

IVD

Notice d'utilisation (français)

1 Utilisation prévue

L'ampliCube STD Panel 2.1 LC est un test in vitro qualitatif pour la détection spécifique de l'ADN de *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* et *Ureaplasma parvum* (ainsi que leur différenciation) dans des échantillons d'urine (de préférence d'urine du premier jet) ou de frottis urogénitaux d'origine humaine.

Ne pas utiliser sur un instrument LightCycler® 480 II (Roche). Ce test n'est pas destiné à être réalisé sur d'autres thermocycleurs PCR en temps réel.

2 Domaine d'application

Trichomonas vaginalis est un protozoaire anaérobie parasite, appartenant à la famille des Trichomonas et transmis essentiellement par les rapports sexuels. Chez l'homme, la maladie est le plus souvent asymptomatique, mais une urétrite est possible. Chez la femme, les symptômes sont une inflammation des muqueuses des organes génitaux (colpite à *Trichomonas*). Ici aussi une atteinte de l'urètre peut survenir et entraîner une inflammation.

Les bactéries *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* et *Ureaplasma parvum* appartiennent à la famille des mycoplasmes. L'infection à mycoplasmes est une maladie sexuellement transmissible, fréquente et très contagieuse. Ces agents pathogènes colonisent souvent les organes génitaux sans porter atteinte à l'hôte, mais ils peuvent parfois provoquer des inflammations locales. Les symptômes varient en fonction de la localisation de l'inflammation (uretère, vessie, prostate, reins, bassin, vagin, trompes, ovaires). Les symptômes les plus fréquents sont une augmentation du besoin d'uriner, des brûlures mictionnelles, un écoulement jaunâtre (urétrite) et des douleurs dans la région rénale. Chez l'homme, *U. urealyticum* est l'agent pathogène responsable des urétrites et des prostatites non gonorrhéiques.

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 d'ADN de *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* et *Ureaplasma parvum*. 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. Cet 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. L'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 (*Trichomonas vaginalis*), HEX (*Mycoplasma hominis*), ATTO Rho12 (*Ureaplasma urealyticum*) et Cyan 500 (*Ureaplasma parvum*) 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 :

P&P MIX	150 µl de mélange Primer & Probe pour <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Ureaplasma parvum</i> et contrôle interne (couvercle vert)
ENZYME	600 µl de mélange d'enzymes (couvercle blanc) Contient de l'ADN-polymérase. (Le composant est coloré en bleu.)
CONTROL INT	250 µl de contrôle interne (couvercle incolore)
CONTROL +	170 µl de contrôle positif (couvercle rouge)
CONTROL -	2x 1800 µl de contrôle négatif (couvercle bleu)

INSTRU	1 notice d'utilisation
---------------	------------------------

4.2 Réactifs, matériel et appareils supplémentaires requis

- MIKROGEN ampliCube Color Compensation (LightCycler® 480, 5-Plex, réf. 50502)
- Extraction d'acides nucléiques : les systèmes d'extraction des acides nucléiques suivants sont recommandés : système MagNA Pure®, kit Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche) ou kit alphaClean Mag RNA/DNA Kit (MIKROGEN) avec traitement sur un extracteur M32, M48 ou M96 (Biocomma)
- Cycleur en temps réel : instrument LightCycler® 480 II (Roche)
- Plaques de PCR à 96 puits et films : tenir compte des recommandations du fabricant de cycleur de PCR en temps réel
- Micropipettes avec embouts jetables à filtre 10 µl, 20 µl, 100 µl et 1000 µl
- Mélangeur à vortex à haute vitesse de rotation (recommandée : 3200 t/min)
- Minicentrifugeuse
- Centrifugeuse pour plaques
- Gants à usage unique, non poudrés
- 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 à +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 (vortexer 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 et préparation des échantillons

Le produit de départ pour l'ampliCube STD Panel 2.1 LC est l'ADN extrait d'échantillons d'urine (de préférence d'urine du premier jet) ou de frottis urogénitaux 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

Procéder 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 ou 100 µl selon le système d'extraction. Suivre les instructions du fabricant du kit d'extraction.

- Décongeler le contrôle interne (IC) (couvercle incolore) et le contrôle négatif (NC) (couvercle bleu).
S'assurer que l'IC et le NC sont complètement décongelés. Avant l'emploi, mélanger brièvement l'IC et le NC au vortex et par centrifugation !
- Lors de l'extraction, ajouter 5 µl d'IC à chaque échantillon du patient et au NC. L'IC doit être ajouté au mélange tampon de lyse de l'échantillon et non directement aux échantillons.
- Procéder 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.

Les systèmes d'extraction des acides nucléiques suivants ont été utilisés pour l'évaluation de la performance :

Système d'extraction	Volume d'échantillon	Volume d'éluat
MagNA Pure® 24 (Roche) Total NA Isolation Kit	200 µl	50 µl
Systèmes d'extraction d'acides nucléiques M96 (biocomma) Kit <i>alpha</i> Clean Mag RNA/DNA Kit (MIKROGEN)	200 µl	100 µl
Systèmes d'extraction d'acides nucléiques M32 (biocomma) Kit <i>alpha</i> Clean Mag RNA/DNA Kit (MIKROGEN)	200 µl	100 µl

Si l'utilisateur désire utiliser des méthodes d'extraction autres que celles indiquées au point 4.2 et pour l'évaluation de la performance, il lui est recommandé de contacter le fabricant afin de s'assurer de la compatibilité.

7.3 Préparation du mastermix

- Décongeler le mélange Primer & Probe (couvercle vert) et le mélange d'enzymes (couvercle blanc), en les protégeant de la lumière.
S'assurer que les réactifs sont complètement décongelés. Avant l'emploi, mélanger les réactifs au vortex et centrifuger brièvement !
- Préparer le mastermix selon le schéma de pipetage suivant :

Composants	Mastermix pour 1 réaction
Mélange Primer & Probe	3 µl
Mélange d'enzymes	12 µl
Volume total	15 µl

- Mélanger le mastermix complet au vortex et centrifuger brièvement.
- Utiliser 15 µl de mastermix pour chaque réaction de PCR.

7.4 Préparation de la réaction de PCR

- Décongeler le contrôle positif (PC) (couvercle rouge).
S'assurer que les réactifs sont complètement décongelés. Avant l'emploi, mélanger les réactifs au vortex et centrifuger brièvement !

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

- Pipeter 10 µl de chaque éluat d'échantillon dans 15 µl de mastermix.
- Pipeter 10 µl de contrôle positif (non préparé) dans 15 µl de mastermix.
- Pipeter 10 µl d'éluat du contrôle négatif dans 15 µl de mastermix.

Chaque test doit contenir un contrôle positif et un contrôle négatif !

Fermer la plaque PCR avec un film adhésif optique.



Les plaques PCR doivent être passés au vortex pendant **au moins 5 secondes** à vitesse maximale, puis centrifugés brièvement.

8 Programmation du thermocycleur en temps réel

L'*ampli*Cube STD Panel 2.1 LC a été évalué avec le LightCycler® 480 Instrument II (Roche) et uniquement développé pour être traité sur un LightCycler® 480 Instrument II (Roche).

8.1 Réglage des canaux de détection

	<i>Ureaplasma parvum</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Contrôle interne (IC)
Couleur	bleu	vert	jaune	orange	rouge
Fluorochrome émetteur	Cyan 500	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Stimulation	440 nm	465 nm	533 nm	533 nm	618 nm
Émission	488 nm	510 nm	580 nm	610 nm	660 nm
Fluorochrome suppresseur	[aucun]	[aucun]	[aucun]	[aucun]	[aucun]

Les indications concernant les longueurs d'ondes des canaux de détection se rapportent au LightCycler® 480 Instrument II (Roche). Avec le LightCycler® 480 Instrument II (Roche), il est nécessaire d'exécuter auparavant une compensation de couleur (5-Plax, réf. 50502) avec le kit mis à disposition par MIKROGEN.

8.2 Programme PCR

Transcription inverse	50°C	8 min
Dénaturation	95°C	3 min
Amplification	45 cycles	
• Dénaturation	95°C	10 s
• Hybridation/Élongation	60°C	45 s

Les informations de base sur la programmation du LightCycler® 480 Instrument II (Roche) figurent dans le mode d'emploi du thermocycleur. Pour les informations spéciales sur la programmation du thermocycleur PCR en temps réel lors de l'utilisation de l'*ampli*Cube STD Panel 2.1 LC, veuillez contacter le fabricant.

9 Résultats

9.1 Validation

- Le contrôle négatif doit se situer en dessous du *Threshold*. Le contrôle interne (IC) doit présenter une courbe positive dans le contrôle négatif. Si le contrôle négatif présente une courbe positive (contamination) ou si l'IC dans le contrôle négatif n'est pas valide, le test n'est pas évaluable.
- Le contrôle positif 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 (IC) doit présenter une courbe positive pour les échantillons négatifs. Le signal de l'IC d'un échantillon de patient doit être comparé avec le signal de l'IC dans le contrôle négatif extrait. Une différence de > +3 pour la valeur Ct de l'IC d'un échantillon comparativement à celle de l'IC du contrôle négatif ou l'absence de signal de l'IC dans l'échantillon peuvent indiquer l'existence d'une inhibition significative de la réaction de PCR. Dans ces cas, un résultat négatif du test n'est pas valide.

9.2 Évaluation

Les données peuvent être évaluées avec le logiciel du thermocycleur PCR correspondant ou avec une solution logicielle spéciale soutenue par MIKROGEN pour l'évaluation automatisée de la PCR et l'interprétation. En cas d'utilisation d'un système LightCycler® 480 Instrument II, l'analyse peut se faire selon la méthode *Abs Quant/2nd Derivative Max* (recommandée) ou la méthode *Abs Quant/Fit Points*. Contacter MIKROGEN pour obtenir de plus amples informations et connaître les instructions correspondantes.

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

Couleur	<i>Ureaplasma parvum</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Contrôle interne (IC)
bleu	positif				
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 le *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* ou *Ureaplasma parvum* 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 cliniques définis positifs

ampliCube STD Panel 2.1 LC	<i>Trichomonas vaginalis</i> (n=33)	<i>Mycoplasma hominis</i> (n=5)	<i>Ureaplasma urealyticum</i> (n=6)	<i>Ureaplasma parvum</i> (n=19)
Négatif	0	0	0	0
Positif	33	5	6	19
Sensibilité [%]	100	100	100	100
IC à 95 %* [%]	89,57 – 100	56,55 – 100	60,97 – 100	83,18 – 100

* IC = intervalle de confiance

Tableau 2 : Échantillons cliniques définis négatifs

ampliCube STD Panel 2.1 LC	<i>Trichomonas vaginalis</i> (n=66)	<i>Mycoplasma hominis</i> (n=66)	<i>Ureaplasma urealyticum</i> (n=66)	<i>Ureaplasma parvum</i> (n=66)
Négatif	66	66	66	66
Positif	0	0	0	0
Spécificité [%]	100	100	100	100
IC à 95 %* [%]	94,50 – 100	94,50 – 100	94,50 – 100	94,50 – 100

* IC = intervalle de confiance

11.2 Sensibilité analytique

Le seuil de détection (LoD) de l'ampliCube STD Panel 2.1 LC a été déterminé avec des séries de dilution d'ADN génomique purifié (standard Vircell) de concentration connue sur le système LightCycler® 480 Instrument II (Roche). Le seuil de détection à 95 % a été déterminé au moyen de l'analyse de régression probit avec le logiciel CombiStats™ version 6.0 (Conseil de l'Europe).

Tableau 3: Seuil de détection (LoD)

	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>
LoD Seuil de détection à 95 % [copies/PCR]	6,41	15,50	5,64	8,90
IC à 95 %* [copies/PCR]	2,90 – 25,28	9,53 – 37,67	3,28 – 18,69	4,80 – 27,51

* IC = intervalle de confiance

11.3 Spécificité analytique

La recherche BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) a démontré que les amorces et sondes sélectionnées de l'ampliCube STD Panel 2.1 LC 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'être humain.

Tableau 4 : Bactéries et virus testés pour démontrer la spécificité analytique de l'ampliCube STD Panel 2.1 LC.

Bactéries	Virus
<i>Aerococcus urinae</i>	Adénovirus
<i>Campylobacter coli</i>	Cytomégalovirus
<i>Campylobacter jejuni</i>	Virus Herpes simplex 1
<i>Candida albicans</i>	Virus Herpes simplex 2
<i>Candida glabrata</i>	Virus des oreillons
<i>Candida krusei</i>	Virus varicelle-zona
<i>Candida parapsilosis</i>	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	
<i>Citrobacter freundii</i>	
<i>Clostridium difficile</i>	
<i>Clostridium perfringens</i>	
ECEH stx+	
<i>Enterococcus faecalis</i>	
<i>Mycoplasma genitalium</i>	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	
<i>Proteus mirabilis</i>	
<i>Proteus vulgaris</i>	
<i>Providencia stuarti</i>	
<i>Treponema pallidum</i>	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	

Aucun de ces échantillons n'a présenté un signal positif. Les amorces et sondes utilisées dans l'ampliCube STD Panel 2.1 LC 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.

11.4 Équivalence de différents échantillons

Le coefficient de variation (CV) de la valeur Ct entre l'eau et l'extrait de l'échantillon respectif a été déterminé après ajout d'ADN génomique purifié (standard Vircell) de concentration connue.

Tableau 5 : Équivalence de différents échantillons

	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>
CV [%] (urine, H ₂ O)	0,57	0,95	1,24	0,75
CV [%] (frottis, H ₂ O)	0,73	1,11	1,32	0,81

Le coefficient de variation (CV), basé sur la valeur Ct (*cycle threshold*) entre l'eau et les extraits d'ADN (obtenus à partir de différents échantillons), était ≤ 1,32 % pour tous les gènes cibles.






12 Bibliographie

- M. Biernat-Sudolska et al. (2006): Assessment of various diagnostic methods of ureaplasma respiratory tract infections in newborns. Acta Biochimica Polonica, October 2006; Vol 53 No.3/2006 pp: 609-612
- M. Bradic et al (2017): Genetic indicators of drug resistance in the highly repetitive genomes of *Trichomonas vaginalis* and other trichomonads. Genome Biol Evol. 2017 Jun; 9(6): pp: 1658–1672
- R. L Dunne et al (2003): Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. Cell Research (2003); 13(4): pp: 239-249
- T. Edwards et al (2014): *Trichomonas vaginalis*: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis. Crit Rev Microbiol, Early Online: 1–12
- M. Hobbs et al (2013): Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection.
- C. Huang et al (2015): *Mycoplasma* and *ureaplasma* infection and male infertility: a systematic review and meta-analysis, Andrology 3.5, pp: 809-816
- R. D. Kirkcaldy et al (2012): *Trichomonas vaginalis* Antimicrobial Drug Resistance in 6 US Cities, STD Surveillance Network, 2009–2010. Emerging Infectious Diseases Vol. 18, No. 6, June 2012, pp: 939-943
- B. Larsen et al (2010): *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, and Adverse Pregnancy Outcomes: A Fresh Look. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology, Volume 2010, Article ID 521921, pp: 1-7


9. H. Moi et al (2015): Management of non-gonococcal urethritis, BMC infectious diseases 15.1, pp: 1-7
10. T. E. Paulish-Miller et al (2014): *Trichomonas vaginalis* Metronidazole Resistance Is Associated with
11. Sex Transm Infect. 2013 September; 89(6): pp: 434–438
12. Single Nucleotide Polymorphisms in the Nitroreductase Genes *ntr4Tv* and *ntr6Tv*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy p. 2938–2943 May 2014 Volume 58 Number 5
13. J. R. Schwebke et al (2004): Trichomoniasis. Clinical Microbiology Reviews, Oct. 2004, pp. 794–803
14. D. Shey Nsagha et al (2015): The Epidemiology of *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis* and *Candida albicans* Co- Infections in Women Attending the Yaounde University Teaching Hospital. American Journal of Epidemiology and Infectious Disease, 2015, Vol. 3, No. 2, pp: 28-31

Nous enverrons volontiers à l'utilisateur une bibliographie plus complète sur simple demande.

13 Description des symboles

	Contient suffisamment de réactifs pour <n> tests Nombre de tests
P&P MIX	Mélange Primer & Probe
ENZYME	Mélange d'enzymes
CONTROL INT	Contrôle interne
CONTROL +	Contrôle positif
CONTROL -	Contrôle négatif
INSTRU	Notice d'utilisation
	Consulter la notice d'utilisation
CONT	Contenu
IVD	Diagnostic <i>in vitro</i>
LOT	Numéro de lot/version
REF	Numéro de référence
	Utiliser jusqu'au Date de péremption
	Conserver entre x °C et y °C
	Fabricant

14 Informations sur le fabricant et la version

ampliCube STD Panel 2.1 LC		Référence 50312
Notice d'utilisation valide à partir de		GAACSD21L2FR 2023-04
	MIKROGEN GmbH 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	
		CE



GAACSD21L2