



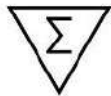
EurobioPlex

*Bartonella spp/Bartonella henselae/Bartonella
quintana*

PCR EN TEMPS REEL

Pour la PCR **qualitative** en temps réel

REF EBX-013-24
EBX-013-48
EBX-013



24/48/96 réactions



Version 5.01 du 06/08/2024

Validé sur :

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Biorad) avec analyse sur CFX Manager version 3.1 (Biorad)
- LightCycler®480 Instrument II (Roche) avec analyse sur LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) avec analyse sur 7500 Software v2
- T-COR 8®-IVD (Tetracore Inc.) avec T-COR 8 SmartCT™ (auto v1) software

Conditions de stockage:

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



Mode d'emploi

SOMMAIRE

Utilisation	2
Introduction	2
Principe de la détection	4
Description et contenu du kit	4
Conservation	5
Précautions et notes	6
Collecte des échantillons, transport et conservation	6
Procédure	7
I-Extraction d'ADN	7
II-Réalisation de la PCR en temps réel.....	7
II-1/ Schéma de la procédure.....	8
II-2/ Procédure détaillée	9
Validation de l'expérimentation	10
Analyse des données et interprétation	12
Analyse des performances	13
Particularités liées à l'instrument de PCR en temps réel T-COR 8®-IVD	16
Codes-Barres pour EBX-013 sur T-COR 8®-IVD	20
Bibliographie	23
Elimination des déchets	23
Symboles	24

UTILISATION

L'Eurobioplex EBX-013 est un test d'amplification par réaction en chaîne de la polymérase (PCR) en temps réel, conçu pour la détection qualitative de la présence ou l'absence de *Bartonella spp.* (toutes *Bartonella*), *Bartonella henselae* et *Bartonella quintana* dans un extrait d'acides nucléiques ADN. Le test est indiqué pour poser un diagnostic de présomption d'infection chez l'homme, ou compléter un diagnostic sérologique avéré ou indéterminé par les techniques usuelles (sérologie, histologie, culture).

L'extrait d'ADN est le matériel de départ pour le kit Eurobioplex *Bartonella spp/ B. henselae/ B. quintana*.

L'Eurobioplex EBX-013 a été validé sur les types de prélèvements suivants :

- Sérum
- Sang
- Biopsie ganglionnaire
- Biopsie splénique
- Biopsie cardiaque
- Extrait de moelle osseuse

INTRODUCTION

Les *Bartonella* sont des bactéries qui infectent de nombreuses espèces de mammifères, dont l'Homme. L'infection chronique des érythrocytes est une adaptation spécifique des *Bartonella* aux mammifères. Elles peuvent être également retrouvées dans la peau, le tissu osseux et les cellules endothéliales. Les principales espèces de *Bartonella* décrites dans la littérature ont été isolées dans les années 90. Environ la moitié d'entre elles sont incriminées comme agents de zoonoses. Le réservoir majeur est alors les animaux vivants à proximité de celui-ci, domestiques et sauvages. En France, par exemple, il s'agit principalement des chats. Les maladies humaines causées par *Bartonella spp* s'appellent les Bartonelloses. Il s'agit notamment de : la maladie des griffes du chat causée par *Bartonella henselae*, et la fièvre des tranchées dont l'agent responsable est *Bartonella quintana*. D'autres espèces de *Bartonella*, moins fréquentes, sont susceptibles de causer d'autres pathologies humaines: *Bartonella bacilliformis*, *B vinsonii berkhoffi*, *B clarridgeiae*, *B tamiae*, *B rochalimae*, *B elizabethae*, *B koehlerae*, *B grahami* et *B alsatica*. Les endocardites constituent les atteintes les plus graves.

Selon les espèces, les *Bartonella* possèdent différents modes de transmission. L'Homme peut être infecté par l'animal directement par griffure, morsure, simple léchage ou par de simples caresses, si la peau des mains est lésée. L'infection peut aussi être transmise indirectement par le biais d'un arthropode hématophage vecteur. Une espèce donnée de *Bartonella* possède généralement un seul hôte réservoir naturel. Les hôtes réservoirs sont des mammifères généralement asymptomatiques du fait d'une bactériémie au long cours qui les caractérise. Les hôtes accidentels développent par contre une symptomatologie plus ou moins marquée.

Il est difficile de proposer un traitement pour des bactéries occasionnant des manifestations cliniques aussi variées. De plus, l'évolution de la maladie varie en fonction de la bactérie et du terrain immunitaire de l'hôte. Elle peut être aiguë, récurrente ou même chronique. Le traitement est à adapter à chaque situation clinique. Il n'existe à ce jour aucune prophylaxie vaccinale.

La maladie des griffes du chat (MGC)

L'agent pathogène est *Bartonella henselae*. La MGC se caractérise par une conjonctivite infectieuse s'accompagnant d'une forte réaction ganglionnaire. Elle a été décrite en 1950 par R. Debré. La prévalence de la MGC est de 6,6 cas pour 100 000 habitants. Le pic d'incidence est rapporté pendant la période froide de l'année, entre septembre et avril, lorsque les animaux domestiques vivent d'avantage au contact de leurs maîtres au sein du foyer.

Le tableau clinique classique inclut l'adénopathie, la fièvre (38-41°C), la fatigue, les céphalées, la splénomégalie et les manifestations cutanées à type de rash maculo-papuleux transitoire. Les vecteurs responsables de la transmission de la maladie sont les puces, la contamination se faisant par une griffure ou une morsure d'un chat infecté ou par la piqûre d'une puce infectée. Il est nécessaire d'adopter un certain nombre de mesures de prévention concernant l'exposition aux animaux, notamment ceux de compagnie. Le pronostic est bon chez les patients immunocompétents, avec une résolution spontanée dans 90% des cas. Par contre, une antibiothérapie est très souvent nécessaire pour les enfants et les personnes immunodéprimées, ainsi que dans les formes neurologiques et cardiaques.

La fièvre des tranchées

L'agent pathogène est *Bartonella quintana*, germe ubiquitaire intracellulaire transmis par les poux de corps, entraînant une fièvre périodique avec des céphalées et des douleurs sévères des membres inférieurs. La fièvre des tranchées est la forme clinique principale de cette infection qui a été essentiellement décrite durant la première guerre mondiale, provoquant alors de grandes épidémies avec plus d'un million de cas estimés en Europe. Elle réapparut durant la seconde guerre mondiale, puis s'éteignit. Actuellement, c'est une pathologie ré-émergente, concernant essentiellement les populations exposées à une hygiène précaire et à la présence de poux de corps, notamment chez les SDF qui présentent une forte prévalence (16 à 30%) dans les pays industrialisés.

Diagnostic

Le diagnostic de ces infections recourt à la sérologie, l'histologie, l'hémoculture et la recherche de l'ADN bactérien à partir de différents prélèvements. Les *Bartonella* sont de petits bacilles Gram négatif, aérobies, polymorphes, non acido-alcool-résistants, le plus souvent immobiles, de 1 à 1,2µm de longueur sur 0,5µm de diamètre. Elles sont de croissance lente, aussi difficiles à cultiver qu'à isoler. Ces bactéries peuvent cependant être cultivées sur des milieux additionnés de sang frais, en atmosphère humide enrichie en CO₂, incubés à 35°C, mais la croissance des bactéries sur ces milieux reste particulièrement fastidieuse et coûteuse. En dehors du tableau clinique, le diagnostic repose sur la sérologie (immunofluorescence indirecte ou immuno-assay enzymatique avec titrage des anticorps IgG ou IgM). L'utilisation des techniques de biologie moléculaire (PCR puis séquençage) permettent de faire le diagnostic rapidement à partir de tissus (ganglion, peau, valve cardiaque,...). Elles permettent également de faire le diagnostic d'espèce. Le diagnostic par PCR en temps réel apporte une sensibilité et reproductibilité et une détection précoce de la présence des bactéries.

PRINCIPE DE LA DETECTION

L'Eurobioplex EBX-013 est un test d'amplification des acides nucléiques ADN bactériens de *Bartonella spp.*, *Bartonella henselae* et *Bartonella quintana*, 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, et/ou à la présence d'inhibiteurs de PCR en trop grande quantité.

Ce kit est un quadriplex : *Bartonella spp* (Bsp.), *Bartonella henselae* (Bh), *Bartonella quintana* (Bq) + contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (CI-PCR).

L'ADN de Bsp., Bh, et Bq est respectivement détecté à l'aide d'une sonde marquée FAM, HEX et TEXAS RED. 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 EBX-013 est prêt à l'emploi pour la détection spécifique de *Bartonella spp* / *henselae* / *quintana*.

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

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

Tableau 1 :

Cible	Fluorophore	Excitation	Emission
<i>Bartonella spp</i>	FAM	495 nm	515 nm
<i>Bartonella henselae</i>	HEX	535 nm	555 nm
<i>Bartonella quintana</i>	Texas Red	585 nm	605 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, T-COR 8®-IVD), Canal 510 (LC 480), Canal Green (RotorGene)

- Canal **HEX** (Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx, T-COR 8®-IVD), Canal VIC (Systèmes ABI), Canal Alexa532 (SmartCycler II), Canal 580 (LC 480), Canal Yellow (RotorGene),

- Canal **Texas Red**: (Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx, T-COR 8®-IVD), LC Red 610 (LC480), Canal Orange (RotorGene)

- Canal **Cy5** (Systèmes ABI, Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx, T-COR 8®-IVD), Canal Alexa647 (SmartCycler II), Canal 660 (LC 480), Canal Red (RotorGene)

Note : Sur LC480 instrument II : Appliquer une compensation de couleur pour les longueurs d'ondes FAM-HEX/VIC-Texas Red-Cy5 (465-510,533-580, 533-610,618-660).

Tableau 2 :

Couleur de Bouchon	Contenu du kit	24 réactions	48 réactions	96 réactions	Reconstitution
Rouge	ENZYME	4 x 100 µl	2 x 350 µl	4 x 350 µl	Prêt à l'emploi
Transparent	OLIGOMIX	4 x 60 µl	2 x 210 µl	4 x 210 µl	Prêt à l'emploi
Jaune	Contrôle Positif CP-Barto	4 x 50 µl	2 x 50 µl	4 x 50 µl	Prêt à l'emploi
Blanc	Contrôle d'inhibition de PCR (CI-PCR)	4 x 280 µl	2 x 280 µl	4 x 280 µl	Prêt à l'emploi
Bleu	Eau = contrôle négatif (CN-H ₂ O)	1 ml	1 ml	1 ml	Prêt à l'emploi

Oligomix : contient les amorces et sondes du quadriplex (Bspp, Bh, Bq, et 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 de bactéries adaptées à la nature du prélèvement testé (exemple : sérum, sang, biopsie ou extrait de moelle osseuse), et de se référer aux instructions du fournisseur du kit d'extraction utilisé.

Dans le kit EBX-013, 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:

Le contrôle positif 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 le contrôle positif CP-Barto ainsi que le contrôle négatif (eau PCR fournie = CN-H₂O + CIPCR) (voir II-2/ 6) du protocole de PCR en temps réel).

Sur T-COR 8®-IVD, nous recommandons que ces contrôles soient réalisés lors de la première utilisation d'un nouveau kit.

II-1/ Schéma de la procédure

1 - PREPARATION MELANGE REACTIONNEL / MASTERMIX

(a) Pour un échantillon ADN extrait
sans CI-PCR

Nombre de réaction(s)	N+3*
Enzyme	(N+3) x 12.5 µl
Oligomix	(N+3) x 7.5 µl
CI-PCR	(N+3) x 1 µl
Volume total Mastermix	(N+3) x 21 µl

* N+1 sur T-COR 8®-IVD

(b) Pour un échantillon ADN extrait
avec CI-PCR

Nombre de réaction(s)	N+3*
Enzyme	(N+3) x 12.5 µl
Oligomix	(N+3) x 7.5 µl
Volume total Mastermix	(N+3) x 20 µl

* N+1 sur T-COR 8®-IVD

2 - PREPARATION DES REACTIONS

Echantillon

20 µl de Mastermix
+
5µl échantillon ADN

Contrôle positif

20 µl de Mastermix
+
5µl CP-Barto

Contrôle Négatif

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

Echantillon

20 µl de Mastermix
+
5µl échantillon ADN

Contrôle positif

20 µl de Mastermix
+
5µl CP-Barto

Contrôle Négatif

20 µl de Mastermix
+
4µl Eau biologie moléculaire (CN-H2O)
+
1 µl CI-PCR

3 – INSTRUMENT PCR EN TEMPS REEL (sauf T-COR 8®-IVD- programmation automatique avec Codes-Barres- voir p.16 à 22)

Programme	Température	Durée	Cycle(s)	
Activation de la Taq polymerase	95°C	3 min	1	-
Amplification	95°C	10 sec	45	-
	60°C	30 sec		Acquisition de fluorescence

II-2/ Procédure détaillée :

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

Cas (a) : Pour un échantillon ADN extrait SANS CI-PCR

Nombre de réaction(s)	1	N+3 ^α
Enzyme	12.5 µl	(N+3) x 12.5 µl
Oligomix	7.5 µl	(N+3) x 7.5 µl
CI-PCR	1 µl	(N+3) x 1 µl
Volume total Mastermix	21 µl*	(N+3) x 21 µl

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

^α N+1 sur T-COR 8[®]-IVD

Cas (b) : Pour un échantillon ADN extrait AVEC CI-PCR

Nombre de réaction(s)	1	N+3 ^α
Enzyme	12.5 µl	(N+3) x 12.5 µl
Oligomix	7.5 µl	(N+3) x 7.5 µl
Volume total Mastermix	20 µl*	(N+3) x 20 µl

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

^α N+1 sur T-COR 8[®]-IVD

- 3) Homogénéiser le Mastermix préparé en 2) et centrifuger brièvement.
- 4) Distribuer 20 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 5 µL d'échantillon d'ADN extrait.
- 6) En parallèle réaliser les contrôles suivants (voir ce point spécifique pour T-COR 8[®]-IVD pages 16 à 22) :

- Contrôle positif :
20 µl de Mastermix + 5 µl de contrôle positif CP-Barto
- Contrôle négatif :

Cas (a) : Pour un échantillon ADN extrait SANS CI-PCR :

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

Cas (b) : Pour un échantillon ADN extrait AVEC CI-PCR

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

- 7) Fermer immédiatement avec un film adhésif ou bouchons transparents pour éviter toute contamination.
- 8) Centrifuger brièvement pour collecter le mélange réactionnel au fond des tubes ou des puits de microplaque.

- 9) Réaliser le programme suivant sur l'instrument de PCR en temps réel (sur T-COR 8®-IVD aucune programmation manuelle n'est nécessaire grâce aux Codes-Barres- voir pages 16 à 22).

Programme	Température	Durée	Cycle(s)	
Activation de la Taq polymérase	95°C	3 min	1	-
Amplification	95°C	10 sec	45	-
	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-Texas Red-Cy5 (465-510,533-580,533-610,618-660).

Note 2 : Pour les appareils de la gamme Applied Biosystems, sélectionner « NONE » dans « PASSIVE REFERENCE ».

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

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

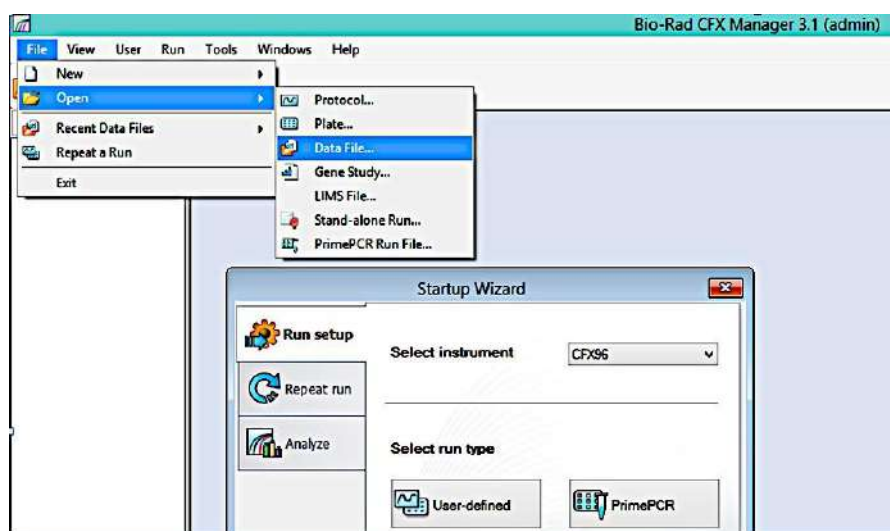
VALIDATION DE L'EXPERIMENTATION

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

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



- Cliquer sur File et sélectionner Open puis Data File.



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

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



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

Pour que le dosage soit valide, les résultats pour les contrôles doivent être les suivants (Tableau 4) ; autrement l'expérimentation ne peut être validée. Sur T-COR 8®-IVD, nous recommandons que ces contrôles soient réalisés lors de la première utilisation d'un nouveau kit.

Tableau 4 :

Contrôle Positif	
FAM	Ct ≤ 32
HEX	Ct ≤ 32
Texas Red	Ct ≤ 32
Contrôle négatif	
FAM	Ct non déterminé
HEX	Ct non déterminé
Texas Red	Ct non déterminé
CY5	Ct ≤ 35

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, Texas Red).

Pour les échantillons cliniques, les résultats suivants sont possibles :

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

Canal FAM *B. spp.*: + Positif => Ct positif (≤ 45)

Canal HEX *B. henselae*: + Positif => Ct positif (≤ 45)

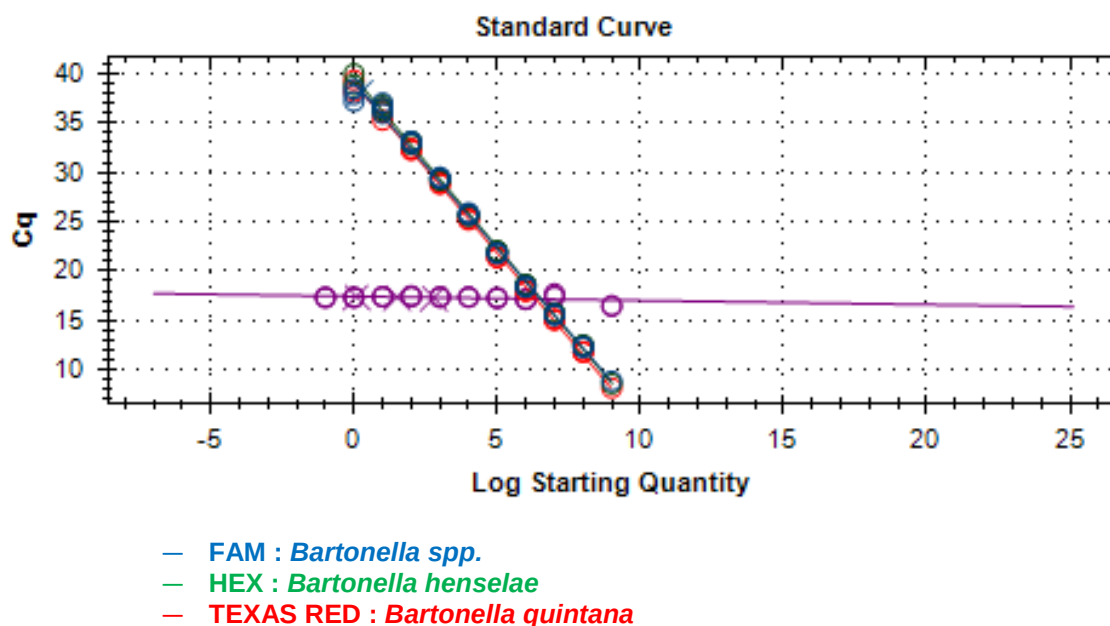
Canal TEXAS RED *B. quintana*: + Positif => Ct positif (≤ 45)

(le seuil de Ct pour positivité des échantillons pour T-COR 8®-IVD est : + Positif => Ct positif soit Ct ≤ 40 dans les trois canaux)

Signal PCR		Présence de bactéries	Validité du test/commentaire
FAM ou HEX ou Texas Red	CY5	<i>Bartonella spp</i> <i>Bartonella henselae</i> <i>Bartonella quintana</i>	
+	+	Oui	VALIDE
-	+	Non	VALIDE
+	-	Oui	VALIDE Possible inhibition de PCR ou problème d'extraction qui n'empêche pas la détection des bactéries.
-	-	Non interprétable	Inhibition de PCR ou problème d'extraction → diluer 5 x l'échantillon ; si même résultat ré-extraire l'échantillon

ANALYSE DES PERFORMANCES

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



Sensibilité analytique: CP-Barto:

12,5 copies/microl pour *B.spp*,

5 copies/microl pour *B.henselae*

5 copies/microl pour *B.quintana*.

Linéarité de quantification : CP-Barto: seuil de détection à 10^9 copies/microl

Coefficient de corrélation et efficacité

	CANAL	Efficacité	Coefficient de corrélation R 2	Pente
Barto spp	FAM	95.5 %	0.999	-3.436
Barto henselae	HEX	98.5 %	0.995	-3.358
Barto quintana	TEXAS RED	95.3 %	0.998	-3.440

Variabilité du signal

Les études de reproductibilité du kit EurobioPlex Bartonella EBX-013 ont été réalisées sur le plasmide BspPHQ (contrôle positif de *Bartonella spp*, *Bartonella henselae* et *Bartonella quintana*) sur CFX96 (Biorad). Les tableaux ci-dessous indiquent le coefficient de variation (CV) moyenné, en fonction de la concentration du plasmide.

Reproductibilité au sein d'une expérience (intra-expérience) :

copies/ μ l	CV % CANAL FAM Bartonella spp	CV % CANAL HEX Bartonella henselae	CV % CANAL TEXAS RED Bartonella quintana
10 8	0.50	0,05	0,35
10 7	0.35	0,48	0,44
10 6	0.48	0,22	0,19
10 5	0.30	0,09	0,12
10 4	0.50	0,29	0,30
10 3	0.27	0,28	0,28
100	0.35	0,50	0,33
50	1.56	2,10	1,63
25	2.00	2,16	2,32
12.5	2.80	2,88	2,52
10	/	/	1,60
5	/	/	2,91
MOYENNE CV	0,91	0,91	1,08

Reproductibilité entre expériences (inter-expériences) :

copies/ μ l	CV % CANAL FAM Bartonella spp	CV % CANAL HEX Bartonella henselae	CV % CANAL TEXAS RED Bartonella quintana
10 8	8,91	3,96	2,80
10 7	6,36	1,99	4,04
10 6	3,77	1,32	4,62
10 5	3,11	1,30	3,49
10 4	2,58	1,09	3,27
10 3	0,19	0,48	4,86
10 2	1,38	2,08	3,89
10	1,24	2,40	4,00
5	/	/	4,26
MOYENNE CV %	3,44	1,83	3,91

Validation sur les échantillons cliniques

Les tests ont été réalisés à partir de 109 échantillons d'ADN extrait: 3 sérums, 6 échantillons sanguins, 90 biopsies ganglionnaires, 1 biopsie de rate, 1 extrait de moelle osseuse, 7 biopsies cardiaques, 1 échantillon d'origine inconnue. Ces échantillons ont été préalablement testés par la technique de routine d'un laboratoire de référence, puis comparés avec le kit EurobioPlex *Bartonella* EBX-013 sur CFX96 (Biorad).

La spécificité et la sensibilité du kit EBX-013 ont été évaluées par l'analyse de :

- 60 *Bartonella spp* POSITIVES
- 49 *Bartonella spp* NEGATIVES
- 45 *Bartonella henselae* POSITIVES/*quintana* NEGATIVES
- 64 *Bartonella henselae* NEGATIVES dont les 15 *quintana* positives ; pas de cross réactivité entre les 2
- 15 *Bartonella quintana* POSITIVES/*henselae* NEGATIVES
- 94 *Bartonella quintana* NEGATIVES dont les 45 *henselae* positives

		EBX-013 Quadriplex Bartonella								
		B spp			B henselae			B quintana		
		POS	NEG	TOTAL	POS	NEG	TOTAL	POS	NEG	TOTAL
Pretest	POS	60	0	60	41	4	45	15	0	15
	NEG	2	47	49	0	64	64	0	94	94
	TOTAL	62	47	109	41	68	109	15	94	109

Sensibilité Spp : > 99 % (n=60) Henselae : 41/45= 91,1 % Quintana : > 99 % (n=15)	Spécificité Spp : 47/49= 95,9% Henselae : > 99 % (n=64) Quintana : > 99 % (n=94)
---	--

Les tests ont été réalisés sur CFX96.

L'extraction de l'ADN bactérien a été réalisée à l'aide des kits d'extraction suivants et selon les instructions du fournisseur :

- EZ1 Blood DNA kit (Qiagen) pour les prélèvements de sang et sérum,
- EZ1 Tissue DNA kit (Qiagen) pour les prélèvements tissulaires (détaillés ci-dessus).

PARTICULARITES LIEES A L'INSTRUMENT DE PCR EN TEMPS REEL T-COR 8®-IVD

T-COR 8®-IVD est un instrument de PCR en temps réel avec 8 puits programmables de façon indépendante qui peuvent être utilisés, patient par patient, indépendamment les uns des autres, du point de vue des tests / « Dosage/assay » réalisés, des programmes thermiques, et du moment du lancement de la PCR.

Les 8 puits peuvent également être utilisés simultanément avec le même « Dosage/Assay ».

Note : Vortexer les tubes avant de les mettre dans la machine et toujours vérifier qu'il n'y a pas de bulles et que le volume de liquide est bien situé au fond du tube.

Contrôles

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

Par la suite, le contrôle interne permet de s'assurer qu'au sein de l'échantillon testé, il n'y a pas d'inhibition de la PCR, et que celle-ci fonctionne correctement.

Fluorophores

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

Pour tous les EBX, dont EBX-013, la combinaison FAM/HEX/Texas Red/Cy5 est celle choisie. Si certains canaux ne sont pas utilisés dans certains kits, ne pas en tenir compte lors de l'analyse des résultats.

Utilisation des Codes-Barres (disponibles en page 20-22)

- 1- Sélectionner Menu > Nouvelle analyse/New Run
- 2- Sélectionner Code-barres/Barcode,
- 3- Scanner sur la droite de l'appareil le Code-Barre désiré :
 - soit pour le contrôle positif (Code-barre EBX-013 Pos Ctrl),
 - soit pour le contrôle négatif (Code-barre EBX-013 Neg Ctrl),
 - soit pour un échantillon (Code-Barre EBX-013)

L'instrument sélectionne automatiquement un des 8 puits disponibles. Suivre les instructions données par l'instrument.

4- Soulever le clapet du puits x sélectionné par l'appareil, et vérifier que la lumière LED bleue est allumée, puis sélectionner « Oui / Yes ».

5- Positionner le tube dans le puits correspondant et rabattre le clapet puis sélectionner « Suivant / Next ».

6- Si vous souhaitez le nommer (optionnel), sélectionner « Echantillon x / Sample x », et le nommer. Sélectionner « Accept ».

7- Sélectionner « Suivant / Next »

8- Pour ajouter/tester un autre contrôle ou échantillon, sélectionner « Ajouter un puits / Add well » et recommencer au point 3-

9- Sélectionner « Démarrer l'analyse / Start Run »

***Note :** la nomination d'un échantillon ou du run ne peut être modifiée ou ajoutée après la fin du run. Elle doit être réalisée avant ou pendant que le run se déroule.*

Présentation et Interprétation des résultats

Les résultats de Ct et les courbes d'amplification sont disponibles à partir du tableau Valeurs SmartCT™ / SmartCT™ Table (valeurs de Ct attribuées sur chaque canal), et des graphes de Ct en fonction des cycles sur chaque canal, les deux étant visualisables en temps réel sur la machine.

Une analyse pour les contrôles négatif et positif, ainsi que pour les échantillons est générée de façon automatique. Celle-ci est disponible dans « Interprétations / Interpretations », à la fin du run, dans la fenêtre « Vue / View ».

Pour le contrôle positif et le contrôle négatif, les résultats suivants sont possibles:

« Neg Ctrl Fail » : Non valide
« Neg Ctrl Valid » : Valide
« Pos Ctrl Fail » : Non valide
« Pos Ctrl Valid » : Valide

Détermination du statut pour les échantillons :

« Détecté(e-s) / Detected » : Positif pour au moins une cible * → encadré vert
« Non détecté / Not detected » : Négatif → encadré rouge
* Les espèces détectées ou non détectées sont spécifiées.

ATTENTION !

Lorsque l'encadré est vert, il est important de lire le statut pour chaque cible dans la mesure où certaines cibles peuvent être négatives.

« Non Valide / Invalid » : Résultat non valide -> retester

Exemple de présentation d'interprétation automatique des résultats sur l'instrument et dans le rapport:

- Pour les contrôles négatif et positif valides, pour la limite de détection (LOD) et pour deux échantillons positifs (Echantillon 3 / Sample 3 et Echantillon 4 / Sample 4) indiqués « Détecté(e-s) / Detected » avec les cibles correspondantes, et pour deux échantillons négatifs indiqués

« Non détecté / Not detected » (Echantillon 1 / Sample 1 et Echantillon 2 / Sample 2):

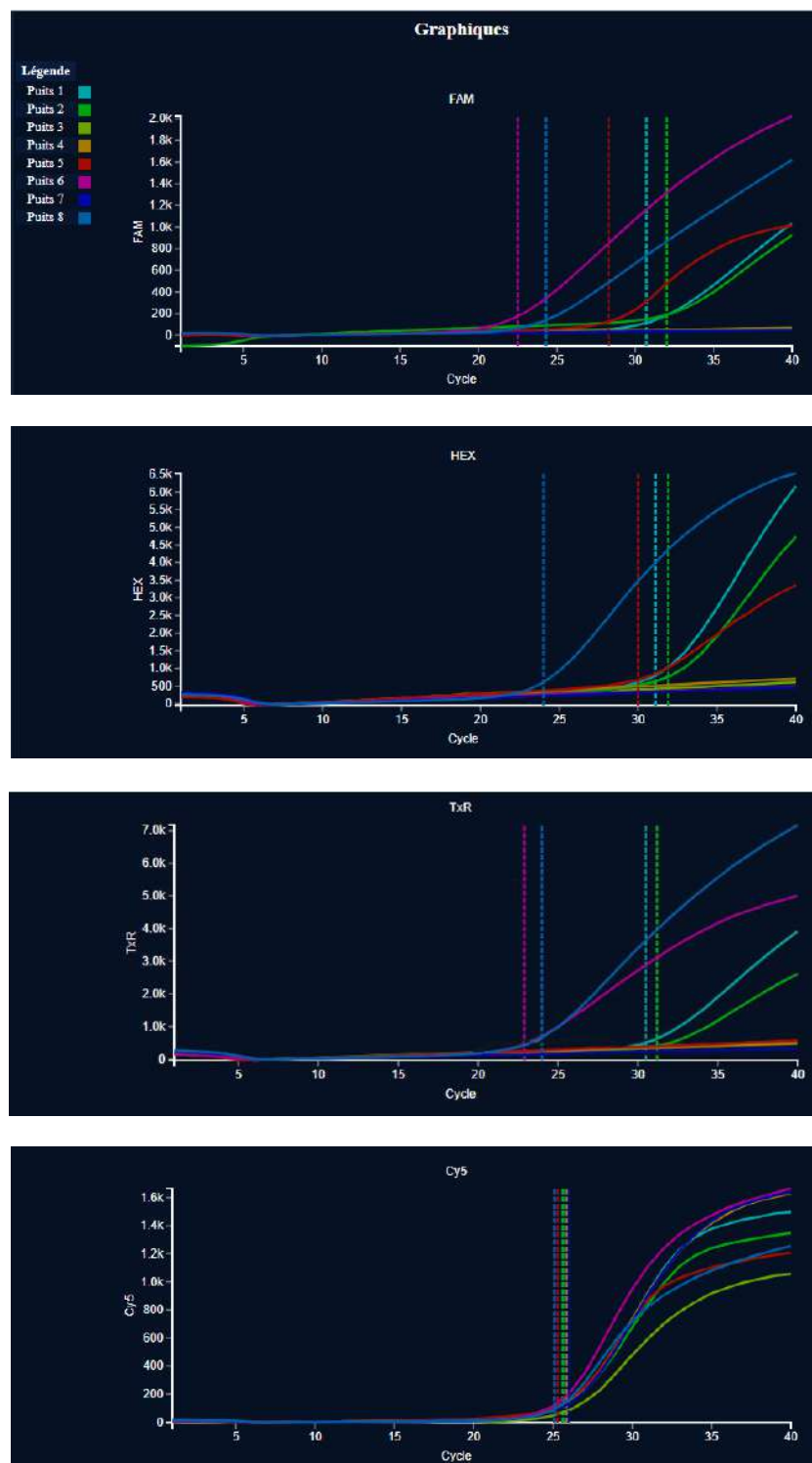
❖ Sur l'écran de l'instrument :

Interprétations		
1	LOD Rep1	EBX-013
	Détecté(e-s): B. quint, B. hens, B. spp	
2	LOD Rep2	EBX-013
	Détecté(e-s): B. quint, B. hens, B. spp	
3	ech1	EBX-013
	Non détecté - B. quint, B. hens, B. spp	
4	ech2	EBX-013
	Non détecté - B. quint, B. hens, B. spp	
5	ech3	EBX-013
	Détecté(e-s): B. hens, B. spp - B. quint not detected	
6	ech4	EBX-013
	Détecté(e-s): B. quint, B. spp - B. hens not detected	
7	CN	EBX-013 Neg Ctrl
	Detected: Neg Ctrl Valid	
8	CP	EBX-013 Pos Ctrl
	Detected: Pos Ctrl Valid	

❖ Dans le rapport :

Résumé								
Puits	Échantillon	Dosage	FAM	HEX	TxR	Cy5	Appeler	Remarque
1	LOD Rep1	EBX-013	30.7	31.1	30.5	25.7	Detected • B. quint • B. hens • B. spp	
2	LOD Rep2	EBX-013	32.0	31.9	31.2	25.6	Detected • B. quint • B. hens • B. spp	
3	ech1	EBX-013				25.9	Not Detected	B. quint, B. hens, B. spp
4	ech2	EBX-013				25.9	Not Detected	B. quint, B. hens, B. spp
5	ech3	EBX-013	28.3	30.0		25.3	Detected • B. hens • B. spp	B. quint not detected
6	ech4	EBX-013	22.5		22.9	25.1	Detected • B. quint • B. spp	B. hens not detected
7	CN	EBX-013 Neg Ctrl				26.0	Detected • Neg Ctrl Valid	
8	CP	EBX-013 Pos Ctrl	24.3	24.0	24.0	25.1	Detected • Pos Ctrl Valid	

Exemple de courbes d'amplification



Codes-Barres sur T-COR8®-IVD pour EBX-013

EBX-013 Pos Ctrl
Contrôle Positif CP-Barto



EBX-013 Neg Ctrl
Eau = contrôle négatif (CN-H2O)



EBX-013



BIBLIOGRAPHIE

Angelakis E, Raoult D. Pathogenicity and treatment of Bartonella infections. Int J Antimicrob Agents. 2014 Jul;44(1):16-25.

Noémie Boillat, Gilbert Greub. Maladie des griffes du chat et autres bartonelloses. Rev Med Suisse 2008;901-907.

Boulouis et al. Les infections à Bartonella chez l'homme et l'animal: aspects diagnostiques et therap. Elsevier. 2007.

Bartonelloses. Précis de biopathologie analyses médicales spécialisées. Biomnis. 2012.

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

ELIMINATION DES DECHETS

Eliminer 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



In vitro diagnostic



Produit marqué CE



Mode d'emploi



eurobio
SCIENTIFIC

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



EurobioPlex

*Bartonella spp/Bartonella henselae/Bartonella
quintana*

REAL-TIME PCR

For **qualitative** real-time PCR

REF EBX-013-24
EBX-013-48
EBX-013



24/48/96 reactions



Version 5.01 2024/08/06

Validated on:

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

Storage conditions:

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



Instructions for use

TABLE OF CONTENTS

Intended use	27
Introduction	27
Principle of detection	29
Description and content of the kit	29
Storage	30
Cautions and notes	31
Samples collection, transport and storage	31
Procedure	32
I- DNA extraction	32
II- Real-time PCR procedure	32
II-1/ Diagram of the procedure	33
II-2/ Detailed procedure	34
Validation of the experiment	35
Data analysis and Interpretation	37
Performance analysis.....	38
Specificities of the Real-Time PCR T-COR 8®-IVD instrument	41
Barcodes for EBX-013 for use on T-COR8®-IVD.....	45
Bibliography	48
Waste disposal	48
Symbols	49

INTENDED USE

The EBX-013 test uses real-time polymerase chain reaction (PCR) amplification and is designed for the qualitative detection of *Bartonella* spp. (all *Bartonella*), *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* from a DNA nucleic acids extract. This test is indicated to confirm a diagnosis of presumption of infection in patients or complete a proven or indeterminate diagnosis by standard techniques (serology, histology and culture). Extracted DNA is the starting material for the Eurobioplex *Bartonella* spp./ *B. henselae*/ *B. quintana* kit.

The Eurobioplex EBX-013 has been validated on the following specimen:

- Serum
- Blood
- Lymph node biopsy
- Spleen biopsy
- Cardiac biopsy
- Bone marrow extract

INTRODUCTION

Bartonella are bacteria that infect many species of mammals, including humans. Chronic infection of erythrocytes is a specific adaptation of *Bartonella* to mammals. They can be also found in the skin, the bone tissue and endothelial cells. The main species of *Bartonella* described in the literature have been isolated in the 1990s. About half of them are implicated as agents of zoonoses. The major reservoir is then domestic and wild animals living close to humans. For example in France, it is mainly cats. Human diseases caused by *Bartonella* spp. are called the Bartonellosis. The two main *Bartonella* species are *Bartonella henselae* responsible for “cat scratch disease”, and *B. Quintana* responsible for “trench fever” and endocarditis. Other less common species of *Bartonella* are likely to cause other human pathologies: *Bartonella bacilliformis*, *B. vinsonii berkhoffi*, *B. clarridgeiae*, *B. tamiae*, *B. rochalimae*, *B. elizabethae*, *B. koehlerae*, *B. graham* and *B. alsatica*. Endocarditis are the most serious complication.

Depending on the species *Bartonella* have various modes of transmission. Humans can be infected with the animal directly by scratch, bite, or simple caresses if the skin of the hands is scratched. The infection can also be transmitted indirectly through a blood-sucking arthropod vector. Each species of *Bartonella* usually has a single natural reservoir host which is generally asymptomatic due to a long-term bacteremia. The accidental hosts however develop symptoms generally more severe.

It is difficult to propose a treatment for bacteria causing so many variable clinical manifestations. Moreover, the evolution of the disease varies according to the bacteria and immune system of the host. It can be acute, recurrent or even chronic. The treatment has to be adapted to each clinical situation. There is so far no vaccine prophylaxis.

Cat scratch disease (CSD)

The pathogen agent is *Bartonella henselae*. The CSD is characterized by infectious conjunctivitis accompanied by a strong lymph node reaction. It was described in 1950 by R. Debré. The prevalence of the CSD is 6.6 cases per 100,000 population. The peak of incidence is reported during the cold period of the year, between September and April when pets live more in contact with their master at home.

The typical symptoms are lymphadenopathy, fever (38-41°C), fatigue, headaches, splenomegaly and cutaneous manifestations such as transitional maculo-papular rash. The disease vectors are fleas with a contamination by the way of a scratch or a bite of an infected cat or through the bite of an infected flea. It is necessary to adopt a number of preventive measures for exposure to animals, especially domestic pets. The prognosis is good in immunocompetent patients, with spontaneous resolution in 90% of cases. On the other hand, antibiotic therapy is often necessary for children and immunocompromised people, as well as in cases of neurological and cardiac forms.

Trench fever

The pathogen agent is *Bartonella Quintana*. It is an intracellular and ubiquitous germ transmitted by body lice causing periodic fever with headaches and severe pain of the lower limbs. Fever trenches is the clinical principal form of this infection that has been essentially described during the First World War causing then epidemics with more than a million cases estimated in Europe. It reappeared during the Second World War and finally disappeared. Currently it is a re-emerging disease which primarily concerns populations exposed to precarious hygiene and the presence of body lice. It notably affects homeless persons in the industrialized countries with a high prevalence (16 to 30%).

Diagnosis

Diagnosis of these infections relies on serology, histology, blood culture and the research of bacterial DNA from different samples. *Bartonella* are small gram-negative bacilli, aerobic, polymorphic, non-acido-alcohol-resistant, often immobile, from 1 to 1,2µm long and 0,5µm in diameter. They are slow-growing, as difficult to cultivate to isolate. However, these bacteria can be grown on media with fresh blood, humid atmosphere enriched in CO₂, incubated at 35°C, but growth of bacteria on these environments remains particularly tedious and costly. Diagnosis is based first on the clinical description and then on serology (indirect immunofluorescence or immunoassay enzyme with titration of IgG or IgM antibodies). The use of the techniques of molecular biology (PCR and sequencing) allows a rapid diagnosis from tissues (lymph node, skin, heart valve,...). It also enables the diagnosis of species. The diagnosis by qPCR brings sensitivity, reproducibility and early detection of the presence of the bacteria.

PRINCIPLE OF DETECTION

The Eurobioplex EBX-013 is a test using real-time amplification of bacterial DNA of *Bartonella spp.*, *Bartonella henselae* and *Bartonella Quintana*, as well as a DNA extraction and PCR inhibition control. The test is performed from the DNA extracted from the sample in a single well/tube.

The DNA extraction and PCR inhibition control allows to checks 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 quadriplex: *Bartonella spp.* (Bspp.), *Bartonella henselae* (Bh) and *Bartonella quintana* (Bq) + control of DNA extraction and PCR inhibition (CI-PCR).

DNA of Bspp., Bh, and Bq is respectively detected using FAM, HEX, and TEXAS RED 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 EBX-013 kit is ready to use for the specific detection of *Bartonella spp. / henselae / quintana*.

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 DNA of these bacteria, and the DNA extraction and PCR inhibition control (see Table 2).

Table 1 :

Target	Fluorophore	Excitation	Emission
<i>Bartonella spp</i>	FAM	495 nm	515 nm
<i>Bartonella henselae</i>	HEX	535 nm	555 nm
<i>Bartonella quintana</i>	Texas Red	585 nm	605 nm
PCR inhibition control (CI-PCR)	Cy5	647 nm	667 nm

Equivalent channels on different real time PCR cyclers:

- Channel **FAM** (ABI Systems, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96, Systems Mx, T-COR8®-IVD), Channel 510 (LC 480), Channel Green (RotorGene)
- Channel **HEX** (Chromo 4/CFX96, Mx Systems, T-COR8®-IVD), Channel VIC (ABI Systems), Channel Alexa532 (SmartCycler II), Channel 580 (LC 480), Channel Yellow (RotorGene),

- Channel **Texas Red** (Chromo 4/CFX96, Mx Systems, T-COR8®-IVD), LC Red 610 (LC480), Channel Orange (RotorGene)
 - Channel **Cy5** (ABI Systems, Chromo 4/CFX96, Mx Systems, T-COR8®-IVD), Channel 660 (LC 480), Channel Alexa647 (SmartCyclerII), Channel Red (RotorGene)
 Note: On LC480 instrument II, apply color compensation for the following channels: FAM-HEX/VIC – Texas Red-Cy5 (465-510, 533-580, 533-610, 618-660).

Table 2 :

Cap color	Components of the kit	24 reactions	48 reactions	96 reactions	Reconstitution
Red	ENZYME	4 x 100 µl	2 x 350 µl	4 x 350 µl	Ready to use
Transparent	OLIGOMIX	4 x 60 µl	2 x 210 µl	4 x 210 µl	Ready to use
Yellow	Positive Control CP-Barto	4 x 50 µl	2 x 50 µl	4 x 50 µl	Ready to use
White	PCR inhibition control (CI-PCR)	4 x 280 µl	2 x 280 µl	4 x 280 µl	Ready to use
Blue	Water = negative control (CN-H ₂ O)	1 ml	1 ml	1 ml	Ready to use

Oligomix : contains the primers and probes of the quadriplex (Bspp+Bh+Bq+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)

STORAGE

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

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

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

CAUTIONS AND NOTES

Read carefully instructions before starting.

- ◇ The experiment must be performed by competent staff.
- ◇ Instruments must have been properly installed, calibrated and maintained according to the manufacturer's recommendations.
- ◇ Clinical samples are potentially infectious and must be processed under a laminar flow hood.
- ◇ The experiment must be performed according to good laboratory practices.
- ◇ Do not use this kit after expiration date.
- ◇ The kit is shipped with dry ice, and the components of the kits must arrive frozen. If one or more components are defrosted, or if the tubes have been damaged, contact Eurobio 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 :

Recommandations of maximum storage of samples before extraction	
Room temperature	2h
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 obey 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 bacterial DNA adapted to the type of sample tested (e.g. serum, blood, biopsy or bone marrow extract), and refer to manufacturer's instructions of the extraction kit.

In the EBX-013 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).

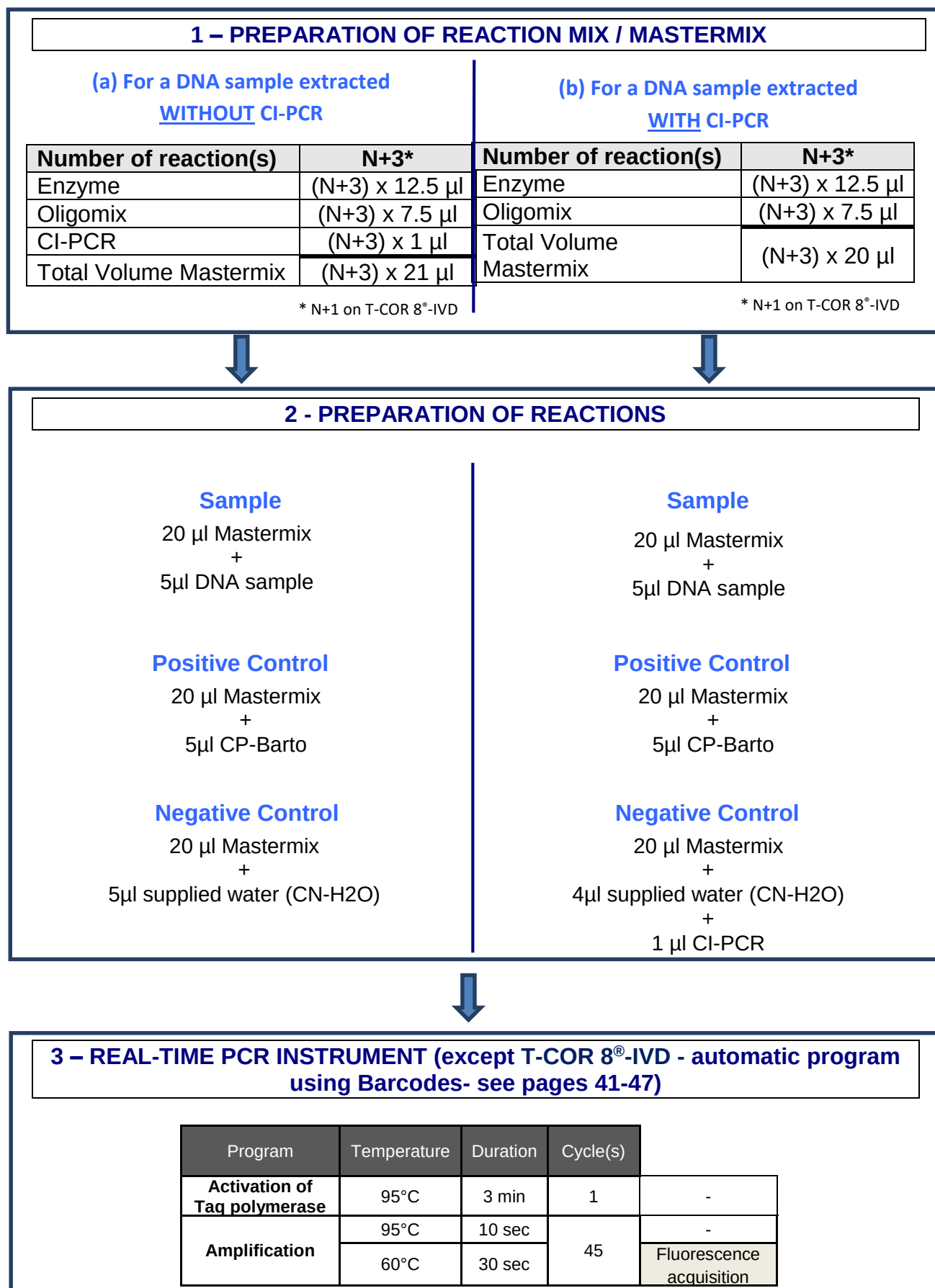
II- Real-time PCR procedure

General comment:

Positive control 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 the positive control CP-Barto as well as the negative control (water supplied = CN-H₂O + CI-PCR) (see II-2/6) of real-time PCR procedure).

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

II-1/ Diagram of the procedure



II-2/ Detailed procedure

- 1) Homogenize the tube of Enzyme, and vortex Oligomix, CP-Barto, and CI-PCR tubes before starting, and centrifuge.
- 2) Prepare Mastermix as below; prepare the reaction mix as follows by multiplying by the number of samples N to test (including positive and negative controls). Prepare enough reagents for at least N+3 reactions^α. (Refer to part 1-(a) or 1-(b) of the previous diagram according to the condition).

Case (a): for a DNA sample extracted without CI-PCR

Number of reaction(s)	1	N+3 ^α
Enzyme	12.5 µl	(N+3) x 12.5 µl
Oligomix	7.5 µl	(N+3) x 7.5 µl
CI-PCR	1 µl	(N+3) x 1 µl
Total volume mastemix	21 µl*	(N+3) x 21 µl

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

^α N+1 on T-COR 8®-IVD

Case (b): for a DNA sample extracted WITH CI-PCR

Number of reaction(s)	1	N+3 ^α
Enzyme	12.5 µl	(N+3) x 12.5 µl
Oligomix	7.5 µl	(N+3) x 7.5 µl
Total volume mastemix	20 µl*	(N+3) x 20 µl

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

^α N+1 on T-COR 8®-IVD

- 3) Homogenize mastermix prepared in 2) and centrifuge briefly
- 4) Distribute 20 µL Mastermix* using a micropipette and filtered tips in each tube or well of microplate for real time PCR.
- 5) Add 5 µL of extracted DNA sample.
- 6) In parallel, test the following controls (see this specific point for T-COR 8®-IVD on pages 41-47):
 - Positive control:
 - 20µL of mastermix + 5µL of CP-Barto
 - Negative control:
 - Case (a): for a DNA sample extracted without CI-PCR
 - 20 µL mastermix + 5 µL supplied water (CN-H2O)
 - Case (b): for a DNA sample extracted with CI-PCR
 - 20 µL mastermix + 4 µL water supplied (CN-H2O) + 1 µL CI-PCR
- 7) Close immediately with an adhesive film or transparent caps to avoid 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 (on T-COR 8®-IVD, no programming is needed thanks to the use of Barcodes- see pages 41-47) :

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

Note 1: On LightCycler ® 480 systems (Roche), two optical systems are available: only "System II" is compliant with use of the kit. Apply color compensation for the following channels: FAM-HEX/VIC-Texas Red-Cy5 (465-510,533-580,533-610,618-660).

Note 2: For the Applied Biosystems systems, select "NONE" in "PASSIVE REFERENCE".

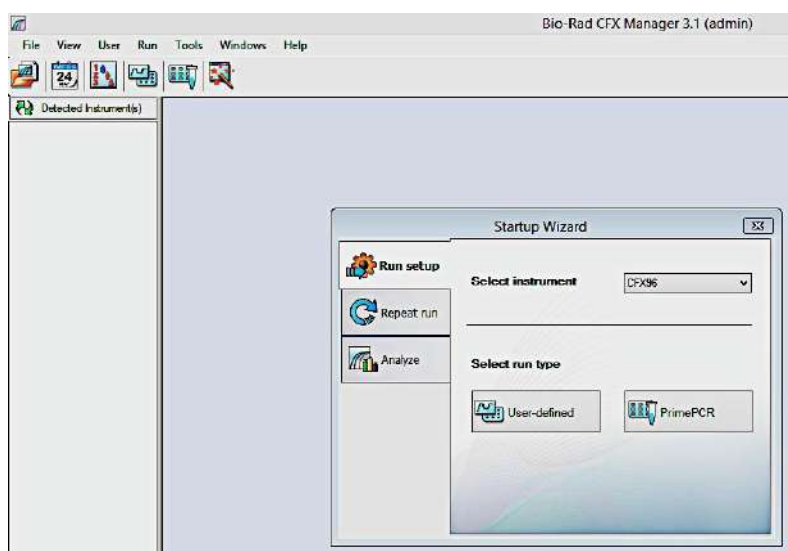
Note 3: On Rotorgene ™, please calibrate the signal by clicking on "GAIN optimization".

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)

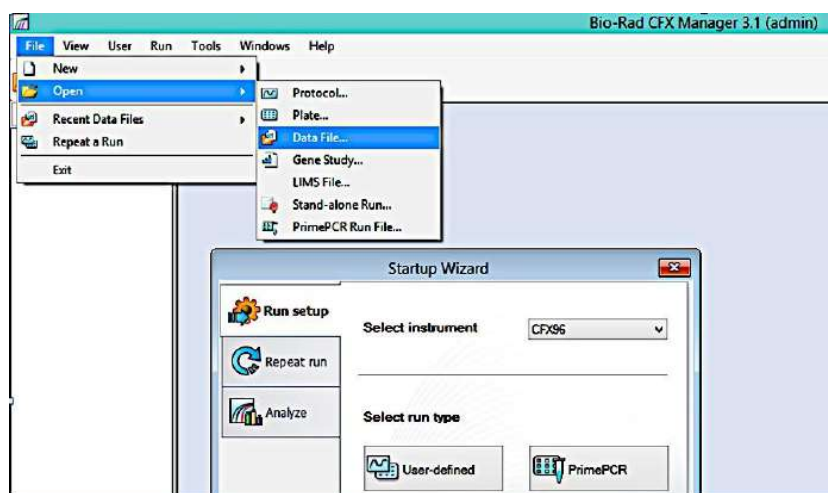
VALIDATION OF THE EXPERIMENT

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.

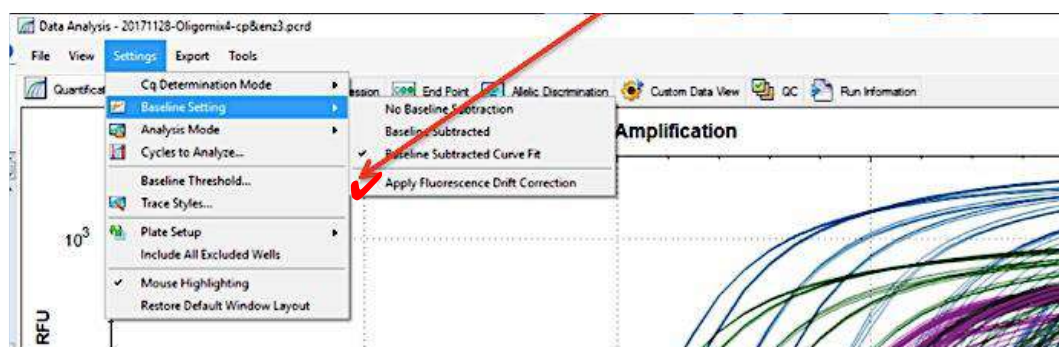


- Click on File and select Open, then Data File



- 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 results for the controls must be the following (Table 5). Otherwise, the experiment is not valid. On T-COR 8®-IVD, we recommend that the positive and negative controls be tested when a new kit is being opened.

Table 4 :

Positive control	
FAM	Ct ≤ 32
HEX	Ct ≤ 32
Texas Red	Ct ≤ 32
Negative control	
FAM	Ct not determined
HEX	Ct not determined
Texas Red	Ct not determined
CY5	Ct ≤ 35

DATA ANALYSIS AND INTERPRETATION

DNA extraction and PCR inhibition control in biological 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 inhibitor of PCR. 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, 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, Texas Red).

For clinical samples, the following results are possible:

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

Channel FAM *Bartonella spp*: + Positive => Ct positive (≤ 45)

Channel HEX *Bartonella henselae*: + Positive => Ct positive (≤ 45)

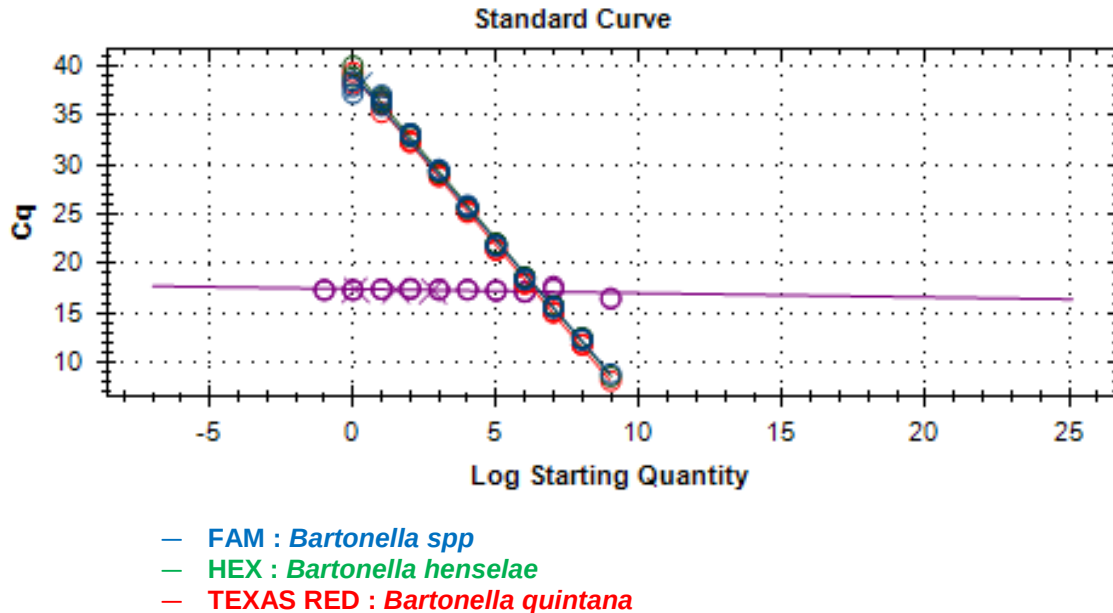
Channel TEXAS RED *Bartonella quintana*: + Positive => Ct positive (≤ 45)

(Ct cut off for positivity of samples for T-COR 8®-IVD is: + Positive => Ct positive (≤ 40) for the 3 channels).

PCR Signal		Presence of bacteria	Test validity/comment
FAM or HEX or Texas Red	CY5	Bartonella spp Bartonella henselae Bartonella quintana	
+	+	Yes	VALID
-	+	No	VALID
+	-	Yes	VALID Possible inhibition of PCR or problem with extraction that doesn't prevent the detection of the bacteria.
-	-	No possible interpretation	Inhibition of PCR or problem with extraction → dilute 5 x the sample; otherwise extract once again the sample

PERFORMANCE ANALYSIS

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



Analytical sensitivity: CP-Barto:

12,5 copies/μl for *B.spp.*,

5 copies/μl for *B.henselae*,

5 copies/μl for *B.quintana*

Linearity for quantification: CP-Barto: from the limit of detection to 10^9 copies/μl

Coefficient of correlation and efficiency

	CHANNEL	Efficiency	Coefficient of correlation R 2	Slope
Barto spp	FAM	95.5 %	0.999	-3.436
Barto henselae	HEX	98.5 %	0.995	-3.358
Barto quintana	TEXAS RED	95.3 %	0.998	-3.440

Variability of the signal

Studies of reproducibility of the kit EurobioPlex Bartonella EBX-013 have been achieved on plasmid BspPHQ (positive control of Bartonella spp., Bartonella henselae and Bartonella quintana) on CFX96 (Biorad). The tables below indicate the average of the coefficient of variation (CV) depending on the concentration of the plasmid.

Reproducibility within an experiment (intra-experiment):

copies/μl	CV % CHANNEL FAM Bartonella spp	CV % CHANNEL HEX Bartonella henselae	CV % CHANNEL TEXAS RED Bartonella quintana
10 8	0.50	0,05	0,35
10 7	0.35	0,48	0,44
10 6	0.48	0,22	0,19
10 5	0.30	0,09	0,12
10 4	0.50	0,29	0,30
10 3	0.27	0,28	0,28
100	0.35	0,50	0,33
50	1.56	2,10	1,63
25	2.00	2,16	2,32
12.5	2.80	2,88	2,52
10			1,60
5	/	/	2,91
AVERAGE CV %	0,91	0,91	1,08

Reproducibility between experiments (inter-experiments):

copies/μl	CV % CHANNEL FAM Bartonella spp	CV % CHANNEL HEX Bartonella henselae	CV % CHANNEL TEXAS RED Bartonella quintana
10 8	8,91	3,96	2,80
10 7	6,36	1,99	4,04
10 6	3,77	1,32	4,62
10 5	3,11	1,30	3,49
10 4	2,58	1,09	3,27
10 3	0,19	0,48	4,86
10 2	1,38	2,08	3,89
10	1,24	2,40	4,00
5			4,26
AVERAGE CV %	3,44	1,83	3,91

Validation on clinical samples

The tests were performed on 109 DNA extracts from: 3 sera, 6 blood samples, 90 lymph node biopsies, 1 spleen biopsy, 1 extract from bone marrow, 7 cardiac biopsies, 1 sample of unknown origin). These samples were previously tested by the routine laboratory technique from a French National Reference Center (CNR) and compared with the kit EurobioPlex Bartonella EBX-013 on CFX96 (Biorad).

The specificity and sensitivity of the EBX-013 kit have been evaluated by analysis of :

- 60 Bartonella spp POSITIVES
- 49 Bartonella spp NEGATIVES
- 45 Bartonella henselae POSITIVES/quintana NEGATIVES
- 64 Bartonella henselae NEGATIVES, 15 of them are the 15 quintana positives ; no cross-reactivity
- 15 Bartonella quintana POSITIVES/henselae NEGATIVES
- 94 Bartonella quintana NEGATIVES, 45 of them are the 45 henselae positives

		EBX-013 Quadriplex Bartonella EUROBIO								
		B spp			B henselae			B quintana		
		POS	NEG	TOTAL	POS	NEG	TOTAL	POS	NEG	TOTAL
Pretest	POS	60	0	60	41	4	45	15	0	15
	NEG	2	47	49	0	64	64	0	94	94
	TOTAL	62	47	109	41	68	109	15	94	109

Sensitivity

Spp : > 99 % (n=60)

Henselae : 41/45= 91,1 %

Quintana : > 99 % (n=15)

Specificity

Spp : 47/49= 95,9%

Henselae : > 99 % (n=64)

Quintana : > 99 % (n=94)

The tests were performed on CFX96.

Bacterial DNA extraction was done using the kits detailed below, following manufacturer's instructions:

- EZ1 Blood DNA kit (Qiagen) for blood and serum samples,
- EZ1 Tissue DNA kit (Qiagen) for tissue samples (detailed above).

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

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

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

Note: Vortex the tubes with the provided T-core vortex before putting the tubes in the T-COR 8®-IVD, and always check that there is no bubble, and that the liquid is all located at the bottom of the tube.

Controls

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

After this initial control, the internal control allows to check that the PCR is working properly, and that there is no PCR inhibition.

Fluorophores

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

For all EBX, such as EBX-013, FAM/HEX/Texas Red/Cy5 combination is used. If some channels are not used, do not consider this channel for results analysis.

Use of Barcodes (available on pages 45-47)

1- Select Menu > New Run

2- Select Barcode

3- Scan the appropriate Barcode on the right side of the instrument:

- For the positive control (Barcode EBX-013 Pos Ctrl),
- For the negative control (Barcode EBX-013 Neg Ctrl),
- For a patient sample (Barcode EBX-013)

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

4- Lift up the lid of the selected well (well x), check that the blue LED light is on, and select "Yes"

5- Place the tube in the corresponding well and select "Next".

6- If you wish to name the sample (optional), select "sample x", name it and select "Accept".

7- Select "Next"

8- To add/test another control or sample, select « Add well » and go back to point 3-.

9- Select "Start run".

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

Presentation and Interpretation of results

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

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

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

« Neg Ctrl Fail »: Not valid

« Neg Ctrl Valid »: Valid

« Pos Ctrl Fail »: Non valid

« Pos Ctrl Valid »: Valid

For patients status:

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

"Not detected": Negative → red box

* The results for the specific species are specified.

CAUTION !

When the box is green, it is important to read the status for each target as some targets may be negative.

« Invalid »: Invalid result -> retest

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

➤ For valid positive and negative controls, for the limit of detection (LOD) and two positive samples (samples 3 and 4) « Detected » for their corresponding targets, and for two negative samples indicated “Not Detected” (samples 1 and 2):

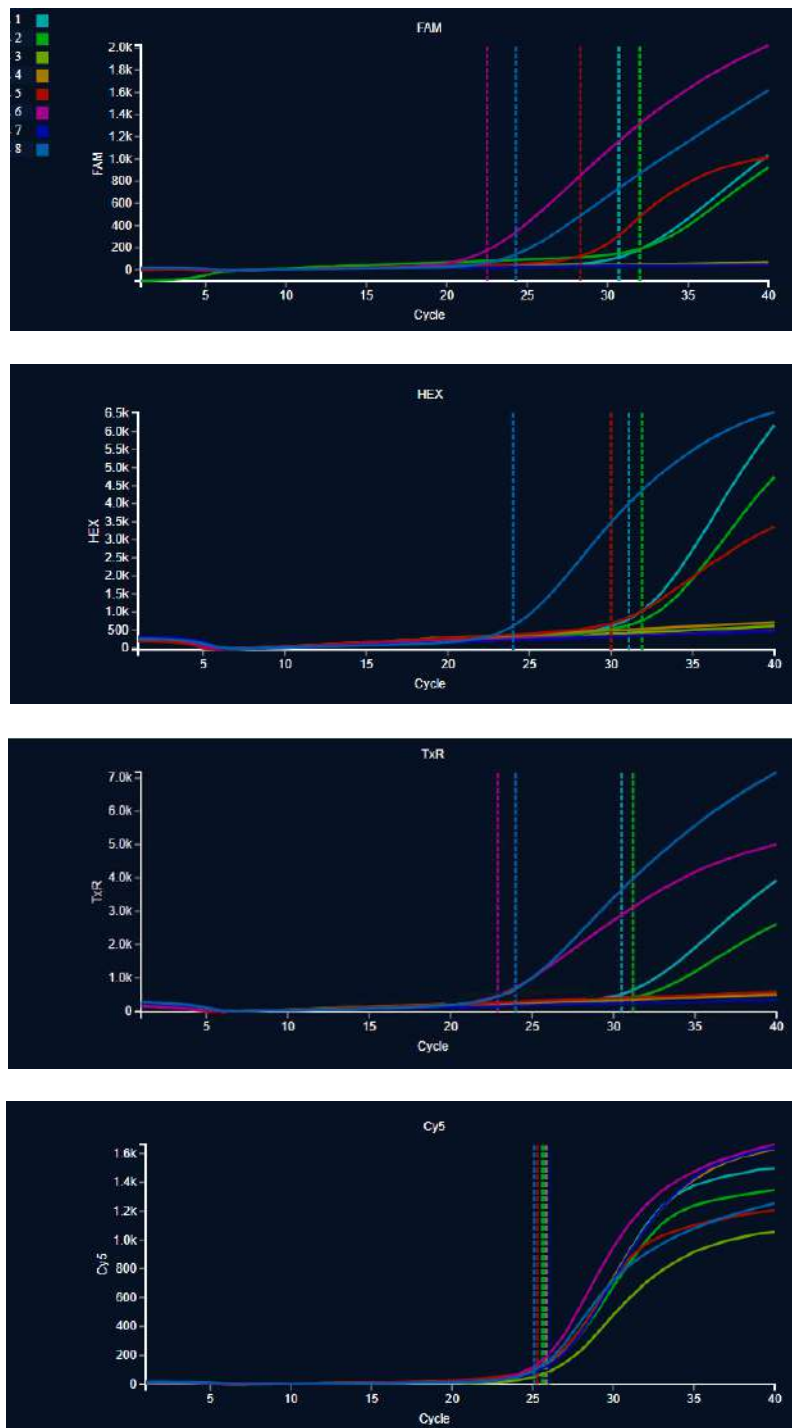
❖ On the instrument screen:

Interpretations		
1	LOD Repl1	EBX-013
	Detected: B. quint, B. hens, B. spp	
2	LOD Repl2	EBX-013
	Detected: B. quint, B. hens, B. spp	
3	ech1	EBX-013
	Not Detected - B. quint, B. hens, B. spp	
4	ech2	EBX-013
	Not Detected - B. quint, B. hens, B. spp	
5	ech3	EBX-013
	Detected: B. hens, B. spp - B. quint not detected	
6	ech4	EBX-013
	Detected: B. quint, B. spp - B. hens not detected	
7	CN	EBX-013 Neg Ctrl
	Détecté(e-s): B. hens, B. spp - B. quint not detected	
8	CP	EBX-013 Pos Ctrl
	Non détecté - B. quint B. hens B. spp	

❖ On the report:

Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5	Call	Note
1	LOD Rep11	EBX-013	30.7	31.1	30.5	25.7	Detected • B. quint • B. hens • B. spp	
2	LOD Rep12	EBX-013	32.0	31.9	31.2	25.6	Detected • B. quint • B. hens • B. spp	
3	ech1	EBX-013				25.9	Not Detected	B. quint, B. hens, B. spp
4	ech2	EBX-013				25.9	Not Detected	B. quint, B. hens, B. spp
5	ech3	EBX-013	28.3	30.0		25.3	Detected • B. hens • B. spp	B. quint not detected
6	ech4	EBX-013	22.5		22.9	25.1	Detected • B. quint • B. spp	B. hens not detected
7	CN	EBX-013 Neg Ctrl				26.0	Detected • Neg Ctrl Valid	
8	CP	EBX-013 Pos Ctrl	24.3	24.0	24.0	25.1	Detected • Pos Ctrl Valid	

Example of amplification curves:



Barcodes for EBX-013 for use on T-COR8®-IVD

EBX-013 Pos Ctrl
Positive Control CP-Barto



EBX-013 Neg Ctrl

Water = Negative Control (CN-H2O)



EBX-013



BIBLIOGRAPHY

Angelakis E, Raoult D. Pathogenicity and treatment of Bartonella infections. Int J Antimicrob Agents. 2014 Jul;44(1):16-25.

Noémie Boillat, Gilbert Greub. Maladie des griffes du chat et autres bartonelloses. Rev Med Suisse 2008;901-907.

Boulouis et al. Les infections à Bartonella chez l'homme et l'animal: aspects diagnostiques et therap. Elsevier. 2007.

Bartonelloses. Précis de biopathologie analyses médicales spécialisées. Biomnis. 2012.

Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, Recommandations de bonnes pratiques, 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
	Instructions for use
	CE labeled product
	In vitro diagnostic


eurobio
SCIENTIFIC
 7, avenue de Scandinavie
 ZA de Courtaboeuf
 91940 Les Ulis
 FRANCE