



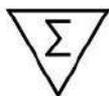
EurobioPlex

Coxiella burnetii

PCR EN TEMPS REEL

Pour la PCR **qualitative** en temps réel

REF **EBX-017**
EBX-017-48
EBX-017-24



24/48/96 réactions



Version 5.00 du 07/07/2020

Validé sur :

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) avec analyse sur CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)
- 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 Per-Well SmartCT™ 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	3
Description et contenu du kit	4
Conservation	5
Précautions et notes	5
Collecte des échantillons, transport et conservation	6
Procédure	6
I- Extraction d'ADN	6
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.....	14
Codes-Barres pour EBX-017 sur T-COR 8™-IVD.....	18
Bibliographie	21
Elimination des déchets	21
Symboles	22

UTILISATION

L'EurobioPlex EBX-017 est un test d'amplification par réaction en chaîne de la polymérase (PCR) en temps réel, conçu pour la détection qualitative de *Coxiella burnetii* dans un extrait d'acides nucléiques ADN. Ce kit contient également un contrôle d'inhibition de PCR. 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 (diagnostic par sérologie, culture, immunohistochimie, ou amplification génique par PCR).

L'extrait d'ADN est le matériel de départ pour le kit EurobioPlex *Coxiella burnetii*.

L'EurobioPlex EBX-017 a été validé sur les types de prélèvements suivants :

- Serum
- Sang
- Biopsie cardiaque
- Biopsie du pharynx
- Biopsie osseuse
- Liquide de ponction (pus)
- Biopsie ganglionnaire
- Surnageant de culture négative
- Biopsie de coque anévrismale

INTRODUCTION

La fièvre Q (Query = qui interroge) fut dénommée ainsi pour souligner les incertitudes concernant son étiologie et son épidémiologie. Il s'agit d'une zoonose causée par une bactérie intracellulaire stricte à Gram-, le coccobacille *Coxiella burnetii*. Décrite la première fois en 1935 chez des employés d'un abattoir de Brisbane en Australie, cette maladie est néanmoins ubiquitaire mais surtout retrouvée en milieu rural. En effet, la bactérie infecte la plupart des mammifères domestiques (bovins, ovins, caprins, chevaux, chiens, chats, lapins) et sauvages (cervidés, renards, rongeurs). Les animaux infectés transmettent la bactérie par le placenta, les urines, les fèces et le lait. La transmission interhumaine reste anecdotique, le plus souvent lors de manœuvres obstétricales chez les femmes infectées. La contamination chez l'homme se fait principalement par inhalation de particules infectées provenant de troupeaux, avec une durée d'incubation d'une à trois semaines, et atteint des individus de tout âge et des deux sexes. La prévalence n'est pas connue avec précision et varie énormément d'une région à l'autre en raison des variations d'exposition aux ruminants. Malgré tout, des données régionales comme celles du Centre National de Référence permettent d'estimer l'incidence de la fièvre Q aigüe à 50 pour 100 000 habitants par an dans le sud de la France. En Europe, l'incidence maximale se situe au printemps et au début de l'été.

La primo-infection peut être asymptomatique (dans 60% des cas) ou symptomatique sous forme d'une fièvre Q aigüe (40% des cas). Le tableau clinique de la fièvre Q aigüe est celui d'un syndrome pseudo-grippal, de pneumopathie atypique ou d'hépatite. Il est principalement décrit par une forte fièvre (91%), parfois prolongée, des céphalées importantes (51%), des myalgies (37%), des arthralgies (27%) et de la toux (34%). Chez le sujet sain, l'évolution spontanée est une guérison complète. Chez certains sujets, par contre, *Coxiella burnetii* est capable de se multiplier malgré la réponse déclenchée par la primo-infection. Ces sujets à risque sont les femmes enceintes, les patients présentant une valvulopathie, les porteurs d'une prothèse valvulaire, les

immunodéprimés. Lorsque le système immunitaire est incapable de contrôler l'infection, une fièvre Q chronique peut se développer. L'endocardite est la manifestation principale de la fièvre Q chronique (retrouvée dans 80% des cas). L'endocardite fait la gravité de l'infection avec une mortalité de 25 à 60% des cas en absence de traitement. La fièvre Q représente 5% de l'ensemble des cas d'endocardite en France. Le traitement, curatif, consiste en une antibiothérapie. La Doxycycline est administrée pour une période de deux semaines à plusieurs mois voire années dans le cas des endocardites (associée à un autre antibiotique). L'efficacité du traitement se juge sur le suivi des titres d'anticorps. La surveillance sérologique doit être d'au moins cinq ans.

Le diagnostic de cette maladie est souvent délicat car ces bactéries sont difficiles à cultiver. L'approche diagnostique nécessite donc le plus souvent l'utilisation de plusieurs méthodes complémentaires en fonction du statut immunitaire du patient et de la symptomatologie. Le diagnostic spécifique repose à la fois sur le diagnostic indirect (sérologie), la mise en évidence directe de la bactérie sur coupes histologiques par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps monoclonal, et l'amplification génique par PCR à partir de sang, de sérum ou de différents autres prélèvements biologiques tels que valve cardiaque, placenta, anévrisme, liquide céphalorachidien. La réaction d'immunofluorescence indirecte est à ce jour la technique de référence pour le sérodiagnostic de la fièvre Q, avec quantification des IgA, IgG et IgM pour les deux phases (antigènes de phase II dans la forme aiguë et de phase I dans la forme chronique). **L'amplification directe par PCR est quant à elle la technique la plus spécifique et la plus sensible pour effectuer le diagnostic d'infection à *Coxiella burnetii*.**

PRINCIPE DE LA DETECTION

L'EurobioPlex EBX-017 est un test d'amplification des acides nucléiques ADN bactériens de *Coxiella burnetii*, 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 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.

Ce kit est un duplex : *Coxiella burnetii* (Coxb) + contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (CI-PCR).

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

DESCRIPTION ET CONTENU DU KIT

Le kit de PCR en temps réel EBX-017 est prêt à l'emploi pour la détection spécifique de *Coxiella burnetii*.

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 cette bactérie et du contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (cf. Tableau 2).

Tableau 1 :

Cible	Fluorophore	Excitation	Emission
<i>Coxiella burnetii</i>	HEX	535 nm	555 nm
Contrôle d'inhibition de PCR (CI-PCR)	Cy5	647 nm	667 nm

Canaux équivalents sur différents instruments de PCR:

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

Tableau 2 :

Couleur de Bouchon	Contenu du kit	EBX-017-24 (24 tests)	EBX-017-48 (48 tests)	EBX-017 (96 tests)	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-Coxb)	4 x 25 µl de CP	2 x 25 µl de CP	4 x 25 µl de CP	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-H2O)	1 ml	1 ml	1 ml	Prêt à l'emploi

Oligomix : contient les amorces et sondes du duplex (Coxb 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 débuter 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.
- ◇ Il est de la responsabilité de l'utilisateur d'utiliser un autre équipement que ceux validés, et dans ce cas, les performances ne sont pas garanties.
- ◇ 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 sur l'étiquette.
- ◇ 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 par exemple à partir d'échantillons de plasma, de sérum, et de se référer aux instructions du fournisseur du kit d'extraction utilisé.

Dans le kit EBX-017, 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. 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 Scientific (Ref EurobioPlex EBX-002).

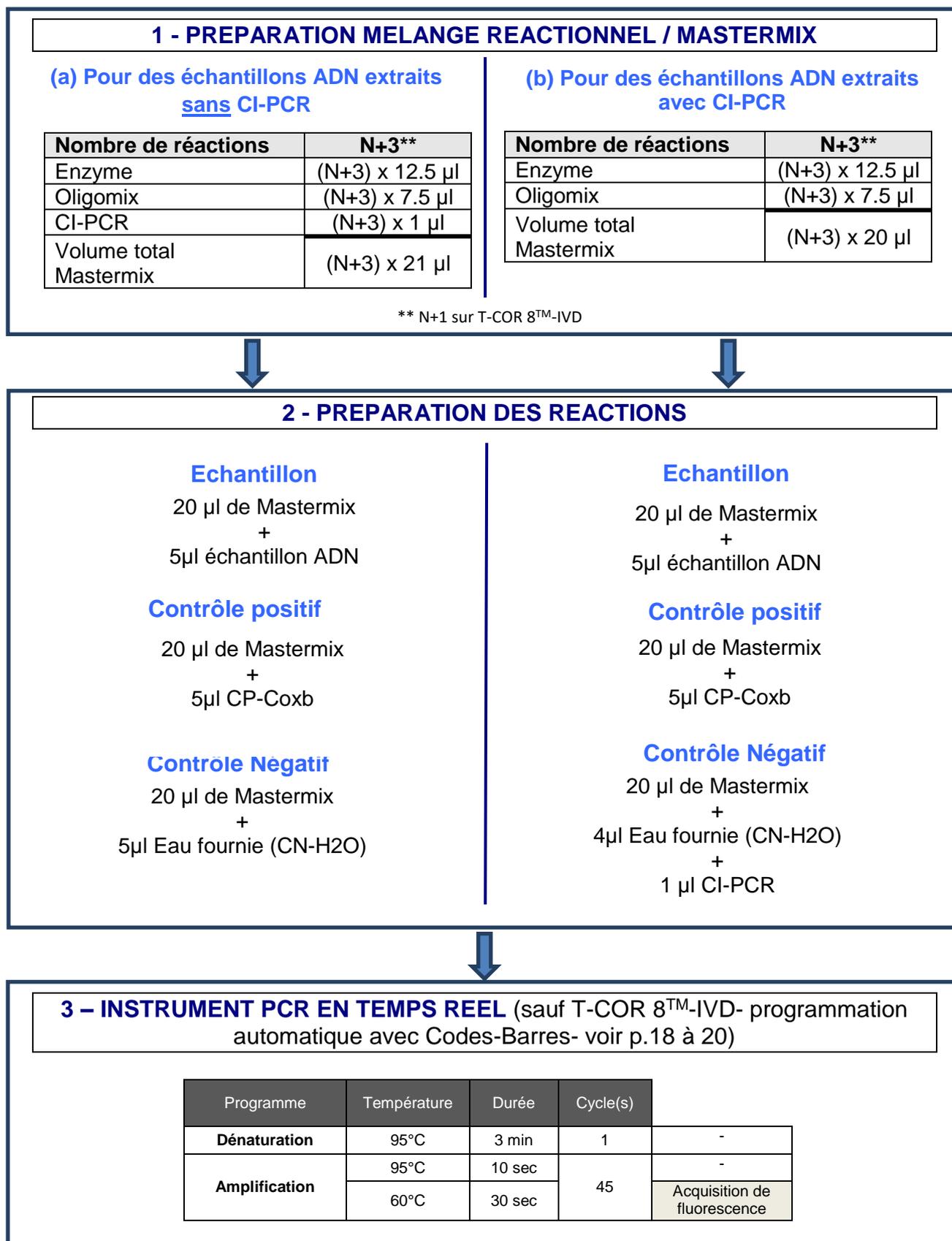
II- Réalisation de la PCR en temps réel

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-Coxb 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 8TM-IVD, nous recommandons que ces contrôles soient réalisés lors de la première utilisation d'un nouveau kit.

II-1/ Schéma de la procédure



II-2/ Procédure détaillée

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

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

Nombre de réactions	1	N+3**
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

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

Nombre de réactions	1	N+3**
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 le cas (a) et le cas (b) est négligeable et n'a pas d'effet sur les performances.

** Pour une utilisation sur T-COR 8TM-IVD, nous recommandons de faire un Mastermix pour N+1 réactions pour une utilisation au coup par coup du kit.

- 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 des échantillons (ADN extrait ou sérum non extrait)
- 6) En parallèle réaliser les contrôles suivants (voir ce point spécifique pour T-COR 8TM-IVD pages 14 à 17) :

- Contrôle positif :

20 µl de Mastermix + 5 µl de contrôle positif CP-Coxb

- Contrôle négatif :

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

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

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

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

- 7) Fermer immédiatement les tubes, ou la plaque avec un film adhésif, 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 8TM-IVD aucune programmation manuelle n'est nécessaire grâce aux Codes-Barres- voir pages 18 à 20).

Programme	Température	Durée	Cycle(s)	
Dénaturation	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.

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

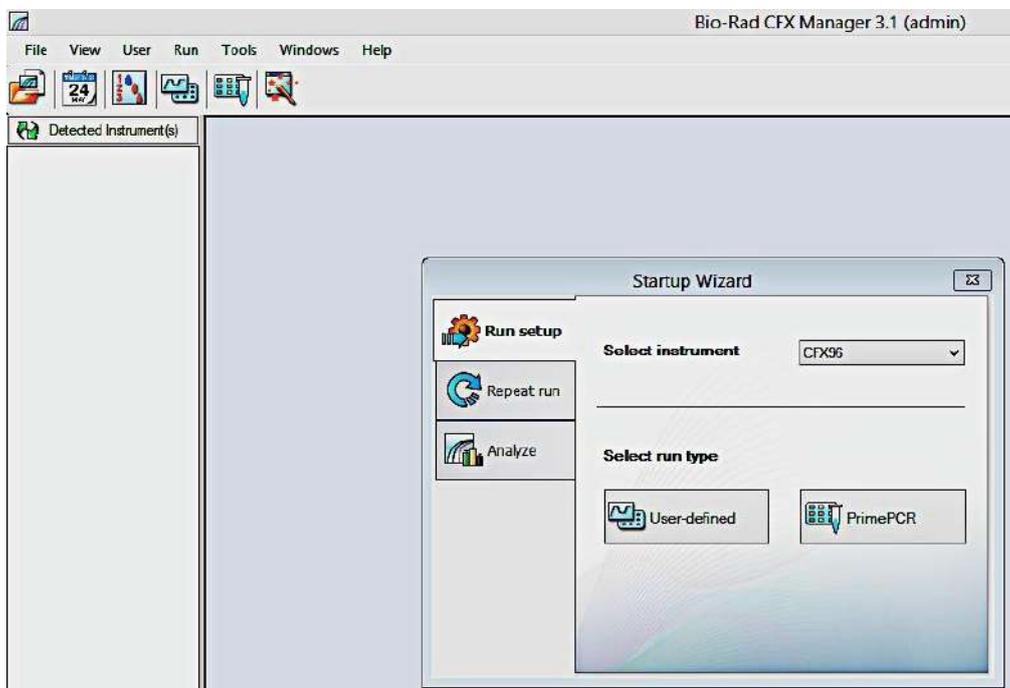
Note 3 : Sur Rotorgene™, calibrer le signal en cliquant sur « GAIN OPTIMISATION ».

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

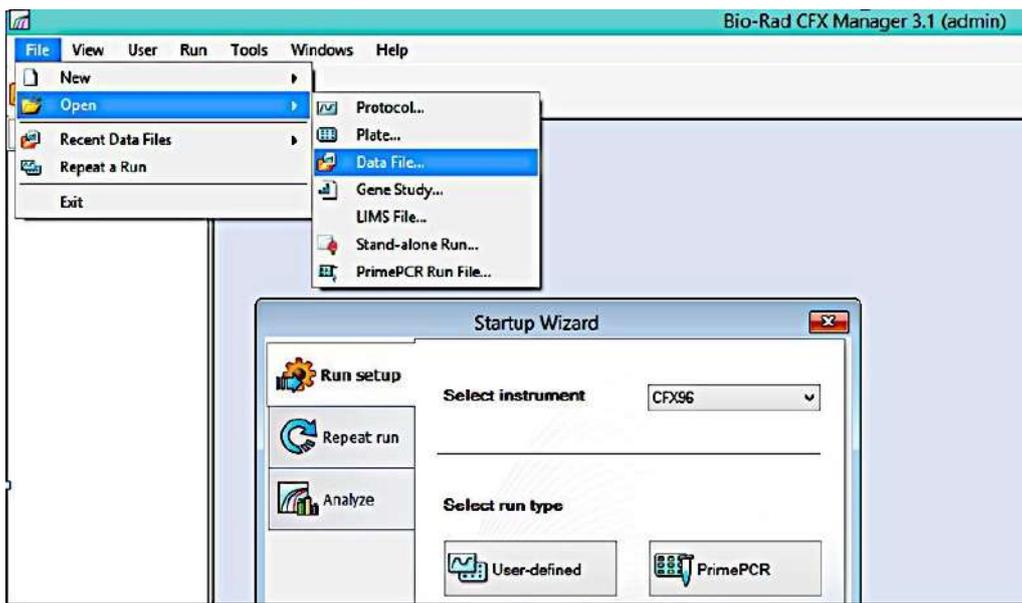
VALIDATION DE L'EXPERIMENTATION

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

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

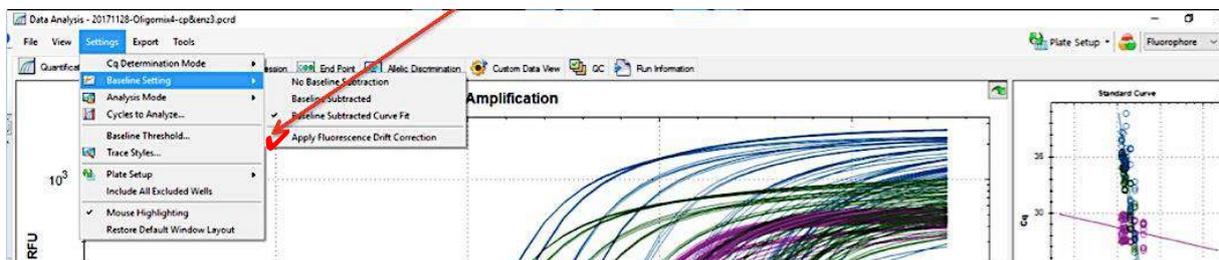


- Cliquer sur « File » et sélectionner « Open » puis « Data File ».



- 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 8TM-IVD, nous recommandons que ces contrôles soient réalisés lors de la première utilisation d'un nouveau kit.

Tableau 4 :

Contrôle Positif	
HEX	Ct ≤ 28
Contrôle négatif	
HEX	Ct non déterminé
CY5	Ct ≤ 30

Sur T-COR 8TM-IVD, l'interprétation est automatiquement générée grâce aux codes-barres.

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. 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 le canal cible (HEX).

Pour les échantillons cliniques, les résultats suivants sont possibles :



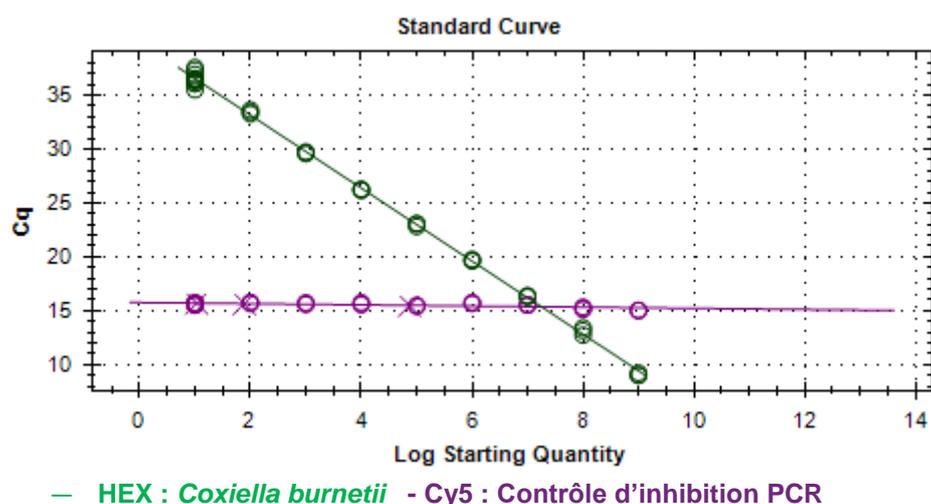
***Seuil de Ct pour la positivité des échantillons :
Canal HEX: + Positif => Ct ≤ 45**

Signal PCR		Présence de <i>Coxiella burnetii</i>	Validité du test/commentaire
HEX	CY5		
+*	+	Oui	VALIDE
-	+	Non	VALIDE
+*	-	Oui	VALIDE Possible inhibition de PCR ou problème d'extraction qui n'empêche pas la détection de <i>Coxiella burnetii</i> .
-	-	Non interprétable	Inhibition de PCR ou problème d'extraction → diluer 5 x l'échantillon ; si même résultat ré-extraire l'échantillon

Sur T-COR 8TM-IVD, l'interprétation est automatiquement générée avec les codes-barres.

ANALYSE DES PERFORMANCES

Exemple d'expérience réalisée sur thermocycleur PCR temps réel CFX96™ (Bio-Rad) :



Sensibilité analytique: CP-Coxb: 10 copies/microl.

Linéarité de quantification : CP-Coxb: 10 copies/microl à 10⁹ copies/microl

Variabilité du signal

Les études de reproductibilité du kit EurobioPlex *Coxiella burnetii* EBX-017 ont été réalisées sur le plasmide Coxb (contrôle positif de *Coxiella burnetii*) sur CFX96™ (Bio-Rad). Le tableau ci-dessous indique le coefficient de variation.

Coefficient de variation (%)	<i>Coxiella burnetii</i> (CANAL HEX)	CI-PCR (CANAL CY5)
REPRODUCTIBILITE INTRA-EXPERIENCE	0,90%	0,45%
REPRODUCTIBILITE INTER-EXPERIENCES	3,08%	3,92%

Validation sur les échantillons cliniques

Les tests ont été réalisés à partir de 103 échantillons d'ADN extrait: 13 sera, 14 échantillons sanguins, 7 biopsies cardiaques, 2 biopsies du pharynx, 30 biopsies osseuses, 6 liquides de ponction (pus), 12 biopsies ganglionnaires, 14 surnageants de culture négative, et 5 biopsies de coque anévrysmale. Ces échantillons ont été préalablement testés par la technique de routine d'un laboratoire de référence, puis comparés avec le kit EurobioPlex *Coxiella burnetii* EBX-017 sur CFX96™ (Bio-Rad).

La spécificité et la sensibilité du kit EBX-017 ont été évaluées par l'analyse des échantillons suivants :

- 48 *Coxiella burnetii* POSITIFS
- 55 *Coxiella burnetii* NEGATIFS

		EBX-017 <i>Coxiella burnetii</i>		
		POSITIFS	NEGATIFS	TOTAL
Pretest	POSITIFS	48	0	48
	NEGATIFS	0	55	55
	TOTAL	48	55	103

Spécificité : > 99 %

De plus, aucune cross-réactivité n'a été observée avec les bactéries suivantes:

- *Mycoplasma* (n=1)=0%
- *Bartonella spp* (n=2)=0%
- *Bartonella henselae* (n=2)=0%
- *Klebsiella kingae* (n=2)=0%
- *Mycobacterium tuberculosis* (n=1)=0%
- *Tropheryma whipplei* (n=1)=0%
- *Staphylococcus aureus* (n=2)=0%
- *Mycobacterium avium* (n=1)=0%
- *Staphylococcus oralis/mitis/sanguis* (n=1)=0%
- *Francisella tularensis* (n=1)=0%

Sensibilité : > 99 %

La concordance est > 99 %.

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

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

- 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 programmes thermiques, des tests/assay réalisés, et du moment du lancement de la PCR.

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

Note : Bien mélanger après dépôt de l'échantillon dans le tube avec allers-retours de pipetage, en évitant la formation de bulles, et s'assurer 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

Pour tous les EBX, dont EBX-017, la combinaison FAM/HEX/Texas Red/Cy5 est celle choisie. Ne pas en tenir compte des canaux FAM et Texas Red pour ce kit lors de l'analyse des résultats.

Tests patients

Avec test du contrôle positif uniquement lors de la première utilisation d'un nouveau kit, et avec 3 décongélations maximum de chaque tube.	Format 24 réactions
Nombre maximum de tests patients	22 patients
Nombre maximum de tests patients, avec un patient à chaque run.	12 patients

Utilisation des Codes-Barres (disponibles en pages 18-20)

- 1- Sélectionner Menu > Nouvelle Analyse/New Run
- 2- Sélectionner Code-barre/Barcodes,
- 3- Scanner sur la droite de l'appareil le Code-Barre désiré :
 - soit pour le contrôle positif (Code-barre EBX-017 Pos Ctrl),
 - soit pour le contrôle négatif (Code-barre EBX-017 Neg Ctrl),
 - soit pour un échantillon (Code-Barre Assay : EBX-017)

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 « échantillon 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 2 étant visualisables en temps réel.

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 → encadré vert
- « Non détecté/Not detected »: Négatif → encadré rouge
- « Non valide/Invalid »: Résultat non valide -> retester → encadré jaune

Exemple de présentation d'interprétation automatique des résultats sur l'instrument T-COR 8™-IVD et dans le rapport:

- Exemple : tests de contrôles négatif (puits 8) et positif (puits 7) valides, d'un contrôle négatif invalide (puits 1), d'un échantillon négatif indiqué « Non détecté/Not Detected » (sample 1-puits 2), et d'un échantillon positif indiqué «Détecté/Detected » (sample 2 - puits 3):

- ❖ Sur l'écran de l'instrument :

Interpretations		
1	Neg Ctrl	EBX-017 Neg Ctrl
Invalid - Neg Ctrl Fail		
2	Sample 1	EBX-017
Not Detected - Coxb Neg		
3	Sample 2	EBX-017
Detected: Coxiella burnetii		
7	Pos Ctrl	EBX-017 Pos Ctrl
Detected: Pos Ctrl		
8	Neg Ctrl	EBX-017 Neg Ctrl
Detected: Neg Ctrl		

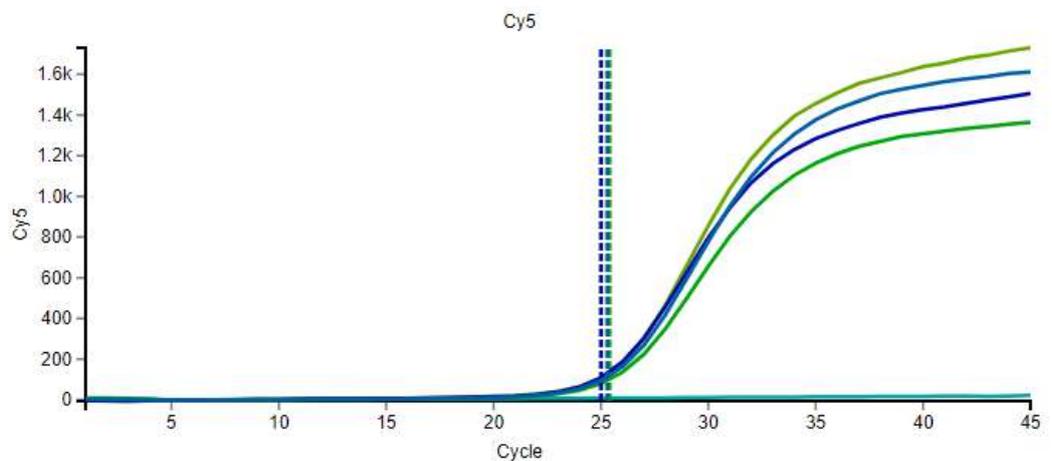
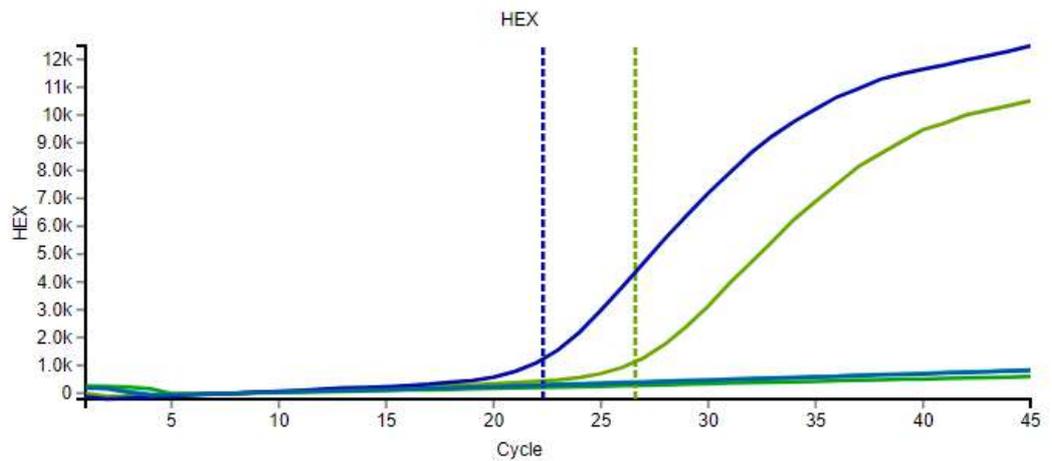
❖ Dans le rapport :

Summary								
Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5	Call	Note
1	Neg Ctrl	EBX-017 Neg Ctrl					Invalid	Neg Ctrl Fail
2	Sample 1	EBX-017				25.4	Not Detected	Coxb Neg
3	Sample 2	EBX-017		26.6		25.3	Detected • <i>Coxiella burnetii</i>	
7	Pos Ctrl	EBX-017 Pos Ctrl		22.3		25.0	Detected • Pos Ctrl	
8	Neg Ctrl	EBX-017 Neg Ctrl				25.3	Detected • Neg Ctrl	

Exemple de courbes d'amplification

Graphs

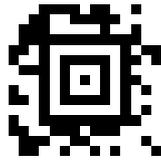
Legend	
Well 1	
Well 2	
Well 3	
Well 7	
Well 8	



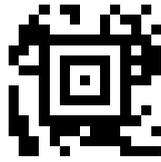
EBX-017 Pos Ctrl



EBX-017 Neg Ctrl



Assay: EBX-017



BIBLIOGRAPHIE

De Bruin A. Detection of *Coxiella burnetii* by qPCR : a comparison of available assays. RIVM Letter report 330071002/2011. National Institute for Public Health and the Environment. Ministry of Health, Welfare and Sport.

Raoult D. Q fever : still a mysterious disease. QJM 2002;95:491-492

Delsing CE, Warris A, Bleeker-Rovers CP. Q fever: still more queries than answers. Adv Exp Med Biol. 2011;719:133-43. Review.

Le traitement de la fièvre Q chronique. Site web IFR48. Unité des Rickettsies. Centre National de Référence (Aix-Marseille Université. URMITE 7278). Marseille. France.

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

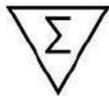
EurobioPlex

Coxiella burnetii

REAL-TIME PCR

For **qualitative** real-time PCR

REF **EBX-017**
EBX-017-48
EBX-017-24



24/48/96 reactions



Version 5.00 - 2020/07/07

Validated on:

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) with analysis on CFX Manager v 3.1 (Bio-Rad)
- 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 Per-Well SmartCT™ 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	25
Introduction	25
Principle of detection	26
Description and content of the kit	26
Storage	28
Cautions and notes	28
Samples collection, transport and storage	28
Procedure	29
I- DNA extraction	29
II- Real-time PCR procedure	29
II-1/ Diagram of the procedure.....	30
II-2/ Detailed procedure	31
Validation of the experiment	32
Data analysis and Interpretation	34
Performance analysis.....	35
Specificities of the Real-Time PCR T-COR 8™-IVD instrument	36
Barcodes for EBX-017 for use on T-COR 8™-IVD	40
Bibliography	43
Waste disposal	43
Symbols	44

INTENDED USE

The EBX-017 test uses real time polymerase chain reaction (PCR) amplification and is designed for the qualitative detection of *uburnetii* from a DNA nucleic acids extract. This kit also contains a control of inhibition of PCR. This test is indicated to confirm a diagnosis of presumption of infection in patients or complete a proven or indeterminate diagnosis by standard techniques (diagnosis by serology, by culture, immunohistochemistry or gene amplification by PCR). Extracted DNA is the starting material for the EurobioPlex *Coxiella burnetii*.

The EurobioPlex EBX-017 has been validated on the following specimen:

- Serum
- Blood
- Cardiac biopsy
- Pharyngeal biopsy
- Bone biopsy
- Puncture fluid (pus)
- Lymph node biopsy
- Negative culture supernatants
- Biopsy of aneurysm

INTRODUCTION

Q fever (Q = query) was so named to highlight the uncertainties about its etiology and epidemiology. It is a zoonotic disease caused by an intracellular gram-negative bacterium: coccobacilli *Coxiella burnetii*. First described in 1935 in employees of a slaughterhouse in Brisbane, Australia, this disease is nevertheless ubiquitous but mostly found in rural areas. Indeed, the bacterium infects most domestic mammals (cattle, sheep, goats, horses, dogs, cats, rabbits) and wild mammals (deer, foxes, rodents). Infected animals transmit the bacteria by the placenta, urine, feces and milk. Inter-humans transmission remains anecdotal, most often by the way of obstetrical manipulations of infected women. Contamination in humans occurs mainly through inhalation of infected fine particles from herds with duration of incubation of one to three weeks. Individuals of all ages and both sexes can be affected. The prevalence is not known accurately and varies greatly from one region to another depending on exposure to ruminants. Nevertheless, regional data such as those of the National Reference Center allow an estimation of the incidence of acute Q fever of 50 per 100,000 inhabitants per year in the South of France. In Europe, the highest incidence is during spring and early summer.

The primo-infection can be asymptomatic (in 60% of cases) or symptomatic with the acute form of Q fever (40% of cases). The clinical presentation of acute Q fever is a flu syndrome, atypical pneumonia or hepatitis. It is primarily described by high fever (91%), sometimes prolonged, major headache (51%), myalgia (37%), arthralgia (27%) and cough (34%). In healthy subjects, spontaneous evolution is a complete healing. In some people, on the other hand, *Coxiella burnetii* is able to multiply despite the response triggered by the primary infection. These subjects at risk are pregnant women, patients with valvulopathy, with a valvular prosthesis, and immuno-compromised patients. When the immune system is unable to control the infection, chronic Q fever can develop. Endocarditis is the main manifestation of chronic Q fever (found in 80% of cases). Endocarditis is the severe factor of the infection with a

mortality of 25 to 60% of the cases in the absence of treatment. Q fever is 5% of all cases of endocarditis in France. The curative treatment consists in an antibiotic therapy. Doxycycline is administered for a period of two weeks to several months or even years in the case of endocarditis (associated with another antibiotic). The effectiveness of the treatment is evaluated by the follow up of antibody levels. Serological surveillance must be of at least five years.

The diagnosis of this disease is often tricky because these bacteria are difficult to cultivate. The diagnostic approach most often requires the use of several complementary methods depending on the immune status of the patient and the symptomatology. Specific diagnosis relies both on the indirect diagnosis (serology), direct identification of the bacterium on histological sections by Immunohistochemistry using monoclonal antibody, and gene amplification by PCR from blood or serum or different other samples such as heart valve, placenta, aneurysm, cerebrospinal fluid. Indirect immunofluorescence reaction is to date the technique of reference for the serodiagnosis of Q fever, with quantification of IgA, IgG and IgM for both phases (antigens of phase II in the acute form and phase I in the chronic form). **Direct PCR amplification is the most sensitive and most specific technique for the diagnosis of infection with *Coxiella burnetii*.**

PRINCIPLE OF DETECTION

The EurobioPlex EBX-017 is a test using real-time amplification of bacterial DNA of *Coxiella burnetii*, as well as a DNA extraction and PCR inhibition control. The test is performed from extracted DNA in a single well/tube.

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

This kit is composed of one duplex: *Coxiella burnetii* (Coxb) + control of DNA extraction and PCR inhibition (CI-PCR).

DNA of *Coxiella burnetii* is detected using HEX labeled probe. 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-017 kit is ready to use for the specific detection of *Coxiella burnetii*.

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 this bacterium, and the DNA extraction and PCR inhibition control (see Table 2).

Table 1:

Target	Fluorophore	Excitation	Emission
<i>Coxiella burnetii</i>	HEX	535 nm	555 nm
PCR inhibition control (CI-PCR)	Cy5	647 nm	667 nm

Equivalent channels on different real time PCR cyclers:

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

- Channel **Cy5** (CFX96™ /Chromo4, Systems ABI, Systems Mx, T-COR 8™-IVD), Channel Alexa647 (SmartCycler II), Channel 660 (LC 480), Channel Red (RotorGene)

Table 2:

Cap color	Components of the kit	EBX-017-24 (24 tests)	EBX-017-48 (48 tests)	EBX-017 (96 tests)	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 210µl	4 x 210 µl	Ready to use
Yellow	Positive Control (CP-Coxb)	4 x 25 µl de CP	2 x 25 µl de CP	4 x 25 µl de CP	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-H2O)	1 ml	1 ml	1 ml	Ready to use

Oligomix: contains the primers and probes of the duplex (Coxb + 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 label of 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.
- ◇ If a non validated equipment is used, it is the user's responsibility, and if so, the performances are not guaranteed.
- ◇ 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, specified on the label.
- ◇ The kit is shipped with dry ice, and the components of the kits must arrive frozen. If one or more components are defrosted, or of the tubes have been damaged, contact Eurobio Scientific.
- ◇ Once defrosted, spin down briefly the tubes before use.
- ◇ It is recommended to define three working areas: 1) Isolation of DNA, 2) Preparation of the reaction mix and 3) Amplification / Detection of amplified products.
- ◇ Use specific lab coat and gloves (powder free) in each working area.
- ◇ Pipettes, reagents and other materials must not cross each area.
- ◇ Specific caution is required to preserve the purity of the reagents and reaction mixtures.
- ◇ Appropriate methods of preparation/extraction of DNA to produce high quality DNA and to be followed by a real-time PCR application should be used, particularly avoiding all sources of DNase contamination.
- ◇ Always use RNase-free DNase-free filtered tips for micropipettes.
- ◇ Do not pipette with mouth and do not eat, drink or smoke in the area.
- ◇ Avoid sprays.

SAMPLES COLLECTION, TRANSPORT AND STORAGE

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

Table 3 :

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

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

PROCEDURE

I- DNA extraction

It is the user's responsibility that the extraction system used be compatible with downstream real time PCR technology. For this kit, we recommend to use extraction methods of DNA from plasma or serum for instance, and refer to manufacturer's instructions of the extraction kit.

In the EBX-017 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 and elution in 50 µl. If the CI-PCR is added to control the PCR, CI-PCR is added to the reaction mix (1 µl per PCR reaction). See real-time PCR protocol for details.

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

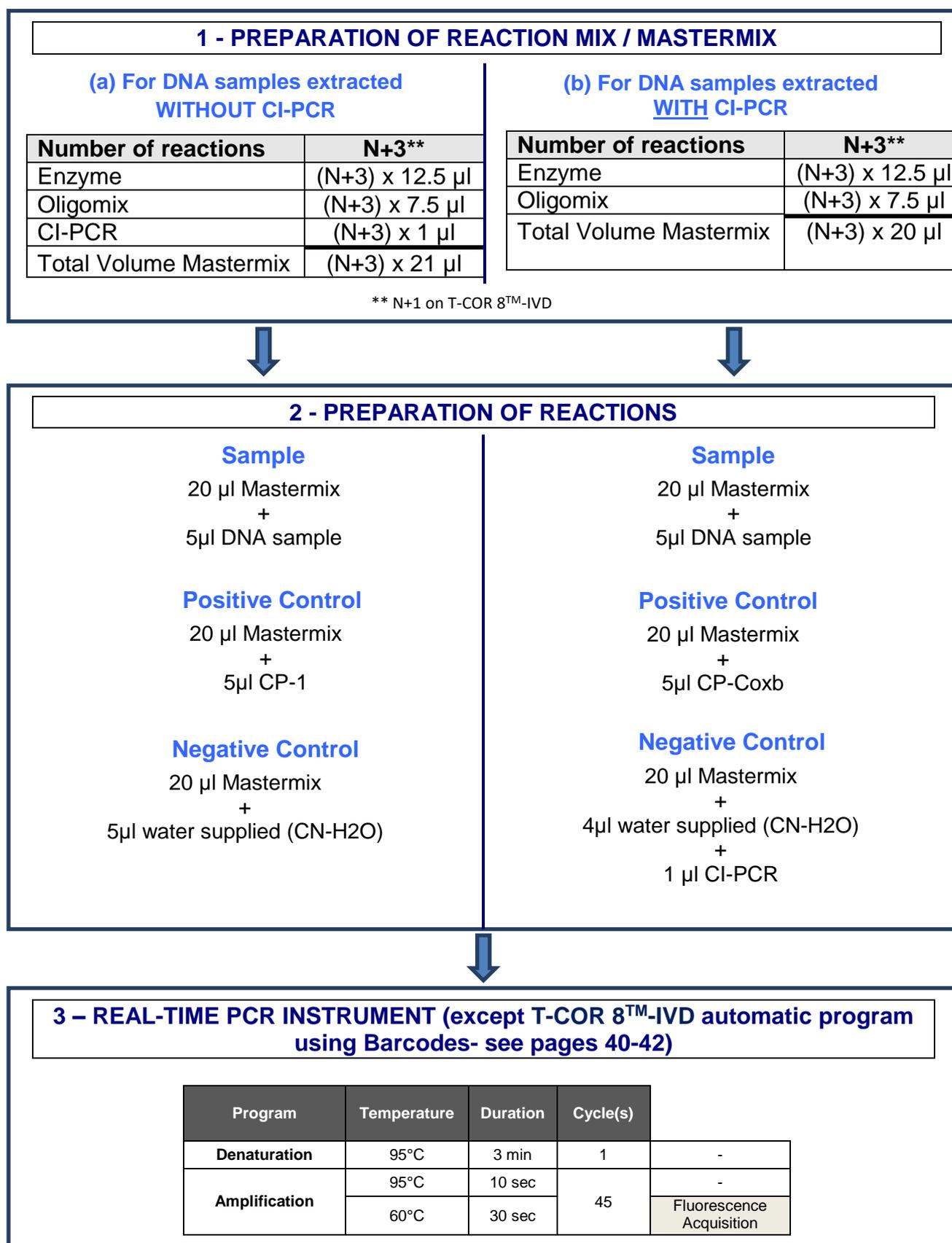
II- Real-time PCR Procedure

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

On T-COR 8TM-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-Coxb and CI-PCR tubes, and centrifuge briefly.
- 2) Prepare a Mastermix as below. N is the number of PCR reactions. Plan to prepare enough reagents for at least N+3 reactions** (Refer to part 1-(a) or 1-(b) of the previous diagram according to the condition).

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

Number of reactions	1	N+3**
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 Mastermix	21 µl*	(N+3) x 21 µl

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

Number of reactions	1	N+3**
Enzyme	12.5 µl	(N+3) x 12.5 µl
Oligomix	7.5 µl	(N+3) x 7.5 µl
Total Volume Mastermix	20 µl*	(N+3) x 20 µl

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

** For use on T-COR 8™-IVD, we recommend a Mastermix for N + 1 reactions for patient by patient use of the kit

- 3) Homogenize the Mastermix prepared in 2) and centrifuge briefly.
- 4) Distribute 20 µl of Mastermix* using a micropipette and filtered tips in each tube or well of microplate for real time PCR.
- 5) Add 5 µl of sample (DNA extracted or non-extracted serum).
- 6) In parallel test the following controls (see this specific point for T-COR 8™-IVD on pages 36-39):

- Positive control:
 - 20µl Mastermix + 5µl CP-Coxb

- Negative control:

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

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

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

- 20 µl Mastermix + 4 µl water supplied (CN-H2O) + 1 µl CI-PCR

- 7) Close immediately the tubes, or the plate with an adhesive film, to avoid all contamination.
- 8) Centrifuge briefly to collect all the PCR reaction mix at the bottom of the tubes or plate.
- 9) Program the real-time PCR instrument as follows (on T-COR 8™-IVD, no programming is needed thanks to the use of Barcodes- see pages 40-42):

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

Note 1: On LightCycler ® 480 systems (Roche), two optical systems are available: only "System II" is compliant with use of the kit.

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

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

Note 4: On CFX96™ (Bio-Rad), 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)

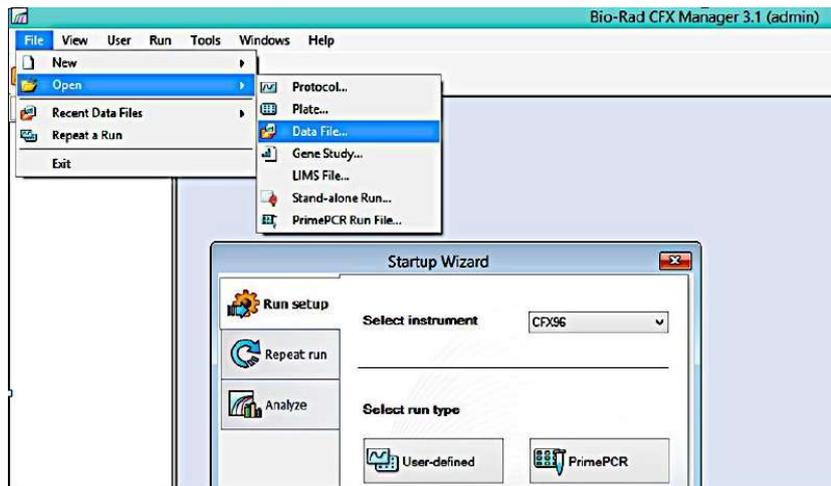
VALIDATION OF THE EXPERIMENT

The analysis of data post-acquisition on a CFX96™ PCR instrument (Bio-Rad) must be done with version 3.1 of CFX Manager Software (Bio-Rad). 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 (Bio-Rad).

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

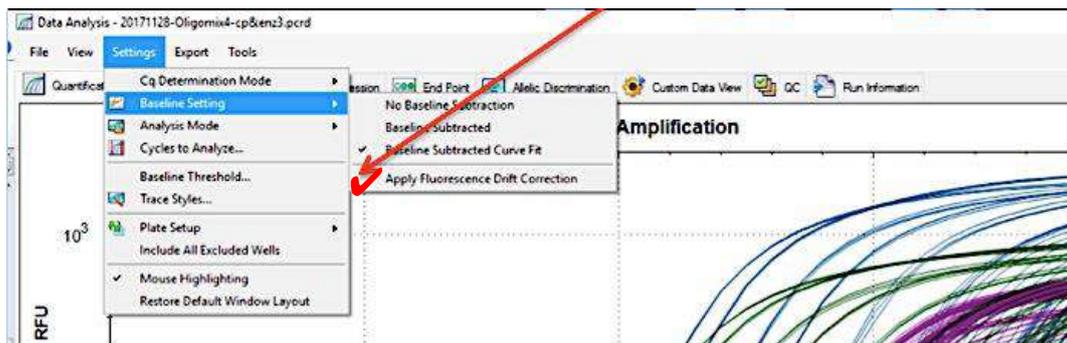


- Click on “File” and select “Open”, then “Data File”:



- 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 4). Otherwise, the experiment is invalid. 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	
HEX	Ct ≤ 28
Negative control	
HEX	Undetermined
CY5	Ct ≤ 30

On T-COR 8™-IVD, results are automatically interpreted thanks to the Barcodes.

DATA ANALYSIS AND INTERPRETATION

DNA extraction and PCR inhibition control in samples:

Two results can be obtained:

1/ the DNA extraction and PCR inhibition control (CI-PCR, channel Cy5) test is positive. The result can be validated.

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

For clinical samples, the following results are possible:



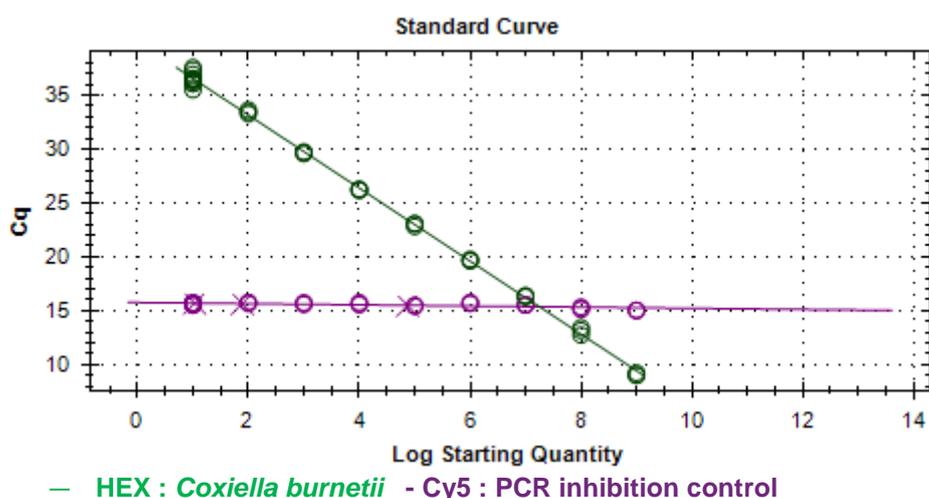
***Ct cut off for positivity of samples: HEX channel:
+ Positive => Ct ≤ 45**

PCR Signal		Presence of <i>Coxiella burnetii</i>	Test validity/comment
HEX	CY5		
+*	+	Yes	VALID
-	+	No	VALID
+*	-	Yes	VALID Possible inhibition of PCR or problem with extraction that does not prevent the detection of the <i>Coxiella burnetii</i> .
-	-	No possible interpretation	Inhibition of PCR or problem with extraction → dilute 5 x the sample; otherwise extract once again the sample

On T-COR 8TM-IVD, results are automatically interpreted thanks to the Barcodes.

PERFORMANCE ANALYSIS

Example of experiment performed on real-time PCR thermocycleur CFX96™ (Bio-Rad):



Analytical sensitivity: CP-Coxb: 10 copies/μl

Linearity for quantification: CP-Coxb: from 10 copies/μl to 10⁹ copies/μl

Variability of the signal

Studies of reproducibility of the kit EurobioPlex *Coxiella burnetii* EBX-017 have been achieved on plasmid Coxb (positive control of *Coxiella burnetii*) on CFX96™ (Bio-Rad). The table below indicates the average of the coefficient of variation (CV) depending on the concentration of the plasmid.

Coefficient of variation (%)	<i>Coxiella burnetii</i> (CHANNEL HEX)	CI-PCR (CHANNEL CY5)
REPRODUCIBILITY WITHIN-EXPERIMENT	0.90 %	0.45 %
REPRODUCIBILITY BETWEEN-EXPERIMENTS	3.08 %	3.92 %

Validation on clinical samples

The tests were performed on 103 DNA extracts from: 13 sera, 14 blood samples, 7 cardiac biopsies, 2 biopsies of the pharynx, 30 bone biopsies, 6 puncture fluids (pus), 12 lymph node biopsies, 14 negative culture supernatants, and 5 biopsies of aneurysm. These samples were previously tested by the routine laboratory technique from a French National Reference Center, and results were compared with the kit EurobioPlex *Coxiella burnetii* EBX-017 on CFX96™ (Bio-Rad).

The specificity and sensitivity of the EBX-017 kit have been evaluated on the following samples:

- 48 *Coxiella burnetii* POSITIVES
- 55 *Coxiella burnetii* NEGATIVES

		EBX-017 <i>Coxiella burnetii</i>		
		POSITIVE	NEGATIVE	TOTAL
Pretest	POSITIVE	48	0	48
	NEGATIVE	0	55	55
	TOTAL	48	55	103

Specificity : > 99 %

Moreover, no cross-reactivity has been observed with the bacteria detailed below:

- *Mycoplasma* (n=1)=0%
- *Bartonella spp* (n=2)=0%
- *Bartonella henselae* (n=2)=0%
- *Klebsiella kingae* (n=2)=0%
- *Mycobacterium tuberculosis* (n=1)=0%
- *Tropheryma whipplei* (n=1)=0%
- *Staphylococcus aureus* (n=2)=0%
- *Mycobacterium avium* (n=1)=0%
- *Staphylococcus oralis/mitis/sanguis* (n=1)=0%
- *Francisella tularensis* (n=1)=0%

Sensitivity : > 99 %

Concordance is > 99 %.

The tests were performed on CFX96™ (Bio-Rad).

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: Mix the sample by pipetting up and down, 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 inhibition.

Fluorophores

For all EBX, such as EBX-017, FAM/HEX/Texas Red/Cy5 combination is used. Do not consider FAM and Texas Red for results analysis.

Patients' Tests

With testing of negative and positive controls only when first opening the kit and with thawing 3 times maximum each tube.	24 reactions format
Maximum total number of patient tests	22 patients
Maximum total number of patient tests, one patient at a time in each run	12 patients

Use of Barcodes (available on pages 40-42)

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-017 Pos Ctrl),
- For the negative control (Barcode EBX-017 Neg Ctrl),
- For a patient sample (Barcode Assay: EBX-017)

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.

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 »: Invalid

« Neg Ctrl Valid »: Valid

« Pos Ctrl Fail »: Invalid

« Pos Ctrl Valid »: Valid

For patients status:

« Detected »: Positive → green box

« Not detected »: Negative → red box

« Invalid »: Invalid result -> retest → yellow box

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

- Example: tests of valid positive and negative controls (wells 7 and 8 respectively), invalid negative control (well 1), 1 negative sample (sample 1-well 2) indicated “Not Detected”, and 1 positive sample (sample 2-well 3) indicated “Detected”:

❖ On the instrument screen:

Interpretations	
1	Neg Ctrl EBX-017 Neg Ctrl Invalid - Neg Ctrl Fail
2	Sample 1 EBX-017 Not Detected - Coxb Neg
3	Sample 2 EBX-017 Detected: Coxiella burnetii
7	Pos Ctrl EBX-017 Pos Ctrl Detected: Pos Ctrl
8	Neg Ctrl EBX-017 Neg Ctrl Detected: Neg Ctrl

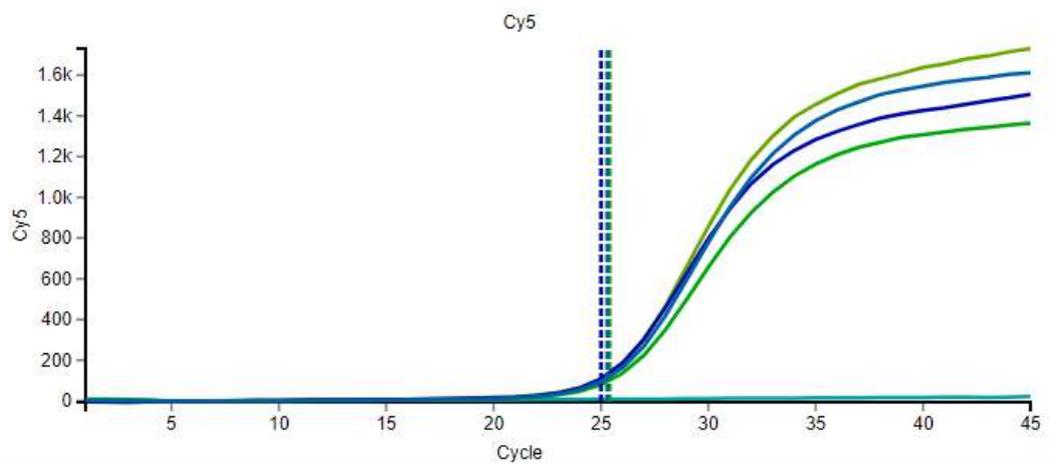
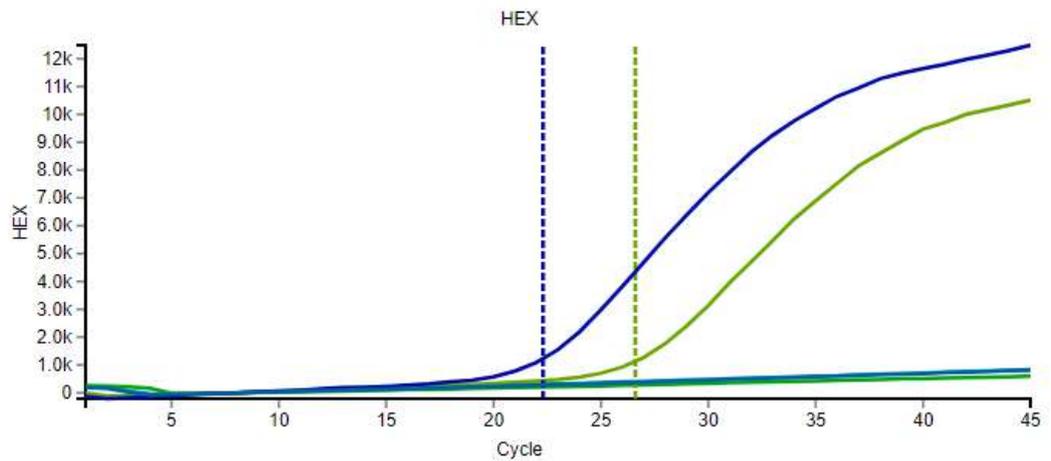
❖ On the report:

Summary								
Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5	Call	Note
1	Neg Ctrl	EBX-017 Neg Ctrl					Invalid	Neg Ctrl Fail
2	Sample 1	EBX-017				25.4	Not Detected	Coxb Neg
3	Sample 2	EBX-017		26.6		25.3	Detected • <i>Coxiella burnetii</i>	
7	Pos Ctrl	EBX-017 Pos Ctrl		22.3		25.0	Detected • Pos Ctrl	
8	Neg Ctrl	EBX-017 Neg Ctrl				25.3	Detected • Neg Ctrl	

Example of amplification curves:

Graphs

Legend	
Well 1	
Well 2	
Well 3	
Well 7	
Well 8	



Barcodes for EBX-017 for use on T-COR 8™-IVD

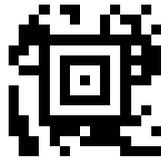
EBX-017 Pos Ctrl



EBX-017 Neg Ctrl



Assay: EBX-017



BIBLIOGRAPHY

De Bruin A. Detection of *Coxiella burnetii* by qPCR : a comparison of available assays. RIVM Letter report 330071002/2011. National Institute for Public Health and the Environment. Ministry of Health, Welfare and Sport.

Raoult D. Q fever : still a mysterious disease. QJM 2002;95:491-492

Delsing CE, Warris A, Bleeker-Rovers CP. Q fever: still more queries than answers. Adv Exp Med Biol. 2011;719:133-43. Review.

Le traitement de la fièvre Q chronique. Web site IFR48. Unité des Rickettsies. Centre National de Référence (Aix-Marseille Université. URMITE 7278). Marseille. France.

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
	CE labeled product
	In vitro Diagnostic
	Instructions for use



eurobio
SCIENTIFIC

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