

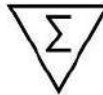
EurobioPlex

Méningite bactérienne materno-fœtale

PCR EN TEMPS REEL

Pour la PCR **qualitative** en temps réel

REF EBX-022-36
EBX-022-09

 9 réactions
36 réactions



Version 6.00 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



SOMMAIRE

Utilisation	3
Introduction	3
Principe de la détection	4
Description et contenu du kit	5
Conservation	6
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	18
Codes-Barres pour EBX-022 sur T-COR 8®-IVD	22
Bibliographie	25
Elimination des déchets	25
Symboles	26

UTILISATION

Le test EBX-022 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 materno-fœtale (MBmf) : *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli*. La PCR en 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-022 a été validé sur le type de prélèvement suivant:

- Liquide céphalo-rachidien (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 1400cas/an en France. 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).

Deux pics d'incidence de la méningite bactérienne 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 par voie verticale 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.

Les infections materno-foetales sont relativement rares (incidence 0,5%) mais ont un potentiel de gravité élevé (10% de mortalité néonatale précoce). Les enfants prématurés, les enfants à petit poids de naissance (moins de 2 kg), et les bébés dont le système immunitaire est déficient ou immature sont les plus vulnérables devant la méningite. Elle exige le traitement immédiat dans un service de soins intensifs. 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.

Diagnostic :

Il n'y a pas d'orientation diagnostique possible par le clinicien entre méningite virale et bactérienne, les symptômes sont communs. La maladie peut se présenter sous différentes formes. L'ordre d'apparition des symptômes varie d'un cas à l'autre. Certains peuvent même ne pas apparaître du tout. Les symptômes suivants sont les plus fréquemment notés: cris ou geignements inhabituels, respiration rapide, agitation, irritabilité lorsque l'enfant est manipulé, vomissements, refus de manger, peau pâle ou marbrée, enfant hypotonique, somnolence, pieds et mains froids, fontanelle bombée, boutons ou éruption cutanée. Plusieurs symptômes de la méningite n'apparaissent que lorsque la maladie est déjà bien avancée et une grande partie s'observe également dans plusieurs maladies comme la grippe par exemple, ce qui rend le diagnostic compliqué. 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.

La méningite néonatale est le plus souvent due à une bactérie : streptocoque du groupe B (*Streptococcus agalactiae*), *Escherichia coli*, ou *Listeria monocytogenes*, par ordre de fréquence.

Le diagnostic rapide et ciblé par amplification génique en temps réel de l'ADN de ces pathogènes bactériens est la technique présentant la meilleure sensibilité et spécificité.

PRINCIPE DE LA DETECTION

L'Eurobioplex EBX-022 est un test d'amplification des acides nucléiques ADN bactériens de *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, 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 driplex : *Streptococcus agalactiae* (SAg), *Listeria monocytogenes* (LM), *Escherichia coli* (EC) + contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (CI-PCR). L'ADN de SAg, LM et EC est respectivement détecté à l'aide d'une sonde marquée FAM, HEX et TEXAS RED. Le contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR est détecté à l'aide d'une sonde marquée CY5. Tous émettent une fluorescence spécifique suite à l'hydrolyse de leur sonde respective au cours de l'élongation du produit d'amplification. La mesure des intensités de fluorescence en temps réel est relative à l'accumulation des produits d'amplification spécifiques.

DESCRIPTION ET CONTENU DU KIT

Le kit de PCR en temps réel EBX-022 est prêt à l'emploi pour la détection spécifique de *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, et *Escherichia coli*.

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>Streptococcus agalactiae</i>	FAM	495 nm	515 nm
<i>Listeria monocytogenes</i>	HEX	535 nm	555 nm
<i>Escherichia coli</i>	Texas Red	585 nm	605 nm
Contrôle d'inhibition de PCR (CI-PCR)	Cy5	647 nm	667 nm

Canaux équivalents sur différents instruments de PCR:

- Canal **FAM** (Systèmes ABI, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx, T-COR 8®-IVD), Canal 510 (LC 480), Canal Green (RotorGene)
- Canal **HEX** (Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx, T-COR 8®-IVD), Canal VIC (Systèmes ABI), Canal Alexa532 (SmartCycler II), Canal 580 (LC 480), Canal Yellow (RotorGene),
- Canal **Texas Red** (Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx, T-COR 8®-IVD), LC Red 610 (LC480), Canal Orange (RotorGene)
- Canal **Cy5** (Systèmes ABI, Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx, T-COR 8®-IVD), Canal Alexa647 (SmartCycler II), Canal 660 (LC 480), Canal Red (RotorGene)

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

Tableau 2 :

Couleur de Bouchon	Contenu du kit	9 réactions	36 réactions	Reconstitution
Rouge	ENZYME	2 x 100 µl	8 x 100 µl	Prêt à l'emploi
Transparent	OLIGOMIX	2 x 60 µl	8 x 60 µl	Prêt à l'emploi
Jaune	Contrôle Positif CP-MBmf	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
Bleu	Eau = contrôle négatif (CN-H2O)	2 x 500 µl	8 x 500 µl	Prêt à l'emploi

Oligomix : contient les amorces et sondes du quadriplex (SAg, LM, EC, et CI-PCR).

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 18)

	9 Réactions	36 Réactions
* Nombre de tests patients possible patient par patient avec recongélation/décongélation 3 fois maximum	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 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 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 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. 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-022, 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 Scientific (Ref EurobioPlex EBX-002).

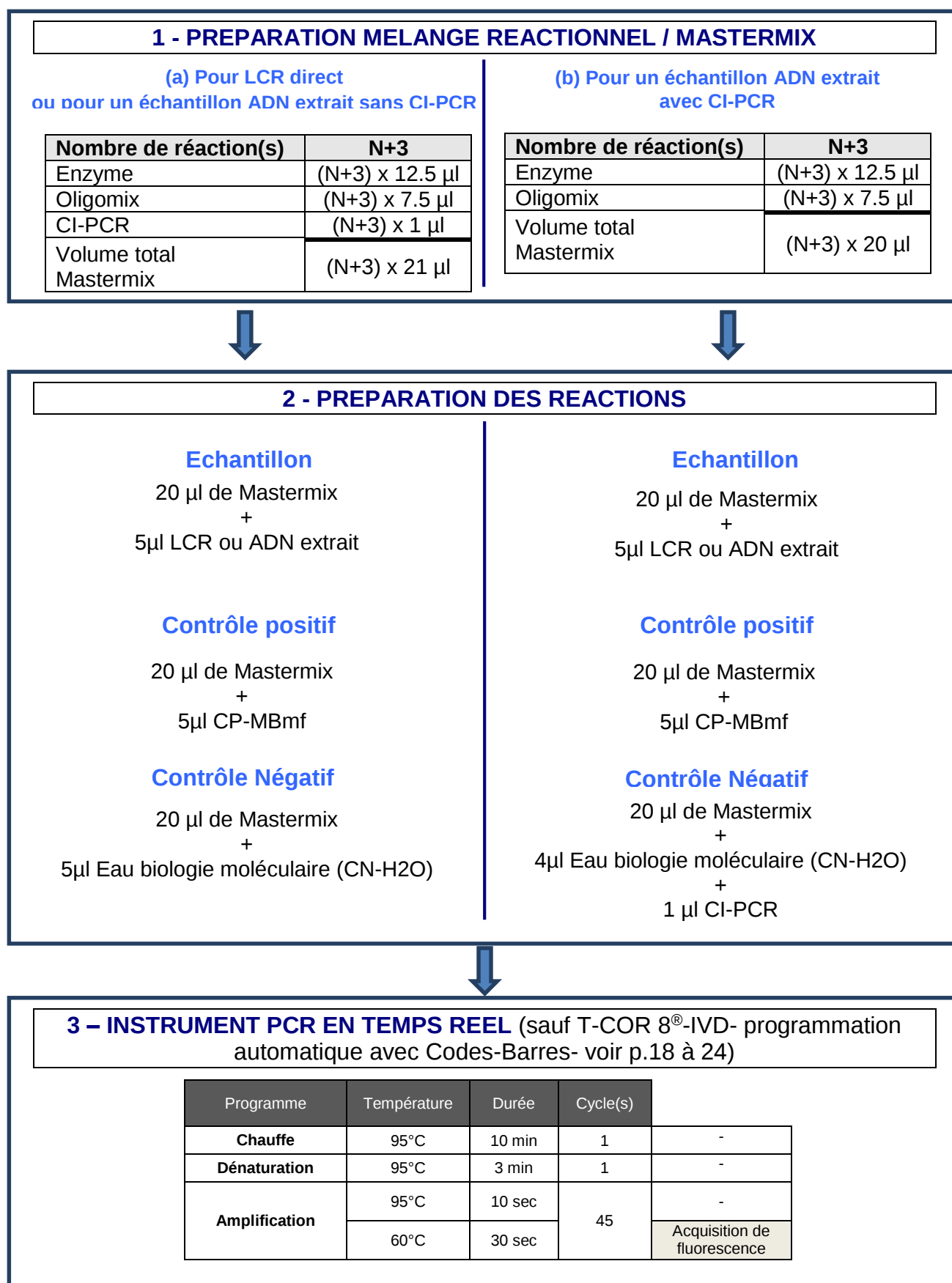
II- Réalisation de la PCR en temps réel

Remarque générale:

Le contrôle positif ainsi que le contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (CI-PCR) contiennent des concentrations élevées de matrice. Les manipulations doivent être réalisées précautionneusement pour éviter toute contamination. Pour contrôler le bon fonctionnement de la PCR, il est nécessaire de tester le contrôle positif CP-MBmf ainsi que le contrôle négatif (eau PCR fournie = CN-H₂O + CIPCR) (voir II-2/ 6) du protocole de PCR en temps réel).

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

II-1/ Schéma de la procédure



II-2/ Procédure détaillée :

- 1) Homogénéiser le tube d'Enzyme, et vortexer Oligomix, CP-MBmf 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 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 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 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 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 (voir ce point spécifique pour T-COR 8®-IVD page 18 à 24) :
 - Contrôle positif :
20 µl de Mastermix + 5 µl de contrôle positif CP-MBmf
 - 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 (sur T-COR 8®-IVD aucune programmation manuelle n'est nécessaire grâce aux Codes-Barres- voir page 18 à 24).

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

Note 1 : Sur LightCycler® 480 (Roche), deux systèmes optiques existent : seul le « System II » est compatible avec l'utilisation du kit. Appliquer une compensation de couleur pour les longueurs d'ondes FAM-HEX/VIC-Texas Red-Cy5 (465-510,533-580,533-610,618-660).

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

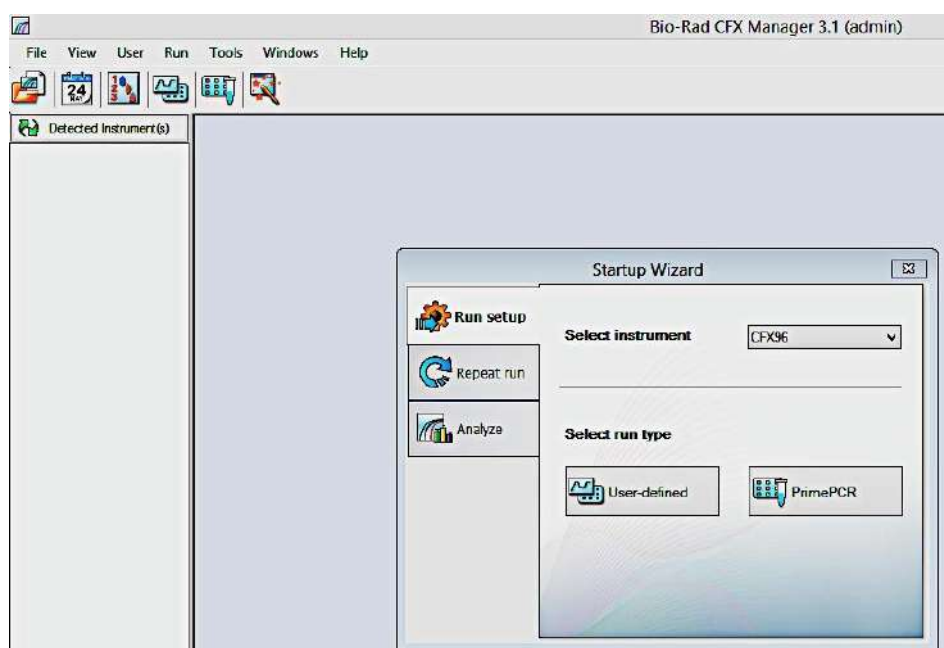
Note 3 : Sur Rotorgene™, calibrer le signal en cliquant sur « GAIN OPTIMISATION ».

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

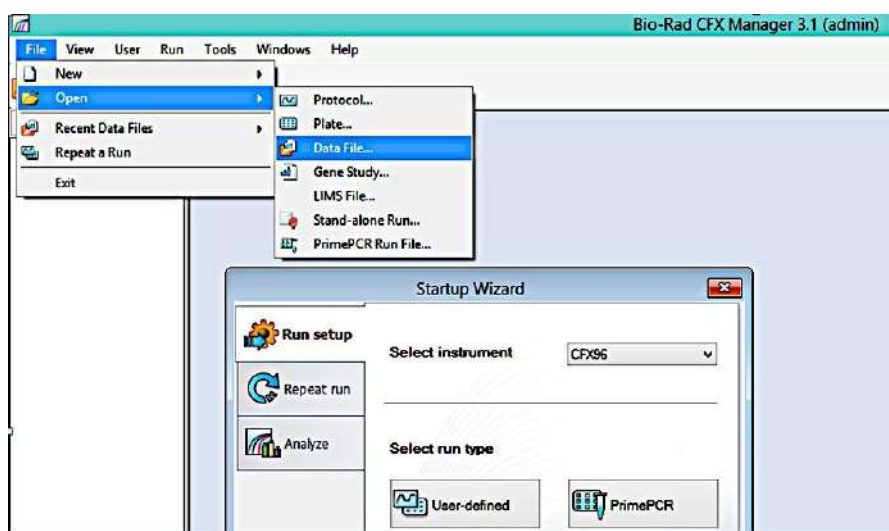
VALIDATION DE L'EXPERIMENTATION

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

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



- Cliquer sur File et sélectionner Open puis Data File.



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

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



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

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

Contrôle positif	
FAM	Ct ≤ 28
HEX	Ct ≤ 28
TEXAS RED	Ct ≤ 28
Contrôle Négatif	
FAM	Ct non déterminé
HEX	Ct non déterminé
TEXAS RED	Ct ≥ 38 ou non déterminé*
CY5	Ct ≤ 35

*Sur T-COR 8®-IVD, Ct ≥ 34 ou non déterminé. L'interprétation est automatiquement générée avec les codes-barres.

ANALYSE DES DONNEES ET INTERPRETATION

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

Deux résultats peuvent être obtenus :

1/ le test du contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (CI-PCR ; canal Cy5) est positif ; le résultat peut être validé.

2/ le test du contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR (CI-PCR ; canal Cy5) est négatif : soit l'ADN 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 est détecté dans les canaux cibles (FAM, HEX, Texas Red).

Pour les échantillons cliniques, les résultats suivants sont possibles :

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

Canal FAM *Streptococcus agalactiae*: + Positif => Ct positif (≤ 45)

Canal HEX *Listeria monocytogenes*: + Positif => Ct positif (≤ 45)

Canal TEXAS RED *Escherichia coli*: + Positif => Ct positif et < 38

(Particularité sur T-COR 8®-IVD, Canal TEXAS RED *Escherichia coli*: + Positif => Ct positif et < 34)

- Signal PCR dans le canal Cy5 (Ct ≤ 45):

Signal PCR				Présence de SAg	Présence de LM	Présence de EC	Validité du test/commentaire
FAM	HEX	Texas Red	CY5				
+	+	+	+	Oui	Oui	Oui	VALIDE
+	+	-	+	Oui	Oui	Non	
+	-	+	+	Oui	Non	Oui	
-	+	+	+	Non	Oui	Oui	
+	-	-	+	Oui	Non	Non	
-	+	-	+	Non	Oui	Non	
-	-	+	+	Non	Non	Oui	
-	-	-	+	Non	Non	Non	

- Pas de signal PCR dans le canal Cy5 (Ct indéterminé) mais Positif pour un ou plusieurs des pathogènes ciblés (Ct < seuil de Ct pour positivité):

Signal PCR				Présence de SAg	Présence de LM	Présence de EC	Validité du test/commentaire
FAM	HEX	Texas Red	CY5				
+	-	-	-	Oui	Non interprétable	Non interprétable	Possible inhibition de PCR ou problème d'extraction si réalisée, qui n'empêche pas la détection d'un pathogène (valide pour ce pathogène) MAIS qui empêcherait la détection de(s) autre(s) pathogène(s) ciblé(s). → Diluer 5 x l'échantillon ; si même résultat, ré-extraire le LCR
-	+	-	-	Non interprétable	Oui	Non interprétable	
-	-	+	-	Non interprétable	Non interprétable	Oui	

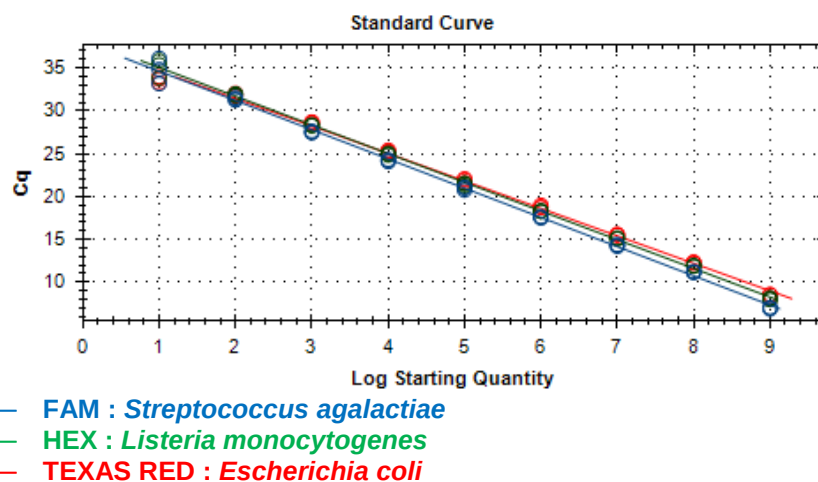
- Pas de signal PCR dans le canal Cy5 (Ct indéterminé) et signal PCR (Ct > seuil de positivité) pour les pathogènes ciblés :

Signal PCR				Présence de SAg	Présence de LM	Présence de EC	Validité du test/commentaire
FAM	HEX	Texas Red	CY5				
-	-	-	-	Non interprétable	Non interprétable	Non interprétable	Inhibition de PCR ou problème d'extraction si réalisée. → Diluer 5x l'échantillon ; si même résultat ré-extraire l'échantillon

SAg: *Streptococcus agalactiae*; LM: *Listeria monocytogenes*; EC: *Escherichia coli*

ANALYSE DES PERFORMANCES

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



Sensibilité analytique: CP-MBmf: 10 copies/microl

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

Coefficient de corrélation et efficacité

Efficacité

FAM: SAg: 95.4 %

HEX: LM: 100.9 %

Texas Red: EC: 99.1 %

Coefficient de corrélation

FAM: SAg: 0.993

HEX: LM: 0.994

Texas Red: EC: 0.997

Streptococcus agalactiae (SAg), *Listeria monocytogenes* (LM), *Escherichia coli* (EC)

Variabilité du signal

EBX-022	INTRA-experiences	INTER-experiences
Bactéries cibles	CV %	CV %
<i>Streptococcus agalactiae</i> (FAM)	0.69	2.26
<i>Listeria monocytogenes</i> (HEX)	0.57	1.56
<i>Escherichia coli</i> (TEXAS RED)	0.64	3.21

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.

		EBX-022 Méningite bactérienne materno-foetale								
		SAg			LM			EC		
		POS	NEG	TOTAL	POS	NEG	TOTAL	POS	NEG	TOTAL
Pretest	POS	5	0	5	1	0	1	7	0	7
	NEG	1	30	31	0	42	42	1	35	36
	TOTAL	6	30	36	1	42	43	8	35	43

Bactéries cibles EBX-022	Spécificité	Sensibilité	Concordance
<i>Streptococcus agalactiae</i> (FAM)	96.8 % *	> 98 %	97.2 % (n = 36)
<i>Listeria monocytogenes</i> (HEX)	> 98 %	> 98 %	> 98 % (n = 43)
<i>Escherichia coli</i>	97.2 % *	> 98 %	97.7 % (n = 43)

* A noter que les échantillons non détectés par la méthode de référence et détectés par la méthode Eurobio Scientific sont à la limite de détection. Il est probable que l'Eurobioplex EBX-022 soit plus sensible.

Etude des interférents éventuels : aucune interférence

Pas de cross réactivité:

- *Streptococcus agalactiae* sur *Listeria monocytogenes* (n=5) = 0%
- *Streptococcus agalactiae* sur *Escherichia coli* (n=5) = 0 %
- *Listeria monocytogenes* sur *Streptococcus agalactiae* (n=1) = 0%
- *Listeria monocytogenes* sur *Escherichia coli* (n=1) = 0 %
- *Escherichia coli* sur *Streptococcus agalactiae* (n=7) = 0%
- *Escherichia coli* sur *Listeria monocytogenes* (n=7) = 0%

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

- *Neisseria meningitidis*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenza*
- *Staphylococcus aureus*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Bartonella spp*
- *Coxiella burnetii*
- *Mycobacterium avium*
- *Klebsiella kingae*

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 le contrôle positif et le contrôle négatif soient testés lors de la première utilisation d'un nouveau kit.

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

Tests patients

<i>Avec validation des contrôles positif et négatif 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-022, la combinaison FAM/HEX/Texas Red/Cy5 est celle choisie. Si certains canaux ne sont pas utilisés dans certains kits, ne pas en tenir compte lors de l'analyse des résultats.

Utilisation des Codes-Barres (disponibles en pages 22 à 24)

- 1- Sélectionner Menu > Nouvelle Analyse/New Run
- 2- Sélectionner Code-barres/Barcode
- 3- Scanner sur la droite de l'appareil le Code-Barre désiré :
 - soit pour le contrôle positif (Code-barre EBX-022 Pos Ctrl),
 - soit pour le contrôle négatif (Code-barre EBX-022 Neg Ctrl),
 - soit pour un échantillon (Code-Barre Assay : EBX-022)

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

- 4- Soulever le clapet du puits x sélectionné par l'appareil, et vérifier que la lumière LED bleue est allumée, puis sélectionner « Oui/Yes ».
- 5- Positionner le tube dans le puits correspondant et rabattre le clapet puis sélectionner « Suivant/Next ».
- 6- Si vous souhaitez le nommer (optionnel), sélectionner « échantillon x/sample x », et le nommer. Sélectionner « Accept ».
- 7- Sélectionner « Suivant/Next »
- 8- Pour ajouter/tester un autre contrôle ou échantillon, sélectionner « Ajouter un puits/Add well » et recommencer au point 3-
- 9- Sélectionner « Démarrer l'analyse/Start run »

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

Présentation et Interprétation des résultats

Les résultats de Ct et les courbes d'amplification sont disponibles, à partir du Tableau Valeurs SmartCT™/SmartCT™ Table (valeurs de Ct attribuées sur chaque canal), et des graphes de Ct en fonction des cycles sur chaque canal, les 2 étant visualisables en temps réel sur la machine.

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

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

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

Détermination du statut pour les échantillons :

« Détecté(e-s)/Detected »: Positif pour au moins une cible * → **encadré vert**

« Non détecté/Not detected »: Négatif → **encadré rouge**

* Les bactéries détectées ou non détectées 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 négatif et positif valides, pour la limite de détection (LOD) indiquée « Detected » avec les cibles correspondantes, et pour deux échantillons négatifs, indiqués « Not Detected » (sample 1 et sample 2):

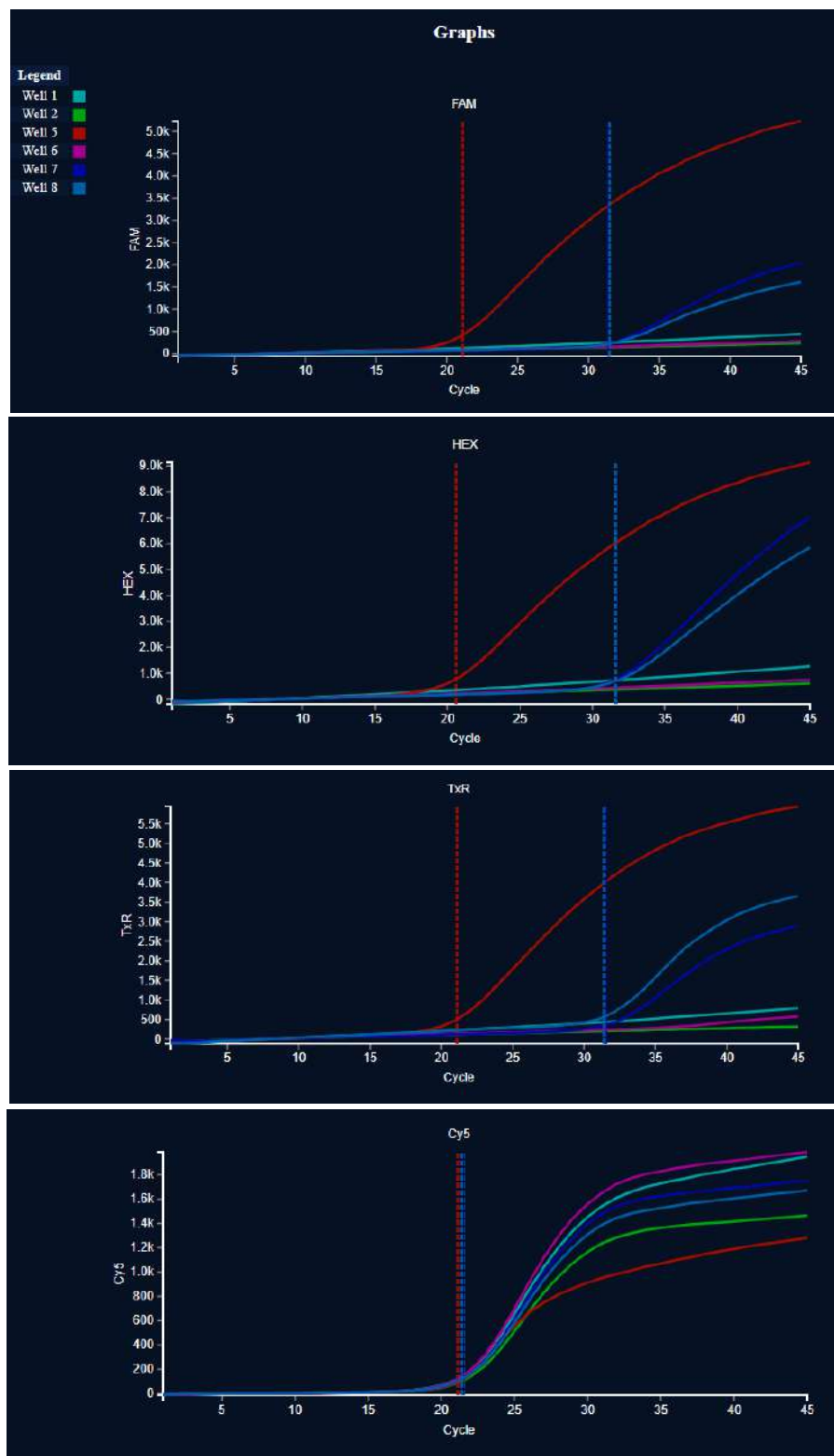
❖ Sur l'écran de l'instrument :

Interpretations		
1	Sample 1	EBX-022
	Not Detected - S. ag, L. mono, E. coli	
2	Sample 2	EBX-022
	Not Detected - S. ag, L. mono, E. coli	
5	EBX-022 POS Ctrl	EBX-022 Pos Ctrl
	Detected: Pos Ctrl Valid	
6	EBX-022 NEG ctrl	EBX-022 Neg Ctrl
	Detected: Neg Ctrl Valid	
7	LOD 10c/microl repl1	EBX-022
	Detected: E. coli, L. mono, S. ag	
8	LOD 10c/microl repl2	EBX-022
	Detected: E. coli, L. mono, S. ag	

❖ Dans le rapport :

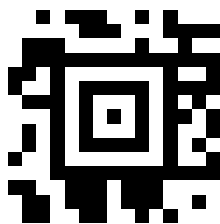
Summary							
Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5	Call
1	Sample 1	EBX-022				21.5	Not Detected
2	Sample 2	EBX-022				21.5	Not Detected
5	EBX-022 POS Ctrl	EBX-022 Pos Ctrl	21.1	20.6	21.1	21.1	Detected • Pos Ctrl Valid
6	EBX-022 NEG ctrl	EBX-022 Neg Ctrl				21.4	Detected • Neg Ctrl Valid
7	LOD 10c/microl repl1	EBX-022	31.4	31.6	31.5	21.5	Detected • E. coli • L. mono • S. ag
8	LOD 10c/microl repl2	EBX-022	31.5	31.6	31.4	21.4	Detected • E. coli • L. mono • S. ag

Exemple de courbes d'amplification

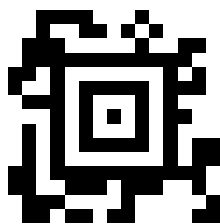


Codes-Barres sur T-COR8®-IVD pour EBX-022

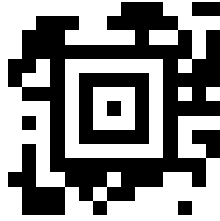
EBX-022 Pos Ctrl
Contrôle Positif CP-MBmf



EBX-022 Neg Ctrl
Eau = contrôle négatif (CN-H2O)



Assay: EBX-022



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.

<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

REF

Référence

LOT

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



Produit marqué CE



Mode d'emploi



eurobio
SCIENTIFIC

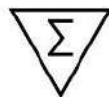
7, avenue de Scandinavie
ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis
FRANCE

EurobioPlex

Neonatal bacterial meningitis REAL-TIME PCR

For **qualitative** real-time PCR

REF EBX-022-36
EBX-022-09



9 reactions
36 reactions



Version 6.00 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	29
Introduction	29
Principle of detection	30
Description and content of the kit	30
Storage	32
Cautions and notes	32
Samples collection, transport and storage	33
Procedure	33
I- DNA extraction	33
II- Real-time PCR procedure	34
II-1/ Diagram of the procedure	35
II-2/ Detailed procedure	36
Validation of the experiment	37
Data analysis and Interpretation	39
Performance analysis.....	40
Specificities of the Real-Time PCR T-COR 8®-IVD instrument	43
Barcodes for EBX-022 for use on T-COR8®-IVD.....	47
Bibliography	50
Waste disposal	50
Symbols	51

INTENDED USE

The EBX-022 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 neonatal/maternal-fetal Bacterial Meningitis (MBmf): *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. **Real-time PCR can be carried out directly on non-extracted samples of CSF**, 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-022 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.

Mother to child infections are relatively rare (incidence = 0.5%) but are very serious (10% of neonatal mortality). Premature babies, low birth weight children (less than 2 kg), and babies whose immune system is deficient or immature are the most vulnerable to meningitis. It requires immediate treatment in an intensive care unit until antibiotics act. Children's 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.

Diagnosis :

There is no obvious diagnostic assessment by the clinician between viral and bacterial meningitis because the symptoms are common. Maternal-fetal bacterial meningitis can occur in different forms. The order of appearance of the symptoms varies among babies or young children and some may never appear. The following symptoms are most frequently noted: screams or unusual whimpers, rapid breathing, restlessness, irritability when the child is being manipulated, vomiting, refusal to eat, pale or mottled skin, hypotonic child, drowsiness, cold hands and feet, protruding fontanels, spots or rash. Several symptoms of meningitis appear only when the disease is already well advanced and most of them are also observed in several diseases such as flu for

example. This makes the diagnosis even more difficult. 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.

Neonatal meningitis is most often due to bacteria: *Streptococcus* Group B (*Streptococcus agalactiae*), *Escherichia coli* or *Listeria monocytogenes*. 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-022 is a test using real-time amplification of bacterial DNA of *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, 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 quadriplex: *Streptococcus agalactiae* (Sag), *Listeria monocytogenes* (LM), *Escherichia coli* (EC) + control of DNA extraction and PCR inhibition (CI-PCR). DNA of Sag, LM and EC is respectively detected using FAM, HEX and Texas Red labeled probes. DNA extraction and PCR inhibition control is detected using a CY5 labeled probe. All probes emit a specific fluorescence following their hydrolysis during the elongation of the amplification product. The measurement of the intensities of real-time fluorescence correlates with the accumulation of specific amplification products.

DESCRIPTION AND CONTENT OF THE KIT

The real-time PCR EBX-022 kit is ready to use for the specific detection of *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*.

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>Streptococcus agalactiae</i>	FAM	495 nm	515 nm
<i>Listeria monocytogenes</i>	HEX	535 nm	555 nm
<i>Escherichia coli</i>	Texas Red	585 nm	605 nm
PCR inhibition control (CI-PCR)	Cy5	647 nm	667 nm

Equivalent channels on different real time PCR cyclers:

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

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

- Channel **Texas Red** (Chromo 4/CFX96, Mx Systems, T-COR8®-IVD), LC Red 610 (LC480), Channel Orange (RotorGene)

- Channel **Cy5** (ABI Systems, Chromo 4/CFX96, Mx Systems, T-COR8®-IVD), Channel 660 (LC 480), Channel Alexa647 (SmartCyclerII), Channel Red (RotorGene)

Note: On LC480 instrument II, apply color compensation for the following channels: FAM-HEX/VIC – Texas Red-Cy5 (465-510, 533-580, 533-610, 618-660).

Table 2 :

Cap color	Components of the kit	9 reactions	36 reactions	Reconstitution
Red	ENZYME	2 x 100 µl	8 x 100 µl	Ready to use
Transparent	OLIGOMIX	2 x 60 µl	8 x 60 µl	Ready to use
Yellow	Positive Control CP-MBmf	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
Blue	Water = negative control (CN-H2O)	2 x 500 µl	8 x 500 µl	Ready to use

Oligomix : contains the primers and probes of the quadriplex (SAg+LM+EC+CI-PCR)

Table 3: Number of patients tests according to the EBX format (9 or 36 reactions) on all instruments except T-COR8®-IVD (see page 43)

	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 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-022 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).

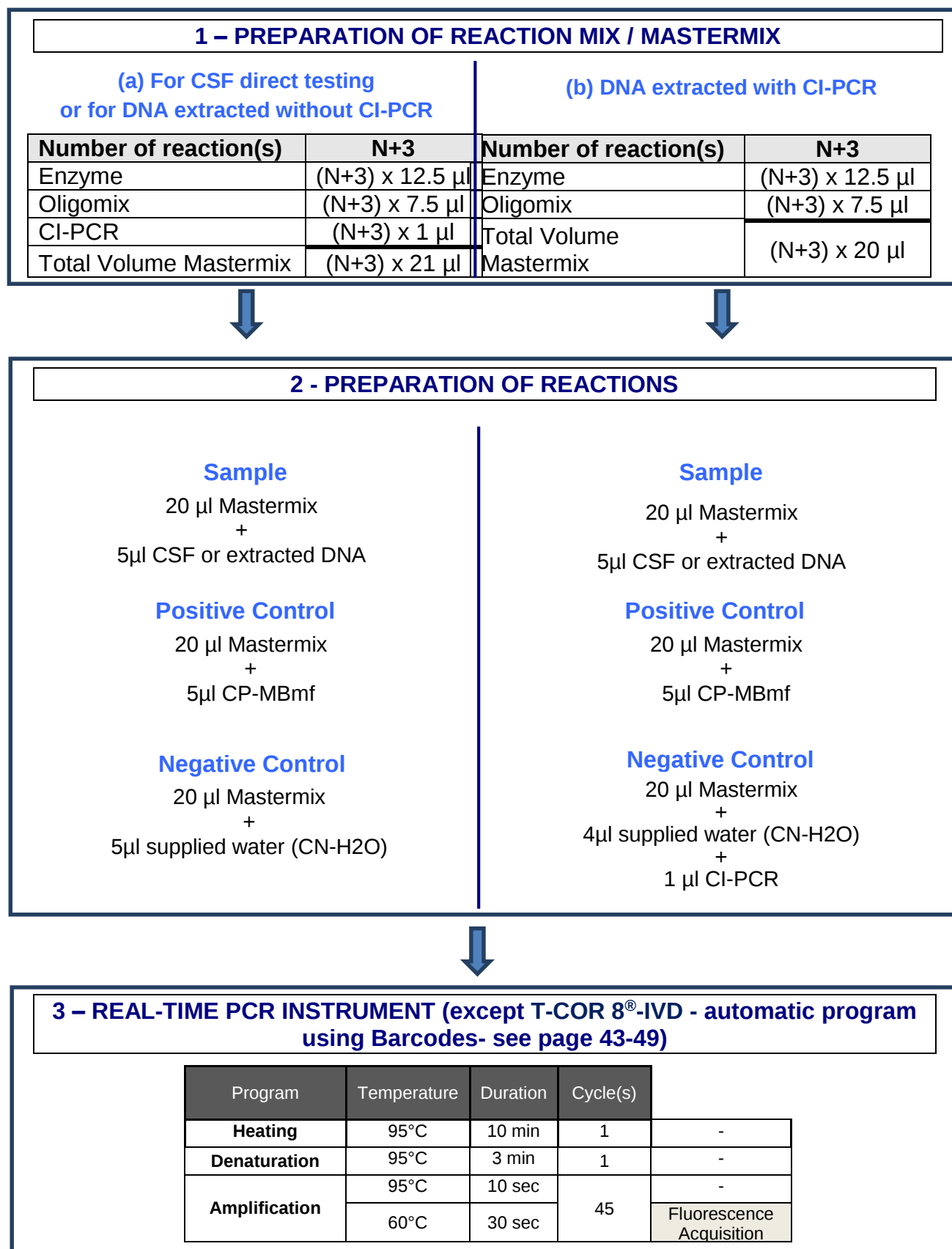
II- Real-time PCR procedure

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-MBmf 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

- 1) Homogenize the tube of Enzyme, and vortex Oligomix, CP-MBmf, 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 (see this specific point for T-COR 8®-IVD on page 43-49):
 - Positive control:
 - 20µL of mastermix + 5µL of CP-MBmf
 - 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 (on T-COR 8®-IVD, no programming is needed thanks to the use of Barcodes- see page 43-49):

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-Texas Red-Cy5 (465-510,533-580,533-610,618-660).

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

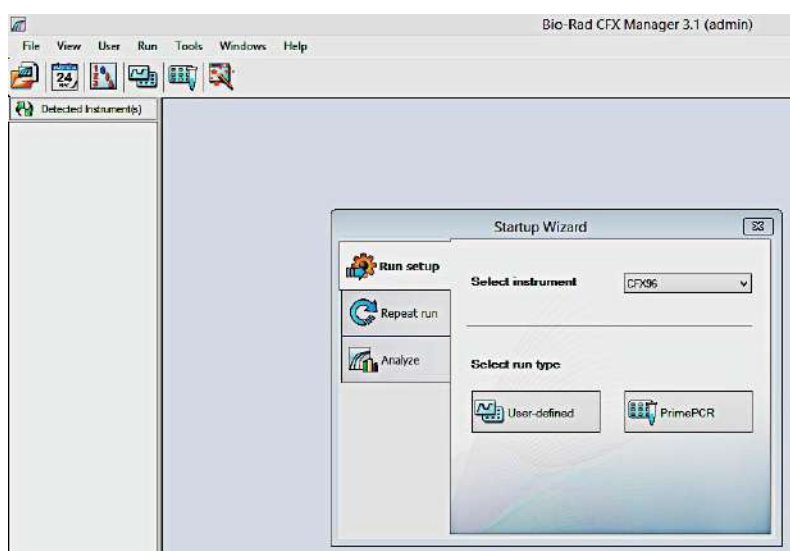
Note 3: On Rotorgene ™, please calibrate the signal by clicking on "GAIN optimization".

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

VALIDATION OF THE EXPERIMENT

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

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

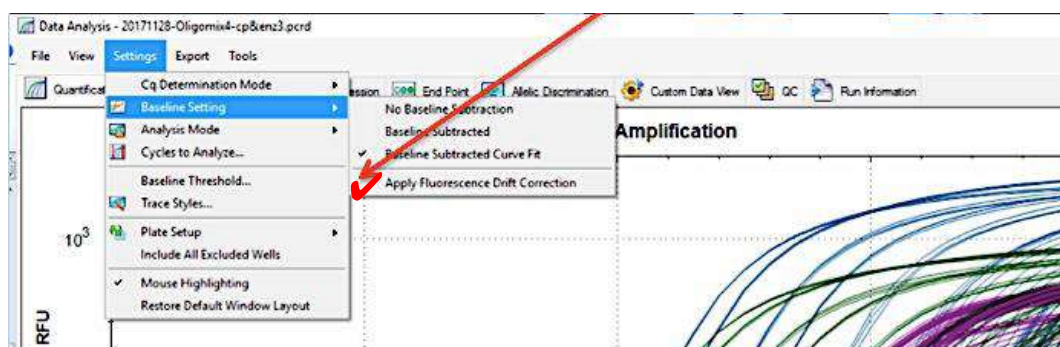


- Click on File and select Open, then Data File



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

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



Once this is done, the analysis can start.

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

Table 5:

Positive Control	
FAM	Ct ≤ 28
HEX	Ct ≤ 28
TEXAS RED	Ct ≤ 28
Negative Control	
FAM	Ct not determined
HEX	Ct not determined
TEXAS RED	Ct ≥ 38 or not determined*
CY5	Ct ≤ 35

* On T-COR 8®-IVD, Ct ≥ 34 or not determined. Interpretation is automatically generated with Barcodes.

DATA ANALYSIS AND INTERPRETATION

DNA extraction and PCR inhibition control in samples:

Two results can be obtained:

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

2/ the DNA extraction and PCR inhibition control (CI-PCR; channel Cy5) test is negative: either 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 signal is detected on the target channel (FAM, HEX, Texas Red).

For clinical samples, the following results are possible:

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

Channel FAM *Streptococcus agalactiae*: + Positive => Ct positive (≤ 45)

Channel HEX *Listeria monocytogenes*: + Positive => Ct positive (≤ 45)

Channel TEXAS RED *Escherichia coli*: + Positive => Ct positive and < 38

(Specificity of T-COR 8®-IVD, Canal TEXAS RED *Escherichia coli*: + Positive => Ct positive and < 34)

- PCR signal in the Cy5 channel (Ct ≤ 45)

PCR Signal				Presence of SAg	Presence of LM	Presence of EC	Test validity / comment
FAM	HEX	Texas Red	CY5				
+	+	+	+	Yes	Yes	Yes	VALID
+	+	-	+	Yes	Yes	No	
+	-	+	+	Yes	No	Yes	
-	+	+	+	No	Yes	Yes	
+	-	-	+	Yes	No	No	
-	+	-	+	No	Yes	No	
-	-	+	+	No	No	Yes	
-	-	-	+	No	No	No	

- No PCR signal in the Cy5 channel (underdetermined Ct) but Positive for one or more pathogens (Ct < Ct cut off of positivity):

PCR Signal				Presence of SAg	Presence of LM	Presence of EC	Test validity / comment
FAM	HEX	Texas Red	CY5				
+	-	-	-	Yes	Not interpretable	Not interpretable	Possible PCR inhibition or problem with extraction if performed, that does not prevent the detection of one pathogen (valid)
-	+	-	-	Not interpretable	Yes	Not interpretable	
-	-	+	-	Not interpretable	Not interpretable	Yes	

							for this pathogen) BUT that could prevent the detection of the other(s) -dilute 5 x the sample and repeat PCR; if same result redo an extraction
--	--	--	--	--	--	--	--

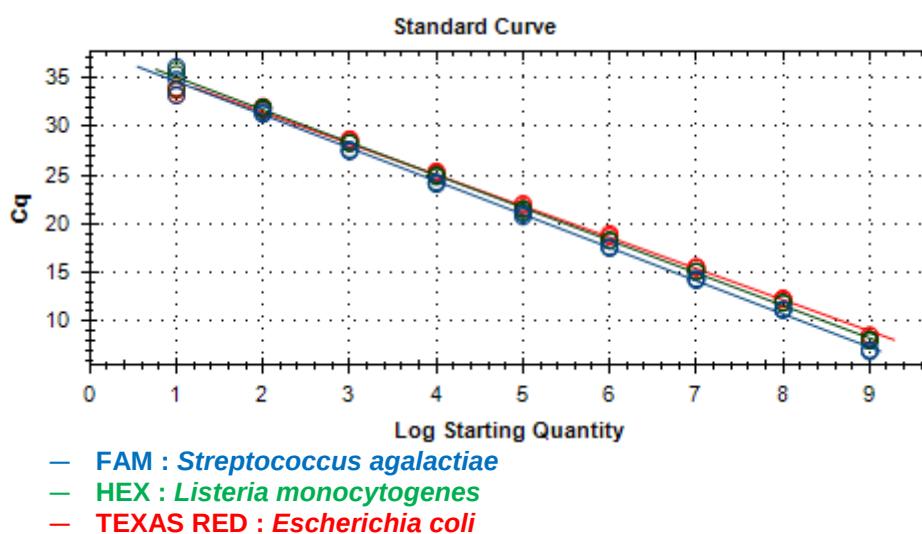
- No PCR signal in the Cy5 channel (undetermined Ct), and Ct signal > Ct cut off for positivity for the pathogens:

PCR Signal				Presence of SAg	Presence of LM	Presence of EC	Test validity / comment
FAM	HEX	Texas Red	CY5				
-	-	-	-	Not interpretable	Not interpretable	Not interpretable	Possible PCR inhibition or problem with extraction if performed - dilute first 5 x and repeat PCR; if same result redo an extraction

SAg: *Streptococcus agalactiae*, LM: *Listeria monocytogenes*, EC: *Escherichia coli*

PERFORMANCE ANALYSIS

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



Analytical sensitivity: CP-MBmf: 10 copies/μl

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

Coefficient of correlation and efficiency

Efficiency

FAM: SAg: 95.4 %

HEX: LM: 100.9 %

Texas Red: EC: 99.1 %

Coefficient of correlation

FAM: SAg: 0.993

HEX: LM: 0.994

Texas Red: EC: 0.997

Streptococcus agalactiae (SAg), *Listeria monocytogenes* (LM), *Escherichia coli* (EC)

Variability of the signal

EBX-022	INTRA-experiment	INTER-experiments
Bacterial targets	CV %	CV %
<i>Streptococcus agalactiae</i> (FAM)	0.69	2.26
<i>Listeria monocytogenes</i> (HEX)	0.57	1.56
<i>Escherichia coli</i> (TEXAS RED)	0.64	3.21

CV : Coefficient of Variation

Validation on clinical samples

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

		EBX-022								
		SAg			LM			EC		
		POS	NEG	TOTAL	POS	NEG	TOTAL	POS	NEG	TOTAL
Pretest	POS	5	0	5	1	0	1	7	0	7
	NEG	1	30	31	0	42	42	1	35	36
	TOTAL	6	30	36	1	42	43	8	35	43

Bacterial targets EBX-022	Specificity	Sensitivity	Concordance
<i>Streptococcus agalactiae</i> (FAM)	96.8 % *	> 98 %	97.2 % (n = 36)
<i>Listeria monocytogenes</i> (HEX)	> 98 %	> 98 %	> 98 % (n = 43)
<i>Escherichia coli</i>	97.2 % *	> 98 %	97.7 % (n = 43)

* Note that samples not detected by the reference method but detected by the Eurobio method are at the limit of detection. It is likely that the EBX-022 Eurobioplex is more sensitive.

Study of potentially interfering microorganisms: Non interference

No cross-reaction for:

- *Streptococcus agalactiae* on *Listeria monocytogenes* (n=5) = 0%
- *Streptococcus agalactiae* on *Escherichia coli* (n=5) = 0 %
- *Listeria monocytogenes* on *Streptococcus agalactiae* (n=1) = 0%
- *Listeria monocytogenes* on *Escherichia coli* (n=1) = 0 %
- *Escherichia coli* on *Streptococcus agalactiae* (n=7) = 0%
- *Escherichia coli* on *Listeria monocytogenes* (n=7) = 0%

None of the bacteria listed below was detected by the EBX-022 kit (n=1 sample of each bacterium):

- *Neisseria meningitidis*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenza*
- *Staphylococcus aureus*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Bartonella spp*
- *Coxiella burnetii*
- *Mycobacterium avium*
- *Klebsiella kingae*

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

<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-022, FAM/HEX/Texas Red/Cy5 combination is used. If some channels are not used, do not consider this channel for results analysis.

Use of Barcodes (available on page 47 to 49)

- 1- Select Menu > New Run
- 2- Select Barcode
- 3- Scan the appropriate Barcode on the right side of the instrument:
 - For the positive control (Barcode EBX-022 Pos Ctrl),
 - For the negative control (Barcode EBX-022 Neg Ctrl),
 - For a patient sample (Barcode Assay: EBX-022)

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

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

select “Yes”

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

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

7- Select “Next”

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

9- Select “Start run”.

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

Presentation and Interpretation of results

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

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

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

« Neg Ctrl Fail »: Not valid

« Neg Ctrl Valid »: Valid

« Pos Ctrl Fail »: Non valid

« Pos Ctrl Valid »: Valid

For patients status:

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

"Not detected": Negative → red box

* The results for the specific bacteria 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) « Detected » for its corresponding targets, and for two negative samples indicated “Not Detected” (samples 1 and 2):

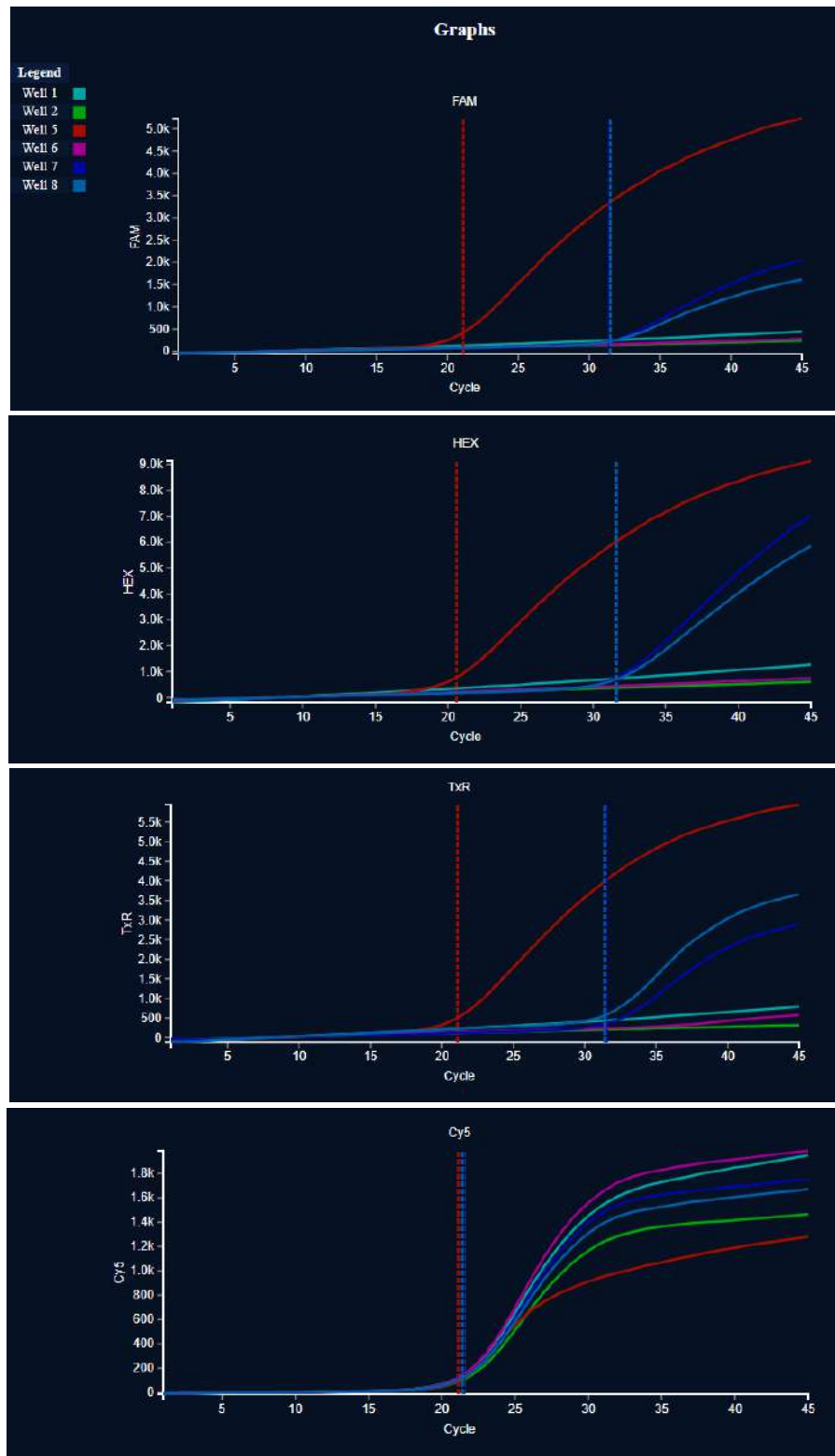
❖ On the instrument screen:

Interpretations	
1	Sample 1 EBX-022 Not Detected - S. ag, L. mono, E. coli
2	Sample 2 EBX-022 Not Detected - S. ag, L. mono, E. coli
5	EBX-022 POS Ctrl EBX-022 Pos Ctrl Detected: Pos Ctrl Valid
6	EBX-022 NEG ctrl EBX-022 Neg Ctrl Detected: Neg Ctrl Valid
7	LOD 10c/microl repl1 EBX-022 Detected: E. coli, L. mono, S. ag
8	LOD 10c/microl repl2 EBX-022 Detected: E. coli, L. mono, S. ag

❖ On the report:

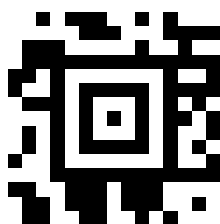
Summary							
Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5	Call
1	Sample 1	EBX-022				21.5	Not Detected
2	Sample 2	EBX-022				21.5	Not Detected
5	EBX-022 POS Ctrl	EBX-022 Pos Ctrl	21.1	20.6	21.1	21.1	Detected • Pos Ctrl Valid
6	EBX-022 NEG ctrl	EBX-022 Neg Ctrl				21.4	Detected • Neg Ctrl Valid
7	LOD 10c/microl repl1	EBX-022	31.4	31.6	31.5	21.5	Detected • E. coli • L. mono • S. ag
8	LOD 10c/microl repl2	EBX-022	31.5	31.6	31.4	21.4	Detected • E. coli • L. mono • S. ag

Example of amplification curves:



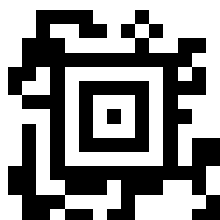
Barcodes for EBX-022 for use on T-COR8®-IVD

EBX-022 Pos Ctrl
Positive Control CP-MBmf

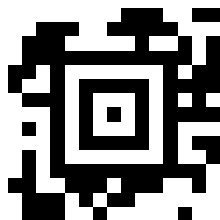


EBX-022 Neg Ctrl

Water = Negative Control (CN-H2O)



Assay: EBX-022



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.

<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
Épidémiologie 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

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

EurobioPlex

Neonatale bakterielle Meningitis

REAL-TIME-PCR

Für **qualitative** Real-Time-PCR

REF **EBX-022-36**
EBX-022-09

 **9 Reaktionen**
36 Reaktionen



Version 6.00 vom 03.10.2019

Validiert für:

- CFX96™ Real-Time-PCR-Detektionssystem (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 und -22°C lagern



Gebrauchsanweisung

INHALTSVERZEICHNIS

Verwendungszweck	54
Einleitung	54
Nachweisprinzip	55
Beschreibung und Lieferumfang des Kits	56
Lagerung	57
Vorsichtshinweise und Erläuterungen	57
Probenentnahme, -transport und -lagerung	58
Verfahren	59
I- DNA-Extraktion	59
II- Real-Time-PCR-Verfahren	59
II-1/ Verfahrensdiagramm	60
II-2/ Verfahren im Detail	61
Validierung des Tests	62
Datenanalyse und Auswertung	64
Leistungsbewertung	66
Besonderheiten des Real-Time-PCR-Geräts T-COR 8®-IVD	69
Barcodes für EBX-022 zur Verwendung am T-COR8®-IVD	73
Literatur	76
Abfallentsorgung	76
Symbole	77

VERWENDUNGSZWECK

Der EBX-022 Test beruht auf Amplifikation mittels Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und ist für den qualitativen Nachweis von *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes* und *Escherichia coli* in Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) bestimmt. Diese Bakterien sind am häufigsten an der Ätiologie der neonatalen bakteriellen Meningitis (MBmf = méningite bactérienne materno-fœtale) 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-022 wurde an folgendem Probentyp 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 werden etwa 1.400 Fälle pro Jahr gezählt. Es gibt vier Hauptüberwachungseinrichtungen in Frankreich: 1) das EPIBAC/InVS-Netzwerk, das rund 300 Krankenhauslabors umfasst, 2) die nationale Beobachtungsstelle für bakterielle Meningitis im Kindesalter: GPIP-Activ, die rund 250 pädiatrische Dienste und 150 mikrobiologische Laboratorien umfasst, 3) die regionalen Beobachtungsstellen für Pneumokokken, 4) die nationalen Referenzzentren.

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.

Materno-fetale Infektionen sind relativ selten (Inzidenz = 0,5%), aber sehr schwerwiegend (10% der Neugeborenensterblichkeit). Frühgeborene, Kinder mit niedrigem Geburtsgewicht (weniger als 2 kg) und Babys, deren Immunsystem unzureichend oder unreif ist, sind am anfälligsten für Meningitis. Sie müssen sofort auf der Intensivstation behandelt werden, bis die Antibiotika wirken. Das Leben der Kinder ist in Gefahr, wenn sich die gezielte Antibiotikabehandlung verzögert. Ob eine bakterielle Meningitis nachgewiesen oder vermutet wird, sie bleibt ein absoluter diagnostischer und therapeutischer Notfall.

Diagnostik :

Für den Kliniker ist eine klare diagnostische Unterscheidung zwischen viraler und bakterieller Meningitis nicht möglich, da die Symptome sehr verbreitet sind. Die neonatale bakterielle Meningitis kann in verschiedenen Formen auftreten. Die Reihenfolge des Auftretens der Symptome variiert je nach Säugling oder Kleinkind und einige treten möglicherweise nie auf. Die folgenden Symptome werden am häufigsten festgestellt: Schreie oder ungewöhnliches Wimmern, schnelles Atmen, Unruhe, Reizbarkeit bei Berührung, Erbrechen, Nahrungsverweigerung, blasse oder gefleckte Haut, Hypotonie, Schläfrigkeit, kalte Hände und Füße, hervorstehende Fontanellen, Flecken oder Ausschlag. Mehrere Symptome der Meningitis treten erst auf, wenn die Krankheit bereits weit fortgeschritten ist, und die meisten von ihnen werden auch bei anderen Erkrankungen wie z. B. der Grippe beobachtet. Dies macht die Diagnose noch schwieriger. 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 neonatale Meningitis wird meist durch Bakterien verursacht: *Streptococcus* Gruppe B (*Streptococcus agalactiae*), *Escherichia coli* oder *Listeria monocytogenes*. Die schnelle und zielgerichtete Diagnose mittels Real-Time-PCR aus der DNA von bakteriellen Krankheitserregern ist die Methode, die die beste Sensitivität und Spezifität aufweist.

NACHWEISPRINZIP

Der Eurobioplex EBX-022 ist ein Test, der Real-Time-Amplifikation der bakteriellen DNA von *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes* und *Escherichia coli* sowie eine DNA-Extraktions- und PCR-Inhibitionskontrolle verwendet. Durchgeführt wird der Test entweder direkt an nicht extrahierten CSF-Proben oder an extrahierter DNA in einer einzigen Vertiefung/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 daher sicher, dass ein negatives Ergebnis nicht auf zu geringe Mengen an DNA in der Cerebrospinalflüssigkeit und/oder fehlerhafte DNA-Extraktion und/oder zu große Mengen an PCR-Inhibitoren zurückzuführen ist.

Das Kit besteht aus einem Quadriplex: *Streptococcus agalactiae* (SAg), *Listeria monocytogenes* (LM), *Escherichia coli* (EC) + Kontrolle der DNA-Extraktion und PCR-Inhibition (CI-PCR). Die DNA von SAg, LM und EC wird jeweils mit FAM-, HEX- und Texas Red-markierten Sonden nachgewiesen. Die DNA-Extraktions- und PCR-Inhibitionskontrolle wird 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-022 Kit wird gebrauchsfertig für den spezifischen Nachweis von *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes* und *Escherichia coli* 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 :

Target	Fluorophor	Anregung	Emission
<i>Streptococcus agalactiae</i>	FAM	495 nm	515 nm
<i>Listeria monocytogenes</i>	HEX	535 nm	555 nm
<i>Escherichia coli</i>	Texas Red	585 nm	605 nm
PCR-Inhibitionskontrolle (CI-PCR)	Cy5	647 nm	667 nm

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

- Kanal **FAM** (ABI Systems, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96, Mx Systems, 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 **Texas Red** (Chromo 4/CFX96, Mx Systems, T-COR8®-IVD), LC Red 610 (LC480), Kanal Orange (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 – Texas Red-Cy5 (465-510, 533-580, 533-610, 618-660).

Tabelle 2 :

Farbe des Verschlusses	Kit-Komponente	9 Reaktionen	36 Reaktionen	Rekonstitution
Rot	ENZYM	2 x 100 µl	8 x 100 µl	Gebrauchsfertig
Transparent	OLIGOMIX	2 x 60 µl	8 x 60 µl	Gebrauchsfertig
Gelb	Positivkontrolle CP-MBmf	2 x 15 µl	8 x 15 µl	Gebrauchsfertig
Weiß	PCR-Inhibitionskontrolle (CI-PCR)	2 x 50 µl	8 x 50 µl	Gebrauchsfertig
Blau	Wasser = Negativkontrolle (CN-H2O)	2 x 500 µl	8 x 500 µl	Gebrauchsfertig

Oligomix : enthält die Primer und Sonden des Quadriplex (Sag+LM+EC+CI-PCR)

Tabelle 3: Anzahl der Patienten-Tests je nach EBX-Format (9 oder 36 Reaktionen) auf allen Geräten mit Ausnahme des T-COR8®-IVD (siehe Seite 69)

	9 Reaktionen	36 Reaktionen
* Anzahl der möglichen Patienten-Tests, Patient für Patient, mit maximal 3 Auftau-/Einfrier-Zyklen	6 Patienten	24 Patienten
* Maximale Anzahl der Patienten-Tests 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 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 (vorzugsweise -80°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-022-Kits kann die CI-PCR auf Kanal CY5 zum Mastermix hinzugegeben werden, wenn die Cerebrospinalflüssigkeit direkt getestet wird, oder vor der Extraktion, wenn diese durchgeführt wird. Die CI-PCR stellt sicher, dass ein negatives Ergebnis nicht auf das Vorhandensein von einer großen Menge an PCR-Inhibitoren oder ein Problem bei der Extraktion, falls diese durchgeführt wurde, 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 auch separat über Eurobio (Ref EurobioPlex EBX-002) erhältlich.

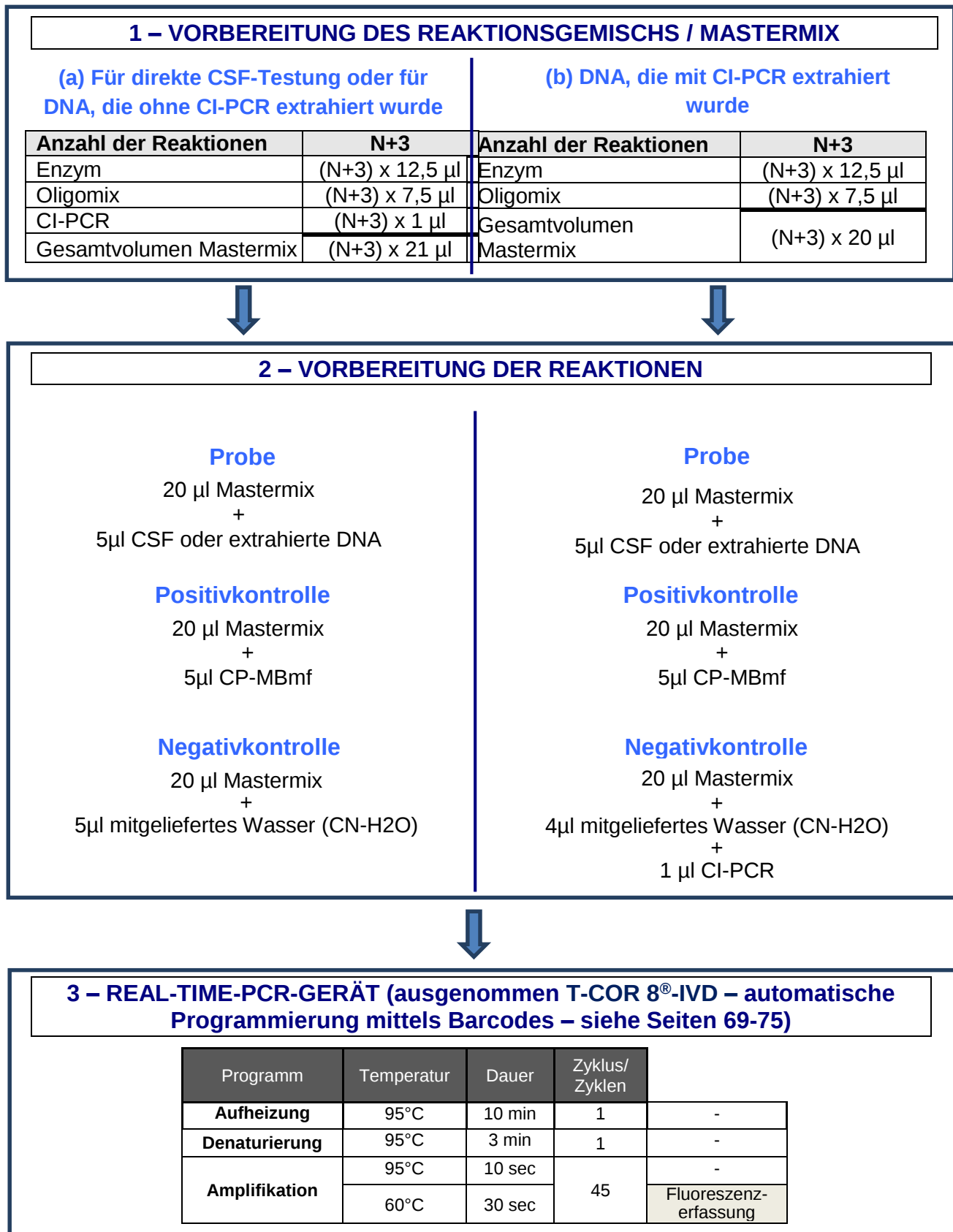
II- Real-Time-PCR-Verfahren

Allgemeine Anmerkungen:

Die Positivkontrolle 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 Positivkontrolle CP-MBmf sowie die Negativkontrolle (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 neues Kit geöffnet wird.

II-1/ Verfahrensdiagramm



II-2/ Verfahren im Detail

- 1) Enzym-Röhrchen homogenisieren und Oligomix-, CP-MBmf- und CI-PCR-Röhrchen vor Beginn vortexen und zentrifugieren.
- 2) Mastermix wie unten beschrieben zubereiten. N ist die Anzahl der Reaktionen (einschließlich Positiv- und Negativkontrollen). Planen Sie genug Reagenzien für N+2-Reaktionen (bis zu 3 getestete Patienten) oder N+3 Reaktionen (ab 3 getesteten 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	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	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	7,5 µl	(N+3) x 7,5 µl	52,5 µl
Gesamtvolumen Mastermix	20 µl*	(N+3) x 20 µl	140

- 3) Den unter 2) zubereiteten Mastermix homogenisieren und kurz zentrifugieren.
- 4) 20 µl Mastermix* 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 bitte die Seiten 69 bis 75):
 - Positivkontrolle:
 - 20µl Mastermix + 5µl CP-MBmf
 - Negativkontrolle:
 - Fall (a): Direkte Testung von CSF oder Testung von DNA, die ohne CI-PCR extrahiert wurde
 - 20 µl Mastermix + 5 µl mitgeliefertes Wasser (CN-H₂O)
 - Fall (b): DNA, die mit CI-PCR extrahiert wurde
 - 20 µl Mastermix + 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 Röhren 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 69-75):

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-Texas Red-Cy5 (465-510,533-580,533-610,618-660).

Anm. 2: Bei Applied Biosystems Systems « NONE » in « PASSIVE REFERENCE » auswählen.

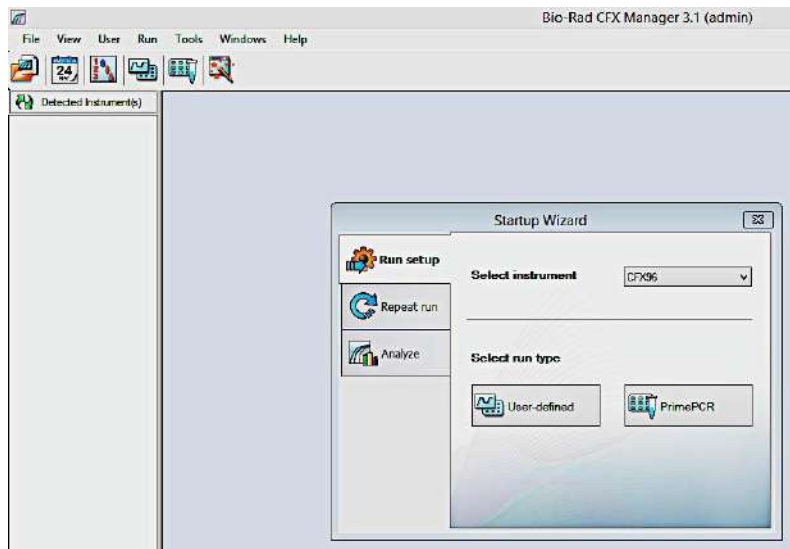
Anm. 3: Am Rotorgene™ bitte das Signal durch Anklicken von « GAIN optimization » kalibrieren.

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).

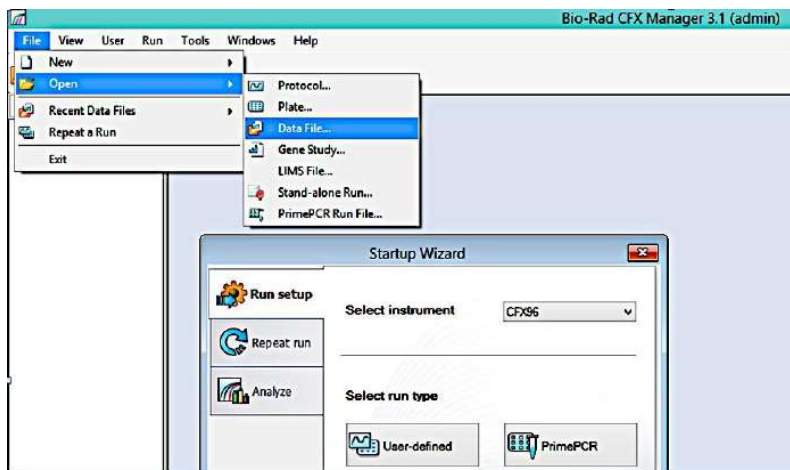
VALIDIERUNG DES TESTS

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.

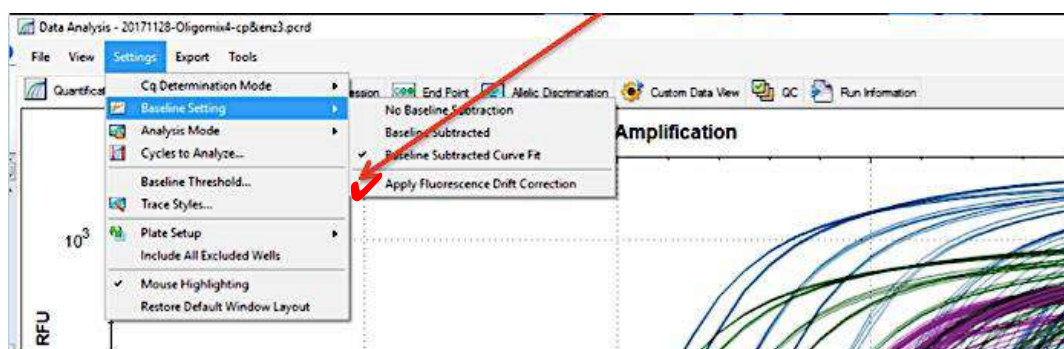


- « File » anklicken und « Open » auswählen, anschließend « Data File » auswählen.



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

In der Registerkarte « Settings » muss die Option « Drift Correction » wie in der Abbildung unten gezeigt, ausgewählt werden: « 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 worden ist.

Tabelle 5:

Positivkontrolle	
FAM	Ct ≤ 28
HEX	Ct ≤ 28
TEXAS RED	Ct ≤ 28
Negativkontrolle	
FAM	Ct nicht bestimmt
HEX	Ct nicht bestimmt
TEXAS RED	Ct ≥ 38 oder nicht bestimmt*
CY5	Ct ≤ 35

* Am T-COR 8®-IVD: Ct ≥ 34 oder nicht bestimmt. Die Auswertung wird automatisch mit Barcodes generiert.

DATENANALYSE UND AUSWERTUNG

DNA-Extraktions- und PCR-Inhibitionskontrolle in Proben:

Zwei Ergebnisse können erhalten werden:

1/ Der Test der DNA-Extraktions- und 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 im Zielkanal (FAM, HEX, Texas Red).

Bei klinischen Proben sind folgende Ergebnisse möglich:

*** Ct-Cut-off für Positivität der Proben:**

Kanal FAM *Streptococcus agalactiae*: + Positiv => Ct positiv (≤ 45)

Kanal HEX *Listeria monocytogenes*: + Positiv => Ct positiv (≤ 45)

Kanal TEXAS RED *Escherichia coli*: + Positiv => Ct positiv und < 38

(Besonderheit am T-COR 8®-IVD, Kanal TEXAS RED *Escherichia coli*: + Positiv => Ct positiv und < 34)

- PCR-Signal in Kanal Cy5 (Ct ≤ 45)

PCR-Signal				Anwesenheit von SAg	Anwesenheit von LM	Anwesenheit von EC	Gültigkeit des Tests/ Kommentar
FAM	HEX	Texas Red	CY5				
+	+	+	+	Ja	Ja	Ja	GÜLTIG
+	+	-	+	Ja	Ja	Nein	
+	-	+	+	Ja	Nein	Ja	
-	+	+	+	Nein	Ja	Ja	
+	-	-	+	Ja	Nein	Nein	
-	+	-	+	Nein	Ja	Nein	
-	-	+	+	Nein	Nein	Ja	
-	-	-	+	Nein	Nein	Nein	

- Kein PCR-Signal in Kanal Cy5 (nicht bestimmter Ct), aber positiv für ein oder mehrere Ziel-Pathogene (Ct < Positivitätsschwelle):

PCR-Signal				Anwesenheit von SAg	Anwesenheit von LM	Anwesenheit von EC	Gültigkeit des Tests/Kommentar
FAM	HEX	Texas Red	CY5				
+	-	-	-	Ja	Keine Auswertung möglich	Keine Auswertung möglich	Mögliche PCR-Inhibition oder Problem bei der Extraktion (falls durchgeführt). Dies verhindert aber nicht den Nachweis eines Pathogens (gültig für dieses Pathogen), ABER der Nachweis des/ der anderen Pathogens/Pathogene könnte verhindert worden sein – Probe 5-fach verdünnen und PCR wiederholen. Falls das Ergebnis gleich bleibt, die Extraktion erneut durchführen.
-	+	-	-	Keine Auswertung möglich	Ja	Keine Auswertung möglich	
-	-	+	-	Keine Auswertung möglich	Keine Auswertung möglich	Ja	

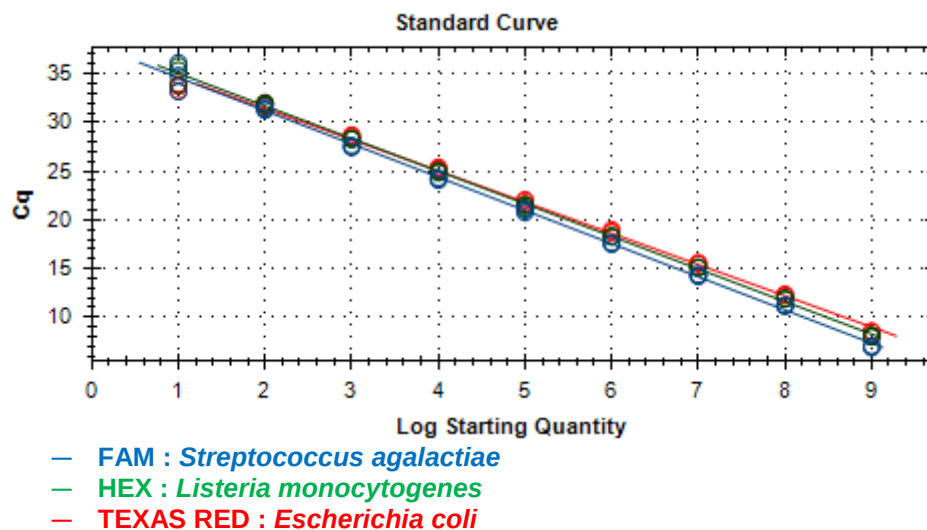
- Kein PCR-Signal in Cy5-Kanal (nicht bestimmter Ct) und kein PCR-Signal (Ct > Positivitätsschwelle) für Ziel-Pathogene:

PCR-Signal				Anwesenheit von SAg	Anwesenheit von LM	Anwesenheit von EC	Gültigkeit des Tests/Kommentar
FAM	HEX	Texas Red	CY5				
-	-	-	-	Keine Auswertung möglich	Keine Auswertung möglich	Keine Auswertung möglich	Mögliche PCR-Inhibition oder Problem bei der Extraktion (falls durchgeführt) – zunächst 5-fach verdünnen und PCR-wiederholen. Falls das Ergebnis gleich bleibt, die Extraktion erneut durchführen

SAg: *Streptococcus agalactiae*, LM: *Listeria monocytogenes*, EC: *Escherichia coli*

LEISTUNGSBEWERTUNG

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



Analytische Sensitivität: CP-MBmf: 10 Kopien/μl

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

Korrelationskoeffizient und Effizienz

Effizienz

FAM: SAg: 95,4 %

HEX: LM: 100,9 %

Texas Red: EC: 99,1 %

Korrelationskoeffizient

FAM: SAg: 0,993

HEX: LM: 0,994

Texas Red: EC: 0,997

Streptococcus agalactiae (SAg), *Listeria monocytogenes* (LM), *Escherichia coli* (EC)

Variabilität des Signals

EBX-022	INNERHALB des Tests	ZWISCHEN den Tests
Bakterielle Targets	CV %	CV %
<i>Streptococcus agalactiae</i> (FAM)	0,69	2,26
<i>Listeria monocytogenes</i> (HEX)	0,57	1,56
<i>Escherichia coli</i> (TEXAS RED)	0,64	3,21

CV : Variationskoeffizient

Validierung an klinischen Proben

Spezifität und Sensitivität wurden an CSF-Proben (ohne Extraktion der DNA), die zuvor im Referenzlabor getestet worden waren, untersucht.

		EBX-022								
		SAg			LM			EC		
		POS	NEG	TOTAL	POS	NEG	TOTAL	POS	NEG	TOTAL
Vortest	POS	5	0	5	1	0	1	7	0	7
	NEG	1	30	31	0	42	42	1	35	36
	TOTAL	6	30	36	1	42	43	8	35	43

Bakterielle Targets EBX-022	Spezifität	Sensitivität	Konkordanz
<i>Streptococcus agalactiae</i> (FAM)	96,8 % *	> 98 %	97,2 % (n = 36)
<i>Listeria monocytogenes</i> (HEX)	> 98 %	> 98 %	> 98 % (n = 43)
<i>Escherichia coli</i>	97,2 % *	> 98 %	97,7 % (n = 43)

* 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-022 Eurobioplex empfindlicher ist.

Studie über potenziell störende Mikroorganismen: keine Interferenz

Keine Kreuzreaktion bei:

- *Streptococcus agalactiae* auf *Listeria monocytogenes* (n=5) = 0%
- *Streptococcus agalactiae* auf *Escherichia coli* (n=5) = 0 %
- *Listeria monocytogenes* auf *Streptococcus agalactiae* (n=1) = 0%
- *Listeria monocytogenes* auf *Escherichia coli* (n=1) = 0 %
- *Escherichia coli* auf *Streptococcus agalactiae* (n=7) = 0%
- *Escherichia coli* auf *Listeria monocytogenes* (n=7) = 0%

Keines der nachfolgend aufgeführten Bakterien wurde mit dem EBX-022-Kit nachgewiesen (n=1 Probe jedes Bakteriums):

- *Neisseria meningitidis*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenza*
- *Staphylococcus aureus*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Bartonella spp*
- *Coxiella burnetii*
- *Mycobacterium avium*
- *Klebsiella kingae*

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

<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-022, wird die FAM/HEX/Texas Red/Cy5 Kombination verwendet. Wenn einer der Kanäle nicht verwendet wird, ist dieser Kanal bei der Auswertung der Ergebnisse nicht zu berücksichtigen.

Verwendung der Barcodes (auf den Seiten 73 bis 75 verfügbar)

- 1- Menü auswählen > Neuer Lauf (« New Run »)
- 2- Barcode auswählen
- 3- Den entsprechenden Barcode auf der rechten Seite des Geräts scannen:
 - Für die Positivkontrolle (Barcode EBX-022 Pos Ctrl),
 - Für die Negativkontrolle (Barcode EBX-022 Neg Ctrl),
 - Für eine Patientenprobe (Barcode Assay: EBX-022)

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 Fail »: Ungültig

« Neg Ctrl Valid »: Gültig

« Pos Ctrl Fail »: Ungültig

« Pos Ctrl Valid »: Gültig

Statusbestimmung der Patienten-Proben:

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

« Not detected »: Negativ → rote Box

* Die Ergebnisse werden in Bezug auf bestimmte Bakterien spezifiziert.

ACHTUNG !

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

« Invalid »: Ungültiges Ergebnis -> 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 zwei negative Proben, die mit « Not Detected » (Proben 1 und 2) angezeigt werden:

❖ Am Gerätebildschirm:

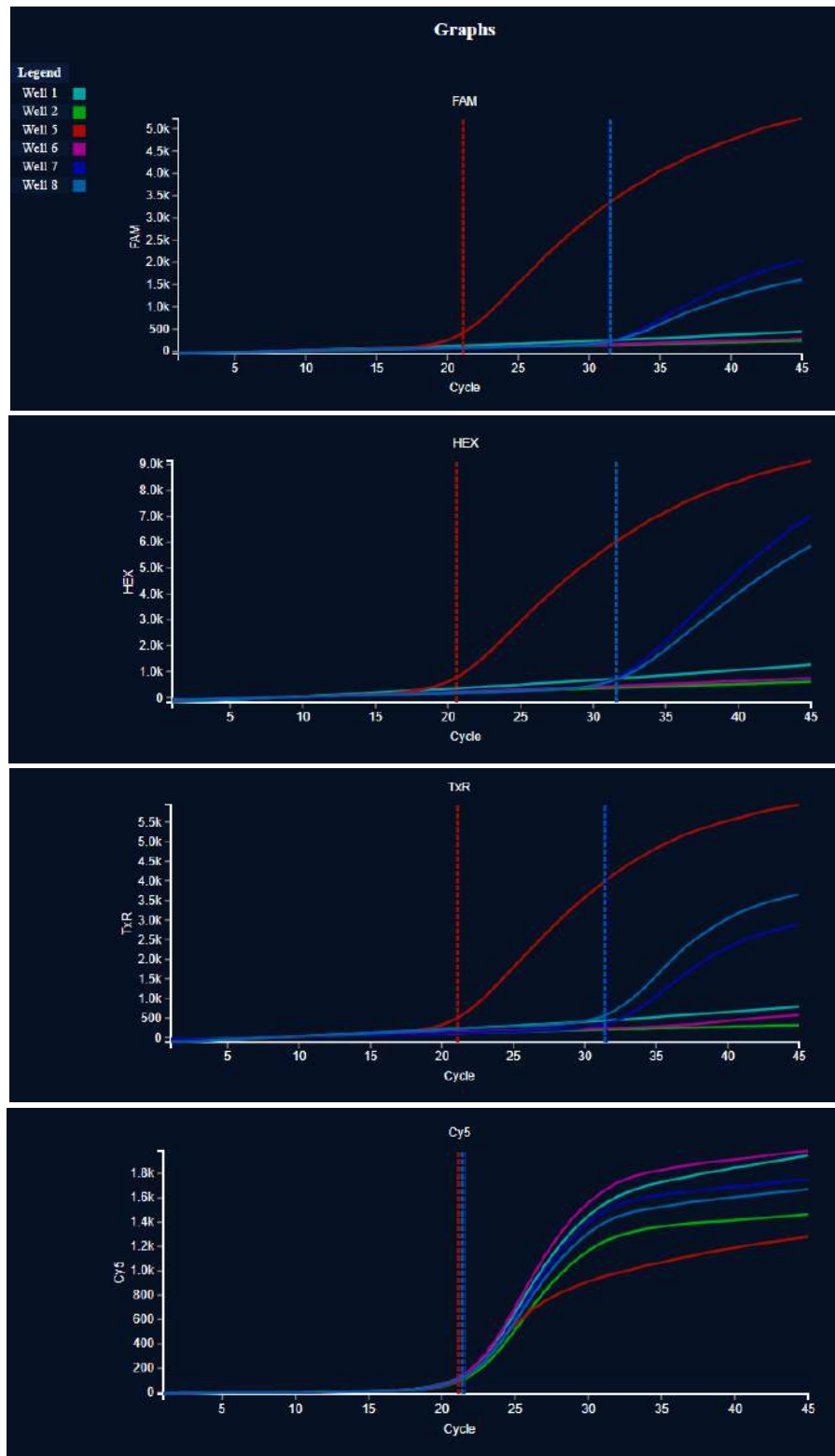
Interpretations	
1	Sample 1 EBX-022 Not Detected - S. ag, L. mono, E. coli
2	Sample 2 EBX-022 Not Detected - S. ag, L. mono, E. coli
5	EBX-022 POS Ctrl EBX-022 Pos Ctrl Detected: Pos Ctrl Valid
6	EBX-022 NEG ctrl EBX-022 Neg Ctrl Detected: Neg Ctrl Valid
7	LOD 10c/microl repl1 EBX-022 Detected: E. coli, L. mono, S. ag
8	LOD 10c/microl repl2 EBX-022 Detected: E. coli, L. mono, S. ag

❖ Im Bericht:

Summary						
Well	Sample	Assay	FAM	HEX	TxR	Cy5
1	Sample 1	EBX-022				21.5
2	Sample 2	EBX-022				21.5
5	EBX-022 POS Ctrl	EBX-022 Pos Ctrl	21.1	20.6	21.1	21.1
6	EBX-022 NEG ctrl	EBX-022 Neg Ctrl				21.4
7	LOD 10c/microl repl1	EBX-022	31.4	31.6	31.5	21.5
8	LOD 10c/microl repl2	EBX-022	31.5	31.6	31.4	21.4

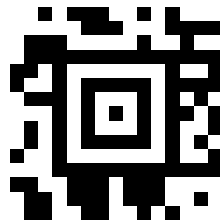
Call	Note
Not Detected	S. ag, L. mono, E. coli
Not Detected	S. ag, L. mono, E. coli
Detected • Pos Ctrl Valid	
Detected • Neg Ctrl Valid	
Detected • E. coli • L. mono • S. ag	
Detected • E. coli • L. mono • S. ag	

Beispiel für Amplifikationskurven:



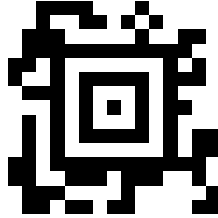
Barcodes für EBX-022 zur Verwendung am T-COR8®-IVD

EBX-022 Pos Ctrl
Positivkontrolle CP-MBmf

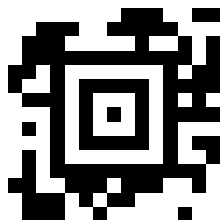


EBX-022 Neg Ctrl

Wasser = Negativkontrolle (CN-H2O)



Assay: EBX-022



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

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