



EurobioPlex

*Bartonella spp/Bartonella henselae/
et Bartonella quintana*

PCR EN TEMPS REEL

Pour la PCR **qualitative** en temps réel.

REF EBX-013



24/48/96 réactions



Version 1.04 du 24/03/2016

Conditions de stockage: conserver tous les réactifs à -20°C jusqu'à utilisation et après première utilisation



Mode d'emploi

UTILISATION

Le test Eurobioplex *Bartonella* EBX-013 est un test d'amplification par réaction en chaîne de la polymérase (PCR) en temps réel conçu pour la détection qualitative de la présence ou l'absence de *Bartonella spp.* (toutes *Bartonella*), *Bartonella henselae* et *Bartonella quintana* dans un extrait d'acide nucléique ADN. Ce kit contient également un contrôle d'inhibition de PCR. Le test est indiqué pour poser un diagnostic de présomption d'infection chez l'homme, à partir de sérum, de sang ou de tout prélèvement biologique de patients, ou compléter un diagnostic sérologique avéré ou indéterminé par les techniques usuelles (sérologie, histologie, culture).

INTRODUCTION

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

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

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

La maladie des griffes du chat (MGC)

L'agent pathogène est *Bartonella henselae*. La MGC se caractérise par une conjonctivite infectieuse s'accompagnant d'une forte réaction ganglionnaire. Elle a été décrite pour la première fois en 1889 par H.Parinaud. La prévalence de la MGC est de 6,6 cas pour 100 000 habitants. Le pic d'incidence est rapporté pendant la période froide de l'année, entre septembre et avril, lorsque les animaux domestiques vivent d'avantage au contact de leurs maîtres au sein du foyer.

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

La fièvre des tranchées

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

Diagnostic

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

PRINCIPE DE LA DETECTION

Le test Eurobioplex EBX-013 est un test d'amplification des acides nucléiques de *Bartonella spp.*, *Bartonella henselae* et *Bartonella quintana* ainsi que d'un contrôle d'inhibition de PCR qui utilise l'amplification par PCR en temps réel. Ce contrôle permet de s'assurer qu'un résultat négatif ne peut être dû à la présence d'inhibiteurs de PCR en trop grande quantité.

Le test est réalisé à partir de l'ADN extrait de l'échantillon. *Bartonella spp.*, *henselae* et *quintana* sont respectivement détectées à l'aide d'une sonde marquée FAM, HEX et TEXAS RED, et 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 son

hydrolyse 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.

Ce système d'amplification a été validé sur :

- un plasmide comportant des inserts spécifiques de *Bartonella spp*, *Bartonella henselae* et *Bartonella quintana* (Contrôle positif : plasmide CP-BsppHQ),
- un plasmide (PUC57) comportant une séquence aléatoire non codante insérée dans celui-ci pour le contrôle d'inhibition de PCR (plasmide CI-PCR),
- des échantillons cliniques de contaminations connues (cf. paragraphe sur l'étude clinique).

DESCRIPTION ET CONTENU DU KIT

Le kit de PCR en Temps réel *Bartonella spp/henselae/quintana* est prêt à l'emploi pour la détection spécifique des bactéries appartenant à ce genre et espèces. Le kit contient les réactifs et l'enzyme nécessaires à l'amplification de l'ADN bactérien de *Bartonella spp*, *Bartonella henselae* et *Bartonella quintana* et du plasmide contrôle d'inhibition de PCR. 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 :

Tableau1 :

Cible	Fluorophore	Excitation	Emission
<i>Bartonella spp</i>	FAM	495 nm	515 nm
<i>Bartonella henselae</i>	HEX	535 nm	555 nm
<i>Bartonella quintana</i>	TexasRed	585 nm	605 nm
Contrôle inhibition de PCR	Cy5	647 nm	667 nm

Alternatives :

- Canal **FAM** (Systèmes ABI, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx), Canal 530 (LC 480), Canal Green (RotorGene)
- Canal **HEX** (Chromo 4, Systèmes Mx), Canal VIC (Systèmes ABI, BioradCFX96), Canal Alexa532 (SmartCycler II), Canal 560 (LC 480), Canal Yellow (RotorGene),
- Canal **Texas Red** : LC Red 610 (LC480), Canal Orange (Rotor Gene)
- Canal **Cy5** (Systèmes ABI, Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx), Canal Alexa647 (SmartCycler II), Canal 670 (LC 480), Canal Red (RotorGene)

Tableau 2 :

Composés du kit	96 tests	48 tests	24 tests	Reconstitution
Master Mix	4x530 µl	2x530 µl	530 µl	Prêt à l'emploi
Eau = contrôle négatif (CN)	1 ml	1 ml	1 ml	Prêt à l'emploi
Contrôle positif (CP-BsppHQ)	50 µl	50 µl	50 µl	Prêt à l'emploi
Contrôle inhibition de PCR	120 µl	60 µl	30 µl	Prêt à l'emploi

Matériel nécessaire non fourni:

- ◇ Hotte biologique
- ◇ Appareil de qPCR
- ◇ Centrifugeuse pour microtubes
- ◇ Vortex
- ◇ Plaques / tubes pour réaction de qPCR
- ◇ Micropipettes
- ◇ Embouts stériles à filtres pour micropipettes
- ◇ Microtubes stériles
- ◇ Gants

CONSERVATION

Tous les réactifs doivent être stockés à -20°C. Une conservation à +4°C n'est pas recommandée.

Tous les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du kit.

Plusieurs cycles de congélation / décongélation (> 3x) doivent être évités, cela pourrait réduire la sensibilité de l'analyse.

PRECAUTIONS ET NOTES

Lire attentivement ces instructions avant de débuter la procédure.

- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée par du personnel compétent.
- ◇ S'assurer que les instruments ont été installés, calibrés et maintenus en accord avec les recommandations du fabricant
- ◇ 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.
- ◇ Eviter les cycles de congélation / décongélation des réactifs, cela peut conduire à une baisse de la sensibilité du test.
- ◇ Une fois les réactifs décongelés, centrifuger brièvement les tubes avant leur utilisation.
- ◇ L'utilisation de glace ou d'un bloc réfrigérant est conseillée en cas de longs délais du fait par exemple d'un important nombre d'échantillons à traiter ou de fortes températures.
- ◇ Définir trois zones de travail distincts : 1) Isolation de l'ADN, 2) Préparation du mélange réactionnel et 3) Amplification / Détection des produits amplifiés.
- ◇ Les pipettes, les réactifs et autres matériels de travail ne doivent pas circuler entre ces deux zones.

- ◇ Une attention particulière doit être mise en œuvre pour conserver la pureté des réactifs et des mélanges réactionnels. L'utilisation de gants est obligatoire. Des méthodes appropriées de préparation d'ADN doivent être utilisées.
- ◇ Utiliser toujours des embouts stériles à filtre pour micropipettes.
- ◇ Porter des blouses et des gants distincts dans chaque zone de travail.
- ◇ Ne pas pipeter avec la bouche. Ne pas manger, ni boire ou fumer dans le laboratoire.
- ◇ Eviter les aérosols.

COLLECTION DES ECHANTILLONS, TRANSPORT ET CONSERVATION

- ◇ Collecter les échantillons dans des tubes stériles.
- ◇ Les échantillons doivent être extraits immédiatement ou congelés de -20°C à -80°C.
- ◇ Le transport des échantillons cliniques est soumis à la réglementation locale pour le transport des agents infectieux.

PROCEDURE

I-Extraction d'ADN

Des kits d'extraction d'ADN sont disponibles chez plusieurs fabricants. Vous pouvez utiliser votre propre système d'extraction ou un système commercial adapté en se référant aux instructions du fabricant.

Par exemple, pour des échantillons de liquide biologique, InnuPREP Blood DNA Mini kit (845-KS-1040050, disponible chez Eurobio) est recommandé selon le protocole d'extraction de fluides corporels, en éluant dans un volume final de 50 µL.

CI-PCR sur le canal CY5 ajouté dans la réaction de PCR 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. Le CI-PCR sur le canal CY5 peut aussi être ajouté avant l'extraction et permet de s'assurer qu'un résultat négatif ne peut être dû à un problème d'extraction ou la présence d'inhibiteurs de PCR en trop grande quantité pour valider le test. Le CI-PCR est également disponible chez Eurobio (Ref EurobioPlex EBX-002). Dans les 2 cas nous recommandons l'ajout d'1 microlitre par extraction (pour une élution dans 50 microlitres) ou par réaction de PCR.

II- Réalisation de la qPCR

Remarques générales:

- a. Bien homogénéiser le mélange réactionnel avant manipulation.
- b. Les contrôles (positif BspHQ et contrôle de PCR) contiennent des concentrations élevées de matrice ADN. Les manipulations doivent être réalisées précautionneusement pour éviter toute contamination.
- c. Les dilutions peuvent être conservées maximum 24h à +4°C.

Il est nécessaire de tester : un contrôle positif CP-BsppHQ (*Bartonella spp/ henselae/ quintana*), un contrôle négatif (eau PCR fournie= CN), et un contrôle d'inhibition de PCR (contrôle fourni= CI-PCR). Aucune gamme standard n'est réalisée.

Exemple de plan de plaque en PCR temps-réel :

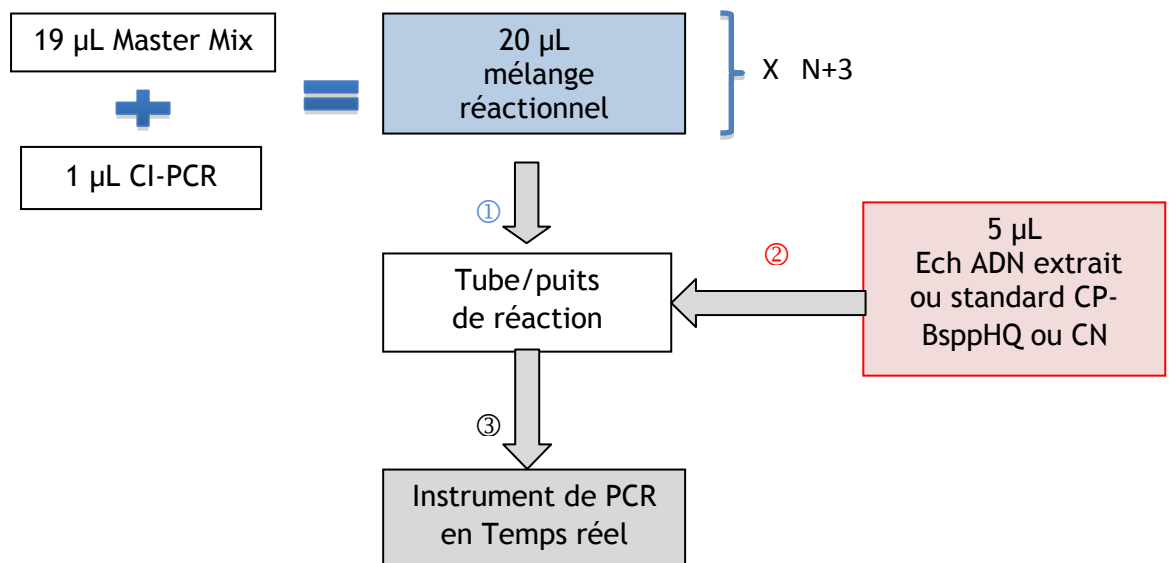
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP-BsppHQ. + CI-PCR											
B	CN											
C	Ech. 1 + CI-PCR											
D												
E	...											
F												
G												
H												

Ech. : Echantillon inconnu d'ADN ; CP-BsppHQ: contrôle positif *Bartonella spp/henselae/quintana* ; CI-PCR : contrôle d'inhibition de PCR directement ajouté au Master Mix s'il n'a pas été ajouté avant extraction ; CN : contrôle négatif (eau)

Protocole de qPCR

- 1) Homogénéiser le Master Mix et centrifuger brièvement.
- 2) Réaliser le mélange réactionnel comme ci-dessous si le CI-PCR n'a pas été ajouté au moment de l'extraction. Sinon utiliser directement 20 microlitres de Master Mix.

Le mélange réactionnel doit être réalisé comme suit en multipliant par le nombre d'échantillons + standards (N) à tester. Prévoir N+3. Ici le CI-PCR est ajouté au moment de la PCR. Celui-ci peut également être ajouté avant extraction et est disponible chez Eurobio sous la référence EurobioPlex EBX-002.



- 1) Distribuer 20 µL de ce mélange réactionnel à l'aide d'une micropipette et d'embouts à filtre stériles dans chaque tube/puits de microplaque pour PCR en temps réel.
- 2) Ajouter 5 µL d'échantillon d'ADN.

- 3) En parallèle, réaliser
 - un tube/puits avec 20 µL du mélange réactionnel + 5 µL de contrôle positif CP-Barto (puits A1)
 - un tube/puits négatif avec 20 µL de mastermix + 5 µL d'eau biologie moléculaire (=H₂O : puits B1).
- 4) Fermer immédiatement avec un film adhésif pour éviter toute contamination.
- 5) Centrifuger brièvement pour collecter le mélange réactionnel au fond des tubes ou des puits de microplaque.
- 6) Réaliser le programme suivant sur l'instrument de qPCR.

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

Note 1 : Rampes de montée et descente en température par défaut, jusqu'à 20°C/sec, ou 100%.

Note 2 : Sur LightCycler® 480, deux systèmes optiques existent : seul le « System II » est compatible avec l'utilisation du kit.

Note 3 : Pour les appareils de la gamme Applied Biosystems, sélectionner « NONE » dans « PASSIVE REFERENCE ».

Note 4 : Sur Rotorgene™, calibrer le signal en cliquant sur « GAIN OPTIMISATION ».

VALIDATION DE L'EXPERIMENTATION

Le seuil doit être positionné juste au-dessus du maximum de signal du contrôle négatif.

Pour que le dosage soit valide, les valeurs de Ct pour les contrôles doivent être les suivantes. En dehors de ces valeurs, l'expérimentation ne peut être validée.

Tableau 3 :

Contrôles	CP-BsppHQ +CI-PCR	CN
Canal FAM	Ct ≤ 18	Ct non déterminé
Canal HEX	Ct ≤ 20	Ct non déterminé
Canal Texas Red	Ct ≤ 18	Ct non déterminé
Canal CY5	Ct ≤ 22	Ct non déterminé

CP-BsppHQ: Contrôle positif *Bartonella spp/henselae/quintana*; CI-PCR: Contrôle d'inhibition de PCR ; CN : Contrôle négatif (eau biologie moléculaire)

ANALYSE DES DONNEES ET INTERPRETATION

Pour les échantillons cliniques, les résultats suivants sont possibles :

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

ANALYSE DE PERFORMANCES

1. Etudes de Reproductibilité :

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

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

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

Reproductibilité entre expériences(inter-expériences) :

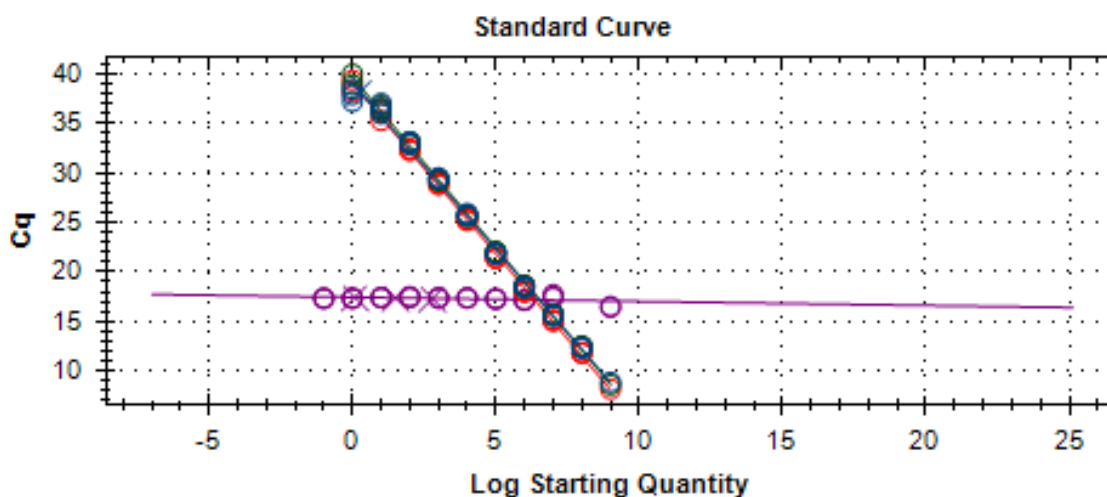
copies/ μ l	CV % CANAL FAM	CV % CANAL HEX	CV % CANAL TEXAS RED
	<i>Bartonella spp</i>	<i>Bartonella henselae</i>	<i>Bartonella quintana</i>
10 8	8,91	3,96	2,80
10 7	6,36	1,99	4,04
10 6	3,77	1,32	4,62
10 5	3,11	1,30	3,49
10 4	2,58	1,09	3,27
10 3	0,19	0,48	4,86
10 2	1,38	2,08	3,89
10	1,24	2,40	4,00
5	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

2. Performances analytiques :

Sensibilité analytique : 12,5 copies/ μ l pour *spp* et *henselae* ; 5 copies/ μ l pour *quintana*.

Linéarité de quantification : seuil de détection à 10E+09 copies/ μ l.

Expérience réalisée sur thermocycleur qPCR CFX96 (Biorad) :



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

3. Evaluation diagnostic : Etude clinique

Comparaison PCR Référence du CNR Marseille et PCR Eurobio (kit *Bartonella* EBX-013) :

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

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

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

		EBX-0.13 Quadriplex Bartonella EUROBIO								
		B spp			B henselae			B quintana		
		POS	NEG	TOTAL	POS	NEG	TOTAL	POS	NEG	TOTAL
Pretestés	POS	60	0	60	41	4	45	15	0	15
	NEG	2	47	49	0	64	64	0	94	94
CNR	TOTAL	62	47	109	41	68	109	15	94	109

Tous les échantillons ont été correctement analysés et présentent tous un signal valide pour le contrôle interne.

Sensibilité

Spp : $60/60 = 100\%$
Henselae : $41/45 = 91,1\%$
Quintana : $15/15 = 100\%$

Spécificité

Spp : $47/49 = 95,9\%$
Henselae : $64/64 = 100\%$
Quintana : $94/94 = 100\%$











BIBLIOGRAPHIE

Angelakis E, Raoult D. Pathogenicity and treatment of Bartonella infections. Int J Antimicrob Agents. 2014 Jul;44(1):16-25.
Noémie Boillat, Gilbert Greub. Maladie des griffes du chat et autres bartonelloses. Rev Med Suisse 2008;901-907.
Boulouis et al. Les infections à Bartonella chez l'homme et l'animal: aspects diagnostiques et thérap. Elsevier. 2007.
Bartonelloses. Précis de biopathologie analyses médicales spécialisées. Biomnis. 2012.

ELIMINATION DES DECHETS

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

SYMBOLES

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



eurobio *AbCys*

7, avenue de Scandinavie
ZA de Courtaboeuf
91953 Les Ulis Cedex
FRANCE



EurobioPlex
Bartonella spp/Bartonella henselae/
and Bartonella quintana
REAL-TIME PCR

For **qualitative** real-time PCR.

REF EBX-013



24/48/96 reactions



Version 1.03 from February 2nd 2016

Storage conditions:

Keep all reagents at -20°C until use and after first use



Instructions for use

INTENDED USE

The Eurobioplex Bartonella EBX-013 test uses real time polymerase chain reaction (PCR) amplification and is designed for the qualitative detection of Bartonella spp. (all Bartonella), Bartonella henselae and Bartonella quintana from a DNA nucleic acid extract. This kit also contains a control of inhibition of PCR. The test allows early diagnosis of presumption of Bartonella infection in humans, from serum, blood or any biological samples of patients, or complement a proven or indeterminate serological diagnosis by standard techniques (serology, histology and culture).

INTRODUCTION

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

Depending on the species Bartonella have various modes of transmission. Humans can be infected with the animal directly by scratch, bite, or simple caresses if the skin of the hands is scratched. The infection can also be transmitted indirectly through a blood-sucking arthropod vector. Each species of Bartonella usually has a single natural reservoir host which is generally asymptomatic due to a long-term bacteremia. The accidental hosts however develop symptoms generally more severe. It is difficult to propose a treatment for bacteria causing so many variable clinical manifestations. Moreover, the evolution of the disease varies according to the bacteria and immune system of the host. It can be acute, recurrent or even chronic. The treatment has to be adapted to each clinical situation. There is so far no vaccine prophylaxis.

Cat scratch disease (CSD)

The pathogen agent is Bartonella henselae. The CSD is characterized by infectious conjunctivitis accompanied by a strong lymph node reaction. It was described for the first time in 1889 by H.Parinaud. The prevalence of the CSD is 6.6 cases per 100,000 population. The peak of incidence is reported during the cold period of the year, between September and April when pets live more in contact with their master at home.

The typical symptoms are lymphadenopathy, fever (38-41°C), fatigue, headaches, splenomegaly and cutaneous manifestations such as transitional maculo-papular rash. The disease vectors are fleas with a contamination by the way of a scratch or a bite of an infected cat or through the bite of an infected flea. It is necessary to adopt a number of preventive measures for exposure to animals, especially domestic pets.

The prognosis is good in immunocompetent patients, with spontaneous resolution in 90% of cases. On the other hand, antibiotic therapy is often necessary for children and immunocompromised people, as well as in cases of neurological and cardiac forms.

Trench fever

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

Diagnosis

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

PRINCIPLE OF THE DETECTION

The Eurobioplex EBX-013 test is a test of amplification of nucleic acid of *Bartonella* spp., *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* by real-time PCR as well as a control of PCR inhibition. This control ensures that a negative result may not be due to the presence of PCR inhibitors at high quantity.

The test is performed from the DNA extracted from the sample. *Bartonella* spp, *henselae* and *quintana* are respectively detected using a FAM, HEX, and TEXAS RED labeled probe. The specific probe of the PCR inhibition control is labelled by the fluorochrome CY5. All emit a specific fluorescence following its hydrolysis during the elongation of the amplification product. The measurement of the intensities of real-time fluorescence relates the accumulation of specific amplification products.

This amplification system has been validated on:

- a plasmid containing specific inserts of *Bartonella* spp., *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* (positive control: plasmid CP-BsppHQ),
- a non-coding random sequence inserted into plasmid PUC57 for the control of PCR inhibition (plasmid CI-PCR),
- clinical samples of known contamination (see clinical study).

DESCRIPTION AND CONTENT OF THE KIT

Bartonella spp/henselae/quintana real-time PCR kit is ready to use for the specific detection of bacteria belonging to this genus and species. The kit contains reagents and enzyme necessary for the amplification of Bartonella spp, Bartonella henselae and Bartonella quintana DNA, and of the plasmid control of PCR inhibition. Fluorescence is emitted and measured individually by an optical system during PCR. The detection of the amplified fragment is carried out by a fluorimeter using the channels listed in the table 1 below:

Table 1 :

Target	Fluorophore	Excitation	Emission
Bartonella spp	FAM	495 nm	515 nm
Bartonella henselae	HEX	535 nm	555 nm
Bartonella quintana	TexasRed	585 nm	605 nm
Control of PCR inhibition	Cy5	647 nm	667 nm

Alternatives:

- Channel **FAM** (ABI Systems, SmartCycler II, Chromo 4/CFX96, Systems Mx), Channel 530 (LC 480), Channel Green (RotorGene)
- Channel **HEX** (Chromo 4, Systems Mx), Channel VIC (ABI Systems, Biorad CFX96), Channel Alexa532 (SmartCycler II), Channel 560 (LC 480), Channel Yellow (RotorGene),
- Channel **Texas Red** : LC Red 610 (LC480), Channel Orange (Rotor Gene)
- Channel **Cy5** (ABI Systems, Chromo 4/CFX96, Mx Systems), Channel 670 (LC480), Channel Alexa647 (SmartCyclerII), Channel Red (RotorGene)

Table 2 :

Components of the kit	96 tests	48 tests	24 tests	Reconstitution
Master Mix	4x530 µl	2x530 µl	530 µl	Ready to use
Water = negative control (CN)	1 ml	1 ml	1 ml	Ready to use
Positive control (CP-BsppHQ)	50 µl	50 µl	50 µl	Ready to use
Control of PCR inhibition	120 µl	60 µl	30 µl	Ready to use

Required material not provided:

- ◇ Biological Hood
- ◇ qPCR instrument
- ◇ Micro centrifuge
- ◇ Vortex
- ◇ Plates / tubes for qPCR
- ◇ Micropipettes
- ◇ Filter tips for micropipettes
- ◇ Sterile microtubes
- ◇ Gloves

STORAGE

All reagents must be stored at -20°C. Storage at +4°C is not recommended.
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.
- ◇ Many freezing/defrosting cycles of the reagents must be avoided, and could lead to decrease in sensitivity.
- ◇ Once defrosted, spin down briefly the tubes before use.
- ◇ Use of ice or cooling block is recommended in case of delays due for example to a significant number of samples to treat or high temperatures.
- ◇ Define three working areas: 1) Isolation of DNA, 2) Preparation of the reaction mix and 3) Amplification / Detection of amplified products.
- ◇ Pipettes, reagents and other materials must not cross each area.
- ◇ Specific caution is required to preserve the purity of the reagents and reaction mixtures. The use of gloves is mandatory. Appropriate methods of preparation of DNA should be used.
- ◇ Always use filtered tips for micropipettes.
- ◇ Use specific lab coat and gloves in each working area.
- ◇ Do not pipette with mouth and do not eat, drink or smoke in the area.
- ◇ Avoid sprays.

COLLECTION OF SAMPLES, TRANSPORT AND STORAGE

- ◇ Collect samples in sterile tubes.
- ◇ The samples should be extracted immediately or frozen from -20°C to -80°C.
- ◇ Transport of clinical samples must obey local regulations for this type of infectious agents.

PROCEDURE

I- Extraction of the DNA

DNA extraction kits are available from several manufacturers. You can use your own homemade technique or a suitable commercial system by referring to the manufacturer's instructions.

For liquid samples, InnuPREP Blood DNA Mini kit (845-KS-1040050, from Eurobio) is recommended following the protocol for extraction of body fluids in a final volume of elution of 50 μ L.

The control of PCR inhibition (CI-PCR; channel Cy5) added to the PCR reaction ensures that a negative result may not be due to the presence of PCR inhibitors at high quantity. It can also be added before the extraction and makes sure that a negative result may not be due to a problem of extraction or the presence of PCR inhibitors at high quantity. CI-PCR is also available from Eurobio (Ref EurobioPlex EBX-002). In the 2 cases we recommend the addition of 1 microlitre per extraction (in a final volume of elution of 50 μ L) or by PCR reaction.

II- qPCR

General comments:

- a) Homogenize the reaction mix before starting.
- b) Positive controls (BspHQ and control of PCR) contain a very high concentration of DNA. Manipulations must be performed carefully to avoid contamination.
- c) Dilutions may be kept maximum 24 hours at + 4°C.

It is necessary to test: a positive control CP-BspHQ (Bartonella spp/ henselae/ quintana), as well as a negative control (water supplied) and the control of PCR inhibition (provided control = CI-PCR). No standard range is performed.

Example of qualitative qPCR plate layout:

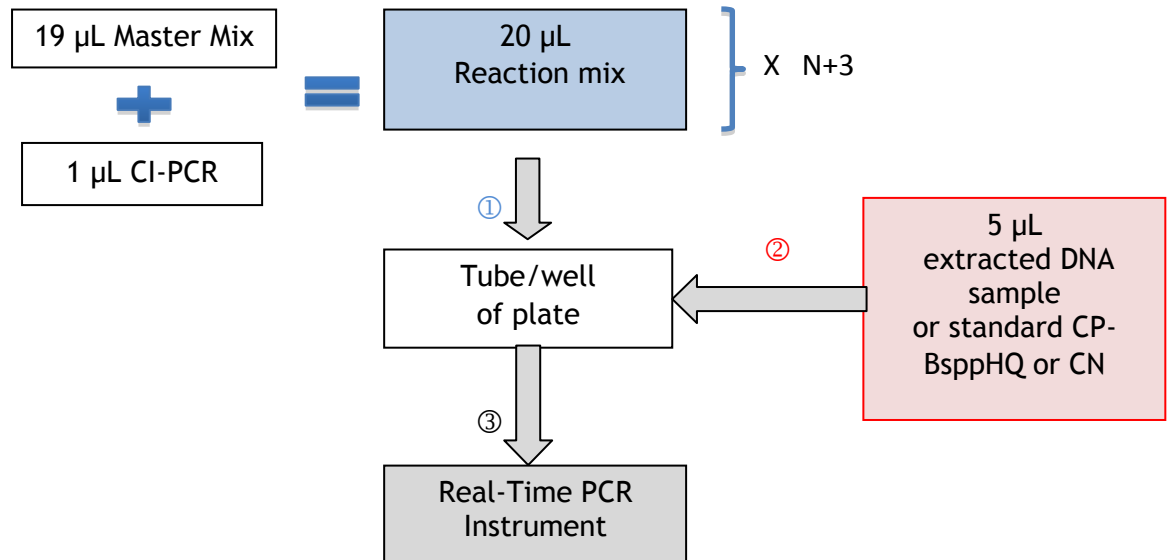
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP-BspHQ. +CI-PCR											
B	CN											
C	Sample 1 + CI-PCR											
D	...											
E												
F												
G												
H												

CP-BspHQ: positive control Bartonella spp/henselae/quintana; CI-PCR: control of PCR inhibition directly added in the Master Mix if not added before extraction; CN: Negative Control (water); Sample: Unknown DNA sample.

Protocol of qPCR

- 1) Homogenize the Master Mix and centrifuge briefly.
- 2) If the CI-PCR has not been added before extraction achieve the reaction mix as follows. Otherwise use directly 20µl of Master Mix.

The reaction mix should be carried out as follows, multiplying by the number of samples + standards (N) to test. Provide N + 3. Here the CI-PCR is added at the time of the PCR. It can also be added before extraction. It is available from Eurobio under reference EurobioPlex EBX - 002.



- 3) Distribute 20 µL of the reaction mix using a micropipette and sterile filter tips in each tube/well of microplate for real-time PCR.
- 4) Add 5 µL of DNA sample.
- 5) In parallel achieve :
 - a tube/well with 20 µL of the reaction mix + 5 µL of positive control CP-Barto (well A1)
 - a negative tube/well with 20 µL of master mix + 5 µL of water molecular biology (= H₂O: Well B1)
- 6) Close immediately with an adhesive film to avoid contamination.
- 7) Centrifuge briefly to collect the reaction mix at the bottom of the tubes or wells.
- 8) Set up the following program on qPCR instrument

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

Note 1 : Set heating and cooling rate by default, up to 20°C/sec, or 100%.

Note 2 : On LightCycler[®] 480 systems, two optical systems are available : only "System II" is compliant with use of the kit.

Note 3 : For the Applied Biosystems systems, select "NONE" in "PASSIVE REFERENCE".

Note 4 : On Rotorgene™, please calibrate the signal by clicking on "GAIN OPTIMIZATION".

VALIDATION OF THE EXPERIMENT

The threshold must be positioned right above the maximum of the negative control signal.

For the assay to be valid, the Ct values for the controls must be the following. Outside of these values, the experiment is not valid.

Table 3 :

Controls	CP-BsppHQ +CI-PCR	CN
Channel FAM	Ct ≤ 18	Ct not determined
Channel HEX	Ct ≤ 20	Ct not determined
Channel Texas Red	Ct ≤ 18	Ct not determined
Channel CY5	Ct ≤ 22	Ct not determined

CP-BsppHQ: positive control Bartonella spp/henselae/quintana; CI-PCR: control of PCR inhibition;
CN : negative control (water)

DATA ANALYSIS AND INTERPRETATION

For clinical samples, the following results are possible:

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

PERFORMANCES ANALYSIS

1. Studies of reproducibility:

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

Reproducibility within an experiment (intra-experiment):

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

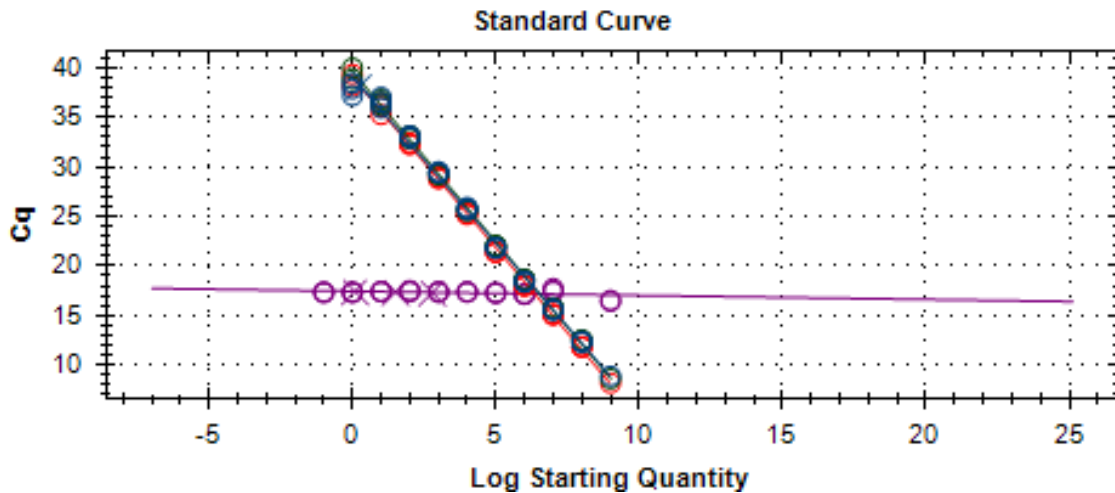
Reproducibility between experiments (inter-experiments):

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

2. Performance analysis :

Analytical sensitivity: 12,5 copies/ μ l for spp and henselae ; 5 copies/ μ l for quintana.
Linearity for quantification: from the detection limit to 10E+09 copies/ μ l.

Experiment conducted on CFX96 (BioRad) qPCR thermocycler:



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

3. Diagnostic evaluation: Clinical study

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

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

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

		EBX-0.13 Quadriplex Bartonella EUROBIO								
		B spp			B henselae			B quintana		
		POS	NEG	TOTAL	POS	NEG	TOTAL	POS	NEG	TOTAL
Prestested CNR	POS	60	0	60	41	4	45	15	0	15
	NEG	2	47	49	0	64	64	0	94	94
	TOTAL	62	47	109	41	68	109	15	94	109

All samples were correctly analysed and all have a valid signal for internal control.

Sensitivity

Spp : 60/60= 100 %
Henselae : 41/45= 91,1 %
Quintana : 15/15= 100 %

Specificity

Spp : 47/49= 95,9%
Henselae : 64/64= 100 %
Quintana : 94/94= 100%











BIBLIOGRAPHY

Angelakis E, Raoult D. Pathogenicity and treatment of Bartonella infections. Int J Antimicrob Agents. 2014 Jul;44(1):16-25.
Noémie Boillat, Gilbert Greub. Maladie des griffes du chat et autres bartonelloses. Rev Med Suisse 2008;901-907.
Boulouis et al. Les infections à Bartonella chez l'homme et l'animal: aspects diagnostiques et therap. Elsevier. 2007.
Bartonelloses. Précis de biopathologie analyses médicales spécialisées. Biomnis. 2012.

WASTE DISPOSAL

Dispose of waste according to DASRI regulations.

SYMBOLS

	Reference
	Batch number
	Highest storage temperature
	Expiration Date
	Content sufficient for « N » reactions
	Keep protected from light
	Manufacturer
	CE labeled product
	In Vitro Diagnostic
	Instructions for use



eurobio *AbCys*

7, avenue de Scandinavie
ZA de Courtaboeuf
91953 Les Ulis Cedex
FRANCE