



# **EurobioPlex**

## *HTLV1/HTLV2*

### **PCR EN TEMPS REEL**

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

**REF** EBX-008



**24/48/96 réactions**

RUO

Version 3.0 du 24/04/2019

#### **Validé sur :**

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Biorad) avec analyse sur CFX Manager version 3.1 (Biorad)
- LightCycler®480 Instrument II (Roche) avec analyse sur LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) avec analyse sur 7500 Software v2

#### **Conditions de stockage:**

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



Mode d'emploi

## SOMMAIRE

<b>Utilisation .....</b>	<b>3</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>3</b>
<b>Principe de la détection .....</b>	<b>5</b>
<b>Description et contenu du kit .....</b>	<b>5</b>
<b>Conservation .....</b>	<b>6</b>
<b>Précautions et notes .....</b>	<b>7</b>
<b>Collecte des échantillons, transport et conservation .....</b>	<b>8</b>
<b>Procédure .....</b>	<b>8</b>
<b>I-Extraction d'ADN .....</b>	<b>8</b>
<b>II-Réalisation de la PCR en temps réel .....</b>	<b>9</b>
II-1/ PCR qualitative.....	9
II-2/ PCR quantitative.....	9
II-3/ Protocole de PCR en temps réel .....	10
Schéma de la procédure .....	10
Procédure détaillée .....	11
<b>Validation de l'expérimentation .....</b>	<b>12</b>
<b>Analyse des données et interprétation .....</b>	<b>14</b>
<b>Analyse quantitative.....</b>	<b>15</b>
<b>Analyse des performances .....</b>	<b>15</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>17</b>
<b>Elimination des déchets .....</b>	<b>17</b>
<b>Symboles .....</b>	<b>18</b>

## UTILISATION

L'Eurobioplex HTLV1/HTLV2 est un test d'amplification par réaction en chaîne de la polymérase (PCR) en temps réel, conçu pour la détection qualitative et quantitative de la présence ou l'absence de provirus HTLV1 et HTLV2 dans un extrait d'acides nucléiques ADN ou ARN retro-transcrits en ADNc. Le test est indiqué pour détecter et différencier spécifiquement l'ADN de ces provirus, et permet de déterminer présomption d'infection par ces derniers chez l'homme. L'extrait d'ADN est le matériel de départ pour le kit Eurobioplex HTLV1/HTLV2.

L'Eurobioplex HTLV1-HTLV2 a été validé sur les types de prélèvements suivants :

- Cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC),
- liquide céphalorachidien,
- ganglion lymphatique,
- peau,
- tissus mous.

## INTRODUCTION

HTLV1 est un rétrovirus isolé en 1980 par l'équipe de R. Gallo, à partir de cellules T d'un patient atteint d'une leucémie/lymphome T de l'adulte. Ce virus appartient à la famille des Retroviridae. Sur la base de l'analyse phylogénétique de séquences virales, sept sous-types moléculaires d'HTLV1 ont été identifiés, en relation avec des zones géographiques propres d'endémie. HTLV1 se transmet essentiellement de cellules à cellules ; différents types cellulaires peuvent être infectés par le virus, incluant surtout les lymphocytes T CD4, mais également les lymphocytes T CD8 et B, les cellules dendritiques et les macrophages. La multiplication du virus est principalement liée à son expansion cellulaire clonale et non à des cycles viraux productifs comme HIV. Des études ont estimé que 10 à 20 millions de personnes sont infectées par le virus HTLV1 dans le monde. En Europe, l'infection à HTLV1 est sporadique, correspondant à des cas d'importation (0,003 %). En revanche, l'infection est endémique dans le sud-ouest du Japon, en Amérique du Sud (Brésil, Colombie, Guyane française, Surinam) et centrale, dans le bassin caribéen (dont les Antilles françaises), en Afrique centrale et orientale. Ainsi, la prévalence de l'infection à HTLV1 a été évaluée entre 1 à 5 % parmi les adultes résidant en zones d'endémie : 1,2 % au Togo, 1,76 % au Brésil, et 3 % aux Antilles et en Guyane française. Les modes de contamination du virus HTLV1 en zones d'endémie sont les suivants :

- voie sexuelle, essentiellement de l'homme à la femme.
- de la mère à l'enfant au cours de l'allaitement prolongé (6 mois).
- voie sanguine : transfusions sanguines (concentrés érythrocytaires, culots plaquettaires) et toxicomanie intraveineuse.

L'infection à HTLV1 demeure, le plus souvent, asymptomatique. Cependant, 3 à 10 % des sujets infectés développent une affection sévère. Il s'agit principalement de :

- leucémie/lymphome T de l'adulte dans 1 à 5 % cas. Elle correspond à une prolifération monoclonale de lymphocytes T CD4 activés, et ses modes de présentation sont variables : leucémique (5 %), lymphomateux (25 %), chronique à évolution lente (20 %), ou encore indolent

- myélopathie : tropical spastic paraparesis/ HTLV1 associated myelopathy (TSP/HAM) dans 2 à 4 % des cas
- dermatite infectieuse déterminée par une éruption eczématiforme exsudative chronique
- uvéite intermédiaire de l'adulte; syndrome de Sjorgren
- infections opportunistes graves comme l'anguillulose, la gale et les dermatophyties.

Cependant, l'infection à HTLV1 peut être responsable d'autres complications viscérales. D'autres manifestations polymorphes liées à l'infection par HTLV1 ont été rapportées, telles qu'une alvéolite lymphocytaire et/ou des nodules pulmonaires centrolobulaires diffus, un syndrome sec oculaire et/ou buccal, une périodontite, des nodules sous-cutanés des mains et de l'olécrâne, une polyarthrite chronique, peu destructrice et corticosensible, des pathologies musculaires inflammatoires associées de type polymyosite/dermatomyosite. De fait, la prévalence des anticorps anti-HTLV1 est supérieure chez les patients ayant une polymyosite/dermatomyosite que dans la population générale à la Martinique (50 % vs 2,2 %) et au Japon (35 % vs 11 %).

La prévalence globale des complications neurologiques au cours de l'infection par HTLV1 est évaluée entre 2 et 4 %. La myélopathie (TSP/HAM) est la complication neurologique la mieux connue et la plus habituelle se traduisant par des troubles moteurs des membres inférieurs caractérisés par une paraparésie spastique et des troubles génito-sphinctériens (pollakiurie, impériosités mictionnelles).

Un autre rétrovirus humain, différent d'HTLV1, est HTLV2. Il a été isolé pour la 1ère fois en 1982 par R Gallo à partir de culture de cellules spléniques d'un patient souffrant d'hémopathie maligne considérée initialement comme une variante de leucémie à tricholeucocytes (LT).

Des foyers d'endémie du HTLV2 ont été observés dans les populations indiennes d'Amérique du Sud chez lesquelles une prévalence de 8 % à 13 % a été rapportée. En Afrique, les cas d'infection à HTLV2 sont présents. En Europe, leur prévalence dans la population générale est très faible, mais HTLV2 est présent en France, comme dans d'autres pays tels que l'Italie et l'Espagne, chez les usagers de drogues par voie intraveineuse.

Au total, 4 sous types génomiques (A-D) sont décrits à ce jour. L'infection à HTLV2 est principalement confinée dans les cellules CD8 et très faiblement dans les cellules T CD4.

La détection d'une infection à HTLV peut se faire par mise en évidence directe du virus, soit par culture virale, soit par dépistage génomique viral à l'aide de la technique d'amplification génique (PCR). Les anticorps anti-HTLV apparaissent après une période de silence sérologique de 51 jours en moyenne (fenêtre sérologique) après le comptage. Comme pour les autres rétrovirus, les porteurs d'anticorps sont porteurs du virus qui persiste tout au long de la vie. Les anticorps sont détectés par ELISA et/ou technique d'agglutination.

Le dépistage par PCR en temps réel apporte sensibilité et reproductibilité, et permet une détection précoce de la présence de ces virus.

## PRINCIPE DE LA DETECTION

L'Eurobioplex EBX-008 est un test d'amplification des acides nucléiques viraux de HTLV1 et HTLV2 (en les différenciant), ainsi que d'un contrôle d'extraction d'ADN et d'inhibition de PCR, qui utilise l'amplification par PCR en temps réel. Le test est réalisé à partir de l'ADN extrait de l'échantillon dans un seul puits/tube.

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

Ce kit est un triplex : HTLV1 + HTLV2 + contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (CI-PCR).

L'ADN de HTLV1 est détecté à l'aide d'une sonde marquée FAM, et celui de HTLV2 est détecté à l'aide d'une sonde marquée HEX. Le contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR est détecté à l'aide d'une sonde marquée CY5. Tous émettent une fluorescence spécifique suite à l'hydrolyse de leur sonde respective au cours de l'élongation du produit d'amplification. La mesure des intensités de fluorescence en temps réel est relative à l'accumulation des produits d'amplification spécifiques.

## DESCRIPTION ET CONTENU DU KIT

Le kit de PCR en temps réel Eurobioplex HTLV1/HTLV2 est prêt à l'emploi pour la détection spécifique de ces virus, et leur quantification.

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

Le kit contient les réactifs et l'enzyme nécessaires à l'amplification de l'ADN de ces virus, et du contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (cf. Tableau 2).

**Tableau 1:**

Cible	Fluorophore	Excitation	Emission
HTLV1	FAM	495 nm	515 nm
HTLV2	HEX	535 nm	555 nm
Contrôle d'inhibition de PCR (CI-PCR)	Cy5	647 nm	667 nm

Canaux équivalents sur différents instruments de PCR :

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

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

**Tableau 2:**

Couleur de Bouchon	Contenu du kit	96 réactions	48 réactions	24 réactions	Reconstitution
<b>Rouge</b>	ENZYME	4 x 375 µl	2 x 375 µl	375 µl	Prêt à l'emploi
<b>Transparent</b>	OLIGOMIX	4 x 75 µl	2 x 75 µl	75 µl	Prêt à l'emploi
<b>Jaune</b>	4 Standards: CP-1 : 3.10 <sup>6</sup> copies/µl CP-2 : 3.10 <sup>4</sup> copies/µl CP-3 : 3.10 <sup>3</sup> copies/µl CP-4 : 3.10 <sup>2</sup> copies/µl	4 x 75 µl de chaque CP -1 -2 -3 -4	2 x 75 µl de chaque CP -1 -2 -3 -4	75 µl de chaque CP -1 -2 -3 -4	Prêt à l'emploi
<b>Blanc</b>	Contrôle d'inhibition de PCR (CI-PCR)	4 x 300 µl	2 x 300 µl	300 µl	Prêt à l'emploi
<b>Bleu</b>	Eau = contrôle négatif (CN-H <sub>2</sub> O)	1 ml	1 ml	1 ml	Prêt à l'emploi

Oligomix : contient les amorces et sondes du triplex (HTLV1 + HTLV2 + CI-PCR).

#### Matériel nécessaire non fourni:

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

### CONSERVATION

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

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

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

## PRECAUTIONS ET NOTES

**Lire attentivement ces instructions avant de débiter la procédure.**

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

## COLLECTE DES ECHANTILLONS, TRANSPORT ET CONSERVATION

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

**Tableau 3 :**

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

- ◇ L'utilisateur peut se référer aux recommandations émises par l'Organisation Mondiale de la Santé ou par la Haute Autorité de Santé pour la bonne conservation des échantillons.
- ◇ Le transport des échantillons cliniques est soumis à la réglementation locale pour le transport des agents infectieux.

## PROCEDURE

### **I- Extraction d'ADN**

Il revient aux utilisateurs de s'assurer que le système d'extraction des acides nucléiques utilisé est compatible avec la technologie de PCR en temps réel. Pour le présent coffret, nous recommandons d'utiliser des méthodes d'extraction d'ADN ou d'ARNm à transcrire en ADNc de virus à partir d'échantillons de sang, liquide céphalorachidien, ganglion lymphatique, peau, ou tissus mous, et de se référer aux instructions du fournisseur du kit d'extraction utilisé.

Dans le kit HTLV1/HTLV2, le CI-PCR sur le canal CY5 peut être ajouté avant l'extraction ou dans la réaction de PCR. Il permet de s'assurer qu'un résultat négatif ne peut être dû à un problème d'extraction ou la présence d'inhibiteurs de PCR en trop grande quantité pour valider le test.

Nous recommandons l'ajout de 10 µl de CI-PCR par extraction et un volume d'élution de 50 µl à la fin de l'extraction. Si le CI-PCR n'est rajouté que pour contrôler la PCR, il est ajouté au mélange réactionnel (1 microlitre par réaction de PCR). Voir Protocole de PCR en temps réel pour plus de détails.

Le CI-PCR est également disponible chez Eurobio (Ref EurobioPlex EBX-002).

## **II- Réalisation de la PCR en temps réel**

### **Remarque générale:**

Les standards HTLV1/HTLV2, ainsi que le contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (CI-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 un contrôle positif, CP-1, ainsi qu'un contrôle négatif (eau PCR fournie= CN-H2O + CI-PCR) (voir II-3/ 6 du protocole de PCR en temps réel).

### **II-1/ PCR qualitative**

Aucune gamme standard n'est réalisée. Seul le contrôle positif CP-1 et le contrôle négatif sont testés.

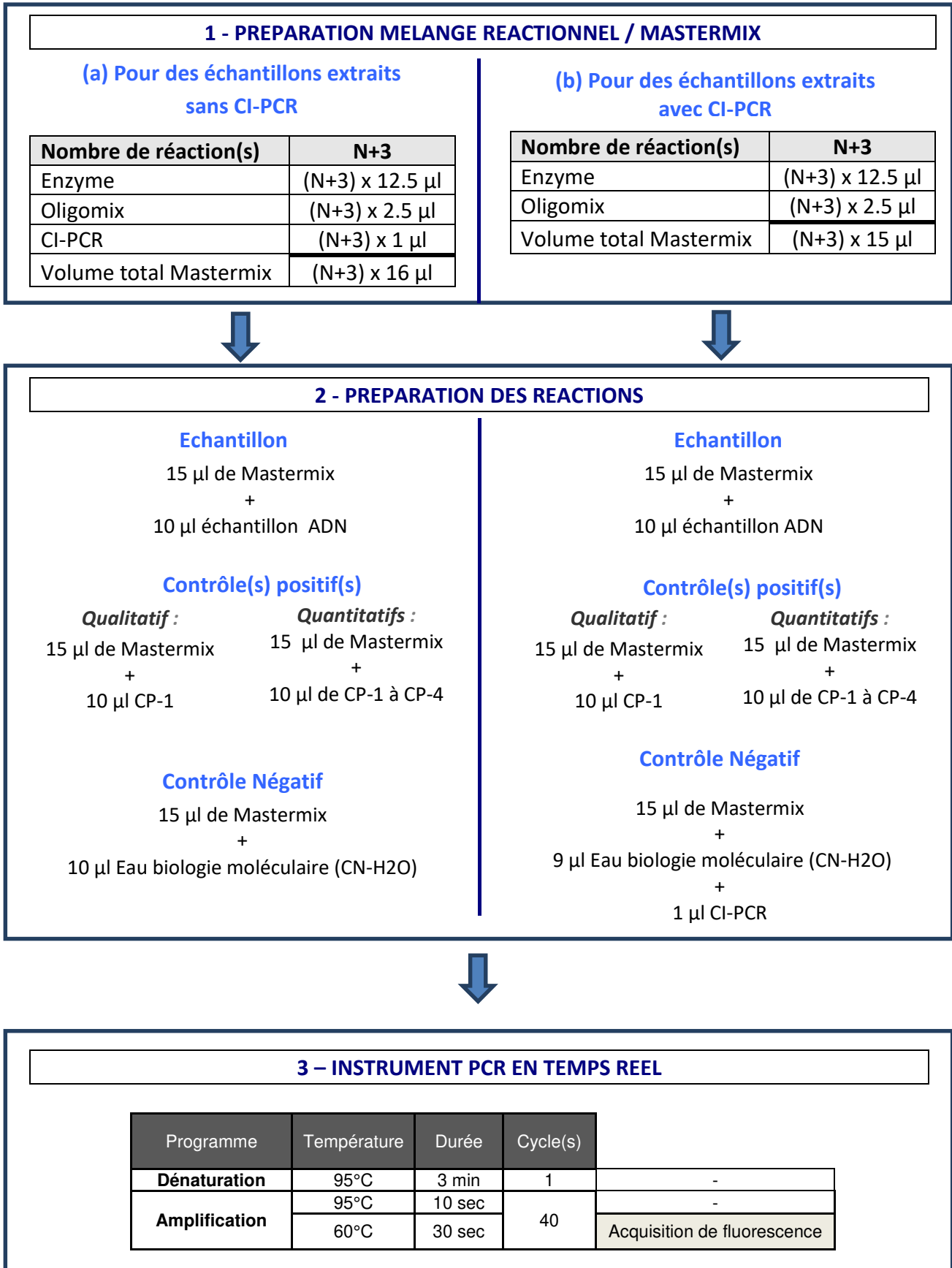
### **II-2/ PCR quantitative**

En plus du contrôle négatif, il faut réaliser une courbe standard à l'aide des quatre tubes contrôles-standards CP-1 à CP-4, prêts à l'emploi. Pour générer une courbe standard sur un système de PCR en temps réel, les concentrations  $3.10^6$ ,  $3.10^4$ ,  $3.10^3$ ,  $3.10^2$  copies/ $\mu$ l doivent être utilisées et définies comme standard en spécifiant le nombre de copies/ $\mu$ l correspondant. Afin de pouvoir corriger une éventuelle variation liée à l'expérimentation, nous recommandons de tester les CP Standards en triplicats.

<b>Standards</b>	<b>Concentration</b>
<b>CP-1</b>	$3.10^6$ copies/ $\mu$ l
<b>CP-2</b>	$3.10^4$ copies/ $\mu$ l
<b>CP-3</b>	$3.10^3$ copies/ $\mu$ l
<b>CP-4</b>	$3.10^2$ copies/ $\mu$ l

## II-3/ Protocole de PCR en temps réel

### Schéma de la procédure



### Procédure détaillée

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

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

Nombre de réaction(s)	1	N+3
Enzyme	12,5 µl	(N+3) x 12,5 µl
Oligomix	2,5 µl	(N+3) x 2,5 µl
CI-PCR	1 µl	(N+3) x 1 µl
Volume total Mastermix	16 µl*	(N+3) x 16 µl

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

Nombre de réaction(s)	1	N+3
Enzyme	12,5 µl	(N+3) x 12,5 µl
Oligomix	2,5 µl	(N+3) x 2,5 µl
Volume total Mastermix	15 µl*	(N+3) x 15 µl

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

- 3) Homogénéiser le Mastermix préparé en 2) et centrifuger brièvement.
- 4) Distribuer 15 µl de Mastermix\* à l'aide d'une micropipette et d'embouts à filtre dans chaque tube/puits de microplaque pour PCR en temps réel.
- 5) Ajouter 10 µl des échantillons d'ADN extrait
- 6) En parallèle réaliser les contrôles suivants :
  - Contrôle(s) positif(s) :
    - o Test qualitatif :
      - 15 µl de Mastermix + 10 µl de contrôle positif CP-1
    - o Test quantitatif :
      - 15 µl de Mastermix + 10 µl de CP-1 à CP-4 pour la gamme standard CP
  - Contrôle négatif :
    - o Cas (a) Pour des échantillons extraits SANS CI-PCR :
      - 15 µl de Mastermix + 10 µl d'eau fournie (CN-H2O)
    - o Cas (b) Pour des échantillons extraits AVEC CI-PCR :
      - 15 µl de Mastermix + 9 µl d'eau fournie (CN-H2O) + 1 µl de CI-PCR
- 7) Fermer immédiatement avec un film adhésif ou bouchons transparents pour éviter toute contamination.
- 8) Centrifuger brièvement pour collecter le mélange réactionnel au fond des tubes ou des puits de microplaque.
- 9) Réaliser le programme suivant sur l'instrument de PCR en temps réel.

Programme	Température	Durée	Cycle(s)	
<b>Dénaturation</b>	95°C	3 min	1	-
<b>Amplification</b>	95°C	10 sec	40	-
	60°C	30 sec		Acquisition de fluorescence

Note 1 : Sur LightCycler® 480 (Roche), deux systèmes optiques existent : seul le « System II » est compatible avec l'utilisation du kit. Appliquer une compensation de couleur pour les longueurs d'ondes FAM-HEX/VIC-Cy5 (465-510,533-580,618-660).

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

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

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

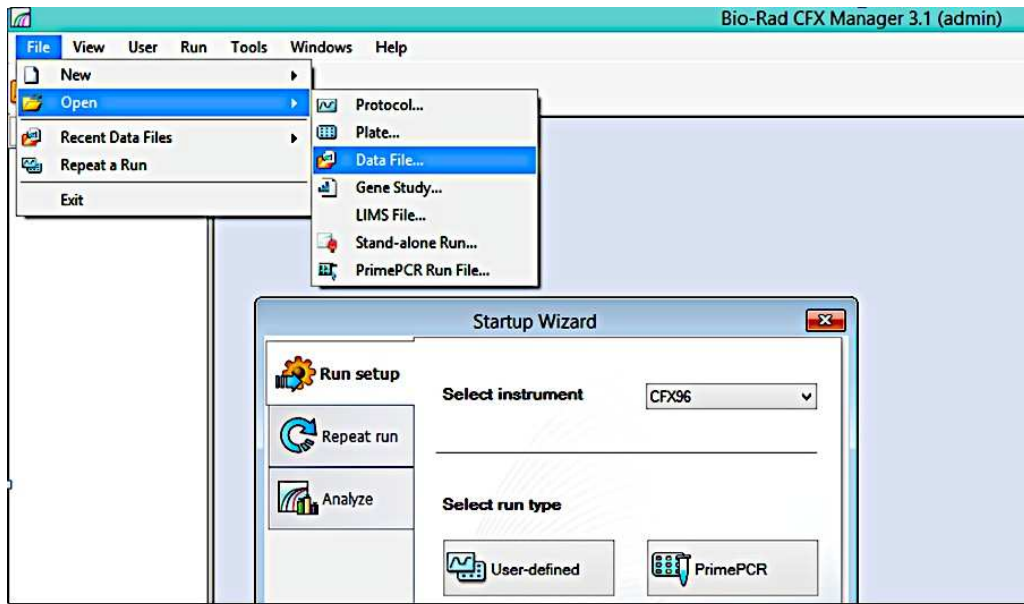
## VALIDATION DE L'EXPERIMENTATION

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

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



- Cliquer sur File et sélectionner Open puis Data File.



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

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



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

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

**Tableau 4:**

Contrôle Positif	
FAM	Ct ≤ 25
HEX	Ct ≤ 25
Contrôle Négatif	
FAM	Ct non déterminé
HEX	Ct non déterminé
CY5	Ct ≤ 35

En PCR quantitative, en plus des contrôles valides du Tableau 4, les efficacités de la PCR temps réel sur les canaux FAM et HEX doivent être comprises entre 80 et 120% et les coefficients de corrélation > 0,95.

## ANALYSE DES DONNEES ET INTERPRETATION

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

Deux résultats peuvent être obtenus :

1/ le test du contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (CI-PCR ; canal Cy5) est positif : l'ADN a été correctement extrait, et il n'y a pas d'inhibiteur de PCR. Le résultat peut être validé.

2/ le test du contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (CI-PCR ; canal Cy5) est négatif : soit l'ADN n'a pas été extrait, soit la PCR n'a pas bien fonctionné, soit la présence d'inhibiteurs de PCR inhibe la réaction de PCR. Il est alors recommandé de répéter l'extraction ou de diluer l'échantillon sauf si un signal spécifique apparaît dans les canaux cibles (FAM, HEX).

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

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

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

Signal PCR			Présence de virus		Validité du test/commentaire
FAM	HEX	CY5	HTLV1	HTLV2	
+*	-	+	Oui	Non	<b>VALIDE</b>
-	+*	+	Non	Oui	<b>VALIDE</b>
+*	+*	+	Oui	Oui	<b>VALIDE</b>
-	-	+	Non	Non	<b>VALIDE</b>
+*	+*	-	Oui	Oui	<b>VALIDE</b> Possible inhibition de PCR ou problème d'extraction qui n'empêche pas la détection des virus
+*	-	-	Oui	Non interprétable	<b>VALIDE POUR HTLV1 :</b> Possible inhibition de PCR ou problème d'extraction qui n'empêche pas la détection de HTLV1. <b>NON VALIDE POUR HTLV2 :</b> Possible inhibition de PCR ou problème d'extraction qui empêcherait la détection de HTLV2 → <b>diluer 5 x l'échantillon ; si même résultat extraire à nouveau l'échantillon.</b>
-	+*	-	Non interprétable	Oui	<b>VALIDE POUR HTLV2 :</b> Possible inhibition de PCR ou problème d'extraction qui n'empêche pas la détection de HTLV2. <b>NON VALIDE POUR HTLV1 :</b> Possible inhibition de PCR ou problème d'extraction qui empêcherait la détection de HTLV1 → <b>diluer 5 x l'échantillon ; si même résultat extraire à nouveau l'échantillon.</b>
-	-	-	Non interprétable	Non interprétable	Possible inhibition de PCR ou problème d'extraction → <b>diluer 5 x l'échantillon ; si même résultat extraire à nouveau l'échantillon</b>

## ANALYSE QUANTITATIVE

Pour tracer les courbes étalon, renseigner les concentrations en copies/ $\mu$ l de la gamme de linéarité de quantification des standards de HTLV1 (canal FAM) et HTLV2 (canal HEX) ( $3 \cdot 10^6$ ,  $3 \cdot 10^4$ ,  $3 \cdot 10^3$ , et  $3 \cdot 10^2$  copies/ $\mu$ l pour CP-1, CP-2, CP-3 et CP-4 respectivement). Le logiciel affichera une courbe standard et calculera pour les échantillons le nombre de copies par microlitre correspondant.

En fonction de la quantité d'ADN introduite, ou du volume de liquide corporel, ou du nombre de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC), ce nombre de copies pourra être ramené à un nombre de copies par  $\mu$ g d'ADN ou par ml de liquide biologique ou par nombre de PBMC (charge provirale PVL/n cellules).

Il est aussi possible de normaliser le résultat à l'aide d'un gène de référence de votre choix, en réalisant indépendamment du kit une PCR temps réel de votre gène de référence (non fourni dans le kit). Néanmoins, il revient alors à l'utilisateur de valider un tel système de normalisation pour déterminer la PVL.

Les résultats des échantillons en dessous du seuil de quantification ne peuvent être validés quantitativement, mais conservent leur qualité de détectabilité (positivité validée selon le canal fluorophore renseigné).

## ANALYSE DES PERFORMANCES

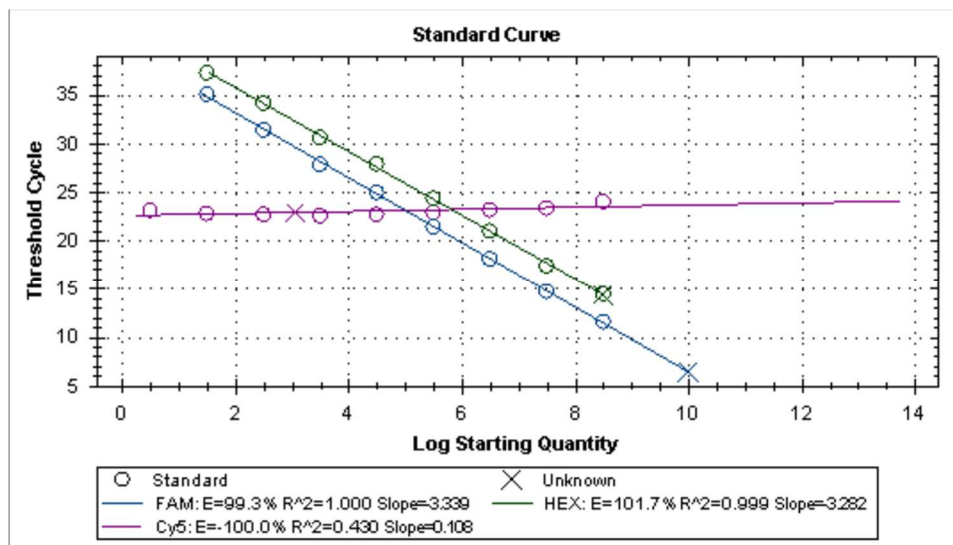
### Limite de détection/sensibilité analytique

100 copies/ $\mu$ l Contrôle Positif

### Linéarité de quantification

300 à  $3 \cdot 10^7$  copies/ $\mu$ l de Contrôle Positif

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



## Validation sur des échantillons cliniques :

### Etude 1 :

Les tests ont été réalisés sur CFX96 (Biorad).

La spécificité et la sensibilité ont été analysées à partir de 54 échantillons d'ADN extrait de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC), de liquide céphalorachidien, ganglions lymphatiques, peau, et tissus mous, provenant de patients de différentes parties du monde et de deux centres de référence.

#### ➤ **Sensibilité**

- HTLV1 positifs : 31 échantillons de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC), 7 échantillons de liquide céphalorachidien, 1 échantillon de ganglion lymphatique, 1 échantillon de peau et 2 autres échantillons de tissus mous,
- HTLV2 positifs : 12 échantillons PBMC

**HTLV1 : > 99% ; HTLV2 : 83%.**

#### ➤ **Spécificité**

La totalité des échantillons négatifs testés sont négatifs et concordants avec les prétests, soit une spécificité **> 99% pour HTLV1 et HTLV2**. Aucune cross-réaction entre HTLV1 et HTLV2 n'a été observée.

**Etude 2 :** Cette étude porte sur HTLV-1 dans des échantillons de sang total.

Les tests ont été réalisés sur ABI7500 (Applied Biosystems).

Les cellules mononuclées ont été séparées des échantillons de sang (EDTA) par centrifugation en gradient de densité ficoll. Ensuite le kit QIAamp blood kit (Qiagen) a été utilisé.

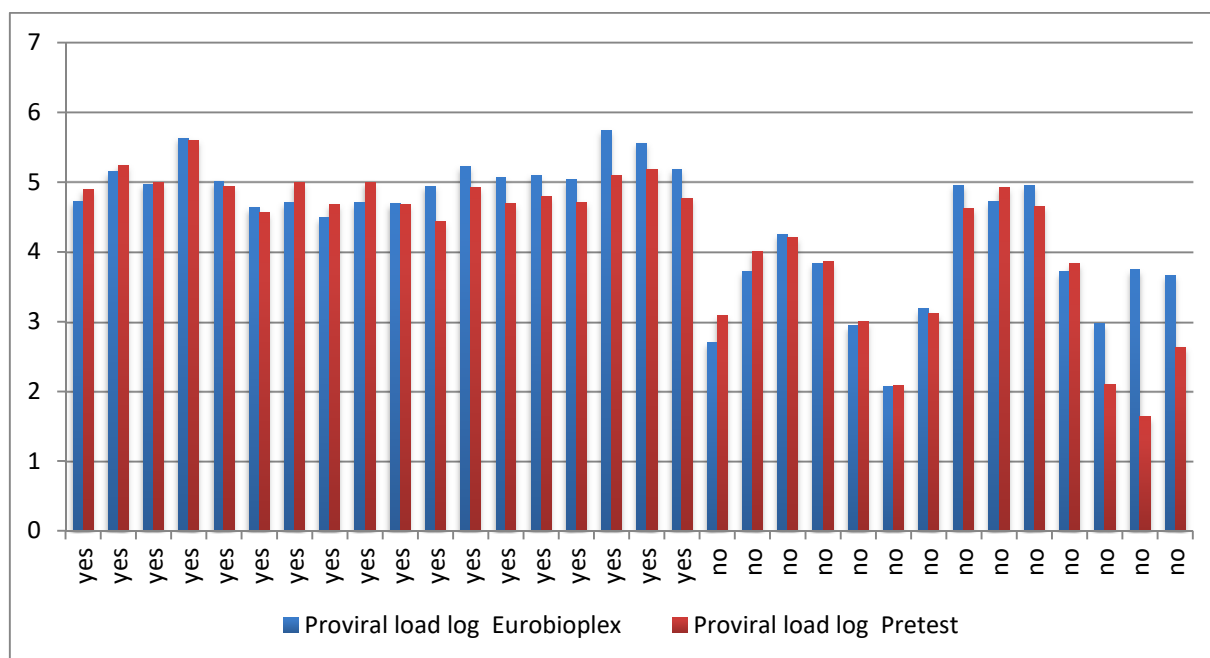
#### ➤ **Spécificité : > 99 %**

10 échantillons VIH positifs et 10 échantillons zikavirus positifs ont été testés et trouvés négatifs pour HTLV-1.

#### ➤ **Sensibilité : > 99%**

32 échantillons de sang total de sujets infectés par HTLV-1 asymptomatiques ou souffrant de paraparésie spastique tropicale ou myélopathie associée à HTLV-1 (TSP/HAM) ont été testés, et tous détectés positifs.

Il existe une excellente corrélation entre les charges provirales obtenues avec l'Eurobioplex et la méthode de référence/Pré-test (graphe ci-dessous: yes ou no désignent l'état TSP/HAM).



Légende:

yes: TSP/HAM

no: asymptomatique

## BIBLIOGRAPHIE

Lézin A, Amoureux MC, Fagour, Agbalika F and Césaire R, Quantitative real time PCR for HTLV1 and HTLV2, 17th International Conference on Human Retrovirology : HTLV and related viruses, 2015.

Dehée A, Césaire R, Désiré N, Lézin A, Bourdonné O, Béra O, Plumelle Y, Smadja D, Nicolas JC. Quantitation of HTLV1 proviral load by a Taqman real time PCR assay J Virol Methods. 2002 Apr;102(1-2):37-51.

Gouhier E, Gaubert-Maréchal E, Abboud P, Couppié P, Nacher M. predictive factors of HTLV1-HIV coinfections in French Guiana. Am J Trop Med Hyg. 2013 Sep;89(3):549-53.

de Mendoza C, Caballero E, Aguilera A, Pirón M, Ortiz de Lejarazu R, Rodríguez C, Cabezas T, González R, Treviño A, Soriano V; Spanish HIV-2/HTLV Group. HIV-2 and HTLV1 infections in Spain, a non-endemic region. AIDS Rev. 2014 Jul-Sep;16(3):152-9.









Paiva A, Casseb J. origin and prevalence of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV1) and type 2 (HTLV2) among indigenous populations in the americas. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2015 Feb;57(1):1-14.

Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, Recommandations de bonnes pratiques, [www.has-santé.fr](http://www.has-santé.fr)

## ELIMINATION DES DECHETS

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

## SYMBOLES

	Référence
	Numéro de lot
	Limites de température de conservation
	Date d'expiration
	Contenu suffisant pour « N » réactions
	Conserver à l'abri de la lumière
	Fabricant
<b>RUO</b>	Research use only
	Mode d'emploi



**eurobio**  
**SCIENTIFIC**

7, avenue de Scandinavie  
91953 Les Ulis Cedex  
FRANCE



**EurobioPlex**  
*HTLV1/HTLV2*  
**REAL-TIME PCR**

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

**REF** EBX-008



**24/48/96 reactions**

**RUO**

Version 3.0 of 2019/04/24

**Validated on:**

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Biorad) with analysis on CFX Manager v 3.1 (Biorad)
- LightCycler®480 Instrument II (Roche) with analysis on LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) with analysis on 7500 Software v2

**Storage conditions:**

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



Instructions for use

## TABLE OF CONTENTS

<b>Intended Use .....</b>	<b>21</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>21</b>
<b>Principle of detection .....</b>	<b>22</b>
<b>Description and content of the kit .....</b>	<b>23</b>
<b>Storage .....</b>	<b>24</b>
<b>Cautions and notes .....</b>	<b>24</b>
<b>Samples collection, transport and storage .....</b>	<b>25</b>
<b>Procedure .....</b>	<b>25</b>
<b>I- DNA extraction .....</b>	<b>25</b>
<b>II- Real-time PCR procedure .....</b>	<b>25</b>
II-1/ Qualitative PCR .....	26
II-2/ Quantitative PCR .....	26
II-3/ Protocol of real-time PCR .....	27
Diagram of the procedure .....	27
Detailed procedure .....	28
<b>Validation of the experiment .....</b>	<b>29</b>
<b>Data Analysis and Interpretation .....</b>	<b>30</b>
<b>Quantitative analysis.....</b>	<b>31</b>
<b>Performance analysis.....</b>	<b>32</b>
<b>Bibliography .....</b>	<b>34</b>
<b>Waste disposal .....</b>	<b>34</b>
<b>Symbols .....</b>	<b>35</b>

## INTENDED USE

The Eurobioplex HTLV1/HTLV2 test uses real-time polymerase chain reaction (PCR) amplification and is designed for the qualitative and quantitative detection of provirus HTLV1 and HTLV2 from a DNA nucleic acid extract or from a messenger RNA extract transcribed into cDNA. This test is indicated to detect and specifically differentiate the DNA of these proviruses, and thus to determine the occurrence of infection by HTLV1 and HTLV2 in humans, or to complete a proven or undetermined presence. Extracted DNA is the starting material for the Eurobioplex HTLV1-HTLV2 kit.

The Eurobioplex HTLV1-HTLV2 has been validated on the following specimen:

- Peripheral blood mononuclear cells (PBMC),
- cerebrospinal fluid,
- lymph node,
- skin,
- soft tissues.

## INTRODUCTION

HTLV1 is a retrovirus isolated in 1980 by the team of R. Gallo, from T cells of an adult patient with a Leukemia/Lymphoma T. This virus belongs to the family of the *Retroviridae*. Based on phylogenetic analysis of viral sequences, seven molecular subtypes of HTLV1 have been identified, in relation to specific endemic geographical areas. HTLV1 is essentially transmitted from cell to cell. Different cell types can be infected by the virus, especially CD4 T lymphocytes, but also CD8 T and B-lymphocytes, dendritic cells and macrophages. The multiplication of the virus is mainly linked to its clonal cell expansion, contrary to viruses such as HIV for which the expansion is due to non-productive viral cycles. Studies have estimated that 10 to 20 million people are infected with HTLV1 virus in the world. In Europe, HTLV1 infection is sporadic, corresponding to cases of importation (0.003%). In contrast, infection is endemic in the southwest of the Japan, South America (Brazil, Colombia, French Guiana, Surinam) and Central America, in the Caribbean basin (including the French West Indies), in Central and Eastern Africa. Thus, the prevalence of HTLV1 infection was evaluated between 1-5% among adults living in endemic areas: 1.2% in Togo, 1.76% in the Brazil, and 3% in the West Indies and French Guiana. The modes of contamination of HTLV1 virus in endemic areas are as follows:

- Sexual: mainly from men to women,
- Mother to child during long breast feeding (6 months),
- Blood transfusions (erythrocyte concentrates, platelet pellets) and intravenous drug abuse.

More often, HTLV1 infection remains asymptomatic. However, 3-10% of infected individuals develop severe disease, mainly:

- T Leukemia/lymphoma in the adult in 1-5% case. It corresponds to a monoclonal proliferation of activated CD4 T cells, and its modes of presentation are variable: leukemia (5%), lymphomatous (25%), indolent or chronic slow-onset (20%)
- Myelopathy: tropical spastic paraparesis / HTLV1 associated myelopathy (TSP/HAM) in 2-4% of cases

- Infectious dermatitis determined by a chronic exudative eczematous eruption,
- Intermediate uveitis of the adult; Sjögren syndrome
- Serious opportunistic infections such as anguillulosis, scabies and the dermatophyties.

However, HTLV1 infection may be responsible for other visceral complications. Other polymorphic manifestations related to infection by HTLV1 have been reported, such as lymphocytic alveolitis or diffuse centrilobular pulmonary nodules, dry eye or mouth syndrome, periodontitis, subcutaneous nodules of the hands and the olecranon, corticosteroid sensitive chronic arthritis, inflammatory muscle diseases associated with polymyositis/dermatomyositis. The prevalence of antibodies anti-HTLV1 is higher in patients with polymyositis/dermatomyositis than in the general population in Martinique (50% vs. 2.2%) and Japan (35% vs 11%).

The overall prevalence of neurological complications during infection by HTLV1 is evaluated between 2% and 4%. Myelopathy (TSP/HAM) is the neurological complication the best known and most common, resulting in motor disorders of the lower limbs characterized by a spastic paraparesis and genito-sphincter disorders (urinary frequency, mictional urgency).

Another HTLV human retrovirus is called HTLV2. It has been isolated for the first time in 1982 by R. Gallo from culture of splenic cells of a patient with malignant hemopathy considered initially as a variant of leukemia with tricholeucocytes (LT). HTLV2 endemic foci were observed in the Indian populations of South America in with a prevalence of 8 to 13 %. In Africa, cases of HTLV2 infection are present. In Europe, the prevalence in the general population is very low, but HTLV2 is present in France, as in other countries such as Italy and Spain, among intravenous drug users. In total, 4 genomic subtypes (A - D) are described to date. Infection with HTLV2 is mainly confined to CD8 cells and very weakly to CD4 T cells.

The detection of HTLV infection can be done by direct evidence of the virus either by viral culture or by viral genome screening using the technique of PCR. Anti-HTLV antibodies appear after a period of serological silence (serological window period) of on average 51 days after the counting. As with other retroviruses, carriers of antibodies are carriers of the virus, which persists throughout life. Antibodies are detected by ELISA and/or agglutination technique.

The detection by qPCR is sensitive, reproducible and brings an early detection of the presence of the virus.

## **PRINCIPLE OF DETECTION**

The Eurobioplex HTLV1/HTLV2 kit is a test using real-time amplification of viral DNA of these viruses (with differentiation), as well as a DNA extraction and PCR inhibition control. The test is performed from extracted DNA from a sample using a reaction in a single well/tube.

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

This kit is composed of one triplex: HTLV1 + HTLV2 + control of DNA extraction and PCR inhibition (CI-PCR).

DNA of HTLV1 and HTLV2 is respectively detected using FAM and HEX labeled probes. DNA extraction and PCR inhibition control is detected using a CY5 labeled probe. All probes emit a specific fluorescence following their hydrolysis during the elongation of the amplification product. The measurement of the intensities of real-time fluorescence correlates with the accumulation of specific amplification products.

## DESCRIPTION AND CONTENT OF THE KIT

The real-time PCR Eurobioplex HTLV1-HTLV2 kit is ready to use for the specific detection and the quantification of these viruses.

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

The kit contains reagents and enzyme for the amplification of HTLV1 and HTLV2 viral DNA, and the DNA extraction and PCR inhibition control (see Table 2).

**Table 1:**

Target	Fluorophore	Excitation	Emission
HTLV1	FAM	495 nm	515 nm
HTLV2	HEX	535 nm	555 nm
PCR inhibition control (CI-PCR)	Cy5	647 nm	667 nm

Equivalent channels on different real time PCR cyclers:

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

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

**Table 2:**

Cap color	Components of the kit	96 reactions	48 reactions	24 reactions	Reconstitution
<b>Red</b>	ENZYME	4 x 375 µl	2 x 375 µl	375 µl	Ready to use
<b>Transparent</b>	OLIGOMIX	4 x 75 µl	2 x 75 µl	75 µl	Ready to use
<b>Yellow</b>	4 Standards: CP-1 : 3.10 <sup>6</sup> copies/µl CP-2 : 3.10 <sup>4</sup> copies/µl CP-3 : 3.10 <sup>3</sup> copies/µl CP-4 : 3.10 <sup>2</sup> copies/µl	4 x 75 µl ech CP -1 -2 -3 -4	2 x 75 µl ech CP -1 -2 -3 -4	75 µl ech CP -1 -2 -3 -4	Ready to use
<b>White</b>	PCR inhibition control (CI-PCR)	4 x 300 µl	2 x 300 µl	300 µl	Ready to use
<b>Blue</b>	Water = negative control (CN-H2O)	1 ml	1 ml	1 ml	Ready to use

Oligomix : contains the primers and probes of the triplex (HTLV1 + HTLV2 + CI-PCR)

**Required material not provided:**

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

<b>STORAGE</b>
----------------

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

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

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

<b>CAUTIONS AND NOTES</b>
---------------------------

**Read carefully instructions before starting**

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

## SAMPLES COLLECTION, TRANSPORT AND STORAGE

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

**Table 3 :**

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

- ◇ The user can refer to the World Health Organization or High Health Authority for storing samples.
- ◇ Transport of clinical samples must follow local regulations for this type of infectious agents.

## PROCEDURE

### **I- DNA extraction**

It is the user's responsibility that the extraction system used be compatible with downstream real time PCR technology. For this kit, we recommend to use extraction methods of viral DNA or of a messenger RNA extract transcribed into cDNA, from Peripheral blood mononuclear cells (PBMC), cerebrospinal fluid, lymph node, skin, or soft tissues, and refer to manufacturer's instructions of the extraction kit.

In the HTLV1-HTLV2 kit, CI-PCR on the CY5 channel can be added before extraction or in the PCR reaction. It ensures that a negative result is not due to an extraction problem or due to the presence of PCR inhibitors at high quantity.

We recommend the addition of 10 µl of CI-PCR per extraction. If the CI-PCR is added to control the PCR, CI-PCR is added to the reaction mix (1µl per PCR reaction). See real-time PCR protocol for details.

CI-PCR is available from Eurobio (Ref EurobioPlex EBX-002).

### **II- Real-time PCR Procedure**

#### **General comment:**

HTLV1-HTLV2 Standards and the DNA extraction and PCR inhibition control (CI-PCR) contain a very high concentration of matrix. Manipulations must be performed carefully to avoid contamination. To control the functioning of the PCR and steps of extraction and real-time PCR amplification, it is necessary to test a positive control, CP-1, as well as the negative control (water supplied = CN-H<sub>2</sub>O + CI-PCR) (see II-3/6) of real-time PCR procedure).

### **II-1/ Qualitative PCR**

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

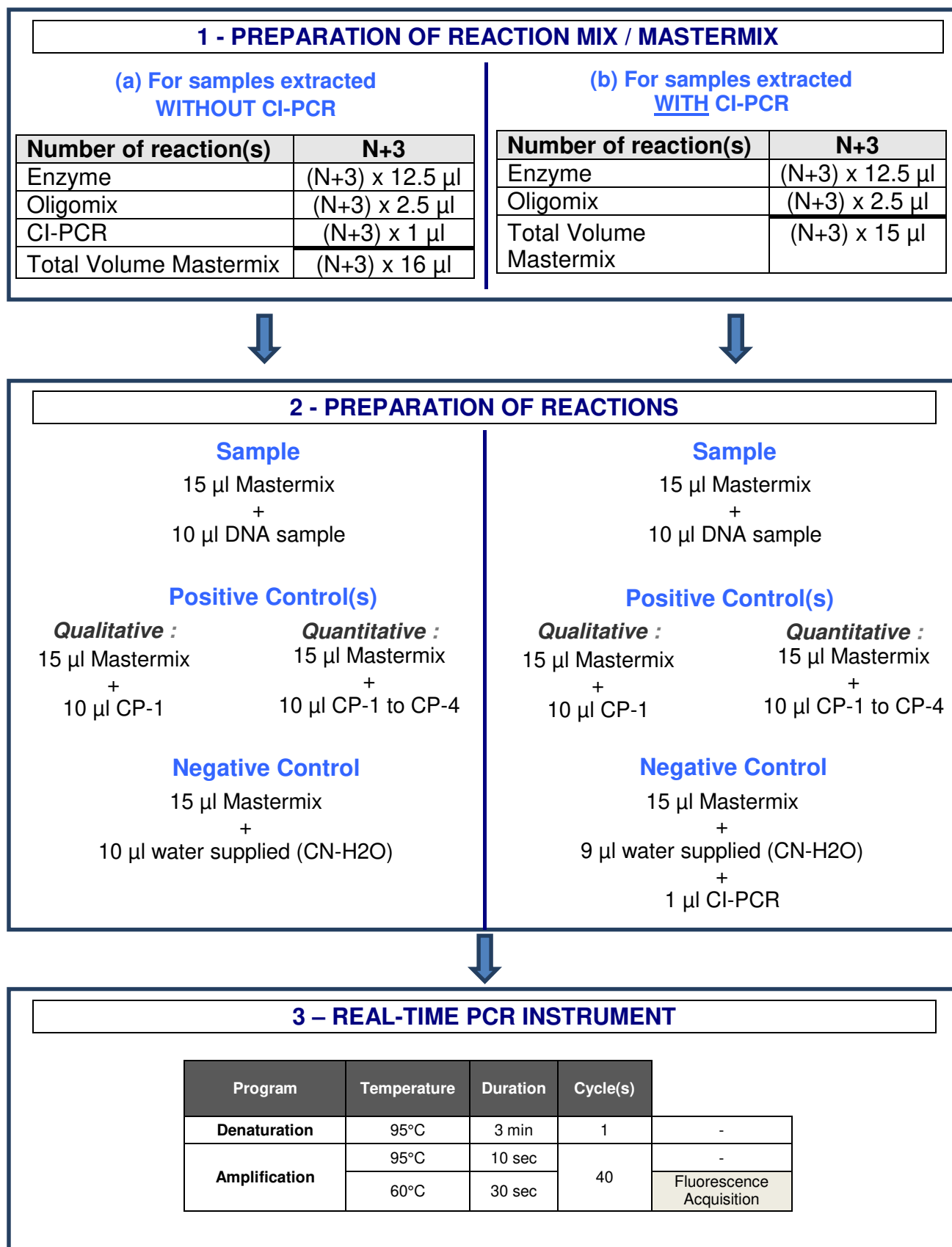
### **II-2/ Quantitative PCR**

It is necessary to perform a standard curve using the four ready to use standards tubes CP-1 to CP-4 in addition to a negative control. To generate a standard curve on a real-time PCR system, the concentrations of  $3.10^6$ ,  $3.10^4$ ,  $3.10^3$  and  $3.10^2$  copies/ $\mu$ l must be used and defined as standard for CP by specifying the corresponding number of copies/ $\mu$ l. In order to correct for possible experimental variation, we recommend testing CP standards in triplicates.

<b>Standards</b>	<b>Concentration</b>
<b>CP-1</b>	$3.10^6$ copies/ $\mu$ l
<b>CP-2</b>	$3.10^4$ copies/ $\mu$ l
<b>CP-3</b>	$3.10^3$ copies/ $\mu$ l
<b>CP-4</b>	$3.10^2$ copies/ $\mu$ l

## II-3/ Protocol of real-time PCR

### Diagram of the procedure



## Detailed Procedure

- 1) Homogenize the tube of Enzyme, and vortex Oligomix, CP standards and CI-PCR tubes before starting, and centrifuge.
- 2) Prepare a Mastermix as below; N is the number of PCR reactions. Plan to prepare enough reagents for at least N+3 reactions (refer to part 1-(a) or 1-(b) of the previous diagram according to the condition).

### Case (a): For samples extracted without CI-PCR

Number of reaction(s)	1	N+3
Enzyme	12.5 µl	(N+3) x 12.5 µl
Oligomix	2.5 µl	(N+3) x 2.5 µl
CI-PCR	1 µl	(N+3) x 1 µl
Total Volume Mastermix	16 µl*	(N+3) x 16 µl

### Case (b): For samples extracted with CI-PCR

Number of reaction(s)	1	N+3
Enzyme	12.5 µl	(N+3) x 12.5 µl
Oligomix	2.5 µl	(N+3) x 2.5 µl
Total Volume Mastermix	15 µl*	(N+3) x 15 µl

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

- 3) Homogenize mastermix prepared in 2) and centrifuge briefly.
- 4) Distribute 15 µl Mastermix\* with a micropipette and filtered tips in each tube or well of microplate for real time PCR.
- 5) Add 10 µl of DNA sample.
- 6) In parallel test the following controls:
  - Positive control(s):
    - o Qualitative test: 15 µl Mastermix + 10 µl CP-1
    - o Quantitative test: 15 µl Mastermix + 10 µl CP-1 to CP-4 to generate CP standard range
  - Negative control:
    - o Case (a): For samples extracted without CI-PCR
      - 15 µl Mastermix + 10 µl water supplied (CN-H2O)
    - o Case (b): For samples extracted with CI-PCR
      - 15 µl Mastermix + 9 µl water supplied (CN-H2O) + 1 µl CI-PCR
- 7) Close immediately with an adhesive film or transparent caps to avoid all contamination.
- 8) Centrifuge briefly to collect all the PCR reaction mix at the bottom of the tubes or plate.
- 9) Program the real-time PCR instrument as follows.

Program	Temperature	Duration	Cycle(s)	
<b>Denaturation</b>	95°C	3 min	1	-
<b>Amplification</b>	95°C	10 sec	40	-
	60°C	30 sec		Fluorescence Acquisition

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

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

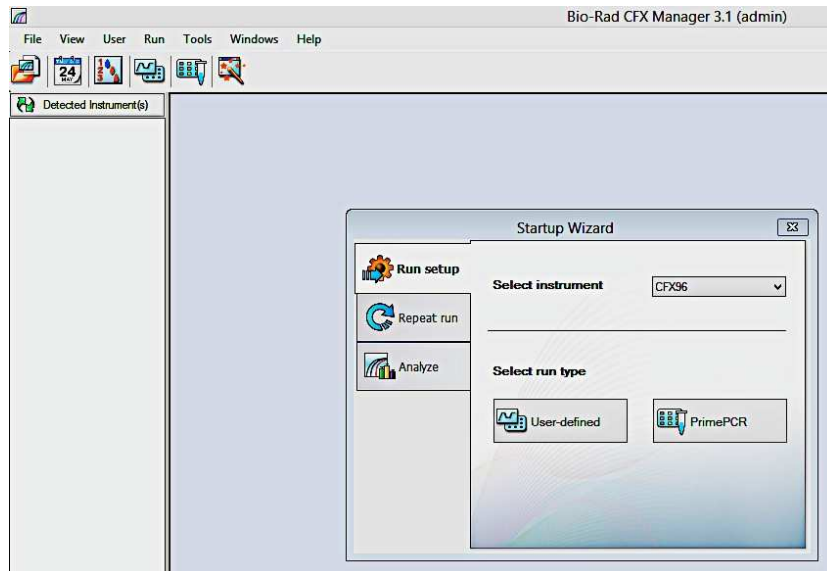
Note 3: On Rotorgene™, please calibrate the signal by clicking on "GAIN optimization".

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

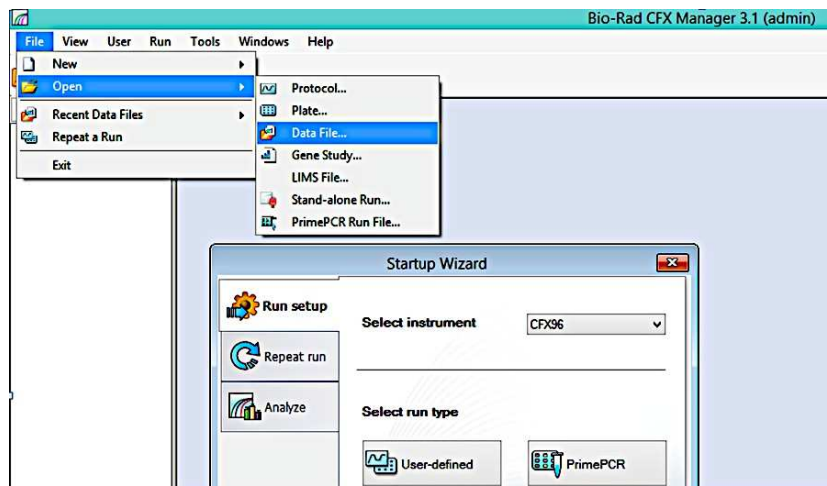
## VALIDATION OF THE EXPERIMENT

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

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

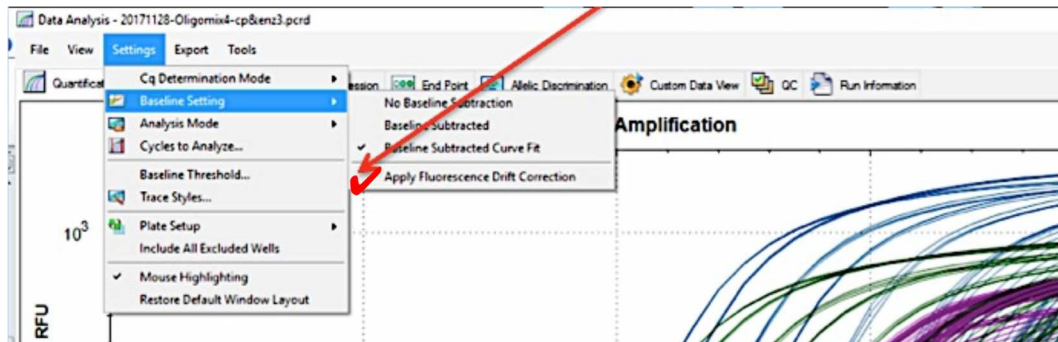


- Click on File and select Open, then Data File



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

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



Once this is done, the analysis can start.

**For the assay to be valid**, the Ct values for the controls must be the following (Table 4). Otherwise, the experiment is not valid.

**Table 4:**

Positive Control	
FAM	Ct ≤ 25
HEX	Ct ≤ 25
Negative Control	
FAM	Undetermined Ct
HEX	Undetermined Ct
CY5	Ct ≤ 35

Moreover, for quantitative PCR, in addition to the valid controls of Table 4, efficiency should be between 80 and 120% on the FAM and HEX channels, and the coefficient of correlation > 0.95.

## DATA ANALYSIS AND INTERPRETATION

### DNA extraction and PCR inhibition control in samples:

Two results can be obtained:

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

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

For clinical samples, the following results are possible:

\* Ct cut off for positivity of samples:

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

PCR Signal			Presence of virus		Test validity/comment
FAM	HEX	CY5	HTLV1	HTLV2	
+*	-	+	Yes	No	<b>VALID</b>
-	+*	+	No	Yes	<b>VALID</b>
+*	+*	+	Yes	Yes	<b>VALID</b>
-	-	+	No	No	<b>VALID</b>
+*	+*	-	Yes	Yes	<b>VALID</b> Possible PCR inhibition or problem with extraction that does not prevent the detection of viruses.
+*	-	-	Yes	No possible interpretation	<b>VALID FOR HTLV1:</b> Possible PCR inhibition or problem with extraction that does not prevent the detection of HTLV1 <b>NOT VALID FOR HTLV2:</b> Possible PCR inhibition or problem with extraction that would prevent the detection of HTLV2 → <b>dilute first 5 x the sample and test again; if necessary redo an extraction</b>
-	+*	-	No possible interpretation	Yes	<b>VALID FOR HTLV2:</b> Possible PCR inhibition or problem with extraction that does not prevent the detection of HTLV2 <b>NOT VALID FOR HTLV1:</b> Possible PCR inhibition or problem with extraction that would prevent the detection of HTLV1 → <b>dilute first 5 x the sample and test again; if necessary redo an extraction</b>
-	-	-	No possible interpretation	No possible interpretation	Possible PCR inhibition or problem with extraction → <b>dilute first 5 x the sample and test again; if necessary redo an extraction</b>

## QUANTITATIVE ANALYSIS

Define the concentrations of the standards of HTLV1 (channel FAM) and HTLV2 (channel HEX) during the setting of the thermal cycler ( $3 \cdot 10^6$ ,  $3 \cdot 10^4$ ,  $3 \cdot 10^3$ , and  $3 \cdot 10^2$  copies/μl for CP-1, CP-2, CP-3 and CP-4, respectively). The software will draw the standard curve and will calculate directly the corresponding number of copies/μl for the samples.

Depending on the input quantity of DNA, volume of body liquid added, or number of peripheral blood mononuclear cells (PBMC), this number of copies/μl may be converted into a number of copy/μg (DNA) or copy/ml (biological fluid) or of copy/n cells (proviral load PVL/n cells).

It is also possible to normalize results by using a reference housekeeping gene of your choice by performing an independent PCR for this reference gene (not included in the kit). However, it is the responsibility of the user to validate such normalization system.

The results below quantification threshold cannot be quantitatively validated, but retain their quality of detectability (positivity validated by the fluorophore channel).

## PERFORMANCE ANALYSIS

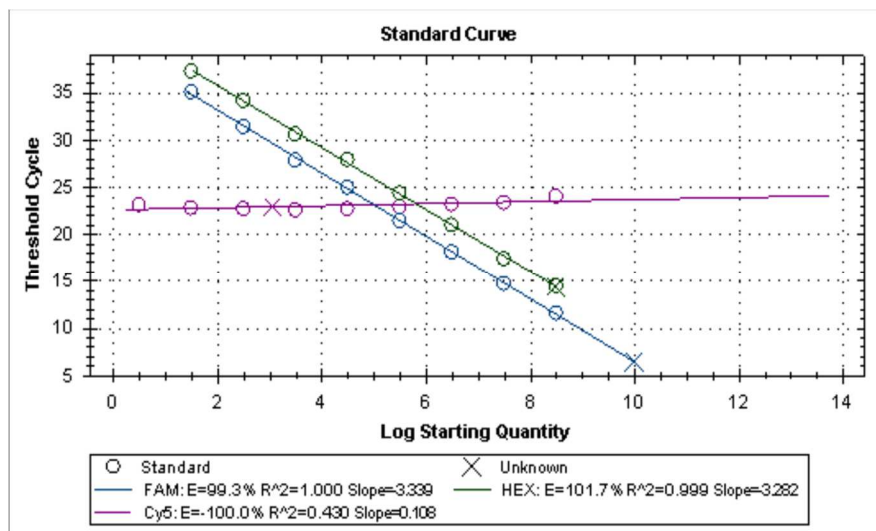
### Limit of detection / Analytical sensitivity

100 copies/ $\mu\text{l}$  of positive control

### Linearity of quantification

From 300 copies/ $\mu\text{l}$  to  $3 \cdot 10^7$  copies/ $\mu\text{l}$  of positive control

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



### Validation on clinical samples

#### Study 1:

The tests were performed on CFX96 (Biorad).

The specificity and sensitivity were analyzed from DNA of 54 extracted samples from peripheral blood mononuclear cells (PBMC), cerebrospinal fluid, lymph nodes, skin, and soft tissues, from patients of different parts of the world and two independent reference centers.

➤ **Sensitivity:**

- HTLV1 positive: 31 PBMC samples, 7 cerebrospinal fluid samples, 1 lymph node sample, 1 skin sample and 2 other soft tissues,
- HTLV2 positive: 12 PBMC samples

**HTLV1: > 99%; HTLV2: 83%.**

➤ **Specificity:**

All of the tested negative samples are negative and concordant with pre-tests. **Specificity > 99% for HTLV1 and HTLV2.** No cross reaction between HTLV1 and HTLV2 was observed.

**Study 2:** This study has been performed from HTLV-1 positive whole blood samples. The tests were performed on ABI7500 (Applied Biosystems). The PBMC cells are separated from the blood samples (EDTA tubes) by centrifugation in ficoll density gradient. Then the QIAamp blood kit (Qiagen) was used.

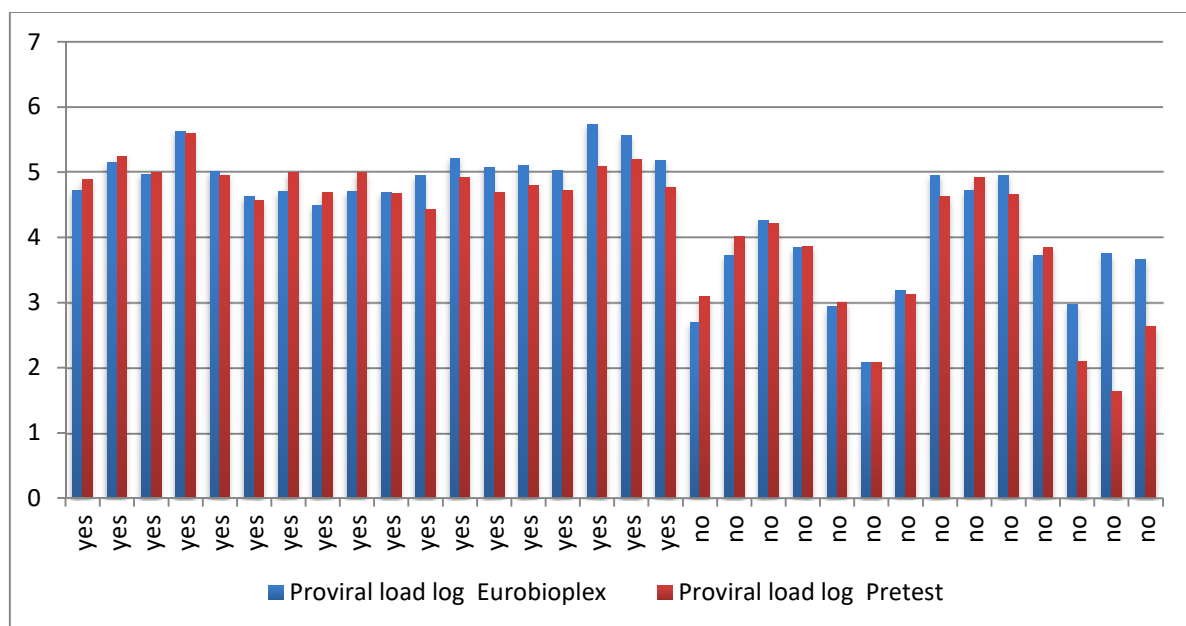
➤ **Specificity: > 99%**

10 HIV positive samples and 10 zikavirus positive samples have been tested and found to be negative for HTLV-1.

➤ **Sensitivity: > 99%**

32 whole blood samples from subjects infected with HTLV-1, asymptomatic or suffering from paraparesis tropical spastic or myelopathy associated with HTLV-1 (TSP/HAM), have been tested, and all detected positive.

There was an excellent correlation between proviral loads obtained with Eurobioplex and the reference/pre-test method (graph below: yes = TSP/HAM; no = asymptomatic).



Legend: yes = TSP/HAM; no = asymptomatic

## BIBLIOGRAPHY

Lézin A, Amoureux MC, Fagour, Agbalika F and Césaire R, Quantitative real time PCR for HTLV1 and HTLV2, 17th International Conference on Human Retrovirology : HTLV and related viruses, 2015.

Dehée A, Césaire R, Désiré N, Lézin A, Bourdonné O, Béra O, Plumelle Y, Smadja D, Nicolas JC. Quantitation of HTLV1 proviral load by a Taqman real time PCR assay J Virol Methods. 2002 Apr;102 (1-2):37-51.

Gouhier E, Gaubert-Maréchal E, Abboud P, Couppié P, Nacher M. predictive factors of HTLV1-HIV coinfections in French Guiana. Am J Trop Med Hyg. 2013 Sep;89 (3):549-53.

de Mendoza C, Caballero E, Aguilera A, Pirón M, Ortiz de Lejarazu R, Rodríguez C, Cabezas T, González R, Treviño A, Soriano V; Spanish HIV-2/HTLV Group. HIV-2 and HTLV1 infections in Spain, a non-endemic region. AIDS Rev. 2014 Jul-Sep;16(3):152-9.

Paiva A, Casseb J. origin and prevalence of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV1) and type 2 (HTLV2) among indigenous populations in the americas. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2015 Feb;57(1):1-14.

Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, Recommandations de bonnes pratiques, [www.has-santé.fr](http://www.has-santé.fr)

## WASTE DISPOSAL

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

## SYMBOLS



Reference



Batch number



Limits of storage temperature



Expiration Date



Content sufficient for « N » reactions



Keep protected from light



Manufacturer

**RUO**

Research Use only



Instructions for use



eurobio

SCIENTIFIC

7, avenue de Scandinavie

91953 Les Ulis Cedex

FRANCE