

## RIDA® GENE CAP Bac

**REF** PG2705



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Allemagne  
Téléphone : +49 (0) 61 51 81 02-0, Fax : +49 (0) 61 51 81 02-20



## 1. Application

Pour le diagnostic *in vitro*. Le test RIDA®GENE CAP Bac est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe et la différenciation de *Chlamydophila pneumoniae* (*Chlamydia pneumoniae*), *Legionella pneumophila* et *Mycoplasma pneumoniae* dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) humain.

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE CAP Bac est destiné à faciliter le diagnostic des pneumonies communautaires (PC) provoquées par *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* ou *Mycoplasma pneumoniae*.

## 2. Résumé et explication du test

La pneumonie communautaire (PC) est la maladie infectieuse la plus souvent signalée dans le monde entier et, dans les pays occidentaux, est la maladie infectieuse qui occasionne le plus de décès. En Allemagne, on dénombre jusqu'à 600 000 cas de PC par an, et la mortalité varie de 0,6 % à 14 % selon que la PC touche des patients hospitalisés ou en ambulatoire<sup>1</sup>. Les bactéries sont les agents pathogènes les plus fréquents dans la PC et la distinction s'opère entre agents pathogènes typiques et atypiques. Les bactéries atypiques ne peuvent pas être cultivées dans une culture habituelle de crachats ou de sang et ne sont pas visibles par coloration Gram. Cela complique la détection des bactéries de PC atypiques étant donné que les méthodes standard ne permettent pas généralement de les identifier. Les bactéries de PC atypiques les plus fréquentes sont notamment *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*), *Legionella* spp. et *Chlamydophila pneumoniae* (*C. pneumoniae*)<sup>2</sup>.

Jusqu'à 20 % des pneumonies touchant des patients en ambulatoire sont provoquées par *M. pneumoniae*,<sup>3</sup> qui est une bactérie très infectieuse dépourvue de paroi cellulaire et qui se transmet essentiellement par voie aérienne par des gouttelettes ou par un contact direct ou indirect. *M. pneumoniae* ne fait pas partie de la flore habituelle de l'humain et est généralement détectée chez les enfants et les jeunes adultes. La pneumonie se développe dans 5 à 25 % des cas par des infections par *M. pneumoniae* et nécessite généralement une antibiothérapie<sup>4</sup>. *Chlamydophila pneumoniae* est une bactérie à Gram négatif qui se transmet généralement par voie aérienne<sup>5</sup>. Une infection par *C. pneumoniae* est souvent difficile à soigner, mais sans gravité<sup>5,6</sup>. On estime que le taux de prévalence de *C. pneumoniae* varie de 50 à 70 % et que 60 % de la population aura subi une infection par *C. pneumoniae* à l'âge de 20 ans. Dans les cas graves, elle peut évoluer en pneumonie atypique. En Allemagne, on estime que jusqu'à 5 % du nombre de PC sont occasionnées par *C. pneumoniae*<sup>1,5</sup>. La bactérie peut vivre dans les voies respiratoires supérieures pendant de nombreuses années, ce qui fait que le danger d'infection peut persister pendant longtemps. Les méthodes de détection classiques des antigènes comme ELISA présentent une faible spécificité et ne peuvent être utilisées qu'après plusieurs semaines d'infection aiguë. La PCR

peut détecter l'agent pathogène de manière fiable à partir d'échantillons ou de tissus du système respiratoire<sup>5</sup>.

La souche de *Legionella*, qui appartient à la famille des *Legionellaceae*, se divise en 40 espèces et plus de 70 sérogroupes. La bactérie *Legionella* fait partie des bactéries intracellulaires facultatives à Gram négatif dont le pic d'infection est atteint en été et au début de l'automne. Dans le cas de la légionellose, on distingue les infections communautaires, les infections dues à un déplacement et les infections nosocomiales. Aux États-Unis, le taux de mortalité liée aux infections nosocomiales varie de 15 à 20 %. En Europe, 12 % des infections par *Legionella* sont mortelles<sup>7</sup>. Toutes les espèces de *Legionella* doivent être considérées comme potentiellement pathogènes pour l'être humain. Cependant, en Europe, la plupart des maladies communautaires sont provoquées par des agents pathogènes du séro groupe 1 de *Legionella pneumophila*. Une infection par *Legionella pneumophila* provoque essentiellement la maladie du légionnaire (aussi appelée légionellose)<sup>8</sup>.

### 3. Principe du test

Le test RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe de *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* et *Mycoplasma pneumoniae* dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) humain.

Après isolement de l'ADN, on procède à l'amplification des fragments de gène (si présents) spécifiques à *Chlamydophila pneumoniae* (ARNr-16S), *Legionella pneumophila* (ARNr-16S) et *Mycoplasma pneumoniae* (IGS). Les séquences cibles amplifiées sont détectées à l'aide de sondes d'hydrolyse qui sont fixées à une extrémité à l'extincteur et à l'autre extrémité à un colorant fluorescent indicateur (fluorophore). Les sondes s'hybrident avec les amplicons en présence d'une séquence cible. Pendant l'extension, la **Taq-Polymerase** sépare l'indicateur de l'extincteur. L'indicateur émet un signal de fluorescence qui est détecté par l'unité optique d'un dispositif de PCR en temps réel. Le signal de fluorescence augmente avec la quantité d'amplicons formés. Le test RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac contient un **Internal Control DNA** (ICD) pour contrôler la préparation de l'échantillon et/ou l'éventuelle inhibition de la PCR.

#### 4. Contenu de la trousse

**Tableau 1:** Contenu du paquet (les réactifs fournis dans le kit permettent de réaliser 100 déterminations.)

Code du kit	Réactifs	Quantité		Couleur du couvercle
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	Jaune
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	Rouge
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	Orange
N	No Template Control	1x	450 µl	Blanc
P	Positive Control	1x	200 µl	Bleu

#### 5. Instructions de conservation des réactifs

- Tous les réactifs doivent être conservés à -20 °C et à l'abri de la lumière et, s'ils ne sont pas ouverts, peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Tous les réactifs doivent être soigneusement décongelés avant leur utilisation (par ex., dans un réfrigérateur entre 2 °C et 8 °C).
- Il est possible de congeler/décongeler les produits jusqu'à 20 fois sans altérer la propriété du test (au besoin, créer des aliquotes après la première décongélation et recongeler immédiatement les réactifs).
- Refroidir tous les réactifs pendant la préparation de la PCR (2 °C à 8 °C).

## 6. Autres réactifs et matériel nécessaires

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE CAP Bac peut être utilisé avec les plateformes d'extraction et les instruments de PCR en temps réel suivants :

**Tableau 2:** Matériel nécessaire

Plateformes d'extraction	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Dispositifs de PCR en temps réel	
R-Biopharm	RIDA®CYCLER
Roche	LightCycler® 480II, LightCycler® 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

**Remarque: En cas d'utilisation du Rotor-Gene Q (QIAGEN), utiliser uniquement des flacons de réaction de 0,1 ml.**

Si vous devez utiliser d'autres plateformes d'extraction ou instruments de PCR en temps réel, contactez R-Biopharm à l'adresse [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de) pour en vérifier la compatibilité.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) pour une utilisation avec les instruments LightCycler® 480II et LightCycler® 480 z
- Consommables de PCR en temps réel (plaques, flacons de réaction, films)
- Centrifugeuse avec rotor pour les flacons ou les plaques de réaction
- Agitateur-mélangeur vortex
- Pipettes (0,5 à 20 µl, 20 à 200 µl, 100 à 1 000 µl)
- Pointes pour pipette dotées de filtres
- Gants jetables non poudrés
- Eau de PCR (sans nucléase)

## 7. Mesures de précaution

Exclusivement réservé au diagnostic *in vitro*.

### 7.1 Mesures de précaution d'ordre général

Ce test doit uniquement être réalisé par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux. Lire attentivement le mode d'emploi avant de réaliser des tests et respecter les instructions à la lettre.

Les échantillons biologiques doivent être considérés comme du matériel potentiellement infectieux, de même que tous les réactifs et le matériel exposés à des échantillons potentiellement infectieux et doivent être manipulés et éliminés comme il se doit. Éviter tout contact direct avec des échantillons biologiques. Éviter la formation de jets et de pulvérisations. Tout matériel exposé à des échantillons biologiques doit être éliminé conformément aux réglementations applicables. Les matériaux jetables inflammables doivent être incinérés. Les déchets liquides contenant des acides ou des bases doivent être neutralisés avant leur élimination.

Les utilisateurs sont responsables de l'élimination adéquate de tous les réactifs et matériaux après leur utilisation, conformément aux normes de sécurité en vigueur. Pour la mise au rebut, respecter les règlements nationaux.

Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

Lors de la manipulation des réactifs et des échantillons, porter un équipement de protection individuelle (gants, blouse, lunettes de protection, masque de protection adaptés) et se laver soigneusement les mains à l'issue du test. Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Ne pas fumer, manger, boire, ni utiliser de produits cosmétiques dans les zones de travail. Éviter tout contact avec les plaies et les membranes muqueuses.

Éliminer le kit de test à l'échéance de la date de péremption. Utiliser uniquement les réactifs fournis avec le produit et recommandés par le fabricant. Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres lots. Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants.

## 7.2 Mesures de précaution en biologie moléculaire

Les procédures de biologie moléculaire comme l'extraction d'acides nucléiques, l'amplification et la détection doivent être réalisées par un personnel de laboratoire formé et qualifié pour éviter tout risque de résultats erronés, notamment dus à la dégradation de l'acide nucléique dans les échantillons ou à la contamination des échantillons par les produits de l'amplification.

En cas de traitement manuel, veiller à ce que la préparation/extraction des échantillons, la préparation de la PCR et l'exécution de la PCR soient effectuées dans des salles différentes afin d'éviter toute contamination croisée. Ne jamais faire entrer les produits de l'amplification dans les zones où sont effectuées la préparation/extraction des échantillons et la préparation de la PCR. Chaque zone (préparation/extraction des échantillons, préparation de la PCR, exécution de la PCR) exige l'utilisation de blouses de laboratoire, de gants et d'instruments différents, exclusivement prévus pour la zone en question. Les blouses, gants et instruments de la zone d'exécution de la PCR ne doivent jamais être utilisés dans la zone de préparation/extraction des échantillons ou celle de préparation de la PCR. Les échantillons doivent uniquement être utilisés pour ce type d'analyse et être traités dans un poste de sécurité microbiologique. Ne jamais ouvrir en même temps des flacons d'échantillons différents. Les pipettes utilisées pour la préparation des échantillons doivent uniquement servir à cette fin.

Les réactifs nécessaires doivent être traités sous une hotte à flux laminaire. Les réactifs nécessaires à l'amplification doivent être préparés de façon adaptée à une procédure de test. Les pipettes utilisées pour les réactifs doivent uniquement servir à cette fin. N'utiliser que des pipettes à déplacement positif ou des pipettes avec pointes à filtre. Les pointes de pipette doivent être stériles et exemptes d'ADNase et d'ARNase ainsi que d'ADN et d'ARN.

Pour éviter toute contamination, manipuler les produits de l'amplification de manière à éviter du mieux possible leur propagation dans l'environnement. Les pipettes utilisées pour les produits de l'amplification doivent uniquement servir à cette fin.

## 8. Prélèvement et conservation des échantillons

### 8.1 Préparation de l'ADN à partir d'un lavage broncho-alvéolaire (LBA)

Pour isoler l'ADN à partir d'un LBA, les échantillons utilisés doivent être conservés selon les directives du laboratoire. Ils ne doivent pas être conservés ou transportés pendant plus de 24 heures après le prélèvement. Les échantillons qui ont été transportés et/ou conservés pendant plus de 24 heures doivent être conservés pendant 72 heures maximum entre +2 °C et +8 °C. Les échantillons conservés pendant plus de 72 heures doivent être placés à -70 °C<sup>9</sup>.

Il est recommandé de préparer des aliquotes des échantillons pour éviter des cycles répétés de décongélation/congélation. Les échantillons congelés doivent être décongelés immédiatement avant extraction pour éviter toute dégradation de l'acide nucléique.

Un kit d'extraction d'acides nucléiques commercialisé (par ex., RIDA<sup>®</sup> Xtract [R-Biopharm]) ou un système d'extraction d'acides nucléiques (par ex., Maxwell<sup>®</sup> RSC [Promega]) est recommandé pour la préparation de l'ADN à partir d'un liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA). Il convient de respecter les instructions du fabricant.

Le test RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac comprend un **Internal Control DNA** qui indique une éventuelle inhibition de la PCR, vérifie l'intégrité des réactifs et confirme la réussite de l'extraction d'acides nucléiques. Le **Internal Control DNA** peut être utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition ou comme contrôle de l'extraction pour la préparation des échantillons en plus du contrôle de l'inhibition.

Si le **Internal Control DNA** est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange maître (tableau 4).

Si le **Internal Control DNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la préparation de l'échantillon **et** comme contrôle de l'inhibition, il convient d'en utiliser 20 µl pendant l'extraction. Le **Internal Control DNA** doit toujours être ajouté au mélange spécimen-tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon. Il est recommandé de pipeter 1 µl de **Internal Control DNA** par réaction au mélange pour la PCR pour le contrôle négatif et le contrôle positif.



## 9. Réalisation du test

### 9.1 Préparation du mélange maître

Calculer le nombre total de réactions (échantillons et réactions de contrôle) nécessaires à la PCR. Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus à chaque exécution du test.

Il est recommandé d'ajouter 10 % de volume de mélange maître de plus afin de compenser la perte au pipetage (voir tableaux 3, 4). Décongeler, mélanger et centrifuger brièvement le mélange réactif **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, le contrôle positif **Positive Control**, le contrôle sans matrice **No Template Control** et l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** avant utilisation. Toujours refroidir tous les réactifs pendant les étapes de travail (2 °C à 8 °C).

**Tableau 3:** Exemple de calcul et de production du mélange maître pour 10 réactions (ICD pour extraction et contrôle de l'inhibition)

Code du kit	Composants du mélange maître	Quantité par réaction	10 réactions (plus 10 %)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Total</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Mélanger le mélange maître, puis centrifuger brièvement.

**Tableau 4:** Exemple de calcul et de production du mélange maître pour 10 réactions (ICD uniquement comme contrôle de l'inhibition)

Code du kit	Composants du mélange maître	Quantité par réaction	10 réactions (plus 10 %)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0,7 µl	7,7 µl
D	<b>Internal Control DNA</b>	1,0 µl	11 µl
	<b>Total</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Mélanger le mélange maître, puis centrifuger brièvement.

## 9.2 Préparation du mélange pour la PCR

Pipeter 20 µl du mélange maître dans chaque flacon de réaction (flacon/plaque).

**Contrôle négatif :** Pipeter 5 µl de **No Template Control** dans le mélange maître pré-pipeté.

**Remarque :** Il est recommandé de pipeter 1 µl de **Internal Control DNA** dans le mélange pour PCR pour le contrôle négatif lorsque le **Internal Control DNA** est utilisé pour le contrôle de l'extraction pour la préparation de l'échantillon et pour le contrôle de l'inhibition.

**Échantillons :** Pipeter 5 µl d'éluat dans le mélange maître pré-pipeté.

**Contrôle positif :** Pipeter 5 µl de **Positive Control** dans le mélange maître pré-pipeté.

**Remarque :** Il est recommandé de pipeter 1 µl de **Internal Control DNA** dans le mélange pour PCR pour le contrôle positif lorsque le **Internal Control DNA** est utilisé pour le contrôle de l'extraction pour la préparation de l'échantillon et pour le contrôle de l'inhibition.

Fermer hermétiquement les flacons ou les plaques de réaction, les centrifuger brièvement à faible vitesse et les transférer vers un dispositif de PCR en temps réel. Démarrer la PCR selon les réglages du dispositif (voir tableaux 5, 6, 7 et 8).

## 9.3 Configuration de l'instrument de PCR

### 9.3.1 Profil de PCR en temps réel de l'ADN

**Tableau 5:** Profil de PCR en temps réel de l'ADN pour la série LightCycler® Rotor-Gene Q, RIDA®CYCLER

Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température	Maximale

**Remarque:** L'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

**Tableau 6:** Profil de PCR en temps réel de l'ADN pour Mx3005P, ABI7500 et CFX96™

Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température	Maximale

**Remarque:** L'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

### 9.3.2 Profil universel de PCR en temps réel

**Remarque:** Le profil universel de PCR en temps réel pour les tests d'ADN ne devrait être utilisé que si les tests de PCR en temps réel RIDA®GENE DNA et RIDA®GENE RNA sont combinés dans un même test.

**Tableau 7:** Profil universel de PCR en temps réel pour la série LightCycler® et RIDA®CYCLER

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température	Maximale

**Remarque:** L'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

**Tableau 8:** Profil universel de PCR en temps réel pour Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q et CFX96™

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température	Maximale

**Remarque:** L'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

## 9.4 Réglage du canal de détection

**Tableau 9:** Sélection des canaux de détection adéquats

Dispositif de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Commentaire
R-Biopharm RIDA®CYCLER	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	Vert	-
	ICD	Jaune	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Orange	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Rouge	
Roche LightCycler® 480II	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	465/510	Le kit RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire.
	ICD	533/580	
	<i>Legionella pneumophila</i>	533/610	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	465/510	Le kit RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire.
	ICD	540/580	
	<i>Legionella pneumophila</i>	540/610	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	610/670	
Agilent Technologies Mx3005P	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	FAM	Régler le colorant de référence sur aucun.
	ICD	HEX	
	<i>Legionella pneumophila</i>	ROX	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Cy5	
ABI 7500	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	FAM	Régler le colorant de référence passif ROX sur aucun.
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	ROX	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	ROX	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Cy5	
Qiagen Rotor- Gene Q	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	Vert	Les réglages de gain doivent être définis sur 5 (valeur par défaut) pour tous les canaux.
	ICD	Jaune	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Orange	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Rouge	

## 10. Contrôle qualité

Les échantillons sont évalués à l'aide du logiciel d'analyse du dispositif de PCR en temps réel correspondant conformément aux instructions du fabricant. Le contrôle négatif et le contrôle positif doivent afficher des résultats corrects (voir tableau 10, figures 1, 2 et 3).

Le contrôle positif **Positive Control** a une concentration de  $10^3$  copies/ $\mu$ l. Chaque analyse par PCR utilise une quantité totale de  $5 \times 10^3$  copies.

**Tableau 10:** Pour être valide, une exécution de PCR doit remplir les conditions suivantes :

Échantillon	Résultat	Ct ICD	Gène Ct cible
Contrôle positif	Positif	SO *1	Voir Certificat d'assurance qualité
Contrôle négatif	Négatif	Ct > 20	0

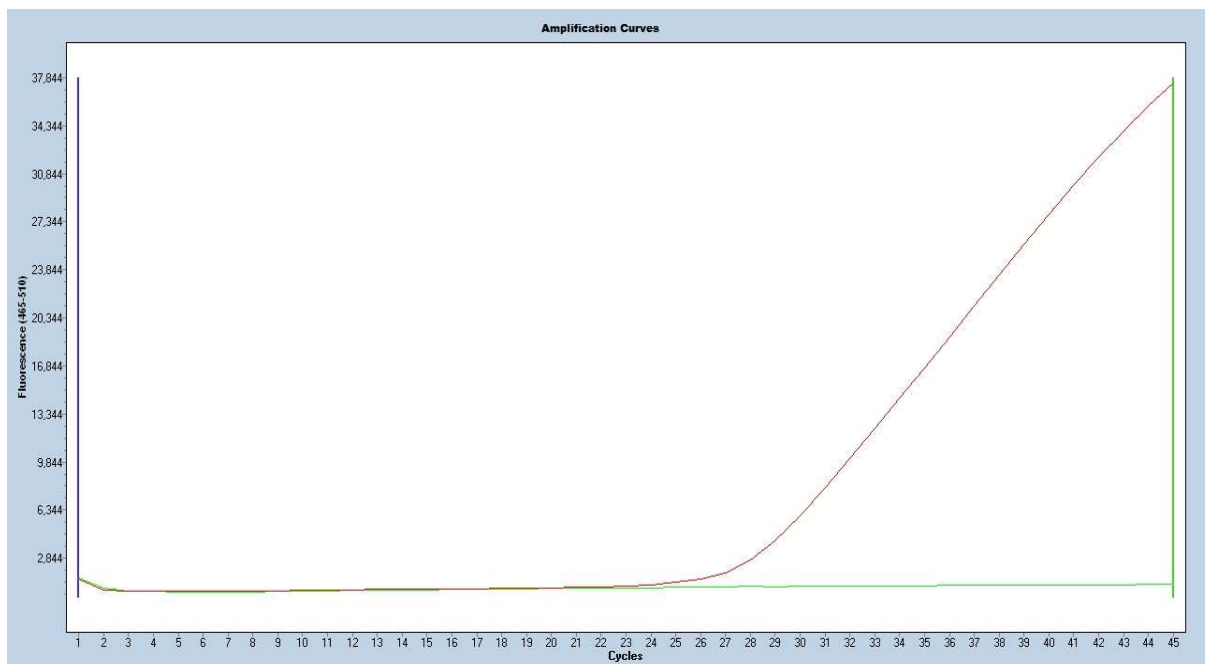
*\*1 Aucune valeur de Ct n'est requise pour que le résultat de l'ICD soit positif pour le contrôle positif.*

Si le contrôle positif n'est pas dans la plage de Ct spécifiée, mais que le contrôle négatif est valide, toutes les réactions doivent être de nouveau analysées, y compris les contrôles.

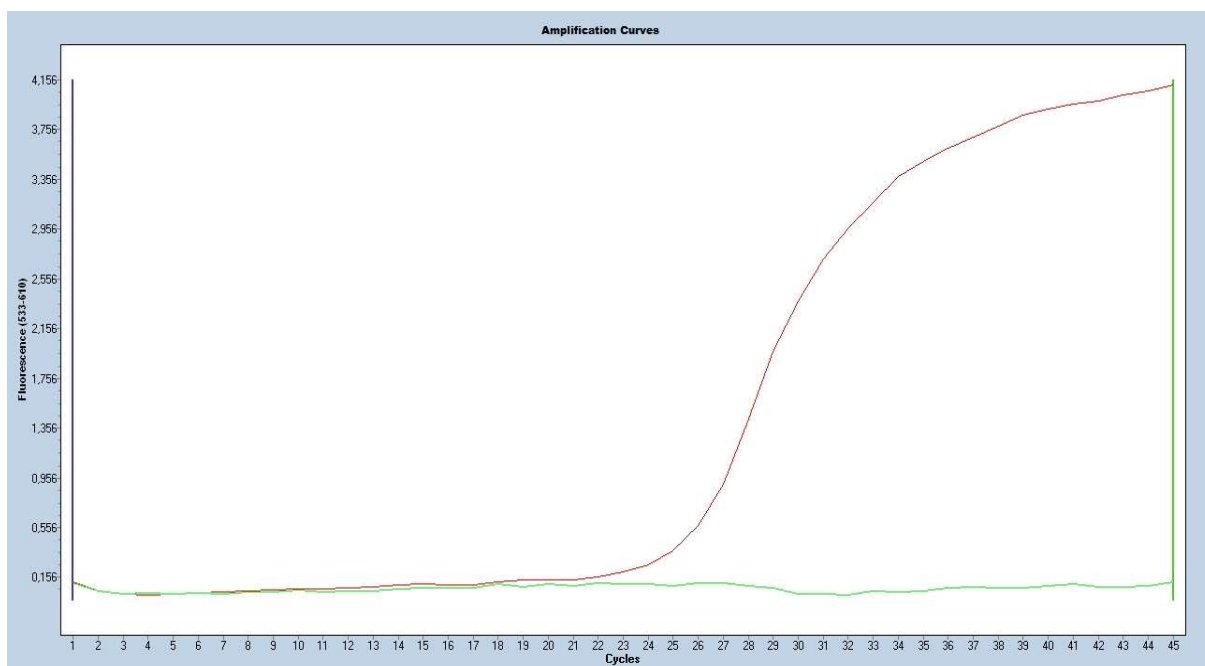
Si le contrôle négatif n'est pas négatif, mais que le contrôle positif est valide, toutes les réactions doivent être de nouveau analysées, y compris les contrôles.

Si les valeurs spécifiées ne sont pas obtenues, vérifier les points suivants avant de renouveler le test :

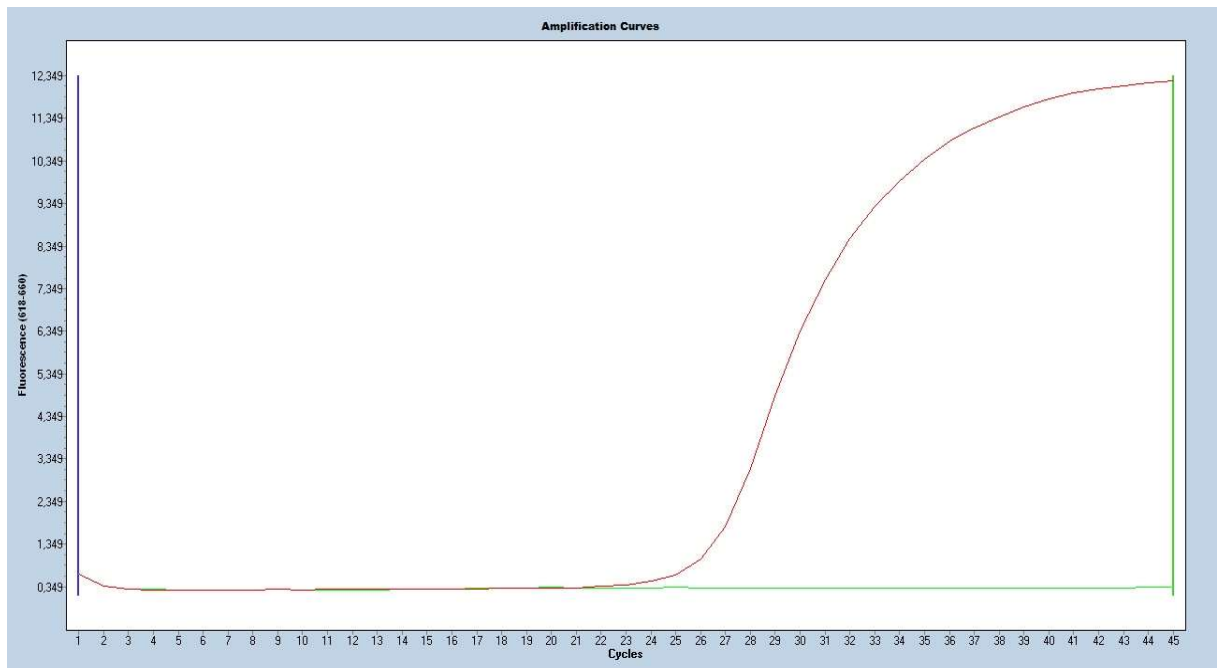
- Date de péremption des réactifs utilisés
- Fonctionnalité des dispositifs utilisés
- Réalisation correcte du test



**Figure 1:** Exécution correcte des contrôles positif (rouge) et négatif (vert) (*Chlamydomonas pneumoniae*) sur le LightCycler® 480II



**Figure 2:** Exécution correcte des contrôles positif (rouge) et négatif (vert) (*Legionella pneumophila*) sur le LightCycler® 480II



**Figure 3:** Exécution correcte des contrôles positif (rouge) et négatif (vert) (*Mycoplasma pneumoniae*) sur le LightCycler® 480II



## 11. Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 11.

**Tableau 11:** Interprétation des échantillons

Détection				
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ICD	Résultat
Positif	Négatif	Négatif	Positif/négatif	<i>C. pneumoniae</i> détectable
Négatif	Positif	Négatif	Positif/négatif	<i>L. pneumophila</i> détectable
Négatif	Négatif	Positif	Positif/négatif	<i>M. pneumoniae</i> détectable
Positif	Positif	Négatif	Positif/négatif	<i>C. pneumoniae</i> et <i>L. pneumophila</i> détectables
Positif	Négatif	Positif	Positif/négatif	<i>C. pneumoniae</i> et <i>M. pneumoniae</i> détectables
Négatif	Positif	Positif	Positif/négatif	<i>L. pneumophila</i> et <i>M. pneumoniae</i> détectables
Positif	Positif	Positif	Positif/négatif	<i>C. pneumoniae</i> , <i>L. pneumophila</i> et <i>M. pneumoniae</i> détectables
Négatif	Négatif	Négatif	Positif	Gènes cibles non détectables
Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Non valide

Un échantillon est estimé positif si l'ADN de l'échantillon et le Internal Control DNA présentent un signal d'amplification dans le système de détection.

Un échantillon est aussi estimé positif si l'ADN de l'échantillon présente un signal d'amplification, mais que le signal d'amplification n'est pas présent dans le système de détection pour le Internal Control DNA. La détection du Internal Control DNA n'est pas indispensable dans ce cas, car les concentrations élevées d'amplicons peuvent provoquer un signal faible ou absent du Internal Control DNA.

Un échantillon est estimé négatif si l'ADN de l'échantillon ne présente aucun signal d'amplification, mais en présente un pour le Internal Control DNA dans le système de détection. Une inhibition de la réaction de PCR peut être exclue par la détection du Internal Control DNA.

Un échantillon est non valide si l'ADN de l'échantillon et le Internal Control DNA ne présentent aucun signal d'amplification dans le système de détection. Des inhibiteurs de la PCR sont présents dans l'échantillon ou une erreur est survenue pendant le

processus d'extraction. L'échantillon extrait doit être dilué à 1/10 avec de l'eau de PCR et de nouveau amplifié, ou il convient d'améliorer l'isolation et la purification de l'échantillon.

## 12. Limites de la méthode

1. Le diagnostic ne doit pas reposer uniquement sur le résultat du test de biologie moléculaire. Il doit toujours tenir compte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
2. Ce test est seulement valide pour le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA).
3. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut empêcher l'évaluation des résultats.
4. Les résultats obtenus avec ce produit dépendent de la qualité de l'identification, de l'extraction, du transport, de la conservation et de la manipulation de l'échantillon. Il est donc crucial d'effectuer ces étapes avec soin et de suivre les instructions fournies par le fabricant des produits d'extraction d'acide nucléique. Un prélèvement, échantillonnage, transport, stockage et traitement incorrects du spécimen ou une charge en agents pathogènes inférieure à la sensibilité analytique du test peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
5. L'utilisation de ce produit implique le port de vêtements appropriés et doit rester confinée à des zones adaptées à la manipulation d'échantillons biologiques potentiellement infectieux et de préparations chimiques classées comme dangereuses afin d'éviter les accidents pouvant entraîner des conséquences graves pour l'utilisateur et d'autres personnes.
6. L'utilisation de ce produit est réservée à un personnel qualifié formé aux procédures de biologie moléculaire telles que l'extraction, l'amplification et la détection d'acides nucléiques. Le respect de cette exigence devrait permettre d'éviter l'obtention de résultats erronés.
7. En cas de traitement manuel, veiller à ce que la préparation/extraction des échantillons, la préparation de la PCR et l'exécution de la PCR soient effectuées dans des salles différentes afin d'éviter la survenue de résultats faux positifs.
8. En cas de traitement manuel, veiller à ce que la préparation/extraction des échantillons, la préparation de la PCR et l'exécution de la PCR soient effectuées avec des vêtements et des instruments différents afin d'éviter l'obtention de résultats faux positifs lors de l'utilisation de ce produit.
9. À l'instar de tous les tests de diagnostic *in vitro* de type PCR, des concentrations extrêmement faibles des séquences cibles sous la limite de détection (LDD) peuvent être détectées, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
10. Des mutations ou polymorphismes au niveau des sites de liaison de l'amorce ou de la sonde peuvent empêcher la détection de nouveaux variants ou de variants inconnus et entraîner des résultats faux négatifs avec le test RIDA®GENE CAP Bac.

11. À l'instar de tous les tests de diagnostic *in vitro* basés sur la PCR, des concentrations extrêmement faibles des séquences cibles sous la limite de détection (LDD) peuvent être détectées, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
12. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Un résultat positif indique que les gènes cibles (*Chlamydophila pneumoniae* (ARNr-16S), *Legionella pneumophila* (ARNr-16S) et *Mycoplasma pneumoniae* (IGS)) sont présents.
13. Les substances paracodéine, ciprofloxacine et guaïfénésine/dextrométhorphanne peuvent manifester des propriétés d'interférence même en petites quantités.

### **13. Performances**

#### **13.1 Performance clinique**

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE CAP Bac a été comparé dans un laboratoire extérieur à la méthode de test de PCR en temps réel spécifique pour l'agent pathogène du laboratoire (analogue aux méthodes de test de PCR agréées selon la norme DIN EN ISO 15189:2007) en utilisant les instruments LightCycler® 480 II et LightCycler® 2.0. Au total, 282 échantillons de rétention d'extraits d'acides nucléiques de matériel respiratoire pour test clinique (LBA) ont été testés. Un résultat non valide a été détecté dans 17 échantillons (6 %) en raison de l'absence de détection de l'ADN de contrôle interne, ce qui indique une détection sensible de résultats d'inhibition par le test RIDA®GENE CAP Bac. Ces échantillons n'ont pas été inclus dans l'évaluation.

Les résultats de chaque agent pathogène sont indiqués dans les tableaux 12 à 14 :

**Tableau 12** : Détection de *Chlamydia pneumoniae* (CP)

		RIDA®GENE CAP Bac – <i>C. pneumoniae</i>		Total
		Positif	Négatif	
En interne CP	Positif	30	0	30
	Négatif	0	235	235
Total		30	235	265

Sensibilité	100,0 %
Spécificité	100,0 %
VPP	100,0 %
VPN	100,0 %

**Tableau 13** : Détection de *Mycoplasma pneumoniae* (MP)

		RIDA®GENE CAP Bac – <i>M. pneumoniae</i>		Total
		Positif	Négatif	
En interne PM	Positif	50	0	50
	Négatif	0	215	215
Total		50	215	265

Sensibilité	100,0 %
Spécificité	100,0 %
VPP	100,0 %
VPN	100,0 %

**Tableau 14** : Détection de *Legionella pneumophila* (LP)

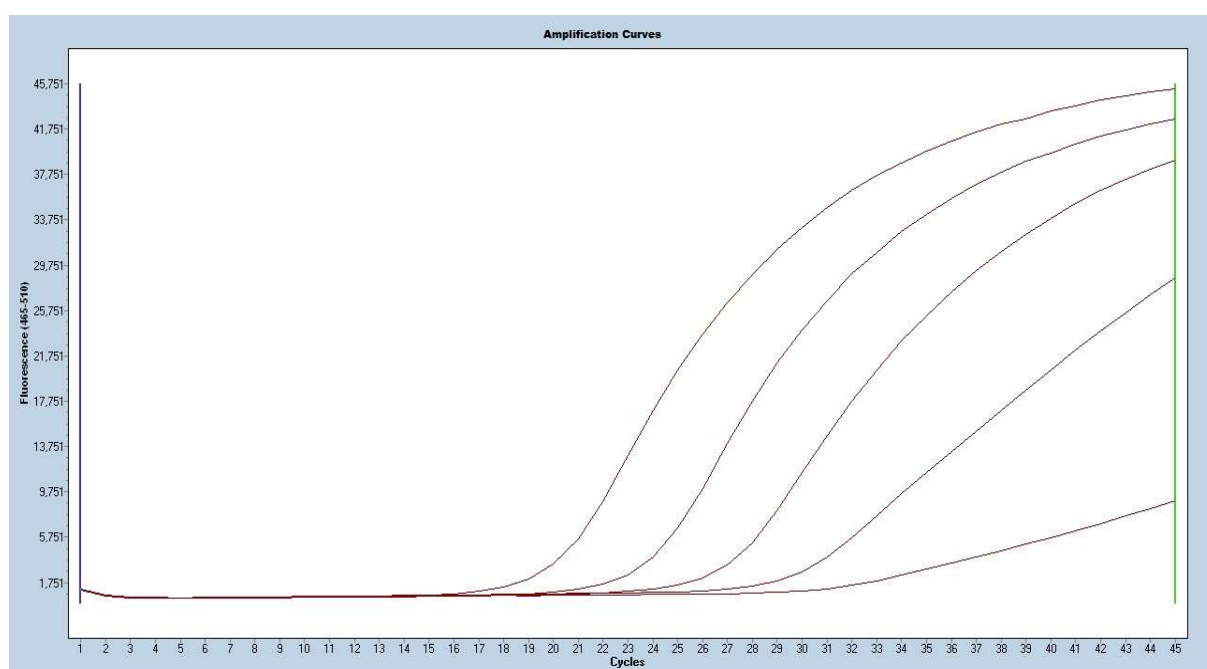
		RIDA®GENE CAP Bac – <i>L. pneumophila</i>		Total
		Positif	Négatif	
En interne PB	Positif	50	0	50
	Négatif	5	210	215
Total		55	210	265

Sensibilité	100,0 %
Spécificité	97,7 %
VPP	90,9 %
VPN	100,0 %

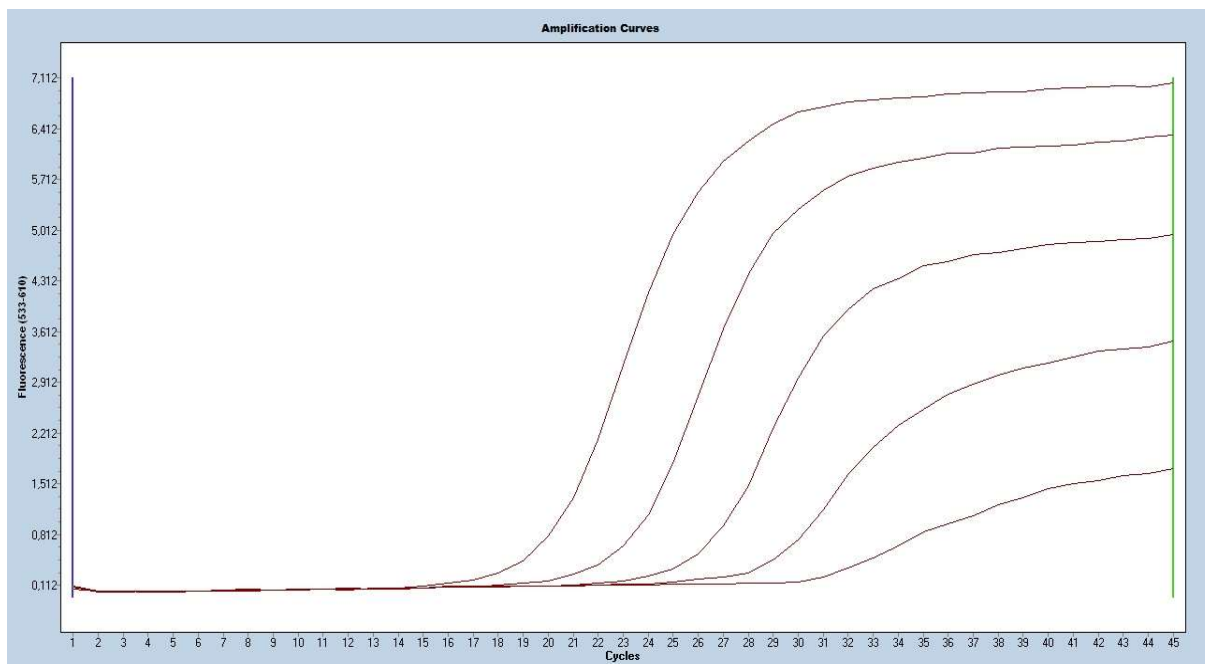
### 13.2 Sensibilité analytique

La limite de détection du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE CAP Bac est  $\geq 50$  copies d'ADN par réaction pour *Chlamydomonas pneumoniae*, *Legionella pneumophila* et *Mycoplasma pneumoniae*.

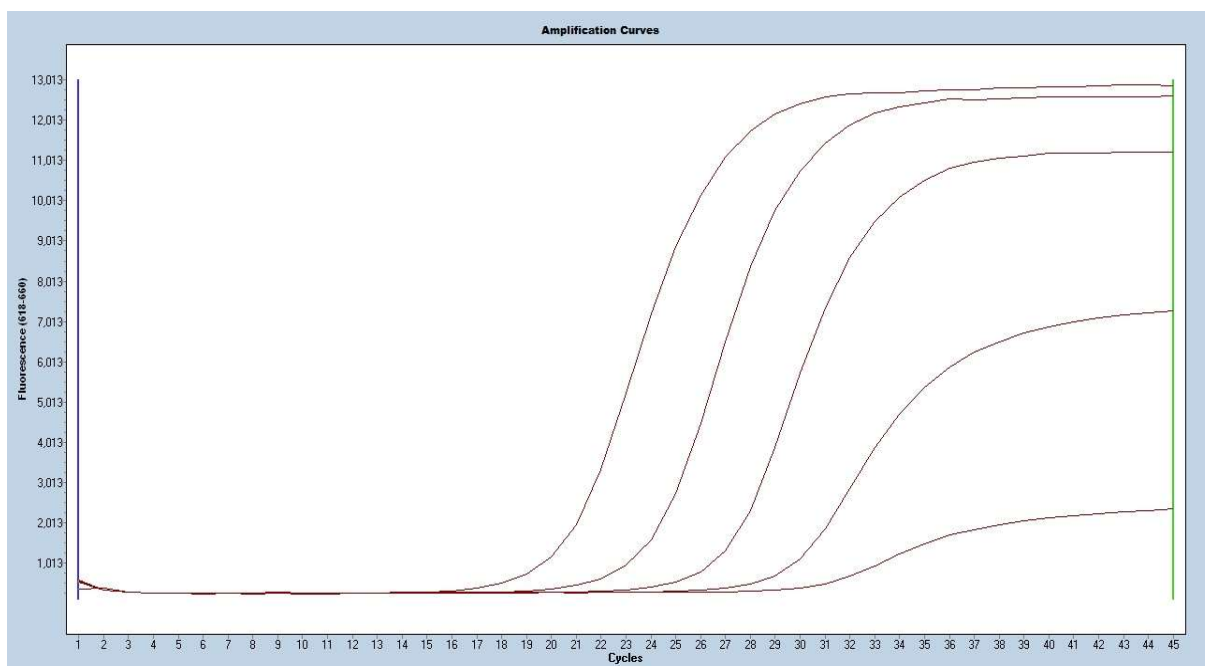
Les figures 4, 5 et 6 ci-dessous montrent une série de dilutions de *Chlamydomonas pneumoniae*, *Legionella pneumophila* et *Mycoplasma pneumoniae* (chacune à  $5 \times 10^5$  à  $10^1$  de copies d'ADN/réaction) avec le LightCycler® 480II.



**Fig. 4:** Série de dilutions de *Chlamydomonas pneumoniae* ( $5 \times 10^5$  à  $10^1$  copies d'ADN/réaction) avec le LightCycler® 480II



**Figure 5:** Série de dilutions de *Legionella pneumophila* ( $5 \times 10^5$  à  $10^1$  copies d'ADN/réaction) avec le LightCycler® 480II



**Figure 6:** Série de dilutions de *Mycoplasma pneumoniae* ( $5 \times 10^5$  à  $10^1$  copies d'ADN/réaction) avec le LightCycler® 480II

La limite de détection de l'ensemble du processus dépend de la matrice de l'échantillon, de l'extraction de l'ADN et de la teneur en ADN.

### 13.3 Spécificité analytique

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE CAP Bac est spécifique à *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* et *Mycoplasma pneumoniae*. Aucune réactivité croisée avec les espèces suivantes n'a été décelée (voir tableau 12) :

**Tableau 15:** Test de la réactivité croisée

Adénovirus 1, humain, souche Adénoïde 71	-	Échovirus 11	-	<i>Mycoplasma hominis</i>	-	Virus influenza B (B/Lee/40)	-
Adénovirus 7, humain, souche Gomen	-	Entérovirus type 71	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	Virus influenza, infectieux A/PR/8/34	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-	Rhinovirus humain, génogroupe A	-	Virus parainfluenza 1, humain, souche C35	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-	Virus parainfluenza 2, humain, souche Greer	-
<i>Chlamydia abortus</i>	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> R22	-	Virus parainfluenza 4b, humain, souche CH19503	-
<i>Chlamydia psittaci</i>	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Virus parainfluenza, sérotype 3	-
Coronavirus 229E, humain	-	Metapneumovirus humain	-	Virus Herpes simplex 1, souche McIntyre	-	Virus respiratoire syncytial, humain, souche 9320	-
Coxsackie B4, humain	-	<i>Mycoplasma fermentans</i>	-	Virus Herpes simplex 2, souche MS	-	Virus respiratoire syncytial, humain, souche Long	-

### 13.4 Réactivité analytique

La réactivité du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE CAP Bac a été examinée en utilisant des sérogroupes de *Legionella pneumophila* (voir tableau 13). Les sérogroupes de *Legionella pneumophila* testés ont été détectés à l'aide du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE CAP Bac.

**Tableau 16:** Test de la réactivité analytique










<i>Legionella pneumophila</i>					
Sérogroupe 1	+	Sérogroupe 6	+	Sérogroupe 11	+
Sérogroupe 2	+	Sérogroupe 7	+	Sérogroupe 12	+
Sérogroupe 3	+	Sérogroupe 8	+	Sérogroupe 13	+
Sérogroupe 4	+	Sérogroupe 9	+	Sérogroupe 14	+
Sérogroupe 5	+	Sérogroupe 10			

### 14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
2019-09-10	Version de la publication

### 15. Signification des symboles

Symboles généraux

	Pour usage diagnostique <i>in vitro</i>
	Respecter le mode d'emploi
	Numéro de lot
	Utiliser avant le
	Température de stockage
	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant



## Symboles spécifiques des tests

Reaction Mix

Taq-Polymerase

Internal Control DNA

No Template Control

Positive Control

## 16. Bibliographie

1. Höffken *et al.* [Epidemiology, diagnosis, antimicrobial therapy and management of community-acquired pneumonia and lower respiratory tract infections in adults. Guidelines of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, the German Respiratory Society, the German Society for Infectiology and the Competence Network CAPNETZ Germany]. *Pneumologie*. 2009; 63:e1-68.
2. Ramirez *et al.* Changing needs of community-acquired pneumonia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011. 66 Suppl 3:iii3-9.
3. Touati *et al.* Evaluation of five commercial real-time PCR assays for Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2009, 2269-2271.
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Mycoplasma pneumoniae* Infections. 2018. <https://www.cdc.gov/pneumonia/atypical/mycoplasma/index.html>. Accessed: 14.08.2019.
5. Robert-Koch-Institut (RKI). RKI-Ratgeber. Chlamydiosen (Teil 2): Erkrankungen durch *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* und *Simkania negevensis*. 2010. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Chlamydiosen\\_Teil2.html#doc2382910bodyText15](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Chlamydiosen_Teil2.html#doc2382910bodyText15). Accessed: 15.08.2019
6. Sharma L. *et al.* Atypical Pneumonia: Updates on Legionella, Chlamydia, and Mycoplasma Pneumonia. *Clin Chest Med*. 2017. 38 (1):45-58.
7. Bartram *et al.* Legionella and the prevention of Legionellosis .2012, World Health Organisation (WHO).
8. Robert-Koch-Institut (RKI). RKI-Ratgeber. Legionellose. 2019. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Legionellose.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Legionellose.html). Accessed: 01.10.2019
9. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for

Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005.