

SPEED-OLIGO GROUP B STREPTOCOCCUS

SP004: Test oligochromatographique pour la détection qualitatif de streptocoque du groupe B dans des échantillons cliniques. 40 tests.

INTRODUCTION:

L'infection à streptocoque du groupe B (SGB; *Streptococcus agalactiae*) reste l'une des principales causes de morbidité et de mortalité néonatale, malgré la réduction de son incidence grâce au dépistage de routine chez les parents. L'infection à SGB chez les enfants se limite au tout premier stade de l'enfance. Environ 80% des infections chez les enfants se produisent lors des premiers jours de vie (infections précoces) et prennent la forme de septicémies et de pneumonies. Les infections à apparition tardive se produisent chez des enfants âgés d'une semaine à trois mois et se manifestent généralement par des méningites et des septicémies. Les nouveau-nés souffrant une infection précoce à SGB reçoivent l'organisme de leur mère durant l'accouchement, du fait que le SGB colonise le tractus génital de celle-ci. La prévention peut consister en une prophylaxie antibiotique intrapartum. Chez les femmes enceintes et accouchées, le SGB provoque des maladies cliniques allant d'infections urinaires légères à des cas graves de septicémie et de méningite. Les infections chez les adultes concernent essentiellement des patients immunocompromis.

Pour les stratégies de prévention basées sur le dépistage de routine chez les femmes enceintes, il est essentiel de disposer de techniques assurant un niveau de détection optimal. Les femmes colonisées peuvent être soumises à une prophylaxie antibiotique intrapartum. Cependant, le problème se pose principalement pour les nouveau-nés de femmes dont l'état de colonisation par SGB est ignoré au moment de l'accouchement. Une méthode rapide de détection de le SGB pourrait faciliter l'identification des enfants colonisés soumis à un risque de maladie invasive, afin d'assurer un suivi et un monitoring appropriés. Les méthodes de culture ont des limites: les résultats ne sont pas disponibles avant un minimum de 36 heures et la valeur prédictive de colonisation par SGB au moment de l'accouchement est de 69% à 87%. Les méthodes de détection PCR spécifiques au SGB mises au point par certains laboratoires cliniques se sont révélées plus sensibles, mais impliquent des procédures compliquées qui ne sont pas faciles à mettre en place dans tous les laboratoires.

La plupart des tests de PCR font appel à des systèmes de détection peu sensibles ou très laborieux. La trousse de détection SPEED-OLIGO GROUP B STREPTOCOCCUS est une méthode basée sur la PCR associée à une bandelette réactive permettant une détection rapide et hautement sensible et spécifique de *S. agalactiae* dans des échantillons cliniques. La solution PCR comprise dans la trousse contient une paire d'oligonucléotides spécifiques pour l'amplification d'un fragment du gène cfb. Cette trousse a été conçue dans l'objectif de 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:

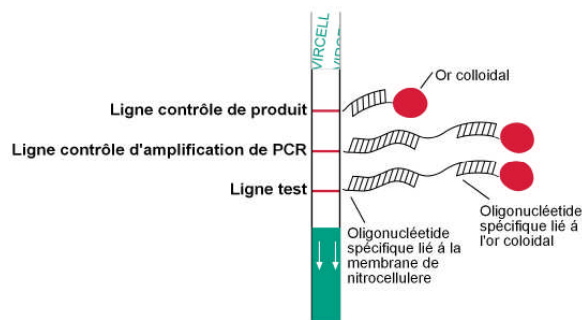
Méthode basée sur l'amplification d'un fragment spécifique d'un gène de streptocoque du groupe B, permettant un diagnostic rapide des infections provoquées par streptocoque du groupe B.

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 d'une paire d'oligonucléotides spécifiques pour son amplification.

La technique se divise en trois étapes: extraction d'ADN, amplification à l'aide d'une paire d'oligonucléotides spécifiques et détection du produit amplifié. 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 (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:

- 1 VIRCELL SGB PCR MIX: 5 ampoules de tampon de PCR, Cl₂Mg, oligonucléotides spécifiques pour streptocoque du groupe B, dNTPs, Taq polymérase et un fragment d'ADN pour contrôle d'amplification de PCR avec des oligonucléotides spécifiques pour son amplification. Lyophilisés.
- 2 VIRCELL SGB POSITIVE CONTROL: 1 ampoule 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 SGB STRIPS: 40 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.
- 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 SGB RUNNING SOLUTION: 2 ampoules de 1 ml de solution d'hybridation, avec du Proclin.
- 8 VIRCELL SAMPLE SOLUTION: 25 ml de solution tamponnée.

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

Matériel nécessaire non fourni :

- Écouvillon et milieu de transport adéquat (voir Prélèvement d'Échantillons)
- Thermocycleur
- Huile minérale (pour thermocycleurs sans couvercle chauffant)
- Micropipettes de précision (10-200 µl)
- Pointes stériles à filtre

PRODUIT PARA DIAGNOSTIC IN VITRO

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

Gants jetables
 Thermobloc 55°C±2°C
 Tubes de microcentrifugeuse de 1,5 ml
 Microcentrifugeuse
 Cabine PCR (recommandée)
 Vortex

CONSERVATION:

Conserver 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 et VIRCELL POSITIVE CONTROL, conserver à une température inférieure à -20°C et éviter les congélations et décongélations inutiles.

STABILITÉ DES RÉACTIFS APRÈS OUVERTURE:

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

STABILITE ET MANIPULATION DES REACTIFS:

La trousse est stable jusqu'à la date de péremption à 2-8°C. Une fois reconstitués, le VIRCELL PCR MIX 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 para diagnostic *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, 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.
- Eviter 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. Eliminer 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.

PRELEVEMENT ET TRAITEMENT DE L'ECHANTILLON:

Pour le diagnostic prénatal, les écouvillonnages doivent être effectués dans le vagin et dans la région anorectale, puis placés dans un milieu de transport approprié. Un milieu Amies ou Stuart peut être employé, à condition de vérifier l'absence d'inhibiteurs de la PCR. Pour les échantillons anaux, introduire l'écouvillon avec précaution sur environ 2,5 cm dans le sphincter anal et le tourner doucement pour toucher les cryptes anales. Pour les échantillons vaginaux, après avoir nettoyé l'excès de sécrétion ou de flux de la zone vaginale, prélever à l'aide d'un écouvillon les sécrétions de la muqueuse du tiers inférieur du vagin. Pour les échantillons combinés rectovaginaux, l'échantillon doit être introduit tout d'abord dans le vagin, puis dans l'anus comme indiqué ci-dessus. Toute information sur la présence éventuelle de substances interférentes ou de substances associées à la rupture de membranes (ex. méconium, liquide amniotique ou sang) doit être communiquée au laboratoire.

Les échantillons destinés au test de colonisation néonatale sont prélevés dans des zones superficielles avant le premier bain. Les échantillons prélevés dans la gorge, les cavités nasales, le conduit auditif externe, l'anus ou le nombril doivent être collectés au moyen d'un écouvillon placé en milieu de transport.

Le sang et le liquide céphalorachidien doivent être collectés dans des conditions aseptiques et transportés non dilués.

Le transport des échantillons peut être effectué à température ambiante. Si le test ne va pas être réalisé immédiatement, ils doivent être stockés à 2-8°C. Si les échantillons doivent être stockés pendant plus de 72 heures, ils doivent être congelés entre -20 et -80°C.

PREPARATION DES REACTIFS:

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

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

PRODUIT PARA DIAGNOSTIC IN VITRO

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

- 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 seconds à 5000 g.
- Ajouter 200 µl de VIRCELL POSITIVE CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION **6** dans chaque tube.
- Mélanger à l'aide du vortex pendant 10 seconds.
- Centrifuger le tube pendant 5 seconds à 5000 g.
- Incuber à température ambiante pendant 3 minutes pour une reconstitution complète.

Une fois reconstitués, le VIRCELL PCR MIX **1** 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.

40 BANDELETTE	TESTS	NOMBRE DE CONTRÔLES POSITIFS	NOMBRE DE CONTRÔLES NEGATIFS	NOMBRE D'ÉCHANTIL- LONS	TOTAL
	1	1	1	38	40
2	2	2	36	40	
4	4	4	32	40	
8	8	8	24	40	

TEST PROCEDURE:

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

Pour le prélèvement de l'ADN, éluer le contenu de l'écouvillon dans SAMPLE SOLUTION **8**, chauffer pour lyser le streptocoque du groupe B, centrifuger et ajouter directement une aliquote dans le PCR MIX.

Procéder selon la procédure suivante:

- 1.-Pipeter 0,5 ml de SAMPLE SOLUTION **8** dans un tube de 1,5 ml. Utiliser autant de tubes que d'échantillons à analyser. Identifier le n° d'échantillon en l'inscrivant sur le couvercle du tube.
- 2.-Tenir l'écouvillon par l'extrémité, près du rebord du tube. Agiter l'écouvillon avec les doigts pendant 10 secondes. Retirer l'écouvillon et fermer le tube.



Prendre toutes les précautions lors de cette opération pour éviter toute contamination.

- 3.-Chauffer à 95°C pendant 5 minutes. Utiliser un thermobloc à chaleur sèche pour tubes de 1,5 ml ou un bain d'eau.
- 4.-Centrifuger à 14000 g pendant 2 minutes.



Lors de cette opération, il est essentiel d'éviter la resuspension de tout élément susceptible d'inhiber la PCR. Pour cette raison, la centrifugation doit être effectuée juste avant la préparation de la réaction de PCR. Le temps écoulé entre la centrifugation et le pipetage de l'échantillon doit être inférieur à 2-3 minutes. Si la PCR n'est pas réalisée immédiatement après le prélèvement, verser 100 µl du surnageant dans un nouveau tube et le congeler à une température inférieure à -20°C jusqu'à réalisation de la PCR. Ce procédé permet d'éviter le risque de resuspension des éléments inhibiteurs.

5.-Pipeter immédiatement 10 µl du surnageant dans chaque tube de PCR.

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

La solution de PCR **1** est lyophilisée. Chaque ampoule contient les composants nécessaires à la réalisation de 8 réactions. Reconstituer les tubes de solution de PCR 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: un tube pour chaque échantillon plus un tube pour le contrôle positif, et un autre pour le contrôle négatif. 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 par tube.
- 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*:

1 cycle	92°C	1minute 30 secondes
35 cycles	92°C	20 secondes
	55°C	20 secondes
	72°C	20 secondes
1 cycle	72°C	2 minutes
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 dénaturation à 95°C, puis d'introduire immédiatement la bandelette.

PRODUIT PARA DIAGNOSTIC IN VITRO

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

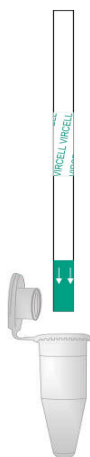
- Ajouter 5 µl de produit de PCR dénaturé, refroidi à 4°C. Les échantillons ne doivent pas rester plus de 1 minute à 4°C sans être ajoutés dans le tube de 1,5 ml.



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 incubé 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 dès que la bandelette est retirée. Si la bandelette sèche, des variations peuvent se produire dans l'intensité du signal et les fonds des échantillons négatifs. 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.

VALIDATION DU MILIEU DE TRANSPORT EN CULTURE ET DES ÉCOUVILLONS DE PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLONS

Tous les lots neufs de milieu de transport en culture utilisés pour transporter des échantillons au laboratoire afin d'être testés doivent être validés pour pouvoir être employés avec ce test, afin d'assurer que le milieu de culture ne contient pas de substances susceptibles d'interférer avec la PCR (protocole de validation disponible).

CONTRÔLE DU TRAITEMENT DE L'ÉCHANTILLON

Afin de vérifier l'efficacité du traitement des échantillons, une quantité de microorganisme ou de contrôle d'ADN purifié de *S. agalactiae* (ref. VIRCELL MBC071) doit être ajoutée dans un tube de milieu de transport en culture validé, puis incubée pendant une heure à température ambiante. Cet échantillon artificiel doit 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.

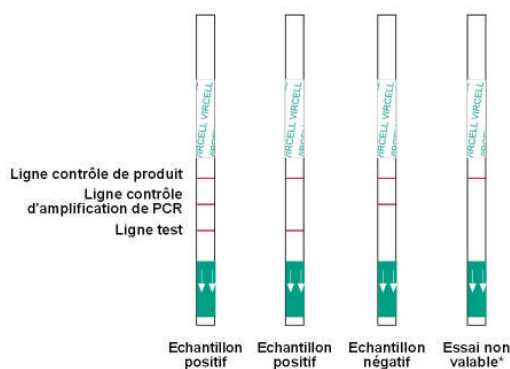
INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS ET PROCÉDURE DE VALIDATION NOTICE D'UTILISATION:

Un contrôle négatif doit être inclus dans chaque essai. Un contrôle positif devrait être inclus dans chaque essai. Chaque fois qu'une nouvelle trousses 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: une bande rouge dans cette position indique la présence de matériel génétique de streptocoque du groupe B dans l'échantillon.

La ligne de contrôle de produit doit toujours être lisible pour que l'essai soit valable



*présence possible d'inhibiteurs de PCR

LIMITES DU TEST:

- 1.- Cette trousses est destinée à une utilisation sur clinical samples humains.
- 2.- Lire la notice soigneusement et appliquer strictement la procédure pour obtenir des résultats fiables. En particulier pour de bon 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.

PRODUIT PARA DIAGNOSTIC IN VITRO

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

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 clinical samples 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.-Un résultat positif n'indique pas nécessairement la présence d'organismes viables. Cependant, il permet de supposer une colonisation par GBS. Le test n'est pas conçu pour distinguer les porteurs de GBS de ceux présentant une infection aux streptocoques.

PERFORMANCES

SENSIBILITÉ ET SPECIFICITÉ:

235 échantillons analysés par culture cellulaire ont été traités et testés. Les résultats ont été les suivants:

Sensibilité (%)	Spécificité (%)
94	99

Sensibilité analytique:

Des dilutions en série d'ADN purifié de Streptococcus groupe B (quantifié par PCR en temps réel) puis traitées et testées. La trousse a pu détecter jusqu'à 8 copies d'ADN par réaction.

Quinze répliques d'écouvillons imbibés de différentes quantités de *S. agalactiae* ont été traitées et testées. La trousse a permis de détecter, avec un taux de reproductibilité de 100%, des échantillons qui contenaient au moins 250 microorganismes et qui développaient après ensemencement une moyenne de 5 colonies.

PRECISION INTRA-ASSAY:

2 échantillons (l'un positif proche de la limite de détection 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:

2 échantillons (l'un positif proche de la limite de détection 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*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydomydia pneumoniae*, *Chlamydomydia psittaci*, *Coxiella burnetii*, *Enterococcus faecalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus*

influenzae, HSV1, HSV2, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* serogroupe A, B et C, *Rickettsia conorii*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus pneumoniae*, *Toxoplasma gondii*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pyogenes*, Streptococcus groupe F, Streptococcus groupe C, *Ureaplasma urealyticum*). Aucun faux résultat positif n'a été obtenu.

SYMBOLES UTILISES SUR LES ETIQUETTES:

	Usage para diagnostic <i>in vitro</i>
	Utiliser avant le: (date de péremption)
	Conservar 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
	Carte de lecture de test monoligne
	Carte d'interprétation
	Ligne de contrôle de produit
	Ligne contrôle d'amplification de la PCR
	Ligne test
	Échantillon
	Échantillon positif
	Échantillon négatif
	Essai non valable
	Date

BIBLIOGRAPHIE :

- Bergeron, M. G., D. Ke, C. Menard, F. J. Picard, M. Gagnon, M. Bernier, M. Ouellette, P. H. Roy, S. Marcoux, and W. D. Fraser. 2000. Rapid detection of group B streptococci in pregnant women at delivery. *N Engl J Med* 343:175-9.
- Davies, H. D., M. A. Miller, S. Faro, D. Gregson, S. C. Kehl, and J. A. Jordan. 2004. Multicenter study of a rapid molecular-based assay for the diagnosis of group B Streptococcus colonization in pregnant women. *Clin Infect Dis* 39:1129-35.
- Honest, H., S. Sharma, and K. S. Khan. 2006. Rapid tests for group B Streptococcus colonization in laboring women: a systematic review. *Pediatrics* 117:1055-66.
- Ke, D., C. Menard, F. J. Picard, M. Boissinot, M. Ouellette, P. H. Roy, and M. G. Bergeron. 2000. Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B streptococci. *Clin Chem* 46:324-31.
- Natarajan, G., Y. R. Johnson, F. Zhang, K. M. Chen, and M. J. Worsham. 2006. Real-time polymerase chain reaction for the rapid

PRODUIT PARA DIAGNOSTIC IN VITRO

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

detection of group B streptococcal colonization in neonates. *Pediatrics* 118:14-22.

6. Rallu, F., P. Barriga, C. Scrivo, V. Martel-Laferriere, and C. Laferriere. 2006. Sensitivities of antigen detection and PCR assays greatly increased compared to that of the standard culture method for screening for group B streptococcus carriage in pregnant women. *J Clin Microbiol* 44:725-8.

7. Schuchat, A. 1998. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin Microbiol Rev* 11:497-513.

Pour toute information complémentaire contacter:
customerservice@vircell.com

REVISION: Mars-09

PRODUIT PARA DIAGNOSTIC IN VITRO

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