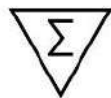




**EurobioPlex**  
*Méningite bactérienne nosocomiale*  
**PCR EN TEMPS REEL**

Pour la PCR **qualitative** en temps réel

**REF** EBX-021

 **9 réactions**  
**36 réactions**



Version 4.00 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

**Conditions de stockage:**

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



Mode d'emploi

## SOMMAIRE

|                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Utilisation .....</b>                                          | <b>2</b>  |
| <b>Introduction .....</b>                                         | <b>2</b>  |
| <b>Principe de la détection .....</b>                             | <b>3</b>  |
| <b>Description et contenu du kit .....</b>                        | <b>4</b>  |
| <b>Conservation .....</b>                                         | <b>5</b>  |
| <b>Précautions et notes .....</b>                                 | <b>5</b>  |
| <b>Collecte des échantillons, transport et conservation .....</b> | <b>6</b>  |
| <b>Procédure .....</b>                                            | <b>7</b>  |
| <b>I-Extraction d'ADN .....</b>                                   | <b>7</b>  |
| <b>II-Réalisation de la PCR en temps réel.....</b>                | <b>8</b>  |
| II-1/ Schéma de la procédure.....                                 | 9         |
| II-2/ Procédure détaillée .....                                   | 10        |
| <b>Validation de l'expérimentation .....</b>                      | <b>11</b> |
| <b>Analyse des données et interprétation .....</b>                | <b>13</b> |
| <b>Analyse des performances .....</b>                             | <b>14</b> |
| <b>Bibliographie .....</b>                                        | <b>16</b> |
| <b>Elimination des déchets .....</b>                              | <b>16</b> |
| <b>Symboles .....</b>                                             | <b>17</b> |

## UTILISATION

Le test EBX-021 est un test d'amplification génique 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 deux bactéries les plus fréquemment impliquées dans l'étiologie de la méningite bactérienne nosocomiale (MBnoso) : *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. 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-021 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. Il existe quatre sources principales de surveillance de la méningite bactérienne 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).

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.

Une méningite est dite nosocomiale si elle survient à l'hôpital (plus de 48 heures après le début de l'hospitalisation) ou si elle fait suite à un geste potentiellement contaminant (ponction lombaire, intervention neurochirurgicale). La fréquence relative des méningites nosocomiales par rapport à celles d'origine communautaire augmente depuis les années 1960. Elle est d'environ 50 % actuellement. Les facteurs qui prédisposent à la méningite bactérienne nosocomiale sont nombreux et différents de ceux rencontrés dans les méningites communautaires. Ces facteurs sont principalement les interventions neurochirurgicales récentes (fuite de LCR, infection de la cicatrice), la présence d'un appareillage neurochirurgical, mais aussi l'immunodépression liée notamment au diabète ou à la dénutrition. Les méningites nosocomiales postopératoires représentent la moitié des infections après

neurochirurgie. La réaction inflammatoire locale induite par un corps étranger favorise les infections en diminuant les systèmes de défense de l'hôte à ce niveau. Ces infections sont graves avec une morbidité variable selon le terrain et le germe responsable, pouvant aller jusqu'à 50 % de séquelles neurologiques et une mortalité d'environ 15 à 16 %, jusqu'à 38 % chez les patients âgés de plus de 60 ans. La mortalité reste avant tout le fait de l'affection sous-jacente et augmente en cas de germes multirésistants. Le pronostic vital est rapidement engagé si l'antibiothérapie ciblée tarde et que le matériel foyer de l'infection n'est pas retiré. Que la méningite bactérienne soit avérée ou suspectée, elle constitue ainsi une urgence diagnostique et thérapeutique absolue.

#### 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. De plus, la symptomatologie clinique de la méningite bactérienne nosocomiale est souvent peu parlante, en particulier dans un contexte post-opératoire ou post-traumatique. 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 bactéries retrouvées en cas de méningite nosocomiale sont différentes de celles retrouvées dans les méningites communautaires. Les bacilles à Gram négatifs et les staphylocoques sont le plus souvent rencontrés. Il s'agit principalement de *Pseudomonas aeruginosa* (40% des cas) et *Staphylococcus aureus* (10% des cas). Le diagnostic rapide et ciblé par amplification génique en temps réel de l'ADN est la technique présentant la meilleure sensibilité et spécificité.

### **PRINCIPE DE LA DETECTION**

L'Eurobioplex EBX-021 est un test d'amplification des acides nucléiques ADN bactériens de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, 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 dans un seul puits/tube.

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

Ce kit est un triplex : *Staphylococcus aureus* (SA), *Pseudomonas aeruginosa* (PA) + contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (CI-PCR). L'ADN de SA et PA est respectivement détecté à l'aide d'une sonde marquée FAM et HEX. Le contrôle

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

## DESCRIPTION ET CONTENU DU KIT

Le kit de PCR en temps réel EBX-021 est prêt à l'emploi pour la détection spécifique de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

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

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

**Tableau 1 :**

| Cible                                 | Fluorophore | Excitation | Emission |
|---------------------------------------|-------------|------------|----------|
| <i>Staphylococcus aureus</i>          | FAM         | 495 nm     | 515 nm   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>         | HEX         | 535 nm     | 555 nm   |
| Contrôle d'inhibition de PCR (CI-PCR) | Cy5         | 647 nm     | 667 nm   |

Canaux équivalents sur différents instruments de PCR:

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

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

**Tableau 2 :**

| Couleur de Bouchon | Contenu du kit                               | 9 réactions | 36 réactions | Reconstitution  |
|--------------------|----------------------------------------------|-------------|--------------|-----------------|
| <b>Rouge</b>       | ENZYME                                       | 2 x 100 µl  | 8 x 100 µl   | Prêt à l'emploi |
| <b>Transparent</b> | OLIGOMIX                                     | 2 x 60 µl   | 8 x 60 µl    | Prêt à l'emploi |
| <b>Jaune</b>       | Contrôle Positif CP-MBnoso                   | 2 x 15 µl   | 8 x 15 µl    | Prêt à l'emploi |
| <b>Blanc</b>       | Contrôle d'inhibition de PCR (CI-PCR)        | 2 x 50 µl   | 8 x 50 µl    | Prêt à l'emploi |
| <b>Bleu</b>        | Eau = contrôle négatif (CN-H <sub>2</sub> O) | 2 x 500 µl  | 8 x 500 µl   | Prêt à l'emploi |

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

**Tableau 3 : Nombre de tests patients pour les formats 9 et 36 réactions**

|                                                                                                                | 9 Réactions | 36 Réactions |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|--------------|
| * Nombre de tests patients possible patient par patient avec <b>recongélation/décongélation 3 fois maximum</b> | 6 patients  | 24 patients  |
| * Nombre maximum de tests patients possible 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-Ingen.
- ◇ 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 ECHANTILLONS, 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 asepsie 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. 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-021, 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:

Le contrôle positif ainsi que le contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (CI-PCR) contiennent des concentrations élevées de matrice. Les manipulations doivent être réalisées précautionneusement pour éviter toute contamination. Pour contrôler le bon fonctionnement de la PCR, il est nécessaire de tester le contrôle positif CP-MBnoso ainsi que le contrôle négatif (eau PCR fournie = CN-H<sub>2</sub>O + CIPCR) (voir II-2/ 6) du protocole de PCR en temps réel).

## II-1/ Schéma de la procédure

### 1 - PREPARATION MELANGE REACTIONNEL / 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               | (N+3) x 7.5 µl  |
| CI-PCR                 | (N+3) x 1 µl    |
| Volume total Mastermix | (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               | (N+3) x 7.5 µl  |
| Volume total Mastermix | (N+3) x 20 µl   |



### 2 - PREPARATION DES REACTIONS

#### Echantillon

20 µl de Mastermix  
+  
5µl LCR ou ADN extrait

#### Contrôle positif

20 µl de Mastermix  
+  
5µl CP-MBnoso

#### Contrôle Négatif

20 µl de Mastermix  
+  
5µl Eau biologie moléculaire (CN-H<sub>2</sub>O)

#### Echantillon

20 µl de Mastermix  
+  
5µl LCR ou ADN extrait

#### Contrôle positif

20 µl de Mastermix  
+  
5µl CP-MBnoso

#### Contrôle Négatif

20 µl de Mastermix  
+  
4µl Eau biologie moléculaire (CN-H<sub>2</sub>O)  
+  
1 µl CI-PCR



### 3 – INSTRUMENT PCR EN TEMPS REEL

| Programme     | Température | Durée  | Cycle(s) |                             |
|---------------|-------------|--------|----------|-----------------------------|
| Chauffe       | 95°C        | 10 min | 1        | -                           |
| Dénaturation  | 95°C        | 3 min  | 1        | -                           |
| Amplification | 95°C        | 10 sec | 45       | -                           |
|               | 60°C        | 30 sec |          | Acquisition de fluorescence |

## II-2/ Procédure détaillée :

- 1) Homogénéiser le tube d'Enzyme, et vortexer Oligomix, CP-MBnos et CI-PCR, puis centrifuger.
- 2) Préparer le Mastermix comme ci-dessous, N étant le nombre de réactions (incluant les contrôles positif et négatif), prévoir la quantité de Mastermix pour N+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<br>N = 7 |
|---------------------------|---------|-----------------|----------------------------------|
| Enzyme                    | 12.5 µl | (N+3) x 12.5 µl | 87.5 µl                          |
| Oligomix                  | 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<br>Mastermix | 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<br>N = 7 |
|---------------------------|---------|-----------------|----------------------------------|
| Enzyme                    | 12.5 µl | (N+3) x 12.5 µl | 87.5 µl                          |
| Oligomix                  | 7.5 µl  | (N+3) x 7.5 µl  | 52.5 µl                          |
| Volume total<br>Mastermix | 20 µl*  | (N+3) x 20 µl   | 140 µl                           |

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

- 3) Homogénéiser le Mastermix préparés en 2) et centrifuger brièvement.
- 4) Distribuer 20 µL de Mastermix\* à l'aide d'une micropipette et d'embouts à filtre dans chaque tube/puits de microplaque pour PCR en temps réel.
- 5) Ajouter 5 µL d'échantillon de LCR (ou ADN extrait).
- 6) En parallèle réaliser les contrôles suivants :

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

- Contrôle négatif :

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

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

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

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

- 7) Fermer immédiatement avec un film adhésif ou bouchons transparents pour éviter toute contamination.

- 8) Centrifuger brièvement pour collecter le mélange réactionnel au fond des tubes ou des puits de microplaque.
- 9) Réaliser le programme suivant sur l'instrument de PCR en temps réel.

| Programme            | Température | Durée  | Cycle(s) |                             |
|----------------------|-------------|--------|----------|-----------------------------|
| <b>Chauffe</b>       | 95°C        | 10 min | 1        | -                           |
| <b>Dénaturation</b>  | 95°C        | 3 min  | 1        | -                           |
| <b>Amplification</b> | 95°C        | 10 sec | 45       | -                           |
|                      | 60°C        | 30 sec |          | Acquisition de fluorescence |

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

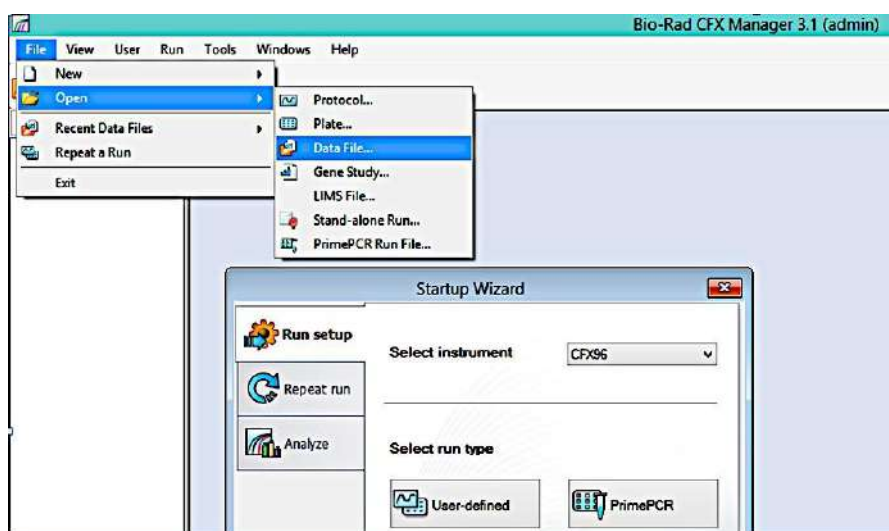
## VALIDATION DE L'EXPERIMENTATION

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.

**Tableau 5 :**

| Contrôle positif |                          |
|------------------|--------------------------|
| FAM              | Ct ≤ 21                  |
| HEX              | Ct ≤ 21                  |
| Contrôle Négatif |                          |
| FAM              | Ct non déterminé         |
| HEX              | Ct ≥ 38 ou non déterminé |
| CY5              | Ct ≤ 35                  |

## ANALYSE DES DONNEES ET INTERPRETATION

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

Deux résultats peuvent être obtenus :

1/ le test du contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (CI-PCR ; canal Cy5) est positif ; 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 testé sur LCR direct), ou de répéter l'extraction, ou de diluer l'échantillon, sauf si un signal spécifique apparaît dans les canaux cibles (FAM et HEX).

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

**\*Seuil de Ct pour échantillons :**

**Canal FAM *Staphylococcus aureus* : + Positif => Ct positif (≤ 45)**

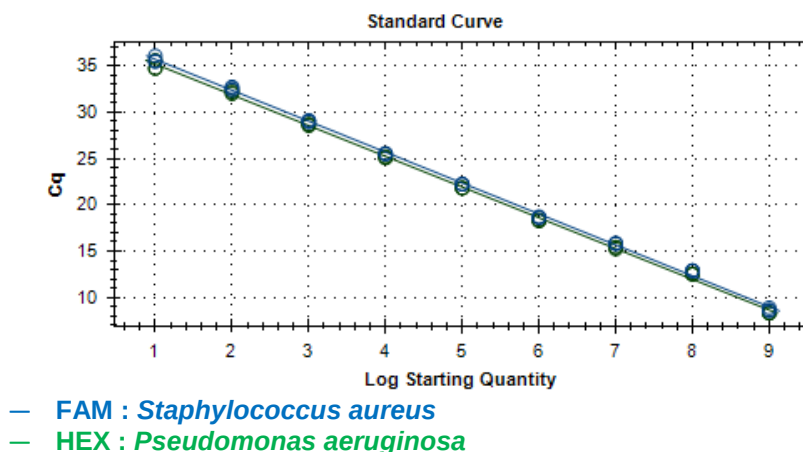
**Canal HEX *Pseudomonas aeruginosa* : + Positif => Ct positif et < 38**

| Signal PCR |     |     | Présence<br>de SA | Présence<br>de PA | Validité du test/commentaire                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|------------|-----|-----|-------------------|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FAM        | HEX | CY5 |                   |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| +          | +   | +   | Oui               | Oui               | <b>valide</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| +          | -   | +   | Oui               | Non               | <b>valide</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| -          | +   | +   | Non               | Oui               | <b>valide</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| -          | -   | +   | Non               | Non               | <b>valide</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| +          | -   | -   | Oui               | Non interprétable | <b>Valide pour SA</b> : possible inhibition de PCR ou problème d'extraction si réalisée, qui n'empêche pas la détection de SA.<br><b>Non valide pour PA</b> : possible inhibition de PCR ou problème d'extraction si réalisée, qui empêcherait la détection de PA - diluer 5x l'échantillon ; si même résultat réextraire l'échantillon |
| -          | +   | -   | Non interprétable | Oui               | <b>Valide pour PA</b> : possible inhibition de PCR ou problème d'extraction si réalisée, qui n'empêche pas la détection de PA.<br><b>Non valide pour SA</b> : possible inhibition de PCR ou problème d'extraction si réalisée, qui empêcherait la détection de SA - diluer 5x l'échantillon ; si même résultat réextraire l'échantillon |
| -          | -   | -   | Non interprétable | Non interprétable | <b>Non valide</b> : Inhibition d'extraction ou de PCR - diluer 5x l'échantillon ; si même résultat réextraire l'échantillon                                                                                                                                                                                                             |

SA : *Staphylococcus aureus* ; PA : *Pseudomonas aeruginosa*

## ANALYSE DES PERFORMANCES

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



**Sensibilité analytique:** CP-MBnoso: 10 copies/microl

**Linéarité de quantification :** CP-MBnoso: 10 copies/microl à  $10^9$  copies/microl

### Coefficient de corrélation et efficacité

#### Efficacité

FAM: SA: 96.0 %

HEX: PA: 98.9 %

#### Coefficient de corrélation

FAM: SA: 0.998

HEX: PA: 0.998

*Staphylococcus aureus* (SA) et *Pseudomonas aeruginosa* (PA)

### Variabilité du signal

| EBX-021                             | INTRA-experience | INTER-experiences |
|-------------------------------------|------------------|-------------------|
| Bactéries cibles                    | CV %             | CV %              |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (FAM)  | 1.31             | 0.64              |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (HEX) | 1.89             | 4.84              |

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) prétestés par le laboratoire de référence.

### 1/ spécificité analytique

*Staphylococcus aureus* : > 98%

*Pseudomonas aeruginosa* : > 98%

### 2/ sensibilité analytique

*Staphylococcus aureus* : > 98%

*Pseudomonas aeruginosa* : > 98%

### 3/ concordance analytique

*Staphylococcus aureus* : > 98% (n = 48)

*Pseudomonas aeruginosa* : > 98% (n = 49)

## Etude des interférents éventuels : aucune interférence

### Pas de cross réactivité:

- *Staphylococcus aureus* sur *Pseudomonas aeruginosa* (n=4) = 0 %
- *Pseudomonas aeruginosa* sur *Staphylococcus aureus* (n=6) = 0 %

1 échantillon de chaque bactérie ci-dessous a été également testé pour :

- *Neisseria meningitidis*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenza*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Listeria monocytogenes*
- *Escherichia coli*
- *Bartonella spp*
- *Coxiella burnetii*
- *Mycobacterium avium*
- *Klebsiella kingae*

Les tests ont été réalisés sur CFX96.

## 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 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.

Charvet A, Garcin F, Albanèse J, Martin C (2009). Méningites nosocomiales. *Antibiotiques*, Volume 11, Issue 1, February 2009, Pages 18-28

<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](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](http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/_documents/consensus/Meningites_consensus-long.pdf). 17<sup>e</sup> 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](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](http://www.has-santé.fr)

## ELIMINATION DES DECHETS

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

## SYMBOLES

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



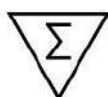
ZA de Courtaboeuf  
 7, avenue de Scandinavie  
 91940 Les Ulis Cedex  
 FRANCE



**EurobioPlex**  
*Nosocomial bacterial meningitis*  
**REAL-TIME PCR**

For **qualitative** real-time PCR

**REF** EBX-021



**9 reactions**  
**36 reactions**



Version 4.00 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

**Storage conditions:**

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



Instructions for use

|                          |
|--------------------------|
| <b>TABLE OF CONTENTS</b> |
|--------------------------|

|                                                        |           |
|--------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Intended use .....</b>                              | <b>20</b> |
| <b>Introduction .....</b>                              | <b>20</b> |
| <b>Principle of detection .....</b>                    | <b>21</b> |
| <b>Description and content of the kit .....</b>        | <b>22</b> |
| <b>Storage .....</b>                                   | <b>23</b> |
| <b>Cautions and notes .....</b>                        | <b>23</b> |
| <b>Samples collection, transport and storage .....</b> | <b>24</b> |
| <b>Procedure .....</b>                                 | <b>25</b> |
| <b>I- DNA extraction .....</b>                         | <b>25</b> |
| <b>II- Real-time PCR procedure .....</b>               | <b>25</b> |
| II-1/ Diagram of the procedure .....                   | 26        |
| II-2/ Detailed procedure .....                         | 27        |
| <b>Validation of the experiment .....</b>              | <b>28</b> |
| <b>Data analysis and Interpretation .....</b>          | <b>29</b> |
| <b>Performance analysis.....</b>                       | <b>30</b> |
| <b>Bibliography .....</b>                              | <b>32</b> |
| <b>Waste disposal .....</b>                            | <b>32</b> |
| <b>Symbols .....</b>                                   | <b>33</b> |

## INTENDED USE

The EBX-021 test uses real-time polymerase chain reaction (PCR) amplification and is designed for the qualitative detection from cerebrospinal fluid (CSF) of the two most frequently involved bacteria in the etiology of nosocomial Bacterial Meningitis (MBnoso): *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **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-021 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. 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.

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.

Meningitis is known as nosocomial if it occurs at the Hospital (more than 48 hours after the beginning of hospitalization) or if it follows a gesture that leads to contamination (lumbar puncture, neurosurgical intervention). The relative frequency of nosocomial meningitis compared with those of Community-acquired meningitis origin increased since the 1960s. It is about 50% currently. Factors that predispose to nosocomial bacterial meningitis are mainly recent neurosurgical interventions (CSF leakage, wound infection), the presence of a neurosurgical device, but also the immunosuppression related to diabetes or undernutrition. Postoperative nosocomial meningitis represents half of the infections after neurosurgery. The local inflammatory reaction induced by a foreign body promotes infections by reducing the defense systems of the host. These infections are serious with variable morbidity, neurological sequelae in up to 50% cases, on average 15% mortality, up to 38% in patients over age 60. The main cause of mortality remains infection (primitive and secondary infections) and increases in case of multidrug resistant germs. Patients' life is at stake if targeted antibiotic treatment is delayed and if the infectious material is not removed. Whether bacterial meningitis is proven or suspected, it remains an absolute diagnostic and therapeutic emergency.

### Diagnosis:

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. Moreover, the clinical symptoms of nosocomial bacterial meningitis are not often clear, especially in a post-operative or post-traumatic context. 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 bacteria found in the case of nosocomial meningitis are different from those found in community-acquired meningitis. Gram-negative bacilli and *Staphylococcus* are most often encountered. These are mainly *Pseudomonas aeruginosa* (40% of cases) and *Staphylococcus aureus* (10% of cases). The rapid and targeted diagnosis by polymerase chain reaction in real-time from the DNA of bacterial pathogens is the technique with the best sensitivity and specificity.

## **PRINCIPLE OF DETECTION**

The Eurobioplex EBX-021 is a test using real-time PCR amplification of bacterial DNA of *Staphylococcus aureus* (SA) and *Pseudomonas aeruginosa* (PA), 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 or in a single well/tube.

The DNA extraction and PCR inhibition control allows to checks for variations that may occur during the DNA extraction step of biological samples and real-time PCR amplification. Thus, it ensures that a negative result may not be due to a 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 is composed of one triplex: *Staphylococcus aureus* (SA), *Pseudomonas aeruginosa* (PA) + control of DNA extraction and PCR inhibition (CI-PCR). DNA of SA and PA is respectively detected using FAM and HEX labeled probes. DNA extraction and PCR inhibition control is detected using a CY5 labeled probe. All probes emit a specific fluorescence following their hydrolysis during the elongation of the amplification product. The measurement of the intensities of real-time fluorescence correlates with the accumulation of specific amplification products.

## DESCRIPTION AND CONTENT OF THE KIT

The real-time PCR EBX-021 kit is ready to use for the specific detection of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

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

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

**Table 1 :**

| Target                          | Fluorophore | Excitation | Emission |
|---------------------------------|-------------|------------|----------|
| <i>Staphylococcus aureus</i>    | FAM         | 495 nm     | 515 nm   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | HEX         | 535 nm     | 555 nm   |
| PCR inhibition control (CI-PCR) | Cy5         | 647 nm     | 667 nm   |

Equivalent channels on different real time PCR cyclers:

- Channel **FAM** (ABI Systems, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96, Systems Mx), Channel 510 (LC 480), Channel Green (RotorGene)
- Channel **HEX** (Chromo 4/CFX96, Mx Systems), Channel VIC (ABI Systems), Channel Alexa532 (SmartCycler II), Channel 580 (LC 480), Channel Yellow (RotorGene),
- Channel **Cy5** (ABI Systems, Chromo 4/CFX96, Mx Systems), 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 |
|--------------------|-----------------------------------|-------------|--------------|----------------|
| <b>Red</b>         | ENZYME                            | 2 x 100 µl  | 8 x 100 µl   | Ready to use   |
| <b>Transparent</b> | OLIGOMIX                          | 2 x 60 µl   | 8 x 60 µl    | Ready to use   |
| <b>Yellow</b>      | Positive Control CP-MBnoso        | 2 x 15 µl   | 8 x 15 µl    | Ready to use   |
| <b>White</b>       | PCR inhibition control (CI-PCR)   | 2 x 50 µl   | 8 x 50 µl    | Ready to use   |
| <b>Blue</b>        | Water = negative control (CN-H2O) | 2 x 500 µl  | 8 x 500 µl   | Ready to use   |

Oligomix : contains the primers and probes of the triplex (SA+PA+CI-PCR)

**Table 3: Number of patients tests according to the EBX format (9 or 36 reactions)**

|                                                                                                        | 9 Reactions | 36 Reactions |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|--------------|
| * Number of possible patients tests patient-by-patient with <b>maximum 3 defrost/refreezing cycles</b> | 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 if the tubes have been damaged, contact Eurobio-Ingen.
- ◇ Once defrosted, spin down briefly the tubes before use.
- ◇ Use of ice or cooling block is advised in case of long delay due for instance to large number of samples or high temperature.
- ◇ 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 at room temperature 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 (preferentially -80°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-021 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.

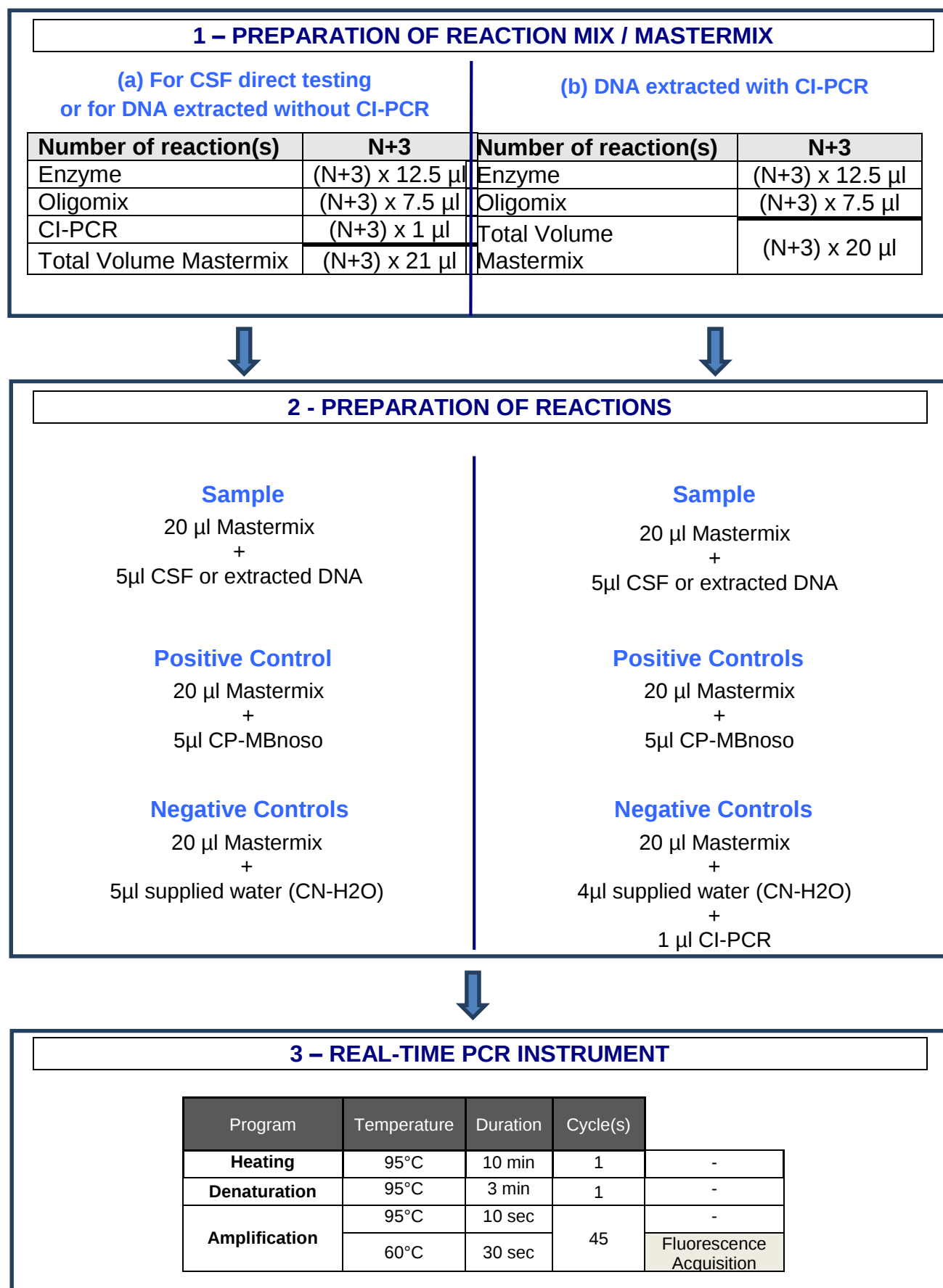
CI-PCR is also available separately from Eurobio (Ref EurobioPlex EBX-002).

### **II- Real-time PCR procedure**

#### **General comment:**

Positive control and the DNA extraction and PCR inhibition control (CI-PCR) contain a very high concentration of matrix. Manipulations must be performed carefully to avoid contamination. To control the functioning of the PCR and steps of extraction and real-time PCR amplification, it is necessary to test the positive control CP-MBnos0 as well as the negative controls (water supplied = CN-H<sub>2</sub>O + CI-PCR) (see II-2/6) of real-time PCR procedure).

## II-1/ Diagram of the procedure



## II-2/ Detailed procedure

- 1) Homogenize the tube of Enzyme, and vortex Oligomix, CP-MBnoso, and CI-PCR tubes before starting, and centrifuge.
- 2) Prepare Mastermix as below; prepare the reaction mix as follows by multiplying by the number of samples N to test (including positive and negative controls). 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              | 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 mastemix | 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              | 7.5 µl  | (N+3) x 7.5 µl  | 52.5 µl                      |
| Total volume mastemix | 20 µl*  | (N+3) x 20 µl   | 140 µl                       |

- 3) Homogenize mastermix prepared in 2) and centrifuge briefly
- 4) Distribute 20 µL Mastermix\* using a micropipette and filtered tips in each tube or well of microplate for real time PCR.
- 5) Add 5 µL of CSF or extracted DNA sample.
- 6) In parallel, test the following controls:
  - Positive control:
    - 20µL of mastermix + 5µL of CP-MBnoso
  - Negative control:
    - Case (a): for CSF direct testing or for DNA extracted without CI-PCR
      - 20 µL mastermix + 5 µL supplied water (CN-H2O)
    - Case (b): for DNA extracted with CI-PCR
      - 20 µL mastermix + 4 µL water supplied (CN-H2O) + 1 µL CI-PCR
- 7) Close immediately with an adhesive film or transparent caps to avoid contamination.
- 8) Centrifuge briefly to collect all the PCR reaction mix at the bottom of the tubes or plate.
- 9) Program the real-time PCR instrument as follows:

| 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 the following channels: FAM-HEX/VIC-Cy5 (465-510,533-580,618-660).

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

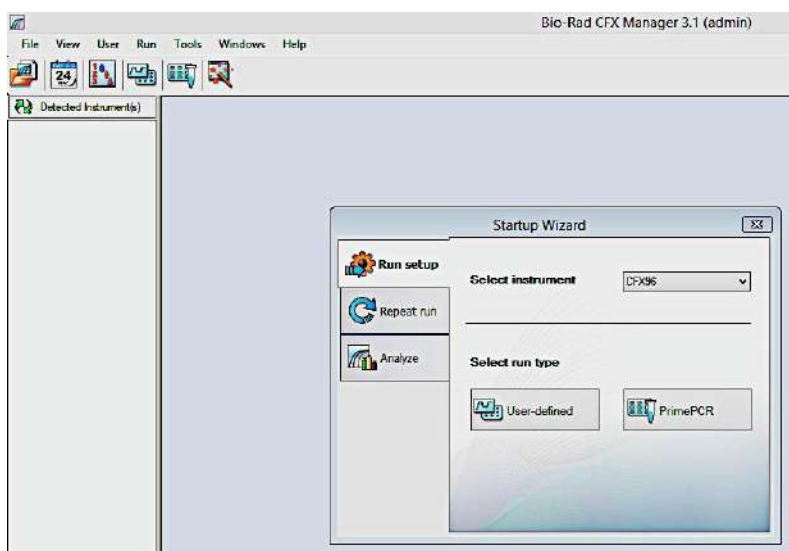
Note 3: On Rotorgene ™, please calibrate the signal by clicking on "GAIN optimization".

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

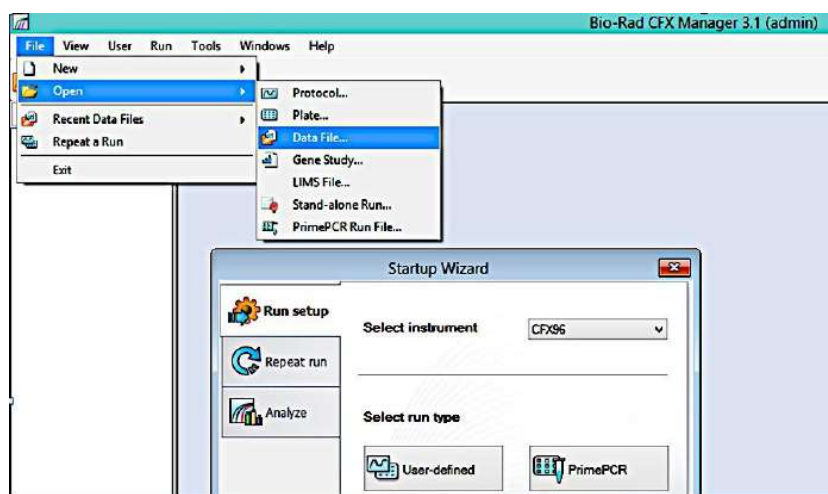
## VALIDATION OF THE EXPERIMENT

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

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

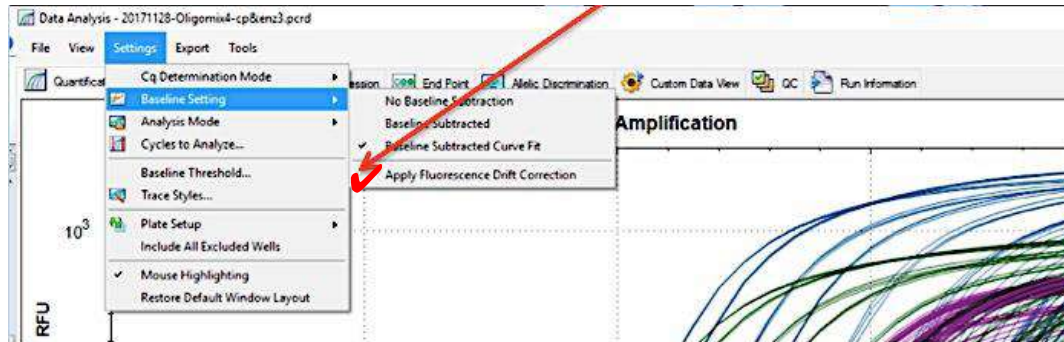


- Click on File and select Open, then Data File



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

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



Once this is done, the analysis can start.

**For the assay to be valid**, the results for the controls must be the following (Table 5). Otherwise, the experiment is not valid.

**Table 5 :**

| Positive control |                             |
|------------------|-----------------------------|
| FAM              | Ct ≤ 21                     |
| HEX              | Ct ≤ 21                     |
| Negative control |                             |
| FAM              | Ct not determinated         |
| HEX              | Ct ≥ 38 or not determinated |
| CY5              | Ct ≤ 35                     |

## 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 (direct CSF), or to repeat the extraction (extracted DNA), or dilute the sample.

For clinical samples, the following results are possible:

\* Ct cut off for samples:

Channel FAM *Staphylococcus aureus* : + Positive => Positive Ct ( $\leq 45$ )

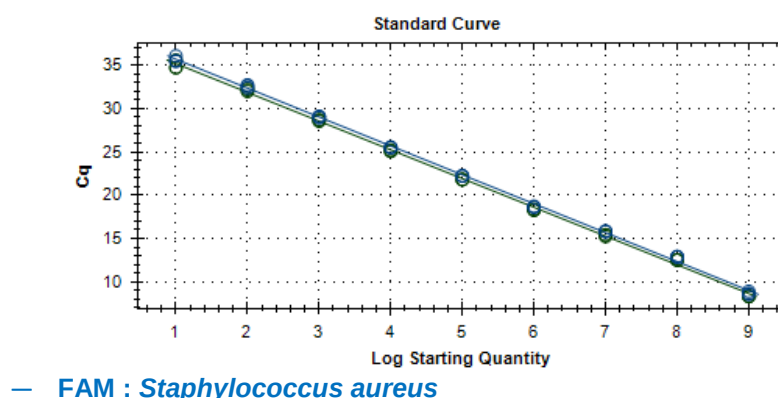
Channel HEX *Pseudomonas aeruginosa* : + Positive => Positive Ct and  $< 38$

| PCR Signal |     |     | Presence of SA    | Presence of PA    | Test validity/comment                                                                                                                                                                                                                                                            |
|------------|-----|-----|-------------------|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FAM        | HEX | CY5 |                   |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| +          | +   | +   | Yes               | Yes               | valid                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| +          | -   | +   | Yes               | No                | valid                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| -          | +   | +   | No                | Yes               | valid                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| -          | -   | +   | No                | No                | valid                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| +          | -   | -   | Yes               | Not interpretable | <b>Valid for SA:</b> possible PCR inhibition, or problem with extraction if one was performed, that does not prevent the detection of SA <b>BUT</b> that could prevent the detection of PA - <b>not valid for PA.</b> Dilute 5 x the sample; if same result, re-extract the CSF  |
| -          | +   | -   | Not interpretable | Yes               | <b>Valid for PA:</b> possible PCR inhibition, or problem with extraction if one was performed, that does not prevent the detection of PA. <b>BUT</b> that could prevent the detection of SA - <b>not valid for SA.</b> Dilute 5 x the sample; if same result, re-extract the CSF |
| -          | -   | -   | Not interpretable | Not interpretable | <b>Not valid:</b> possible PCR inhibition, or problem with extraction if one was performed. Dilute 5 x the sample; if same result, re-extract the CSF                                                                                                                            |

SA : *Staphylococcus aureus*, PA : *Pseudomonas aeruginosa*

## PERFORMANCE ANALYSIS

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



— **HEX : *Pseudomonas aeruginosa***

**Analytical sensitivity:** CP-MBno: 10 copies/μl

**Linearity for quantification:** CP-MBno: from 10 copies/μl to 10<sup>9</sup> copies/μl

**Coefficient of correlation and efficiency**

**Efficiency**

FAM: SA: 96.0 %

HEX: PA: 98.9 %

**Coefficient of correlation**

FAM: SA: 0.998

HEX: PA: 0.998

*Staphylococcus aureus* (SA) and *Pseudomonas aeruginosa* (PA)

**Variability of the signal**

| EBX-021                             | INTRA-experiment | INTER-experiments |
|-------------------------------------|------------------|-------------------|
| Bacterial targets                   | CV %             | CV %              |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (FAM)  | 1.31             | 0.64              |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (HEX) | 1.89             | 4.84              |

CV : Coefficient of Variation

**Validation on clinical samples**

Specificity and sensitivity were analysed from samples of CSF (DNA not extracted) previously tested by the reference laboratory.

**1/ Analytical specificity**

*Staphylococcus aureus* : > 98%

*Pseudomonas aeruginosa* : > 98%

**2/ Analytical sensitivity**

*Staphylococcus aureus* : > 98%

*Pseudomonas aeruginosa* : > 98%

**3/ Concordance**

*Staphylococcus aureus* : > 98% (n = 48)

*Pseudomonas aeruginosa* : > 98% (n = 49)

**Study of potentially interfering microorganisms: none of the bacteria listed below was detected by the EBX-021 kit (n=1 sample of each bacterium):**

- *Neisseria meningitidis*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenza*
- *Streptococcus agalactiae*

- *Listeria monocytogenes*
- *Escherichia coli*
- *Bartonella spp*
- *Coxiella burnetii*
- *Mycobacterium avium*
- *Klebsiella kingae*

The tests were performed on CFX96.

## 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 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.

Charvet A, Garcin F, Albanèse J, Martin C (2009). Méningites nosocomiales. *Antibiotiques*, Volume 11, Issue 1, February 2009, Pages 18-28

<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](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](http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/_documents/consensus/Meningites_consensus-long.pdf). 17<sup>e</sup> 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](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](http://www.has-santé.fr)

## WASTE DISPOSAL

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

## SYMBOLS

|                                                                                     |                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
|    | Reference                              |
|    | Batch number                           |
|    | Limits of storage temperature          |
|    | Expiration Date                        |
|    | Content sufficient for « N » reactions |
|    | Keep protected from light              |
|   | Manufacturer                           |
|  | Instructions for use                   |
| <b>CE</b>                                                                           | CE labeled product                     |
| <b>IVD</b>                                                                          | In vitro diagnostic                    |



eurobio

SCIENTIFIC

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