

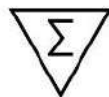
EurobioPlex

Méningite bactérienne communautaire

PCR EN TEMPS REEL

Pour la PCR **qualitative** en temps réel

REF **EBX-020-36**
EBX-020-09



9 réactions
36 réactions



Version 5.00 du 03/10/2019

Validé sur :

- CFX96™ Real Time PCR detection system (Biorad) avec analyse sur CFX Manager version 3.1 (Biorad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche) avec analyse sur LightCycler® 480 software v1.5 (Roche)
- Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) avec analyse sur 7500 Software v2
- 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	3
Introduction	3
Principe de la détection	4
Description et contenu du kit	5
Conservation	7
Précautions et notes	7
Collecte des échantillons, transport et conservation	8
Procédure	8
I-Extraction d'ADN	8
II-Réalisation de la PCR en temps réel.....	9
II-1/ Schéma de la procédure.....	10
II-2/ Procédure détaillée	11
Validation de l'expérimentation	12
Analyse des données et interprétation	14
Analyse des performances	16
Particularités liées à l'instrument de PCR en temps réel T-COR 8®-IVD	19
Codes-Barres pour EBX-020 sur T-COR 8®-IVD	23
Bibliographie	29
Elimination des déchets	29
Symboles	30

UTILISATION

Le test EBX-020 est un test d'amplification par réaction en chaîne de la polymérase (PCR) en temps réel, conçu pour la détection qualitative, dans du liquide céphalo-rachidien (LCR), de la présence ou l'absence des trois bactéries les plus fréquemment impliquées dans l'étiologie de la méningite bactérienne communautaire (MBcom) : *Neisseria meningitidis* (méningocoque), *Streptococcus pneumoniae* (pneumocoque), et *Haemophilus influenzae*. La PCR temps-réel **peut être directement réalisée sur des échantillons de LCR non extraits**, ce qui permet de répondre à l'urgence diagnostique de cette pathologie, **ou sur de l'ADN extrait**. Le test est indiqué pour poser un diagnostic de présomption d'infection chez l'homme, ou compléter un diagnostic avéré ou indéterminé par les autres techniques (diagnostic clinique avec évaluation sémiologique de signes infectieux et/ou évocateurs d'une atteinte méningée, diagnostic bactériologique par examen du LCR et mise en culture).

L'Eurobioplex EBX-020 a été validé sur le type de prélèvement suivant:

- Liquide céphalorachidien (LCR)

INTRODUCTION

La méningite est une inflammation des enveloppes du système nerveux central. Elle peut avoir une origine bactérienne ou virale, et de nombreux pathogènes peuvent en être la cause.

La méningite bactérienne concerne 22 cas par million d'habitants soit environ 1400 cas/an en France. Deux pics d'incidence sont observés : l'un chez l'enfant de moins d'un an et l'autre chez l'adulte de plus de 60 ans. La méningite bactérienne est rare (20% des cas) mais est extrêmement grave comparée à la méningite virale. Une transmission materno-fœtale est le plus souvent à l'origine de l'infection chez le nouveau-né. Quant à la méningite bactérienne chez l'adulte, une part non négligeable serait due à des infections nosocomiales. Nous distinguons dès lors usuellement la méningite bactérienne en trois sous-catégories : la méningite bactérienne communautaire, la méningite bactérienne materno-fœtale, et la méningite bactérienne nosocomiale.

Au niveau mondial, les méningites bactériennes communautaires sont responsables de 170 000 décès annuels (OMS), et plus d'un million de personnes seraient atteintes. Les caractéristiques épidémiologiques sont variables selon les zones climatiques et pays. Les épidémies liées au méningocoque sont majoritairement retrouvées en Afrique sub-saharienne au niveau de la bande du Sahel : on parle de « ceinture méningitique ». Les zones endémiques se trouvent dans certains pays d'Amérique du Sud (Brésil, Equateur), d'Afrique (Sahara occidental, Maroc, Egypte), et d'Asie (Arabie Saoudite, Inde et Chine). Tous les pays sont concernés pour les zones endémosporaires. La mortalité est particulièrement élevée dans les pays en voie de développement. 20% des patients atteints de méningite bactérienne communautaire décèdent et 30% sont porteurs de séquelles. Le pronostic vital est rapidement engagé si l'antibiothérapie ciblée tarde. Que la méningite bactérienne soit avérée ou suspectée, elle constitue ainsi une urgence diagnostique et thérapeutique absolue.

Il existe quatre sources principales de surveillance en France : 1) le réseau EPIBAC/InVS soit environ 300 laboratoires hospitaliers, 2) l'observatoire national des

méningites bactériennes de l'enfant : GPIP-Activ qui comprend environ 250 services de pédiatrie et 150 laboratoires de microbiologie, 3) les observatoires régionaux à pneumocoque, 4) les centres nationaux de référence (CNR).

Diagnostic :

Il n'y a pas d'orientation diagnostique possible par le clinicien entre méningite virale et bactérienne, les symptômes sont communs: fièvre, maux de tête, raideur dans la nuque, vomissements, limitation de l'élévation des membres inférieurs, flexion involontaire des membres inférieurs à la flexion forcée de la nuque. Les portes d'entrées ORL sont les plus fréquentes. Seul l'examen cyto-bactériologique du liquide céphalo-rachidien (LCR) permet de poser le diagnostic. La mise en culture du LCR est systématique et ce, dans les meilleurs délais. Une fraction du prélèvement de LCR est conservée séparément en prévision de la recherche microbiologique par amplification génique (PCR). La formule leucocytaire, la coloration de GRAM, et la détection des antigènes solubles peuvent orienter le diagnostic mais la sensibilité de ces techniques est fortement altérée si le patient est d'ores et déjà traité par antibiothérapie.

Les principales bactéries impliquées dans la méningite bactérienne communautaire (chez l'adulte) sont, par ordre de fréquence, *Streptococcus pneumoniae* (pneumocoque), *Neisseria meningitidis* (méningocoque, de déclaration obligatoire), et *Haemophilus influenzae*. Le pneumocoque et le méningocoque sont à l'origine de plus de 80% des cas. Le diagnostic rapide et ciblé par amplification génique en temps réel de l'ADN des pathogènes bactériens responsables de méningite bactérienne communautaire est la technique présentant la meilleure sensibilité et spécificité.

PRINCIPE DE LA DETECTION

L'Eurobioplex EBX-020 est un test d'amplification des acides nucléiques ADN bactériens de *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*, 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 directement sur du LCR ou à partir de l'ADN extrait de l'échantillon au moyen d'une double réaction dans deux puits/tubes.

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 disponibilité de l'ADN au sein du LCR, ou une mauvaise extraction, et/ou à la présence d'inhibiteurs de PCR en trop grande quantité.

Il s'agit d'un kit composé de deux oligomix différents permettant chacun de détecter les différents pathogènes indiqués ci-dessous :

Oligomix 1 : *Neisseria meningitidis* (NM), 2 gènes + contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (CI-PCR),

Oligomix 2 : *Streptococcus pneumoniae* (SP) et *Haemophilus influenzae* (HI) + contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (CI-PCR).

Pour le premier triplex, deux gènes de NM sont respectivement détectés à l'aide d'une sonde marquée FAM et HEX. Pour le second triplex, l'ADN de SP et HI est respectivement détecté à l'aide d'une sonde marquée FAM et HEX. Pour les deux triplex, 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-020 est prêt à l'emploi pour la détection spécifique de *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, et *Haemophilus influenzae*.

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 : Pathogènes détectés par chaque oligomix

Cible	Oligomix 1	Oligomix 2	Fluorophore
<i>Neisseria meningitidis</i> – Gène 1	X	-	FAM
<i>Neisseria meningitidis</i> – Gène 2	X	-	HEX
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	X	FAM
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	X	HEX
Contrôle d'inhibition de PCR (CI-PCR)	X	X	Cy5

Longueurs d'ondes d'excitation/émission pour FAM (495/515 nm), HEX (535/555 nm), et CY5 (647/667 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 **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-Cy5 (465-510, 533-580, 618-660).

Tableau 2 :

Couleur de Bouchon	Contenu du kit	9 réactions	36 réactions	Reconstitution
Rouge	Enzyme	4 x 100 µl	16 x 100 µl	Prêt à l'emploi
Transparent	Oligomix 1	2 x 60 µl	8 x 60 µl	Prêt à l'emploi
Vert	Oligomix 2	2 x 60 µl	8 x 60 µl	Prêt à l'emploi
Bleu	Eau = contrôle négatif (CN-H2O)	2 x 500 µl	8 x 500 µl	Prêt à l'emploi
Jaune	Contrôle Positif CP-MBcom1	2 x 15 µl	8 x 15 µl	Prêt à l'emploi
Orange	Contrôle Positif CP-MBcom2	2 x 15 µl	8 x 15 µl	Prêt à l'emploi
Blanc	Contrôle d'inhibition de PCR (CI-PCR)	2 x 50 µl	8 x 50 µl	Prêt à l'emploi

Oligomix 1 : contient les amorces et sondes du 1^{er} triplex (2 gènes de NM, et CI-PCR).

Oligomix 2 : contient les amorces et sondes du 2nd triplex (SP, HI, et CI-PCR).

CP-MBcom1 : contrôle positif Méningite bactérienne communautaire pour 2 gènes de NM

CP-MBcom2 : contrôle positif Méningite bactérienne communautaire pour SP et HI

Tableau 3 : Nombre de tests patients pour les formats 9 et 36 réactions sur tous les instruments, sauf le T-COR 8®-IVD (voir page 19)

	9 réactions	36 réactions
* Nombre de tests patients possibles patient par patient avec décongélation/congélation 3 fois maximum	6 patients	24 patients
* Nombre maximum de tests patients possibles sur 1 run sans recongélation	7 patients	34 patients

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) Eventuelle 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 les 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 (facultatif sur LCR) 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 ÉCHANTILLONS, TRANSPORT ET CONSERVATION

- Collecter les échantillons dans des tubes stériles
- Il revient à l'utilisateur de maîtriser ses propres conditions de collecte, transport, conservation des échantillons, et si une extraction est réalisée alors utiliser des systèmes adaptés afin de produire des ADN de qualité.
- La ponction lombaire est réalisée après une aseptie rigoureuse de la zone de ponction, et une anesthésie locale peut être réalisée. Le LCR est prélevé par ponction au niveau des vertèbres lombaires à l'aide d'une aiguille à ponction lombaire, au niveau de l'interspace L3-L4, L4-L5 ou L5-S1. Une fois prélevé, le LCR est amené immédiatement au laboratoire, pour y être analysé.
- Un LCR démontrant la présence importante de sang peut également donner un résultat négatif. Dans ce cas, il peut être judicieux de réaliser le test après extraction de l'ADN et non pas sur LCR direct. Cela peut également être fait dans un deuxième temps, si le résultat est négatif sur LCR direct.
- Il est recommandé que les échantillons soient conservés selon les recommandations de stockage des échantillons (Tableau 4).

Tableau 4 :

Recommandations de stockage maximum des échantillons	
Température ambiante	2 h
4°C	16 h
-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

Cette partie est facultative car ce kit est utilisable directement sur du LCR (ADN bactérien non extrait).

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 à partir d'échantillons de LCR, et de se référer aux instructions du fournisseur du kit d'extraction utilisé.

Dans le kit EBX-020, le CI-PCR sur le canal CY5 peut être ajouté dans le mastermix dans le cas d'un test sur LCR direct, ou avant l'extraction si une extraction est réalisée. Il permet de s'assurer qu'un résultat négatif ne peut être dû à la présence d'inhibiteurs de PCR en trop grande quantité pour valider le test, ou éventuellement à un problème d'extraction si cette méthode a été utilisée.

Si une extraction est réalisée, nous recommandons l'ajout de 10µl de CI-PCR au prélèvement biologique 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 ou dans le cas d'un test sur LCR direct, il est ajouté au mélange réactionnel (1 microlitre par réaction de PCR). Voir Protocole de PCR en temps réel pour plus de détails.

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

II- Réalisation de la PCR en temps réel

Remarque générale:

Les contrôles positifs 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 les contrôles positifs, CP-MBcom1 et CP-MBcom2 selon le triplex utilisé, ainsi que les contrôles négatifs (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 MELANGES REACTIONNELS / MASTERMIX

(a) Pour LCR direct
ou pour un échantillon ADN extrait sans CI-PCR

Nombre de réaction(s)	N+3
Enzyme	(N+3) x 12.5 µl
Oligomix 1 ou 2	(N+3) x 7.5 µl
CI-PCR	(N+3) x 1 µl
Volume total Mastermix 1 ou 2	(N+3) x 21 µl

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

Nombre de réaction(s)	N+3
Enzyme	(N+3) x 12.5 µl
Oligomix 1 ou 2	(N+3) x 7.5 µl
Volume total Mastermix 1 ou 2	(N+3) x 20 µl



2 - PREPARATION DES REACTIONS

Echantillon

20 µl de Mastermix 1 ou 2
+
5µl LCR ou ADN extrait

Contrôles positifs

20 µl de Mastermix 1 + 5µl CP-MBcom1 20 µl de Mastermix 2 + 5µl de CP-MBcom2

Contrôles Négatifs

20 µl de Mastermix 1 ou 2
+
5µl Eau biologie moléculaire (CN-H₂O)

Echantillon

20 µl de Mastermix 1 ou 2
+
5µl LCR ou ADN extrait

Contrôles positifs

20 µl de Mastermix 1 + 5µl CP-MBcom1 20 µl de Mastermix 2 + 5µl de CP-MBcom2

Contrôles Négatifs

20 µl de Mastermix 1 ou 2
+
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.19 à 28)

Programme	Température	Durée	Cycle(s)	
Chauffage	95°C	10 min	1	
Dénaturation/Activation	95°C	3 min	1	
Amplification	95°C	10 sec	45	Acquisition de fluorescence
	60°C	30 sec		

II-2/ Procédure détaillée : Procéder de façon identique pour la détection de NM avec l'oligomix 1, et pour la détection de SP et HI avec l'oligomix 2.

- 1) Homogénéiser le tube d'Enzyme, et vortexer Oligomix 1 et 2, CP-MBcom1 et CP-MBcom2, et CI-PCR, puis centrifuger.
- 2) Préparer les Mastermix 1 et 2 comme ci-dessous, N étant le nombre de réactions (incluant les contrôles positif et négatif), prévoir la quantité de Mastermix pour N+2 réactions (jusqu'à 3 patients testés) à N+3 réactions (au-delà de 3 patients testés).
(Se référer à la partie 1-a ou 1-b du schéma précédent selon la condition).

Cas (a) : Pour LCR direct, ou pour un échantillon ADN extrait SANS CI-PCR

Nombre de réaction(s)	1	N+3	Exemple pour 3 patients N = 7
Enzyme	12.5 µl	(N+3) x 12.5 µl	87.5 µl
Oligomix 1 ou 2	7.5 µl	(N+3) x 7.5 µl	52.5 µl
CI-PCR	1 µl	(N+3) x 1 µl	7 µl
Volume total Mastermix 1 ou 2	21 µl*	(N+3) x 21 µl	147 µl

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

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

Nombre de réaction(s)	1	N+3	Exemple pour 3 patients N = 7
Enzyme	12.5 µl	(N+3) x 12.5 µl	87.5 µl
Oligomix 1 ou 2	7.5 µl	(N+3) x 7.5 µl	52.5 µl
Volume total Mastermix 1 ou 2	20 µl*	(N+3) x 20 µl	140 µl

- 3) Homogénéiser les Mastermix préparés en 2) et centrifuger brièvement.
- 4) Distribuer 20 µL de Mastermix* 1 ou 2 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 de LCR (ou ADN extrait).
- 6) En parallèle réaliser les contrôles suivants (voir ce point spécifique pour T-COR 8®-IVD page 19 à 28) :

- Contrôles positifs :

20 µl de Mastermix 1 + 5 µl de contrôle positif CP-MBcom1

20 µl de Mastermix 2 + 5 µl de contrôle positif CP-MBcom2

- Contrôles négatifs :

Cas (a) : Pour LCR direct, ou pour un échantillon ADN extrait SANS CI-PCR

▪ 20µL de Mastermix 1 + 5µL d'eau fournie (CN-H2O)

▪ 20µL de Mastermix 2 + 5µL d'eau fournie (CN-H2O)

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

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

▪ 20µL de Mastermix 2 + 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 page 19 à 28).

Programme	Température	Durée	Cycle(s)	
Chauffage	95°C	10 min	1	
Dénaturation/Activation	95°C	3 min	1	
Amplification	95°C	10 sec	45	Acquisition de fluorescence
	60°C	30 sec		

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

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

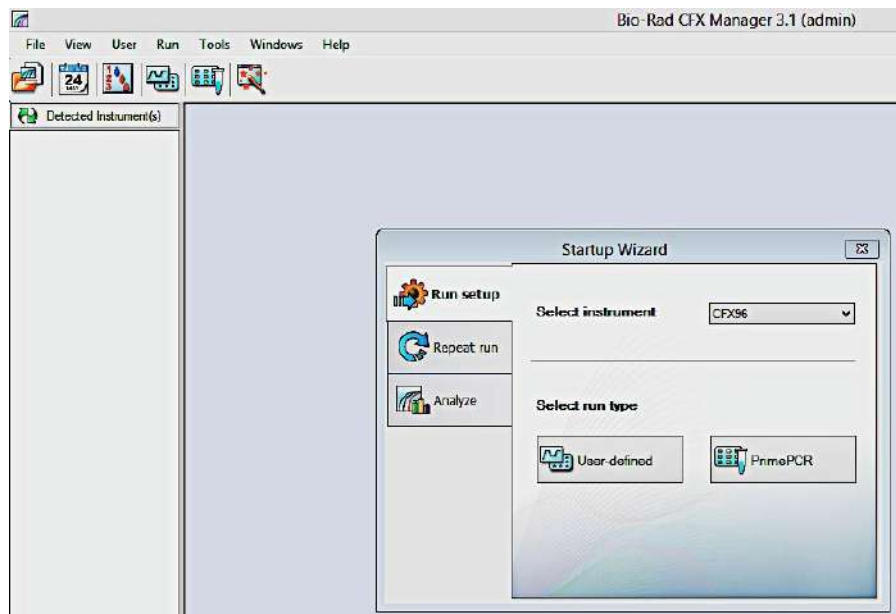
Note 3 : Sur Rotorgene™, calibrer le signal en cliquant sur « GAIN OPTIMISATION ».

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

VALIDATION DE L'EXPERIMENTATION

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

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



- Cliquer sur File et sélectionner Open puis Data File.



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

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



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

Pour que le dosage soit valide, les résultats pour les contrôles doivent être les suivants (Tableau 5) ; 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 5 :

Contrôles Positifs		
Canal	CP-MBcom1	CP-MBcom2
FAM	Ct ≤ 22	Ct ≤ 21
HEX	Ct ≤ 22	Ct ≤ 21
Contrôles Négatifs		
Canal	Contrôle Négatif Mastermix 1	Contrôle Négatif Mastermix 2
FAM	Ct non déterminé	Ct non déterminé
HEX	Ct non déterminé	Ct non déterminé
CY5	Ct ≤ 35	Ct ≤ 35

CP-MBcom1 et 2: Contrôles positifs de la méningite bactérienne communautaire (Triplex1 et triplex2)

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 bactérien au sein du LCR n'est pas disponible, soit l'ADN n'a pas été extrait (dans le cas d'une extraction), soit la PCR n'a pas bien fonctionné, soit la présence d'inhibiteurs de PCR inhibe la réaction de PCR. Un LCR présentant la présence importante de sang peut également donner un résultat négatif.

Il est alors recommandé de réaliser une extraction (si initialement testée sur LCR direct), ou de répéter l'extraction, ou de diluer l'échantillon sauf si un signal spécifique apparaît dans le canal FAM ou HEX.

OLIGOMIX 1 :

Pour les échantillons cliniques testés avec l'Oligomix 1, les résultats suivants sont possibles :

***Seuil de Ct pour la positivité des échantillons, canaux FAM (NM gène 1) et HEX (NM gène 2) : + Positif => Ct ≤ 45**

Signal PCR			Présence de NM	Validité du test/commentaire
FAM	HEX	CY5		
+	+	+	Oui	valide
+	-	+	Oui	valide
-	+	+	Oui	valide
-	-	+	Non	valide

+	-	-	Oui	Valide : possible inhibition de PCR ou problème d'extraction si une extraction a été réalisée, qui n'empêche pas la détection de la bactérie
-	+	-	Oui	Valide : possible inhibition de PCR ou problème d'extraction si une extraction a été réalisée, qui n'empêche pas la détection de la bactérie
-	-	-	Non interprétable	Non valide : possible inhibition de PCR ou problème d'extraction si une extraction a été réalisée -diluer 5 x l'échantillon ; si même résultat extraire l'échantillon

NM : *Neisseria meningitidis*

OLIGOMIX 2 :

Pour les échantillons cliniques testés avec l'Oligomix 2, les résultats suivants sont possibles :

***Seuil de Ct pour la positivité des échantillons, canaux FAM (SP) et HEX (HI) :**

+ Positif => Ct ≤ 45

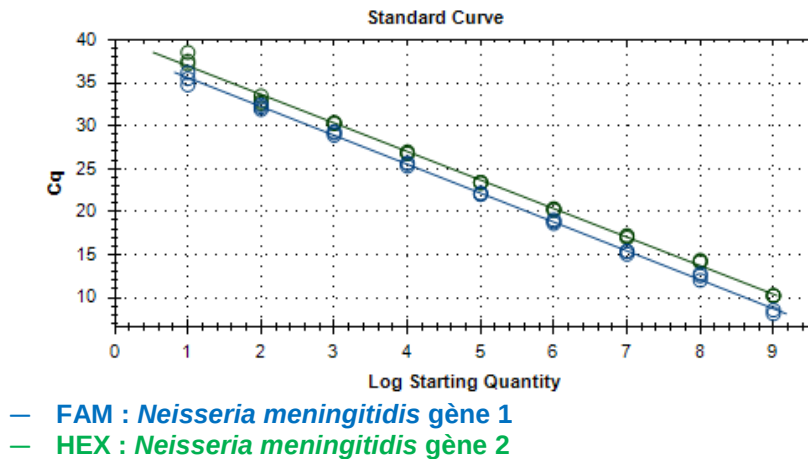
Signal PCR			Présence de SP	Présence de HI	Validité du test/commentaire
FAM	HEX	CY5			
+	+	+	Oui	Oui	valide
+	-	+	Oui	Non	valide
-	+	+	Non	Oui	valide
-	-	+	Non	Non	valide
+	-	-	Oui	Non interprétable	Valide pour SP : possible inhibition de PCR ou problème d'extraction si une extraction a été réalisée, qui n'empêche pas la détection de SP. Non valide pour HI : possible inhibition de PCR ou problème d'extraction si une extraction a été réalisée, qui empêcherait la détection de HI -diluer 5x l'échantillon; si même résultat extraire l'échantillon
-	+	-	Non interprétable	Oui	Valide pour HI : possible inhibition de PCR ou problème d'extraction si une extraction a été réalisée, qui n'empêche pas la détection de HI. Non valide pour SP : possible inhibition de PCR ou problème d'extraction si une extraction a été réalisée, qui empêcherait la détection de SP -diluer 5x l'échantillon; si même résultat extraire l'échantillon
-	-	-	Non interprétable	Non interprétable	Non valide : possible inhibition de PCR ou problème d'extraction si une extraction a été réalisée- diluer 5x l'échantillon ; si même résultat extraire l'échantillon

SP : *Streptococcus pneumoniae* ; HI : *Haemophilus influenzae*

ANALYSE DES PERFORMANCES

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

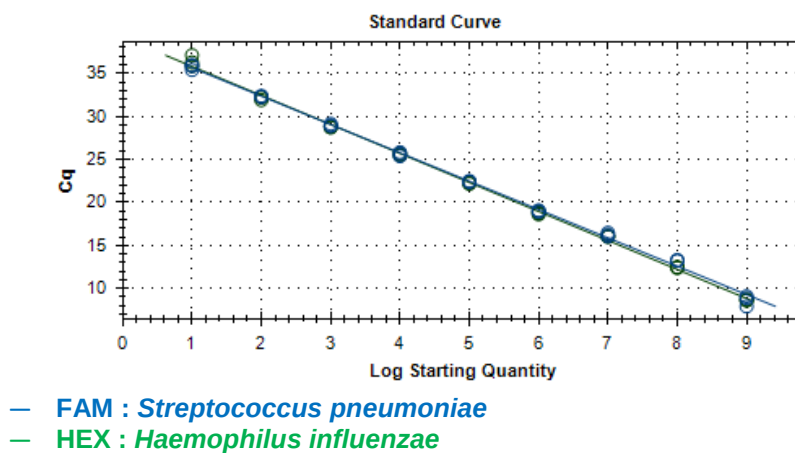
- Avec l'Oligomix 1:



Sensibilité analytique: CP-MBcom1: 10 copies/microl

Linéarité de quantification : CP-MBcom1: 10 copies/microl à 10^9 copies/microl

- Avec l'Oligomix 2 :



Sensibilité analytique: CP-MBcom2: 10 copies/microl

Linéarité de quantification : CP-MBcom2: 10 copies/microl à 10^9 copies/microl

Coefficient de corrélation et efficacité

Méningite communautaire EBX-020 Triplex 1	Méningite communautaire EBX-020 Triplex 2
Bactéries et abréviations: <i>Neisseria meningitidis</i> (NM) 2 gènes	Bactéries et abréviations: <i>Streptococcus pneumoniae</i> (SP) et <i>Haemophilus influenzae</i> (HI)
Efficacité FAM: NM gène 1: 98,2 % HEX: NM gène 2: 101,9 % Coefficient de corrélation FAM: NM gène 1: 0.996 HEX: NM gène 2: 0.995	Efficacité FAM: SP: 100,3 % HEX: HI: 96,3 % Coefficient de corrélation FAM: SP: 0.993 HEX: HI: 0.994

Variabilité du signal

EBX-020		INTRA-experience	INTER-experiences
	Bactéries cibles	CV %	CV %
Triplex 1	<i>Neisseria meningitidis</i> Gène 1 (FAM)	0.98	1.87
	<i>Neisseria meningitidis</i> Gène 2 (HEX)	0.61	2.01
Triplex 2	<i>Strepto. pneumoniae</i> (FAM)	0.62	2.65
	<i>Haemophilus influenzae</i> (HEX)	0.54	3.52

CV : Coefficient de Variation

Validation sur les échantillons cliniques

La spécificité et la sensibilité ont été analysées à partir d'échantillons de LCR (ADN non extraits) et de souches bactériennes (HI positives diluées dans des LCR HI négatifs) prétestés par le laboratoire de référence.

TRIPLEX 1 : EBX-020Com1

1/ spécificité analytique

Neisseria meningitidis gène 1 : 95.5 % *

Neisseria meningitidis gène 2 : 95.5 % *

2/ sensibilité analytique

Neisseria meningitidis gène 1 : > 98 %

Neisseria meningitidis gène 2 : > 98 %

3/ concordance analytique

Neisseria meningitidis gène 1 : 96 % (n = 50)

Neisseria meningitidis gène 2 : 96 % (n = 50)

TRIPLEX 2 : EBX-020Com2

1/ spécificité analytique

Streptococcus pneumoniae : 95.1 % *

Haemophilus influenzae : > 98 %

2/ sensibilité analytique

Streptococcus pneumoniae : > 98 %

Haemophilus influenzae : > 98 %

3/ concordance analytique

Streptococcus pneumoniae : 95.7 % (n = 46)

Haemophilus influenzae : > 98 % (n = 14)

* A noter que les échantillons non détectés par la méthode de référence et détectés par la méthode Eurobio sont à la limite de détection. Il est probable que l'Eurobioplex EBX-020 soit plus sensible.

Etude des interférents éventuels : aucune interférence

1 échantillon de chaque bactérie ci-dessous a été testé.

Pas de cross réactivité du Triplex 1 avec :

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Staphylococcus aureus*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Listeria monocytogenes*
- *Escherichia coli*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Bartonella spp*
- *Coxiella burnetii*
- *Mycobacterium avium*
- *Streptococcus oralis mitis sanguis*
- *Francisella tularensis*
- *Mycoplasma*
- *Klebsiella kingae*
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Tropheryma whipplei*

Pas de cross réactivité du Triplex 2 avec :

- *Neisseria meningitidis*
- *Staphylococcus aureus*
- *Listeria monocytogenes*
- *Escherichia coli*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Bartonella spp*
- *Coxiella burnetii*
- *Mycobacterium avium*
- *Mycoplasma*
- *Klebsiella kingae*
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Tropheryma whipplei*

Les tests ont été réalisés sur CFX96.

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 les contrôles positifs et négatifs 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.

Tests patients

Chaque oligomix nécessite l'utilisation d'un puits. Dans le cas de l'EBX-020, 2 puits sont nécessaires par échantillon pour tester les 2 oligomix disponibles.

<i>Avec validation des contrôles Positifs et négatifs une seule fois lors de la première utilisation</i>	9 réactions	36 réactions
Nombre de tests patients possible patient par patient avec décongélation/congélation 3 fois maximum	7 patients	34 patients

Fluorophores

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

Pour tous les EBX, dont EBX-020, la combinaison FAM/HEX/Texas Red/Cy5 est celle choisie. Si certains canaux ne sont pas utilisés dans le kit (cas du Texas Red pour l'EBX-020), ne pas en tenir compte lors de l'analyse des résultats.

Utilisation des Codes-Barres (disponibles en page 23 à 28)

1- Sélectionner Menu > Nouvelle Analyse/New Run

2- Sélectionner Code-barre/Barcode,

3- Scanner sur la droite de l'appareil le Code-Barre désiré :

- soit pour le contrôle positif 1 ou 2 (Code-barre EBX-020 CP1 ou EBX-020 CP2),
- soit pour le contrôle négatif 1 ou 2 (Code-barre EBX-020 CN1 ou EBX-020 CN2),
- soit pour un échantillon testé avec oligomix 1 (Code-Barre EBX-020 olig1) ou oligomix 2 (Code-Barre EBX-020 olig2)

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 de la 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 sur la machine.

Une analyse pour les contrôles négatifs et positifs, 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 les contrôles positifs et négatifs, les résultats suivants sont possibles:

« Neg Ctrl 1 (pour oligomix 1) ou Neg Ctrl 2 (pour oligomix 2) Fail » : Non valide

« Neg Ctrl 1 (pour oligomix 1) ou Neg Ctrl 2 (pour oligomix 2) Valid » : Valide

« Pos Ctrl 1 (pour oligomix 1) ou Pos Ctrl 2 (pour oligomix 2) Fail » : Non valide

« Pos Ctrl 1 (pour oligomix 1) ou Pos Ctrl 2 (pour oligomix 2) 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

* Pour chaque oligomix, les bactéries ou gènes détectés ou non détectés sont spécifiés.

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 négatifs et positifs valides, pour la limite de détection (LOD) indiquée « Detected » avec la cible correspondante, et pour un échantillon négatif dans les 2 oligomix, indiqué « Not Detected » avec les cibles correspondantes:

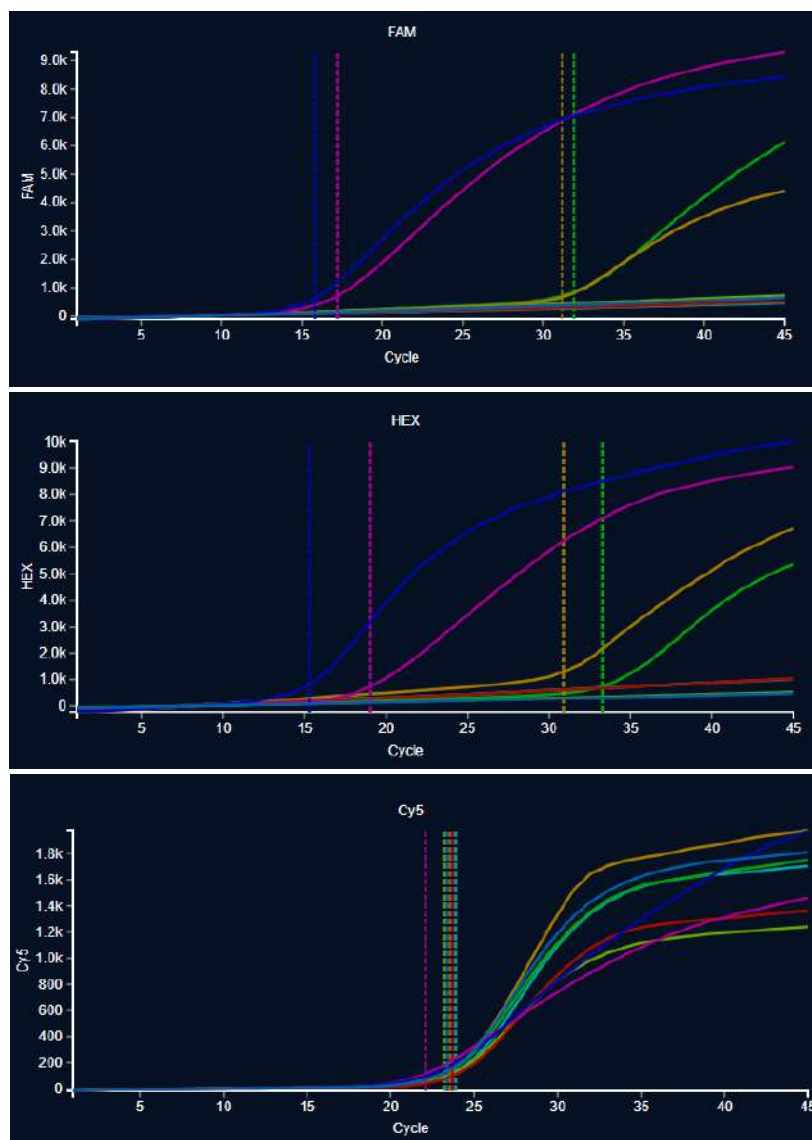
❖ Sur l'écran de l'instrument :

Interpretations		
1	CN2	EBX-020 CN2
	Detected: Neg Ctrl 2 Valid	
2	LOD OLIGO1	EBX-020 olig1
	Detected: N. men gene 2, N. men gene 1	
3	Sample 1	EBX-020 olig1
	Not Detected - N. men	
4	LOD OLIGO2	EBX-020 olig2
	Detected: H. inf, S. pneumo	
5	Sample 1	EBX-020 olig2
	Not Detected - S. pneumo, H. inf	
6	CP1	EBX-020 CP1
	Detected: Pos Ctrl 1 Valid	
7	CP2	EBX-020 CP2
	Detected: Pos Ctrl 2 Valid	
8	CN1	EBX-020 CN1
	Detected: Neg Ctrl 1 Valid	

❖ Dans le rapport :

Summary							
Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5	Call
1	CN2	EBX-020 CN2				23.9	Detected • Neg Ctrl 2 Valid
2	LOD OLIGO1	EBX-020 olig1	31.9	33.3		23.4	Detected • N. men gene 2 • N. men gene 1
3	Sample 1	EBX-020 olig1				23.2	Not Detected
4	LOD OLIGO2	EBX-020 olig2	31.2	30.9		23.6	Detected • H. inf • S. pneumo
5	Sample 1	EBX-020 olig2				23.7	Not Detected
6	CP1	EBX-020 CP1	17.2	19.0		22.1	Detected • Pos Ctrl 1 Valid
7	CP2	EBX-020 CP2	15.8	15.3		23.4	Detected • Pos Ctrl 2 Valid
8	CN1	EBX-020 CN1				23.4	Detected • Neg Ctrl 1 Valid
							Note
							N. men
							S. pneumo, H. inf

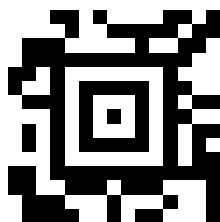
Exemple de courbes d'amplification



Codes-Barres sur T-COR8®-IVD pour EBX-020

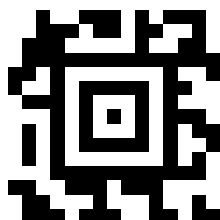
EBX-020 CN1

**Eau = contrôle négatif (CN-H₂O)
(à tester avec oligomix 1)**



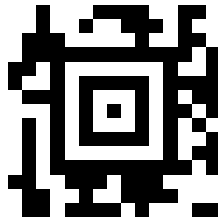
EBX-020 CN2

**Eau = contrôle négatif (CN-H₂O)
(à tester avec oligomix 2)**



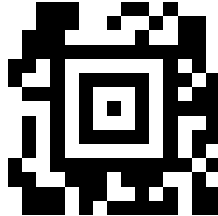
EBX-020 CP1

**Contrôle Positif CP-MBcom1
(à tester avec oligomix 1)**



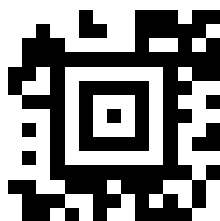
EBX-020 CP2

**Contrôle Positif CP-MBcom2
(à tester avec oligomix 2)**



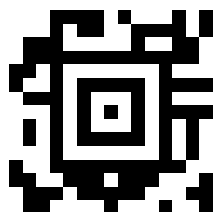
EBX-020 olig1

(pour test avec oligomix 1)



EBX-020 olig2

(pour test avec oligomix 2)



BIBLIOGRAPHIE

Van de Beek et al (2006). Community-acquired bacterial meningitis in adults in the Netherlands, 2006–14: a prospective cohort study. In *The Lancet Infectious Diseases*. March 2016 16(3):339-347.

Cohen-Bacrie S, Ninove L, Nougairé`de A, Charrel R, Richet H, et al. (2011) Revolutionizing Clinical Microbiology Laboratory Organization in Hospitals with In Situ Point-of-Care. PLoS ONE 6(7): e22403.

Hotomi M, Togawa A, Kono M, Sugita G, Sugita R, et al. (2013) An Application of Outer Membrane Protein P6-Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Haemophilus influenzae in Middle Ear Fluids and Nasopharyngeal Secretions. PLoS ONE 8(8): e71774.

Brouwer MC, Tunkel AR, van de Beek D. (2010) Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. Clin Microbiol Rev. 2010 Jul;23(3):467-92.

Corless C.E, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox A.J and Kaczmarek E.B. (2001). Simultaneous Detection of Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, and Streptococcus pneumoniae in Suspected Cases of Meningitis and Septicemia Using Real-Time PCR. J. Clin. Microbiol. 2001, 39(4):1553.

<http://www.sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/corpus/disciplines/pedia/malinfped/96/leconimprim.pdf>. BOST-BRU C. et PLANTAZ D.

http://opac.invs.sante.fr/doc_num.php?explnum_id=8208
Epidémiologie des méningites aiguës en France. Parent I. Paris. Institut de Veille Sanitaire. 2012.

http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/_documents/consensus/Meningites_consensus-long.pdf. 17^e conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse. Prise en charge des méningites bactériennes aiguës communautaires (à l'exclusion du nouveau-né). 2008. Raffi F. et Duval X.

http://www.biomnis.com/referentiel/liendoc/precis/HAEMOPHILUS_INFLUENZAE.pdf. Biomnis. Précis de biopathologie Analyses médicales spécialisées. 2012

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

ELIMINATION DES DECHETS

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

SYMBOLES

	Référence
	Numéro de lot
	Limites de température de conservation
	Date d'expiration
	Contenu suffisant pour « N » réactions
	Conserver à l'abri de la lumière
	Fabricant
	In vitro diagnostic
	Produit marqué CE
	Mode d'emploi



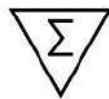
ZA de Courtaboeuf
7, avenue de Scandinavie
91940 Les Ulis Cedex
FRANCE

EurobioPlex

*Community-acquired
bacterial meningitis*
REAL-TIME PCR

For **qualitative** real-time PCR

REF **EBX-020-36**
EBX-020-09



9 reactions
36 reactions



Version 5.00 of 2019/10/03

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	33
Introduction	33
Principle of detection	34
Description and content of the kit	35
Storage	36
Cautions and notes	36
Samples collection, transport and storage	37
Procedure	38
I- DNA extraction	38
II- Real-time PCR procedure	38
II-1/ Diagram of the procedure	39
II-2/ Detailed procedure	40
Validation of the experiment	41
Data analysis and Interpretation	43
Performance analysis.....	44
Specificities of the Real-Time PCR T-COR 8®-IVD	48
Barcodes for EBX-020 for use on T-COR8®-IVD.....	52
Bibliography	58
Waste disposal	58
Symbols	59

INTENDED USE

The EBX-020 test uses real-time polymerase chain reaction (PCR) amplification, and is designed for the qualitative detection from cerebrospinal fluid (CSF) of the three most frequently involved bacteria in the etiology of Community-acquired Bacterial Meningitis (MBcom): *Neisseria meningitidis* (meningococcus), *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus), and *Haemophilus influenzae*. **Real-time PCR can be carried out directly on CSF without extraction, which** can answer the need of diagnostic urgency in this pathology, but **also on extracted DNA**. This test is indicated to confirm a diagnosis of presumption of infection in patients or complete a proven or indeterminate diagnosis by other techniques (clinical diagnosis with semiological examination, bacteriological study and culture of CSF).

The Eurobioplex EBX-020 has been validated on the following specimen:

- Cerebrospinal fluid (CSF)

INTRODUCTION

Meningitis is an inflammation of meninges surrounding the central nervous system tissue, and is due to many bacterial or viral pathogens.

Bacterial meningitis affects 22 cases per million people, about 1400 cases/year in France. Two peaks of incidence are observed: one in less than one year old children and the other affects adults over age 60. Bacterial meningitis is rare (20% of cases) but is extremely serious compared to viral meningitis. Maternal-fetal transmission is most often the source of infection in the newborn. As for bacterial meningitis in adults, a substantial part would be due to nosocomial infections. Bacterial meningitis is thus often subdivided in three subcategories: community-acquired bacterial meningitis, maternal-fetal bacterial meningitis, and nosocomial bacterial meningitis.

Community-acquired bacterial meningitis are worldwide responsible for 170 000 annual deaths (WHO), and more than a million people would be affected. The epidemiological characteristics vary according to climatic zones and countries. Meningococcal outbreaks are mainly found in sub-Saharan Africa at the band of the Sahel called "meningitis belt". Endemic areas are found in some countries of South America (Brazil, Ecuador), Africa (Western Sahara, Morocco, Egypt), and Asia (Saudi Arabia, India and China). All countries are concerned for endemo-sporadic areas. Mortality is particularly high in developing countries. 20% of patients with community-acquired bacterial meningitis die and 30% suffer from sequelae. Patients' life is at stake if targeted antibiotic treatment is delayed. Whether bacterial meningitis is proven or suspected, it remains an absolute diagnostic and therapeutic emergency.

There are four main sources of surveillance in France: 1) the EPIBAC/InVS network which comprises approximately 300 hospital laboratories, 2) the national observatory for childhood bacterial meningitis: GPIP-Activ which includes approximately 250 pediatric services and 150 microbiology laboratories, 3) the regional pneumococcal observatories, 4) the national reference centers.

There is no obvious diagnostic assessment by the clinician between viral and bacterial meningitis because the symptoms are common: fever, headache, stiffness in the neck, vomiting, limited elevation of the lower limbs, and involuntary flexion of lower limbs as soon as the neck is forced to bend. The ORL entry ways are the most common. Only the cyto-bacteriological examination of the cerebrospinal fluid (CSF) enables to make

the diagnosis. Culture of CSF is rapidly and systematically done. A fraction of the sampling of CSF is separately kept in anticipation of microbiological research by polymerase chain reaction (PCR). Count of leukocytes, GRAM stain, and detection of soluble antigens can orient the diagnosis but the sensitivity of these techniques is strongly altered if the patient is already treated by antibiotic therapy.

The main bacteria involved in community-acquired bacterial meningitis (in adults) are in order of frequency: *Streptococcus pneumoniae* (Pneumococcus), *Neisseria meningitidis* (meningococcus, mandatory reporting), and *Haemophilus influenzae*. The pneumococcal and meningococcal bacteria are responsible for more than 80% of cases. The rapid and targeted diagnosis by polymerase chain reaction in real-time from the DNA of bacterial pathogens of community-acquired bacterial meningitis is the technique with the best sensitivity and specificity.

PRINCIPLE OF DETECTION

The Eurobioplex EBX-020 is a test using real-time PCR amplification of bacterial DNA of *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*, as well as a DNA extraction and PCR inhibition control. The test is performed directly from non-extracted samples of CSF or from extracted DNA using two reactions in two wells/tubes.

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 lack of availability of DNA in CSF, and/or a bad DNA extraction, and/or the presence of PCR inhibitors in too large quantities.

This kit contains two different oligomixes which permit to detect the different pathogens listed below:

Oligomix 1 : *Neisseria meningitidis* (NM), 2 genes + control of DNA extraction and PCR inhibition (CI-PCR),

Oligomix 2 : *Streptococcus pneumoniae* (SP) and *Haemophilus influenzae* (HI) + control of DNA extraction and PCR inhibition (CI-PCR).

For the first one, two genes of NM are respectively detected using FAM and HEX labeled probes. For the second triplex, DNA of SP and HI is also detected using respectively FAM and HEX labeled probes. For the two triplexes, 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-020 kit is ready to use for the specific detection of *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*.

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: Pathogens detected by each oligomix

Target	Oligomix 1	Oligomix 2	Fluorophore
<i>Neisseria meningitidis</i> – Gene 1	X	-	FAM
<i>Neisseria meningitidis</i> – Gene 2	X	-	HEX
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	X	FAM
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	X	HEX
PCR inhibition control (CI-PCR)	X	X	Cy5

Wavelengths of excitation/emission for FAM (495/515 nm), HEX (535/555 nm), CY5 (647/667 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 **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 -Cy5 (465-510, 533-580-618-660).

Table 2:

Cap color	Components of the kit	9 reactions	36 reactions	Reconstitution
Red	Enzyme	4 x 100 µl	16 x 100 µl	Ready to use
Transparent	Oligomix 1	2 x 60 µl	8 x 60 µl	Ready to use
Green	Oligomix 2	2 x 60 µl	8 x 60 µl	Ready to use
Blue	Water = negative control (CN-H ₂ O)	2 x 500 µl	8 x 500 µl	Ready to use
Yellow	Positive Control CP-MBcom1	2 x 15 µl	8 x 15 µl	Ready to use
Orange	Positive Control CP-MBcom2	2 x 15 µl	8 x 15 µl	Ready to use
White	PCR inhibition control (CI-PCR)	2 x 50 µl	8 x 50 µl	Ready to use

Oligomix 1: contains the primers and probes of the first triplex (2 genes of NM, and CI-PCR).
Oligomix 2: contains the primers and probes of the second triplex (SP, HI, and CI-PCR).
CP-MBcom1: positive control of the community-acquired bacterial meningitis for 2 genes of NM, triplex1
CP-MBcom2: positive control of the community-acquired bacterial meningitis for SP et HI, triplex2

Table 3: Number of patients tests according to the EBX format (9 or 36 reactions) on all instruments except T-COR8®-IVD (see page 48)

	9 Reactions	36 Reactions
Number of possible patients tests patient-by-patient with maximum 3 defrost/refreezing cycles	6 patients	24 patients
Maximum number of patients tests in 1 run without refreezing cycles	7 patients	34 patients

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 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.
- ◇ It is the responsibility of the user to master its own conditions of collection, transport and storage of samples, and if an extraction of DNA is performed then use suitable systems to produce DNA of good quality.
- ◇ Lumbar puncture is performed after a rigorous asepsis of the area and a local anesthesia. CSF is collected by puncture at the lumbar vertebrae level of the L3-L4, L4-L5 or L5-S1 interspace. Once collected, the CSF is immediately brought to the laboratory for analysis.
- ◇ A CSF showing the presence of blood can also give a negative result. In this case, it may be wise to perform the test after extraction of DNA and not on direct LCR. This can also be done in a second attempt, if the result is negative on direct LCR.
- ◇ It is recommended that samples be stored according to the recommendations of storage of samples (Table 4).

Table 4 :

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 obey local regulations for this type of infectious agents.

PROCEDURE

I- DNA Extraction

This part is optional because this kit can be used directly on CSF (without extraction of bacterial DNA).

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 from CSF samples, and refer to manufacturer's instructions of the extraction kit.

In the EBX-020 kit, CI-PCR on the CY5 channel can be added into the mastermix in case of direct CSF testing, or before extraction if one is performed. It ensures that a negative result is not due to the presence of PCR inhibitors at high quantity, or potentially due to a problem with extraction if it has been performed.

If an extraction is performed, we recommend the addition of 10 µl of CI-PCR to the biological sample for a final volume of elution of 50 µl after extraction.

If the CI-PCR is added to control the real-time PCR or in the case of direct CSF testing, CI-PCR is added to the reaction mix (1 µl per PCR reaction).

See real-time PCR protocol for details.

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

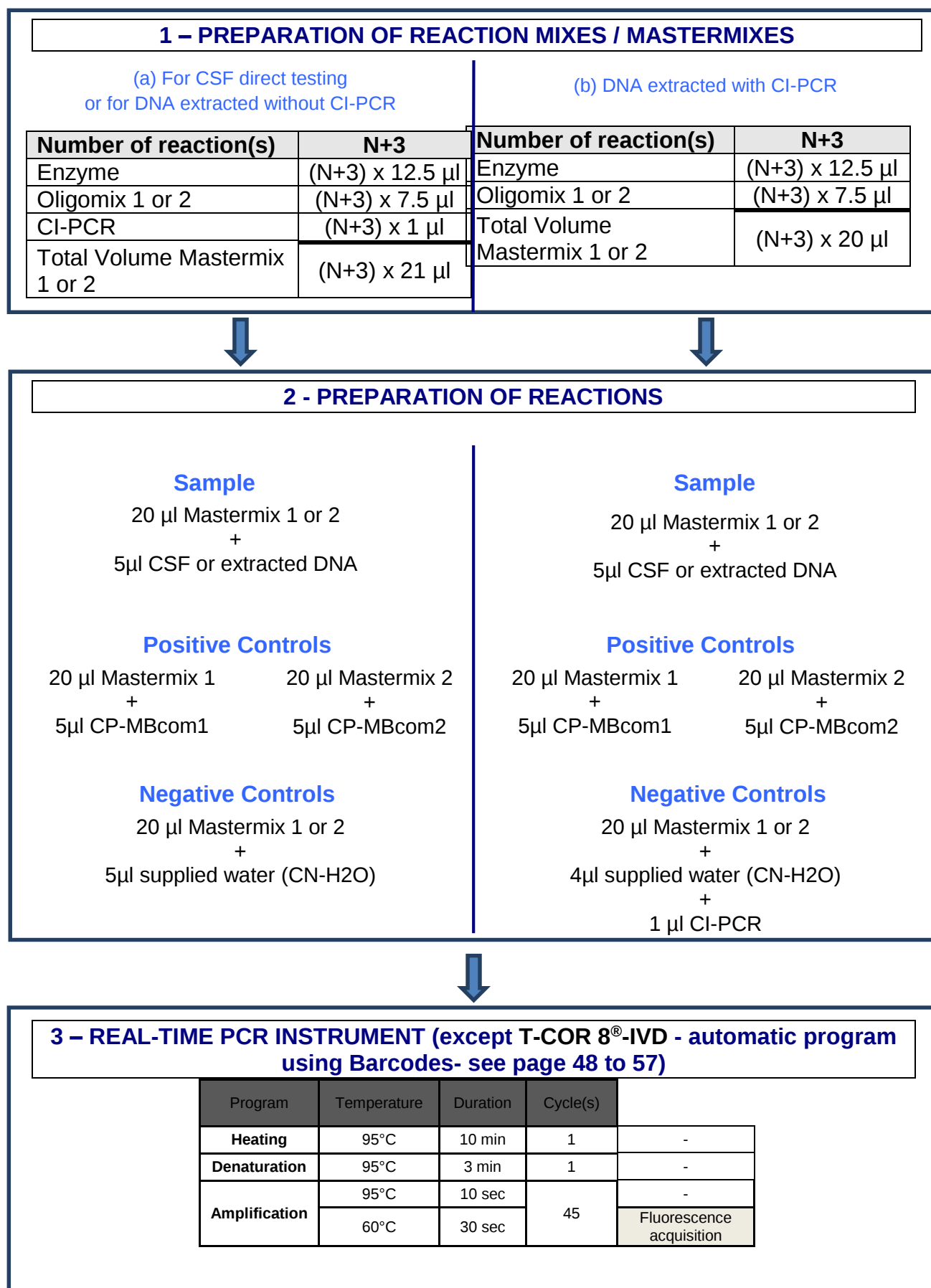
II- Real-time PCR procedure

General comment:

Positive controls 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 controls CP-MBcom1 and CP-MBcom2 with their corresponding triplex 1 and 2 respectively, as well as the negative controls (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: Proceed in the same way for the detection of NM with the oligomix 1, and for the detection of SP and HI with the oligomix 2.

- 1) Homogenize the tube of Enzyme, and vortex Oligomix 1, Oligomix 2, CP-MBcom1, CP-MBcom2, and CI-PCR tubes before starting, and centrifuge.
- 2) Prepare Mastermixes 1 and 2 as below; prepare the reaction mixes 1 and 2 as follows by multiplying by the number of samples N to test (including positive and negative controls). On average, prepare enough reagents depending on the size of the sampling for N+2 reactions (up to 3 patients tested) or N+3 reactions (beyond 3 patients tested).
(Refer to part 1-(a) or 1-(b) of the previous diagram according to the condition).

Case (a): for CSF direct testing, or for DNA extracted without CI-PCR

Number of reaction(s)	1	N+3	Example for 3 patients N = 7
Enzyme	12.5 µl	(N+3) x 12.5 µl	87.5 µl
Oligomix 1 or 2	7.5 µl	(N+3) x 7.5 µl	52.5 µl
CI-PCR	1 µl	(N+3) x 1 µl	7 µl
Total volume mastermix 1 or 2	21 µl*	(N+3) x 21 µl	147 µl

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

Case (b): for DNA extracted with CI-PCR

Number of reaction(s)	1	N+3	Example for 3 patients N = 7
Enzyme	12.5 µl	(N+3) x 12.5 µl	87.5 µl
Oligomix 1 or 2	7.5 µl	(N+3) x 7.5 µl	52.5 µl
Total volume mastermix 1 or 2	20 µl*	(N+3) x 20 µl	140 µl

- 3) Homogenize the mastermixes prepared in 2) and centrifuge briefly
- 4) Distribute 20 µL Mastermix* 1 or 2 using a micropipette and filtered tips in each tube or well of microplate for real time PCR.
- 5) Add 5 µL of CSF or extracted DNA sample.
- 6) In parallel, test the following controls (see this specific point for T-COR 8®-IVD on page 48-57)

- Positive controls:

- 20µL of mastermix 1 + 5µL of CP-MBcom1
- 20µL of mastermix 2 + 5µL of CP-MBcom2

- Negative controls:

○ Case (a): CSF direct testing or for DNA extracted without CI-PCR

- 20 µL mastermix 1 + 5 µL supplied water (CN-H2O)
- 20 µL mastermix 2 + 5 µL supplied water (CN-H2O)

○ Case (b) : for DNA extracted with CI-PCR

- 20 µL mastermix 1 + 4 µL water supplied (CN-H2O) + 1 µL CI-PCR
- 20 µL mastermix 2 + 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 page 48-57):

Program	Temperature	Duration	Cycle(s)	
Heating	95°C	10 min	1	-
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. Apply color compensation for FAM-HEX/VIC- Cy5 (465-510, 533-580, 618-660).

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

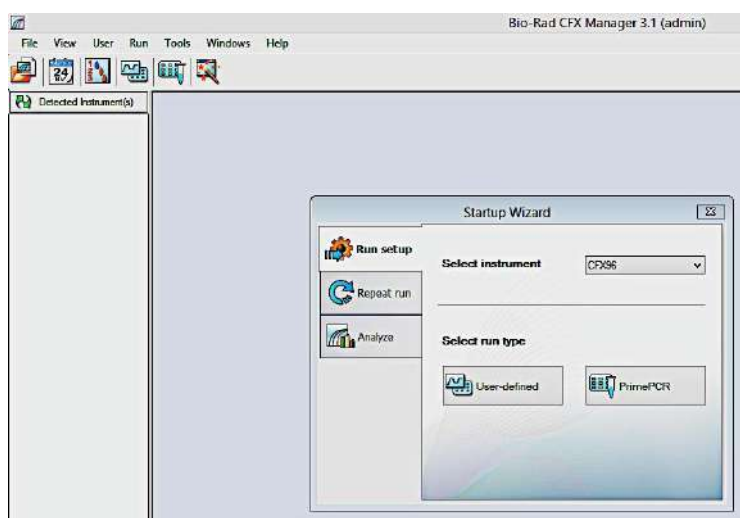
Note 3: On Rotorgene™, please calibrate the signal by clicking on "GAIN optimization".

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

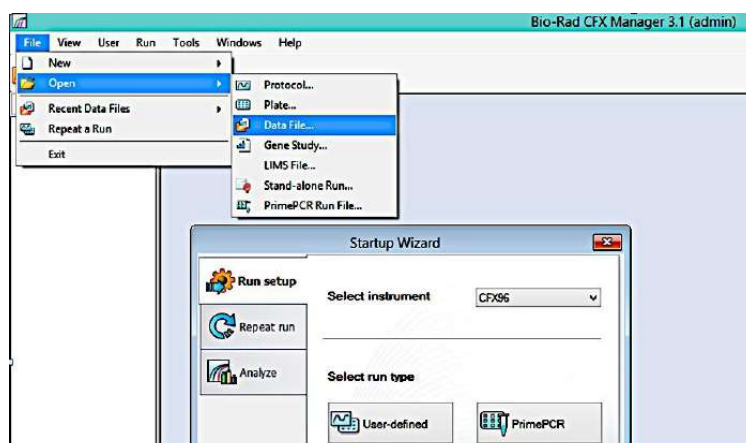
VALIDATION OF THE EXPERIMENT

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

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

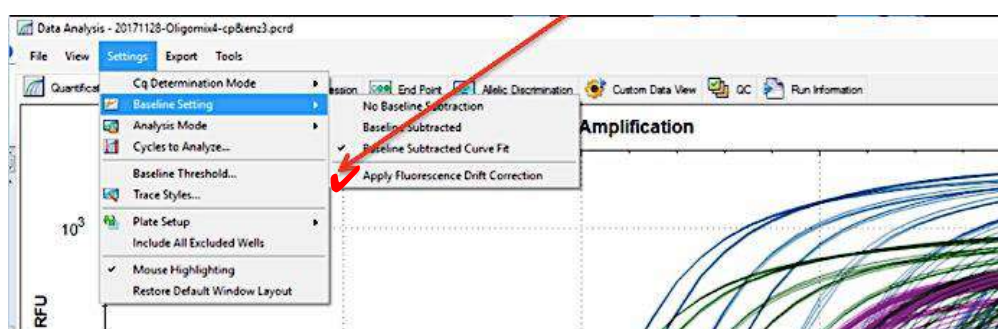


- Click on File and select Open, then Data File



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

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



Once this is done, the analysis can start.

For the assay to be valid, the 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 negatives controls be tested when a new kit is being opened.

Table 5:

Positive controls		
Channel	CP-MBcom1	CP-MBcom2
FAM	Ct ≤ 22	Ct ≤ 21
HEX	Ct ≤ 22	Ct ≤ 21
Negative controls		
Channel	Negative control Mastermix 1	Negative control Mastermix 2
FAM	Ct not determinated	Ct not determinated
HEX	Ct not determinated	Ct not determinated
CY5	Ct ≤ 35	Ct ≤ 35

CP-MBcom1 and 2: positive controls of the community-acquired bacterial meningitis (Triplex1 and Triplex2)

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 bacterial DNA is not reachable within the CSF, or DNA was not extracted (in case of extraction), the PCR did not work well, or the presence of PCR inhibitors inhibits the PCR reaction. A CSF showing the presence of blood can also give a negative result.

It is then recommended to perform an extraction (if CSF was initially tested directly), or to repeat the extraction, or dilute the sample, unless a specific signal appears in all other channels (FAM and HEX).

OLIGOMIX 1:

For clinical samples tested with Oligomix 1, the following results are possible:

*** Ct cut off for samples:**

Channel FAM-NM gene 1 and HEX-NM gene 2: + Positive => Positive Ct (≤ 45)

PCR Signal			Presence of NM	Test validity/comment
FAM	HEX	CY5		
+	+	+	Yes	valid
+	-	+	Yes	valid
-	+	+	Yes	valid
-	-	+	No	valid
+	-	-	Yes	Valid: possible problem with PCR inhibition, or with extraction if performed, which does not prevent the detection of the bacterium.
-	+	-	Yes	Valid: possible problem with PCR inhibition, or with extraction if performed, which does not prevent the detection of the bacterium.
-	-	-	Not interpretable	Not valid: possible problem with PCR inhibition, or with extraction if performed - dilute first 5 x the sample and repeat PCR; if necessary redo an extraction.

NM: *Neisseria meningitidis*

OLIGOMIX 2:

For clinical samples tested with Oligomix 2, the following results are possible:

* Ct cut off for samples:

Channel FAM-SP and HEX-HI: + Positive => Positive Ct (≤ 45)

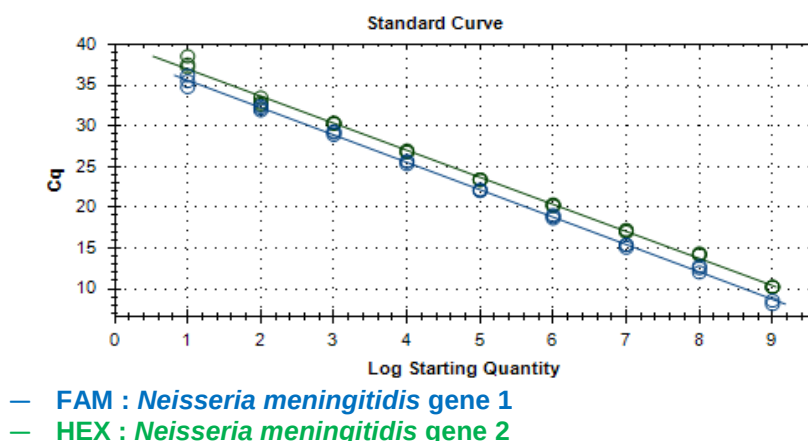
PCR Signal			Presence of SP	Presence of HI	Test validity/comment
FAM	HEX	CY5			
+	+	+	Yes	Yes	valid
+	-	+	Yes	No	valid
-	+	+	No	Yes	valid
-	-	+	No	No	valid
+	-	-	Yes	Not interpretable	Valid for SP: possible problem with PCR inhibition, or with extraction if performed, which does not prevent the detection of SP. BUT that could prevent the detection of HI -dilute 5 x the sample; not valid for HI.
-	+	-	Not interpretable	Yes	Valid for HI: possible problem with PCR inhibition, or with extraction if performed, which does not prevent the detection of HI. BUT that could prevent the detection of SP -dilute 5 x the sample; not valid for SP.
-	-	-	Not interpretable	Not interpretable	Not valid: possible problem with PCR inhibition, or with extraction if performed - dilute first 5 x the sample and repeat PCR; if necessary redo an extraction.

SP: *Streptococcus pneumoniae*; HI : *Haemophilus influenzae*

PERFORMANCE ANALYSIS

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

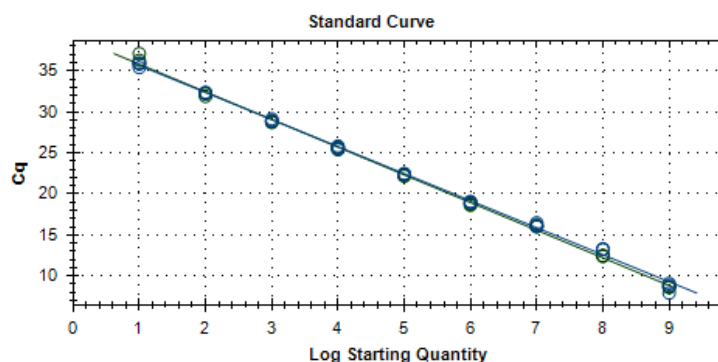
- With Oligomix 1:



Analytical sensitivity: CP-MBcom1: 10 copies/μl

Linearity for quantification: CP-MBcom1 from 10 copies/μl to 10⁹ copies/μl

- With Oligomix 2:



— FAM : *Streptococcus pneumoniae*

— HEX : *Haemophilus influenzae*

Analytical sensitivity: CP-MBcom2: 10 copies/μl

Linearity for quantification: CP-MBcom2 from 10 copies/μl to 10⁹ copies/μl

Coefficient of correlation and efficiency

EBX-020 Triplex 1	EBX-020 Triplex 2
Bacteria and abbreviations: <i>Neisseria meningitidis</i> (NM) 2 genes	Bacteria and abbreviations: <i>Streptococcus pneumoniae</i> (SP) and <i>Haemophilus influenzae</i> (HI)
Efficiency FAM: NM gene 1: 98,2 % HEX: NM gene 2: 101,9 % Coefficient of correlation FAM: NM gene 1: 0.996 HEX: NM gene 2: 0.995	Efficiency FAM: SP: 100,3 % HEX: HI: 96,3 % Coefficient of correlation FAM: SP: 0.993 HEX: HI: 0.994

Variability of the signal

EBX-020		INTRA-experiment	INTER-experiments
	Bacterial targets	CV %	CV %
Triplex 1	<i>Neisseria meningitidis</i> Gene 1 (FAM)	0.98	1.87
	<i>Neisseria meningitidis</i> Gene 2 (HEX)	0.61	2.01
Triplex 2	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (FAM)	0.62	2.65
	<i>Haemophilus influenzae</i> (HEX)	0.54	3.52

Validation on clinical samples

Specificity and sensitivity were analysed from samples of CSF (DNA not extracted) and bacterial strains (HI positive strains diluted in HI-negative CSF) previously tested by the reference laboratory.

TRIPLEX 1: EBX-020 Com1

1/ Analytical specificity

Neisseria meningitidis gene 1: 95.5 %*

Neisseria meningitidis gene 2: 95.5 %*

2/ Analytical sensitivity

Neisseria meningitidis gene 1: > 98 %

Neisseria meningitidis gene 2: > 98 %

3/ Concordance

Neisseria meningitidis gene 1: 96 % (n = 50)

Neisseria meningitidis gene 2: 96 % (n = 50)

TRIPLEX 2: EBX-020 Com2

1/ Analytical specificity

Streptococcus pneumoniae: 95.1 %*

Haemophilus influenzae: > 98 %

2/ Analytical sensitivity

Streptococcus pneumoniae: > 98 %

Haemophilus influenzae: > 98 %

3/ Concordance

Streptococcus pneumoniae: 95.7 % (n = 46)

Haemophilus influenzae: > 98 % (n = 14)

* Note that samples not detected by the reference method but detected by the Eurobio method are at the limit of detection. It's likely that the EBX-020 Eurobioplex is more sensitive.

Study of potentially interfering microorganisms: none of the bacteria listed below was detected by the EBX-020 kit (n=1 sample of each bacterium).

No cross-reactivity of the Triplex 1 with:

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Staphylococcus aureus*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Listeria monocytogenes*
- *Escherichia coli*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Bartonella spp*
- *Coxiella burnetii*

- *Mycobacterium avium*
- *Streptococcus oralis mitis sanguis*
- *Francisella tularensis*
- *Mycoplasma*
- *Klebsiella kingae*
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Tropheryma whipplei*

No cross-reactivity of the Triplex 2 with:

- *Neisseria meningitidis*
- *Staphylococcus aureus*
- *Listeria monocytogenes*
- *Escherichia coli*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Bartonella spp*
- *Coxiella burnetii*
- *Mycobacterium avium*
- *Mycoplasma*
- *Klebsiella kingae*
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Tropheryma whipplei*

The tests were performed on CFX96.

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.

Patients' Tests

Patient's tests require 2 wells, one for each oligomix tested.

<i>With validation of positive and negative controls once, during first use of the kit.</i>	9 reactions	36 reactions
Number of possible patients tests, patient by patient, with a maximum of 3 freezing/thawing cycles	7 patients	34 patients

Fluorophores

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

For all EBX, such as EBX-020, FAM/HEX/Texas Red/Cy5 combination is used. If some channels are not used (Texas Red for EBX-020), do not consider this channel for results analysis.

Use of Barcodes (available on page 52 to 57)

1- Select Menu > New Run

2- Select Barcode

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

- For positive control 1 or 2 (Barcode EBX-020 CP1 or EBX-020 CP2),

- For negative control 1 or 2 (Barcode EBX-020 CN1 or EBX-020 CN2),
- For a patient sample tested with oligomix 1 (Barcode EBX-020 olig1) or oligomix 2 (Barcode EBX-020 olig2)

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 1 (for oligomix 1) or Neg Ctrl 2 (for oligomix 2) Fail »: Not valid

« Neg Ctrl 1 (for oligomix 1) or Neg Ctrl 2 (for oligomix 2) Valid »: Valid

« Pos Ctrl 1 (for oligomix 1) or Pos Ctrl 2 (for oligomix 2) Fail »: Non valid

« Pos Ctrl 1 (for oligomix 1) or Pos Ctrl 2 (for oligomix 2) Valid »: Valid

For patients status:

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

"Not detected": Negative → red box

* For each oligomix, the results for the specific bacteria or genes 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) indicated as « Detected » for its corresponding targets, and for a negative sample for both oligomix, indicated “Not Detected” for its corresponding targets:

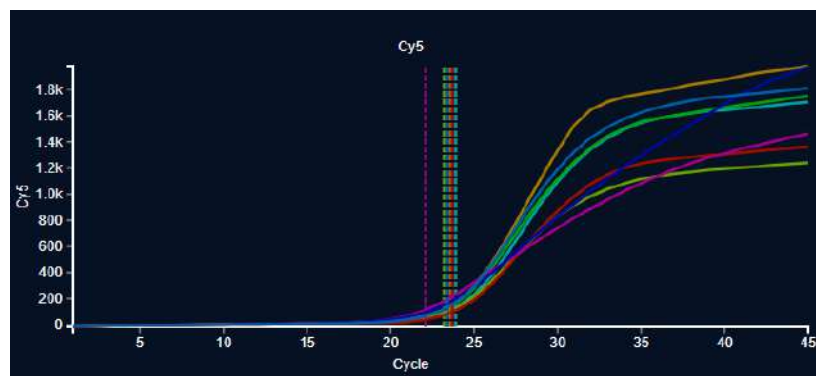
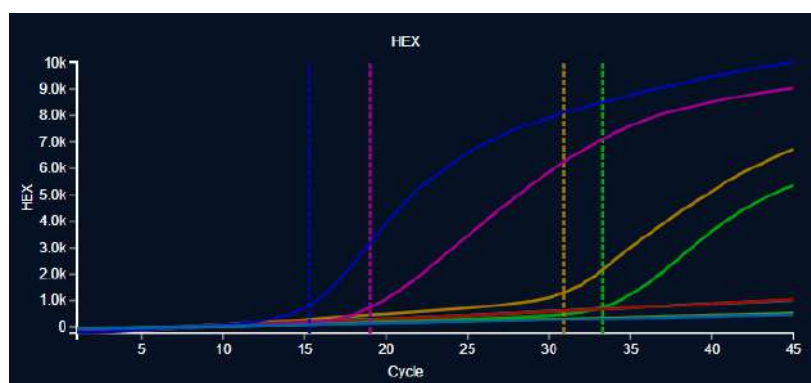
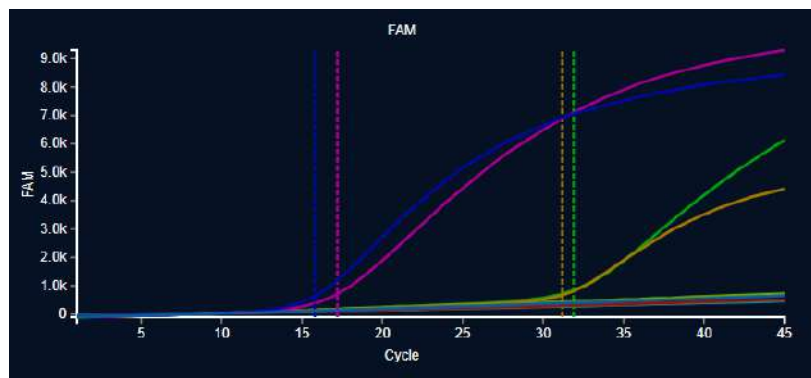
❖ On the instrument screen:

Interpretations		
1	CN2	EBX-020 CN2
Detected: Neg Ctrl 2 Valid		
2	LOD OLIGO1	EBX-020 olig1
Detected: N. men gene 2, N. men gene 1		
3	Sample 1	EBX-020 olig1
Not Detected - N. men		
4	LOD OLIGO2	EBX-020 olig2
Detected: H. inf, S. pneumo		
5	Sample 1	EBX-020 olig2
Not Detected - S. pneumo, H. inf		
6	CP1	EBX-020 CP1
Detected: Pos Ctrl 1 Valid		
7	CP2	EBX-020 CP2
Detected: Pos Ctrl 2 Valid		
8	CN1	EBX-020 CN1
Detected: Neg Ctrl 1 Valid		

❖ On the report:

Summary							
Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5	Call
1	CN2	EBX-020 CN2				23.9	Detected • Neg Ctrl 2 Valid
2	LOD OLIGO1	EBX-020 olig1	31.9	33.3		23.4	Detected • N. men gene 2 • N. men gene 1
3	Sample 1	EBX-020 olig1				23.2	Not Detected
4	LOD OLIGO2	EBX-020 olig2	31.2	30.9		23.6	Detected • H. inf • S. pneumo
5	Sample 1	EBX-020 olig2				23.7	Not Detected
6	CP1	EBX-020 CP1	17.2	19.0		22.1	Detected • Pos Ctrl 1 Valid
7	CP2	EBX-020 CP2	15.8	15.3		23.4	Detected • Pos Ctrl 2 Valid
8	CN1	EBX-020 CN1				23.4	Detected • Neg Ctrl 1 Valid

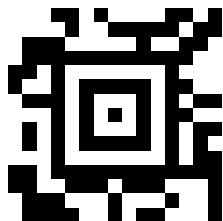
Example of amplification curves:



Barcodes for EBX-020 for use on T-COR8®-IVD

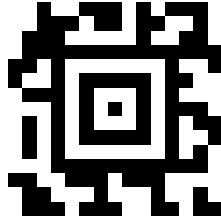
EBX-020 CN1

**Water = Negative control (CN-H2O)
(to test with oligomix 1)**



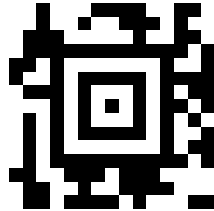
EBX-020 CN2

**Water = Negative control (CN-H₂O)
(to test with oligomix 2)**



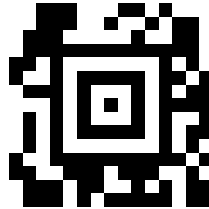
EBX-020 CP1

**Positive control CP-MBcom1
(to test with oligomix 1)**



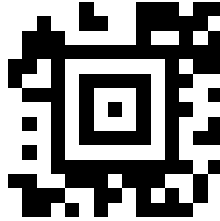
EBX-020 CP2

**Positive control CP-MBcom2
(to test with oligomix 2)**



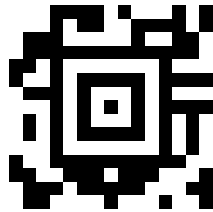
EBX-020 olig1

(to test with oligomix 1)



EBX-020 olig2

(to test with oligomix 2)



BIBLIOGRAPHY

Van de Beek et al (2006). Community-acquired bacterial meningitis in adults in the Netherlands, 2006–14: a prospective cohort study. In *The Lancet Infectious Diseases*. March 2016 16(3):339-347.

Cohen-Bacrie S, Ninove L, Nougairé de A, Charrel R, Richet H, et al. (2011) Revolutionizing Clinical Microbiology Laboratory Organization in Hospitals with In Situ Point-of-Care. *PLoS ONE* 6(7): e22403.

Hotomi M, Togawa A, Kono M, Sugita G, Sugita R, et al. (2013) An Application of Outer Membrane Protein P6-Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of *Haemophilus influenzae* in Middle Ear Fluids and Nasopharyngeal Secretions. *PLoS ONE* 8(8): e71774.

Brouwer MC, Tunkel AR, van de Beek D. (2010) Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev*. 2010 Jul;23(3):467-92.

Corless C.E, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox A.J and Kaczmarek E.B. (2001). Simultaneous Detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in Suspected Cases of Meningitis and Septicemia Using Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol*. 2001, 39(4):1553.

<http://www.sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/corpus/disciplines/pedia/malinfped/96/leconimprim.pdf>. BOST-BRU C. et PLANTAZ D.

http://opac.invs.sante.fr/doc_num.php?explnum_id=8208 Epidémiologie des méningites aiguës en France. Parent I. Paris. Institut de Veille Sanitaire. 2012.

http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/_documents/consensus/Meningites_consensus-long.pdf. 17^e conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse. Prise en charge des méningites bactériennes aiguës communautaires (à l'exclusion du nouveau-né). 2008. Raffi F. et Duval X.

http://www.biomnis.com/referentiel/liendoc/precis/HAEMOPHILUS_INFLUENZAE.pdf. Biomnis. Précis de biopathologie Analyses médicales spécialisées. 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

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

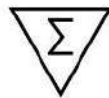
EurobioPlex

Ambulant erworbene bakterielle Meningitis

REAL-TIME PCR

Für **qualitative** Real-Time-PCR

REF **EBX-020-36**
EBX-020-09



9 Reaktionen
36 Reaktionen



Version 5.00 vom 03.10.2019

Validiert für:

- CFX96™ Real-Time-PCR-Nachweissystem (Biorad) mit Auswertung mittels CFX Manager v 3.1 (Biorad)
- LightCycler®480 Instrument II (Roche) mit Auswertung mittels LightCycler® 480 Software v1.5 (Roche)
- Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) mit Auswertung mittels 7500 Software v2
- T-COR 8®-IVD (Tetracore Inc.) mit T-COR 8 SmartCT™ (auto v1) Software

Lagerung:

Bis zu ihrer Verwendung und nach der ersten Anwendung alle Reagenzien
im Bereich zwischen -15°C and -22°C lagern



Gebrauchsanweisung

INHALTSVERZEICHNIS

Verwendungszweck	62
Einleitung	62
Nachweisprinzip	63
Beschreibung und Lieferumfang des Kits	64
Lagerung	66
Vorsichtshinweise und Erläuterungen	66
Probenentnahme, -transport und -lagerung	67
Verfahren	68
I- DNA-Extraktion	68
II- Real-Time-PCR-Verfahren	68
II-1/ Verfahrensdiagramm	69
II-2/ Verfahren im Detail	70
Validierung des Tests	71
Datenanalyse und Auswertung	73
Leistungsbewertung	76
Besonderheiten des Real-Time-PCR-Geräts T-COR 8®-IVD	79
Barcodes für EBX-020 zur Verwendung am T-COR8®-IVD	83
Literatur	89
Abfallentsorgung	89
Symbole	90

VERWENDUNGSZWECK

Der EBX-020 Test beruht auf Amplifikation mittels Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und ist für den qualitativen Nachweis von *Neisseria meningitidis* (Meningococcus), *Streptococcus pneumoniae* (Pneumococcus) und *Haemophilus influenzae* in Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) bestimmt. Diese Bakterien sind am häufigsten an der Ätiologie der ambulant erworbenen bakteriellen Meningitis (Meningite bactérienne communautaire = MBcom) beteiligt. Die **Real-Time-PCR kann direkt mit nicht extrahierten CSF-Proben durchgeführt werden**, was es ermöglicht, auf die Dringlichkeit der Diagnostik zu reagieren. Sie kann aber **auch mit extrahierter DNA** durchgeführt werden. Dieser Test ist indiziert, um die Diagnose einer vermuteten Infektion bei Patienten zu bestätigen oder eine nachgewiesene oder unklare Diagnose durch weitere Verfahren (klinische Diagnose mit semiologischer Bewertung, bakteriologische Untersuchung der CSF und CSF-Kultur) zu ergänzen.

Der Eurobioplex EBX-020 wurde an folgendem Probenotyp validiert:

- Cerebrospinalflüssigkeit (CSF)

EINLEITUNG

Meningitis ist eine Entzündung der Hirnhaut, die das Gewebe des zentralen Nervensystems umgibt, und kann durch viele bakterielle oder virale Krankheitserreger ausgelöst werden.

Die Inzidenz der bakteriellen Meningitis liegt bei 22 Fällen pro Million Menschen, in Frankreich gibt es etwa 1.400 Fälle pro Jahr. Es werden zwei Häufigkeitsspitzen beobachtet: eine bei Kindern unter einem Jahr und die andere bei Erwachsenen über 60 Jahre. Die bakterielle Meningitis ist selten (20% der Fälle), aber im Vergleich zur viralen Meningitis eine extrem schwere Erkrankung. Die materno-fetale Übertragung ist meist die Quelle der Infektion beim Neugeborenen. Was die bakterielle Meningitis bei Erwachsenen betrifft, so ist ein wesentlicher Teil auf nosokomiale Infektionen zurückzuführen. Die bakterielle Meningitis wird daher häufig in drei Unterkategorien aufgeteilt: ambulant erworbene bakterielle Meningitis, neonatale bakterielle Meningitis und nosokomiale bakterielle Meningitis.

Die ambulant erworbene bakterielle Meningitis ist weltweit jährlich für 170.000 Todesfälle verantwortlich (WHO), Schätzungen zufolge sind mehr als eine Million Menschen betroffen. Die epidemiologischen Merkmale variieren je nach Klimazone und Land. Meningokokken-Epidemien treten vor allem im subsaharischen Afrika in der Sahelregion auf: Man spricht vom "Meningitis-Gürtel". Endemische Gebiete gibt es in einigen Ländern Südamerikas (Brasilien, Ecuador), Afrikas (Westsahara, Marokkos, Ägyptens) und Asiens (Saudi-Arabien, Indien und China). Alle Länder sind über die Gebiete mit endemisch-sporadischen Erkrankungsfällen besorgt. Die Mortalität ist besonders hoch in den Entwicklungsländern. 20% der Patienten mit ambulant erworbener bakterieller Meningitis sterben und 30% leiden an Folgeerscheinungen. Das Leben der Patienten ist in Gefahr, wenn sich die gezielte Antibiotikabehandlung verzögert. Ungeachtet dessen, ob eine bakterielle Meningitis nachgewiesen oder vermutet wird, bleibt sie ein absoluter diagnostischer und therapeutischer Notfall.

In Frankreich gibt es vier Hauptüberwachungseinrichtungen: 1) das EPIBAC/InVS-Netzwerk, das rund 300 Krankenhauslabors umfasst, 2) die nationale Beobachtungsstelle für bakterielle Meningitis im Kindesalter: GPIP-Activ, die rund rund

250 pädiatrische Dienste und 150 mikrobiologische Laboratorien umfasst, 3) die regionalen Beobachtungsstellen für Pneumokokken, 4) die nationalen Referenzzentren.

Diagnostik

Für den Kliniker ist eine klare diagnostische Unterscheidung zwischen viraler und bakterieller Meningitis kaum möglich, da folgende Symptome häufig auftreten: Fieber, Kopfschmerzen, Nackensteifigkeit, Erbrechen, Einschränkung beim Anheben der unteren Extremitäten und unwillkürliche Flexion der unteren Extremitäten, sobald der Nacken gebeugt wird. Die Übertragung erfolgt am häufigsten nasopharyngeal oder oropharyngeal. Nur die zytobakteriologische Untersuchung der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) ermöglicht die Diagnose. Die CSF-Kultur wird schnell und systematisch angelegt. Ein Teil der CSF-Probe wird separat für eine mikrobiologische Untersuchung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) aufbewahrt. Das Zählen der Leukozyten, die GRAM-Färbung und der Nachweis von löslichen Antigenen können die Diagnosefindung unterstützen, die Empfindlichkeit dieser Methoden ist jedoch stark verändert, wenn der Patient bereits mit einer Antibiotikatherapie behandelt wird.

Die Bakterien, die hauptsächlich an der ambulant erworbenen bakteriellen Meningitis (beim Erwachsenen) beteiligt sind, sind in der Reihenfolge ihrer Häufigkeit: *Streptococcus pneumoniae* (Pneumococcus), *Neisseria meningitidis* (Meningococcus, Meldepflicht) und *Haemophilus influenzae*. Die Pneumokokken und Meningokokken sind für mehr als 80% der Fälle verantwortlich. Die schnelle und gezielte Diagnose mittels Real-Time-PCR aus der DNA von bakteriellen Krankheitserregern der ambulant erworbenen bakteriellen Meningitis ist die Methode, die die beste Sensitivität und Spezifität aufweist.

NACHWEISPRINZIP

Der Eurobioplex EBX-020 ist ein Test, der Real-Time-PCR-Amplifikation der bakteriellen DNA von *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* und *Haemophilus influenzae* sowie eine DNA-Extraktions- und PCR-Inhibitionskontrolle verwendet. Durchgeführt wird der Test entweder direkt an nicht extrahierten CSF-Proben oder an extrahierter DNA unter Nutzung zweier Reaktionen in zwei Vertiefungen/Röhrchen.

Die DNA-Extraktions- und PCR-Inhibitionskontrolle ermöglicht die Überprüfung auf Variationen, die während der DNA-Extraktion aus biologischen Proben und der Real-Time-PCR-Amplifikation auftreten können. Sie stellt somit sicher, dass ein negatives Ergebnis nicht auf zu geringe Mengen an DNA in der Cerebrospinalflüssigkeit und/oder fehlerhafte DNA-Extraktion und/oder auf zu große Mengen an PCR-Inhibitoren zurückzuführen ist.

Das Kit enthält zwei unterschiedliche Oligomixe, die es ermöglichen, die nachfolgend aufgeführten Pathogene nachzuweisen:

Oligomix 1 : *Neisseria meningitidis* (NM), 2 Gene + Kontrolle der DNA-Extraktion und PCR-Inhibition (CI-PCR),

Oligomix 2 : *Streptococcus pneumoniae* (SP) und *Haemophilus influenzae* (HI) + Kontrolle der DNA-Extraktion und PCR-Inhibition (CI-PCR).

Für den ersten Triplex werden zwei Gene von NM mit FAM- und HEX-markierten Sonden nachgewiesen. Für den zweiten Triplex wird die DNA von SP und HI ebenfalls mit FAM- und HEX-markierten Sonden nachgewiesen. Für beide Triplexe wird die DNA-Extraktion und PCR-Inhibitionskontrolle mit einer CY5-markierten Sonde nachgewiesen. Alle Sonden emittieren nach ihrer Hydrolyse während der Elongation des Amplifikationsprodukts eine spezifische Fluoreszenz. Die Fluoreszenzintensität geht mit der Akkumulation spezifischer Amplifikationsprodukte einher.

BESCHREIBUNG UND LIEFERUMFANG DES KITS

Das Real-Time PCR EBX-020 Kit wird gebrauchsfertig für den spezifischen Nachweis von *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae* geliefert.

Die emittierte Fluoreszenz wird durch optische Messungen während der PCR aufgezeichnet. Der Nachweis des amplifizierten Fragments wird mit einem Fluorimeter unter Verwendung der in Tabelle 1 aufgezeigten Kanäle durchgeführt.

Das Kit enthält Reagenzien und Enzyme für die Amplifikation der DNA dieser Bakterien und die DNA-Extraktions- und PCR-Inhibitionskontrolle (siehe Tabelle 2).

Tabelle 1: Von jedem Oligomix nachgewiesene Pathogene

Target	Oligomix 1	Oligomix 2	Fluorophor
<i>Neisseria meningitidis</i> – Gen 1	X	-	FAM
<i>Neisseria meningitidis</i> – Gen 2	X	-	HEX
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	X	FAM
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	X	HEX
PCR-Inhibitionskontrolle (CI-PCR)	X	X	Cy5

Wellenlängen der Anregung/Emission für FAM (495/515 nm), HEX (535/555 nm), CY5 (647/667 nm).

Entsprechende Kanäle auf unterschiedlichen Real-Time-PCR-Cyclern:

- Kanal **FAM** (ABI Systems, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96, Systems Mx, T-COR8®-IVD), Kanal 510 (LC 480), Kanal Green (RotorGene)
- Kanal **HEX** (Chromo 4/CFX96, Mx Systems, T-COR8®-IVD), Kanal VIC (ABI Systems), Kanal Alexa532 (SmartCycler II), Kanal 580 (LC 480), Kanal Yellow (RotorGene),
- Kanal **Cy5** (ABI Systems, Chromo 4/CFX96, Mx Systems, T-COR8®-IVD), Kanal 660 (LC 480), Kanal Alexa647 (SmartCyclerII), Kanal Red (RotorGene)

Anmerkung: Am LC480 II-Gerät ist die Farbkompensation auf den folgenden Kanälen anzuwenden: FAM-HEX/VIC -Cy5 (465-510, 533-580-618-660).

Tabelle 2:

Farbe des Verschlusses	Kit-Inhalt	9 Reaktionen	36 Reaktionen	Rekonstitution
Rot	Enzym	4 x 100 µl	16 x 100 µl	Gebrauchsfertig
Transparent	Oligomix 1	2 x 60 µl	8 x 60 µl	Gebrauchsfertig
Grün	Oligomix 2	2 x 60 µl	8 x 60 µl	Gebrauchsfertig
Blau	Wasser = Negativkontrolle (CN-H ₂ O)	2 x 500 µl	8 x 500 µl	Gebrauchsfertig
Gelb	Positivkontrolle CP-MBcom1	2 x 15 µl	8 x 15 µl	Gebrauchsfertig
Orange	Positivkontrolle CP-MBcom2	2 x 15 µl	8 x 15 µl	Gebrauchsfertig
Weiß	PCR-Inhibitionskontrolle (CI-PCR)	2 x 50 µl	8 x 50 µl	Gebrauchsfertig

Oligomix 1: enthält Primer und Sonden des ersten Triplex (2 Gene von NM und CI-PCR).

Oligomix 2: enthält Primer und Sonden des zweiten Triplex (SP, HI und CI-PCR).

CP-MBcom1: Positivkontrolle der ambulant erworbenen bakteriellen Meningitis für 2 Gene von NM, Triplex 1

CP-MBcom2: Positivkontrolle der ambulant erworbenen bakteriellen Meningitis für SP und HI, Triplex 2

Tabelle 3: Anzahl der Patiententests je nach EBX-Format (9 oder 36 Reaktionen) auf allen Geräten mit Ausnahme des T-COR8®-IVD (siehe Seite 79)

	9 Reaktionen	36 Reaktionen
Anzahl der möglichen Patiententests Patient für Patient mit maximal 3 Auftau-/Einfrier-Zyklen	6 Patienten	24 Patienten
Maximale Anzahl der Patiententests in 1 Lauf ohne Einfrier-Zyklen	7 Patienten	34 Patienten

Nicht im Lieferumfang enthalten:

- ◇ Biologische Sicherheitswerkbank
- ◇ Real-Time-PCR-Gerät
- ◇ Mikrozentrifuge
- ◇ Vortex-Mischer
- ◇ Platten / Röhrchen für Real-Time-PCR
- ◇ Mikropipetten
- ◇ DNase-freie und RNase-freie Filterspitzen für Mikropipetten
- ◇ Sterile Mikroröhrchen
- ◇ Handschuhe (puderfrei)

LAGERUNG

Alle Reagenzien müssen zwischen -15° und -22°C gelagert werden.

Alle Reagenzien müssen bis zu dem auf dem Kit angegebenen Verfallsdatum verwendet werden.

Mehrere Gefrier-/Auftau-Zyklen (> 3x) sind zu vermeiden, da dies zu einer Verringerung der Sensitivität führen kann. .

VORSICHTSHINWEISE UND ERLÄUTERUNGEN

Die Gebrauchsanweisung vor der Durchführung des Tests sorgfältig lesen.

- ◇ Der Test ist von geschultem Personal durchzuführen.
- ◇ Die Geräte müssen gemäß den Empfehlungen des Herstellers ordnungsgemäß installiert, kalibriert und gewartet worden sein.
- ◇ Klinische Proben sind potenziell infektiös und müssen unter einem Laminar-Flow-Abzug verarbeitet werden.
- ◇ Der Test muss nach den Grundsätzen der guten Laborpraxis durchgeführt werden.
- ◇ Das Kit nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- ◇ Das Kit wird auf Trockeneis geliefert, und die einzelnen Komponenten des Kits müssen gefroren ankommen. Wenn eine oder mehr Komponenten aufgetaut oder die Röhrchen beschädigt sind, wenden Sie sich an Eurobio Scientific.
- ◇ Nach dem Auftauen die Röhrchen vor Gebrauch kurz zentrifugieren.
- ◇ Es wird empfohlen, drei Arbeitsbereiche festzulegen: 1) Isolierung der DNA, 2) Vorbereitung des Reaktionsgemischs und 3) Amplifikation / Nachweis der amplifizierten Produkte.
- ◇ In jedem Arbeitsbereich einen eigenen Labormantel und Handschuhe (puderfrei) tragen.
- ◇ Pipetten, Reagenzien und andere Materialien nur jeweils in einem Bereich verwenden.
- ◇ Besondere Sorgfalt ist geboten, um die Reinheit der Reagenzien und Reaktionsgemische zu erhalten.
- ◇ Zur Herstellung qualitativ hochwertiger DNA und zur Durchführung einer Real-Time-PCR sollten geeignete Methoden angewendet werden, wobei insbesondere alle Quellen der DNase-Kontamination zu vermeiden sind.
- ◇ Immer RNase-freie und DNase-freie Filterspitzen für Mikropipetten verwenden.
- ◇ Nicht mit dem Mund pipettieren und in den Arbeitsbereichen nicht essen, trinken oder rauchen.
- ◇ Aerosole vermeiden.

PROBENENTNAHME, -TRANSPORT UND -LAGERUNG

- ◇ Proben in sterilen Röhrchen sammeln.
- ◇ Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, die Gewinnung, den Transport und die Lagerung von Proben sowie die Extraktion von DNA durch geeignete Maßnahmen so zu gestalten, dass DNA von guter Qualität hergestellt werden kann.
- ◇ Die Lumbalpunktion wird durchgeführt, nachdem der Bereich rund um die Einstichstelle gründlich desinfiziert und lokal betäubt wurde. Für die CSF-Entnahme wird der Bereich der Lendenwirbelsäule, meist zwischen L3-L4, L4-L5 oder L5-S1 punktiert. Nach der Gewinnung wird die Cerebrospinalflüssigkeit sofort in ein Labor zur Analyse gebracht.
- ◇ Cerebrospinalflüssigkeit, die mit Blut verunreinigt ist, kann ebenfalls zu einem negativen Ergebnis führen. In diesem Fall ist es ratsam, den Test nach der DNA-Extraktion und nicht direkt mit der Cerebrospinalflüssigkeit durchzuführen. Dies kann auch in einem zweiten Ansatz erfolgen, wenn das Ergebnis der ohne Extraktion getesteten Cerebrospinalflüssigkeit negativ ist.
- ◇ Es wird empfohlen, dass die Proben gemäß den Empfehlungen in der nachstehenden Tabelle gelagert werden (Tabelle 4).

Tabelle 4 :

Empfehlungen für die maximale Lagerung von Proben vor der Extraktion	
Raumtemperatur	2 h
4°C	16h
-20°C	Langfristige Lagerung

- ◇ Der Anwender kann sich hinsichtlich der Lagerung von Proben auch an die Empfehlungen der Weltgesundheitsorganisation oder der zuständigen Gesundheitsbehörde halten.
- ◇ Der Transport klinischer Proben muss den örtlichen Vorschriften für diesen Typ von Infektionserregern entsprechen.

VERFAHREN

I- DNA-Extraktion

Dieser Teil ist optional, da dieses Kit direkt mit Cerebrospinalflüssigkeit verwendet werden kann (ohne Extraktion der bakteriellen DNA).

Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, dass das verwendete Extraktionssystem mit der nachgeschalteten Real-Time-PCR-Technologie kompatibel ist. Für dieses Kit empfehlen wir die Extraktion von bakterieller DNA aus CSF-Proben. Beachten Sie die Herstelleranweisungen des Extraktionskits.

Im Falle des EBX-020-Kits kann die CI-PCR auf Kanal Cy5 zum Mastermix hinzugegeben werden, wenn die Cerebrospinalflüssigkeit direkt getestet wird, oder vor der Extraktion, falls diese durchgeführt wird. Die CI-PCR stellt sicher, dass ein negatives Ergebnis nicht auf das Vorhandensein einer großen Menge an PCR-Inhibitoren oder auf ein Problem bei der Extraktion, falls diese durchgeführt wird, zurückzuführen ist.

Wenn eine Extraktion durchgeführt wird, empfehlen wir die Zugabe von 10 µl CI-PCR zu der biologischen Probe und ein Elutionsendvolumen von 50 µl nach Extraktion.

Wenn die CI-PCR zur Kontrolle der Real-Time-PCR hinzugegeben oder die Cerebrospinalflüssigkeit direkt getestet wird, wird die CI-PCR zum Reaktionsgemisch hinzugegeben (1 µl pro PCR-Reaktion).

Detaillierte Informationen können dem Real-Time-PCR-Protokoll entnommen werden.

CI-PCR ist separat über Eurobio erhältlich (Ref. EurobioPlex EBX-002).

II- Real-Time-PCR-Verfahren

Allgemeine Anmerkungen:

Positivkontrollen und die DNA-Extraktions- und PCR-Inhibitionskontrolle (CI-PCR) enthalten hohe Konzentrationen an Matrix. Sie müssen vorsichtig gehandhabt werden, um Kontamination zu vermeiden. Um die Funktion der PCR und die Schritte der Extraktion und Real-Time-PCR-Amplifikation zu überprüfen, ist es notwendig, die Positivkontrollen CP-MBcom1 und CP-MBcom2 mit ihrem entsprechendem Triplex 1 bzw. 2 sowie die Negativkontrollen (mitgeliefertes Wasser = CN-H₂O + CI-PCR) zu testen (Einzelheiten dazu finden Sie im Abschnitt II-2/6) des Real-Time-PCR-Verfahrens).

Wir empfehlen, am T-COR 8[®]-IVD Positiv- und Negativkontrollen zu testen, sobald ein neuen Kit geöffnet wird.

II-1/ Verfahrensdiagramm

1 – VORBEREITUNG DER REAKTIONSGEMISCHE / MASTERMIXE

(a) Für direkte CSF-Testung oder für DNA, die ohne CI-CPR extrahiert wurde

(b) DNA, die mit CI-PCR extrahiert wurde

Anzahl der Reaktionen	N+3
Enzym	(N+3) x 12,5 µl
Oligomix 1 oder 2	(N+3) x 7,5 µl
CI-PCR	(N+3) x 1 µl
Gesamtvolumen Mastermix 1 oder 2	(N+3) x 21 µl

Anzahl der Reaktionen	N+3
Enzyme	(N+3) x 12,5 µl
Oligomix 1 oder 2	(N+3) x 7,5 µl
Gesamtvolumen	
Mastermix 1 oder 2	(N+3) x 20 µl

2 – VORBEREITUNG DER REAKTIONEN

Probe

20 µl Mastermix 1 oder 2
+
5µl CSF oder extrahierte DNA

Positivkontrollen

20 µl Mastermix 1	20 µl Mastermix 2
+	+
5µl CP-MBcom1	5µl CP-MBcom2

Negativkontrollen

20 µl Mastermix 1 oder 2
+
5µl mitgeliefertes Wasser (CN-H₂O)

Probe

20 µl Mastermix 1 oder 2
+
5µl CSF oder extrahierte DNA

Positivkontrollen

20 µl Mastermix 1	20 µl Mastermix 2
+	+
5µl CP-MBcom1	5µl CP-MBcom2

Negativkontrollen

20 µl Mastermix 1 oder 2
+
4µl mitgeliefertes Wasser (CN-H₂O)
+
1 µl CI-PCR

3 – REAL-TIME PCR-GERÄT (ausgenommen T-COR 8®-IVD – automatische Programmierung mittels Barcodes- siehe Seiten 79 bis 88)

Programm	Temperatur	Dauer	Zyklus/ Zyklen	
Aufheizung	95°C	10 min	1	-
Denaturierung	95°C	3 min	1	-
Amplifikation	95°C	10 sec	45	-
	60°C	30 sec		Fluoreszenz- erfassung

II-2/ Verfahren im Detail: Für den Nachweis von NM mit Oligomix 1 und für den Nachweis von SP und HI mit Oligomix 2 in der gleichen Weise vorgehen.

- 1) Enzym-Röhrchen homogenisieren und Oligomix 1-, Oligomix 2-, CP-MBcom1-, CP-MBcom2- und CI-PCR-Röhrchen vor Beginn vortexen und zentrifugieren.
- 2) Mastermixe 1 und 2 wie unten beschrieben zubereiten. N ist die Anzahl der Reaktionen (einschließlich Positiv- und Negativkontrollen). Planen Sie durchschnittlich, genügend Reagenzien für N+2-Reaktionen (bis zu 3 getestete Patienten) oder N+3-Reaktionen (mehr als 3 getestete Patienten) vorzubereiten.
(Je nach Bedingung siehe Teil 1-(a) oder 1-(b) des oben aufgeführten Diagramms).

Fall (a): Für direkte *Testung von CSF oder DNA*, die ohne CI-PCR extrahiert wurde

Anzahl der Reaktionen	1	N+3	Beispiel für 3 Patienten N = 7
Enzym	12,5 µl	(N+3) x 12,5 µl	87,5 µl
Oligomix 1 oder 2	7,5 µl	(N+3) x 7,5 µl	52,5 µl
CI-PCR	1 µl	(N+3) x 1 µl	7 µl
Gesamtvolumen Mastermix 1 oder 2	21 µl*	(N+3) x 21 µl	147 µl

* Die Differenz im Volumen zwischen Bedingung (a) oder (b) hat keinen Einfluss auf die Leistung.

Fall (b): Für DNA, die mit CI-PCR extrahiert wurde

Anzahl der Reaktionen	1	N+3	Beispiel für 3 Patienten N = 7
Enzym	12,5 µl	(N+3) x 12,5 µl	87,5 µl
Oligomix 1 oder 2	7,5 µl	(N+3) x 7,5 µl	52,5 µl
Gesamtvolumen Mastermix 1 oder 2	20 µl*	(N+3) x 20 µl	140 µl

- 3) Die unter 2) zubereiteten Mastermixe homogenisieren und kurz zentrifugieren.
- 4) 20 µl Mastermix* 1 oder 2 mit einer Mikropipette und Filterspitzen in jedes Röhrchen/jede Vertiefung der Mikroplatte für die Real-Time-PCR dispensieren.
- 5) 5 µl CSF oder extrahierte DNA-Probe hinzugeben.
- 6) Parallel dazu folgende Kontrollen testen (wenn der T-COR 8®-IVD eingesetzt wird, lesen Sie zu diesem spezifischen Punkt die Seiten 79-88)

- Positivkontrollen:

- 20µl Mastermix 1 + 5µl CP-MBcom1
- 20µl Mastermix 2 + 5µl CP-MBcom2

- Negativkontrollen:

- Fall (a): Direkte Testung von CSF oder DNA, die ohne CI-PCR extrahiert wird
 - 20 µl Mastermix 1 + 5 µl mitgeliefertes Wasser (CN-H₂O)
 - 20 µl Mastermix 2 + 5 µl mitgeliefertes Wasser (CN-H₂O)
- Fall (b) : DNA, die mit CI-PCR extrahiert wird

- 20 µl Mastermix 1 + 4 µl mitgeliefertes Wasser (CN-H₂O) + 1 µl CI-PCR
 - 20 µl Mastermix 2 + 4 µl mitgeliefertes Wasser (CN-H₂O) + 1 µl CI-PCR
- 7) Sofort mit Klebefilm oder transparenten Deckeln verschließen, um jedwede Kontamination zu vermeiden.
 - 8) Kurz zentrifugieren, um das gesamte PCR-Reaktionsgemisch am Boden der Röhrchen oder Platten zu sammeln.
 - 9) Das Real-Time-PCR-Gerät wie folgt programmieren (am T-COR 8®-IVD ist keine Programmierung notwendig, da Barcodes verwendet werden, siehe Seiten 79-88):

Programm	Temperatur	Dauer	Zyklus/ Zyklen	
Aufheizung	95°C	10 min	1	-
Denaturierung	95°C	3 min	1	-
Amplifikation	95°C	10 sec	45	-
	60°C	30 sec		Fluoreszenz- erfassung

Anm. 1: Bei LightCycler ® 480-Systemen (Roche) stehen zwei optische Systeme zur Verfügung: Nur « System II » ist für dieses Kit geeignet. Farbkompensation für folgende Kanäle anwenden: FAM-HEX/VIC- Cy5 (465-510, 533-580, 618-660).

Anm. 2: Bei Applied Biosystems Systems « ROX » in « PASSIVE REFERENCE » auswählen.

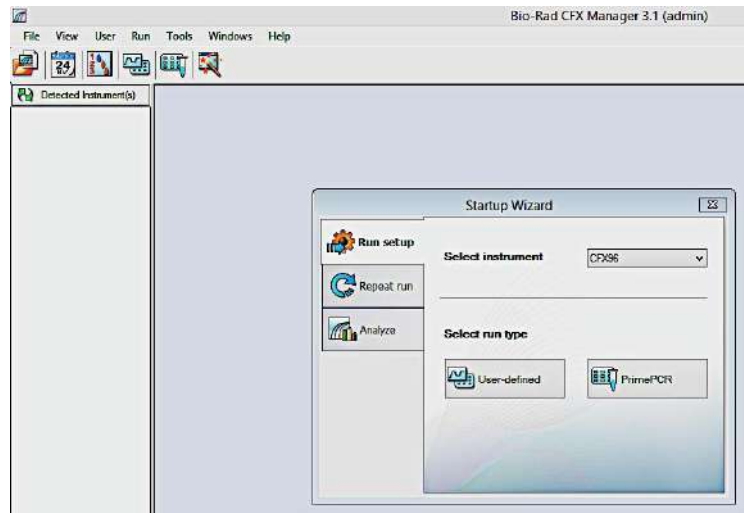
Anm. 3: Am Rotorgene TM bitte das Signal durch Anklicken von « GAIN optimization » kalibrieren.

Anm. 4: Am CFX96 (Biorad) den Lauf mit v1.6 oder neuerer Version der CFX Manager Software starten und mit v3.1 analysieren (siehe § Validierung des Tests)

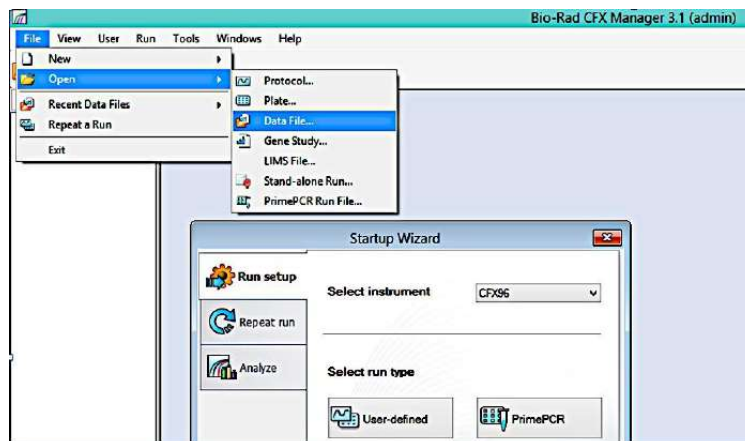
VALIDIERUNG DES TESTS

Die Analyse der Daten nach deren Erfassung an einem CFX96 PCR-Gerät (Biorad) muss mit der Version 3.1 der CFX Manager Software (Biorad) erfolgen. Um diese Version 3.1 für einen Lauf zu verwenden, der mit einer früheren Version gestartet wurde, bitte wie folgt vorgehen: Am Ende des Laufs muss die Datendatei mit der Dateiendung .pcrd geöffnet und mit der Version 3.1 des CFX Manager (Biorad) bearbeitet werden.

Wurde der Lauf beispielsweise mit dem CFX Manager v1.6 durchgeführt, bitte das CFX Manager v3.1 Icon anklicken, um die Datendatei mit dem CFX Manager v3.1 zu öffnen. Das nachfolgende Bildschirmfenster erscheint.

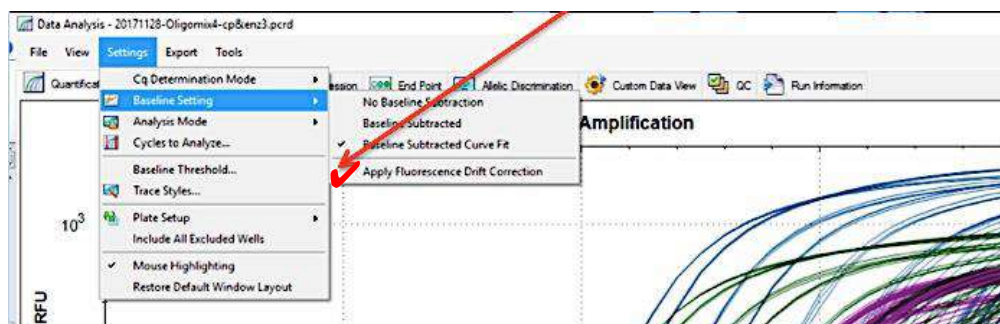


- « File » anklicken und « Open » auswählen, anschließend « Data File » auswählen.



- Die Datei auswählen, die analysiert werden soll, und « Open » anklicken.

In der Registerkarte « Settings » muss die Option « Drift Correction » ausgewählt werden, wie in der Abbildung unten gezeigt: « Settings », dann « Baseline Setting » und anschließend « Apply Fluorescence Drift Correction » anklicken.



Wenn dies erfolgt ist, kann die Analyse beginnen.

Damit der Test gültig ist, müssen die Ergebnisse der Kontrollen wie folgt sein (Tabelle 5). Ansonsten ist der Test ungültig. Wenn der T-COR 8®-IVD eingesetzt wird, empfehlen wir, die Positiv- und Negativkontrollen zu testen, sobald ein neues Kit geöffnet wird.

Tabelle 5:

Positivkontrollen		
Kanal	CP-MBcom1	CP-MBcom2
FAM	Ct ≤ 22	Ct ≤ 21
HEX	Ct ≤ 22	Ct ≤ 21
Negativkontrollen		
Kanal	Negativkontrolle Mastermix 1	Negativkontrolle Mastermix 2
FAM	Ct nicht bestimmt	Ct nicht bestimmt
HEX	Ct nicht bestimmt	Ct nicht bestimmt
CY5	Ct ≤ 35	Ct ≤ 35

CP-MBcom1 und 2: Positivkontrollen der ambulant erworbenen bakteriellen Meningitis (Triplex 1 und Triplex 2)

DATENANALYSE UND AUSWERTUNG

DNA-Extraktions- und PCR-Inhibitionskontrolle in Proben:

Zwei Ergebnisse können erhalten werden:

1/ Der Test der DNA-Extraktions- und PCR-Inhibitionskontrolle (CI-PCR; Kanal Cy5) ist positiv: Das Ergebnis kann bestätigt werden.

2/ Der Test der DNA-Extraktions- und PCR-Inhibitionskontrolle (CI-PCR; Kanal Cy5) ist negativ: Entweder ist keine bakterielle DNA in der Cerebrospinalflüssigkeit verfügbar oder die DNA wurde nicht extrahiert (im Falle einer Extraktion) oder die PCR hat nicht gut funktioniert oder PCR-Inhibitoren hemmen die PCR-Reaktion. Wenn die Cerebrospinalflüssigkeit mit Blut verunreinigt ist, kann dies ebenfalls ein negatives Ergebnis hervorrufen.

Es wird dann empfohlen, eine Extraktion vorzunehmen (falls die CSF zuerst direkt getestet wurde) oder die Extraktion zu wiederholen oder die Probe zu verdünnen, ausgenommen, es erscheint ein spezifisches Signal in allen anderen Kanälen (FAM und HEX).

OLIGOMIX 1:

Für klinische Proben, die mit Oligomix 1 getestet werden, sind folgende Ergebnisse möglich:

*** Ct-Cut-off für Proben:**

Kanal FAM-NM Gen 1 und HEX-NM Gen 2: + Positiv => Positiver Ct (≤ 45)

PCR-Signal			Anwesenheit von NM	Gültigkeit des Tests/Kommentar
FAM	HEX	CY5		
+	+	+	Ja	Gültig
+	-	+	Ja	Gültig
-	+	+	Ja	Gültig
-	-	+	Nein	Gültig
+	-	-	Ja	Gültig: Mögliches Problem durch PCR-Inhibition oder Problem bei der Extraktion, falls sie durchgeführt wurde. Dies verhindert jedoch nicht den Nachweis des Bakteriums.
-	+	-	Ja	Gültig: Mögliches Problem durch PCR-Inhibition oder Problem bei der Extraktion, falls sie durchgeführt wurde. Dies verhindert jedoch nicht den Nachweis des Bakteriums.
-	-	-	Keine Auswertung möglich	Nicht gültig: Mögliches Problem durch PCR-Inhibition oder Problem bei der Extraktion, falls sie durchgeführt wurde – zunächst die Probe 5-mal verdünnen und die PCR wiederholen; falls erforderlich, eine Extraktion noch einmal durchführen.

NM: *Neisseria meningitidis*

OLIGOMIX 2:

Für klinische Proben, die mit Oligomix 2 getestet werden, sind folgende Ergebnisse möglich:

* Ct-Cut-off für Proben:

Kanal FAM-SP und HEX-HI: + Positiv => Positiver Ct (≤ 45)

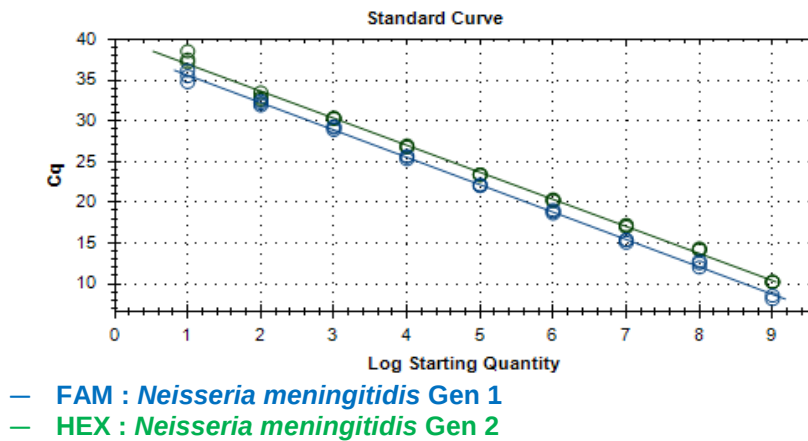
PCR-Signal			Anwesenheit von SP	Anwesenheit von HI	Gültigkeit des Tests/Kommentar
FAM	HEX	CY5			
+	+	+	Ja	Ja	Gültig
+	-	+	Ja	Nein	Gültig
-	+	+	Nein	Ja	Gültig
-	-	+	Nein	Nein	Gültig
+	-	-	Ja	Keine Auswertung möglich	Gültig für SP: Möglicherweise Problem durch PCR-Inhibition oder Problem bei der Extraktion, falls sie durchgeführt wurde. Dies verhindert jedoch nicht den Nachweis von SP. ABER dies könnte den Nachweis von HI verhindern – die Probe 5-mal verdünnen; nicht gültig für HI.
-	+	-	Keine Auswertung möglich	Ja	Gültig für HI: Möglicherweise Problem durch PCR-Inhibition oder Problem bei der Extraktion, falls sie durchgeführt wurde. Dies verhindert jedoch nicht den Nachweis von HI. ABER dies könnte den Nachweis von SP verhindern – die Probe 5-mal verdünnen; nicht gültig für SP.
-	-	-	Keine Auswertung möglich	Keine Auswertung möglich	Nicht gültig: Mögliches Problem durch PCR-Inhibition oder Problem bei der Extraktion, falls sie durchgeführt wurde – zunächst die Probe 5-mal verdünnen und die PCR wiederholen; falls erforderlich, eine Extraktion noch einmal durchführen.

SP: *Streptococcus pneumoniae*; HI : *Haemophilus influenzae*

LEISTUNGSBEWERTUNG

Beispieltest durchgeführt auf dem Real-Time-PCR-Thermocycler CFX96 (Biorad):

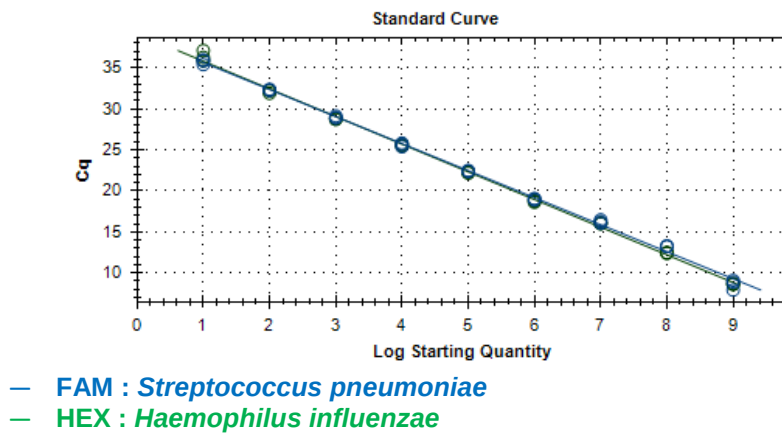
- Mit Oligomix 1:



Analytische Sensitivität: CP-MBcom1: 10 Kopien/μl

Linearität der Quantifizierung: CP-MBcom1 von 10 Kopien/μl bis 10⁹ Kopien/μl

- Mit Oligomix 2:



Analytische Sensitivität: CP-MBcom2: 10 Kopien/μl

Linearität der Quantifizierung: CP-MBcom2 von 10 Kopien/μl bis 10⁹ Kopien/μl

Korrelationskoeffizient und Effizienz

EBX-020 Triplex 1	EBX-020 Triplex 2
Bakterien und Abkürzungen: <i>Neisseria meningitidis</i> (NM) 2 Gene	Bakterien und Abkürzungen: <i>Streptococcus pneumoniae</i> (SP) und <i>Haemophilus influenzae</i> (HI)
Effizienz FAM: NM Gen 1: 98,2 % HEX: NM Gen 2: 101,9 % Korrelationskoeffizient FAM: NM Gen 1: 0,996 HEX: NM Gen 2: 0,995	Effizienz FAM: SP: 100,3 % HEX: HI: 96,3 % Korrelationskoeffizient FAM: SP: 0,993 HEX: HI: 0,994

Variabilität des Signals

EBX-020		INNERHALB des Tests	ZWISCHEN den Tests
	Bakterielle Targets	CV %	CV %
Triplex 1	<i>Neisseria meningitidis</i> Gen 1 (FAM)	0,98	1,87
	<i>Neisseria meningitidis</i> Gen 2 (HEX)	0,61	2,01
Triplex 2	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (FAM)	0,62	2,65
	<i>Haemophilus influenzae</i> (HEX)	0,54	3,52

CV : Variationskoeffizient

Validierung an klinischen Proben

Spezifität und Sensitivität wurden an CSF-Proben (ohne Extraktion der DNA) und Bakterienstämmen (HI-positive Stämme verdünnt in HI-negativer CSF), die zuvor im Referenzlabor getestet worden waren, untersucht.

TRIPLEX 1: EBX-020 Com1

1/ Analytische Spezifität

Neisseria meningitidis Gen 1: 95,5 %*

Neisseria meningitidis Gen 2: 95,5 %*

2/ Analytische Sensitivität

Neisseria meningitidis Gen 1: > 98 %

Neisseria meningitidis Gen 2: > 98 %

3/ Kondordanz

Neisseria meningitidis Gen 1: 96 % (n = 50)

Neisseria meningitidis Gen 2: 96 % (n = 50)

TRIPLEX 2: EBX-020 Com2

1/ Analytische Spezifität

Streptococcus pneumoniae: 95,1 %*

Haemophilus influenzae: > 98 %

2/ Analytische Sensitivität

Streptococcus pneumoniae: > 98 %

Haemophilus influenzae: > 98 %

3/ Konkordanz

Streptococcus pneumoniae: 95,7 % (n = 46)

Haemophilus influenzae: > 98 % (n = 14)

* Beachten Sie, dass Proben, die nicht mit der Referenzmethode, jedoch mit der Eurobio-Methode erkannt wurden, Konzentrationen nahe der Nachweisgrenze aufweisen. Es ist wahrscheinlich, dass der EBX-020 Eurobioplex empfindlicher ist.

Studie über potenziell störende Mikroorganismen: Keines der nachfolgend aufgeführten Bakterien wurde mit dem EBX-020-Kit nachgewiesen (n=1 Probe je Bakterium).

Keine Kreuzreaktivität des Triplex 1 mit:

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Staphylococcus aureus*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Listeria monocytogenes*
- *Escherichia coli*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Bartonella spp*
- *Coxiella burnetii*
- *Mycobacterium avium*
- *Streptococcus oralis mitis sanguis*
- *Francisella tularensis*
- *Mycoplasma*
- *Klebsiella kingae*
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Tropheryma whipplei*

Keine Kreuzreaktivität des Triplex 2 mit:

- *Neisseria meningitidis*
- *Staphylococcus aureus*
- *Listeria monocytogenes*
- *Escherichia coli*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Bartonella spp*
- *Coxiella burnetii*
- *Mycobacterium avium*
- *Mycoplasma*
- *Klebsiella kingae*
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Tropheryma whipplei*

Die Tests wurden am CFX96 durchgeführt.

BESONDERHEITEN DES REAL-TIME-PCR-GERÄTS T-COR 8®-IVD

Der T-COR 8®-IVD ist ein Real-Time-PCR-Gerät mit 8 unabhängigen Vertiefungen, die unabhängig voneinander, Patient für Patient hinsichtlich des thermischen Protokolls, der Tests und der Startzeit des Laufs programmiert werden können.

Die 8 Vertiefungen können auch simultan mit dem gleichen Test verwendet werden.

Bitte beachten: Vortexen Sie die Röhrchen mit dem bereitgestellten T-core Vortexer, bevor Sie sie in den T-COR 8®-IVD stellen, und stellen Sie immer sicher, dass es keine Blasenbildung gibt und dass sich die Flüssigkeit vollständig am Boden des Röhrchens befindet.

Kontrollen

Wir empfehlen, die Positiv- und Negativkontrollen auf dem T-COR 8®-IVD zu testen, sobald ein neues Kit geöffnet wird.

Nach dieser ersten Kontrolle ermöglicht die interne Kontrolle die Überprüfung, ob die PCR ordnungsgemäß funktioniert und keine PCR-Inhibition vorliegt.

Patienten-Tests

Für die Patienten-Tests werden 2 Vertiefungen benötigt, eine für jeden getesteten Oligomix.

<i>Mit Validierung von Positiv- und Negativkontrollen einmalig bei der ersten Verwendung des Kits</i>	9 Reaktionen	36 Reaktionen
Anzahl der möglichen Patienten-Tests, Patient für Patient, mit maximal 3 Gefrier-/Auftau-Zyklen	7 Patienten	34 Patienten

Fluorophore

Vier Kombinationen von Fluorophoren sind am T-COR 8®-IVD verfügbar.

Für alle EBX, wie beispielsweise EBX-020, wird die FAM/HEX/Texas Red/Cy5 Kombination verwendet. Wenn einer der Kanäle (Texas Red für EBX-020) nicht verwendet wird, ist dieser Kanal bei der Auswertung der Ergebnisse nicht zu berücksichtigen.

Verwendung der Barcodes (auf den Seiten 83 bis 88 verfügbar)

1- Menü auswählen > Neuer Lauf (« New Run »)

2- Barcode auswählen

3- Den entsprechenden Barcode auf der rechten Seite des Geräts scannen:

- Für Positivkontrolle 1 oder 2 (Barcode EBX-020 CP1 oder EBX-020 CP2),
- Für Negativkontrolle 1 oder 2 (Barcode EBX-020 CN1 oder EBX-020 CN2),
- Für eine Patientenprobe, die mit Oligomix 1 (Barcode EBX-020 olig1) oder mit Oligomix 2 getestet wird (Barcode EBX-020 olig2)

Das Gerät wählt nach dem Zufallsprinzip eine der 8 verfügbaren Vertiefungen aus. Befolgen Sie die Anweisungen an dem Gerät.

4- Den Deckel der ausgewählten Vertiefung (Vertiefung x) hochklappen, überprüfen, ob das blaue LED-Licht aufleuchtet, und « Yes » auswählen

5- Das Röhrchen in die entsprechende Vertiefung stellen und « Next » auswählen

6- Wenn Sie die Probe mit Namen versehen möchten (optional), « sample x » auswählen, den Namen eingeben und « Accept » auswählen

7- « Next » auswählen

8- Um eine weitere Kontrolle oder Probe hinzuzufügen/zu testen, « Add well » auswählen und zurück zu Schritt 3- gehen

9- « Start run » auswählen

***Beachten Sie:** Der Name einer Probe oder eines Laufs kann nicht verändert oder hinzugefügt werden, nachdem der Lauf beendet ist. Diese Eingabe muss vor oder während des Laufs erfolgen.*

Darstellung und Auswertung der Ergebnisse

Ct-Werte und Amplifikationskurven sind über die SmartCT™-Tabelle (Ct-Werte auf jedem Kanal) und die « Ct versus PCR cycles »-Diagramme verfügbar, beide können während des Laufs in Echtzeit angezeigt werden.

Eine automatische Analyse der Positiv- und Negativkontrollen sowie der Patientenproben steht unter « Interpretations » zur Verfügung, am Ende des Laufs ist sie im « View »-Fenster sichtbar.

Bei Positiv- und Negativkontrollen sind folgende Ergebnisse möglich:

« Neg Ctrl 1 (für Oligomix 1) oder Neg Ctrl 2 (für Oligomix 2) Fail »: Ungültig

« Neg Ctrl 1 (für Oligomix 1) oder Neg Ctrl 2 (für Oligomix 2) Valid »: Gültig

« Pos Ctrl 1 (für Oligomix 1) oder Pos Ctrl 2 (für Oligomix 2) Fail »: Ungültig

« Pos Ctrl 1 (für Oligomix 1) oder Pos Ctrl 2 (für Oligomix 2) Valid »: Gültig

Statusbestimmung der Patienten-Proben:

« Detected »: Positiv auf mindestens ein Target getestet * → grüne Box

« Not detected »: Negativ → rote Box

* Für jeden Oligomix werden die Ergebnisse in Bezug auf bestimmte Bakterien oder Gene spezifiziert.

ACHTUNG !

Wenn die Box grün ist, ist es wichtig, den Status für jedes Target abzulesen, da manche Targets negativ sein können.

« Invalid »: Ungültiger Test -> erneut testen

Beispiel für die Darstellung der automatischen Auswertung der Ergebnisse am T-COR 8®-IVD-Gerätebildschirm und im Bericht:

- Für gültige Positiv- und Negativkontrollen; für die Nachweisgrenze (LOD), die mit « Detected » in Bezug auf die entsprechenden Targets angezeigt wird; für eine auf beide Oligomixe negativ getestete Probe, die mit « Not Detected » in Bezug auf die entsprechenden Targets angezeigt wird.

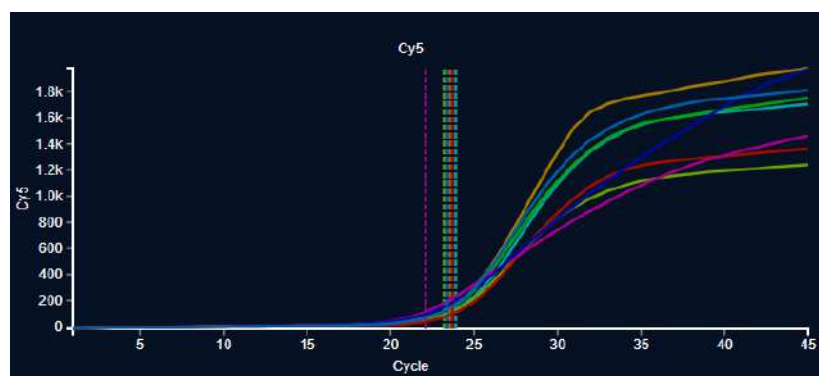
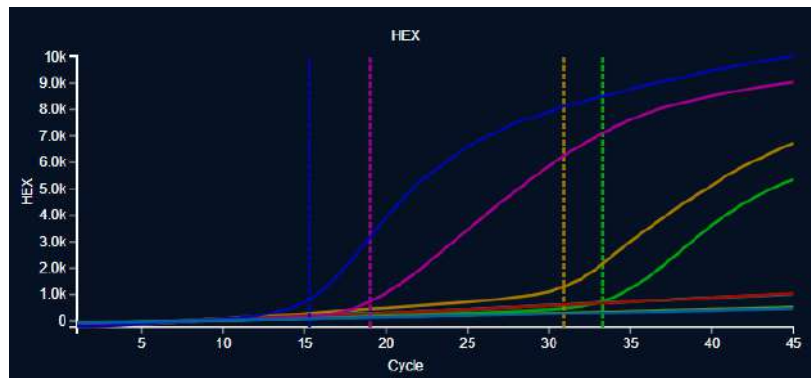
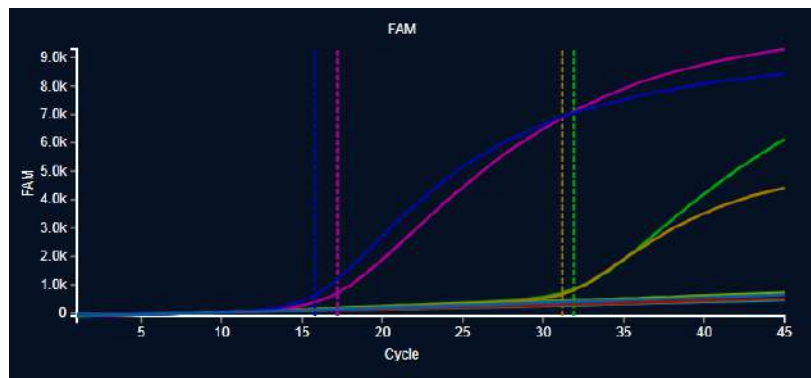
❖ Am Gerätebildschirm:

Interpretations		
1	CN2	EBX-020 CN2
Detected: Neg Ctrl 2 Valid		
2	LOD OLIGO1	EBX-020 olig1
Detected: N. men gene 2, N. men gene 1		
3	Sample 1	EBX-020 olig1
Not Detected - N. men		
4	LOD OLIGO2	EBX-020 olig2
Detected: H. Inf, S. pneumo		
5	Sample 1	EBX-020 olig2
Not Detected - S. pneumo, H. inf		
6	CP1	EBX-020 CP1
Detected: Pos Ctrl 1 Valid		
7	CP2	EBX-020 CP2
Detected: Pos Ctrl 2 Valid		
8	CN1	EBX-020 CN1
Detected: Neg Ctrl 1 Valid		

❖ Im Bericht:

Summary								
Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5	Call	Note
1	CN2	EBX-020 CN2				23.9	Detected • Neg Ctrl 2 Valid	
2	LOD OLIGO1	EBX-020 olig1	31.9	33.3		23.4	Detected • N. men gene 2 • N. men gene 1	
3	Sample 1	EBX-020 olig1				23.2	Not Detected	N. men
4	LOD OLIGO2	EBX-020 olig2	31.2	30.9		23.6	Detected • H. inf • S. pneumo	
5	Sample 1	EBX-020 olig2				23.7	Not Detected	S. pneumo, H. inf
6	CP1	EBX-020 CP1	17.2	19.0		22.1	Detected • Pos Ctrl 1 Valid	
7	CP2	EBX-020 CP2	15.8	15.3		23.4	Detected • Pos Ctrl 2 Valid	
8	CN1	EBX-020 CN1				23.4	Detected • Neg Ctrl 1 Valid	

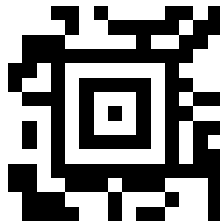
Beispiel für Amplifikationskurven:



Barcodes für EBX-020 zur Verwendung am T-COR8®-IVD

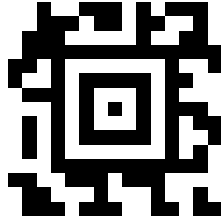
EBX-020 CN1

**Wasser = Negativkontrolle (CN-H₂O)
(Testung mit Oligomix 1)**



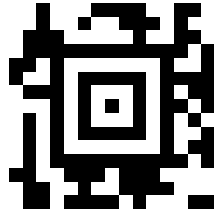
EBX-020 CN2

Wasser = Negativkontrolle (CN-H₂O)
(Testung mit Oligomix 2)



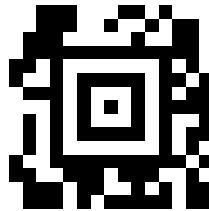
EBX-020 CP1

**Positivkontrolle CP-MBcom1
(Testung mit Oligomix 1)**



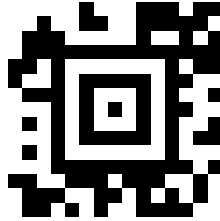
EBX-020 CP2

**Positivkontrolle CP-MBcom2
(Testung mit Oligomix 2)**



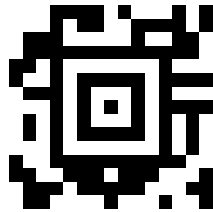
EBX-020 olig1

(Testung mit Oligomix 1)



EBX-020 olig2

(Testung mit Oligomix 2)



LITERATUR

- Van de Beek et al (2006). Community-acquired bacterial meningitis in adults in the Netherlands, 2006–14: a prospective cohort study. In *The Lancet Infectious Diseases*. March 2016 16(3):339-347.
- Cohen-Bacrie S, Ninove L, Nougairé A, Charrel R, Richet H, et al. (2011) Revolutionizing Clinical Microbiology Laboratory Organization in Hospitals with In Situ Point-of-Care. *PLoS ONE* 6(7): e22403.
- Hotomi M, Togawa A, Kono M, Sugita G, Sugita R, et al. (2013) An Application of Outer Membrane Protein P6-Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of *Haemophilus influenzae* in Middle Ear Fluids and Nasopharyngeal Secretions. *PLoS ONE* 8(8): e71774.
- Brouwer MC, Tunkel AR, van de Beek D. (2010) Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev.* 2010 Jul;23(3):467-92.
- Corless C.E, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox A.J and Kaczmarek E.B. (2001). Simultaneous Detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in Suspected Cases of Meningitis and Septicemia Using Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39(4):1553.
- <http://www.sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/corpus/disciplines/pedia/malinfped/96/leconimprim.pdf>. BOST-BRU C. et PLANTAZ D.
- http://opac.invs.sante.fr/doc_num.php?explnum_id=8208 Epidémiologie des méningites aiguës en France. Parent I. Paris. Institut de Veille Sanitaire. 2012.
- http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/_documents/consensus/Meningites_consensus-long.pdf. 17^e conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse. Prise en charge des méningites bactériennes aiguës communautaires (à l'exclusion du nouveau-né). 2008. Raffi F. et Duval X.
- http://www.biomnis.com/referentiel/liendoc/precis/HAEMOPHILUS_INFLUENZAE.pdf. Biomnis. Précis de biopathologie Analyses médicales spécialisées. 2012
- Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, Recommandations de bonnes pratiques, www.has-santé.fr

ABFALLENTSORGUNG

Der Abfall ist gemäß den Bestimmungen über die Entsorgung von infektiösem Material zu entsorgen.

SYMBOLE

	Bestellnummer
	Chargenbezeichnung
	Höchste Lagertemperatur
	Verfallsdatum
	Inhalt ausreichend für « N » Reaktionen
	Vor Lichteinstrahlung schützen
	Hersteller
	Gebrauchsanweisung
	CE-gezeichnetes Produkt
	In-vitro-Diagnostikum



eurobio
SCIENTIFIC

ZA de Courtaboeuf
7, avenue de Scandinavie
91940 Les Ulis Cedex
FRANKREICH