

**IVD**

## Notice d'utilisation (français)

**1 Utilisation prévue**

L'ampliCube STD Panel 1 est un test *in vitro* qualitatif pour la détection spécifique de l'ADN de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Mycoplasma genitalium* dans des échantillons d'urine (de préférence d'urine du premier jet) ou de frottis urogénitaux d'origine humaine.

**2 Domaine d'application**

*Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* sont les agents pathogènes bactériens transmis par voie sexuelle les plus fréquents. *Chlamydia trachomatis* est une bactérie intracellulaire obligatoire. L'infection est asymptomatique dans la majorité des cas. Chez la femme, en absence de traitement, l'infection peut provoquer une «maladie inflammatoire pelvienne» (MIP) qui peut s'accompagner de symptômes chroniques et de séquelles, tels que des grossesses tubaires ou abdominales et une stérilité. Chez le nouveau-né, l'infection à *Chlamydia trachomatis* peut provoquer une ophtalmie néonatale. Chez l'homme, l'infection peut se manifester par les symptômes cliniques d'une uréthrite ou d'une épидидymite. *Neisseria gonorrhoeae* est une bactérie diploïde à Gram négatif. Cette bactérie est l'agent pathogène de la gonorrhée et peut entraîner comme séquelles une épидидymite chez l'homme et une «maladie inflammatoire pelvienne», une stérilité et des grossesses tubaires et abdominales chez la femme. En dehors de la sphère génitale, *Neisseria gonorrhoeae* peut provoquer des infections anorectales, oropharyngées et oculaires. Chez la femme, une infection à *Mycoplasma genitalium* peut provoquer une cervicite, une endométriose, une uréthrite et une «maladie inflammatoire pelvienne». Chez l'homme, cette bactérie peut être à l'origine de symptômes d'une uréthrite. *Mycoplasma genitalium* est également associé à des infections des muqueuses respiratoires et gastro-intestinales.

**3 Principe du test**

Ce test est un système de PCR Real Time (en temps réel). Il utilise des amorces spécifiques et des sondes marquées pour l'amplification et la détection de l'ADN de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Mycoplasma genitalium*. Afin de s'assurer que les acides nucléiques isolés de l'échantillon du patient ne contiennent pas de substances inhibant la PCR, un contrôle interne (IC) est ajouté à l'échantillon pendant l'isolement de l'ADN. Ce IC est amplifié et détecté dans la même préparation de PCR. Ceci permet d'exclure les faux négatifs dus à une inhibition de la réaction PCR. Le IC sert en même temps à prouver que les acides nucléiques ont été extraits de l'échantillon du patient. Les sondes pour la détection de l'ADN spécifique de l'agent pathogène sont marquées avec les fluorochromes émetteurs (reporter) FAM (*Chlamydia trachomatis*), HEX (*Neisseria gonorrhoeae*) et ATTO Rho12 (*Mycoplasma genitalium*), et les sondes pour la détection du contrôle interne le sont avec ATTO 647N. Ceci permet une détection simultanée de toutes les séquences cibles dans un mélange réactionnel. La valeur Ct (*cycle threshold*) décrit la partie de la courbe où la fluorescence augmente pour la première fois de manière exponentielle au-dessus du bruit de fond.

**4 Réactifs**
**4.1 Contenu de l'emballage**

Les réactifs fournis suffisent à effectuer 50 analyses. Chaque lot de réactifs contient :

<b>P&amp;P MIX</b>	150 µl de mélange amorce-échantillon pour STD Panel 1 et de contrôle interne (couvercle vert)
<b>ENZYME</b>	600 µl de mélange d'enzymes (couvercle blanc) Contient de l'ADN-polymérase. (Le composant est coloré en bleu.)
<b>CONTROL INT</b>	250 µl de contrôle interne (couvercle incolore)
<b>CONTROL +</b>	170 µl de contrôle positif (couvercle rouge)
<b>CONTROL -</b>	2 x 1800 µl de contrôle négatif (couvercle bleu)
<b>INSTRU</b>	1 notice d'utilisation

**4.2 Réactifs, matériel et appareils supplémentaires requis**

- MIKROGEN ampliCube Color Compensation pour Light Cycler® 480 II (Roche)
- Kit d'isolement des acides nucléiques du commerce. Le système d'extraction des acides nucléiques suivant est recommandé: MagNAPure® Compact, Total Nucleic Acid Kit I (Roche)
- Thermocycleur en temps réel. Le thermocycleur suivant est recommandé: Light Cycler® 480 II (Roche)
- Plaques PCR à 96 puits et films ou tubes (PCR-clean), en fonction du thermocycleur
- Micropipettes avec embouts jetables à filtre 10 µl, 20 µl, 100 µl et 1000 µl
- Agitateur Vortex
- Minicentrifugeuse
- Éventuellement centrifugeuse pour plaques
- Gants à usage unique, sans poudre
- Bloc réfrigérant

**5 Durée de conservation et manipulation**

- Avant et après utilisation, conserver les réactifs entre -25°C et -18°C.
- Une décongélation et une congélation répétée des composants (plus de dix fois) doivent être évitées. Un aliquotage des composants du test est recommandé après la première décongélation.
- Toujours réfrigérer correctement les réactifs pendant les étapes de travail (+2°C – +8°C).
- Protéger tous les composants du kit de la lumière directe du soleil tout au long de la réalisation du test.
- Avant le début du test, décongeler complètement, mélanger (vortex brièvement) et centrifuger tous les réactifs.
- Une date de péremption est indiquée sur les emballages. Au-delà de cette date, la qualité du produit n'est plus garantie.
- Le test ne doit être réalisé que par des professionnels spécialement formés et agréés.
- En cas de modification substantielle du produit ou de non-respect des consignes par l'utilisateur, l'application peut sortir du cadre d'utilisation prévue de MIKROGEN.
- Une contamination croisée peut fausser les résultats des tests. Ajouter avec précaution les échantillons du patient et les contrôles. Veiller à ce que les mélanges réactionnels ne se répandent pas dans d'autres puits.

**6 Avertissements et consignes de sécurité**

- À utiliser uniquement pour le diagnostic *in vitro*.
- Tous les échantillons des patients sont potentiellement infectieux et doivent être manipulés comme tels.
- Porter des gants à usage unique appropriés durant toute la procédure de test.
- Tous les réactifs et matériels entrant en contact avec des échantillons potentiellement infectieux doivent être traités avec des désinfectants appropriés ou éliminés conformément aux règles d'hygiène en vigueur. Les indications de concentration et les durées d'incubation du fabricant doivent être respectées.
- Ne jamais remplacer les réactifs ni les mélanger avec des réactifs d'autres lots, d'autres kits de PCR MIKROGEN ou avec des réactifs d'autres fabricants.
- Avant de réaliser le test, lire l'intégralité de la notice d'utilisation et suivre scrupuleusement les instructions. Les écarts au protocole de test décrit dans la notice d'utilisation peuvent fausser les résultats.

**7 Prélèvement d'échantillons et préparation des réactifs**
**7.1 Échantillons**

Le produit de départ pour l'ampliCube STD Panel 1 est l'ADN extrait d'échantillons d'urine (de préférence d'urine du premier jet) ou de frottis urétraux d'origine humaine. La qualité de la préparation d'acides nucléiques influence le résultat du test. Il faut s'assurer que la méthode d'extraction choisie est compatible avec la technologie PCR en temps réel.

## 7.2 Extraction des acides nucléiques

Procédez à l'extraction des acides nucléiques de l'échantillon du patient et du contrôle négatif (NC). Nous recommandons un volume d'extraction initial de 200 µl et un volume d'éluat de 50 µl. Suivez les instructions du fabricant du kit d'extraction.

- Décongeler le contrôle interne (IC) (couvercle incolore) et le contrôle négatif (NC) (couvercle bleu).  
**Assurez-vous que le IC et le NC sont complètement décongelés. Avant l'emploi, mélangez brièvement le IC et le NC au vortex et par centrifugation!**
- Lors de l'extraction, ajouter 5 µl de IC à chaque échantillon du patient et au NC. Le IC doit être ajouté au mélange tampon de lyse de l'échantillon et non directement aux échantillons. (Remarque: le IC ne peut pas être utilisé sans extraction dans la PCR!)
- Procédez à l'extraction des échantillons du patient et du NC. (Remarque: le NC ne peut pas être utilisé sans extraction dans la PCR!)
- Le contrôle positif n'est pas extrait.

Le système d'extraction des acides nucléiques suivant est recommandé et a été utilisé pour l'évaluation de la performance:

Système d'extraction	Volume d'échantillon	Volume d'éluat
MagNAPure Compact (Roche) Total Nucleic Acid Kit I	200 µl	50 µl

Si vous désirez utiliser d'autres méthodes d'extraction, veuillez contacter le fabricant afin de vous assurer de la compatibilité.

## 7.3 Préparation du mastermix

- Décongeler le mélange amorce-échantillon (couvercle vert) et le mélange d'enzymes (couvercle blanc), en protégeant les réactifs de la lumière.  
**Assurez-vous que les réactifs sont complètement décongelés. Avant l'emploi, mélangez les réactifs au vortex et centrifugez brièvement!**
- Préparez le mastermix selon le schéma de pipettage suivant:

Composants	Mastermix pour 1 réaction
Mélange amorce-échantillon	3 µl
Mélange d'enzymes	12 µl
Volume total	15 µl

- Mélangez le mastermix complet au vortex et centrifugez brièvement.
- Utilisez 15 µl de mastermix pour chaque réaction de PCR.

## 7.4 Préparation de la réaction de PCR

- Décongelez le contrôle positif (PC) (couvercle rouge).  
**Assurez-vous que les réactifs sont complètement décongelés. Avant l'emploi, mélangez au vortex les réactifs et centrifugez brièvement!**

Composants	1 réaction
Mastermix de 7.3	15 µl
Éluat d'échantillon ou éluat de NC ou de PC	10 µl

- Pipetez 10 µl de chaque éluat d'échantillon dans le mastermix.
- Pipetez 10 µl de contrôle positif (non préparé) dans le mastermix.
- Pipetez 10 µl d'éluat du contrôle négatif dans le mastermix.

Chaque test doit contenir un contrôle positif et un contrôle négatif! Fermez la plaque PCR avec un film adhésif optique ou fermez le tube avec le couvercle prévu.



**Les plaques PCR ou les tubes doivent être passés au vortex pendant au moins 10 secondes à vitesse maximale, puis centrifugés brièvement.**

## 8 Programmation du thermocycleur en temps réel

L'ampliCube STD Panel 1 a été évalué avec LightCycler® 480 Instrument II (Roche).

### 8.1 Réglage des canaux de détection

	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Neisseria gonorrh.</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>	Contrôle interne (IC)
Fluorochrome émetteur	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Couleur	vert	jaune	orange	rouge
Émission	510 nm	580 nm	610 nm	660 nm
Fluorochrome suppresseur	[aucun]	[aucun]	[aucun]	[aucun]

Les indications concernant les longueurs d'ondes des canaux de détection se rapportent au LightCycler® 480 II.

Avec le LightCycler® 480 II, il est nécessaire d'exécuter auparavant une compensation de couleur avec le kit mis à disposition par Mikrogen.

### 8.2 Programme PCR

Transcription inverse	50°C	8 min.
Dénaturation	95°C	3 min.
<b>Amplification</b>	<b>45 cycles</b>	
• Dénaturation	95°C	10 sec.
• Hybridation/Élongation	60°C	45 sec.

Vous trouverez les informations de base sur la programmation des différents thermocycleurs en temps réel dans le mode d'emploi du thermocycleur utilisé. Pour les informations spéciales sur la programmation du thermocycleur PCR en temps réel lors de l'utilisation de l'ampliCube STD Panel 1, veuillez contacter le fabricant.

## 9 Résultats

L'évaluation des données sur le LightCycler® 480 II se fait avec la méthode *Abs Quant/2nd Derivative Max*.

### 9.1 Validation

- Le contrôle négatif doit se situer en dessous du *Threshold*. Le test n'est pas évaluable en cas de contamination de ce contrôle (courbe positive).
- Le contrôle négatif doit présenter une courbe positive. La valeur Ct du contrôle positif doit être < 33. Un contrôle positif en dehors de cette zone indique l'existence d'un problème d'amplification.
- Le contrôle interne doit présenter une courbe positive pour les échantillons négatifs et dans le contrôle négatif. Un écart à la courbe du IC dans un échantillon négatif par rapport au contrôle négatif indique l'existence d'un problème d'extraction ou d'inhibition de la PCR.

### 9.2 Évaluation

Les signaux supérieurs au *Threshold* sont évalués comme des résultats positifs. Les champs vides dans le tableau sont des résultats négatifs.

	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>	Contrôle interne (IC)
Couleur				
vert	positif			
jaune		positif		
orange			positif	
rouge				positif*

\*En cas de signaux positifs dans les canaux de détection de l'agent pathogène, le signal du contrôle interne n'est pas nécessaire pour l'interprétation du test. Une charge élevée d'agents pathogènes dans l'échantillon du patient peut entraîner un signal réduit ou manquant pour le contrôle interne.

## 10 Limites de la méthode et restrictions

- Les résultats du test doivent toujours être interprétés en tenant compte du tableau clinique. Le résultat doit être mis en balance avec les données cliniques pour décider du traitement approprié.
- Un résultat négatif pour *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et/ou *Mycoplasma genitalium* ne permet pas d'exclure une infection par l'agent pathogène respectif.

## 11 Caractéristiques

### 11.1 Sensibilité et spécificité diagnostiques

La sensibilité et la spécificité ont été déterminées à l'aide d'échantillons définis positifs et négatifs.

**Tableau 1:** Échantillons définis positifs

ampliCube STD Panel 1	<i>Chlamydia trachomatis</i> (n=10)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (n=11)	<i>Mycoplasma genitalium</i> (n=10)
Négatif	0	0	0
Positif	10	11	10
<b>Sensibilité</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>

**Tableau 2:** Échantillons définis négatifs

ampliCube STD Panel 1	<i>Chlamydia trachomatis</i> (n=50)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (n=49)	<i>Mycoplasma genitalium</i> (n=50)
Négatif	50	49	50
Positif	0	0	0
<b>Spécificité</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>

### 11.2 Sensibilité analytique

Le seuil de détection (LoD) de l'ampliCube STD Panel 1 a été déterminé avec des séries de dilution d'ADN plasmidique de concentration connue sur un système LightCycler® 480 II (Roche). Le seuil de détection à 95% a été déterminé au moyen de l'analyse probit avec le logiciel CombiStats™ version 5.0 (Council of Europe).

**Tableau 3:** Seuil de détection (LoD)

	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<b>LoD</b>			
Seuil de détection à 95% du génome/PCR	16,00 (9,41 – 39,39)	11,29 (7,09 – 25,70)	11,97 (7,10 – 28,31)

### 11.3 Spécificité analytique

La recherche BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)) montre que les amorces et sondes sélectionnées de l'ampliCube STD Panel 1 détectent spécifiquement les agents pathogènes sélectionnés.

De plus, la spécificité a été déterminée en analysant l'ADN/ARN génomique d'autres bactéries et virus pathogènes chez l'homme.

**Tableau 4:** Bactéries et virus testés pour démontrer la spécificité analytique de l'ampliCube STD Panel 1.

Bactéries	Virus
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Adénovirus A
<i>Bordetella pertussis</i>	Adénovirus de sérotype 1 (C)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Adénovirus de sérotype 3 (B)
<i>Campylobacter coli</i>	Astrovirus
<i>Citrobacter freundii</i>	Coronavirus 229E
<i>Clostridium difficile</i>	Coronavirus NL63
<i>Clostridium perfringens</i>	Coronavirus OC43
ECEH stx+	Cytomégalo virus
ECEI	Entérovirus 68
<i>Enterococcus faecalis</i>	Virus d'Epstein-Barr
ECET	Virus Herpes simplex 1
<i>Haemophilus influenzae</i>	Virus Herpes simplex 2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Métapneumovirus A humain
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Influenzavirus A
<i>Legionella pneumophila</i>	Influenzavirus B
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Virus de la rougeole
<i>Morganella morganii</i>	Virus des oreillons
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Norovirus G1
<i>Neisseria cinerea</i>	Norovirus G2
<i>Proteus mirabilis</i>	Parainfluenza 1
<i>Proteus vulgaris</i>	Parvovirus B19
<i>Salmonella typhimurium</i>	VRS A
	VRS B
	Rotavirus
	Virus varicelle-zona

Aucun de ces échantillons n'a présenté un signal positif. Les amorces et sondes utilisées dans l'ampliCube STD Panel 1 n'ont pas présenté de réactions croisées avec les agents pathogènes énumérés dans le tableau 4. Le contrôle interne (IC) était valide dans tous les tests.

## 12 Bibliographie

- Chan PA, Robinette A, Montgomery M, Almonte A, Cu-Uvin S, Lonks JR, Chapin KC, Kojic EM, Hardy EJ. Extragenital Infections Caused by Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae: A Review of the Literature. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2016; 2016:5758387. doi: 10.1155/2016/5758387. Epub 2016 Jun 5. Review. PubMed PMID: 27366021; PubMed Central PMCID: PMC4913006.
- Daley GM, Russell DB, Tabrizi SN, McBride J. Mycoplasma genitalium: a review. *Int J STD AIDS.* 2014 Jun;25(7):475-87. doi: 10.1177/0956462413515196. Epub 2014 Feb 11. Review. PubMed PMID: 24517928.
- Hill SA, Masters TL, Wachter J. Gonorrhoea - an evolving disease of the new millennium. *Microb Cell.* 2016 Sep 5;3(9):371-389. doi: 10.15698/mic2016.09.524. Review. PubMed PMID: 28357376; PubMed Central PMCID: PMC5354566.
- Moi H, Blee K, Horner PJ. Management of non-gonococcal urethritis. *BMC Infect Dis.* 2015 Jul 29;15:294. doi: 10.1186/s12879-015-1043-4. Review. PubMed PMID: 26220178; PubMed Central PMCID: PMC4518518.
- Munoz JL, Goje OJ. Mycoplasma genitalium: An Emerging Sexually Transmitted Infection. *Scientifica (Cairo).* 2016;2016:7537318. doi: 10.1155/2016/7537318. Epub 2016 Feb 29. Review. PubMed PMID: 27034904; PubMed Central PMCID: PMC4789526.
- O'Connell CM, Ferone ME. Chlamydia trachomatis Genital Infections. *Microb Cell.* 2016 Sep 5;3(9):390-403. doi: 10.15698/mic2016.09.525. Review. PubMed PMID: 28357377; PubMed Central PMCID: PMC5354567.
- Tsevat DG, Wiesenfeld HC, Parks C, Peipert JF. Sexually transmitted diseases and infertility. *Am J Obstet Gynecol.* 2017 Jan;216(1):1-9. doi: 10.1016/j.ajog.2016.08.008. Review. PubMed PMID: 28007229; PubMed Central PMCID: PMC5193130

Nous vous enverrons volontiers une bibliographie plus complète sur simple demande.

## 13 Description des symboles

	Contient suffisamment de réactifs pour <n> tests Nombre de tests
	Mélange amorce-échantillon
	Mélange d'enzymes
	Contrôle interne
	Contrôle positif
	Contrôle négatif
	Notice d'utilisation
	Consulter la notice d'utilisation
	Contenu
	Diagnostic in vitro
	Numéro de lot/version
	Numéro de commande
	Utiliser jusqu'au Date de péremption
	Conserver entre x °C et y °C
	Fabricant

#### 14 Données sur le fabricant et la version

<b>ampliCube STD Panel 1</b>	Référence <b>50301</b>
<b>Notice d'utilisation</b> valide à partir de	GAACSD1003FR 2023-04
 <b>MIKROGEN GmbH</b> Anna-Sigmund-Str. 10 82061 Neuried Allemagne Tél. +49 89 54801-0 Fax +49 89 54801-100 E-mail mikrogen@mikrogen.de Internet www.mikrogen.de	
	 <b>0483</b>



GAACSD1003