

## SPEED-OLIGO MYCOBACTERIA

**SP005:** Test oligo-chromatographique pour le dépistage qualitatif du genre *Mycobacterium* et de 12 espèces différentes de mycobactéries: complexe *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*), complexe *M. avium-intracellulare-scrofulaceum*, complexe *M. chelonae-abscessus*, *M. kansasii*, *M. fortuitum* et *M. gordonae* dans des échantillons de culture. 40 tests.

### INTRODUCTION:

Les mycobactéries sont un groupe de microorganismes d'une grande importance clinique, car elles sont à l'origine de différentes infections chez les humains, avec une forte morbidité et mortalité. Elles constituent actuellement l'un des plus graves problèmes sanitaires au niveau mondial. On estime qu'environ un tiers de la population mondiale est infecté par le bacille de la tuberculose.

Du point de vue pratique, il est possible de définir trois groupes au sein du genre *Mycobacterium*: 1) le complexe *M. tuberculosis*, dont les mycobactéries entraînent une tuberculose, et qui comprend les espèces *M. tuberculosis*, *M. bovis* (y compris BCG), *M. africanum* et *M. microti*; 2) *M. leprae*, qui provoque la lèpre; 3) les mycobactérioses produites par des mycobactéries autres que les précédentes, ne provoquant pas de tuberculose, et dont le pouvoir pathogène est moindre; ces dernières peuvent être opportunistes ou saprophytes.

#### Complexe *M. tuberculosis*

Le réservoir naturel de *M. tuberculosis* est l'espèce humaine, tandis que celui de *M. bovis* est surtout le bétail. La tuberculose est une maladie chronique et granulomateuse qui touche surtout le poumon, bien qu'elle puisse attaquer d'autres tissus, voire de façon disséminée.

#### Complexe *M. avium-intracellulare*

Ce type de mycobactéries est largement répandu dans la nature. Elles n'attaquent en général que des malades souffrant du SIDA ou immunocompromis. Elles peuvent entraîner des tableaux d'infection disséminée ou focalisée (poumon, tractus gastro-intestinal ou ganglions lymphatiques).

#### *M. scrofulaceum*

En rapport avec des cas de lymphadénite chez les enfants.

#### *M. kansasii*

Cette espèce provoque une maladie pulmonaire chronique similaire à la tuberculose. Chez des patients immunocompromis, elle peut causer une pathologie disséminée.

#### *M. abscessus*

Peut entraîner des infections pulmonaires chroniques, des infections de plaies chirurgicales, des infections de cathéter ou des infections disséminées chez des patients immunocompromis.

#### *M. chelonae*

Cette espèce, qui présente une forte résistance face aux antimicrobiens, est fréquemment isolée chez des malades immunocompromis.

#### *M. fortuitum*

Cette espèce provoque des infections de plaies chirurgicales, des infections de cathéter, des ostéomyélites et des cellulites.

#### *M. gordonae*

Cette espèce est généralement isolée dans les laboratoires de microbiologie en tant que contaminant, mais elle peut parfois entraîner une pathologie chez des patients immunocompromis.

La trousse de dépistage SPEED-OLIGO MYCOBACTERIA est une méthode qui repose sur l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) en association avec une bandelette réactive à lecture visuelle (dipstick), ce qui permet une détection rapide et hautement sensible et spécifique du genre *Mycobacterium* et de 12 espèces différentes de mycobactéries: complexe *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*), complexe *M. avium-intracellulare-scrofulaceum*, complexe *M. chelonae-abscessus*, *M. kansasii*, *M. fortuitum* et *M. gordonae*.

La solution PCR contenue dans cette trousse comprend des oligonucléotides spécifiques permettant l'amplification de l'ITS (Internal Transcribed Spacer) entre les gènes ribosomiaux 16S-23S. Cette trousse a été conçue dans l'objectif d'en faciliter l'utilisation. En fonction du thermocycleur employé, le délai d'amplification sera de 60 à 75 minutes,

### FOR INFORMATION USE ONLY

Not to be used for performing the assay. Refer to the insert accompanying the kit.

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.

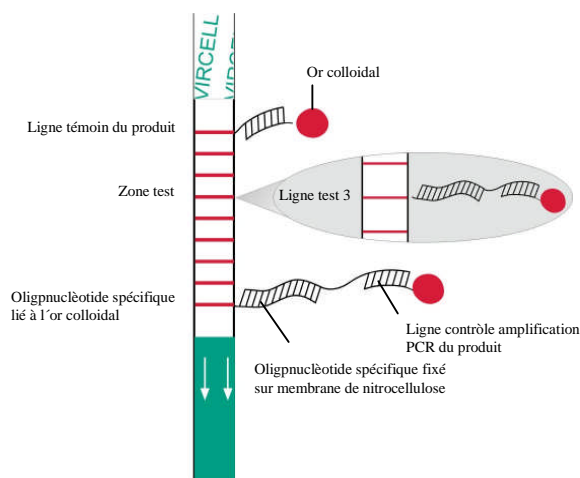
### PRINCIPE DU TEST:

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

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 est lyophilisée. Il est nécessaire de les reconstituer avant l'utilisation (voir «Préparation des réactifs»). Les autres réactifs sont prêts à l'usage.

### COMPOSITION DU COFFRET:

☐ VIRCELL MBA PCR MIX: 5 ampoules de tampon de PCR,  $Cl_2Mg$ , oligonucléotides spécifiques pour mycobactéries, dNTPs, Taq polymérase et un fragment d'ADN pour contrôle d'amplification de PCR avec des oligonucléotides spécifiques pour son amplification. Lyophilisés.

### 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>

4 VIRCELL MBA 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.

7 VIRCELL MBA 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 :

Cabine de sécurité

Thermobloc ou bain thermostatique à 95°C±2°C

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:**

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, 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 reconstituée	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 restent stable 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 est compatible avec différents coffrets SPEED-OLIGO de VIRCELL. Ne pas intervertir VIRCELL PCR MIX, 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.

#### **PREPARATION DES REACTIFS:**

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

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:

- 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.

#### **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>

Une fois reconstituée, le VIRCELL PCR MIX [1] peut être congelés à une température inférieure à -20°C pour être utilisé dans des réactions ultérieures.

### TEST PROCEDURE:

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

Le prélèvement de l'ADN peut être réalisé à partir de bactéries cultivée en milieu liquide ou en milieu solide. Il est indispensable que l'environnement de travail soit exempt d'ADN amplifié et que le matériel employé soit exempt d'ADNase. Pour le prélèvement, il est possible d'employer une méthode ou une trousse de prélèvement du commerce, mais la méthode décrite ci-dessous est rapide et valide pour le prélèvement d'ADN à amplifier. La première étape de ce protocole est variable selon que les mycobactéries auront été cultivées sur un milieu liquide ou solide. Les autres étapes du protocole sont identiques quel que soit le milieu.

Milieu liquide : Pipeter 1 ml dans un tube. Centrifuger pendant 15 minutes à 12 000 g pour concentrer les bactéries. Éliminer le surnageant et remettre les bactéries en suspension dans 300 µl de VIRCELL SAMPLE SOLUTION.

Milieu solide : Recueillir la colonie bactérienne avec une oese et la mettre en suspension dans 300 µl de VIRCELL SAMPLE SOLUTION.

-Incuber les bactéries pendant 1 heure à 95°C dans un bain thermostatique ou un thermobloc, en prenant soin de bien placer les tubes employés. Pour réaliser l'incubation, il est conseillé d'employer des tubes à bouchon vissé afin d'éviter toute ouverture à cause de la chaleur et une éventuelle formation d'aérosols de mycobactéries. Il est souhaitable de réaliser cette opération dans une cabine de sécurité biologique.

-Centrifuger pendant 5 minutes à 12000 g, et utiliser 10 µl du surnageant directement pour la PCR. La centrifugation doit être réalisée juste avant de réaliser la PCR afin d'éviter la remise en suspension de composants susceptibles d'inhiber la PCR. Si la réalisation de la PCR n'est pas possible immédiatement, il est recommandé de recueillir le surnageant dans un nouveau tube pouvant être stocké à une température inférieure à -20°C, en prenant soin de ne pas entraîner de matériel précipité.

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

La solution de PCR [2] 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. Placer sur un porte-tube le nombre de tubes nécessaires: un tube pour chaque échantillon. L'excédent de solution de PCR peut être congelé à une température inférieure à -20°C pour être utilisé dans des réactions ultérieures.

- Pipeter 15 µl de solution de PCR reconstituée par tube.
- Ajouter 10 µl d'échantillon dans chaque tube.
- Introduire le tube de PCR dans le thermocycleur et lancer le programme suivant\*:

1 cycle	92°C	1 minute
	92°C	20 secondes
40 cycles	55°C	30 secondes
	72°C	30 secondes
1 cycle	72°C	1 minute
1 cycle	95°C	1 minute

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

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

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

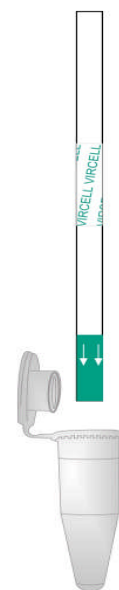
- Ajouter 40 µl de VIRCELL RUNNING SOLUTION [7] dans un tube\* de 1,5 ml et incuber à 55°C pendant 2 minutes.
- Dénaturer l'échantillon à 95°C pendant 1 minute et le placer rapidement dans de la glace ou sur un portoir isofreeze à 4°C. Les échantillons ne doivent être en aucun cas placés sur un portoir 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.
- 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 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 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.*

### 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>

## 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.

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

Pour la lecture du résultat, placer la bandelette en position S, comme indiqué sur la fiche de lecture. La bandelette de test comprend 9 lignes de lecture: une ligne témoin du produit, une ligne de contrôle de l'amplification, une ligne générique commune réagissant en présence n'importe quelle mycobactérie, et 6 lignes de typage permettant d'identifier différents complexes ou espèces de mycobactéries. L'interprétation des résultats peut donner lieu à quatre situations différentes:

### 1.-Test non-valide (Figure **INVAL**):

1.1.-Aucune ligne n'apparaît: dans ce cas, l'échantillon et la solution VIRCELL RUNNING SOLUTION n'ont pas bien imbibé la bandelette.

1.2.-Seule apparaît la ligne témoin du produit: l'échantillon contient des composants inhibant l'amplification de n'importe quel ADN présent dans celui-ci, y compris le contrôle de l'amplification.

En cas de détection d'inhibition, il est recommandé de recentrifuger l'échantillon pendant 5 minutes à 12.000 g (Voir alinéa «Procédure de test: Prélèvement de l'ADN») et de reprendre 10 µl du surnageant pour réaliser une nouvelle PCR. Si l'inhibition persiste, il est souhaitable de procéder à un nouveau prélèvement à partir de la culture originale.

2.-Test négatif (Figure **S(-)**): La ligne témoin du produit et la ligne de contrôle de l'amplification apparaissent. Le test a donc été réalisé correctement, et la présence de composants inhibiteurs peut être écartée. Le test est considéré négatif en l'absence d'ADN de mycobactéries dans l'échantillon; la présence d'un microorganisme n'appartenant pas au genre *Mycobacterium* reste cependant possible.

3.-Test positif pour le genre *Mycobacterium* (Figure **S(+) TL 7**): La bande spécifique du genre (TL7) apparaît, accompagnée ou non de la ligne de contrôle de l'amplification. Dans ce cas, la présence d'une mycobactérie dans l'échantillon est confirmée.

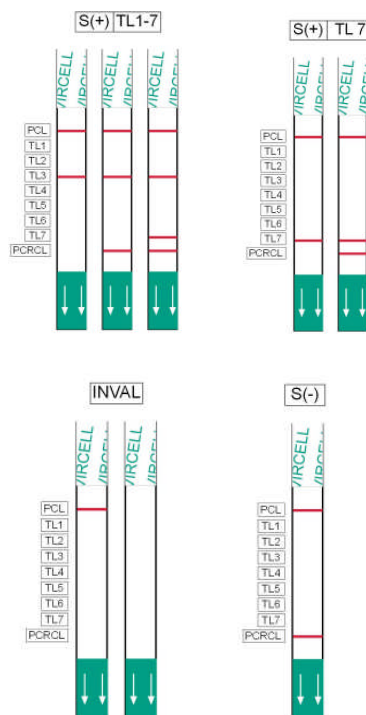
4.-Test positif pour l'une des mycobactéries ou l'un des complexes spécifiques ciblés par le test (Figure **S(+) TL1-7**): L'une des bandes spécifiques aux mycobactéries ciblées par le test (TL1, TL2, TL3, TL4, TL5, TL6) apparaît. Ces bandes peuvent apparaître concomitamment ou non avec la ligne de genre et/ou la ligne de contrôle de l'amplification. Il peut arriver que des coinfections mettent en cause deux mycobactéries ou davantage, auquel cas on observera deux lignes spécifiques (TL1, TL2, TL3, TL4, TL5, TL6) ou davantage, toujours pour les mycobactéries ciblées par le test.

Ce test permet la réalisation d'une PCR multiple dans un seul et même tube à PCR. La solution PCR est dosée de manière à ce que l'amplification des lignes des espèces (TL1, TL2, TL3, TL4, TL5, TL6) soit légèrement favorisée par rapport aux lignes de genre (TL7) et de contrôle de la PCR (PCRCL); de la même façon, l'amplification du genre *Mycobacterium* (TL7) est légèrement plus efficiente que celle du contrôle de la PCR (PCRCL). Ces caractéristiques de la technique expliquent que la ligne de contrôle de la PCR puisse ne pas apparaître pour un échantillon se révélant positif pour le genre *Mycobacterium* (Figure **S(+) TL 7**), voire que les lignes de contrôle de la PCR et du genre n'apparaissent pas pour des échantillons se révélant positifs pour certaines des mycobactéries ciblées par le test (Figure **S(+) TL1-7**). Toutefois, ce fait, peu fréquent, n'invalide pas le résultat du test.

En fonction de la mycobactérie présente dans l'échantillon, on observera un signal sur les lignes suivantes.

Microorganisme	Ligne/s spécifique
Complexe <i>M. chelonae/M. abscessus</i>	TL1
<i>Mycobacterium gordonae</i>	TL2
<i>M. kansasii</i>	TL3
Complexe <i>M. tuberculosis</i> ( <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. microti</i> , <i>M. africanum</i> )	TL4 ou (TL4 + TL3)*
Complexe <i>M. avium/intracellulare/scrofulaceum</i>	TL5
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	TL6
Genre <i>Mycobacterium</i>	TL7

\* Il arrive fréquemment, qu'en plus de la ligne TL4, un signal de moindre intensité apparaisse sur la ligne TL3.



## LIMITES DU TEST:

- 1.-Cette trousse est destinée à une utilisation sur échantillons de culture humains.
- 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.-La détection du microorganisme dépend du nombre d'organismes présents dans la culture.
- 4.-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.
- 5.-Ce produit est exclusivement conçu pour être utilisé par des personnes formées aux techniques de PCR.
- 6.-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.
- 7.-Ce test a été vérifié pour être employé aussi bien en milieu solide (Lowenstein-Jensen, Middlebrook) que liquide (Middlebrook), à l'aide de systèmes manuels ou automatisés (Bactec, BacT/ALERT). Il n'a pas été vérifié dans d'autres types de milieu.
- 8.-Les performances n'ont pas été déterminées pour tous les génotypes.
- 9.-Le test fonctionne uniquement dans les limites des régions géographiques dans lesquelles les sondes ont été choisies. En raison de la variabilité

## 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>

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.

10.-Un résultat négatif n'exclut pas la présence du microorganisme à des niveaux inférieurs à la limite de détection de l'essai.

11.-Le contrôle interne inclus dans l'essai n'élimine pas tous les faux négatifs.

12.-L'ADN doit être extrait d'une culture bactérienne selon une méthode appropriée, préalablement au processus d'amplification.

13.-L'efficacité du test n'a pas été prouvée directement sur des échantillons cliniques.

## PERFORMANCES

### SENSIBILITÉ ET SPECIFICITÉ:

173 prélèvements ont été testés avec du matériel d'hybridation que l'on trouve dans le commerce.

Les résultats sont les suivants:

Sensibilité (%)	Spécificité (%)
98	100

Sensibilité analytique:

Des dilutions en série d'ADN purifié de *M. tuberculosis* (quantifié par PCR en temps réel) puis traitées et testées. La trousse a pu détecter jusqu'à 20 copies d'ADN par réaction.

11 prélèvements issus de souches de référence ont été traités et analysés.

Les résultats sont les suivants:

Concordance = 90,9 %

Le résultat indique la réaction croisée entre *M. marinum* et *M. kansasii*.

### PRECISION INTRA-ASSAY:

7 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:




7 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*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydomonas pneumoniae*, *Chlamydomonas psittaci*, *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium haemolyticum*, *Corynebacterium xerosis*, *Coxiella burnetii*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus ducreyi*, HSV1, HSV2, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* serogrupos A, B et C, *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia cyriacigeorgica/asteroides*, *Nocardia farcinica*, *Nocardia nova*, *Propionibacterium acnes*, *Rhodococcus equi*, *Rickettsia conorii*, *Salmonella typhi*, *Streptomyces ambofaciens*, *Streptomyces gardneri/Nocardia beijingensis*, *Streptomyces sampsonii*, *Streptococcus pneumoniae*, *Toxoplasma gondii*). Aucun faux résultat positif n'a été obtenu.

### SYMBOLES UTILISES SUR LES ETIQUETTES:

	Usage <i>in vitro</i>
	Utiliser avant le: (date de péremption)
	Conserver 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 7 ligne
	Carte d'interprétation 7 ligne
	Ligne de contrôle de produit
	Ligne contrôle d'amplification de la PCR
	Ligne test 1
	Ligne test 2
	Ligne test 3
	Ligne test 4
	Ligne test 5
	Ligne test 6
	Ligne test 7
	Ligne test
	Échantillon
	Échantillon positif
	Échantillon négatif
	Échantillon positif pour TL7
	Échantillon positif pour TL1, TL2, TL3, TL4, TL5, TL6 et/ou TL7
	Essai non valable
	Date

### BIBLIOGRAPHIE :

- Alcaide Fernández de Vega, F., Esteban Moreno, J., González Martín, J., Palacios Gutiérrez, J. 2005. Mycobacterias. Procedimientos en Microbiología Clínica. 9ª.
- Blackwood, K. S., C. He, J. Gunton, C. Y. Turenne, J. Wolfe, and A. M. Kabani. 2000. Evaluation of recA sequences for identification of Mycobacterium species. J. Clin. Microbiol. 38:2846-2852
- Kim, B. J., S. K. Hong, K. H. Lee, Y. J. Yun, E. C. Kim, Y. G. Park, G. H. Bai, and Y. H. Kook. 2004. Differential identification of Mycobacterium tuberculosis complex and nontuberculous mycobacteria by duplex PCR assay using the RNA polymerase gene (rpoB). J. Clin. Microbiol. 42:1308-1312.

### 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>

4. Kirschner, P., and E. C. Bottger. 1998. Species identification of mycobacteria using rDNA sequencing. *Methods Mol. Biol.* 101:349-361
5. Kox, L. F., H. M. Jansen, S. Kuijper, and A. H. Kolk. 1997. Multiplex PCR assay for immediate identification of the infecting species in patients with mycobacterial disease. *J. Clin. Microbiol.* 35:1492-1498
6. Lebrun, L., F. X. Weill, L. Lafendi, F. Houriez, F. Casanova, M. C. Gutierrez, D. Ingrand, P. Lagrange, V. Vincent, and J. L. Herrmann. 2005. Use of the INNO-LiPA-MYCOBACTERIA assay (version 2) for identification of *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare-Mycobacterium scrofulaceum* complex isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43:2567-2574.
7. Mäkinen J, Marjamäki M, Marttila H, Soini H. 2006. Evaluation of a novel strip test, GenoType Mycobacterium CM/AS, for species identification of mycobacterial cultures. *Clin Microbiol Infect.* 12:481-3.
8. Padilla, E., V. Gonzalez, J. M. Manterola, A. Perez, M. D. Quesada, S. Gordillo, C. Vilaplana, M. A. Pallares, S. Molinos, M. D. Sanchez, and V. Ausina. 2004. Comparative evaluation of the new version of the INNO-LiPA Mycobacteria and GenoType Mycobacterium assays for identification of Mycobacterium species from MB/BacT liquid cultures artificially inoculated with mycobacterial strains. *J. Clin. Microbiol.* 42:3083-3088.
9. Pérez-Martínez I, Ponce-De-León A, Bobadilla M, Villegas-Sepúlveda N, Pérez-García M, Sifuentes-Osornio J, González-y-Merchand JA, Estrada-García T. 2008. A novel identification scheme for genus Mycobacterium, *M. tuberculosis* complex, and seven mycobacteria species of human clinical impact. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*;27:451-9.
10. Richter E, Rüschi-Gerdes S, Hillemann D. 2006. Evaluation of the GenoType Mycobacterium Assay for identification of mycobacterial species from cultures. *J Clin Microbiol.*44:1769-75.
11. Richter, E., M. Weizenegger, A. M. Fahr, and S. Rusch-Gerdes. 2004. Usefulness of the GenoType MTBC assay for differentiating species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in cultures obtained from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 42:4303-4306.
12. Roth, A., M. Fischer, M. E. Hamid, S. Michalke, W. Ludwig, and H. Mauch. 1998. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J. Clin. Microbiol.* 36:139-147.
13. Sanguinetti, M., B. Posteraro, F. Ardito, S. Zanetti, A. Cingolani, L. Sechi, A. De Luca, L. Ortona, and G. Fadda. 1998. Routine use of PCR-reverse cross-blot hybridization assay for rapid identification of Mycobacterium species growing in liquid media. *J. Clin. Microbiol.* 36:1530-1533
14. Springer, B., L. Stockman, K. Teschner, G. D. Roberts, and E. C. Bottger. 1996. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J. Clin. Microbiol.* 34:296-303.
15. Suffys, P. N., R. A. da Silva, M. de Oliveira, C. E. Campos, A. M. Barreto, F. Portaels, L. Rigouts, G. Wouters, G. Jannes, G. van Reybroeck, W. Mijs, and B. Vanderborcht. 2001. Rapid identification of mycobacteria to the species level using INNO-LiPA Mycobacteria, a reverse hybridization assay. *J. Clin. Microbiol.* 39:4477-4482.
16. Takewaki, S., K. Okuzumi, I. Manabe, M. Tanimura, K. Miyamura, K. Nakahara, Y. Yazaki, A. Ohkubo, and R. Nagai. 1994. Nucleotide sequence comparison of the mycobacterial dnaJ gene and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacterial species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:159-166.
17. Tevere, V.T., Hewitt, P.L., Dare, A., Hocknell, P, Keen, A., Spadoro, J.P. and Young, K.K.Y. 1996. Detection of *mycobacterium tuberculosis* by PCR amplification with pan-mycobacterium primers and hybridization to an *M. tuberculosis*-specific probe. *J. Clin. Microbiol.* 34:918-923.
18. Tortoli, E., A. Mariottini, and G. Mazzarelli. 2003. Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification. *J. Clin. Microbiol.* 41:4418-4420.
19. Wu, X., Ahang, J., Liang, J., Yang, Lu, Y., Li, H., Li, C., Yue, J., Zhang, L., and Liu, Z. 2007. Comparison of three methods for rapid identification of mycobacterial clinical isolates to the species level. *J. Clin. Microbiol.* 45:1898-1903.
20. Xiong, L., Kong, F., Yang, Y., Cheng, J. and Gilbert, G.L. 2006. Use of PCR and reverse line blot hybridization macroarray based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences for rapid identification of 34 Mycobacterium species. *J. Clin. Microbiol.* 44:3544-3550.

Pour toute information complémentaire contacter:  
customerservice@vircell.com

**REVISION: Juillet-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>