

SPEED-OLIGO BACTERIAL MENINGITIS

SP006: Test oligo-chromatographique pour le dépistage qualitatif du les agents causant des méningites suivants: *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* et *Haemophilus influenzae* dans des échantillons cliniques. 24 tests.

INTRODUCTION:

Malgré la disponibilité d'antibiotiques efficaces et l'existence de vaccins contre plusieurs des principaux agents causant une méningite bactérienne, cette maladie reste l'une des plus importantes causes de mortalité et de séquelles neurologiques à long terme dans le monde entier. Cette pathologie demeure l'une des 10 principales causes de décès chez les enfants dans les pays développés. Les agents étiologiques de la méningite bactérienne sont variables selon la saison de l'année, l'âge, le statut vaccinal et la situation géographique du patient. *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* et *Streptococcus pneumoniae* étaient autrefois les trois principaux germes pathogènes à l'origine des méningites. Toutefois, le développement de vaccins et la mise en œuvre de programmes de vaccination sont venus modifier le profil épidémiologique des méningites bactériennes.

Un diagnostic rapide et précis des méningites bactériennes s'avère essentiel pour déterminer le traitement adéquat, ce qui peut contribuer à réduire la mortalité et les séquelles à long terme. La culture bactérienne est considérée comme la technique de référence pour le diagnostic étiologique de la méningite bactérienne. Toutefois, cette technique requiert beaucoup de temps (l'identification du pathogène prend le plus souvent de 1 à 2 jours), ainsi que la présence de microorganismes viables permettant leur mise en culture; par ailleurs, sa sensibilité est directement affectée par l'instauration d'un traitement antibiotique. Des tests rapides d'agglutination d'antigène sur latex peuvent être réalisés rapidement sur site, mais leur manque de sensibilité en limite l'usage clinique.

Au cours des dernières années, l'emploi de techniques PCR pour le diagnostic étiologique d'infections du SNC a augmenté. Les nouvelles méthodes moléculaires permettent de réaliser un diagnostic rapide et fiable, avec de meilleures performances que les tests traditionnels. La détection des produits amplifiés à travers une méthode reposant sur une double hybridation améliore la spécificité du test et en renforce la sensibilité.

La plupart des tests PCR avaient recours à des systèmes de détection peu sensibles ou très laborieux. La trousse de dépistage SPEED-OLIGO BACTERIAL MENINGITIS est une méthode qui fait appel à une PCR en association avec une bandelette réactive, ce qui permet un dépistage rapide et hautement sensible et spécifique d'*Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* et *Streptococcus pneumoniae* dans des échantillons de liquide céphalo-rachidien (LCR). Les différentes solutions PCR incluses dans cette trousse contiennent des paires d'oligo-nucléotides optimisés pour l'amplification individuelle de chaque pathogène. Le gène *lytA* a été retenu pour le dépistage spécifique de *S. pneumoniae*, le gène *bexA* pour l'amplification spécifique d'*H. influenzae*, et le gène *ctrA* pour le dépistage spécifique de *N. meningitidis*. Le dépistage est réalisé sur une seule et même bandelette comportant des bandes séparées, lesquelles contiennent les sondes complémentaires des gènes-cibles pour chacune des trois bactéries.

Cette trousse a été conçue dans l'objectif d'en faciliter l'utilisation. En fonction du thermocycleur employé, le délai d'amplification sera de 15 à 75 minutes, contre seulement 5-10 minutes pour la détection par bandelette réactive. La présentation de la solution PCR sous forme lyophilisée minimise les procédures de manipulation et de pipetage afin de prévenir toute contamination.

PRINCIPE DU TEST:

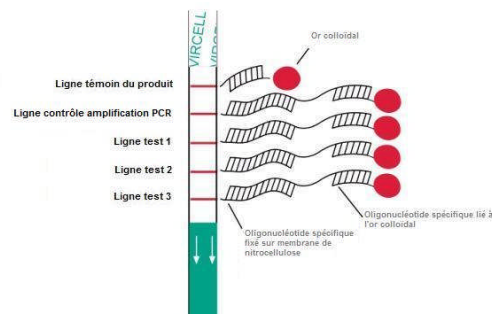
Méthode basée sur l'amplification de fragments spécifiques de gènes de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* et *Haemophilus influenzae*, permettant un diagnostic rapide des infections provoquées par

Streptococcus pneumoniae, *Neisseria meningitidis* et *Haemophilus influenzae*.

Ce test comprend un contrôle interne d'amplification pour vérifier l'absence d'inhibiteurs de l'amplification dans l'échantillon et assurer une bonne amplification. Ce contrôle se compose d'un fragment d'ADN et de d'une paire d'oligonucléotides spécifiques pour son amplification.

La technique se divise en trois étapes: extraction d'ADN, amplification à l'aide de paires d'oligonucléotides spécifiques et détection des produits amplifiés. Une bandelette réactive est employée pour la détection. Une fois la double amplification réalisée, le contrôle d'amplification et l'amplicon spécifique au test sont dénaturés, ce qui facilite leur déplacement le long de la membrane. Ces fragments de PCR réagissent avec des oligonucléotides spécifiques liés à une suspension colloïdale de particules d'or. Par la suite, le complexe formé par les produits de PCR et l'or colloïdal migre sur la membrane jusqu'au niveau des sondes spécifiques (une des trois bandes de la ligne de test et ligne de contrôle d'amplification de PCR), où une seconde hybridation se produit. La ligne de contrôle du produit apparaît lorsque l'hybridation de l'excédent de la sonde liée à l'or se produit avec un oligonucléotide complémentaire absorbé sur la membrane. Des lignes rouges apparaissent dans les positions où l'or réagit.

Cette technique est plus sensible et spécifique que la PCR classique. La double hybridation permet de distinguer des fragments amplifiés spécifiques et non spécifiques.



CARACTÉRISTIQUES DE LA TROUSSE:

Cette trousse est basée sur l'amplification d'ADN et sur les principes d'hybridation.

Compte tenu du risque de contamination, il est conseillé de lire attentivement le chapitre «Recommandations et précautions».

La solution PCR et le contrôle positif sont lyophilisés. Il est nécessaire de les reconstituer avant l'utilisation (voir «Préparation des réactifs»). Les autres réactifs sont prêts à l'usage.

COMPOSITION DU COFFRET:

1A VIRCELL BME PCR MIX A: 3 ampoules de tampon de PCR, Cl_2Mg , oligonucléotides spécifiques pour *S. pneumoniae*, dNTPs, Taq polymérase et un fragment d'ADN pour contrôle d'amplification de PCR avec des oligonucléotides spécifiques pour son amplification. Lyophilisés.

1B VIRCELL BME PCR MIX B: 3 ampoules de tampon de PCR, Cl_2Mg , oligonucléotides spécifiques pour *H. influenzae* et *N. meningitidis*, dNTPs et Taq polymérase. Lyophilisés.

2 VIRCELL BME POSITIVE CONTROL: 1 ampoule avec un mélange d'ADN non infectieux lyophilisé, à utiliser comme contrôle positif.

3 VIRCELL NEGATIVE CONTROL: 1 ampoule de 200 µl d'eau déionisée, à utiliser comme contrôle négatif.

4 VIRCELL BME STRIPS: 24 bandelettes pour la détection d'ADN spécifique.

5 VIRCELL PCR MIX RECONSTITUTION SOLUTION: 1 ampoule de 1 ml de solution aqueuse pour reconstituer le mélange de PCR. Contient du Triton X-100.

USAGE IN VITRO UNIQUEMENT

Fabricant: VIRCELL, S.L. Pza. Dominguez Ortiz 1. Polígono Industrial Dos de Octubre.18320 Santa Fe *GRANADA* ESPAGNE* Tel.+34.958.441264* Fax+34.958.510712
<http://www.vircell.com>

6. VIRCELL POSITIVE CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION: 1 ampoule de 500 µl de solution aqueuse pour reconstituer le contrôle positif. Contient du Triton X-100.

7. VIRCELL BME RUNNING SOLUTION: 1 ampoule de 1 ml de solution d'hybridation, avec du Proclin.

Conservé entre 2 et 8°C et vérifier la date de péremption.

Matériel nécessaire non fourni:

Cabine de sécurité biologique
Trousse de prélèvement d'ADN (voir recommandations à l'alinéa «Procédure du test»)

Thermocycleur

Huile minérale (pour thermocycleurs sans couvercle chauffant).

Micropipettes de précision (10-200 µl)

Pointes stériles à filtre

Gants jetables

Thermobloc 55°C±2°C

Tubes de microcentrifugeuse de 1,5 ml

Microcentrifugeuse

Cabine PCR (recommandée)

Vortex

CONSERVATION:

Conservé entre 2 et 8°C. Ne pas utiliser les éléments de la trousse après la date de péremption. La date de péremption indiquée est valable à condition que les éléments soient conservés fermés, entre 2 et 8°C. Après la reconstitution de VIRCELL PCR MIX A et B et VIRCELL POSITIVE CONTROL, conservé à une température inférieure à -20°C et éviter les congélations et décongélations inutiles.

STABILITÉ DES RÉACTIFS APRÈS OUVERTURE:

RÉACTIF	STABILITÉ
VIRCELL PCR MIX A et B et VIRCELL POSITIVE CONTROL reconstitués	Conservé à une température inférieure à -20°C et utiliser jusqu'à la date de péremption
Autres éléments	Conservé à 2-8°C et utiliser jusqu'à la date de péremption

STABILITÉ ET MANIPULATION DES RÉACTIFS:

La trousse est stable jusqu'à la date de péremption à 2-8°C. Une fois reconstitués, le VIRCELL PCR MIX A et B et le VIRCELL POSITIVE CONTROL restent stables jusqu'à la date de péremption à une température inférieure à -20°C. Employer tous les réactifs dans des conditions aseptiques pour éviter toute contamination microbienne.

Utiliser uniquement les quantités de réactif nécessaires pour la réalisation du test. Ne pas remettre dans l'ampoule l'excédent de produit non utilisé.

VIRCELL, S.L. dégage toute responsabilité en cas d'utilisation inappropriée des réactifs inclus dans la trousse.

RECOMMANDATIONS ET PRECAUTIONS:

- Usage *in vitro* uniquement. Usage professionnel uniquement.
- Utiliser uniquement les réactifs du coffret. VIRCELL PCR MIX RECONSTITUTION SOLUTION, VIRCELL POSITIVE CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION et VIRCELL NEGATIVE CONTROL sont compatibles avec différents coffrets SPEED-OLIGO de VIRCELL. Ne pas intervertir VIRCELL PCR MIX A et B, VIRCELL POSITIVE CONTROL, VIRCELL STRIPS et VIRCELL RUNNING SOLUTION entre les lots et les coffrets.
- L'utilisation de pointes de pipette à filtre est essentielle pour éviter les contaminations durant l'extraction d'ADN et la réalisation de la PCR.
- Traiter les échantillons comme s'ils étaient infectieux, selon des procédures de sécurité du laboratoire. Maintenir toutes les surfaces de travail propres et désinfectées à l'aide d'une solution récemment préparée d'hypochlorite de soude à 0,5% dans de l'eau déionisée ou distillée.

- Pour obtenir des résultats plus fiables, il est conseillé de tester les échantillons dès que possible après leur prélèvement. La variation des temps de stockage durant l'envoi des échantillons n'a pas été évaluée.
- Utiliser des gants de protection jetables, des blouses de laboratoire et une protection oculaire lors de la manipulation des échantillons. Se laver soigneusement les mains après la manipulation des échantillons.
- Éviter les contaminations microbiennes en retirant les aliquotes des réactifs.
- Il est essentiel de disposer de trois espaces de travail indépendants pour la réalisation du test: zone de pré-amplification, zone d'amplification et zone de post-amplification ou de détection. Le flux de travail doit être unidirectionnel dans le laboratoire, depuis la zone de pré-amplification jusqu'à la zone de post-amplification. Il est nécessaire de porter des gants dans chaque zone et de les retirer et de les jeter avant de quitter chaque zone. A) Zone de pré-amplification : pour le prélèvement d'échantillons et l'extraction d'ADN. Du matériel spécifique doit être utilisé pour les opérations de pré-amplification (gants, tubes stériles, pointes de pipette à filtre, micropipettes, microcentrifugeuse et autres équipements nécessaires) et ne doit pas être employé pour d'autres procédés ni transporté dans d'autres zones. B) Zones d'amplification: cette zone est réservée à la réaction de PCR, les réactifs de PCR devant être exclusivement manipulés dans celle-ci. Du matériel spécifique doit être utilisé pour les opérations d'amplification (gants, tubes stériles, pointes de pipette à filtre, micropipettes, microcentrifugeuse, thermocycleur, cabine à flux laminaire et autres équipements nécessaires) et ne doit pas être employé pour d'autres procédés ni transporté dans d'autres zones. Une fois l'amplification terminée, les tubes de PCR ne doivent jamais être ouverts dans cette zone. C) Zone de post-amplification ou de détection: cette zone est réservée à la détection. Cette opération exige un thermobloc, des tubes de centrifugeuse de 1,5 ml et une micropipette. Le matériel et l'équipement de cette zone ne doivent pas en sortir.
- En raison de la haute sensibilité du test, il convient de prendre toutes les précautions pour maintenir la pureté des réactifs de la trousse et des mélanges d'amplification. Tous les réactifs employés doivent avoir un niveau de pureté maximal. Éliminer tout réactif susceptible d'être contaminé.
- Ce produit est exclusivement conçu pour être utilisé par des personnes formées aux techniques d'essai PCR.
- Ne pas utiliser la trousse au-delà de la date de péremption.
- L'ensemble du matériel doit être jeté conformément à la législation en vigueur.
- Les éléments de ce coffret peuvent contenir du matériel génétique ou des substances d'origine animale et/ou humaine. Bien que non infectieux, ce matériel doit être manipulé comme étant potentiellement infectieux. Tout le matériel doit être manipulé et jeté comme potentiellement infectieux. Respecter la législation locale en matière de déchets médicaux.
- Les bandelettes développées doivent être stockées à un endroit séparé de la zone de pré-amplification afin d'éviter le risque de contamination de la PCR. Il est conseillé de couper les extrémités des bandelettes révélées pour mieux les conserver.

PRÉLEVEMENT ET TRAITEMENT DE L'ÉCHANTILLON:

Le liquide céphalo-rachidien (LCR) doit être prélevé dans un conteneur stérile fermant hermétiquement. Les échantillons doivent être prélevés le plus tôt possible au cours de la phase aiguë de l'infection.

Il convient de ne pas retarder le transport des échantillons, et les tests de laboratoire doivent être réalisés le plus tôt possible. Les échantillons de LCR pour culture bactérienne peuvent être transportés à température ambiante. À la réception, il faut prélever aseptiquement une aliquote de 200 µl dans un tube stérile à fermeture hermétique, et la conserver à 2-8°C jusqu'au moment du test. Si l'on prévoit que le traitement sera retardé de 72 heures ou davantage, congeler l'échantillon entre -20 et -80°C.

La manipulation d'échantillons de LCR au laboratoire doit être réalisée en respectant les mesures de sécurité opportunes. Toute manipulation d'échantillons dont on soupçonne qu'ils puissent contenir *N. meningitidis* et susceptibles de générer des aérosols doit être réalisée dans une cabine de sécurité biologique.

USAGE IN VITRO UNIQUEMENT

Fabricant: VIRCELL, S.L. Pza. Dominguez Ortiz 1. Polígono Industrial Dos de Octubre.18320 Santa Fe *GRANADA* ESPAGNE* Tel.+34.958.441264* Fax+34.958.510712
<http://www.vircell.com>

PREPARATION DES REACTIFS:

Tous les réactifs fournis sont prêts à l'usage, à l'exception du VIRCELL PCR MIX A et B et du VIRCELL POSITIVE CONTROL.

1A VIRCELL PCR MIX A. Chaque solution de PCR contient une quantité suffisante pour réaliser 8 réactions de PCR. Pour sa reconstitution, suivre les instructions ci-dessous:

- Ajouter 150 µl de VIRCELL PCR MIX RECONSTITUTION SOLUTION **5** dans chaque tube.
- Mélanger à l'aide du vortex pendant 10 secondes.



Il convient de s'assurer que la solution PCR est complètement homogénéisée

- Incuber à température ambiante pendant 3 minutes pour une reconstitution complète.

1B VIRCELL PCR MIX B. Chaque solution de PCR contient une quantité suffisante pour réaliser 8 réactions de PCR. Pour sa reconstitution, suivre les instructions ci-dessous:

- Ajouter 150 µl de VIRCELL PCR MIX RECONSTITUTION SOLUTION **5** dans chaque tube.
- Mélanger à l'aide du vortex pendant 10 secondes.



Il convient de s'assurer que la solution PCR est complètement homogénéisée

- Incuber à température ambiante pendant 3 minutes pour une reconstitution complète.

2 VIRCELL POSITIVE CONTROL. Pour sa reconstitution, suivre les instructions ci-dessous :

- Centrifuger le tube correspondant pendant 5 secondes à 5000 g.
- Ajouter 100 µl de VIRCELL POSITIVE CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION **6** dans le tube.
- Mélanger à l'aide du vortex pendant 10 secondes.
- Centrifuger le tube pendant 5 secondes à 5000 g.
- Incuber à température ambiante pendant 3 minutes pour une reconstitution complète.

Une fois reconstitués, le VIRCELL PCR MIX **1A** et **1B** et le VIRCELL POSITIVE CONTROL **2** peuvent être congelés à une température inférieure à -20°C pour être utilisés dans des réactions ultérieures.

PROCEDURE:

Le nombre d'échantillons traités par trousse dépendra de la stratégie adoptée pour l'analyse des échantillons.

	TESTS	NOMBRE DE CONTRÔLES POSITIFS	NOMBRE DE CONTRÔLES NEGATIFS	NOMBRE D'ÉCHANTILLONS	TOTAL
24 BANDETTES	1	1	1	22	24
	2	2	2	20	24
	4	4	4	16	24
	8	8	8	8	24

TEST PROCEDURE:

1.-Extraction d'ADN: (réalisée dans la zone de pré-amplification).

Pour l'extraction d'ADN, il est conseillé d'utiliser des kits d'extraction commerciaux en respectant les instructions du fabricant. Cette trousse a été testée avec les kits d'extraction d'ADN suivant: High pure PCR template preparation kit (Roche), QIAamp DNA blood mini kit (Qiagen) et

NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel). D'autres kits commerciaux peuvent être employés. Consulter le service technique.

2.-PCR (réalisée dans la zone d'amplification):

Les solutions de PCR **1A** et **1B** sont lyophilisées. Chaque ampoule contient les composants nécessaires à la réalisation de 8 réactions. Reconstituer les tubes de solution de PCR **1A** et **1B** nécessaires (voir « Préparation des réactifs ») en fonction du nombre d'échantillons à analyser et du nombre de contrôles à inclure. Placer sur un porte-tube le nombre de tubes nécessaires: 2 tubes pour chaque échantillon plus 2 tubes pour le contrôle positif, et un autre 2 pour le contrôle négatif. Marquer un tube de chaque paire comme A et l'autre comme B. L'excédent de solution de PCR peut être congelé à une température inférieure à -20°C pour être utilisé dans des réactions ultérieures.

Pour chaque test, le contrôle négatif doit être le dernier réactif à préparer.

- Pipeter 15 µl de solution de PCR reconstituée marqué comme A dans chaque tube marqué comme A.
- Pipeter 15 µl de solution de PCR reconstituée marqué comme B dans chaque tube marqué comme B.
- Ajouter 10 µl d'échantillon ou de contrôle dans chaque tube. Le contrôle négatif inclus dans la trousse est de l'eau.
- Introduire le tube de PCR dans le thermocycleur et lancer le programme suivant* :

40 cycles	92°C	1 minute
	92°C	20 secondes
	55°C	20 secondes
	72°C	20 secondes
1 cycle	72°C	1 minute
1 cycle	95°C	1 minute

*(suivre les instructions fournies par le fabricant du thermocycleur).



*Le contrôle positif **2** est lyophilisé. Il doit être reconstitué avant usage (voir « préparation des réactifs »). Après la reconstitution, le contrôle positif peut être congelé à une température inférieure à -20°C pour être utilisé dans des réactions ultérieures (voir « préparation des réactifs »).*

En raison de la sensibilité de la technique et afin d'éviter des contaminations, le contrôle positif doit être manipulé à la fin de la préparation de la PCR, lorsque la solution de PCR et les échantillons ont été distribués. Il est conseillé de conserver séparément le contrôle positif et les tubes de solution de PCR, ainsi que de pipeter le contrôle positif dans la zone de post-amplification juste avant de commencer la PCR.

La détection des produits de PCR s'effectuera au moyen d'une bandelette réactive. Si l'hybridation n'est pas réalisée immédiatement, les tubes de PCR peuvent être congelés à une température inférieure à -20°C. Pour pouvoir réaliser l'hybridation ultérieurement, il faudra recommencer l'étape de dénaturation finale de la PCR.

Etape 1	95°C	1 minute
---------	------	----------

3.-Detection sur bandelette: (réalisée dans la zone de post-amplification).

Avant d'effectuer cette opération, le thermobloc doit être chauffé à 55°C.

- Ajouter 35 µl de VIRCELL RUNNING SOLUTION **7** dans un tube* de 1,5 ml et incuber à 55°C pendant 2 minutes.
- Dénaturer l'échantillon à 95°C pendant 1 minute et le placer rapidement dans de la glace ou sur un portoir isofreeze à 4°C. Les échantillons ne doivent être en aucun cas placés sur un portoir à température ambiante après la dénaturation à 95°C. Si l'on ne dispose pas de portoir isofreeze ou de glace, il est possible de pipeter l'échantillon sans l'avoir refroidi juste après la

USAGE IN VITRO UNIQUEMENT

Fabricant: VIRCELL, S.L. Pza. Dominguez Ortiz 1. Polígono Industrial Dos de Octubre.18320 Santa Fe *GRANADA* ESPAGNE* Tel.+34.958.441264* Fax+34.958.510712
<http://www.vircell.com>

dénaturation à 95°C, puis d'introduire immédiatement la bandelette.

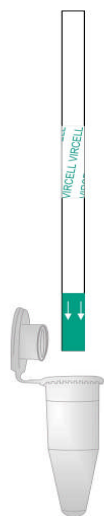
- Ajouter 5 µl de produit de PCR dénaturé marqué comme A et 5 µl de produit de PCR dénaturé marqué comme B, refroidi à 4°C. Les échantillons ne doivent pas rester plus de 1 minute à 4°C sans être ajoutés dans le tube de 1,5 ml.



Si le produit de PCR n'est pas ajouté dans le tube de 1,5 ml immédiatement après la phase de dénaturation finale du programme PCR, il conviendra de recommencer cette étape (95°C pendant 1 minute), puis de le refroidir à 4°C dans de la glace ou sur un portoir isofreeze.

En cas d'analyse simultanée de nombreux échantillons et pour éviter de laisser passer plus d'une minute entre la dénaturation et la détection sur la bandelette, il est recommandé de dénaturer et de détecter les échantillons par groupes de 3 à 5. Cela évite l'apparition de faux négatifs.

- Introduire immédiatement la bandelette dans le bon sens (les flèches dirigées vers l'échantillon: voir schéma) et incuber à 55°C pendant 5 minutes.



- Retirer la bandelette et lire le résultat.
*Le tube de 1,5 ml doit entrer dans le thermobloc.



L'interprétation des résultats doit être effectuée juste après avoir retiré la bandelette. Le séchage peut entraîner des variations d'intensité du signal et des fonds peuvent apparaître sur les échantillons négatifs. Pour cette raison, si l'on souhaite conserver les résultats, il est recommandé d'incuber la bandelette à 55°C pendant 10 minutes (au lieu de 5 minutes seulement) et de la sécher immédiatement après pendant 1 minute à l'aide d'un séchoir manuel. Avec ce procédé, le signal reste inaltérable dans le temps, évitant l'apparition de signaux non spécifiques. Les bandelettes développées doivent être stockées à un endroit séparé de la zone de pré-amplification afin d'éviter le risque de contamination de la PCR.

CONTRÔLE DE QUALITÉ INTERNE:

Chaque lot est soumis à un contrôle de qualité interne avant d'être commercialisé, afin d'assurer le respect des spécifications les plus strictes. Les résultats du contrôle final de chaque lot sont disponibles.

CONTRÔLE DU TRAITEMENT DE L'ÉCHANTILLON

Afin de vérifier l'effectivité du traitement des échantillons, ajouter une quantité de microorganisme ou de contrôle d'ADN purifié de l'un des microorganismes (réf. MBC070 STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE DNA CONTROL, MBC020 HAEMOPHILUS INFLUENZAE DNA CONTROL, MBC036 NEISSERIA MENINGITIDIS SEROGROUP A DNA CONTROL, MBC066 NEISSERIA MENINGITIDIS SEROGROUP

B DNA CONTROL, MBC053 NEISSERIA MENINGITIDIS SEROGROUP C DNA CONTROL) dans un tube de milieu de transport de culture validé et l'incuber pendant une heure à température ambiante. Cet échantillon artificiel doit ensuite être traité et testé.

Un contrôle négatif doit être employé dans chaque essai à partir de l'étape d'isolement de l'acide nucléique afin de vérifier l'absence de contamination du produit artificiel.

INTERPRETATION DES RÉSULTATS ET PROCEDURE DE VALIDATION NOTICE D'UTILISATION:

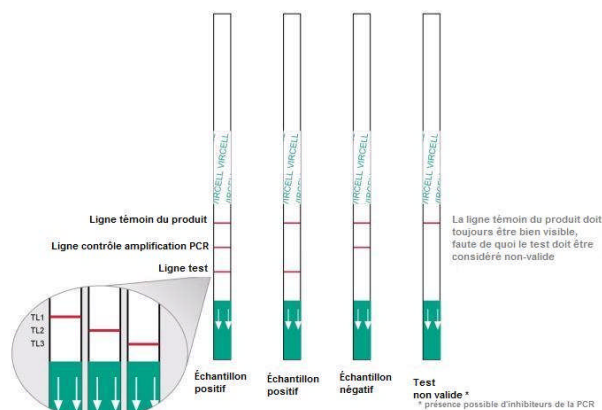
Un contrôle négatif doit être inclus dans chaque essai. Un contrôle positif devrait être inclus dans chaque essai. Chaque fois qu'une nouvelle trousse est ouverte, un contrôle positif doit être inclus au moins dans le premier essai. Le contrôle positif permet de détecter des défauts des réactifs et de vérifier le bon fonctionnement du procédé de base. Le contrôle négatif permet de détecter des contaminations environnementales des réactifs. Pour lire le résultat, placer la bandelette dans la position indiquée par un S sur la carte de lecture.

Le test comprend 3 zones de lecture:

- Ligne de contrôle de produit: elle doit toujours être positive et lisible si le test a été correctement effectué. Cette ligne indique que l'or colloïdal a bien fonctionné, que la viabilité de la sone est adéquate et que la solution d'hybridation s'écoule correctement.
- Ligne de contrôle d'amplification de PCR: l'absence de bande rouge dans cette position indique la présence dans l'échantillon d'inhibiteurs susceptibles d'avoir interféré avec la réaction d'amplification. Dans ce cas, l'essai doit être répété avec une seconde aliquote de l'échantillon ou avec un nouvel échantillon. Dans les échantillons fortement positifs, la ligne peut être faible ou négative en raison d'une teneur élevée en cible spécifique dans l'échantillon, mais cela n'invalide pas le résultat final.
- Ligne de test: la bandelette de test comprend 3 bandes qui correspondent, respectivement, à *N. meningitidis* (Ligne de test 3, TL3), *H. influenzae* (Ligne de test 2, TL2), *S. pneumoniae* (Ligne de test 1, TL1). L'apparition d'une bande rouge à cette position (TL1, TL2 ou TL3) indique la présence de matériel génétique de *N. meningitidis*, *H. influenzae* ou *S. pneumoniae* dans l'échantillon. En cas d'apparition de plus d'une bande dans cette Ligne de test, le résultat doit être considéré non-valide. Dans ce cas, le test doit être répété à partir de l'échantillon original. Sur la fiche d'interprétation apparaît une unique bande sur la position de la Ligne de test, ce qui indique qu'en cas de résultat positif, seule l'une des trois lignes test doit apparaître.

USAGE IN VITRO UNIQUEMENT

Fabricant: VIRCELL, S.L. Pza. Dominguez Ortiz 1. Polígono Industrial Dos de Octubre.18320 Santa Fe *GRANADA* ESPAGNE* Tel.+34.958.441264* Fax+34.958.510712
<http://www.vircell.com>



LIMITES DU TEST:

- 1.-Cette trousse est destinée à une utilisation sur échantillons de liquide céphalo-rachidien (CSF/LCR) homme.
- 2.-Lire la notice soigneusement et appliquer strictement la procédure pour obtenir des résultats fiables. En particulier pour de bons résultats, vérifier que les volumes pipetés sont conformes aux recommandations et les temps et les températures d'incubation. Il est particulièrement important de réaliser chaque étape de l'essai dans les zones décrites dans la procédure d'essai.
- 3.-Ce test n'est pas indicatif du site d'infection et n'est pas destiné à remplacer le test d'isolement.
- 4.-La détection du microorganisme dépend du nombre d'organismes présents dans l'échantillon et pourrait être altérée par les méthodes de prélèvement d'échantillons, les facteurs du patient, l'état de l'infection et/ou la souche.
- 5.-Comme tout autre test diagnostique, les résultats doivent être évalués sur la base de toutes les données cliniques et de laboratoire. Les résultats doivent être interprétés avec les données cliniques et d'autres tests diagnostiques.
- 6.-Ce produit est exclusivement conçu pour être utilisé par des personnes formées aux techniques de PCR.
- 7.-Les résultats du test sont qualitatifs. Il n'existe pas de corrélation entre l'ordre de grandeur du résultat positif et le nombre de microorganismes dans l'échantillon.
- 8.-Ce test a été vérifié pour être utilisé avec des échantillons de liquide céphalo-rachidien (CSF/LCR) humains. Il n'a pas été vérifié avec d'autres types d'échantillon.
- 9.-La fiabilité des résultats dépendra de la réalisation correcte du prélèvement d'échantillons, du transport, du stockage et des procédures de traitement.
- 10.-Les performances n'ont pas été déterminées pour tous les génotypes.
- 11.-Le test fonctionne uniquement dans les limites des régions génomiques dans lesquelles les sondes ont été choisies. En raison de la variabilité élevée des génomes bactériens, il est possible que certains sous-types ne soient pas détectés. Des modifications des séquences des oligonucléotides de PCR ou des sondes peuvent produire de faux négatifs.
- 12.-Un résultat négatif n'exclut pas la présence du microorganisme à des niveaux inférieurs à la limite de détection de l'essai.
- 13.-Un test positif n'exclut pas la possibilité de présence d'autres agents pathogènes.
- 14.-Le contrôle interne inclus dans l'essai n'élimine pas tous les faux résultats négatifs.
- 15.-La détection de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* et *Haemophilus influenzae* dans des Échantillons de liquide céphalo-rachidien (CSF/LCR) n'indique pas obligatoirement l'implication de l'agent pathogène dans l'épisode de méningite. Cependant, la combinaison des données cliniques et d'un résultat positif de PCR suggère une méningite provoquée par le microorganisme détecté.

PERFORMANCES

SENSIBILITÉ ET SPECIFICITÉ:

Sensibilité analytique:

Des dilutions en série d'ADN purifié de *S. pneumoniae* puis traitées et testées. La trousse a pu détecter jusqu'à 50 fg d'ADN par réaction.

Des dilutions en série d'ADN purifié de *N. meningitidis* serogroupe A puis traitées et testées. La trousse a pu détecter jusqu'à 50 fg d'ADN par réaction.

Des dilutions en série d'ADN purifié de *N. meningitidis* serogroupe B puis traitées et testées. La trousse a pu détecter jusqu'à 50 fg d'ADN par réaction.

Des dilutions en série d'ADN purifié de *N. meningitidis* serogroupe C puis traitées et testées. La trousse a pu détecter jusqu'à 50 fg d'ADN par réaction.

Des dilutions en série d'ADN purifié de *H. influenzae* puis traitées et testées. La trousse a pu détecter jusqu'à 50 fg d'ADN par réaction.

Spécificité:

50 échantillons de patients atteints de pathologies neurologiques autres que des méningites ont été traités et analysés. Aucun résultat positif n'a été obtenu.

PRECISION INTRA-ASSAY:

4 échantillons (l'un positif proche de la limite de détection pour chaque pathogène et l'autre négatif) ont été amplifiés 5 fois dans un seul essai réalisé par le même opérateur dans des conditions de travail identiques.

Des résultats similaires ont été observés dans tous les essais.

PRECISION INTER-ASSAY:

4 échantillons (l'un positif proche de la limite de détection pour chaque pathogène et l'autre négatif) ont été amplifiés individuellement pendant 3 jours de suite par 2 opérateurs différents.

Des résultats similaires ont été observés dans tous les essais.

REACTIONS CROISEES ET INTERFERENCES:

Des échantillons contenant différents microorganismes ont été testés (*Aspergillus fumigatus*, *Bacillus cereus*, *Bordetella pertussis*, *Brucella abortus*, *Candida albicans*, *Chlamydomydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydomydia psittaci*, *Coxiella burnetii*, *Cytomegalovirus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterovirus 71*, *Haemophilus ducreyi*, *HSV1*, *HSV2*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Rickettsia conorii*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus* grupo B, *Streptococcus* grupo F, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Toxoplasma gondii*, *Varicella-Zoster virus*). Aucun faux résultat positif n'a été obtenu.

SYMBLES UTILISES SUR LES ETIQUETTES:

	Usage <i>in vitro</i>
	Utiliser avant le: (date de péremption)
	Conservé à 2-8°C
	Contient la quantité suffisante pour <X> tests
	Numéro de lot
	Code produit
	Consulter la notice d'utilisation
	Reconstituer en <X> µl

USAGE IN VITRO UNIQUEMENT

Fabricant: VIRCELL, S.L. Pza. Dominguez Ortiz 1. Polígono Industrial Dos de Octubre.18320 Santa Fe *GRANADA* ESPAGNE* Tel.+34.958.441264* Fax+34.958.510712
<http://www.vircell.com>

RCARD 3	Carte de lecture de test 3 ligne
ICARD	Carte d'interprétation
PCL	Ligne de contrôle de produit
PCRCL	Ligne contrôle d'amplification de la PCR
TL	Ligne test
TL1	Ligne de test 1
TL2	Ligne de test 2
TL3	Ligne de test 3
S	Échantillon
S (+)	Échantillon positif
S (-)	Échantillon négatif
INVAL	Essai non valable
DATE	Date

BIBLIOGRAPHIE :

1. Failace, L; Wagner, M.; Chesky, M; Scalco, R; Jobim, LF. 2005. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus* sp. by polymerase chain reaction for the diagnosis of bacterial meningitis. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* 63: 920-924.
2. El Bashir, H; Laundry, M; Booy R. 2003. Diagnosis and treatment of bacterial meningitis. *Archives of Disease in Childhood* 88: 615-620.
3. Poppert, S; Essig, A; Stoehr, B; Steingruber, A; Wirths, B; Juretschko, S; Reischl, U; Wellinghausen, N. 2005. Rapid diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR and fluorescence in situ hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 3390-3397.
4. Tzanakaki, G; Tsopanomichalou, M; Kesanopoulos, K; Matzourani, R; Sioumala, M; Tabaki, A; Kremastinou, J. 2005. Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 11: 386-390.
5. Corless, CE; Guiver, M; Borrow, R; Edwards-Jones, V; Fox, AJ; Kaczmarek, EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39: 1553-1558.

Pour toute information complémentaire contacter:
customerservice@vircell.com

REVISION: Juin-09

USAGE IN VITRO UNIQUEMENT

Fabricant: VIRCELL, S.L. Pza. Dominguez Ortiz 1. Polígono Industrial Dos de Octubre.18320 Santa Fe *GRANADA* ESPAGNE* Tel.+34.958.441264* Fax+34.958.510712
<http://www.vircell.com>