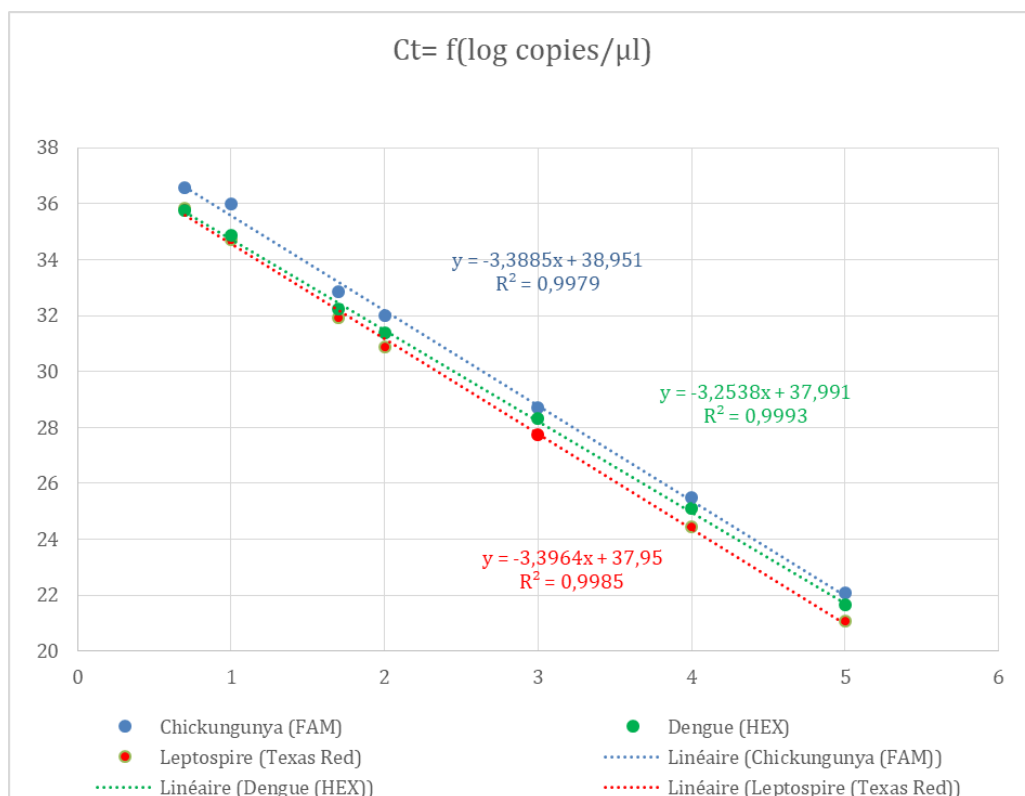
Tests were performed on Bio-Rad CFX96.

Linearity

From 5 to 10⁵ copies/μl of PC for the 3 targets.

	PCR % efficacy	Slope	R ²
Chikungunya/FAM	97.29	-3.39	0.998
Dengue/HEX	102.92	-3.25	0.999
Leptospire/Texas Red	96.98	-3.40	0.999

Instructions For Use EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire



Detection of different Leptospire strains

The following strains were tested and detected with EBX-050.

- *Leptospira inadai* serovar *Lyme* strain 10
- *Leptospira borgpetersenii* serovar *Javanica veldrat*
- *Leptospira weilli* serovar *Celladoni*
- *Leptospira wolbachii* serovar *Codice*
- *Leptospira genomospecies5/yanagawae* serovar *Saopaulo*
- *Leptospira interrogans* serovar *Icterohaemorrhagiae*
- *Leptospira alexanderi* serovar *Ranarum*
- *Leptospira kirschneri* serovar *Cynopteri* strain 3522C
- *Leptospira fainei* serovar *Hurstbridge* strain BUT6
- *Leptospira santarosai* serovar *Shermani* strain 1342K
- *Leptospira noguchii*

Variability of RT-PCR signal for Chikungunya (FAM), Dengue (HEX) and Leptospire (Texas Red) channels

EBX-050 reproducibility was determined on quantified RNA Amplirun for Chikungunya, Dengue 2, Vircell virus RNA control, and for nucleic acids extracted from *Leptospira interrogans* bacteria serovar *Canicola*, on the 3 batches of EurobioPlex kits.

Instructions For Use EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

Table 7 : Repeatability and reproducibility

	Coefficient of variation (CV %) intra-run	Coefficient of variation (CV %) inter-run	Coefficient of variation (CV %) inter-lots
Chikungunya	0.89	0,45	1.14
Dengue serotype 1	0.99	3.00	1.79
Dengue serotype 2	1.93	1.70	1.12
Dengue serotype 3	2.64	2.20	1.17
Dengue serotype 4	3.14	1.67	1.21
Leptospire	0.06	1.44	1.09

Tests were performed on Bio-Rad CFX96.

Diagnostic performance

Tests were performed on positive or negative pre-characterised samples: 265 serum, 21 plasma-EDTA, 28 urine samples, 6 EDTA anti-coagulated whole blood. Numbers of positives and negatives are detailed in Table 8.

For this study, sample extraction was performed on Maelstrom TANbeads (Taiwan Advanced Nanotech). Tests were performed on Bio-Rad CFX96.

Table 8 : Table of diagnostic performance contingency

EBX-050 Chikungunya				
		POS	NEG	TOTAL
Characterised pre Chikungunya test	POS	8	0	8
	NEG	0	141	141
	TOTAL	8	141	149
EBX-050 Dengue				
		POS	NEG	TOTAL
Characterised pre Dengue test	POS	144	3	147
	NEG	0	83	83
	TOTAL	144	86	230
EBX-050 Leptospire				
		POS	NEG	TOTAL
Characterised pre Leptospire test	POS	49	3	52
	NEG	0	60	60
	TOTAL	49	63	112

Instructions For Use EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

Diagnostic sensitivity and specificity performance was therefore:

Table 9 : Diagnostic Sensitivity and Diagnostic Performance

	Chikungunya	Dengue	Leptospire
Diagnostic Sensitivity (%)	>99%	98% [confidence interval (CI) at 95%: 94.6%-99.9%]	94 % [confidence interval (CI) at 95%: 87.9%-100%]
Diagnostic Specificity (%)	>99%	>99%	>99%

Absence of cross reaction with other pathogens

The chikungunya and leptospire system was experimentally tested and found non-cross-reactive with the following pathogens:

- HEV
- Parechovirus type 1
- Norovirus GI
- Norovirus GII
- HHV6
- HSV1
- HSV2
- VZV
- EBV
- Zikavirus
- Mayaro virus
- *Legionella*
- *Coxiella*
- *Bartonella henselae*
- *Bartonella quintana*
- *Clostridium difficile*

Cibles de multimarqueur RP 1	Cibles de multimarqueur RP 2
Influenza A H3N2 (Brisbane/10/07)	Influenza A H1 (Nouvelle Calédonie/20/99)
Influenza A H1N1 (NY/02/2009)	Influenza B (Florida/02/06)
Rhinovirus (Type 1A)	VRS (Type A)
Adénovirus (Type 3)	Parainfluenza (Type 2)
Parainfluenza (Type 1)	Parainfluenza (Type 3)
Parainfluenza (Type 4)	Coronavirus (HKU-1 recombinant)
Métapneumovirus (Pérou 6-2003)**	Coronavirus (OC43)
C. pneumoniae (CWL-029)	Coronavirus (NL63)
M. pneumoniae (M129)	Coronavirus (229E)
Virus Cocksackie (Type A1)	Bordetella pertussis (A639)

The Dengue system was experimentally tested and found to be non-cross-reactive with chikungunya, leptospire, HEV and zikavirus.

An overall *in silico* analysis was performed at time of design and indicated absence of potential cross reactions.

Specific *in silico* analysis demonstrated an absence of potential cross reaction for the following viruses in particular Usutu, West Nile, Japanese encephalitis, Tick encephalitis, Yellow fever, Saint Louis encephalitis, Hepatitis A, Hepatitis C.

Instructions For Use EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

14. Quantity control

In accordance with the Eurobio system of Quality Management, certified ISO EN 13485, each EurobioPlex Chikungunya /Dengue/Leptospire batch is tested compliant to predefined specifications in order to assure constant product quality.

15. Bibliography

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

16. Elimination of waste

Waste management and elimination compliant to DASRI legislation in France

17. Declaration of incident

All serious incidents (if any) arising in connection with this EUROBIO procedure is notified to EUROBIO SCIENTIFIC and to the competent authorities of the European Union Member State in which user and/or patient are established.

Instructions For Use EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

18. Technical assistance

For technical assistance regarding EUROBIO products, please contact our technical support.

EUROBIO SCIENTIFIC customer service can be contacted by e-mail sent to adv@eurobio-scientific.com or by telephone on +33 (0)1.69.79.64.80.



7 avenue de Scandinavie
ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis
FRANCE

Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire



EurobioPlex *Chikungunya/Dengue/Leptospire* **RT-PCR EN TEMPS REEL**

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

EBX-050-25 (pour 25 réactions)

EBX-050-50 (pour 50 réactions)



EBX-050-100 (pour 100 réactions)

EBX-050-200 (pour 200 réactions)

EBX-050-600 (pour 600 réactions)



25/50/100/200/600 réactions



0459



EBX-050 V 1.02 – 16/12/2024

Validé sur :

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) avec analyse sur CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)



Notice d'utilisation

Disponible sur demande à info@eurobio-scientific.com

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

Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

Table des matières

ENGLISH.....	1
FRANCAIS.....	24
ESPAÑOL.....	48
ITALIANO	68
1. Informations générales	26
2. Destination du dispositif.....	27
3. Symboles	28
4. Principe.....	29
5. Composants du kit.....	30
6. Conservation et stockage	30
7. Matériel requis non fourni	30
8. Instrument de PCR en temps réel	31
9. Mise en garde et précautions.....	31
10. Protocole	32
10.1 Collecte des échantillons.....	32
10.2 Extraction des acides nucléiques.....	33
10.3 Réalisation de la RT-PCR en temps réel.....	33
10.4 Protocole détaillé	35
11. Validation de l'expérimentation.....	36
12. Analyse des données et interprétation	38
13. Analyse des performances	39
14. Contrôle qualité.....	44
15. Bibliographie.....	44
16. Elimination des déchets	44
17. Déclaration d'incident	44
18. Assistance technique.....	45

Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

1. Informations générales

Les virus du Chikungunya et de la Dengue sont des Arthropod-Borne virus (Arbovirus), transmis par les arthropodes (moustiques, tiques, phlébotomes etc.). Le virus de la Dengue appartient à la famille des *Flaviviridae* et celui du Chikungunya aux *Alphaviridae* de la famille des *Togaviridae*. Ils sont transmis par diverses espèces de moustiques du genre *Aedes* tel qu'*aegypti* (principalement en Amérique tropicale et subtropicale, et sud des Etats-Unis) et *albopictus* (principalement en Asie), *furcifer*, *africanus*, *taylori* et *luteophaeus* 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. 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.

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

Les leptospires quant à eux sont un groupe de bactéries souvent regroupées dans l'espèce *Leptospira interrogans* et sont à l'origine des leptospiroses, des zoonoses ubiquitaires. Il a récemment été constaté une forte augmentation du nombre de cas signalés. En tant que zoonose, elle touche des animaux vivant à proximité de l'homme tels le rat, ou le cochon. Le leptospire est un pathogène pour l'homme.

La leptospirose sévit dans différentes parties du monde, à l'île de la Réunion, Wallis et Futuna, aux Antilles, en Guyane, dans les pays tropicaux, l'Asie du sud-est, Cambodge, Vietnam, Laos. Le leptospire a même été détecté en Poitou Charente, dans le sud et sud-ouest de la France près d'élevage porcins en région humide.

Les leptospires sont des bactéries spiralées possédant des endoflagelles pour se déplacer. Le large polymorphisme de symptômes non spécifiques et la diversité des organes touchés rendent le diagnostic clinique très difficile, notamment dû au fait qu'elle puisse être confondue avec une forte grippe. Elle peut commencer par des douleurs diffuses, ou localisées (ex : douleurs méningées) qui, si

Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

elles ne sont pas diagnostiquées à temps, conduisent à une divagation de la parole et du raisonnement. Dans certains cas, elle est accompagnée de jaunisse et/ou néphrite. Après dialyse et antibiotiques, le patient récupère en 5 à 6 semaines si la maladie était modérée (bien que des bactéries puissent encore être trouvées dans l'urine du patient plusieurs semaines après la disparition des symptômes). La leptospirose peut également évoluer vers des hémorragies violentes - parfois létales - ou une maladie grave des reins. Il existe de nombreux sérovars (icterohaemorrhagiae, canicola, pomona, par exemple) qui ne présentent pas de signature antigénique homogène, ce qui rend difficile la conception de vaccins efficaces.

D'après les recommandations de l'organisation mondiale de la santé, la confirmation biologique de la leptospirose, repose soit sur l'isolement de la bactérie, soit sur l'identification de ses acides nucléiques dans les échantillons biologiques, ou encore sur une sérologie positive dans un contexte clinique et épidémiologique évocateur. L'usage de la culture bactérienne est très limité en raison de ses difficultés de réalisation et du temps nécessaire pour la croissance des bactéries. La détection précoce de la leptospirose peut se faire par PCR en temps réel, en général à partir du plasma ou sérum préparé à partir du sang du patient. Le moment optimal de prélèvement pour le sang est avant 8 jours de maladie. Il n'y a pas d'intérêt à pratiquer le test PCR en temps réel dans le sang au-delà de 10 jours après le début symptomatologique de la maladie (fin de la période de bactériémie). La Haute Autorité de Santé (HAS) a indiqué que le test PCR simple (non en temps réel) n'a pas d'intérêt dans le diagnostic biologique spécifique de la leptospirose. La HAS estime que la technique de PCR en temps réel est actuellement la plus intéressante pour le diagnostic biologique spécifique précoce de la leptospirose. Elle doit être réservée aux 8 premiers jours après l'apparition de fièvre, réalisée sur un échantillon de sang prélevé, de préférence avant la mise en œuvre de l'antibiothérapie. Du fait de la faible concentration habituelle des leptospires dans le sang, toute PCR en temps réel négative doit donner lieu à une exploration sérologique.

2. Destination du dispositif

Le dispositif EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire est test d'amplification par Transcription inverse suivie d'une réaction en chaîne de la polymérase en temps réel (RT-PCR), conçu pour la détection qualitative de la présence ou l'absence des virus Chikungunya et Dengue et de la bactérie Leptospire dans un extrait d'acides nucléiques.

Le test EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire est indiqué pour aider à poser un diagnostic de présomption d'infection chez l'homme, ou compléter un diagnostic sérologique avéré ou indéterminé. L'extrait d'acides nucléiques est le matériel de départ pour le kit EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire. Les acides nucléiques sont extraits à partir du plasma, du sérum ou des urines de patients.

Ce système d'amplification a été validé sur des échantillons de plasma, de sérum et d'urine, et sur le contrôle interne endogène.

Le test EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire est un dispositif médical de diagnostic *in vitro*, il doit être utilisé par du personnel de laboratoire d'analyse de biologie médicale qualifié. Il ne doit pas être recyclé après utilisation. Ce dispositif n'est pas destiné au dépistage du chikungunya / dengue/leptospire en banque de sang ou d'organes.

Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

3. Symboles



Référence catalogue



Code de lot



Limite de température



Date d'expiration



Contenu suffisant pour « N » essais



Fabricant



Date de fabrication



Produit marqué CE



Dispositif Médical de Diagnostic *in vitro*



Consulter les instructions d'utilisation



Attention



Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé



A conserver à l'abri de la lumière du soleil

Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

4. Principe

Le dispositif EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire est un test d'amplification de l'acide ribonucléique (ARN) de Chikungunya et Dengue et de l'acide nucléique ADN codant pour un ARN ribosomal et l'ARN ribosomal de Leptospire, ainsi que d'un contrôle interne endogène d'extraction et d'inhibition de RT-PCR, qui utilise l'amplification par RT-PCR en temps réel. Le test est réalisé à partir des acides nucléiques extraits de l'échantillon au moyen d'une réaction unique dans un seul puit. Les amorces et sondes du kit permettent la détection de l'ARN des 4 sérotypes de la Dengue (screening) sans typage.

Le contrôle interne endogène d'extraction et d'inhibition de RT-PCR permet de s'assurer qu'un résultat négatif ne peut être dû à une mauvaise extraction et/ou à la présence d'inhibiteurs de PCR en trop grande quantité.

L'ARN du virus Chikungunya est détecté à l'aide d'une sonde marquée FAM, celui de la Dengue est détecté à l'aide d'une sonde marquée HEX. L'ARN ribosomal et l'ADN codant pour l'ARN ribosomal de leptospire sont détectés à l'aide d'une sonde marquée Texas Red. Le contrôle interne endogène d'extraction et d'inhibition de RT-PCR est détecté à l'aide d'une sonde marquée CY5. Tous émettent une fluorescence spécifique.

Le dispositif n'est pas automatisé. Il est de la responsabilité de l'utilisateur d'utiliser un autre équipement que ceux validés, et dans ce cas, les performances ne sont pas garanties.

Tableau 1 : Détection des cibles selon les fluorophores

Cible	Fluorophore	Excitation	Emission
CHIKUNGUNYA	FAM	495 nm	515 nm
DENGUE	HEX	535 nm	555 nm
LEPTOSPIRE	TEXAS RED	585 nm	605 nm
Contrôle interne endogène	Cy5	650 nm	670 nm

Canaux équivalents sur différents instruments de PCR :

- Canal FAM (Systèmes ABI, SmartCycler II, Systèmes Mx, Chromo4/CFX96, T-COR 8®-IVD), Canal 510 (LC 480), Canal Green (RotorGene)
- Canal HEX (Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx, T-COR 8®-IVD), Canal VIC (Systèmes ABI), Canal Alexa532 (SmartCycler II), Canal 580 (LC 480), Canal Yellow (RotorGene)
- Canal Texas Red (Systèmes ABI, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96™, Systèmes Mx, T-COR 8™-IVD), LC Red 610 (LC480®), Canal Orange (RotorGene)
- Canal Cy5 (Systèmes ABI, Systèmes Mx, Chromo4/CFX96, T-COR 8®-IVD), Canal Alexa647 (SmartCycler II), Canal 660 (LC 480), Canal Red (RotorGene)

Note : Sur LC480 instrument II : Appliquer une compensation de couleur pour les longueurs d'ondes FAM-HEX/VIC-Cy5 (465-510,533-580,618-660).

Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

5. Composants du kit

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

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

Le kit contient les réactifs et les enzymes nécessaires à l'amplification de l'ARN viral de Chikungunya, de Dengue et de l'ADN codant pour l'ARN ribosomal et l'ARN ribosomal de Leptospire et du contrôle endogène d'extraction et d'inhibition par RT-PCR (Tableau 2).

Tableau 2 : Composant du kit

Couleur de bouchon	Contenu du kit	EBX-050 (25 tests)	EBX-050 (50 tests)	EBX-050 (100 tests)	EBX-050 (200 tests)	EBX-050 (600 tests)	Reconstitution
Rouge	Enzymes	225 µl	450 µl	900 µl	2x900 µl	4x1350 µl	Prêt à l'emploi
Transparent	Oligomix	80 µL	160 µL	320 µL	2X320 µL	3x640 µL	Prêt à l'emploi
Bleu	Eau = contrôle négatif (CN-H2O)	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	Prêt à l'emploi
Jaune	Contrôle positif (CP) Chikungunya/ Dengue/ Leptospire/ CI endogène	75 µl	150 µl	300 µl	2 x 300 µl	3x300 µL	Prêt à l'emploi

6. Conservation et stockage

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

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



Plusieurs cycles de congélation / décongélation (>5x) doivent être évités, cela pourrait réduire la sensibilité de l'analyse.

7. Matériel requis non fourni

- ◇ Hotte biologique
- ◇ Appareil de PCR temps réel
- ◇ Centrifugeuse pour microtubes

Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

- ◇ 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)

8. Instrument de PCR en temps réel

Le kit EurobioPlex a été développé et validé pour être utilisé avec le CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) avec analyse sur CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad) en appliquant la drift correction, et entre 15 et 45 cycles (cf. §11.).

9. Mise en garde et précautions



Lire attentivement ces instructions avant de débiter le protocole.

- ◇ 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, le technicien ne doit pas utiliser le kit.
- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée par des techniciens de laboratoire d'analyse de biologie médicale.
- ◇ S'assurer que les instruments ont été installés, calibrés et maintenus en accord avec les recommandations du fabricant.
- ◇ Les échantillons cliniques doivent être considérés comme du matériel potentiellement infectieux et doivent être préparés sous une hotte à flux laminaire.
- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée selon les bonnes pratiques de laboratoire.
- ◇ Ne pas utiliser ce kit après la date de péremption indiquée.
- ◇ Eviter les cycles de congélation / décongélation des réactifs, cela peut conduire à une baisse de la sensibilité du test.
- ◇ Eviter une exposition prolongée à la lumière des réactifs, limitée au temps technique nécessaire à la préparation de la plaque PCR, sans quoi les performances ne sont pas garanties.
- ◇ Une fois les réactifs décongelés, centrifuger brièvement les tubes avant leur utilisation.
- ◇ Pour de très fortes charges virales ($Ct < 15$), il est possible d'observer une courbe d'amplification en forme de cloche. Il s'agit bien d'un signal positif. En décochant l'analyse à partir de 15 cycles, la courbe présente une allure classique d'amplification exponentielle.
- ◇ Il est recommandé de définir trois zones de travail distinctes : 1) Isolation des acides nucléiques, 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.

Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

- ◇ Des méthodes appropriées de préparation/extraction des acides nucléiques pour une production d'ARN/ADN de qualité et une application de RT-PCR doivent être utilisées, notamment afin d'éviter tout risque de contamination avec les RNases/DNases.
- ◇ Utiliser des embouts à filtre pour micropipettes, RNase-free et DNase-free.
- ◇ Ne pas pipeter avec la bouche. Ne pas manger, ni boire ou fumer dans le laboratoire.
- ◇ Eviter les aérosols.
- ◇ Le kit n'est pas destiné à un usage unique. Lors de la réutilisation du dispositif, il est nécessaire de suivre les recommandations concernant les cycles de congélation-décongélation autorisés, et les précautions pour prévenir la contamination des réactifs.
- ◇ Les composants du kit ne doivent pas être utilisés séparément (ni avec d'autres réactifs, ni avec les réactifs d'autres lots).
- ◇ Le dispositif n'est pas automatisé. Il est de la responsabilité de l'utilisateur d'utiliser un autre équipement que ceux validés, et dans ce cas, les performances ne sont pas garanties.
- ◇ La décongélation des réactifs doit être ménagée afin de ne pas altérer les performances du dispositif (à +2°C/+8°C ou à température ambiante).

10. Protocole

10.5 Collecte des échantillons

- ◇ Collecter les échantillons dans des tubes stériles. Pour une extraction des acides nucléiques à partir de sérum, collecter les échantillons sur tubes sec, pour une extraction à partir de plasma, collecter les échantillons sur tubes EDTA.
 - ◇ Un plasma lipémique peut induire une inhibition de PCR, empêchant la détection des pathogènes
-  **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 des acides nucléiques par des systèmes adaptés produise des acides nucléiques de qualité.
 - ◇ Il est recommandé que les échantillons soient extraits immédiatement, ou conservés selon les recommandations de stockage des échantillons avant extraction (Tableau 3).
 - ◇ Les références bibliographiques dans la section « 15. Bibliographie » fournissent des données indicatives sur la stabilité des échantillons et des ARNs.

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

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

Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

Attention	
	◇ L'utilisateur peut se référer aux recommandations émises par l'Organisation Mondiale de la Santé ou par la Haute Autorité de Santé pour la bonne conservation des échantillons ◇ Les acides nucléiques extraits doivent être stockés à <-70°C afin d'assurer leur stabilité. Au-delà d'une année de stockage des ARNs à <-70°C, ou si stockés à -20°C, les Ct obtenus peuvent augmenter. Il est conseillé de ré-extraire un échantillon biologique stocké depuis plus d'un an. Il est conseillé de limiter à 3 le nombre de décongélation des ARNs. ◇ Le transport des échantillons cliniques est soumis à la réglementation locale pour le transport des agents infectieux.

10.6 Extraction des acides nucléiques

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

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

10.7 Réalisation de la RT-PCR en temps réel

Remarque générale :

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

Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

Schéma de la procédure :

1 - PREPARATION MELANGE REACTIONNEL / MASTERMIX

Nombre de réactions	N+3
Enzymes	(N+3) x 7.5 µl
Oligomix	(N+3) x 2.5 µl
Volume total Mastermix	(N+3) x 10µl



2 - PREPARATION DES REACTIONS

Echantillon

10 µl de Mastermix
+
5µl échantillon extrait

Contrôle positif (CP)

10 µl de Mastermix
+
5µl CP

Contrôle Négatif (CN-H2O)

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



3 – INSTRUMENT PCR EN TEMPS REEL

Programme	Température	Durée	Cycle(s)	
Reverse Transcription	45 °C	5 min	1	-
Dénaturation	98°C	20 sec	1	-
Amplification	98°C	3 sec	45	-
	58°C	45 sec		Acquisition de fluorescence

Voir 11. Validation de l'expérimentation pour les Settings détaillés avec drift correction et analyse entre 15 et 45 cycles.

Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

10.8 Protocole détaillé

- 3) Homogénéiser le tube d'Enzymes, et vortexer l'Oligomix puis centrifuger.
- 4) Préparer le Mastermix comme ci-dessous, N étant le nombre de réaction(s), prévoir la quantité de Mastermix pour N+3 réactions minimum.

Nombre de réactions	N+3
Enzymes	(N+3) x 7.5 µl
Oligomix	(N+3) x 2.5 µl
Volume total Mastermix	(N+3) x 10µl

- 3) Homogénéiser le Mastermix préparé en 2) et centrifuger brièvement.
 - 10) Distribuer 10 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.
 - 11) Ajouter 5 µL d'échantillon extrait.
 - 12) En parallèle réaliser les contrôles suivants :
 - Contrôle positif : 10 µl Mastermix + 5 µl de contrôle positif CP.
 - Contrôle négatif : 10µl de Mastermix + 5µl d'eau fournie (CN-H2O)
 - 13) Fermer immédiatement avec un film adhésif ou bouchons transparents pour éviter toute contamination.
 - 14) Centrifuger brièvement pour collecter le mélange réactionnel au fond des tubes ou des puits de microplaque.
 - 15) Réaliser le programme suivant sur l'instrument de PCR en temps réel.
- Durée approximative: 1h10

Programme	Température	Durée	Cycle(s)	
Reverse Transcription	45 °C	5 min	1	-
Dénaturation	98°C	20 sec	1	-
Amplification	98°C	3 sec	45	-
	58°C	45 sec		Acquisition de fluorescence

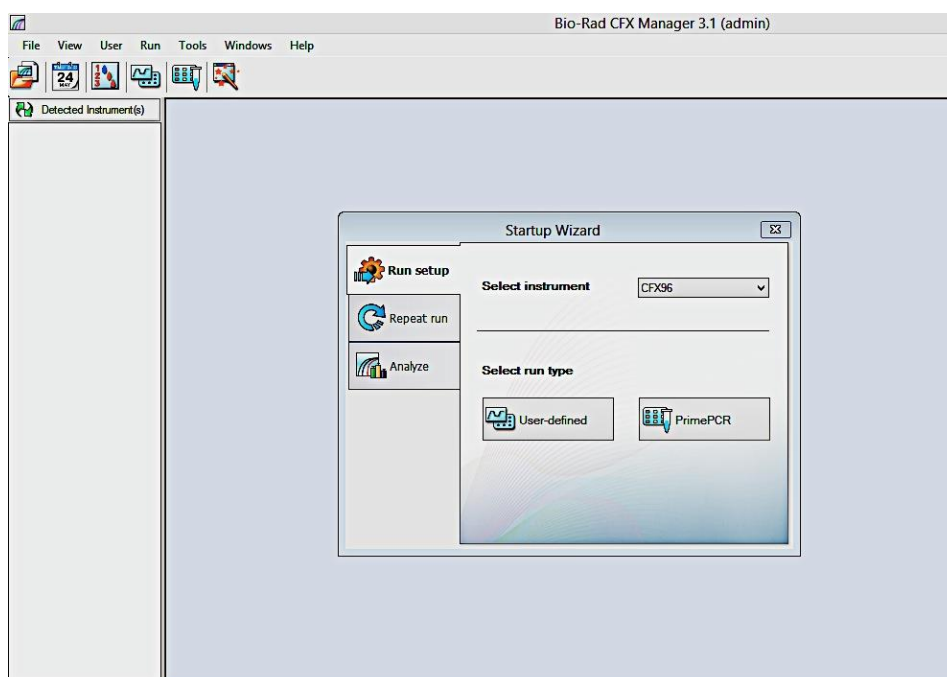
Note: Sur CFX96 (Bio-Rad), lancer le run à partir de la version 1.6 ou postérieure, puis analyser avec la version 3.1 (voir 11.Validation de l'expérimentation pour les Settings détaillés avec drift correction et analyse entre 15 et 45 cycles).

Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

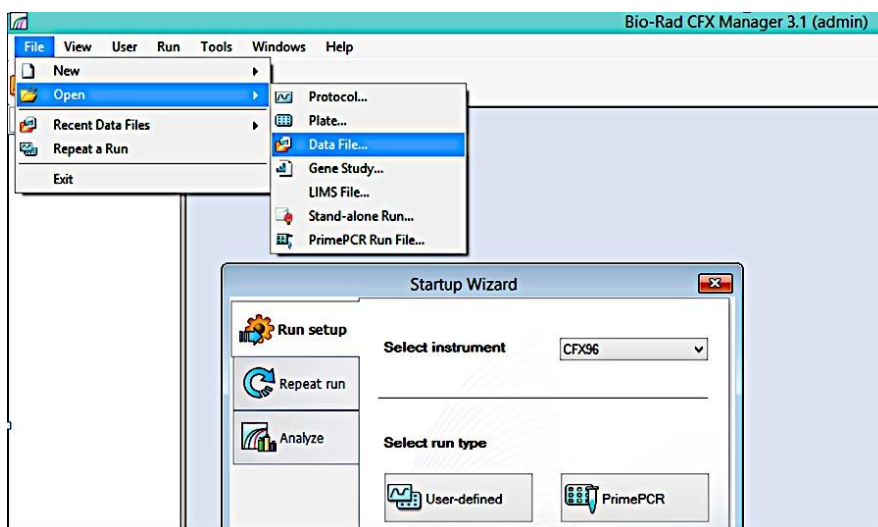
11. Validation de l'expérimentation

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

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



- Cliquer sur File et sélectionner Open puis Data File.



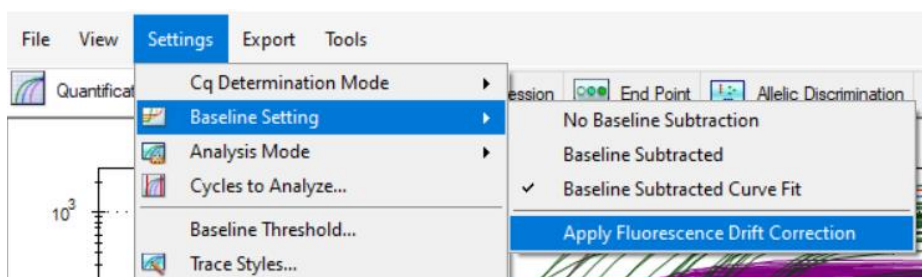
Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

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



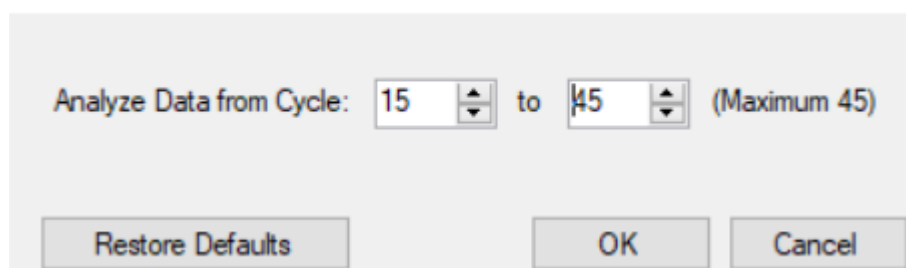
Dans l'onglet « Settings » :

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

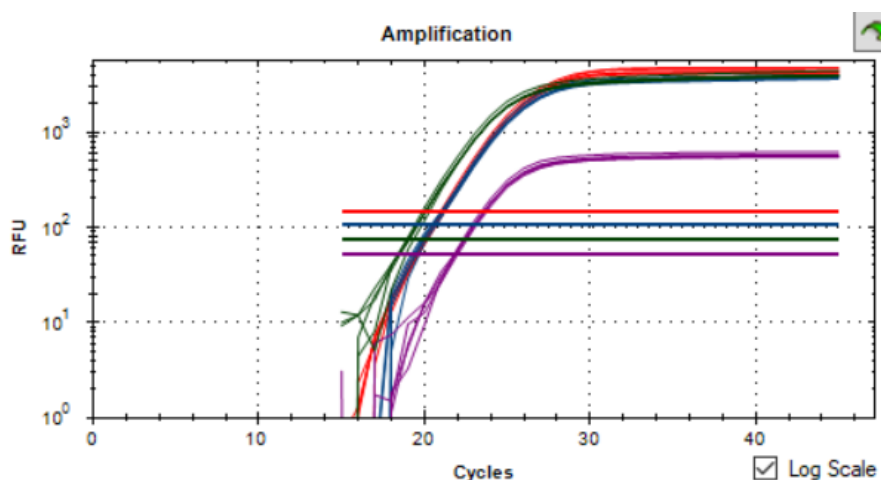


- Pour « cycles to analyze », l'analyse est faite entre 15 et 45 cycles, comme sur le schéma ci-dessous :

Cycles to Analyze



- **Puis, pour l'analyse**, en Echelle log, positionner les thresholds entre le bas et le milieu des courbes exponentielles du CP, comme ci-dessous. Une fois cette étape réalisée, l'analyse peut débuter dans les canaux FAM, HEX, Texas Red et Cy5.



Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

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

Tableau 4: Spécifications à valider pour les contrôles positifs et négatif du kit

Contrôle positif	
Canal FAM	Ct ≤ 28
Canal HEX	Ct ≤ 28
Canal Texas Red	Ct ≤ 28
Canal CY5	Ct ≤ 30
Contrôle négatif	
Canal FAM	Ct non déterminé
Canal HEX	Ct non déterminé
Canal Texas Red	Ct non déterminé
Canal CY5	Ct non déterminé ou > 35

12. Analyse des données et interprétation

Pour ce qui concerne le contrôle endogène d'extraction et d'inhibition de RT-PCR dans les échantillons, le bon fonctionnement de la réaction de RT-PCR peut être évalué sur le canal Cy5 mesurant le contrôle endogène. Différents cas de figures peuvent être obtenus :

1/ le test du contrôle interne endogène d'extraction et d'inhibition de RT-PCR est positif et Ct ≤ 35: les acides nucléiques ont été correctement extraits, et il n'y a pas d'inhibiteurs de RT-PCR. Le résultat peut être validé.

2/ le test du contrôle interne endogène d'extraction et d'inhibition de RT-PCR est négatif/non déterminé ou Ct > 35: soit les acides nucléiques n'ont pas été bien extraits, soit la reverse transcription n'a pas bien fonctionné, soit la présence d'inhibiteurs de PCR inhibe la réaction de PCR. Cela peut se produire dans le cas d'un plasma lipémique. Il est recommandé de répéter l'extraction ou de diluer l'échantillon, sauf si un signal spécifique apparaît dans les 3 canaux FAM, HEX ou Texas Red.

Pour les échantillons cliniques, les résultats du Tableau 5 sont possibles.

Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

Tableau 5 : Analyse et interprétation des résultats des échantillons cliniques

Seuil de positivité pour FAM/HEX/Texas Red : Ct ≤ 45

Chikungunya	Dengue	Leptospire	Contrôle interne endogène	Validité du test/Interprétation
FAM	HEX	Texas Red	CY5	
+	-	-	Ct ≤ 35	OUI : Présence d'acides nucléiques de Chikungunya, Négatif pour Dengue et Leptospire
-	+	-	Ct ≤ 35	OUI : Présence d'acides nucléiques de la Dengue, Négatif pour Chikungunya et Leptospire
-	-	+	Ct ≤ 35	OUI : Présence d'acides nucléiques Leptospire ; Négatif pour Chikungunya et Dengue
+	+	-	Ct ≤ 35	OUI : Présence d'acides nucléiques de Chikungunya et Dengue, Négatif pour Leptospire
-	+	+	Ct ≤ 35	OUI : Présence d'acides nucléiques de Dengue et Leptospire, Négatif pour Chikungunya
+	-	+	Ct ≤ 35	OUI : Présence d'acides nucléiques de Chikungunya et Leptospire, Négatif pour Dengue
+	+	+	Ct ≤ 35	OUI : Présence des 3 cibles
-	-	-	Ct ≤ 35	OUI : Absence des 3 cibles
-/+	-/+	-/+	Ct ND ou > 35	Oui pour les cibles positives. NI pour toutes les cibles négatives

NI : non interprétable car inhibition de RT-PCR ou problème d'extraction : aucune conclusion définitive sur les 3 cibles ne peut être donnée. **Il est alors recommandé de réaliser un nouveau prélèvement et/ou répéter l'extraction et/ou de diluer l'échantillon 5 fois.**

ND : non déterminé

13. Analyse des performances

Limite de détection/sensibilité analytique

La sensibilité d'EBX-050 pour Chikungunya a été déterminée à partir de l'Etalon international (1st World Health Organization International Standard for Chikungunya virus RNA for Nucleic acid amplification techniques (NAT)-based assays PEI code : 11785/16) extrait sur Maelstrom TANbeads8, et de l'Amplirun Chikungunya virus RNA control (Vircell) sur 3 lots de kits.

Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

La sensibilité d'EBX-050 pour les 4 sérotypes de Dengue a été déterminée à partir des Amplirun quantifiés Dengue1, Dengue 2, dengue 3 et Dengue 4 virus RNA control (Vircell) sur 3 lots de kits.

La sensibilité d'EBX-050 pour la leptospire a été déterminée à partir d'une culture bactérienne titrée de *Leptospira interrogans* serovar *Canicola* extraite sur Maelstrom TANbeads8 sur 3 lots de kits.

Pour déterminer la LOD_{95%}, une analyse Probit a été réalisée : une gamme de dilution a été réalisée à partir d'un mélange plasmidique des 3 cibles, et testée en 24 réplicata pour chaque concentration.

Tableau 6 : Sensibilité analytique

	LOD _{100%} sur CP	LOD _{95%} sur CP		LOD _{100%} sur ARN
Chikungunya	50 copies/μl	8,8 copies/μl	Chikungunya sur WHO Standard	7.5 IU/μl éluat
			Chikungunya sur ARN control	55 copies/μl éluat
Dengue	5 copies/μl	3 copies/μl	Dengue 1 sur ARN control	3 copies/μl éluat
			Dengue 2 sur ARN control	10 copies/μl éluat
			Dengue 3 sur ARN control	30 copies/μl éluat
			Dengue 4 sur ARN control	30 copies/μl éluat
Leptospire	50 copies/μl	7,8 copies/μl	Leptospire sur culture bactérienne titrée	500 bactéries/μl éluat (95% pour 250 bactérie/μl éluat)

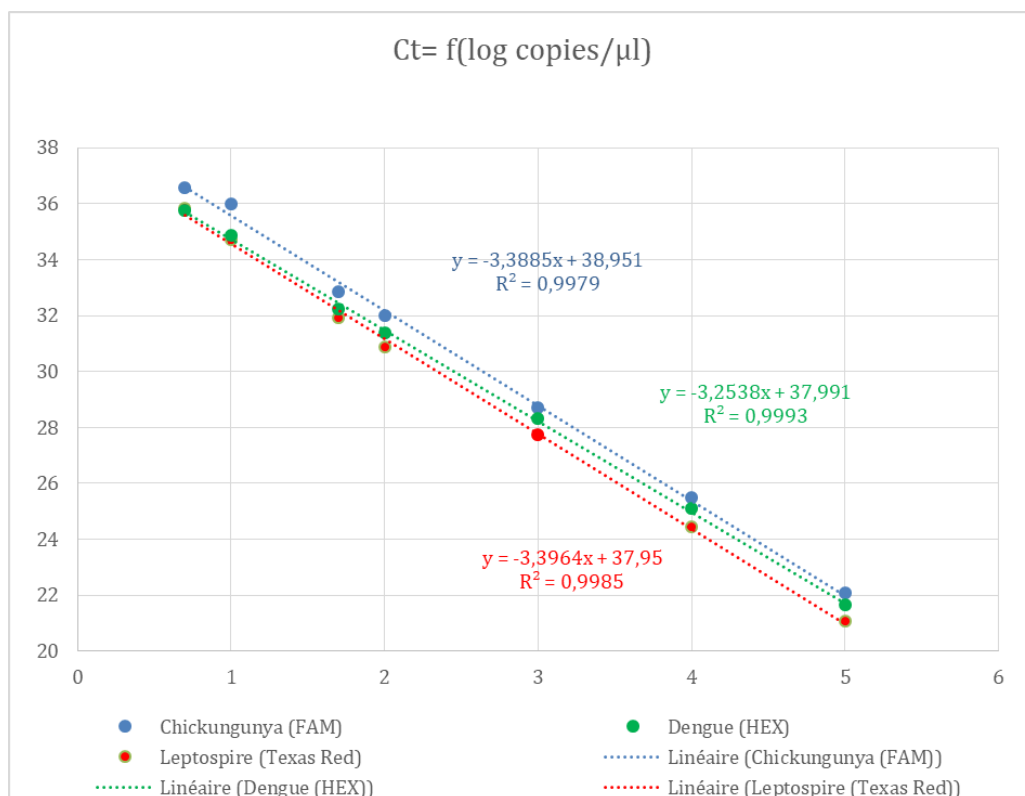
Les tests ont été réalisés sur CFX96 (Bio-Rad).

Linéarité

De 5 à 10⁵ copies/μl de CP pour les 3 cibles.

	Efficacité PCR %	Pente	R ²
Chikungunya/FAM	97,29	-3,39	0,998
Dengue/HEX	102,92	-3,25	0,999
Leptospire/Texas Red	96,98	-3,40	0,999

Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire



Détection de différentes souches de Leptospire

Les souches suivantes ont été testées, et détectées avec EBX-050.

- *Leptospira inadai* serovar *Lyme strain 10*
- *Leptospira borgpetersenii* serovar *Javanica veldrat*
- *Leptospira weilli* serovar *Celladoni*
- *Leptospira wolbachii* serovar *Codice*
- *Leptospira genomospecies5/yanagawae* serovar *Saopaulo*
- *Leptospira interrogans* serovar *Icterohaemorrhagiae*
- *Leptospira alexanderi* serovar *Ranarum*
- *Leptospira kirschneri* serovar *Cynopteri strain 3522C*
- *Leptospira fainei* serovar *Hurstbridge strain BUT6*
- *Leptospira santarosai* serovar *Shermani strain 1342K*
- *Leptospira noguchii*

Variabilité du signal de RT-PCR pour les canaux du Chikungunya (FAM), de la Dengue (HEX) et de Leptospire (Texas Red)

La reproductibilité d'EBX-050 a été déterminée sur des ARN Amplirun quantifiés Chikungunya, Dengue 2, virus RNA control (Viracell) et des acides nucléiques extraits de la bactérie *Leptospira interrogans* serovar *Canicola*, sur 3 lots de kits.

Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

Tableau 7 : Répétabilité et reproductibilité

	Coefficient de variation (CV %) intra-run	Coefficient de variation (CV %) inter-run	Coefficient de variation (CV %) inter-lots
Chikungunya	0,89	0,45	1,14
Dengue sérotype 1	0,99	3,00	1,79
Dengue sérotype 2	1,93	1,70	1,12
Dengue sérotype 3	2,64	2,20	1,17
Dengue sérotype 4	3,14	1,67	1,21
Leptospire	0,06	1,44	1,09

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

Performances diagnostiques

Les essais ont été menés sur des échantillons pré-caractérisés positifs ou négatifs : 265 serum, 21 plasma-EDTA, 28 urines, 6 sang-total -EDTA. Les nombres de positifs et négatifs sont détaillés dans le tableau 8.

Pour cette étude, l'extraction des échantillons a été réalisée sur Maelstrom TANbeads (Taiwan Adadvanced Nanotech). Les tests ont été réalisés sur CFX96 (Bio-Rad).

Tableau 8 : Tableaux de contingence des performances diagnostiques

EBX-050 Chikungunya				
		POS	NEG	TOTAL
Caractérisés pre test Chikunugunya	POS	8	0	8
	NEG	0	141	141
	TOTAL	8	141	149
EBX-050 Dengue				
		POS	NEG	TOTAL
Caractérisés pre test Dengue	POS	144	3	147
	NEG	0	83	83
	TOTAL	144	86	230
EBX-050 Leptospire				
		POS	NEG	TOTAL
Caractérise pre test Leptospire	POS	49	3	52
	NEG	0	60	60
	TOTAL	49	63	112

Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

Les performances de sensibilité et spécificité diagnostiques sont donc :

Tableau 9 : Sensibilité et Spécificité diagnostiques

	Chikungunya	Dengue	Leptospire
Sensibilité diagnostique (%)	>99%	98% [intervalle de confiance (IC) à 95%: 94.6%-99.9%]	94 % [intervalle de confiance (IC) à 95%: 87.9%-100%]
Spécificité diagnostique (%)	>99%	>99%	>99%

Absence de cross réaction avec d'autres pathogènes

Le système chikungunya et leptospire ont été testés expérimentalement et ne cross-réagissent pas avec les pathogènes suivants :

- HEV
- Parechovirus type 1
- Norovirus GI
- Norovirus GII
- HHV6
- HSV1
- HSV2
- VZV
- EBV
- Zikavirus
- Mayaro virus
- *Legionella*
- *Coxiella*
- *Bartonella henselae*
- *Bartonella quintana*
- *Clostridium difficile*

Cibles de multimarqueur RP 1	Cibles de multimarqueur RP 2
Influenza A H3N2 (Brisbane/10/07)	Influenza A H1 (Nouvelle Calédonie/20/99)
Influenza A H1N1 (NY/02/2009)	Influenza B (Florida/02/06)
Rhinovirus (Type 1A)	VRS (Type A)
Adénovirus (Type 3)	Parainfluenza (Type 2)
Parainfluenza (Type 1)	Parainfluenza (Type 3)
Parainfluenza (Type 4)	Coronavirus (HKU-1 recombinant)
Métapneumovirus (Pérou 6-2003)**	Coronavirus (OC43)
C. pneumoniae (CWL-029)	Coronavirus (NL63)
M. pneumoniae (M129)	Coronavirus (229E)
Virus Cocksackie (Type A1)	Bordetella pertussis (A639)

Le système Dengue a été testé expérimentalement et ne cross réagit pas avec le chikungunya, la leptospire, HEV ou zikavirus.

Une analyse *in silico* globale a été réalisée lors du design et indique l'absence de réactions croisées potentielles.

Une analyse *in silico* spécifique a démontré une absence de réaction croisée potentielle pour notamment le virus Usutu, le Nil Occidental/West Nile virus, l'encéphalite japonaise/Japanese encephalitis virus, l'encéphalite à tique/Tick encephalitis virus, la fièvre jaune/Yellow fever virus, l'encéphalite de Saint Louis/Saint Louis encephalitis virus, l'hépatite A/Hepatitis A virus, l'hépatite C/Hepatitis C virus.

Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

14. Contrôle qualité

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

15. Bibliographie

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

16. Elimination des déchets

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

17. Déclaration d'incident

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

Notice d'utilisation EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

18. Assistance technique

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

Le service clients d'EUROBIO SCIENTIFIC est joignable par voie électronique (mail), à l'adresse adv@eurobio-scientific.com ou par téléphone au +33 (0)1.69.79.64.80.



7 avenue de Scandinavie
ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis
FRANCE

Ficha técnica EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire



eurobio
SCIENTIFIC

EurobioPlex *Chikungunya/Dengue/Leptospire* RT-PCR EN TIEMPO REAL

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

EBX-050-25 (para 25 reacciones)

EBX-050-50 (para 50 reacciones)

REF

EBX-050-100 (para 100 reacciones)

EBX-050-200 (para 200 reacciones)

EBX-050-600 (para 600 reacciones)



25/50/100/200/600 reacciones



EBX-050 V 1.02 – 16/12/2024

Validado en :

- CFX96^{MT} Real Time PCR detection system (Bio-Rad) con análisis en CFX Manager versión 3.1 (Bio-Rad)



Ficha técnica

Disponible previa solicitud en info@eurobio-scientific.com

El *Resumen de las Características de Seguridad y Rendimiento (RCSP)* será puesto a disposición por el organismo notificado certificador en EUDAMED una vez que este último esté funcional. También se puede obtener bajo petición.

Ficha técnica EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

Índice

ENGLISH.....	1
FRANCAIS.....	24
ESPANOL.....	48
ITALIANO	68
1. Informaciones generales	48
2. Destino del dispositivo	49
3. Símbolos	50
4. Principio.....	51
5. Componentes del kit	52
6. Conservación y almacenamiento	52
7. Material requerido no suministrado	52
8. Instrumento de PCR en tiempo real	53
9. Advertencias y precauciones.....	53
10. Protocolo	54
10.1 Recogida de muestras	54
10.2 Extracción de ácidos nucleicos	55
10.3 Realización de la RT-PCR en tiempo real	55
10.4 Protocolo detallado	57
11. Validación de la experimentación	58
12. Análisis de los datos e interpretación	60
13. Análisis de las prestaciones	62
14. Control de calidad	66
15. Bibliografía.....	66
16. Eliminación de los residuos	66
17. Declaración de incidente	66
18. Asistencia técnica	67

Ficha técnica EurobioPlex

Chikungunya/Dengue/Leptospire

1. Informaciones generales

Los virus del Chikungunya y del Dengue son Arthropod-Borne virus (Arbovirus), transmitidos por los artrópodos (mosquitos, garrapatas, flebótomos, etc.). El virus del Dengue pertenece a la familia de los *Flaviridae* y el del Chikungunya a la de los *Alfavirus* de la familia de los *Togaviridae*. Son transmitidos por diversas especies de mosquitos del género *Aedes* como *aegypti* (principalmente en América tropical y subtropical, y el sur de Estados Unidos) y *albopictus* (principalmente en Asia), *furcifer*, *africanus*, *taylori* y *luteophaeus* con una distribución mundial, en particular en regiones tropicales. Las dos primeras especies se identifican hasta la fecha como los principales vectores epidémicos, a causa de su adaptación a las zonas de hábitat humano. En Francia, las regiones del sur están más especialmente concernidas.

Existen 4 serotipos del Dengue (DENV 1-4). El genoma del Dengue es un ARN monocatenario. La replicación del virus y la transcripción se produce en el citoplasma de la célula huésped. La enfermedad comienza con fiebre, dolores musculares y articulares. En la mayoría de los casos, la infección no presenta complicaciones, pero en un 20% de los casos puede ser más grave y a veces comprometer un pronóstico vital, sobre todo en el caso de infecciones secundarias, con shock hemorrágico, ya que la infección por una cepa no protege al huésped de una infección por otra cepa.

El virus del Chikungunya (CHIKV) es un pequeño virus envuelto de forma esférica de ARN monocatenario, de aproximadamente 12 kpb. La fase virémica de la infección por Chikungunya dura en promedio de 3 a 10 días. Los principales signos clínicos son la aparición brutal de fiebre alta (> 40°C), que dura de 24 a 48 horas, acompañada de artralgias y mialgias, poliartralgias muy dolorosas que afectan especialmente a las articulaciones de las extremidades como muñecas, tobillos o falanges, con pronunciada hinchazón de las articulaciones, manifestaciones cutáneas de tipo erupción maculopapular, eritematosa o edemas. Las infecciones por el CHIKV pueden evolucionar en una enfermedad crónica. Los síntomas son similares a los de la malaria o la infección por dengue, y no es raro encontrar los 2 simultáneamente. Para cierto número de pacientes (10 a 70 %), se observan recurrencias clínicas de la enfermedad a una distancia de varios meses de la fase aguda. No existe un tratamiento específico del Chikungunya.

Las leptospirosis son un grupo de bacterias a menudo agrupadas en la especie *Leptospira interrogans* y son responsables de las leptospirosis, zoonosis ubicuas. Recientemente se ha constatado un fuerte aumento del número de casos reportados. En tanto que zoonosis, afecta a animales que viven cerca de los humanos, como las ratas, o el cerdo. La leptospira es un patógeno para el humano.

La leptospirosis hace estragos en muchas partes del mundo, como en la isla Reunión, Wallis y Futuna en las Antillas Occidentales, Guyana, los países tropicales, el sudeste asiático, Camboya, Vietnam y Laos. La leptospira se ha detectado incluso en Poitou Charente, en el sur y suroeste de Francia, cerca de granjas porcinas en regiones húmedas.

Las leptospirosis son bacterias espirales que poseen endoflagelos para moverse. El amplio polimorfismo de síntomas no específicos y la diversidad de los órganos afectados hacen que el diagnóstico clínico sea muy difícil, sobre todo debido a que puede confundirse con una fuerte gripe. Puede comenzar con dolores difusos o localizados (por ejemplo, dolores meníngeos) que, si no se diagnostican a tiempo, conducen a una divagación del habla y del razonamiento. En algunos casos va acompañado de ictericia

Ficha técnica EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

y/o nefritis. Tras diálisis y antibióticos, el paciente se recupera en 5 a 6 semanas si la enfermedad era moderada (aunque aún pueden encontrarse bacterias en la orina del paciente varias semanas después de la desaparición de los síntomas). La leptospirosis también puede progresar hacia hemorragias violentas -a veces letales- o una enfermedad grave de los riñones. Existen muchos serovares (por ejemplo, icterohaemorrhagiae, canicola, pomona) que no presentan una firma antigénica homogénea, lo que hace difícil el diseño de vacunas eficaces.

Según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud, la confirmación biológica de la leptospirosis se basa ya sea en el aislamiento de la bacteria, o bien en la identificación de sus ácidos nucleicos en las muestras biológicas, o incluso en una serología positiva en un contexto clínico y epidemiológico evocador. El uso del cultivo bacteriano es muy limitado debido a sus dificultades de realización y al tiempo necesario para el crecimiento de las bacterias. La detección precoz de la leptospirosis puede realizarse por PCR en tiempo real, en general a partir del plasma o suero preparado a partir de la sangre del paciente. El momento óptimo de la toma de muestra de sangre es antes de 8 días de enfermedad. No tiene sentido realizar el test PCR en tiempo real en sangre más allá de los 10 días después del inicio sintomatológico de la enfermedad (fin del período de bacteriemia). La Alta Autoridad de Salud (HAS por sus siglas en francés) ha indicado que el test PCR simple (no en tiempo real) carece de interés para el diagnóstico biológico específico de la leptospirosis. La HAS considera que la técnica de PCR en tiempo real es actualmente la más interesante para el diagnóstico biológico específico precoz de la leptospirosis. Debe reservarse para los primeros 8 días después de la aparición de la fiebre, realizada sobre una muestra de sangre tomada preferiblemente antes de la implementación de la antibioterapia. Debido a la baja concentración habitual de leptospiras en la sangre, cualquier PCR en tiempo real negativo debe dar lugar a una exploración serológica.

2. Destino del dispositivo

El dispositivo EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire es un test de amplificación por Transcripción inversa seguida de una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), diseñada para la detección cualitativa de la presencia o ausencia de los virus Chikungunya y Dengue y de la bacteria Leptospira en un extracto de ácidos nucleicos.

El test EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire está indicado para ayudar a realizar un diagnóstico de presunción de infección en humanos, o complementar un diagnóstico serológico comprobado o indeterminado. El extracto de ácidos nucleicos es el material de partida para el kit EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire. Los ácidos nucleicos se extraen a partir del plasma, suero u orina de los pacientes.

Este sistema de amplificación ha sido validado en muestras de plasma, suero y orina, y en el control interno endógeno.

El test EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire es un dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*, debe ser utilizado por un personal cualificado de laboratorio de análisis de biología médica. No debe reciclarse después de su uso. Este dispositivo no está destinado a la detección del chikungunya/dengue/leptospira en bancos de sangre u órganos.

Ficha técnica EurobioPlex

Chikungunya/Dengue/Leptospire

3. Símbolos



Referencia catálogo



Código de lote



Límite de temperatura



Fecha límite de utilización



Contenido suficiente para “n” ensayos



Fabricante



Fecha de fabricación



Producto con el marcado CE



Dispositivo Médico de Diagnóstico *In vitro*



Consulta las instrucciones de utilización



Atención



No utilizar si el embalaje está dañado



Conservar al abrigo de la luz del sol

Ficha técnica EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

4. Principio

El dispositivo EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire es un test de amplificación del ácido ribonucleico (ARN) de Chikungunya y Dengue y del ácido nucleico del ADN que codifica el ARN ribosómico y el ARN ribosómico de Leptospira, así como un control interno endógeno de extracción e inhibición de RT-PCR, que utiliza la amplificación por RT-PCR en tiempo real. El test se realiza a partir de ácidos nucleicos extraídos de la muestra por medio de una reacción única en un solo pocillo. Los cebadores y sondas del kit permiten la detección del ARN de los 4 serotipos del Dengue (screening) sin tipificación.

El control interno endógeno de extracción e inhibición de RT-PCR permite garantizar que un resultado negativo no pueda deberse a una mala extracción y/o a la presencia de inhibidores de PCR en una cantidad demasiado grande.

El ARN del virus Chikungunya se detecta con la ayuda de una sonda marcada FAM, el del Dengue se detecta con la ayuda de una sonda marcada HEX. El ARN ribosómico y el ADN que codifica el ARN ribosómico de la leptospira se detectan con la ayuda de una sonda marcada Texas Red. El control interno endógeno de extracción e inhibición de RT-PCR se detecta con la ayuda de una sonda marcada Cy5. Todos emiten una fluorescencia específica.

El dispositivo no está automatizado. Es responsabilidad del usuario utilizar otro equipo distinto a los validados, y en ese caso, las prestaciones no están garantizadas.

Tabla 1: Detección de los objetivos según los fluoróforos.

Objetivo	Fluoróforo	Excitación	Emisión
CHIKUNGUNYA	FAM	495 nm	515 nm
DENGUE	HEX	535 nm	555 nm
LEPTOSPIRA	TEXAS RED	585 nm	605 nm
Control interno endógeno	Cy5	650 nm	670 nm

Canales equivalentes en diferentes instrumentos de PCR:

- Canal FAM (Sistemas ABI, SmartCycler II, Sistemas Mx, Chromo4/CFX96, T-COR 8®-IVD), Canal 510 (LC 480), Canal Green (RotorGene)
- Canal HEX (Chromo 4/CFX96, Sistemas Mx, T-COR 8®-IVD), Canal VIC (Sistemas ABI), Canal Alexa532 (SmartCycler II), Canal 580 (LC 480), Canal Yellow (RotorGene)
- Canal Texas Red (Sistemas ABI, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96™, Sistemas Mx, T-COR 8™-IVD), LC Red 610 (LC480®), Canal Orange (RotorGene)
- Canal Cy5 (Sistemas ABI, Sistemas Mx, Chromo4/CFX96, T-COR 8®-IVD), Canal Alexa647 (SmartCycler II), Canal 660 (LC 480), Canal Red (RotorGene)

Nota: En LC480 instrument II: Aplicar una compensación de color para longitudes de onda FAM-HEX/VIC-Cy5 (465-510,533-580,618-660).

Ficha técnica EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

5. Componentes del kit

El kit de RT-PCR en tiempo real Eurobioplex Chikungunya/Dengue/Leptospire está listo para usar para la detección específica de estos patógenos.

La fluorescencia se emite y mide de manera individual mediante un sistema óptico en el transcurso de la PCR. La detección de los fragmentos amplificados se realiza por mediante un fluorímetro utilizando los canales indicados en la Tabla 1.

El kit contiene los reactivos y las enzimas necesarios para la amplificación del ARN viral de Chikungunya, de Dengue y del ADN codificante para el ARN ribosómico y el ARN ribosómico de Leptospira y del control endógeno de extracción y de inhibición por RT-PCR (Tabla 2).

Tabla 2: Componente del kit

Color del tapón	Contenido del kit	EBX-050 (25 tests)	EBX-050 (50 tests)	EBX-050 (100 tests)	EBX-050 (200 tests)	EBX-050 (600 tests)	Reconstitución
Rojo	Enzimas	225 µl	450 µl	900 µl	2x900 µl	4x1350 µl	Listo para usar
Transparente	Oligomix	80 µL	160 µL	320 µL	2X320 µL	3x640 µL	Listo para usar
Azul	Agua = control negativo (CN-H2O)	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	Listo para usar
Amarillo	Control positivo (CP) Chikungunya/ Dengue/ Leptospira/CI endógeno	75 µl	150 µl	300 µl	2 x 300 µl	3x300 µL	Listo para usar

6. Conservación y almacenamiento

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

Todos los reactivos se pueden utilizar hasta la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta del kit.



Se deben evitar varios ciclos de congelación/descongelación (>5x), ya que esto podría reducir la sensibilidad del análisis.

7. Material requerido no suministrado

- ◇ Campana biológica
- ◇ Aparato de PCR en tiempo real
- ◇ Centrifugadora para microtubos

Ficha técnica EurobioPlex

Chikungunya/Dengue/Leptospire

- ◇ Vórtice
- ◇ Placas / tubos para reacción de PCR en tiempo real
- ◇ Micropipetas
- ◇ Boquillas DNase-free y RNase-free de filtro para micropipetas
- ◇ Microtubos estériles
- ◇ Guantes (sin talco)

8. Instrumento de PCR en tiempo real

El kit EurobioPlex ha sido desarrollado y validado para ser utilizado con el CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) con análisis en CFX Manager versión 3.1 (Bio-Rad) aplicando corrección de deriva, y entre 15 y 45 ciclos (ver §11).

9. Advertencias y precauciones



Lea cuidadosamente estas instrucciones antes de iniciar el protocolo.

- ◇ El kit se envía en hielo seco y los componentes del kit deben llegar congelados. Si uno o varios de los componentes llegan descongelados, o si los tubos han sufrido daños durante el transporte, el técnico no debe utilizar el kit.
- ◇ Este experimento debe ser realizado por técnicos de laboratorio de análisis de biología médica.
- ◇ Asegúrese de que los instrumentos hayan sido instalados, calibrados y mantenidos de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.
- ◇ Las muestras clínicas deben considerarse como material potencialmente infeccioso y deben prepararse bajo una campana de flujo laminar.
- ◇ Esta experimentación debe realizarse según las buenas prácticas de laboratorio.
- ◇ No utilice este kit después de la fecha de vencimiento indicada.
- ◇ Evite los ciclos de congelación/descongelación de los reactivos, esto puede conducir a una reducción de la sensibilidad del test.
- ◇ Evite la exposición prolongada a la luz de los reactivos, limitada al tiempo técnico necesario para la preparación de la placa PCR, de lo contrario no se garantizan las prestaciones.
- ◇ Una vez descongelados los reactivos, centrifugar brevemente los tubos antes de su utilización.
- ◇ Para cargas virales muy fuertes ($Ct < 15$), se puede observar una curva de amplificación en forma de campana. Se trata de una señal positiva. Al desmarcar el análisis a partir de 15 ciclos, la curva presenta una apariencia clásica de amplificación exponencial.
- ◇ Se recomienda definir tres zonas de trabajo distintas: 1) Aislamiento de ácidos nucleicos, 2) Preparación de la mezcla de reacción y 3) Amplificación/Detección de productos amplificados.
- ◇ Utilice batas y guantes (sin talco) distintos en cada zona de trabajo.
- ◇ Las pipetas, los reactivos y otros materiales de trabajo no deben circular entre estas zonas.
- ◇ Se debe prestar especial atención para conservar la pureza de los reactivos y las mezclas de reacción.
- ◇ Deben utilizarse métodos apropiados de preparación/extracción de ácidos nucleicos para una producción de ARN/ADN de calidad y una aplicación de RT-PCR, en particular para evitar cualquier riesgo de contaminación con RNasas/DNasas.

Ficha técnica EurobioPlex

Chikungunya/Dengue/Leptospire

- ◇ Utilice boquillas con filtro para micropipetas, RNase-free y DNase-free.
- ◇ No pipetee con la boca. No coma, beba ni fume en el laboratorio.
- ◇ Evite los aerosoles.
- ◇ El kit no está destinado para un solo uso. Al reutilizar el dispositivo, es necesario seguir las recomendaciones relativas a los ciclos de congelación-descongelación autorizados, y las precauciones para evitar la contaminación de los reactivos.
- ◇ Los componentes del kit no deben utilizarse por separado (ni con otros reactivos ni con los reactivos de otros lotes).
- ◇ El dispositivo no está automatizado. Es responsabilidad del usuario utilizar otro equipo distinto a los validados, y en ese caso, las prestaciones no están garantizadas.
- ◇ La descongelación de los reactivos se debe realizar de manera que se alteren las prestaciones del dispositivo (a +2°C/+8°C o a temperatura ambiente).

10. Protocolo

10.9 Recogida de muestras

- ◇ Recoger las muestras en tubos estériles. Para una extracción de los ácidos nucleicos a partir de suero, recoja las muestras en tubos secos; para una extracción a partir de plasma, recoja las muestras en tubos EDTA.
 - ◇ El plasma lipémico puede inducir a una inhibición de PCR, impidiendo la detección de los patógenos
-  **La utilización de heparina como anticoagulante está prohibida.**
- ◇ Corresponde al usuario controlar sus propias condiciones de recogida, transporte, conservación y extracción de las muestras para que la extracción de los ácidos nucleicos mediante sistemas adaptados produzca ácidos nucleicos de calidad.
 - ◇ Se recomienda que las muestras se extraigan inmediatamente o se conserven según las recomendaciones de almacenamiento de las muestras antes de su extracción (Tabla 3).
 - ◇ Las referencias bibliográficas de la sección « 15. Bibliografía » proporcionan datos indicativos sobre la estabilidad de las muestras y de los ARNs.

Tabla 3: recomendaciones de almacenamiento de la sangre antes de la preparación del plasma o suero, y de almacenamiento del plasma, suero y orina antes de la extracción

Recomendaciones de almacenamiento de la sangre total (antes de la preparación del plasma y el suero)	
<24h	
Recomendaciones de almacenamiento máximas de las muestras (orina, plasma o suero) antes de la extracción	
Temperatura ambiente	2h
+2°C/+8°C	5 días
<-70°C (preferiblemente a -20°C)	Almacenamiento a largo plazo (>5 días y máximo 2 meses a -20°C)

Ficha técnica EurobioPlex

Chikungunya/Dengue/Leptospire

Atención	
	◇ El usuario puede remitirse a las recomendaciones emitidas por la Organización Mundial de la Salud o por la Alta Autoridad de Salud para la buena conservación de las muestras. ◇ Los ácidos nucleicos extraídos deben almacenarse a <-70°C para garantizar su estabilidad. Más allá de un año de almacenamiento de ARN a <-70 °C, o si se almacenan a -20 °C, los Ct obtenidos puede aumentar. Se recomienda volver a extraer una muestra biológica almacenada durante más de un año. Se recomienda limitar a 3 el número de descongelaciones de ARNs. ◇ El transporte de las muestras clínicas está sujeto a las regulaciones locales para el transporte de agentes infecciosos.

10.10 Extracción de ácidos nucleicos

Corresponde a los usuarios cerciorarse de que el sistema de extracción de los ácidos nucleicos utilizado sea compatible con la tecnología de RT-PCR en tiempo real. Para la presente caja, recomendamos utilizar métodos de extracción de ácidos nucleicos a partir de muestras de plasma, suero u orina y remitirse a las instrucciones del proveedor del kit de extracción utilizado.

Las prestaciones, incluidos los patógenos interferentes, tal como se describen en el § 13 del presente documento, se han obtenido con las siguientes técnicas de extracción: columnas Qiagen (QIAamp Ultrasens Virus kit Ref: 53704), o extractor EZ1 (Qiagen) o Maelstrom TANbeads (Taiwan Adadvanced Nanotech).

10.11 Realización de la RT-PCR en tiempo real

Observación general:

El control positivo, así como el control interno endógeno y de inhibición por RT-PCR contienen concentraciones elevadas de matriz. Las manipulaciones deben realizarse con precaución para evitar cualquier contaminación. Para controlar el correcto funcionamiento de la PCR, es necesario probar el control positivo (CP) así como un control negativo (agua suministrada = CN-H2O) (ver II-2/6) del protocolo RT-PCR en tiempo real).

Ficha técnica EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

Esquema del procedimiento:

1 - PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE REACCIÓN / MASTERMIX

Número de reacciones	N+3
Enzimas	(N+3) x 7.5 µl
Oligomix	(N+3) x 2.5 µl
Volumen total Mastermix	(N+3) x 10µl



2 - PREPARACIÓN DE LAS REACCIONES

Muestra

10 µl de Mastermix
+
5 µl de muestra extraída

Control positivo (CP)

10 µl de Mastermix
+
5µl CP

Control negativo (CN-H2O)

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



3 – INSTRUMENTO PCR EN TIEMPO REAL

Programa	Temperatura	Duración	Ciclo(s)	
Transcripción inversa	45 °C	5 min	1	-
Desnaturalización	98 °C	20 seg	1	-
Amplificación	98 °C	3 seg	45	-
	58 °C	45 seg		Adquisición de fluorescencia

Ver 11. Validación de la experimentación para los Settings (ajustes) detallados con drift correction (corrección de deriva) y análisis entre 15 y 45 ciclos.

Ficha técnica EurobioPlex

Chikungunya/Dengue/Leptospire

10.12 Protocolo detallado

- 5) Homogeneizar el tubo de Enzimas, agitar el Oligomix y luego centrifugar.
- 6) Preparar el Mastermix como se indica a continuación, siendo N el número de reacciones, prever la cantidad de Mastermix para N+3 reacciones como mínimo.

Número de reacciones	N+3
Enzimas	(N+3) x 7.5 µl
Oligomix	(N+3) x 2.5 µl
Volumen total Mastermix	(N+3) x 10µl

- 3) Homogeneizar el Mastermix preparado en 2) y centrifugar brevemente.
 - 16) Distribuir 10 µL de Mastermix con la ayuda de una micropipeta y de boquillas de filtro en cada tubo/pocillo de microplaca para PCR en tiempo real.
 - 17) Añadir 5 µL de muestra extraída.
 - 18) En paralelo realizar los siguientes controles:
 - Control positivo: 10 µl Mastermix + 5 µl control positivo CP.
 - Control negativo: 10 µl de Mastermix + µl de agua suministrada (CN-H2O)
 - 19) Cerrar inmediatamente con film adhesivo o tapones transparentes para evitar cualquier contaminación.
 - 20) Centrifugar brevemente para recoger la mezcla de reacción en el fondo de los tubos o de los pocillos de la microplaca.
 - 21) Realizar el siguiente programa en el instrumento de PCR en tiempo real.
- Duración aproximada: 1:10 h

Programa	Temperatura	Duración	Ciclo(s)	
Transcripción inversa	45 °C	5 min	1	-
Desnaturalización	98 °C	20 seg	1	-
Amplificación	98 °C	3 seg	45	-
	58 °C	45 seg		Adquisición de fluorescencia

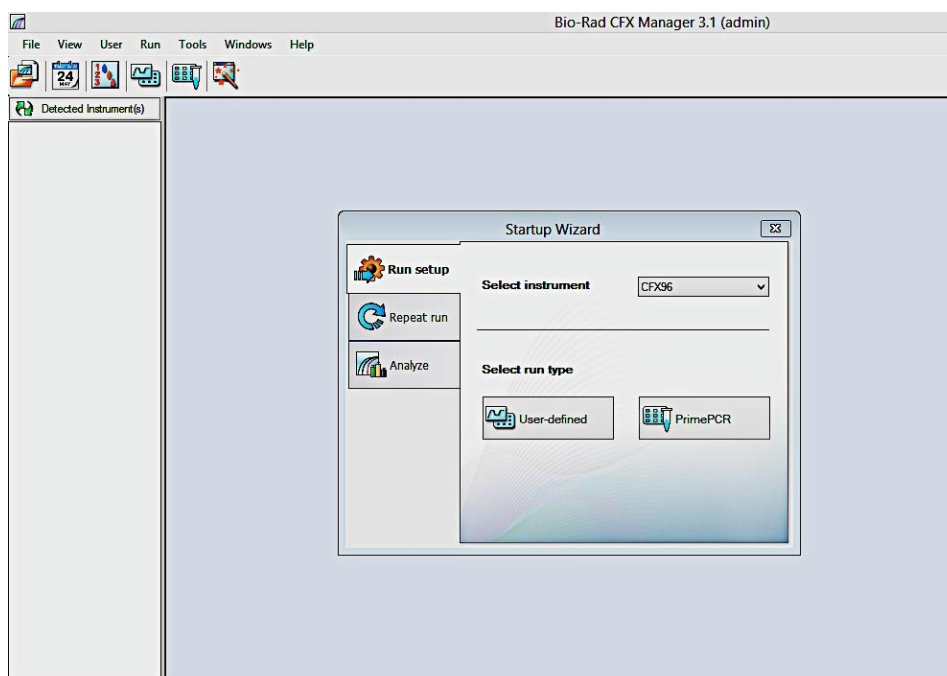
Nota: En CFX96 (Bio-Rad), iniciar la ejecución desde la versión 1.6 o posterior, y luego analizar con la versión 3.1 (**ver 11.Validación de la experimentación para los Settings (ajustes) detallados con drift correction (corrección de deriva) y análisis entre 15 y 45 ciclos**).

Ficha técnica EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

11. Validación de la experimentación

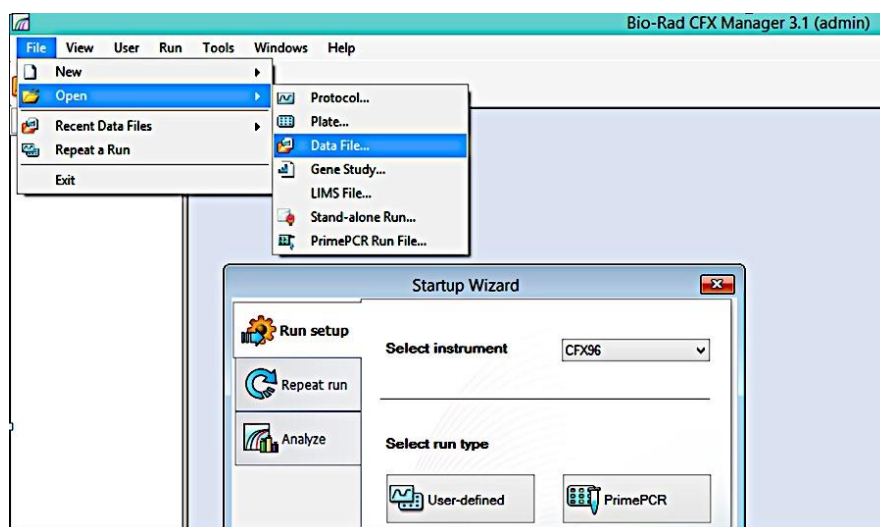
El análisis de los datos post-adquisición en un aparato de PCR CFX96 (Bio-Rad) debe realizarse con la ayuda de la versión 3.1 del software CFX Manager (Bio-Rad). Para pasar a esta versión a partir de un run (ejecución) lanzado en una versión anterior, siga el siguiente procedimiento: al final del run, el archivo de datos con el sufijo .pcrd debe abrirse y procesarse con la versión 3.1 del CFX Manager (Bio-Rad).

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



- Haga clic en File y seleccione Open y luego Data File.

Ficha técnica EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

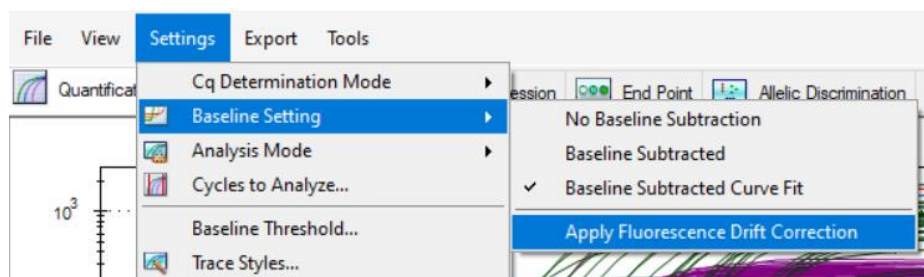


- Seleccione el archivo que desea analizar y haga clic en Open (abrir).

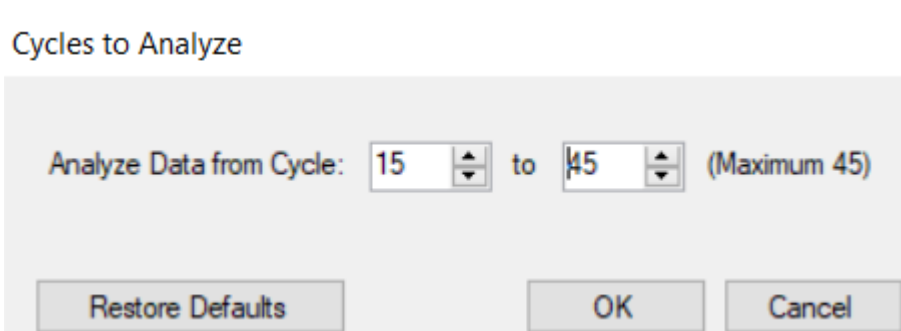


En la pestaña « Settings » :

➔ La opción « drift correction » debe aplicarse como en la siguiente imagen: haga clic en la pestaña Settings, luego en Baseline Setting y en Apply Fluorescence Drift Correction.



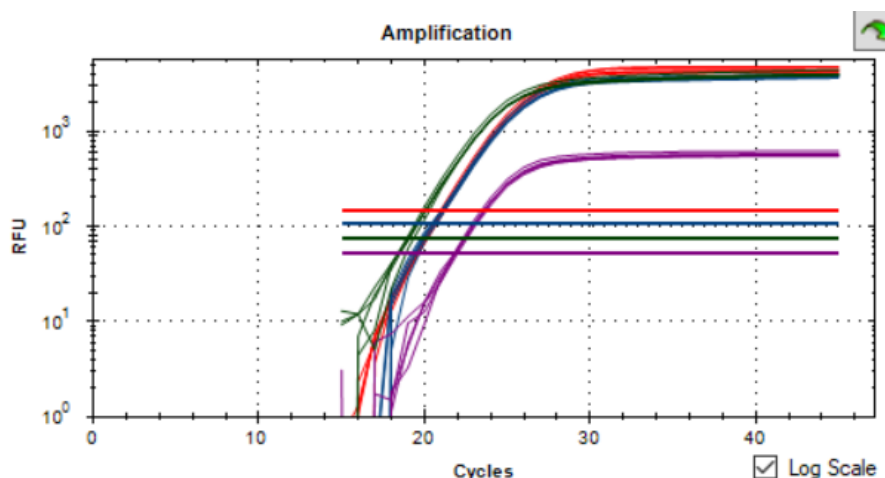
➔ Para « cycles to analyze », el análisis se realiza entre 15 y 45 ciclos, como en el siguiente diagrama:



- **Luego, para el análisis**, en Log Scale (Escala log), coloque los umbrales entre la parte inferior y la mitad de las curvas exponenciales del CP, como se muestra a continuación. Una vez realizada esta etapa, se puede comenzar el análisis en los canales FAM, HEX, Texas Red y Cy5.

Ficha técnica EurobioPlex

Chikungunya/Dengue/Leptospire



Amplificación Ciclos

Para que la dosis sea válida, los valores de Ct para los controles deben ser los siguientes (Tabla 4). Fuera de estos valores, la experimentación no se puede validar.

Tabla 4: Especificaciones a validar para los controles positivos y negativos del kit.

Control positivo	
Canal FAM	Ct ≤ 28
Canal HEX	Ct ≤ 28
Canal Texas Red	Ct ≤ 28
Canal CY5	Ct ≤ 30
Control negativo	
Canal FAM	Ct no determinado
Canal HEX	Ct no determinado
Canal Texas Red	Ct no determinado
Canal CY5	Ct no determinado o > 35

12. Análisis de los datos e interpretación

En lo que respecta al control endógeno de extracción y de inhibición de RT-PCR en las muestras, el correcto funcionamiento de la reacción RT-PCR se puede evaluar en el canal Cy5 midiendo el control endógeno. Se pueden obtener diferentes escenarios:

1/ el test de control interno endógeno de extracción e inhibición de RT-PCR es positivo y Ct ≤ 35: los ácidos nucleicos se han extraído correctamente y no existen inhibidores de RT-PCR. El resultado se puede validar.

Ficha técnica EurobioPlex

Chikungunya/Dengue/Leptospire

2/ el test de control interno endógeno para la extracción e inhibición de RT-PCR es negativo/no determinado o Ct > 35: ya sea los ácidos nucleicos no se extrajeron bien, o la transcripción inversa no funcionó bien, o la presencia de inhibidores de PCR inhibe la reacción de PCR . Esto puede producirse en el caso de un plasma lipémico. Se recomienda repetir la extracción o diluir la muestra, salvo que aparezca una señal específica en los 3 canales FAM, HEX o Texas Red.

Para las muestras clínicas, los resultados de la Tabla 5 son posibles.

Tabla 5: Análisis e interpretación de los resultados de las muestras clínicas.

Umbral de positividad para FAM/HEX/Texas Red: Ct ≤ 45

Chikungunya	Dengue	Leptospira	Control interno endógeno	Validez del test/Interpretación
FAM	HEX	Texas Red	CY5	
+	-	-	Ct ≤ 35	SÍ: Presencia de ácidos nucleicos de Chikungunya, Negativos para Dengue y Leptospira
-	+	-	Ct ≤ 35	SÍ: Presencia de ácidos nucleicos de Dengue, Negativo para Chikungunya y Leptospira
-	-	+	Ct ≤ 35	SÍ: Presencia de ácidos nucleicos de Leptospira; Negativo para Chikungunya y Dengue
+	+	-	Ct ≤ 35	SÍ: Presencia de ácidos nucleicos de Chikungunya y Dengue, Negativo para Leptospira
-	+	+	Ct ≤ 35	SÍ: Presencia de ácidos nucleicos de Dengue y Leptospira, Negativo para Chikungunya
+	-	+	Ct ≤ 35	SÍ: Presencia de ácidos nucleicos de Chikungunya y Leptospira, Negativo para Dengue
+	+	+	Ct ≤ 35	SÍ: Presencia de los 3 objetivos
-	-	-	Ct ≤ 35	SÍ: Ausencia de los 3 objetivos
-/+	-/+	-/+	Ct ND o > 35	SÍ para los objetivos positivos. NI para todos los objetivos negativos

NI: no interpretable debido a la inhibición de RT-PCR o problema de extracción: no se puede dar una conclusión definitiva sobre los 3 objetivos. **Se recomienda entonces realizar una nueva toma de muestra y/o repetir la extracción y/o diluir la muestra 5 veces.**

ND: no determinado

Ficha técnica EurobioPlex

Chikungunya/Dengue/Leptospire

13. Análisis de las prestaciones

Límite de detección/sensibilidad analítica

La sensibilidad de EBX-050 para Chikungunya se determinó utilizando el Patrón Internacional (1st World Health Organization International Standard for Chikungunya virus RNA for Nucleic acid amplification techniques (NAT)-based assays PEI code : 11785/16) extraído de Maelstrom TANbeads8 y del Amplirun Chikungunya virus RNA control (Vircell) sobre 3 lotes de kits.

La sensibilidad de EBX-050 para los 4 serotipos de Dengue se determinó a partir de los Amplirun cuantificados Dengue1, Dengue 2, Dengue 3 y Dengue 4 virus RNA control (Vircell) sobre 3 lotes de kits.

La sensibilidad de EBX-050 para leptospira se determinó a partir de un cultivo bacteriano titulado de *Leptospira interrogans* serovar *Canicola* extraído de Maelstrom TANbeads8 sobre 3 lotes de kits.

Para determinar el LOD_{95%}, se realizó un análisis Probit: se realizó una gama de dilución a partir de una mezcla plasmídica de los 3 objetivos y se probó en 24 réplicas para cada concentración.

Tabla 6: Sensibilidad analítica

	LOD _{100%} sobre CP	LOD _{95%} sobre CP		LOD _{100%} sobre ARN
Chikungunya	50 copias/μl	8,8 copias/μl	Chikungunya sobre WHO Standard	7,5 IU/μl eluido
			Chikungunya sobre ARN control	55 copias/μl eluido
Dengue	5 copias/μl	3 copias/μl	Dengue 1 sobre ARN control	3 copias/μl eluido
			Dengue 2 sobre ARN control	10 copias/μl eluido
			Dengue 3 sobre ARN control	30 copias/μl eluido
			Dengue 4 sobre ARN control	30 copias/μl eluido
Leptospira	50 copias/μl	7,8 copias/μl	Leptospira sobre cultivo bacteriano titulado	500 bacterias/μl eluido (95% para 250 bacterias/μl eluido)

Los tests se realizaron sobre CFX96 (Bio-Rad).

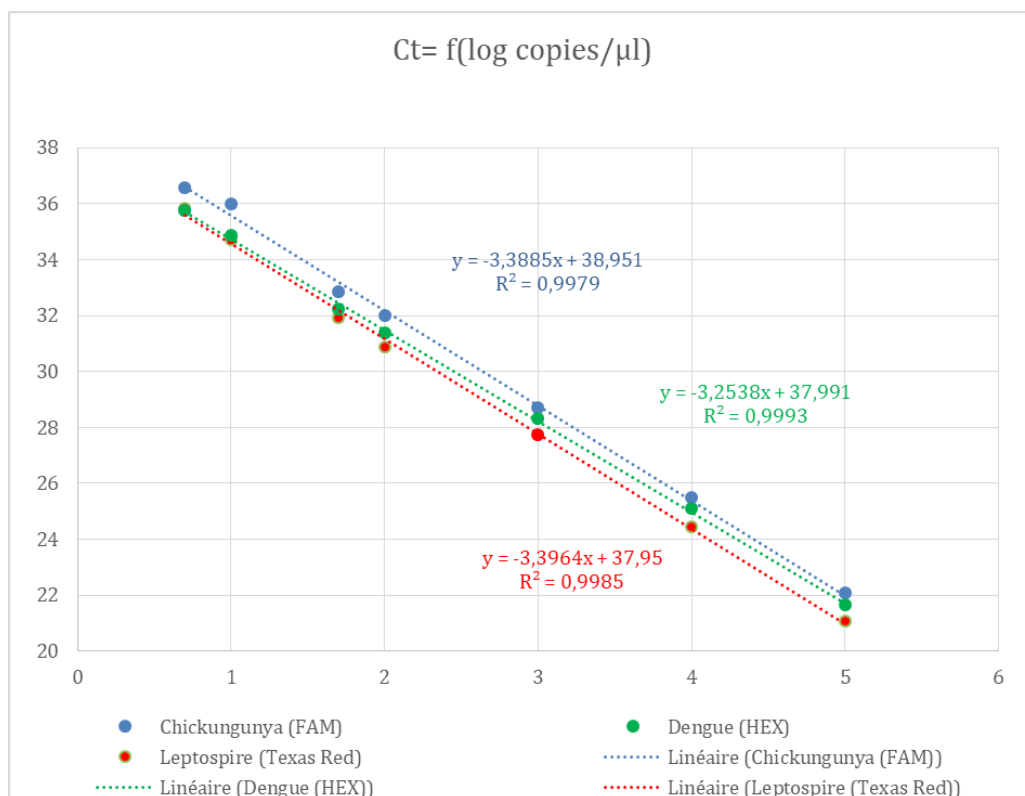
Linealidad

De 5 a 10⁵ copias/μl de CP para los 3 objetivos.

	Eficacia PCR %	Pendiente	R ²
Chikungunya/FAM	97,29	-3,39	0,998
Dengue/HEX	102,92	-3,25	0,999
Leptospira/Texas Red	96,98	-3,40	0,999

Ficha técnica EurobioPlex

Chikungunya/Dengue/Leptospire



Linéaire = Lineal

Detección de diferentes cepas de Leptospira

Las siguientes cepas fueron probadas y detectadas con EBX-050.

- *Leptospira inadai* serovar *Lyme strain 10*
- *Leptospira borgpetersenii* serovar *Javanica veldrat*
- *Leptospira weilli* serovar *Celladoni*
- *Leptospira wolbachii* serovar *Codice*
- *Leptospira genomospecies5/yanagawae* serovar *Saopaulo*
- *Leptospira interrogans* serovar *Icterohaemorrhagiae*
- *Leptospira alexanderi* serovar *Ranarum*
- *Leptospira kirschneri* serovar *Cynopteri strain 3522C*
- *Leptospira fainei* serovar *Hurstbridge strain BUT6*
- *Leptospira santarosai* serovar *Shermani strain 1342K*
- *Leptospira noguchii*

Variabilidad de la señal de RT-PCR para los canales del Chikungunya (FAM), del Dengue (HEX) y de Leptospira (Texas Red)

La reproducibilidad de EBX-050 se determinó en ARN Amplirun cuantificados de Chikungunya, Dengue 2, virus RNA control (Viracell) y ácidos nucleicos extraídos de la bacteria *Leptospira interrogans* serovar *Canicola*, sobre 3 lotes de kits.

Ficha técnica EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

Tabla 7: Repetibilidad y reproducibilidad

	Coeficiente de variación (CV %) intra-run	Coeficiente de variación (CV %) inter- run	Coeficiente de variación (CV%) inter- lotes
Chikungunya	0,89	0,45	1,14
Dengue serotipo 1	0,99	3,00	1,79
Dengue serotipo 2	1,93	1,70	1,12
Dengue serotipo 3	2,64	2,20	1,17
Dengue serotipo 4	3,14	1,67	1,21
Leptospira	0,06	1,44	1,09

Los tests se realizaron sobre CFX96 (Bio-Rad).

Prestaciones diagnósticas

Los ensayos se realizaron sobre muestras precaracterizadas positivas o negativas : 265 sueros, 21 plasma-EDTA, 28 orinas, 6 sangre-total -EDTA. Los números de positivos y negativos se detallan en la Tabla 8.

Para este estudio, la extracción de las muestras se realizó en Maelstrom TANbeads (Taiwan Advanced Nanotech). Los tests se realizaron sobre CFX96 (Bio-Rad).

Tabla 8: Tablas de contingencia de las prestaciones diagnósticas

EBX-050 Chikungunya				
		POS	NEG	TOTAL
Caracterizados pre test Chikungunya	POS	8	0	8
	NEG	0	141	141
	TOTAL	8	141	149
EBX-050 Dengue				
		POS	NEG	TOTAL
Caracterizados pre test Dengue	POS	144	3	147
	NEG	0	83	83
	TOTAL	144	86	230
EBX-050 Leptospira				
		POS	NEG	TOTAL
Caracterizado pre test Leptospira	POS	49	3	52
	NEG	0	60	60
	TOTAL	49	63	112

Ficha técnica EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospira

Las prestaciones de sensibilidad y especificidad diagnósticas son por lo tanto:

Tabla 9: Sensibilidad y especificidad diagnósticas

	Chikungunya	Dengue	Leptospira
Sensibilidad diagnóstica (%)	>99%	98% [intervalo de confianza (IC) al 95%: 94,6%-99,9%]	94 % [intervalo de confianza (IC) al 95%: 87,9%-100%]
Especificidad diagnóstica (%)	>99%	>99%	>99%

Ausencia de reacción cruzada con otros patógenos.

El sistema chikungunya y leptospira se ha probado experimentalmente y no reacciona de forma cruzada con los siguientes patógenos:

- HEV
- Parechovirus tipo 1
- Norovirus GI
- Norovirus GII
- HHV6
- HSV1
- HSV2
- VZV
- EBV
- Zikavirus
- Mayaro virus
- *Legionella*
- *Coxiella*
- *Bartonella henselae*
- *Bartonella quintana*
- *Clostridium difficile*

Cibles de multimarqueur RP 1	Cibles de multimarqueur RP 2
Influenza A H3N2 (Brisbane/10/07)	Influenza A H1 (Nouvelle Calédonie/20/99)
Influenza A H1N1 (NY/02/2009)	Influenza B (Florida/02/06)
Rhinovirus (Type 1A)	VRS (Type A)
Adénovirus (Type 3)	Parainfluenza (Type 2)
Parainfluenza (Type 1)	Parainfluenza (Type 3)
Parainfluenza (Type 4)	Coronavirus (HKU-1 recombinant)
Métapneumovirus (Pérou 6-2003)**	Coronavirus (OC43)
C. pneumoniae (CWL-029)	Coronavirus (NL63)
M. pneumoniae (M129)	Coronavirus (229E)
Virus Cocksackie (Type A1)	Bordetella pertussis (A639)

Objetivos multimarqueur RP 1	Objetivos multimarqueur RP 2
Influenza A H3N2 (Brisbane/10/07)	Influenza A H1 (Nueva Caledonia/20/99)
Influenza A H1N1 (NY/02/2009)	Influenza B (Florida/02/06)
Rhinovirus (Tipo 1A)	VRS (Tipo A)
Adenovirus (Tipo 3)	Parainfluenza (Tipo 2)
Parainfluenza (Tipo 1)	Parainfluenza (Tipo 3)
Parainfluenza (Tipo 4)	Coronavirus (HKU-1 recombinante)
Metapneumovirus (Perú 6-2003)**	Coronavirus (OC43)
C. pneumoniae (CWL-029)	Coronavirus (NL63)
M pneumoniae (M129)	Coronavirus (229E)
Virus Cocksackie (Tipo A1)	Bordetella pertussis (A639)

Ficha técnica EurobioPlex

Chikungunya/Dengue/Leptospire

El sistema Dengue ha sido probado experimentalmente y no tiene reacciones cruzadas con el chikungunya, la leptospira, HEV o zikavirus.

Un análisis *in silico* global se realizó durante el diseño e indica la ausencia de posibles reacciones cruzadas.

Un análisis *in silico* específico demostró una ausencia de reacciones cruzadas potenciales, en particular, para el virus Usutu, el Nilo Occidental/West Nile virus, la encefalitis japonesa/Japanese encephalitis virus, la encefalitis por garrapata/Tick encephalitis virus, la fiebre amarilla/Yellow fever virus, la encefalitis de San Luis/Saint Louis encephalitis virus, la hepatitis A/Hepatitis A virus, la hepatitis C/Hepatitis C virus.

14. Control de calidad

De acuerdo con el sistema de gestión de calidad de Eurobio, certificado ISO EN 13485, cada lote de EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire se prueba según especificaciones predefinidas para garantizar una calidad constante de los productos.

15. Bibliografía

- Alta Autoridad de Salud: Criopreservación de tejidos, células y líquidos biológicos resultantes del tratamiento, Recomendaciones de buenas prácticas, HAS / Servicio de buenas prácticas profesionales / Septiembre de 2009; www.has-santé.fr.
- Organización Mundial de la Salud. <https://iris.who.int/handle/10665/334254>. Test de diagnóstico del SARS-CoV-2/Diagnostic testing for SARS-CoV-2: consejos provisionales/interim guidance, 11 de septiembre de 2020. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- Fleige Simone, Pfaffl Michael W. Molecular Aspects of Medicine 27 (2006) 126–139. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance (review).
- Alfaro-Núñez Alonzo, Stephanie Crone, Shila Mortensen, Maiken Worsøe Rosenstjerne, Anders Fomsgaard, Ellinor Marving, Sofie Holdflod Nielsen, Michelle Grace Pinto Jørgensen, Charlotta Polacek, Arie S. Cohen, Claus Nielsen, Transbound Emerg Dis. 2022;69:189–194 SARS-CoV-2 RNA stability in dry swabs for longer storage and transport at different temperatures
- Yu Keke, Jie Xing, Jie Zhang, Ruiying Zhao, Ye Zhang, Lanxiang Zhao, Effect of multiple cycles of freeze-thawing on the RNA quality of lung cancer tissues Cell Tissue Bank 2017 Sep;18(3):433-44

16. Eliminación de los residuos

Eliminar todos los residuos de acuerdo con la legislación sobre los DASRI.

17. Declaración de incidente

Cualquier incidente grave que ocurra en relación con el dispositivo deberá ser objeto de una

Ficha técnica EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

notificación a EUROBIO SCIENTIFIC y a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido el usuario y/o el paciente.

18. Asistencia técnica

Para obtener una asistencia sobre nuestros productos, le agradeceremos contactar con nuestro soporte técnico.

Puede comunicarse con el servicio de atención al cliente de EUROBIO SCIENTIFIC por vía electrónica (correo electrónico), en la dirección adv@eurobio-scientific.com o por teléfono al +33 (0)1.69.07.94.77.



7 avenue de Scandinavie
ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis
FRANCIA

Scheda tecnica EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire



EurobioPlex *Chikungunya/Dengue/Leptospira* **RT-PCR IN TEMPO REALE**

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

EBX-050-25 (per 25 reazioni)

EBX-050-50 (per 50 reazioni)



EBX-050-100 (per 100 reazioni)

EBX-050-200 (per 200 reazioni)

EBX-050-600 (per 600 reazioni)



25/50/100/200/600 reazioni



EBX-050 V 1.02 – 16/12/2024

Validato su:

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) con analisi su CFX Manager versione 3.1 (Bio-Rad)



Scheda tecnica

Disponível a pedido em info@eurobio-scientific.com

La *Sintesi delle caratteristiche di sicurezza e di prestazione clinica (SSCP)* sarà messa a disposizione dall'organismo notificato su EUDAMED non appena quest'ultima sarà operativa. Può anche essere ottenuta su richiesta.

Scheda tecnica EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

Indice

ENGLISH.....	1
FRANCAIS.....	24
ESPANOL.....	48
ITALIANO	68
1. Informazioni generali.....	70
2. Destinazione del dispositivo	71
3. Simboli	72
4. Premessa.....	73
5. Componenti del kit	74
6. Conservazione e stoccaggio.....	74
7. Attrezzatura necessaria non fornita	74
8. Strumento per PCR in tempo reale.....	75
9. Avvertenze e precauzioni	75
10. Protocollo	76
10.1 Raccolta dei campioni	76
10.2 Estrazione degli acidi nucleici	77
10.3 Esecuzione della RT- PCR in tempo reale.....	77
10.4 Protocollo dettagliato	79
11. Convalida dell'esperimento.....	80
12. Analisi dei dati e interpretazione	82
13. Analisi delle performance	84
14. Controllo qualità.....	88
15. Bibliografia.....	88
16. Smaltimento dei rifiuti	88
17. Incident reporting.....	89
18. Assistenza tecnica.....	89

Scheda tecnica EurobioPlex

Chikungunya/Dengue/Leptospire

1. Informazioni generali

I virus della Chikungunya e della Dengue sono degli Arthropod-Borne virus (Arbovirus), trasmessi da artropodi (zanzare, zecche, pappataci etc.). Il virus della Dengue appartiene alla famiglia dei *Flaviviridae*, quello della Chikungunya degli *Alphaviridae* della famiglia dei *Togaviridae*. Sono trasmessi da diverse specie di zanzare del genere *Aedes*, fra cui *aegypti* (principalmente in America tropicale e subtropicale e nel sud-est degli Stati Uniti) e *albopictus* (principalmente in Asia), *furcifer*, *africanus*, *taylori* e *luteophaeus* con una distribuzione mondiale, in particolare nelle regioni tropicali. Le due prime specie vengono attualmente identificate come i principali vettori epidemici a causa del loro adattamento alle zone di insediamento umano. In Francia, le regioni del sud sono quelle maggiormente colpite.

Sono 4 i sierotipi della Dengue noti (DENV 1-4). Il genoma della Dengue è costituito da un RNA a singolo filamento. La replicazione del virus e la trascrizione avvengono nel citoplasma della cellula ospite. La malattia esordisce con febbre, mialgie e artralgie. Nella maggior parte dei casi, l'infezione non presenta complicazioni, tuttavia, nel 20% dei casi può portare ad altre condizioni più gravi e a volte potenzialmente fatali, soprattutto in caso di infezioni secondarie, con shock emorragico, poiché un'infezione di un ceppo non protegge l'ospite da un'infezione con un altro ceppo.

Il virus della Chikungunya (CHIKV) è un piccolo virus rivestito di forma sferica di RNA a singolo filamento di circa 12 kbp. La fase viremica dell'infezione da Chikungunya dura in media da 3 a 10 giorni. I principali sintomi clinici sono costituiti dall'insorgenza improvvisa di febbre alta (> 40 °C) che si protrae per 24-48 ore, accompagnata da artralgie e mialgie, da poliartralgie molto dolorose che coinvolgono principalmente le articolazioni delle estremità quali polsi, caviglie o falangi, con tumefazione articolare marcata, manifestazioni cutanee di tipo rash maculo-papuloso, eritematoso o edemi. Le infezioni da CHIKV possono progredire in malattia cronica. I sintomi sono simili a quelli della malaria, dell'infezione da Dengue e non è raro trovare entrambi contemporaneamente. Per un determinato numero di pazienti (dal 10 al 70%), si osservano ricorrenze cliniche della malattia a distanza di qualche mese dalla fase acuta. Non esistono trattamenti specifici per la Chikungunya.

Le leptospire invece, sono un gruppo di batteri spesso raggruppati nella specie *Leptospira interrogans* e sono all'origine delle leptosirosi e delle zoonosi ubiquitarie. Recentemente è stato rilevato un aumento esponenziale del numero di casi segnalati. Come zoonosi, colpisce gli animali che vivono a contatto con gli esseri umani, fra cui il topo o il maiale. La *Leptospira* è patogena per l'uomo.

La leptosirosi affligge diverse parti del mondo, tra cui l'isola della Réunion, Wallis e Futuna nelle Antille, in Guyana, nei paesi tropicali, nel sud-est asiatico, in Cambogia, Vietnam, Laos. La *Leptospira* è stata individuata anche nel Poitou Charente, nel sud e sud-ovest della Francia in prossimità di allevamenti suini in zone umide.

Le leptospire sono batteri di forma elicoidale dotati di endoflagelli che ne consentono il movimento. L'ampio polimorfismo sintomatologico aspecifico e la varietà di organi coinvolti rendono la diagnosi clinica molto difficile, in particolare per il fatto che è possibile confonderla con una forte influenza. L'esordio può manifestarsi con algie diffuse o localizzate (ad es., segni meningei) che, se non diagnosticate in tempo, conducono ad uno stato di eloquio confuso e compromissione cognitiva. In alcuni casi, i sintomi sono accompagnati da ittero e/o nefrite. Dopo dialisi e terapia antibiotica, il paziente recupera in 5-6 settimane se la patologia è stata di moderata intensità (nonostante alcuni

Scheda tecnica EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

batteri possano ancora essere presenti nell'urina del paziente per diverse settimane dopo la scomparsa dei sintomi). La leptospirosi può anche progredire verso emorragie violente - talvolta letali - o una grave patologia renale. Esistono diversi sierotipi (icterohaemorrhagiae, canicola, pomona, ad esempio) che non presentano una firma antigenica omogenea, rendendo quindi difficile lo sviluppo di vaccini efficaci.

Stando alle raccomandazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, la conferma biologica della leptospirosi si fonda o sull'isolamento del batterio, o sull'identificazione dei relativi acidi nucleici nei campioni biologici, oppure su una sierologia positiva in un contesto clinico ed epidemiologico indicativo. L'uso della coltura batterica è molto limitato a causa delle difficoltà di realizzazione e del tempo necessario per la crescita batterica. La diagnosi precoce di leptospirosi può essere fatta mediante PCR in tempo reale, generalmente partendo dal plasma o dal siero preparato dal sangue del paziente. Il momento migliore per il prelievo di sangue è durante la prima settimana (8 giorni) dall'insorgenza dei sintomi della malattia. Non c'è motivo di effettuare il test PCR in tempo reale del sangue trascorsi 10 giorni dalla comparsa della sintomatologia della malattia (termine del periodo di batteriemia). La Haute Autorité de Santé (HAS) ha affermato che il test PCR semplice (non in tempo reale) non ha alcuna rilevanza nella diagnosi biologica specifica della leptospirosi. La HAS stima che la tecnica della PCR in tempo reale sia attualmente la più interessante per la diagnosi biologica specifica tempestiva della leptospirosi. Dev'essere limitata ai primi 8 giorni dalla comparsa della febbre, effettuata su un campione ematico raccolto preferibilmente prima della somministrazione della terapia antibiotica. Data la concentrazione solitamente bassa di leptospire nel sangue, qualsiasi PCR in tempo reale negativa deve essere seguita da una ricerca sierologica.

2. Destinazione del dispositivo

Il dispositivo EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospira è un test di amplificazione seguito da reazione a catena della polimerasi-transcriptasi inversa in tempo reale (RT-PCR), destinato alla rilevazione qualitativa della presenza o dell'assenza dei virus Chikungunya e Dengue e del batterio Leptospira in un estratto di acidi nucleici.

Il test EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospira è indicato per contribuire alla diagnosi presuntiva di infezione nell'uomo, o per integrare una diagnosi sierologica accertata o indeterminata. L'estratto di acidi nucleici rappresenta il materiale di partenza per il kit EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospira. Gli acidi nucleici sono estratti partendo dal plasma, dal siero o dalle urine dei pazienti.

Questo sistema di amplificazione è stato validato su campioni di plasma, di siero e di urina e sul controllo interno endogeno.

Il test EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospira è un dispositivo medico-diagnostico *in vitro* il cui uso è riservato al personale di laboratorio di analisi di biologia clinica qualificato. Non riciclare il dispositivo dopo l'uso. Il dispositivo non è destinato allo screening del Chikungunya/Dengue/Leptospira presso la banca del sangue o degli organi.

Scheda tecnica EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

3. Simboli



Numero di catalogo



Codice del lotto



Limite di temperatura



Data di scadenza



Contenuto sufficiente per «n» test



Fabbricante



Data di fabbricazione



Producto con el marcado CE



Dispositivo Médico de Diagnóstico *In vitro*



Consultare le istruzioni per l'uso



Attenzione



Non usare se la confezione è danneggiata



Tenere al riparo dalla luce solare

Scheda tecnica EurobioPlex

Chikungunya/Dengue/Leptospire

4. Premessa

Il dispositivo EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospira è un test di amplificazione dell'acido ribonucleico (RNA) di Chikungunya e Dengue e dell'acido nucleico DNA codificante per un RNA ribosomiale e l'RNA ribosomiale di Leptospira, nonché di un controllo interno endogeno di estrazione e inibizione della RT-PCR che impiega l'amplificazione mediante RT-PCR in tempo reale. Il test viene effettuato partendo dagli acidi nucleici estratti dal campione mediante una reazione unica in un singolo pozzetto. I primer e le sonde del kit consentono il rilevamento dell'RNA dei 4 sierotipi della Dengue (screening) senza tipizzazione.

Il controllo interno endogeno di estrazione e inibizione della RT-PCR garantisce che un risultato negativo non possa essere dovuto a un'estrazione errata e/o alla presenza di inibitori della PCR in quantità eccessiva.

L'RNA del virus Chikungunya viene rilevato mediante una sonda marcata FAM, quello della Dengue viene rilevato mediante una sonda marcata HEX. L'RNA ribosomiale e il DNA codificante per l'RNA ribosomiale di Leptospira vengono rilevati mediante una sonda marcata Texas Red. Il controllo interno endogeno di estrazione e inibizione della RT-PCR viene rilevato mediante una sonda marcata Cy5. Tutte emettono una fluorescenza specifica.

Il dispositivo non è automatizzato. L'utilizzo di apparecchiature diverse da quelle approvate è responsabilità dell'utente e, in questo caso, le performance non sono garantite.

Tabella 1: Rilevamento dei target basato su fluorocromi

Target	Fluorocromo	Eccitazione	Emissione
CHIKUNGUNYA	FAM	495 nm	515 nm
DENGUE	HEX	535 nm	555 nm
LEPTOSPIRA	TEXAS RED	585 nm	605 nm
Controllo interno endogeno	Cy5	650 nm	670 nm

Canali equivalenti su diversi strumenti di PCR:

- Canale FAM (Sistemi ABI, SmartCycler II, Sistemi Mx, Chromo4/CFX96, T-COR 8®-IVD), Canale 510 (LC 480), Canale Green (RotorGene)
- Canale HEX (Chromo 4/CFX96, Sistemi Mx, T-COR 8®-IVD), Canale VIC (Sistemi ABI), Canale Alexa532 (SmartCycler II), Canale 580 (LC 480), Canale Yellow (RotorGene)
- Canale Texas Red (Sistemi ABI, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96™, Sistemi Mx, T-COR 8™-IVD), LC Red 610 (LC480®), Canale Orange (RotorGene)
- Canale Cy5 (Sistemi ABI, Sistemi Mx, Chromo4/CFX96, T-COR 8®-IVD), Canale Alexa647 (SmartCycler II), Canale 660 (LC 480), Canale Red (RotorGene)

Nota: Su LC480 strumento II: Applicare una compensazione di colore per le lunghezze d'onda FAM-HEX/VIC-Cy5 (465-510, 533-580, 618-660).

Scheda tecnica EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

5. Componenti del kit

Il kit RT-PCR in tempo reale EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospira è pronto per l'uso per la rilevazione specifica di questi patogeni.

La fluorescenza viene emessa e misurata individualmente da un sistema ottico durante la PCR. La rilevazione dei frammenti amplificati viene effettuata mediante un fluorimetro, usando i canali indicati nella Tabella 1.

Il kit contiene i reagenti e gli enzimi necessari all'amplificazione dell'RNA virale della Chikungunya, della Dengue e del DNA codificante per l'RNA ribosomiale e l'RNA ribosomiale di Leptospira e del controllo endogeno di estrazione e inibizione mediante RT-PCR (tabella 2).

Tabella 2: Componenti del kit

Colore del tappo	Contenuto del kit	EBX-050 (25 test)	EBX-050 (50 test)	EBX-050 (100 test)	EBX-050 (200 test)	EBX-050 (600 test)	Ricostituzione
Rosso	Enzimi	225 µl	450 µl	900 µl	2x900 µl	4x1350 µl	Pronto all'uso
Trasparente	Oligomix	80 µl	160 µl	320 µl	2x320 µl	3x640 µl	Pronto all'uso
Blu	Acqua = controllo negativo (CN-H2O)	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	Pronto all'uso
Giallo	Controllo positivo (CP) Chikungunya/ Dengue/ Leptospira/ CI endogeno	75 µl	150 µl	300 µl	2x300 µl	3x300 µl	Pronto all'uso

6. Conservazione e stoccaggio

Tutti i reagenti devono essere conservati a una temperatura fra -15 °C e -22 °C.

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

⚠ È necessario evitare più cicli di congelamento/scongelamento (> 5x) poiché ciò potrebbe ridurre la sensibilità dell'analisi.

7. Attrezzatura necessaria non fornita

- ◇ Cappa biologica
- ◇ Apparecchio per PCR in tempo reale
- ◇ Centrifuga per microprovette

Scheda tecnica EurobioPlex

Chikungunya/Dengue/Leptospire

- ◇ Vortex
- ◇ Piastre/provette per reazione PCR in tempo reale
- ◇ Micropipette
- ◇ Puntali DNase-free e RNase-free con filtro per micropipette
- ◇ Microprovette sterili
- ◇ Guanti (senza talco)

8. Strumento di PCR in tempo reale

Il kit EurobioPlex è stato sviluppato e validato per essere utilizzato con il CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) con analisi su CFX Manager versione 3.1 (Bio-Rad) applicando la drift correction, e tra 15 e 45 cicli (cfr. §11.).

9. Avvertenze e precauzioni



Leggere attentamente le seguenti istruzioni prima di avviare il protocollo

- ◇ Il kit viene spedito sotto ghiaccio secco e i componenti del kit devono pervenire congelati. Qualora uno o più componenti arrivino scongelati, o qualora le provette siano state danneggiate durante il trasporto, il tecnico non deve utilizzare il kit.
- ◇ Questa sperimentazione deve essere effettuata da tecnici di laboratorio di analisi di biologia clinica.
- ◇ Accertarsi che gli strumenti siano stati installati, calibrati e mantenuti in base alle raccomandazioni del fabbricante.
- ◇ I campioni clinici vanno considerati come materiale potenzialmente infettivo e devono essere preparati sotto una cappa a flusso laminare.
- ◇ Questa sperimentazione deve essere effettuata secondo le buone prassi di laboratorio.
- ◇ Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza indicata.
- ◇ Evitare i cicli di congelamento/scongelamento dei reagenti, ciò può comportare una diminuzione della sensibilità del test.
- ◇ Evitare l'esposizione prolungata alla luce dei reagenti, limitata al tempo tecnico necessario alla preparazione della piastra PCR; in caso contrario, le performance non sono garantite.
- ◇ Una volta scongelati i reagenti, centrifugare brevemente le provette prima dell'uso.
- ◇ Per cariche virali molto intense ($Ct < 15$), è possibile osservare una curva di amplificazione a campana. È evidentemente un segnale di positività. Deselezionando l'analisi a partire da 15 cicli, la curva presenta il classico andamento dell'amplificazione esponenziale.
- ◇ Si raccomanda la definizione di tre aree di lavoro distinte: 1) Isolamento degli acidi nucleici, 2) preparazione della miscela di reazione, e 3) Amplificazione/rilevazione dei prodotti amplificati.
- ◇ Indossare camici e guanti (senza talco) diversi in ogni area di lavoro.
- ◇ Le pipette, i reagenti e altri materiali di lavoro non devono circolare tra queste aree.
- ◇ Prestare particolare attenzione nella conservazione della purezza dei reagenti e delle miscele di reazione.

Scheda tecnica EurobioPlex

Chikungunya/Dengue/Leptospire

- ◇ Devono essere impiegati metodi appropriati di preparazione/estrazione degli acidi nucleici per una produzione di RNA/DNA di qualità e l'applicazione della RT-PCR, in particolare onde evitare qualsiasi rischio di contaminazione con gli RNases/DNases.
- ◇ Utilizzare dei puntali con filtro per micropipette, RNase-free e DNase-free.
- ◇ Non pipettare con la bocca. Non mangiare, né bere o fumare in laboratorio.
- ◇ Evitare gli aerosol.
- ◇ Il kit non è destinato al monouso. Al momento di riutilizzare il dispositivo, è necessario attenersi alle raccomandazioni relative ai cicli di congelamento-scongelo autorizzati, nonché alle precauzioni per prevenire la contaminazione dei reagenti.
- ◇ I componenti del kit non devono essere utilizzati separatamente (né con altri reagenti, né con reagenti di altri lotti).
- ◇ Il dispositivo non è automatizzato. L'utilizzo di apparecchiature diverse da quelle approvate è responsabilità dell'utente e, in questo caso, le performance non sono garantite.
- ◇ Lo scongelamento dei reagenti dev'essere gestito in maniera tale da non alterare le performance del dispositivo (a + 2 °C/+ 8 °C o a temperatura ambiente).

10. Protocollo

10.13 Raccolta dei campioni

- ◇ Raccogliere i campioni in provette sterili. Per l'estrazione degli acidi nucleici partendo dal siero, raccogliere i campioni in provette asciutte; per l'estrazione partendo dal plasma, raccogliere i campioni in provette EDTA.
- ◇ Un plasma lipemico può indurre un'inibizione della PCR, impedendo la rilevazione dei patogeni.
- ⚠ **È vietato l'uso dell'eparina come anticoagulante.**
- ◇ Spetta all'utente gestire le condizioni di raccolta, trasporto, conservazione ed estrazione dei campioni affinché l'estrazione degli acidi nucleici con sistemi adeguati produca acidi nucleici di qualità.
- ◇ Si raccomanda che i campioni vengano estratti immediatamente o conservati secondo le raccomandazioni di conservazione dei campioni prima dell'estrazione (Tabella 3).
- ◇ I riferimenti bibliografici nella sezione «15. Bibliografia» forniscono dei dati indicativi sulla stabilità dei campioni e degli RNA.

Tabella 3: raccomandazioni per la conservazione del sangue prima della preparazione del plasma o del siero, e per la conservazione di plasma, siero e urine prima dell'estrazione

Raccomandazioni di conservazione del sangue intero (prima della preparazione del plasma e del siero)	
< 24h	
Raccomandazioni di conservazione massima dei campioni (urine, plasma o siero) prima dell'estrazione	
Temperatura ambiente	2h
+2 °C +8 °C	5 giorni
<-70 °C (auspicabile a -20 °C)	Conservazione a lungo termine (> 5 giorni e massimo 2 mesi a -20 °C)

Scheda tecnica EurobioPlex

Chikungunya/Dengue/Leptospire

Attenzione	
	◇ L'utente può fare riferimento alle raccomandazioni formulate dall'Organizzazione Mondiale della Sanità o dalla Haute Autorité de Santé per la corretta conservazione dei campioni. ◇ Gli acidi nucleici estratti devono essere conservati a < -70 °C al fine di garantirne la stabilità. Trascorso un anno dalla conservazione degli RNA a < -70 °C, o se conservati a -20 °C, i Ct ottenuti possono aumentare. Si consiglia di estrarre nuovamente un campione biologico conservato da più di un anno. Si consiglia di limitare il numero di scongelamenti di RNA a 3. ◇ Il trasporto dei campioni clinici è sottoposto alla normativa locale relativa al trasporto di agenti infettivi.

10.14 Estrazione degli acidi nucleici

Spetta agli utenti garantire che il sistema di estrazione degli acidi nucleici utilizzato sia compatibile con la tecnologia della RT-PCR in tempo reale. Per questo set, si raccomanda di utilizzare dei metodi di estrazione degli acidi nucleici partendo da campioni di plasma, siero o urine, e di fare riferimento alle istruzioni del fornitore del kit di estrazione utilizzato.

Le performance, inclusi i patogeni interferenti, fra cui quelli descritti al § 13 del presente documento, sono state ottenute mediante le tecniche di estrazione seguenti: colonne Qiagen ((QIAamp Ultrasens Virus Rif. kit: 53704), o estrattore EZ1 (Qiagen) o Maelstrom TANbeads (Taiwan Advanced Nanotech).

10.15 Esecuzione della RT- PCR in tempo reale

Osservazioni di carattere generale :

Il controllo positivo nonché il controllo interno endogeno di estrazione e inibizione mediante RT-PCR contengono concentrazioni elevate di matrice. La manipolazione deve essere effettuata con cautela onde evitare la contaminazione. Al fine di verificare il corretto funzionamento della PCR, è necessario testare il controllo positivo (CP) nonché un controllo negativo (acqua fornita = CN-H₂O) (vedere II-2/6) del protocollo della RT-PCR in tempo reale).

Scheda tecnica EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

Schema della procedura:

1 - PREPARAZIONE DELLA MISCELA DI REAZIONE/MASTERMIX

Numero di reazioni	N+3
Enzimi	(N+3) x 7,5 µl
Oligomix	(N+3) x 2,5 µl
Volume totale Mastermix	(N+3) x 10 µl



2 - PREPARAZIONE DELLE REAZIONI

Campione

10 µl di Mastermix
+
5 µl campione estratto

Controllo positivo (CP)

10 µl di Mastermix
+
5 µl CP

Controllo negativo (CN-H2O)

10 µl di Mastermix
+
5 µl acqua per biologia molecolare (CN-H2O)



3 - STRUMENTO PCR INTEMPO REALE

Programma	Temperatura	Durata	Ciclo(i)	
Trascrittasi inversa	45 °C	5 min	1	-
Denaturazione	98 °C	20 sec	1	-
Amplificazione	98 °C	3 sec	45	-
	58 °C	45 sec		Acquisizione di fluorescenza

Vedere 11. Convalida dell'esperimento per i Setting dettagliati con drift correction e analisi tra 15 e 45 cicli.

Scheda tecnica EurobioPlex

Chikungunya/Dengue/Leptospire

10.16 Protocollo dettagliato

- 7) Omogeneizzare la provetta degli enzimi e agitare con il Vortex l'Oligomix, quindi centrifugare.
- 8) Preparare il Mastermix come segue, dove N è il numero di reazioni; prevedere la quantità di Mastermix per N+3 reazioni minimo.

Numero di reazioni	N+3
Enzimi	(N+3) x 7,5 µl
Oligomix	(N+3) x 2,5 µl
Volume totale Mastermix	(N+3) x 10 µl

- 22) Omogeneizzare il Mastermix preparato in 2) e centrifugare brevemente.
 - 23) Con l'aiuto di una micropipetta e di puntali con filtro, distribuire 10 µl di Mastermix in ogni provetta/pozzetto della micropiastra per PCR in tempo reale.
 - 24) Aggiungere 5 µl di campione estratto.
 - 25) Contemporaneamente, eseguire i seguenti controlli:
 - Controllo positivo: 10 µl Mastermix + 5 µl di controllo positivo CP.
 - Controllo negativo: 10 µl di Mastermix + 5 µl di acqua fornita (CN-H₂O)
 - 26) Chiudere immediatamente con una pellicola adesiva o tappi trasparenti onde evitare qualsiasi contaminazione.
 - 27) Centrifugare brevemente per raccogliere la miscela di reazione dal fondo delle provette o dei pozzetti della piastra di microtitolazione.
 - 28) Effettuare il seguente programma sullo strumento PCR in tempo reale.
- Durata approssimativa: 1h10

Programma	Temperatura	Durata	Ciclo(i)	
Trascrittasi inversa	45 °C	5 min	1	-
Denaturazione	98 °C	20 sec	1	-
Amplificazione	98 °C	3 sec	45	-
	58 °C	45 sec		Acquisizione di fluorescenza

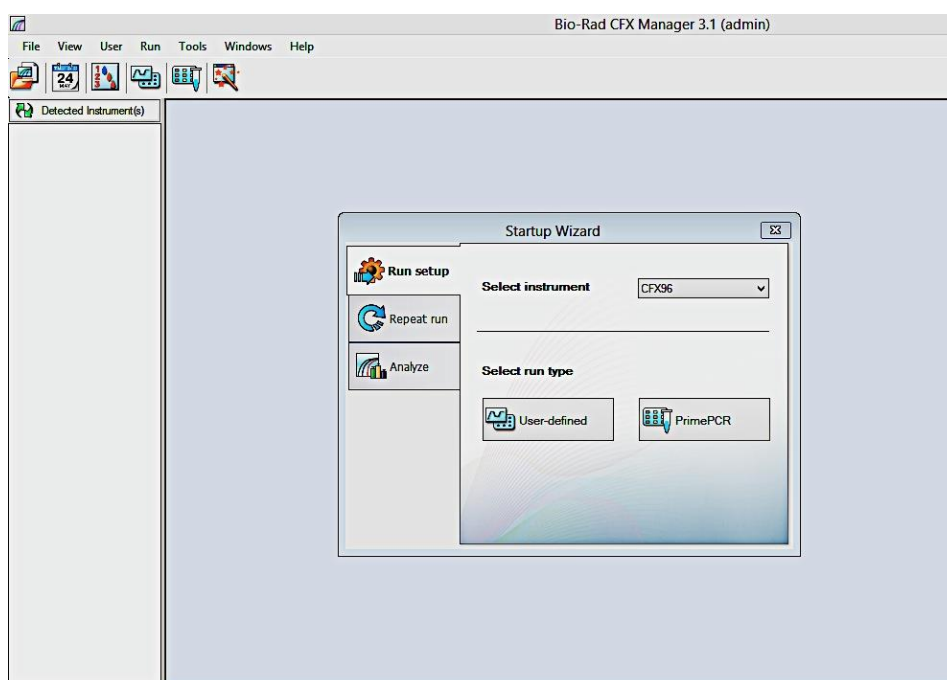
Nota: Su CFX96 (Bio-Rad), avviare il Run a partire dalla versione 1.6 o successiva, quindi analizzare con la versione 3.1 (**vedere 11. Convalida dell'esperimento per i Setting dettagliati con drift correction e analisi tra 15 e 45 cicli.**).

Scheda tecnica EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

11. Convalida dell'esperimento

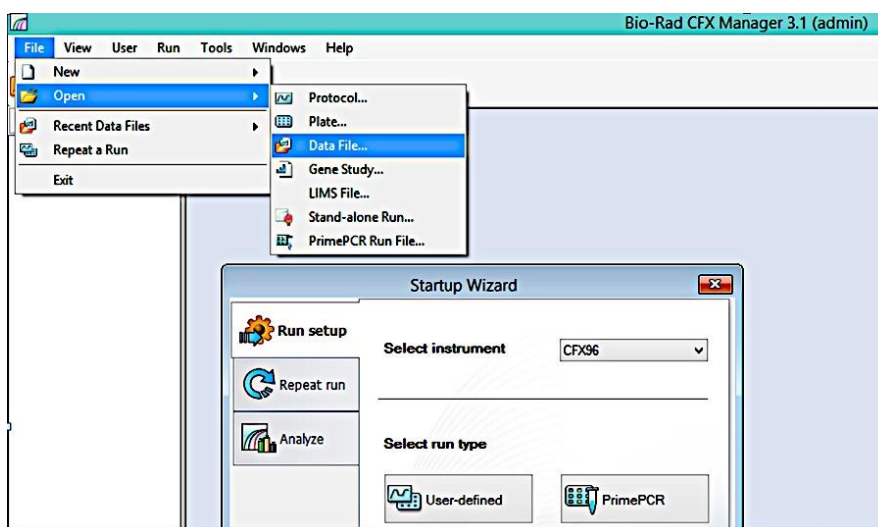
L'analisi dei dati post-acquisizione su un apparecchio per PCR CFX96 (Bio-Rad) deve essere effettuata usando la versione 3.1 del software CFX Manager (Bio-Rad). Per passare a questa versione da un Run avviato su una versione precedente, attenersi alla procedura che segue: al termine del Run, il file di dati con suffisso .pcrd deve essere aperto ed elaborato con la versione 3.1 del CFX Manager (Bio-Rad).

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



- Fare clic su File e selezionare Open, quindi Data File.

Scheda tecnica EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

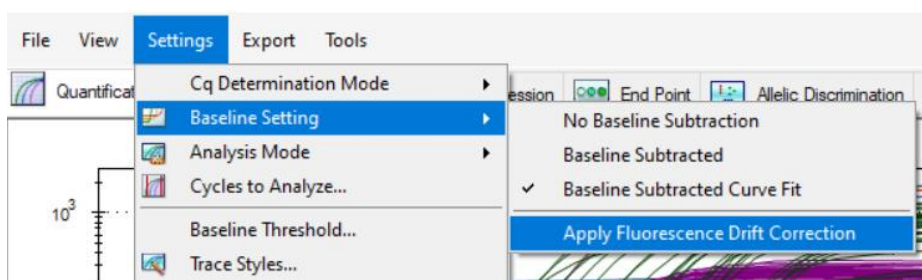


- Selezionare il file che si desidera analizzare e fare clic su Open.

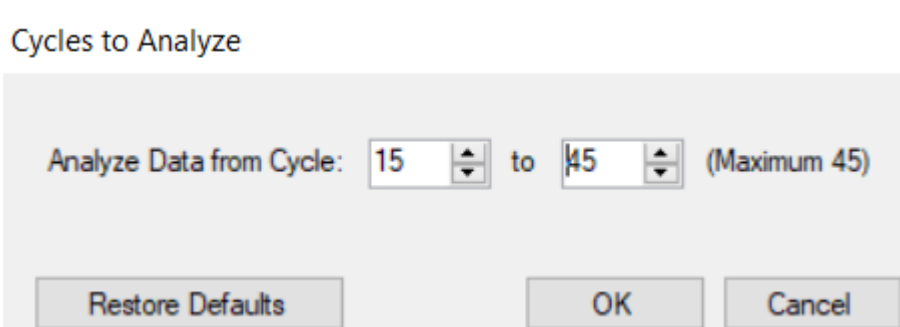


Nel tab «Settings»:

→ L'opzione «drift correction» deve essere applicata come nell'immagine che segue: fare clic sul tab Settings, quindi su Baseline Setting e su Apply Fluorescence Drift Correction.



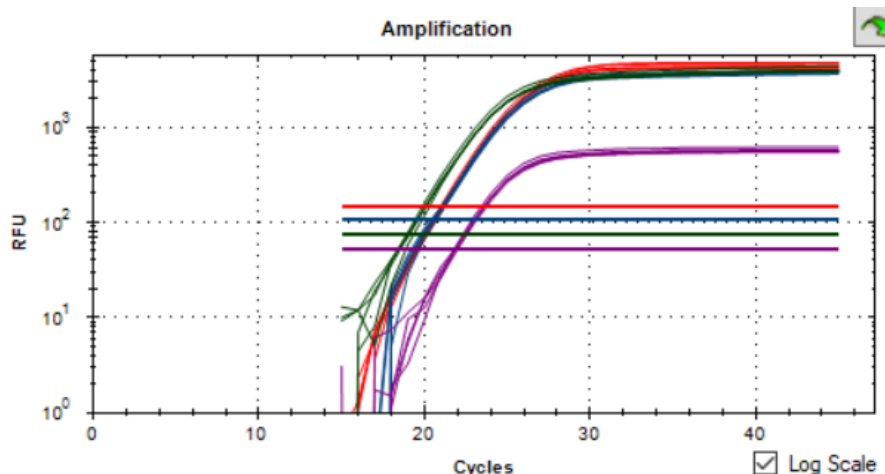
→ Per «cycles to analyze», l'analisi viene eseguita tra i 15 e i 45 cicli, secondo lo schema seguente:



Scheda tecnica EurobioPlex

Chikungunya/Dengue/Leptospire

- **Quindi, per l'analisi**, in Log scale, posizionare i threshold tra la parte inferiore e centrale delle curve esponenziali del CP, come indicato di seguito. Una volta completata questa fase, l'analisi può iniziare nei canali FAM, HEX, Texas Red e Cy5.



Affinché il dosaggio sia valido, i valori di Ct per i controlli devono essere i seguenti (Tabella 4). Al di fuori di questi valori, l'esperimento non può essere validato.

Tabella 4 : Specifiche da validare per i controlli positivi e negativi del kit

Controllo positivo	
Canale FAM	Ct ≤ 28
Canale HEX	Ct ≤ 28
Canale Texas Red	Ct ≤ 28
Canale Cy5	Ct ≤ 30
Controllo negativo	
Canale FAM	Ct non determinato
Canale HEX	Ct non determinato
Canale Texas Red	Ct non determinato
Canale Cy5	Ct non determinato o > 35

12. Analisi dei dati e interpretazione

Per quanto riguarda il controllo endogeno di estrazione e inibizione della RT-PCR nei campioni, la corretta applicazione della reazione della RT-PCR può essere valutata sul canale Cy5 misurando il controllo endogeno. È possibile ottenere diversi risultati:

Scheda tecnica EurobioPlex

Chikungunya/Dengue/Leptospire

1/ il test del controllo interno endogeno di estrazione e inibizione della RT-PCR è positivo e $Ct \leq 35$; gli acidi nucleici sono stati estratti correttamente e non sono presenti inibitori della RT-PCR. Il risultato può essere validato.

2/ il test del controllo interno endogeno di estrazione e inibizione della RT-PCR è negativo/non determinato o $Ct > 35$: o l'estrazione degli acidi nucleici non è stata effettuata correttamente, o la trascrittasi inversa non è andata completamente a buon fine, o la presenza di inibitori della PCR inibisce la reazione della PCR stessa. Questo può verificarsi nel caso di plasma lipemico. Si raccomanda di ripetere l'estrazione o di diluire il campione, a meno che non appaia un segnale specifico nei 3 canali FAM, HEX o Texas Red.

Per i campioni clinici, i risultati della Tabella 5 sono plausibili.

Tabella 5: Analisi e interpretazione dei risultati dei campioni clinici

Soglia di positività per FAM/HEX/Texas Red: $Ct \leq 45$

Chikungunya	Dengue	Leptospira	Controllo interno endogeno	Validità del test/Interpretazione
FAM	HEX	Texas Red	Cy5	
+	-	-	$Ct \leq 35$	Sì: Presenza di acidi nucleici di Chikungunya, Negativo per Dengue e Leptospira
-	+	-	$Ct \leq 35$	Sì: Presenza di acidi nucleici della Dengue, Negativo per Chikungunya e Leptospira
-	-	+	$Ct \leq 35$	Sì: Presenza di acidi nucleici della Leptospira; Negativo per Chikungunya e Dengue
+	+	-	$Ct \leq 35$	Sì: Presenza di acidi nucleici di Chikungunya e Dengue, Negativo per Leptospira
-	+	+	$Ct \leq 35$	Sì: Presenza di acidi nucleici di Dengue e Leptospira, Negativo per Chikungunya
+	-	+	$Ct \leq 35$	Sì: Presenza di acidi nucleici di Chikungunya e Leptospira, Negativo per Dengue
+	+	+	$Ct \leq 35$	Sì: Presenza dei 3 target
-	-	-	$Ct \leq 35$	Sì: Assenza dei 3 target
-/+	-/+	-/+	$Ct \text{ ND o } > 35$	Sì per i target positivi. NI per tutti i target negativi

Scheda tecnica EurobioPlex

Chikungunya/Dengue/Leptospire

NI: non interpretabile a causa di inibizione della RT-PCR o problema di estrazione: non può essere formulata nessuna conclusione definitiva sui 3 target. **Si raccomanda quindi di effettuare un nuovo prelievo e/o di ripetere l'estrazione e/o di diluire il campione 5 volte.**

ND: non determinato

13. Analisi delle performance

Limite di rilevazione/sensibilità analitica

La sensibilità di EBX-050 per Chikungunya è stata determinata partendo dallo Standard internazionale (1st World Health Organization International Standard for Chikungunya virus RNA for Nucleic acid amplification techniques (NAT)-based assays PEI code: 11785/16) estratto su Maelstrom TANbeads8, e da Amplirun Chikungunya virus RNA control (Vircell) su 3 lotti di kit.

La sensibilità di EBX-050 per i 4 sierotipi della Dengue è stata determinata partendo dagli Amplirun quantificati Dengue 1, Dengue 2, Dengue 3 e Dengue 4 virus RNA control (Vircell) su 3 lotti di kit.

La sensibilità di EBX-050 per la Leptospira è stata determinata partendo da una coltura batterica titolata di *Leptospira interrogans* sierotipo *Canicola* estratta su Maelstrom TANbeads8 su 3 lotti di kit.

Al fine di determinare la LOD_{95%}, è stata effettuata un'analisi Probit: è stata eseguita una serie di diluizioni partendo da una miscela plasmidica dei 3 target, e testata in 24 replicati per ogni concentrazione.

Tabella 6: Sensibilità analitica

	LOD _{100%} su CP	LOD _{95%} su CP		LOD _{100%} su RNA
Chikungunya	50 copie/μl	8,8 copie/μl	Chikungunya su standard OMS	7,5 IU/μl eluato
			Chikungunya su standard OMS	55 copie/μl eluato
Dengue	5 copie/μl	3 copie/μl	Dengue 1 su controllo RNA	3 copie/μl eluato
			Dengue 2 su controllo RNA	10 copie/μl eluato
			Dengue 3 su controllo RNA	30 copie/μl eluato
			Dengue 4 su controllo RNA	30 copie/μl eluato
Leptospira	50 copie/μl	7,8 copie/μl	Leptospira su coltura batterica titolata	500 batteri/μl eluato (95% per 250 batteri/μl eluato)

I test sono stati effettuati su CFX96 (Bio-Rad)

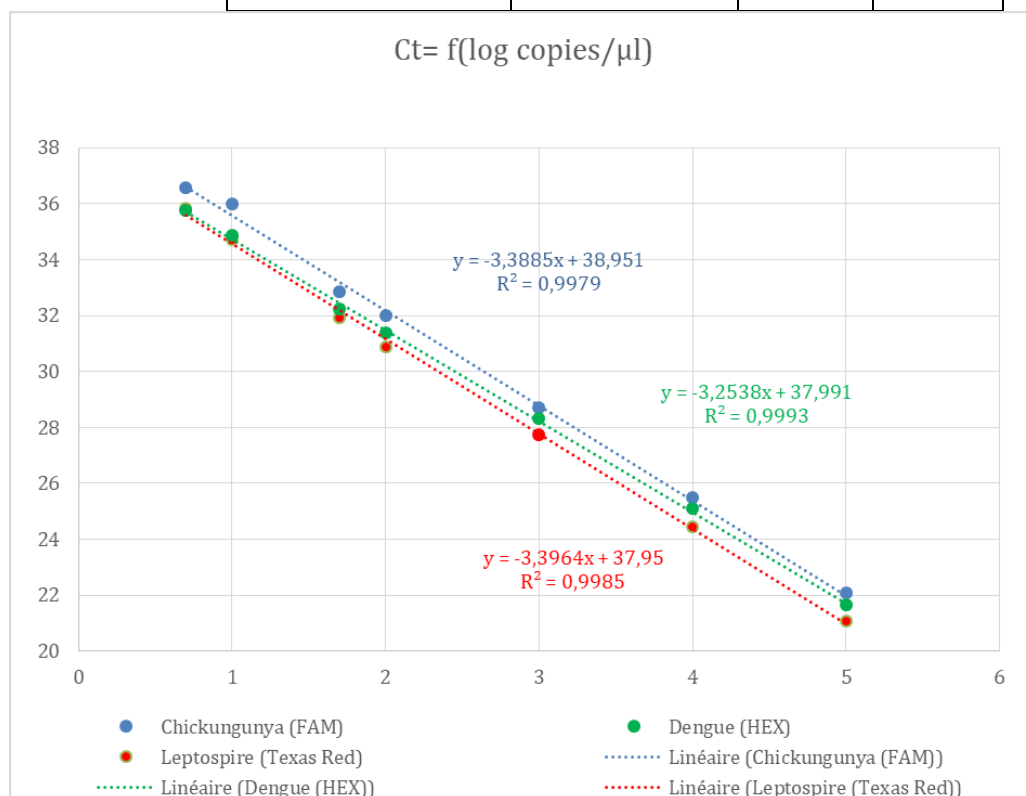
Scheda tecnica EurobioPlex

Chikungunya/Dengue/Leptospire

Linearità

Da 5 a 10^5 copie/ μ l di CP per i 3 target.

	Efficacia PCR %	Pendenza	R ²
Chikungunya/FAM	97,29	-3,39	0,998
Dengue/HEX	102,92	-3,25	0,999
Leptospira/Texas Red	96,98	-3,40	0,999



Rilevazione dei diversi ceppi di Leptospira

I ceppi che seguono sono stati testati e rilevati con EBX-050.

- *Leptospira inadai* sierotipo Lyme strain 10
- *Leptospira borgpetersenii* sierotipo Javanica veldrat
- *Leptospira weilli* sierotipo Celladoni
- *Leptospira wolbachii* sierotipo Codice
- *Leptospira genomospecies5/yanagawae* sierotipo Saopaulo
- *Leptospira interrogans* sierotipo Icterohaemorrhagiae
- *Leptospira alexanderi* sierotipo Ranarum
- *Leptospira kirschneri* sierotipo Cynopteri strain 3522C
- *Leptospira fainei* sierotipo Hurstbridge strain BUT6
- *Leptospira santarosai* serovar Shermani strain 1342K
- *Leptospira noguchii*

Scheda tecnica EurobioPlex

Chikungunya/Dengue/Leptospire

Variabilità del segnale della RT-PCR per i canali della Chikungunya (FAM), della Dengue (HEX) e di Leptospira (Texas Red)

La riproducibilità di EBX-050 è stata determinata su degli RNA Amplirun quantificati Chikungunya, Dengue 2, virus RNA control (Vircell) e di acidi nucleici estratti dal batterio *Leptospira interrogans* sierotipo *Canicola*, su 3 lotti di kit.

Tabella 7: Ripetibilità e riproducibilità

	Coefficiente di variazione (CV%) intra-run	Coefficiente di variazione (CV%) inter-run	Coefficiente di variazione (CV%) inter-lotti
Chikungunya	0,89	0,45	1,14
Dengue sierotipo 1	0,99	3,00	1,79
Dengue sierotipo 2	1,93	1,70	1,12
Dengue sierotipo 3	2,64	2,20	1,17
Dengue sierotipo 4	3,14	1,67	1,21
Leptospira	0,06	1,44	1,09

I test sono stati effettuati su CFX96 (Bio-Rad)

Performance diagnostiche

I test sono stati eseguiti su campioni pre-caratterizzati positivi o negativi: 265 siero, 21 plasma-EDTA, 28 urine, 6 sangue intero -EDTA. I numeri dei positivi e dei negativi sono specificati nella tabella 8.

Per questo studio, l'estrazione dei campioni è stata effettuata su Maelstrom TANbeads (Taiwan Advanced Nanotech). I test sono stati effettuati su CFX96 (Bio-Rad)

Tabella 8: Tabelle delle contingenze delle performance diagnostiche

EBX-050 Chikungunya				
		POS	NEG	TOTALE
Caratterizzati pre-test Chikungunya	POS	8	0	8
	NEG	0	141	141
	TOTALE	8	141	149
EBX-050 Dengue				
		POS	NEG	TOTALE
Caratterizzati pre-test Dengue	POS	144	3	147
	NEG	0	83	83
	TOTALE	144	86	230

Scheda tecnica EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospira

EBX-050 Leptospira				
		POS	NEG	TOTALE
Caratterizzato pre-test Leptospira	POS	49	3	52
	NEG	0	60	60
	TOTALE	49	63	112

Le performance di sensibilità e specificità diagnostiche sono quindi:

Tabella 9: Sensibilità e specificità diagnostiche

	Chikungunya	Dengue	Leptospira
Sensibilità diagnostica (%)	> 99%	98% [intervallo di confidenza (IC) al 95%: 94,6%-99,9%]	94% [intervallo di confidenza (IC) al 95%: 87,9%-100%]
Specificità diagnostica (%)	> 99%	> 99%	> 99%

Assenza di reazioni crociate con altri patogeni

I sistemi Chikungunya e Leptospira sono stati testati in via sperimentale e non presentano reazioni crociate con i seguenti patogeni:

- HEV
- Parechovirus di tipo 1
- Norovirus GI
- Norovirus GII
- HHV6
- HSV1
- HSV2
- VZV
- EBV
- Zikavirus
- Mayaro virus
- *Legionella*
- *Coxiella*
- *Bartonella henselae*
- *Bartonella quintana*
- *Clostridium difficile*

Target di multi-marker RP1	Target di multi-marker RP2
Influenza A H3N2 (Brisbane/10/07)	Influenza A H1 (Nuova Caledonia/20/99)
Influenza A H1N1 (NY/02/2009)	Influenza B (Florida/02/06)
Rhinovirus (Tipo 1°)	VRS (Tipo A)
Adenovirus (Tipo 3)	Parainfluenza (Tipo 2)
Parainfluenza (Tipo 1)	Parainfluenza (Tipo 3)
Parainfluenza (Tipo 4)	Coronavirus (HKU-1 ricombinante)
Metapneumovirus (Perù 6-2003)**	Coronavirus (OC43)
C pneumoniae (CWL-029)	Coronavirus (NL63)
M. pneumoniae (M129)	Coronavirus (229E)
Virus Cocksackie (Tipo A1)	Bordetella pertussis (A639)

Il sistema Dengue è stato testato in via sperimentale e non presenta reazioni crociate con la Chikungunya, la Leptospira, l'HEV o il virus Zika.

Scheda tecnica EurobioPlex

Chikungunya/Dengue/Leptospire

È stata eseguita un'analisi *in silico* complessiva al momento della progettazione e indica l'assenza di reazioni crociate potenziali.

Un'analisi *in silico* specifica ha dimostrato l'assenza di reazioni crociate potenziali per, in particolare, il virus Usutu, il virus del Nilo Occidentale/West Nile virus, l'encefalite giapponese/Japanese encephalitis virus, l'encefalite da zecche/Tick encephalitis virus, la febbre gialla/Yellow fever virus, l'encefalite di St. Louis/Saint Louis encephalitis virus, l'epatite A/Hepatitis A virus, l'epatite C/Hepatitis C virus.

14. Controllo qualità

Conformemente al Sistema di gestione della qualità di Eurobio, certificato ISO EN 13485, ogni lotto di EurobioPlex Chikungunya /Dengue/Leptospire viene testato secondo specifiche predefinite allo scopo di garantire una qualità costante dei prodotti.

15. Bibliografia

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

16. Smaltimento dei rifiuti

Eliminare tutti i rifiuti in conformità alla normativa relativa ai Rifiuti sanitari.

Scheda tecnica EurobioPlex Chikungunya/Dengue/Leptospire

17. Incident reporting

Qualsiasi evento grave verificatosi con il dispositivo deve essere notificato all'azienda EUROBIO SCIENTIFIC e all'autorità competente dello Stato membro presso il quale l'utente e/o il paziente risiede.

18. Assistenza tecnica

Per ottenere assistenza relativa ai nostri prodotti, contattare la nostra assistenza tecnica.

È possibile contattare il servizio clienti di EUROBIO SCIENTIFIC via e-mail, all'indirizzo adv@eurobio-scientific.com, o telefonicamente al numero +33 (0)1.69.79.64.80.



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