

SPEED-OLIGO MYCOPLASMA PNEUMONIAE

SP001: Test oligochromatographique pour la détection qualitatif de *Mycoplasma pneumoniae* dans des échantillons cliniques. 40 tests.

INTRODUCTION:

Mycoplasma pneumoniae est un agent pathogène commun provoquant 10-30% des cas de pneumonie acquise dans la communauté. La plupart des cas sont relativement bénins et environ 15% des infections évoluent de façon asymptomatique, mais elles peuvent également provoquer des tableaux cliniques graves, voire mortels. La pneumonie produite par *M. pneumoniae* est plus fréquente chez les enfants et les adolescents.

L'isolement de l'organisme par mise en culture et la détection au moyen de tests sérologiques sont les méthodes de diagnostic classiques. La nature délicate de l'agent pathogène et la séroprévalence élevée sont les principaux inconvénients de ces procédés. L'isolement de *M. pneumoniae* est lent et insensible. La sérologie est un outil important pour le diagnostic de l'infection à *M. pneumoniae*. La détection d'IgM ou de séroconversion en IgG dans des paires d'échantillons sont les méthodes sérologiques préférées. Le principal désavantage est l'absence de réponse IgM chez de nombreux adultes, tandis que le diagnostic basé sur l'IgG n'est possible que sous forme rétrospective.

La PCR est la méthode choisie pour la détection de *M. pneumoniae* dans des échantillons respiratoires, remplaçant d'autres méthodes directes de diagnostic en raison de sa haute sensibilité basée sur l'amplification. Cela permet de détecter l'agent pathogène dans des sécrétions respiratoires aux stades précoces de la maladie, en l'absence d'une réponse d'anticorps. Bien que *M. pneumoniae* puisse persister dans l'appareil respiratoire durant plusieurs mois chez certains patients, il est détecté moins fréquemment aux stades tardifs de la maladie. La détection des produits amplifiés à l'aide d'une méthode basée sur une double hybridation améliore la spécificité du test et accroît sa sensibilité.

La plupart des tests de PCR font appel à des systèmes de détection peu sensibles ou très laborieux. La trousse de détection SPEED-OLIGO MYCOPLASMA PNEUMONIAE est une méthode basée sur la PCR associée à une bandelette réactive permettant une détection rapide et hautement sensible et spécifique de *M. pneumoniae* dans des échantillons respiratoires. Les solutions PCR comprises dans la trousse contiennent une paire d'oligonucléotides spécifiques pour l'amplification d'un fragment du gène P1. 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:

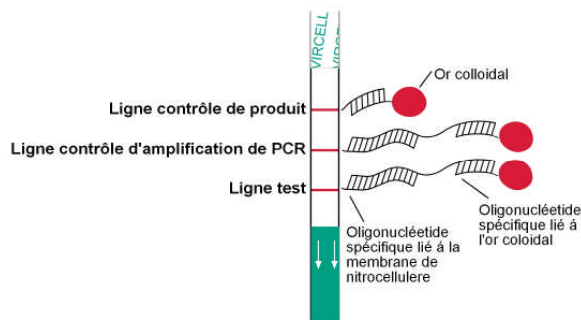
Méthode basée sur l'amplification d'un fragment spécifique d'un gène de *M. pneumoniae*, permettant un diagnostic rapide des infections provoquées par *M. pneumoniae*.

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 MPN PCR MIX: 5 ampoules de tampon de PCR, Cl₂Mg, oligonucléotides spécifiques pour *M. pneumoniae*, dNTPs, Taq polymérase et un fragment d'ADN pour contrôle d'amplification de PCR avec des oligonucléotides spécifiques pour son amplification. Lyophilisés.
- 2 VIRCELL MPN 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 MPN 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 MPN RUNNING SOLUTION: 2 ampoules 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 :

- Kits d'extraction d'ADN (voir recommandations dans «Procédure»)
- 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

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>

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:

1. Usage *in vitro* uniquement. Usage professionnel uniquement.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Éviter les contaminations microbiennes en retirant les aliquotes des réactifs.
8. 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.

9. 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.
10. Ce produit est exclusivement conçu pour être utilisé par des personnes formées aux techniques d'essai PCR.
11. Ne pas utiliser la trousse au-delà de la date de péremption.
12. L'ensemble du matériel doit être jeté conformément à la législation en vigueur.
13. Les réactifs de ce coffret pourrait 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.
14. 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. Est recommandé pour couper les bords de Les bandelettes développées pour une meilleure conservation.

PRELEVEMENT ET TRAITEMENT DE L'ECHANTILLON:

Manipuler tous les échantillons comme s'ils étaient des agents infectieux transmettant des maladies.

Prélèvement d'échantillons

Le matériel à tester peut comprendre des écouvillons nasopharyngés, des sécrétions pharyngées et nasales, des expectorations, des expectorations induites, des lavages bronchiques, des tissus ou des cellules infectés ou des cultures.

Les écouvillons doivent être mélangés à un milieu de transport en culture liquide (références Vircell MTC et MTV). Les écouvillons d'alginate de calcium ne doivent pas être employés pour le prélèvement d'échantillons du fait qu'ils inhibent la PCR. L'emploi de kits commerciaux d'extraction d'ADN est conseillé.

Transport d'échantillons

Les échantillons respiratoires humains doivent être transportés dans un milieu de transport en culture (références Vircell MTC et MTV).

Pour assurer l'arrivée au laboratoire d'échantillons de haute qualité, il convient de les transporter le plus rapidement possible.

Stockage des échantillons

Les échantillons peuvent être stockés à 2-8°C pendant un maximum de 24 heures ou congelés à une température inférieure à -20°C pendant une durée plus longue. Les extraits peuvent être stockés à une température d'au moins -20°C pendant au moins un an. Éviter les congélations et décongélations successives.

Après usage, conserver le reste de chaque échantillon traité à 2-8°C au cas où le test devrait être répété. Toute répétition d'un essai doit être effectuée dans un délai de 7 jours après le prélèvement de l'échantillon.

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:

- Ajouter 150 µl de VIRCELL PCR MIX RECONSTITUTION SOLUTION **[2]** dans chaque tube.
- Mélanger à l'aide du vortex pendant 10 secondes.

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



Vous devez être sûr que le mélange de PCR est complètement homogénéisé

- 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 200 µl de VIRCELL POSITIVE CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION **6** dans chaque 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 **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 BANDELETTES	TESTS	NOMBRE DE CONTRÔLES POSITIFS	NOMBRE DE CONTRÔLES NÉGATIFS	NOMBRE D'ÉCHANTILLONS	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 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):

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.

Le contrôle négatif doit être le dernier échantillon à préparer à un essai donné.

- 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	1 minute 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.-Détection 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.
- 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.

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>



- 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 ne contient pas de substances susceptibles d'interférer avec la PCR (protocole de validation disponible). Tous les milieux de culture de VIRCELL (références Vircell MTC et MTV) ont été testés pour assurer l'absence de substances interférentes.

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 *M. pneumoniae* (réf. VIRCELL MBC035) 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 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.

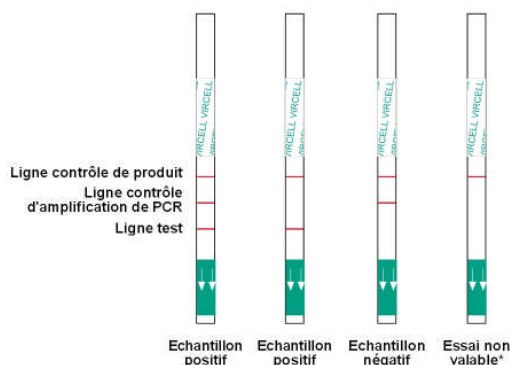
Le test comprend 3 zones de lecture:

- 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: une bande rouge dans cette position indique la présence de matériel génétique de *M. pneumoniae* 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 trousse est destinée à une utilisation sur échantillons respiratoires 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.- 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 respiratoires 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 géographiques 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.

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>

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 *M. pneumoniae* dans des échantillons respiratoires n'indique pas obligatoirement l'implication de l'agent pathogène dans l'épisode de pneumonie. Cependant, la combinaison des données cliniques et d'un résultat positif de PCR suggère une pneumonie provoquée par le microorganisme détecté.

16.-Ce test a été validé pour être utilisé avec des kits d'extraction commerciaux.

PERFORMANCES

SENSIBILITÉ ET SPECIFICITÉ:

Sensibilité analytique:

Des dilutions en série d'ADN purifié de *M. pneumoniae* puis traitées et testées. La trousse a pu détecter jusqu'à 20 copies d'ADN par réaction.

Sensibilité diagnostique:

60 échantillons ont été testés par PCR en temps réel dans un test externe. Les résultats ont été les suivants:
Sensibilité diagnostique=100%

Spécificité:

60 échantillons ont été testés par PCR en temps réel dans un test externe. Les résultats ont été les suivants:
Especificite=98%

50 échantillons de donneurs sains ont été traités et analysés. Aucun résultat positif n'a été détecté.

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*, *Chlamydomytila pneumoniae*, *Chlamydomytila psittaci*, *Coxiella burnetii*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus ducreyi*, HSV1, HSV2, *Legionella pneumophila*, *Neisseria meningitidis* sérotype A, B et C, *Rickettsia conorii*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Toxoplasma gondii*) certains d'entre eux étant fréquents dans les échantillons respiratoires. 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 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 :

- Daxboeck, F; Krause, R; Wenisch, C. 2003. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Clinical Microbiology and Infection* 9: 263-273.
- Loens, K; Ursi, D; Goossens, H; Ieven, M. 2003. Molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4915-4923.
- Pitcher, D; Chalker, VJ; Sheppard, C; George, RC; Harrison, TG. 2006. Real-time detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory samples with and internal processing control. *J Med Microbiol* 55: 149-155.
- Stralin, K; Bäckman, A. Holmberg, H; Fredlund, H; Olcén, P. 2005. Design of a multiplex PCR for *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydomytila pneumoniae* to be used on sputum samples. *APMIS* 113: 99-111.

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>