

## BIOSYNEX AMPLIQUICK *Leptospira*

PCR DESTINÉE À LA DÉTECTION DE *LEPTOSPIRA INTERROGANS* (AGENT PATHOGÈNE RESPONSABLE DE LA LEPTOSPIROSE) DANS LES URINES, LE SÉRUM OU LE PLASMA.

*Dispositif médical de diagnostic in vitro réservé à un usage professionnel.*

**REF** 3150064

### 1. DESTINATION

BIOSYNEX AMPLIQUICK *Leptospira* est un test de diagnostic moléculaire in vitro destiné à la détection qualitative non-automatisé de *Leptospira interrogans* (bactérie responsable de la leptospirose) à partir d'un extrait d'ADN obtenu à partir de prélèvements urinaires ou de sérum/plasma. Ce test permet de détecter une cible moléculaire de *Leptospira* située sur le gène lipL32 codant une protéine de la membrane externe présente uniquement chez les souches pathogènes. Ce test non automatisé est destiné au diagnostic in vitro en laboratoire par des professionnels uniquement.

### 2. RÉSUMÉ CLINIQUE

La leptospirose est une maladie bactérienne présente dans le monde entier. La maladie est principalement causée par des bactéries pathogènes de l'espèce *Leptospira interrogans*. Ses principaux réservoirs sont les rongeurs, en particulier les rats, qui excrètent la bactérie dans leur urine. Celle-ci se maintient assez facilement dans l'environnement (eau douce ou sols boueux) ce qui favorise la contamination. Chez l'homme, la maladie est souvent bénigne si la prise en charge est appropriée.

L'incubation dure en moyenne 4 à 14 jours. La maladie peut évoluer vers différentes formes cliniques. Dans la forme modérée, elle s'apparente à un syndrome grippal avec fièvre, maux de tête, douleurs articulaires et musculaires. Sans prise en charge adaptée, elle peut évoluer vers des formes plus graves avec une atteinte multiviscérale pouvant entraîner insuffisance rénale, atteinte neurologique, hémorragies voire la mort.

En France, les populations les plus exposées sont les travailleurs agricoles, les égoutiers, et plus largement celles régulièrement en contact avec des environnements et surfaces contaminés tels que les eaux, les sols ou les végétaux. Il y a une incidence également chez les personnes pratiquant des loisirs nautiques en eau douce.

Le diagnostic clinique peut être confirmé par amplification du génome de la bactérie par PCR. Pour les échantillons de sérum ou plasma, la PCR n'a d'intérêt que lors de la première semaine suivant l'apparition des symptômes. Passé ce délai, une sérologie devra être faite pour rechercher des anticorps. Pour les échantillons urinaires, la PCR peut être effectuée à partir de la deuxième semaine suivant le début de la fièvre.

Le diagnostic et la mise en place d'une antibiothérapie précoces diminuent le risque de complication, et raccourcit l'évolution de la maladie.

### 3. PRINCIPE DU TEST

Le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK *Leptospira* est un test de diagnostic in vitro, basé sur la technologie de PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel par hydrolyse de sondes fluorescentes. Il permet l'amplification spécifique et la détection simultanée de cibles moléculaires portant les séquences d'intérêt : La séquence lipL32 de l'ADN bactérien, un contrôle interne exogène CIEZ, ainsi que le contrôle interne endogène de la RNase P.

Cette méthode utilise des sondes marquées avec le fluorophore FAM pour l'amplification spécifique du gène bactérien, une sonde marquée avec le fluorophore HEX pour le contrôle exogène CIEZ permettant de valider la réaction d'amplification, excluant ainsi des résultats faussement négatifs, et d'une troisième sonde marquée par le fluorophore Cy5 utilisée pour l'amplification de la région RNase P codant pour l'ARN humain hautement conservé du contrôle interne. Ainsi ce second contrôle procédural permet d'évaluer la qualité du prélèvement de l'échantillon biologique, et de valider les étapes d'extraction et de purification de l'ADN.

L'augmentation du signal de fluorescence est détectée seulement si la séquence cible complémentaire à la sonde amplifiée est présente dans l'échantillon. Le signal fluorescent est donc directement proportionnel à l'amplification de la cible pendant la phase d'amplification. La valeur C<sub>q</sub> (cycle quantification) correspond au nombre de cycles à partir duquel la fluorescence commence à augmenter de manière exponentielle différenciellement du bruit de fond. Le kit est utilisable sur trois types de matrices :

- Echantillon urinaire
- Sérum
- Plasma

En première intention, nous recommandons que les tests soient effectués à partir de sérum ou de plasma (Goarant, 2016). Pour les échantillons d'urine, nous recommandons dans la mesure du possible d'effectuer une extraction/purification de l'ADN plutôt que d'utiliser la méthode de traitement de l'échantillon, car travailler à partir de l'ADN extrait offre une meilleure sensibilité.

Avant leur utilisation avec le kit d'amplification BIOSYNEX AMPLIQUICK Leptospira (§9), les échantillons doivent être préalablement collectés et traités selon les procédures détaillées aux §7 et §8 en utilisant le kit de traitement des échantillons BIOSYNEX AMPLIQUICK (réf 3150063 et références associées) ou traités pour obtenir des extraits d'ADN purifiés à l'aide d'un kit adapté.

#### 4. MATERIEL REQUIS

##### Matériel fourni :

- 1 Microtube contenant 325µL de Master Mix prêt à l'emploi (25 réactions)
- 1 Contrôle positif (CONTRÔLE + capuchon rouge)
- 1 Contrôle négatif (CONTRÔLE -, capuchon vert)

##### Matériel nécessaire mais non fourni :

- Kit d'extraction de l'ADN
- Gants non poudrés à usage unique
- Micropipettes & pointes à filtre
- Centrifugeuse pour microplaque PCR
- Thermocycleur pour PCR en temps réel
- Tubes/barrettes/plaques de PCR

Le thermocycleur pour PCR en temps réel utilisé pour le test doit posséder les caractéristiques principales suivantes :

- Être un système "ouvert"
- Essais quantitatifs de PCR en temps réel.
- Bloc de thermocyclage programmable.
- Source d'excitation : LEDs, lampe ou laser.
- Jeux de filtres (longueurs d'onde Excitation/Émission) adaptés à la détection des fluorophores "reporter" des sondes FAM, HEX et Cy5.
- Connexion avec un ordinateur utilisant un logiciel spécifique d'analyse permettant la récupération des données de fluorescence, et l'interprétation des résultats.

Le kit a été développé et validé sur les instruments de PCR en temps réel suivants :

- CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Opus Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- QuantStudio 5 System (Applied Biosystems)
- LightCycler 480 (Roche)
- Amplix-DT lite 48 (DNA Technology)

Si un autre thermocycleur est utilisé, veuillez réaliser votre propre validation du kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Leptospira en utilisant les contrôles fournis et/ou des échantillons qualifiés appropriés avant d'utiliser le test.

#### 5. PRÉCAUTIONS

- Suivez attentivement ce mode d'emploi. Le non-respect de l'une des instructions de cet IFU peut nuire à la performance du test et avoir des conséquences néfastes.
- Respecter les Bonnes Pratiques de Laboratoire et porter des gants de laboratoire non poudrés jetables tout au long de la procédure de test.
- La gestion quotidienne d'un grand nombre d'échantillons et la grande sensibilité de la technique PCR peuvent, en l'absence de précautions, générer des résultats faussement positifs par contamination. Les opérations de pré-manipulation de la PCR, de post-PCR et d'extraction de l'ADN doivent donc être

effectuées dans des pièces séparées. Porter des gants jetables dans chaque zone et les changer avant de passer d'une zone à l'autre.

- Le test et le capuchon sont à usage unique. Ne pas les réutiliser. Ne pas ouvrir les tubes de PCR à la fin du test.
- Ne pas utiliser le test si la feuille d'aluminium est ouverte ou endommagée. Une fois la feuille d'aluminium retirée, utiliser le test immédiatement.
- Ne pas utiliser le kit s'il est arrivé décongelé.
- Ne pas utiliser le kit en cas de dommage ou de fuite. En cas de détérioration de l'emballage uniquement (pas de casse ni de fuite), le kit reste utilisable.
- Garder le kit à l'abri de la lumière.
- Centrifuger les tubes avant de les ouvrir, en les ouvrant l'un après l'autre et en les refermant bien entre chaque pour éviter toute contamination.
- Le CONTRÔLE+ contient des quantités importantes de séquences d'ADN. Il peut donc potentiellement contaminer les autres composants du kit si les bonnes pratiques de biologie moléculaire ne sont pas suivies. Pour limiter ce risque de contamination, il est recommandé de stocker ce composant en dehors du kit après la première ouverture du kit.
- Les contrôles négatifs et positifs inclus dans le kit reproduisent les résultats obtenus avec des échantillons négatifs ou positifs respectivement. Ils doivent être utilisés à chaque nouvelle analyse.
- Pour s'assurer de l'absence de contamination lors des manipulations, il est laissé à l'utilisateur le soin d'inclure dans sa démarche qualité interne, à la fréquence choisie, un puits de contrôle négatif expérimental dans lequel 8µL d'eau de qualité biologie moléculaire sont ajoutés au Master mix.
- Lors de l'utilisation de contrôles négatifs et positifs avec une série de patients, il est recommandé de déposer d'abord le contrôle négatif, puis les échantillons de patients, et de terminer par le dépôt du contrôle positif.
- Jeter les pièces souillées ou les composants vides du kit dans une poubelle adaptée aux déchets biologiques.
- Le dispositif contient du matériel d'origine bactérienne ou animale et peut transmettre des agents infectieux ; il doit donc être manipulé avec précaution.
- Le sang peut interférer avec les résultats du test. L'échantillon ne doit pas contenir de sang.
- Si, en relation avec l'utilisation de BIOSYNEX AMPLIQUICK Leptospira, un décès ou une détérioration grave de la santé est survenu, il convient de le signaler au fabricant et à l'autorité compétente de votre pays. En cas de doute, signalez-le.
- Fiche de données de sécurité disponible sur demande. Le résumé de la sécurité et des performances sera disponible en ligne sur Eudamed.

## 6. CONSERVATION DU KIT

Le kit est expédié congelé. Les composants du kit doivent arriver congelés. Conserver le kit à une température de -20°C. Dans ces conditions, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du kit. Ne pas utiliser le kit et ses composants après la date de péremption. Protéger le kit et les réactifs de la lumière directe.

Le kit peut subir 10 cycles de congélation/décongélation sans que la durée de conservation et les qualités du produit ne soient altérées.

## 7. RECUEIL ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

BIOSYNEX AMPLIQUICK Leptospira permet l'amplification de l'ADN de Leptospira sur sérum, plasma ou urine. Ce test peut être réalisé en utilisant un extrait ADN purifié issu d'échantillon, ou d'échantillons collectés et traités avec le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Treatment (ref 3150063 et références associées).

### Echantillons d'urine :

L'urine doit être récoltée dans un pot à prélèvement sec stérile et sans conservateur. Avant analyse Les échantillons d'urine peuvent être conservés jusqu'à 8h à température ambiante (+21° +/- 2°C) et 24h à +2-8°C. Après l'étape de pré-traitement, le culot des échantillons d'urine remis en suspension dans le tampon de resuspension du kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Treatment peut être conservé jusqu'à 24h à température ambiante ou à +2-8°C.

### Echantillons de sérum/plasma :

L'échantillon de sang doit être recueilli dans un tube EDTA ou hépariné.

Avant analyse, les échantillons de plasma et de sérum peuvent être conservés jusqu'à 8 heures à température ambiante et 7 jours à +2-8°C.

Après l'étape de centrifugation, le culot des échantillons de plasma et de sérum est remis en suspension dans le tampon de resuspension du kit AMPLIQUICK Sample Treatment. Il peut être conservé jusqu'à 8 heures à température ambiante et 7 jours à +2-8°C pour le plasma et 5 jours à +2-8°C pour le sérum.

Le transport des échantillons cliniques doit respecter les réglementations locales pour le transport des agents infectieux.

## 8. EXTRACTION DES ACIDES NUCLÉIQUES

L'extraction des acides nucléiques doit être effectuée avant le protocole d'amplification à l'aide d'un système d'extraction approprié pour l'ADN bactérien. Veuillez suivre les instructions du fabricant. Le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Leptospira a été validé avec les kits d'extraction suivants :

- BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample treatment (Biosynex - ref. 3150063 et références associées)
- QIAamp DNA Mini kit (Qiagen - Ref 51306)
- NucleoMag Dx Pathogen (Macherey Nagel - Ref 744215)
- NucleoMag Pathogen (Macherey Nagel - Ref 744210)
- Kit de réactifs d'extraction d'acides nucléiques (ADN/ARN) (Singuway Biotech - Ref MTQM036).

Si une autre méthode ou un autre kit d'extraction d'ADN est utilisé, veuillez effectuer votre propre validation de la méthode du kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Leptospira en utilisant des échantillons respiratoires qualifiés avant d'utiliser le test (ne pas utiliser les contrôles fournis).

Il n'est pas nécessaire d'extraire les contrôles positif et négatif avec le kit d'extraction des acides nucléiques.

## 9. PROTOCOLE D'AMPLIFICATION

Il est recommandé d'effectuer les dépôts de Master Mix et les ajouts d'échantillons sur un support réfrigéré ou sur de la glace.

1. Sortir le tube de Master mix du congélateur et le laisser décongeler brièvement à température ambiante ou sur de la glace, puis vortexer.
2. Centrifuger 10 secondes le tube afin de récupérer les éventuelles gouttelettes présentes sur les parois ou dans le bouchon.
3. Déposer 12 µL de Master mix par puits de PCR.
4. Ajouter 8µL d'échantillon ou de contrôle.
5. Fermer les puits avec les bouchons appropriés.
6. Centrifuger pendant 10 secondes.
7. Placer les tubes dans le thermocycleur et lancer le programme d'amplification suivant :

Programme PCR :

Etape	Répétitions	Température	Durée	Acquisition
Activation Taq	1x	95°C	3 min	-
Dénaturation	11x	95°C	15 sec	-
Hybridation / Elongation		69.5°C	1 min	-
Dénaturation	45x	95°C	15 sec	-
Hybridation / Elongation		59°C	1 min	oui

Entrer **20 µL** de volume réactionnel dans le programme du thermocycleur.

Veuillez-vous référer au mode d'emploi du thermocycleur utilisé quant aux informations nécessaires à la programmation.

Réglage des canaux de détection :

Cible	Fluorochrome
Gène lipL32 de Leptospira	FAM
Contrôle interne CIEZ	HEX
Contrôle procédural gène RNase P	Cy5

## 10. ANALYSE DES DONNÉES ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

### A. Critères de validation de l'essai

#### Contrôle négatif :

La fluorescence émise doit être en-dessous du seuil (Threshold). C'est un indicateur d'amplification non-spécifique. Si la fluorescence dépasse le seuil, vérifier la présence d'une courbe atypique. Dans le cas d'une courbe d'amplification, une contamination ou une erreur de distribution dans les microtubes est à envisager. Seuls les deux contrôles (internes CIEZ et procédural RNase P) doivent être amplifiés.

#### Contrôle positif :

La valeur du contrôle positif doit être détectée préférentiellement avant 30 cycles ( $Cq \leq 30$ ). En l'absence d'amplification du contrôle positif, l'existence d'un problème d'amplification ou de détection de fluorescence (thermocycleur défectueux ou non adapté à la méthode) sont à envisager.

#### Contrôle interne d'amplification :

Le contrôle interne CIEZ permet de s'assurer que les enzymes présentes dans le Master Mix sont fonctionnelles et valide la réaction d'amplification. Le contrôle procédural RNase P valide la qualité de la collecte de l'échantillon biologique et valide les étapes d'extraction et de purification de l'ADN. En effet, les courbes d'amplification du contrôle interne exogène et du contrôle procédural RNase P doivent être observées dans les canaux HEX et Cy5.

Néanmoins, deux situations d'absence d'amplification des contrôles internes peuvent être observées :

- Si le gène cible est présent initialement dans l'échantillon avec un nombre élevé de copies, les contrôles internes peuvent ne pas être amplifiés. Ce résultat est conforme et n'invalide pas le test. Il doit être interprété comme un résultat positif malgré l'absence de signal du contrôle interne. Ce phénomène est le résultat d'une compétition de l'amplification entre les contrôles internes et les cibles présentes à un nombre élevé de copies.
- Si le gène cible dans le canal FAM n'est pas amplifié et qu'il n'y a pas d'amplification des contrôles internes dans les canaux HEX et Cy5, alors aucun résultat ne peut être rendu. Cette situation met en évidence la présence d'inhibiteurs de la PCR. La PCR doit être réitérée en repartant de l'échantillon primaire et sur extrait d'ADN préférentiellement.

### B. Interprétation qualitative (positive ou négative)

Les signaux supérieurs au seuil (threshold), **et étant visuellement conformes à une courbe classique d'amplification en PCR**, sont considérés comme des résultats positifs.

Certains échantillons peuvent présenter des courbes atypiques qui ne sont pas caractéristiques de courbes d'amplification. Dans ce cas, il ne faut pas considérer le résultat comme interprétable et renouveler l'analyse de l'échantillon avec les contrôles.

Canaux de détection			Interprétation
FAM (Gène lipL32)	HEX (Contrôle interne CIEZ)	Cy5 (Gène RNaseP)	
-	+	+	Contrôle négatif
+	+	+	Contrôle positif
+	+	+	Patient présentant de l'ADN spécifique de Leptospire
+	+	-*	
+	-*	-*	
+	-*	+	
-	+	+	Patient ne présentant pas de l'ADN spécifique de Leptospire détectable
-	+	-	Résultat invalide : mauvaise qualité du prélèvement, inhibition de la réaction de PCR ou problème lors du test- Réaliser un nouveau test ou un nouveau prélèvement
-	-	-	

NB : \*En cas de signaux positifs dans le canal (FAM) de détection de la cible pathogène, les signaux des contrôles internes ne sont pas nécessaires pour valider le résultat. Une charge élevée d'agents pathogènes peut entraîner un signal réduit ou absent pour le contrôle interne et/ou pour le contrôle procédural.

## 11. PERFORMANCES

### Sensibilité analytique

La limite de détection (LoD) du kit BIOSYNEX AMPLIQUICK *Leptospira* est définie comme étant la concentration pouvant être détectée à au moins 95% sur un échantillon d'ADN spécifique de *Leptospira interrogans*.

Les extraits d'ADN ont été obtenus après purification avec le kit QIAamp DNA Mini kit (Qiagen).

Les échantillons non extraits ont été préparés avec le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample treatment (ref. 3150063).

La LoD<sub>95</sub> a été déterminée statistiquement, en se basant sur les résultats obtenus en effectuant une série de dilutions d'un échantillon de référence avec un nombre connu de bactéries :

Type d'échantillon	LoD <sub>95</sub> ( <i>Leptospira</i> /mL)
AND extrait (tout type d'échantillon)	467.4
Urine (sans extraction d'ADN)	1077.07
Serum (sans extraction d'ADN)	561.26
Plasma (sans extraction d'ADN)	450.094

### Spécificité analytique

Spécificité du gène *lipL32*

La sélection des oligonucléotides (amorces et sondes) a été validée *in silico* par alignement BLAST. La comparaison des séquences montre une détection spécifique de *lipL32* des souches de *Leptospira* pathogènes.

Aucune amorce ou sonde ne détectent d'ADN bactérien autre que celui de *Leptospira* ciblé.

23 ADN de *Leptospira* pathogènes ou saprophytes exprimant *lipL32* dont 3 dans lesquelles la séquence d'ADN est peu conservée, ont été testées avec le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK *Leptospira*.

<i>L. mayottensis</i>	+	<i>L. gomenensis</i>	+
<i>L. alexanderi</i>	+	<i>L. putramalaysiae</i>	+
<i>L. licerasiae</i>	+	<i>L. tipperaryensis</i>	+
<i>L. fainei</i>	+	<i>L. borgpetersenii</i>	+
<i>L. kirschneri</i>	+	<i>L. interrogans</i>	+
<i>L. wolffii</i>	+	<i>L. noguchii</i>	+
<i>L. kmetyi</i>	+	<i>L. santarosai</i>	+
<i>L. alstonii</i>	+	<i>L. weilii</i>	+
<i>L. adleri</i>	+	<i>L. inadai</i>	-
<i>L. barantonii</i>	+	<i>L. biflexa</i>	-
<i>L. ellisii</i>	+	<i>L. wolbachii</i>	-
<i>L. dzianensis</i>	+		

Réactivité croisée

Un panel de 79 échantillons d'ADNs et 38 d'ARNs issus d'une biobanque dont la liste est donnée dans les tableaux suivants, ont été testés avec le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK *Leptospira*. Pour l'ensemble de ces échantillons, aucune amplification de la cible de *Leptospira* (gène *lipL32*) n'a été observée.

ADN		
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>Enterococcus faecium</i> (VanA)	<i>Mycobacterium ulcerans</i>
<i>Adenovirus</i>	<i>Epstein-Barr Virus</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>Adenovirus 41</i>	<i>Escherichia coli</i> (EAEC)	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Escherichia coli</i> (EIEC)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i> (ETEC)	<i>Neisseria meningitidis</i> Sg A
<i>Bartonella henselae</i>	<i>Escherichia coli</i> (VTEC)	<i>Neisseria meningitidis</i> Sg B
<i>Bartonella Quintana</i>	<i>Francisella tularensis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> Sg C
<i>Bk Virus</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Papillomavirus type 16</i>
<i>Bordetella holmesii</i>	<i>Giardia intestinalis</i>	<i>Papillomavirus type 18</i>
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Parvovirus B19</i> (Plasmid)
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Rickettsia conorii</i>
<i>Borrelia afzelii</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Borrelia garinii</i>	<i>Herpes simplex 1</i>	<i>Salmonella typhi</i>

<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Herpes simplex 2</i>	<i>Staphylococcus aureus (MecA-)</i>
<i>Brucella abortus</i>	<i>Hhv-6</i>	<i>Staphylococcus aureus (MecA+)</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Hhv-8</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Klebsiella pneumoniae (NDM-1)</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>Candida auris</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Leishmania chagasi</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>Leishmania infantum</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>Chlamydophila psittaci</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Varicella-Zoster Virus</i>
<i>Coxiella burnetii</i>	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Mycobacterium kansasii</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Cytomegalovirus</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Enterococcus faecalis (VanB)</i>		

ARN	
<i>Coronavirus Oc43</i>	<i>Influenza A H5</i>
<i>Coronavirus</i>	<i>Influenza B</i>
<i>Coronavirus SARS (2003)</i>	<i>Measles</i>
<i>Coxsackie A6</i>	<i>MERS Coronavirus</i>
<i>Coxsackie B1</i>	<i>Mumps</i>
<i>Coxsackie B5</i>	<i>Norovirus</i>
<i>Dengue 1 Virus</i>	<i>Novel Influenza A H1n1</i>
<i>Dengue 2 Virus</i>	<i>Parainfluenza 1</i>
<i>Dengue 3 Virus</i>	<i>Parainfluenza 2</i>
<i>Dengue 4 Virus</i>	<i>Parainfluenza 3</i>
<i>Echovirus 5</i>	<i>Parainfluenza 4 A</i>
<i>Enterovirus 68</i>	<i>Respiratory Syncytial Virus (Subtype A)</i>
<i>Rhinovirus</i>	<i>Respiratory Syncytial Virus (Subtype B)</i>
<i>Rotavirus</i>	<i>West Nile Virus</i>
<i>Rubella</i>	<i>Yellow Fever Virus</i>
<i>Tick-Borne Encephalitis Virus</i>	<i>Zika Virus (Asian Lineage)</i>
<i>Human Parainfluenza 1</i>	<i>Zika Virus</i>
<i>Influenza A H1</i>	<i>Chikungunya Virus</i>
<i>Influenza A H3</i>	<i>SARS-CoV-2</i>

Différents échantillons d'urine positifs en ADN d'organismes pathogènes ont été testés. Aucun signal d'amplification n'a été observé en présence des micro-organismes suivants :

- *Klebsiella pneumoniae*
- *Escherichia coli*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Enterococcus faecalis*
- *Proteus mirabilis*
- *Citrobacter koseri*
- *Staphylococcus aureus*
- *Klebsiella oxytoca*
- *Staphylococcus saprophyticus*
- *Enterobacter aerogenes*
- *Candida Albicans*

### Interférence

La présence d'inhibiteurs de PCR dans l'échantillon peut rendre le résultat du test ininterprétable. La présence de divers inhibiteurs dans des échantillons plasmatiques, sériques ou urinaires a été testée. Parmi les substances testées, seul le sang entraîne l'inhibition de l'amplification des séquences cibles avec le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Leptospira.



Matrice	Substance testée	Condition	Interférence observée
Sérum Plasma	Sang	≥ 2%	Oui
	Héparine	N/A	
Urine	Albumine	5%	Aucune
		0,1%	
	Glucose	1%	
		0,1%	
	pH	pH4	
		pH9	
	Urée	5 mmol/L	
		1,4 mmol/L	
0,4 mmol/L			
Sang	2%	Oui	
	5%		

#### Cut-off

Aucun cut-off ne nécessite d'être appliqué.

#### Performances cliniques

Les performances cliniques ont été déterminées sur 193 échantillons issus de 4 études internes qui ont été qualifiés positifs ou négatifs à *Leptospira* à l'aide de tests PCR marqués CE et référencés par le ministère de la Santé français ou de culture bactérienne couplée à la spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Le tableau de contingence ci-dessous reprend les performances du kit BIOSYNEX AMPLIQUICK *Leptospira* sur des échantillons traités avec le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Treatment :

	Type d'échantillon	Qualification pour <i>Leptospira</i>	
		Positif	Négatif
Etude 1	Urine	0	90
Etude 2	Serum	0	30
	Plasma	0	30
Etude 3	Urine	15	2*
	Serum	12	0
	Plasma	3	0
Etude 4	Urine	6	0
	Serum	3	0
	Sang total (seulement testé sur extrait d'ADN)	2	0

\*Parmi les 32 échantillons qualifiés de positifs pour *Leptospira* dans l'étude 3, deux se sont révélés négatifs à l'aide du kit BIOSYNEX AMPLIQUICK *Leptospira* et ont été confirmés négatifs à l'aide d'un autre kit marqué CE disponible sur le marché. Ces deux échantillons ont donc été requalifiés comme négatifs.

Le tableau de contingence ci-dessous montre la performance du kit *Leptospira* AMPLIQUICK de BIOSYNEX sur des échantillons après extraction/purification de l'ADN à l'aide d'un kit commercial :

BIOSYNEX AMPLIQUICK <i>Leptospira</i>		Qualification	
		Positif	Négatif
	Positif	40	0
	Négatif	0	150

**Sensibilité : 100%**      **Spécificité : 100%**  
(95% IC : 91.19% à 100.00%)      (95% IC : 97.60% à 100.00%)

Le tableau de contingence ci-dessous reprend les performances du kit BIOSYNEX AMPLIQUICK *Leptospira* sur des échantillons traités avec le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Treatment :



		Qualification	
		Positif	Négatif
BIOSYNEX AMPLIQUICK Leptospira	Positif	35	0
	Négatif	4*	152
Sensibilité : 89.74%		Spécificité : 100%	
(95% IC : 75.78% à 97.13%)		(95% IC : 97.60% à 100.00%)	

\*Parmi les 21 échantillons d'urine qualifiés de positifs pour *Leptospira*, 4 se sont révélés négatifs avec la méthode de préparation des échantillons sans extraction d'ADN. Ces échantillons présentaient des valeurs Ct élevées et donc des charges bactériennes faibles. La LoD<sub>95</sub> est beaucoup plus élevée avec les échantillons d'urine qu'avec d'autres types d'échantillons.

### Précision

Les données de précision du kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Leptospira ont été déterminées en se basant sur 5 conditions :

- Variabilité intra-essai (au sein de la même expérience)
- Variabilité inter-essais (entre différentes expériences)
- Variabilité inter-manipulateurs
- Variabilité inter-lots
- Variabilité inter-laboratoires

Les données de variabilité sont exprimées en termes de valeur moyenne, d'écart type et de coefficient de variation, sur la base des valeurs de cycle seuil de quantification (Cq) de l'ADN de *Leptospira*.

### Données sur la variabilité intra-essai :

Deux dilutions d'échantillon ont été testées pour chaque matrice : 1 forte (+++) correspondant à 200 000 copies/μL et 1 faible (+) correspondant à 5 copies/μL, ainsi qu'un échantillon négatif (-). Chaque échantillon a été testé 20 fois.

### Extrait d'ADN

GENE LipL32	Urine			Plasma			Sérum		
	Valeurs Cq moyenne s	Ecart type	Coefficient de variation %	Valeurs Cq moyenne s	Ecart type	Coefficient de variation %	Valeurs Cq moyenne s	Ecart type	Coefficient de variation %
Echantillon -	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Echantillon +++	26,9	0,3	1,2	26,9	0,5	1,7	26,3	0,2	0,9
Echantillon +	28,5	1,0	3,5	28,8	1,0	3,4	27,9	0,7	2,6
Contrôle interne CIEZ	Valeurs Cq moyenne s	Ecart type	Coefficient de variation %	Valeurs Cq moyenne s	Ecart type	Coefficient de variation %	Valeurs Cq moyenne s	Ecart type	Coefficient de variation %
Echantillon -	22,8	0,2	1,0	22,6	0,2	0,9	22,4	0,4	1,7
Echantillon +++	23	0,2	0,8	22,9	0,4	1,7	22,9	0,2	1,0
Echantillon +	21,5	0,8	3,7	21,6	0,5	2,1	21,4	0,8	3,9

Contrôle procédura I RNase P	Valeurs Cq moyenne s	Ecart type	Coefficien t de variation %	Valeurs Cq moyenne s	Ecart type	Coefficien t de variation %	Valeurs Cq moyenne s	Ecart type	Coefficien t de variation %
Echantillon -	18.1	0.2	1.0	15.2	0.2	1.5	14.3	0.3	2.2
Echantillon +++	17,0	0,1	0,4	15,3	0,1	0,6	14,0	0,1	0,8
Echantillon +	20,8	0,1	0,6	19,1	0,1	0,6	17,6	0,1	0,6

**Echantillons prétraités avec le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Treatment**

GENE LipL32	Urine			Plasma			Sérum		
	Valeurs Cq moyenne s	Ecart type	Coefficien t de variation %	Valeurs Cq moyenne s	Ecart type	Coefficien t de variation %	Valeurs Cq moyenne s	Ecart type	Coefficien t de variation %
Echantillon -	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Echantillon +++	27,6	0,4	1,5	27,5	0,3	1,0	27	0,3	1,3
Echantillon +	29,9	1,0	3,4	29,5	0,9	3,1	28,8	0,7	2,5
Contrôle interne CIEZ	Valeurs Cq moyenne s	Ecart type	Coefficien t de variation %	Valeurs Cq moyenne s	Ecart type	Coefficien t de variation %	Valeurs Cq moyenne s	Ecart type	Coefficien t de variation %
Echantillon -	22.6	0.6	2.8	23.1	0.5	2.2	23.4	0.5	1.9
Echantillon +++	22,1	0,5	2,4	22,6	0,8	3,5	22,4	0,3	1,3
Echantillon +	21,6	0,5	2,4	21,8	0,1	0,6	21,6	0,2	1,0
Contrôle procédura I RNase P	Valeurs Cq moyenne s	Ecart type	Coefficien t de variation %	Valeurs Cq moyenne s	Ecart type	Coefficien t de variation %	Valeurs Cq moyenne s	Ecart type	Coefficien t de variation %
Echantillon -	19.9	0.1	0.7	17.2	0.2	0.9	18.0	0.2	1.0
Echantillon +++	18,3	0,1	0,7	18,0	0,1	0,8	15,3	0,1	0,7
Echantillon +	22,2	0,2	1,0	21,9	0,2	0,9	19,2	0,1	0,5

**Données sur la variabilité inter-essai, manipulateurs, lots et laboratoires :**

Deux dilutions d'échantillon ont été testées : 1 forte (+++) correspondant à 200 000 copies/μL et 1 faible (+) correspondant à 5 copies/μL. Les échantillons négatifs donnent les résultats attendus.

**Variabilité inter-essais et inter manipulateurs :**

Chaque échantillon est testé sur le même lot en double deux fois par jour par deux techniciens, pendant 5 jours.

**Variabilité inter-lots :**

Chaque échantillon est testé en triple sur le premier lot et en double sur le deuxième et troisième lots.

**Variabilité inter laboratoires :**

Chaque échantillon est testé en double dans le premier lieu et en double dans le deuxième lieu.

GENE LipL32	Valeurs Cq moyennes CTRL+	Ecart type	Coefficient de variation %	Valeurs Cq moyennes ech +++	Ecart type	Coefficient de variation %	Valeurs Cq moyennes ech +	Ecart type	Coefficient de variation %
Variabilité inter-essais	24,3	1,0	4,3	11,4	0,2	2,1	29,5	0,7	2,4
Variabilité inter manipulateurs	24,3	0,0	0,0	11,2	0,2	2,1	29,2	0,5	1,7
Variabilité inter-lots	24,2	0,5	2,0	11,1	0,5	4,2	28,8	1,4	4,9
Variabilité inter-laboratoires	24,1	0,4	1,8	10,6	0,3	3,1	26,8	0,9	3,4
Contrôle interne CIEZ	Valeurs Cq moyennes CTRL+	Ecart type	Coefficient de variation %	Valeurs Cq moyennes ech +++	Ecart type	Coefficient de variation %	Valeurs Cq moyennes ech +	Ecart type	Coefficient de variation %
Variabilité inter-essais	22,5	1,1	4,9	23,3	0,4	1,9	23,3	0,1	0,5
Variabilité inter manipulateurs	22,8	0,4	1,6	23,1	0,3	1,5	23,1	0,3	1,5
Variabilité inter-lots	23,6	0,2	0,7	23,0	0,8	3,6	23,7	0,4	1,5
Variabilité inter-laboratoires	25,9	0,1	0,5	25,9	0,5	2,1	25,7	0,7	2,7
Contrôle procédural RNase P	Valeurs Cq moyennes CTRL+	Ecart type	Coefficient de variation %	Valeurs Cq moyennes ech +++	Ecart type	Coefficient de variation %	Valeurs Cq moyennes ech +	Ecart type	Coefficient de variation %
Variabilité inter-essais	21,4	0,6	2,9	22,2	0,3	1,5	25,0	0,3	1,2
Variabilité inter manipulateurs	21,8	0,4	2,0	21,9	0,5	2,2	25,0	0,1	0,2
Variabilité inter-lots	22,5	0,2	0,9	22,1	0,2	1,1	23,8	1,1	4,4
Variabilité inter-laboratoires	22,3	0,4	1,9	21,3	0,7	3,5	21,9	0,0	0,0

## 12. LIMITES

1. Le non-respect d'une instruction de l'IFU peut avoir un effet négatif sur les performances de l'essai et/ou invalider le résultat de l'essai.
2. Comme pour tout test diagnostique, les résultats doivent être considérés avec les autres informations cliniques dont dispose le médecin. Un résultat négatif ne peut jamais exclure la présence de *Leptospira* dans l'échantillon (par exemple, les gènes peuvent être présents à une concentration inférieure à la limite

















minimale de détection du test, interférence) et un résultat positif ne peut jamais garantir la présence de *Leptospira* dans l'échantillon (par exemple, contamination). Un diagnostic définitif ne peut être posé que par le médecin après évaluation de toutes les données cliniques et de laboratoire.

- Urine sample with more than 2% blood may interfere with the test result. In case of blood in the urine sample, consider the result with caution. Serum and plasma samples should not contain blood.

### 13. BIBLIOGRAPHIE

- [www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/leptospirose](http://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/leptospirose)
- Miotto BA, da Hora AS, Taniwaki SA, Brandão PE, Heinemann MB, Hagiwara MK. Development and validation of a modified TaqMan based real-time PCR assay targeting the lipL32 gene for detection of pathogenic *Leptospira* in canine urine samples. *Braz J Microbiol.* 49:3:584-590. July 2018.
- Woods K, Nic-Fhogartaigh C, Arnold C, Boutthasavong L, Phuklia W et al. A comparison of two molecular methods for diagnosing leptospirosis from three different sample types in patients presenting with fever in Laos. *Clin Microbiol Infect.* 24:9:1017.1-1017-7. Sept 2018.
- O Munch M, Chambers LC, Manhart LE, Domogala D, Lopez A, Fredricks DN, Srinivasan S. Optimizing bacterial DNA extraction in urine. *PLOS ONE.* 14:9. Sept 2019.
- Lucchesi PMA, Arroyo GH, Etcheverria AI, Parma AE, Seijo AC. Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. 37:2:131-134. May 2004.
- Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 64:3:247-255. July 2009.
- Cyrille Goarant. Leptospirosis: risk factors and management challenges in developing countries. *Res Rep Trop Med.* 2016 Sep 28;7:49-62. doi: 10.2147/RRTM.S102543. PMID: 30050339; PMCID: PMC6028063.

### 14. SYMBOLES INTERNATIONAUX

	Consulter la notice d'utilisation ou la notice d'utilisation électronique		Contient suffisamment pour <n> tests		Référence catalogue
	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>		Limites de température		Numéro de lot
	Détection qualitative par PCR		Conserver à l'abri de la lumière		Date de péremption
	Contrôle négatif		Contrôle positif		Master MIX
	Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé et consulter la notice d'utilisation		Fabricant		Mandataire Suisse
	Importateur				

### 15. INFORMATIONS FABRICANT



**BIO SYNEX S.A.**  
22 boulevard Sébastien Brant  
67400 ILLKIRCH-  
GRAFFENSTADEN – France

Standard:

Tel : +33 3 88 78 78 87

[www.biosynex.com](http://www.biosynex.com)

Contacts France :

Tel. : +33 3 88 77 57 00

[service.clients@biosynex.com](mailto:service.clients@biosynex.com)

Contacts autres pays :

Tel. : +33 3 88 77 57 52

[sales@biosynex.com](mailto:sales@biosynex.com)

Service Après-Vente :

Tel. : +33 3 88 77 57 25

[tech.support@biosynex.com](mailto:tech.support@biosynex.com)



**BIO SYNEX SWISS S.A.**

Route de Rossemaison 100

2800 DELEMONT - Switzerland

**Derniers changements :** mise en conformité selon IVDR (EU) 2017/746

## BIOSYNEX AMPLIQUICK *Leptospira*

PCR FOR THE QUALITATIVE DETECTION OF *LEPTOSPIRA INTERROGANS* IN URINE, SERUM OR PLASMA

*In vitro* diagnostic medical device for professional use.

**REF** 3150064

### 1. INTENDED PURPOSE

BIOSYNEX AMPLIQUICK *Leptospira* is a molecular *in vitro* diagnostic test for the qualitative detection by qPCR of *Leptospira interrogans*. The test is an aid for the diagnosis of *Leptospirosis* performed using a DNA extract obtained from urine, serum or plasma samples. This test detects a molecular target of *Leptospira* located on the lipL32 gene encoding an outer membrane protein present only in pathogenic strains. This non-automated test is intended for *in vitro* diagnostic use in laboratory by professionals only.

### 2. CLINICAL SUMMARY

*Leptospirosis* is a bacterial disease that occurs worldwide. The disease is mainly caused by pathogenic bacteria of the species *Leptospira interrogans*. Its main reservoirs are rodents, especially rats, which excrete the bacteria in their urine. This bacterium is easily maintained in the environment (fresh water or muddy soils) which favors contamination. In humans, the disease is often benign with appropriate treatment.

Incubation lasts an average of 4 to 14 days. The disease can evolve into different clinical forms. In the moderate form, it resembles an influenza-like syndrome with fever, headache, joint and muscle pain. Without appropriate treatment, it can evolve into more serious forms with multivisceral damage that can lead to renal failure, neurological damage, haemorrhage and even death.

In France, the most exposed populations are agricultural workers, sewage workers, and more generally those who are regularly in contact with contaminated environments and surfaces such as water, soil or plants. There is also an incidence in people practicing freshwater leisure activities.

Clinical diagnosis can be confirmed by (real-time) PCR amplification of the bacterial genome. For serum or plasma samples, PCR is only of interest during the first week following the appearance of symptoms. After this period, serology should be performed to look for antibodies. For urine samples, PCR can be performed from the second week after the onset of fever.

Early diagnosis and antibiotic treatment reduce the risk of complications and shorten the course of the disease.

### 3. TEST PRINCIPLE

The BIOSYNEX AMPLIQUICK *Leptospira* kit is an *in vitro* diagnostic test based on real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) technology by fluorescent probe hydrolysis. It allows the specific amplification and simultaneous detection of molecular targets carrying the sequences of interest: the lipL32 sequence of the bacterial DNA, an exogenous internal control CIEZ, as well as the endogenous internal control RNase P. This method uses probes labelled with the FAM fluorophore for the specific amplification of the bacterial gene, a probe labelled with the HEX fluorophore for the CIEZ exogenous control allowing to validate the amplification reaction, thus excluding false negative results, and a third probe labelled with the Cy5 fluorophore used for the amplification of the internal control RNase P region coding for highly conserved human RNA. Thus, this second procedural control allows to evaluate the quality of the biological sample collection, and to validate the DNA extraction and purification steps.

The increase of the fluorescence signal is only detected if the target sequence complementary to the amplified probe is present in the sample. The fluorescent signal is therefore directly proportional to the amplification of the target during the amplification phase. The C<sub>q</sub> (cycle quantification) value corresponds to the number of cycles at which the fluorescence starts to increase exponentially in contrast to the background. The kit can be used on three types of samples:

- serum
- plasma
- urine

As a first line of approach, we recommend that tests be performed using serum or plasma (Goarant, 2016). For urine samples, we recommend whenever possible to perform a DNA extraction/purification rather than using the Sample Treatment method as working from extracted DNA provides better sensitivity.

Prior to their use with the BIOSYNEX AMPLIQUICK Leptospira amplification kit (§9), samples must be first collected and treated according to the procedures detailed in §7 and §8 using BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Treatment kit (ref 3150063 and related references) or processed to obtain purified DNA extracts using a suitable kit.

## 4. KIT CONTENT

### Material included

- 1 Microtube containing 325µL of ready-to-use Master Mix (25 reactions)
- 1 Positive Control (CTRL +, red cap)
- 1 Negative Control (CTRL -, green cap)

### Material required but not included

- DNA extraction kit
- Powder-free disposable gloves
- Pipettes and filtered tips
- Real-time PCR Thermal Cycler
- PCR microplate or microtubes centrifuge
- PCR tubes/strips/plate

The PCR thermal cycler used for the test must have the following main characteristics:

- Open system
- Real-time quantitative PCR assays.
- Programmable Thermal Cycler block
- Excitation source : Leds, lamp or laser
- Filter sets (excitation/emission wavelengths) suitable for the detection of "reporter" fluorophores of the FAM, HEX and Cy5 probes.
- Connection with a computer using specific analysis software that allow the recovery of fluorescence data, absolute quantification assays, and the interpretation of results.

The kit has been developed and validated with the following real-time thermal cyclers:

- CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96 Opus Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- QuantGene 9600 (Bioer)
- LightCycler 480 (Roche)
- Amplix-DT lite 48 (DNA Technology).

If another thermal cycler is used, please perform your own validation of the BIOSYNEX AMPLIQUICK Leptospira kit using the provided controls and/or appropriate qualified samples before using the test.

## 5. PRECAUTIONS

- Carefully follow these instructions for use. Failure to follow any instruction of this IFU may adversely affect the test performance and have harmful consequences.
- Follow Good Laboratory Practice and wear powder-free laboratory disposable gloves throughout the test procedure.
- The daily management of a large number of samples and the high sensitivity of the PCR technique can, in the absence of precaution, generate false positive results by contamination. Pre-handling PCR, post-PCR and DNA extraction should therefore be performed in separate rooms. Wear disposable gloves in each zone and change them before moving from one zone to another.
- The test and cap are for single use only. Do not reuse. Do not open the PCR tubes at the end of the test.
- Do not use the test if aluminum foil is opened or damaged. Once the aluminum foil is removed, use the test immediately.
- Do not use the kit if it arrived unfrozen.
- Do not use the kit in case of breakage or leakage. In the event of damage to the packaging only (no breakage or leakage), the kit remains usable.

- Protect the kit from light.
- Centrifuge the tubes before opening, opening them one after the other and closing them well between each one to avoid any contamination.
- The CTRL+ contains significant amounts of DNA sequences. It can therefore potentially contaminate the other components of the kit if good molecular biology practices are not followed. To limit this risk of contamination, it is recommended to store this component outside the kit at the first opening of the kit.
- The negative and positive controls included in the kit mimic results obtained with negative or positive samples respectively. They must be used with each new run.
- To ensure that there is no contamination during handling, it is left to the user to include as part of their internal quality approach, at the frequency chosen, an experiment negative control well in which 8µL of molecular biology grade water are added to the Master mix.
- When using negative and positive controls with a series of patients, it is recommended to first deposit the negative control, then deposit the patient samples, and to finish with the deposit of the positive control.
- Dispose of soiled parts or empty kit components in a trash bin suitable for biological waste.
- The device contains material of bacterial or animal origin and may transmit infectious agents and should be handled with caution.
- Blood may interfere with test results. Sample should not contain blood.
- If, in relation to the use of BIOSYNEX AMPLIQUICK Leptospira, a death or a serious deterioration of health has occurred, this should be reported to the manufacturer and the competent authority of your country. If in doubt, report it.
- Safety data sheet available on request. Summary of safety and performance will be available online on Eudamed

## 6. REAGENT STORAGE AND STABILITY

The kit is shipped frozen. Kit components must arrive frozen. Store the kit at a temperature of -20°C. Under these conditions, the reagents are stable until the expiry date indicated on the kit label. Do not use the kit and any of its components after the expiry date. Protect the kit and the reagents from direct light.

The kit can undergo 10 freeze/thaw cycles without the shelf-life and qualities of the product are altered.

## 7. TEST PRINCIPLE

BIOSYNEX AMPLIQUICK Leptospira allows the amplification of Leptospira DNA from serum, plasma, or urine samples. The test can be performed using purified DNA extract from the samples, or samples collected and treated with the BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Treatment kit (ref 3150063 and related references).

Urine samples:

Urine should be collected in a sterile, preservative-free dry collection container. Before analysis urine samples can be stored up to 8h at RT (room temperature, +21°C/+2°C) and 24h at +2-8°C. After the pre-treatment step, the pellet resuspended in resuspension buffer from the BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Treatment kit, can be stored up to 24h at RT or +2-8°C.

Serum/plasma samples:

The blood sample should be collected in an EDTA or heparinized tube.

Before analysis plasma and serum samples can be stored up to 8h at RT and 7 days at +2-8°C. After the centrifugation steps, plasma and serum pellets resuspended in the sample treatment buffer from the BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Treatment kit can be stored up to 8h at RT and 7 days at +2-8°C for plasma and 5 days at +2-8°C for serum.

Transportation of clinical specimens must comply with local regulations for the transport of infectious agents.

## 8. EXTRACTION OF NUCLEIC ACIDS

The nucleic acids extraction must be performed before the amplification protocol using a suitable extraction system for bacterial DNA. Please follow the manufacturer's instructions.

The BIOSYNEX AMPLIQUICK Leptospira kit has been validated with the following extraction kits:

- BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample treatment (Biosynex - ref. 3150063 and related references)
- QIAamp DNA Mini kit (Qiagen – Ref 51306)
- NucleoMag Dx Pathogen (Macherey Nagel – Ref 744215)
- NucleoMag Pathogen (Macherey Nagel – Ref 744210)



- Nucleic Acid Extraction Reagents (DNA/RNA) kit (Singuway Biotech – Ref MTQM036).

If another DNA extraction method or kit is used, please perform your own method validation of the BIOSYNEX AMPLIQUICK Leptospira kit using qualified respiratory samples before using the test (do not use the controls provided).

It is not necessary to extract the positive and negative controls with the Nucleic Acid Extraction Kit.

## 9. AMPLIFICATION PROTOCOL

It is recommended that Master Mix deposits and sample additions be performed on a refrigerated rack or on ice.

1. Remove the Master mix tube from the freezer and let it thaw briefly at room temperature or on ice, then vortex.
2. Centrifuge the tube for 10 seconds to collect any droplets from the sides or cap.
3. Dispense 12  $\mu$ L of Master mix per PCR well.
4. Add 8  $\mu$ L of sample or control.
5. Close the wells with appropriate caps.
6. Centrifuge for 10 seconds.
7. Place them in the thermal cycler and run the following amplification program.

PCR Program :

Step	Repetitions	Temperature	Duration	Acquisition
Taq Activation	1x	95°C	3 min	-
Denaturation	11x	95°C	15 sec	-
Hybridation / Elongation		69.5°C	1 min	-
Denaturation	45x	95°C	15 sec	-
Hybridation / Elongation		59°C	1 min	Yes

Enter **20  $\mu$ L** of reaction volume into the Thermal Cycler program.

Please refer to the operating instructions of the Thermal Cycler used for programming information.

Setting the detection channels:

Target	Fluorochrome
LipL32 gene of Leptospira	FAM
Internal control CIEZ	HEX
Procedural Control gene RNase P	Cy5

## 10. DATA ANALYSIS AND INTERPRETATION OF RESULTS

### A. Trial Validation Criteria

#### Negative control :

The fluorescence emitted must be below the threshold. This is a non-specific amplification indicator. If the fluorescence is above the threshold, check for an atypical curve. In the case of an amplification curve, a contamination or a distribution error in the microtubes is to be considered. Only the internal and procedural controls signals should be amplified.

#### Positive control:

The value of the positive control should preferably be detected before 30 cycles ( $Cq \leq 30$ ). In the absence of amplification of the positive control, the existence of an amplification or fluorescence detection problem (defective thermal cycler or instrument non-adapted to the method) should be considered.

#### Internal amplification control:

The exogenous CIEZ amplification control ensures that the enzymes in the master mix are functional and validates the amplification reaction. The RNase P procedural control validates the quality of the biological sample collection and validates the DNA extraction and purification steps.

Indeed, an amplification curve of the exogenous internal control and the procedural control must be observed in the HEX and Cy5 channels.

Nevertheless, two situations of lack of amplification of the internal control can be observed:

- If the target gene is initially present in the sample with a high number of copies, the internal controls may not be amplified. This result is consistent and does not invalidate the test. It should be interpreted as a positive result despite the lack of signal from the internal controls. This phenomenon is the result of amplification competition between the internal controls and targets present at high copy numbers.
- If the target gene in the FAM channel is not amplified, as well as the internal controls in HEX and Cy5 channels, then no result can be rendered. This situation highlights the presence of PCR inhibitors. PCR should be repeated starting from the primary sample and preferably on DNA extract

#### B. Qualitative interpretation (positive or negative)

Signals above the threshold, **and visually consistent with a classical PCR amplification curve**, are considered positive results.

Some samples may show atypical curves that are not characteristic of amplification curves. In this case, the result should not be considered as interpretable and repeat the analysis of the sample with the controls.

Detection channels			Interpretation
FAM (gene lipL32)	HEX (internal ctrl CIEZ)	Cy5 (RNase P)	
-	+	+	Negative control
+	+	+	Positive control
+	+	+	Patient with <i>Leptospira</i> specific DNA
+	+	_*	
+	-	+	
+	_*	_*	
-	+	+	Patient with no <i>Leptospira</i> specific DNA
-	+	-	Invalid result: poor sample quality, inhibition of reaction, or problems during testing. Perform a new test or re-sampling.
-	-	-	

\*In case of positive signals in the channel (FAM) for pathogen target detection, the signal from the internal controls is not required to validate the result. A high pathogen load may result in a reduced or absent signal for the internal amplification control and/or the procedural control..

## 11. PERFORMANCES

### Analytical sensitivity

The detection limit (LoD) of the BIOSYNEX AMPLIQUICK *Leptospira* kit is defined as the concentration that can be detected at 95% at least on a specific *Leptospira interrogans* DNA sample.

DNA extracts from qualified samples were obtained after purification with the QIAamp DNA Mini kit (Qiagen).

The non-extracted samples (urine, serum and plasma) were prepared with the BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Treatment kit (ref. 3150063).

The LoD<sub>95</sub> has been statistically determined, based on results obtained by performing a dilution series of a reference sample with a known number of bacteria

Sample type	LoD <sub>95</sub> ( <i>Leptospira</i> /mL)
DNA extract (all sample types)	467.4
Urine (without DNA extraction)	1077.07
Serum (without DNA extraction)	561.26
Plasma (without DNA extraction)	450.094

### Analytical specificity

#### Specificity for the lipL32 gene

The design of oligonucleotides (primers and probes) was validated *in silico* by BLAST alignment. The comparison of the sequences obtained shows a specific detection of lipL32 gene from *Leptospira*.

No primers or probes detect bacterial DNA other than that of *Leptospira* targeted.

23 DNAs from pathogenic and saprophytic *Leptospira* strains expressing lipL32 including 3 in which the sequence is poorly conserved (-), were tested with the BIOSYNEX AMPLIQUICK *Leptospira* kit.

<i>L. mayottensis</i>	+	<i>L. gomenensis</i>	+
<i>L. alexanderi</i>	+	<i>L. putramalaysiae</i>	+
<i>L. licerasiae</i>	+	<i>L. tipperaryensis</i>	+
<i>L. fainei</i>	+	<i>L. borgpetersenii</i>	+
<i>L. kirschneri</i>	+	<i>L. interrogans</i>	+
<i>L. wolffii</i>	+	<i>L. noguchii</i>	+
<i>L. kmetyi</i>	+	<i>L. santarosai</i>	+
<i>L. alstonii</i>	+	<i>L. weilii</i>	+
<i>L. adleri</i>	+	<i>L. inadai</i> (-)	-
<i>L. barantonii</i>	+	<i>L. biflexa</i> (-)	-
<i>L. ellisii</i>	+	<i>L. wolbachii</i> (-)	-
<i>L. dzianensis</i>	+		

### Cross-reactivity

A panel of 79 DNA samples and 38 RNA samples from a biobank listed in the following tables were tested with the BIOSYNEX AMPLIQUICK Leptospira kit. For all these samples, no amplification of the Leptospira target (lipL32 gene) was observed.

DNA		
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>Enterococcus faecium</i> (VanA)	<i>Mycobacterium ulcerans</i>
<i>Adenovirus</i>	<i>Epstein-Barr Virus</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>Adenovirus 41</i>	<i>Escherichia coli</i> (EAEC)	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Escherichia coli</i> (EIEC)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i> (ETEC)	<i>Neisseria meningitidis</i> Sg A
<i>Bartonella henselae</i>	<i>Escherichia coli</i> (VTEC)	<i>Neisseria meningitidis</i> Sg B
<i>Bartonella Quintana</i>	<i>Francisella tularensis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> Sg C
<i>Bk Virus</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Papillomavirus type 16</i>
<i>Bordetella holmesii</i>	<i>Giardia intestinalis</i>	<i>Papillomavirus type 18</i>
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Parvovirus B19</i> (Plasmid)
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Rickettsia conorii</i>
<i>Borrelia afzelii</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Borrelia garinii</i>	<i>Herpes simplex 1</i>	<i>Salmonella typhi</i>
<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Herpes simplex 2</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (MecA-)
<i>Brucella abortus</i>	<i>Hhv-6</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (MecA+)
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Hhv-8</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (NDM-1)	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>Candida auris</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Leishmania chagasi</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>Leishmania infantum</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>Chlamydophila psittaci</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Varicella-Zoster Virus</i>
<i>Coxiella burnetii</i>	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Mycobacterium kansasii</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Cytomegalovirus</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Enterococcus faecalis</i> (VanB)		

RNA	
<i>Coronavirus Oc43</i>	<i>Influenza A H5</i>
<i>Coronavirus</i>	<i>Influenza B</i>
<i>Coronavirus SARS (2003)</i>	<i>Measles</i>
<i>Coxsackie A6</i>	<i>MERS Coronavirus</i>
<i>Coxsackie B1</i>	<i>Mumps</i>
<i>Coxsackie B5</i>	<i>Norovirus</i>
<i>Dengue 1 Virus</i>	<i>Novel Influenza A H1n1</i>

<i>Dengue 2 Virus</i>	<i>Parainfluenza 1</i>
<i>Dengue 3 Virus</i>	<i>Parainfluenza 2</i>
<i>Dengue 4 Virus</i>	<i>Parainfluenza 3</i>
<i>Echovirus 5</i>	<i>Parainfluenza 4 A</i>
<i>Enterovirus 68</i>	<i>Respiratory Syncytial Virus (Subtype A)</i>
<i>Rhinovirus</i>	<i>Respiratory Syncytial Virus (Subtype B)</i>
<i>Rotavirus</i>	<i>West Nile Virus</i>
<i>Rubella</i>	<i>Yellow Fever Virus</i>
<i>Tick-Borne Encephalitis Virus</i>	<i>Zika Virus (Asian Lineage)</i>
<i>Human Parainfluenza 1</i>	<i>Zika Virus</i>
<i>Influenza A H1</i>	<i>Chikungunya Virus</i>
<i>Influenza A H3</i>	<i>SARS-CoV-2</i>

Various samples positive for pathogenic organisms' DNA were tested. No amplification signal was observed in the presence of the following micro-organisms:

- *Klebsiella pneumoniae*
- *Escherichia coli*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Enterococcus faecalis*
- *Proteus mirabilis*
- *Citrobacter koseri*
- *Staphylococcus aureus*
- *Klebsiella oxytoca*
- *Staphylococcus saprophyticus*
- *Enterobacter aerogenes*
- *Candida Albicans*
- *Streptococcus B*

#### Interferences

The presence of PCR inhibitors in the sample may render the test result uninterpretable. The presence of various inhibitors in plasma, serum or urine samples was tested. Among the substances tested, only blood inhibited the amplification of target sequences with the BIOSYNEX AMPLIQUICK Leptospira kit.

Sample type	Substance tested	Test condition	Observed interference
Serum, Plasma	Blood	≥ 2%	Yes
	Heparin	N/A	None
	EDTA	N/A	
Urine	Albumin	5%	
		0.1%	
	Glucose	1%	
		0,1%	
	pH	pH4	
		pH9	
	Urea	5 mmol/L	
		1.4 mmol/L	
		0.4 mmol/L	
	Blood	2%	
5%			

#### Cut-off

No cut-off needs to be applied.

#### Clinical performances

The clinical performances were determined on 193 samples from 4 internal studies that were qualified positive or negative for *Leptospira* using CE marked PCR tests referenced by the French Health Ministry or bacterial culture paired with MALDI-TOF mass spectrometry.

The clinical performances were determined on 182 samples that were qualified positive or negative using CE marked PCR tests referenced by the French Health Ministry.

	Sample type	Leptospira qualification	
		Positive	Negative
Study 1	Urine	0	90
Study 2	Serum	0	30
	Plasma	0	30
Study 3	Urine	15	2*
	Serum	12	0
	Plasma	3	0
Study 4	Urine	6	0
	Serum	3	0
	Whole blood (only tested on DNA extract)	2	0

\*Among the 32 samples qualified as positive for *Leptospira* in Study 3, two were found negative using the BIOSYNEX AMPLIQUICK *Leptospira* kit and were confirmed negative using another CE marked kit on the market. Thus, those two samples were requalified as negative.

The contingency table below shows the performance of the BIOSYNEX AMPLIQUICK *Leptospira* kit on samples after DNA extraction/purification with a commercial kit:

		Qualification	
		Positive	Negative
BIOSYNEX AMPLIQUICK <i>Leptospira</i>	Positive	40	0
	Negative	0	150

**Sensitivity : 100%**      **Specificity : 100%**  
 (95%CI: 91.19% to 100.00%)      (95%CI: 97.60% to 100.00%)

The contingency table below shows the performance of the BIOSYNEX AMPLIQUICK *Leptospira* kit on samples treated with the BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Treatment kit:

		Qualification	
		Positive	Negative
BIOSYNEX AMPLIQUICK <i>Leptospira</i>	Positive	35	0
	Negative	4*	152

**Sensitivity : 89.74%**      **Specificity : 100%**  
 (95%CI: 75.78% to 97.13%)      (95%CI: 97.60% to 100.00%)

\*Among the 21 urine samples qualified as positive for *Leptospira*, 4 were found negative with the sample preparation method without DNA extraction. These samples had high Ct values associated and therefore low bacterial loads. LoD95 is much higher with urine sample than with other sample types.

### Precision

The precision data in the context of the BIOSYNEX AMPLIQUICK *Leptospira* kit was determined based on 5 conditions:

- Intra-assay variability (within a same experiment)
- Inter-assay variability (between different experiments)
- Inter-operator variability
- Inter-lot variability
- Inter-laboratory variability

The variability data are expressed in terms of mean value, standard deviation and coefficient of variation, based on the threshold cycle of quantification (Cq) values of the *Leptospira* DNA.

**Intra-assay variability data:**

Two sample dilutions were tested for each matrix: 1 high (+++) corresponding to 200 000 copies/μL and 1 low (+) corresponding to 5 copies/μL, as well as a negative sample (-). Each sample was tested 20 times

**Extracted DNA**

GENE	Urine			Plasma			Serum		
	Average Cq value	Standard deviation	Coefficient of variation %	Average Cq value	Standard deviation	Coefficient of variation %	Average Cq value	Standard deviation	Coefficient of variation %
Sample -	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Sample +++	26,9	0,3	1,2	26,9	0,5	1,7	26,3	0,2	0,9
Sample +	28,5	1,0	3,5	28,8	1,0	3,4	27,9	0,7	2,6
Internal control CIEZ	Average Cq value	Standard deviation	Coefficient of variation %	Average Cq value	Standard deviation	Coefficient of variation %	Average Cq value	Standard deviation	Coefficient of variation %
Sample -	22,8	0,2	1,0	22,6	0,2	0,9	22,4	0,4	1,7
Sample +++	23	0,2	0,8	22,9	0,4	1,7	22,9	0,2	1,0
Sample +	21,5	0,8	3,7	21,6	0,5	2,1	21,4	0,8	3,9
Procedural control RNase P	Average Cq value	Standard deviation	Coefficient of variation %	Average Cq value	Standard deviation	Coefficient of variation %	Average Cq value	Standard deviation	Coefficient of variation %
Sample -	18,1	0,2	1,0	15,2	0,2	1,5	14,3	0,3	2,2
Sample +++	17,0	0,1	0,4	15,3	0,1	0,6	14,0	0,1	0,8
Sample +	20,8	0,1	0,6	19,1	0,1	0,6	17,6	0,1	0,6

**Samples pre-treated with the BIOSYNEX AMPLIQUICK Sample Treatment kit:**

GENE	Urine			Plasma			Serum		
	Average Cq value	Standard deviation	Coefficient of variation %	Average Cq value	Standard deviation	Coefficient of variation %	Average Cq value	Standard deviation	Coefficient of variation %
Sample -	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Sample +++	27,6	0,4	1,5	27,5	0,3	1,0	27	0,3	1,3
Sample +	29,9	1,0	3,4	29,5	0,9	3,1	28,8	0,7	2,5

Internal control CIEZ	Average Cq value	Standard deviation	Coefficient of variation %	Average Cq value	Standard deviation	Coefficient of variation %	Average Cq value	Standard deviation	Coefficient of variation %
Sample -	22,6	0,6	2,8	23,1	0,5	2,2	23,4	0,5	1,9
Sample +++	22,1	0,5	2,4	22,6	0,8	3,5	22,4	0,3	1,3
Sample +	21,6	0,5	2,4	21,8	0,1	0,6	21,6	0,2	1,0
Procedural control RNase P	Average Cq value	Standard deviation	Coefficient of variation %	Average Cq value	Standard deviation	Coefficient of variation %	Average Cq value	Standard deviation	Coefficient of variation %
Sample -	19,9	0,1	0,7	17,2	0,2	0,9	18,0	0,2	1,0
Sample +++	18,3	0,1	0,7	18,0	0,1	0,8	15,3	0,1	0,7
Sample +	22,2	0,2	1,0	21,9	0,2	0,9	19,2	0,1	0,5

**Inter-assay, operators, and lots variability:**

Two sample dilutions were tested: 1 high (+++) corresponding to 200 000 copies/μL and 1 low (+) corresponding to 5 copies/μL. Negative sample give expected results.

**Inter-days and operators variability**

Each sample is tested on the same lot in duplicate twice each day by two technicians, during 5 days.

**Inter-lots variability**

Each sample is tested in triplicate on the first lot and in duplicate on the second and third lots.

**Inter-places variability**

Each sample is tested in duplicate in the first place and in duplicate in the second place.

GENE LipL32	Average Cq CTRL+	Standard deviation	Coefficient of variation %	Average Cq value sample +++	Standard deviation	Coefficient of variation %	Average Cq value sample +	Standard deviation	Coefficient of variation %
Inter assay variability	24,3	1,0	4,3	11,4	0,2	2,1	29,5	0,7	2,4
Inter operator variability	24,3	0,0	0,0	11,2	0,2	2,1	29,2	0,5	1,7
Inter lot variability	24,2	0,7	2,9	10,9	0,5	4,4	29,5	1,0	3,3
Inter places variability	24,1	0,4	1,8	10,6	0,3	3,1	26,8	0,9	3,4
Internal control CIEZ	Average Cq CTRL+	Standard deviation	Coefficient of variation %	Average Cq value sample +++	Standard deviation	Coefficient of variation %	Average Cq value sample +	Standard deviation	Coefficient of variation %
Inter assay variability	22,5	1,1	4,9	23,3	0,4	1,9	23,3	0,1	0,5
Inter operator variability	22,8	0,4	1,6	23,1	0,3	1,5	23,1	0,3	1,5
Inter lot variability	23,6	0,2	0,9	22,7	0,8	3,7	23,5	0,3	1,3
Inter places variability	25,9	0,1	0,5	25,9	0,5	2,1	25,7	0,7	2,7



Procedural control RNase P	Average Cq CTRL+	Standard deviation	Coefficient of variation %	Average Cq value sample +++	Standard deviation	Coefficient of variation %	Average Cq value sample +	Standard deviation	Coefficient of variation %
Inter assay variability	21,4	0,6	2,9	22,2	0,3	1,5	25,0	0,3	1,2
Inter operator variability	21,8	0,4	2,0	21,9	0,5	2,2	25,0	0,1	0,2
Inter lot variability	22,7	0,2	0,9	21,8	0,3	1,4	24,0	0,4	1,9
Inter places variability	22,3	0,4	1,9	21,3	0,7	3,5	21,9	0,0	0,0

## 12. LIMITS

1. Failure to follow any instruction of the IFU may adversely affect the test performance and/or invalidate the test result.
2. As for any diagnostic test, results must be considered with other clinical information available to the physician. A negative result can never rule out the presence of *Leptospira* in the sample (e.g. genes may be present at a concentration below the minimum detection limit of the test, interference) and a positive result can never ensure the presence of *Leptospira* in the sample (e.g. contamination). A definitive diagnosis can only be made by the physician after evaluation of all clinical and laboratory data.
3. Urine sample with more than 2% blood may interfere with the test result. In case of blood in the urine sample, consider the result with caution. Serum and plasma samples should not contain blood.

## 13. BIBLIOGRAPHY

1. [www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/leptospirose](http://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/leptospirose)
2. Miotto BA, da Hora AS, Taniwaki SA, Brandão PE, Heinemann MB, Hagiwara MK. Development and validation of a modified TaqMan based real-time PCR assay targeting the lipL32 gene for detection of pathogenic *Leptospira* in canine urine samples. *Braz J Microbiol.* 49:3:584-590. July 2018.
3. Woods K, Nic-Fhogartaigh C, Arnold C, Boutthasavong L, Phuklia W et al. A comparison of two molecular methods for diagnosing leptospirosis from three different sample types in patients presenting with fever in Laos. *Clin Microbiol Infect.* 24:9:1017.1-1017-7. Sept 2018.
4. O Munch M, Chambers LC, Manhart LE, Domogala D, Lopez A, Fredricks DN, Srinivasan S. Optimizing bacterial DNA extraction in urine. *PLOS ONE.* 14:9. Sept 2019.
5. Lucchesi PMA, Arroyo GH, Etcheverria AI, Parma AE, Seijo AC. Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. *37:2:131-134.* May 2004.
6. Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 64:3:247-255. July 2009.
7. Cyrille Goarant. Leptospirosis: risk factors and management challenges in developing countries. *Res Rep Trop Med.* 2016 Sep 28;7:49-62. doi: 10.2147/RRTM.S102543. PMID: 30050339; PMCID: PMC6028063..

## 14. INTERNATIONAL SYMBOLS

	Consult instructions for use or electronic instructions for use		Contains sufficient for <n> tests		Catalog number
	In vitro diagnostic medical device		Temperature limit		Batch code
	Qualitative detection by PCR		Keep away from sunlight		Use-by date
	Negative control		Positive control		Master MIX
	Do not use if package is damaged and consult instructions for use		Manufacturer		Authorized Representative in Switzerland
	Importer				

## 15. MANUFACTURER INFORMATION



**BIO SYNEX S.A.**  
 22 boulevard Sébastien Brant  
 67400 ILLKIRCH-  
 GRAFFENSTADEN – France  
 Standard:  
 Tel: +33 3 88 78 78 87  
[www.biosynex.com](http://www.biosynex.com)  
 Contacts France:  
 Phone : +33 3 88 77 57 00  
[service.clients@biosynex.com](mailto:service.clients@biosynex.com)  
 Contacts other countries:  
 Phone: +33 3 88 77 57 52  
[sales@biosynex.com](mailto:sales@biosynex.com)  
 Customer service  
 Tel. : +33 3 88 77 57 25  
[tech.support@biosynex.com](mailto:tech.support@biosynex.com)



**BIO SYNEX SWISS S.A.**  
 Route de Rossemaison 100  
 2800 DELEMONT - Switzerland

**Latest changes:** IVDR (EU) 2017/746 compliance