



Mast Group Ltd.
Mast House, Derby Road,
Bootle, Merseyside, L20 1EA
United Kingdom
Tel: + 44 (0) 151 472 1444
Fax: + 44 (0) 151 944 1332
email: sales@mast-group.com
Web: www.mast-group.com



Mast Diagnostica GmbH
Feldstrasse 20
DE-23858 Reinfeld
Germany
Tel: + 49 (0) 4533 2007 0
Fax: + 49 (0) 4533 2007 68
email: mast@mast-diagnostica.de
Web: www.mast-group.com

Mast Diagnostic
12 rue Jean-Jacques Mention
CS91106, 80011 Amiens, CEDEX 1
France
Tél: + 33 (0) 3 22 80 80 67
Fax: + 33 (0) 3 22 80 99 22
email: info@mast-diagnostic.fr
Web: www.mast-group.com



**Mast
Group**

MAST ISOPLEX® *E. coli* O157 kit

DNA/LYO4 20 tests

Pour une utilisation sur thermocycleurs en temps réel avec capacité de détection FAM et TAMRA.

Utilisation

Le kit MAST ISOPLEX® *E. coli* O157 est optimisé pour le typage d'*Escherichia coli* O157 dans les échantillons de selles humains à l'aide de la technique LAMP (loop-mediated isothermal amplification) en utilisant la technologie de sondes MAST ISOPLEX®. Le kit contient les réactifs pour la détection de la Perosamine synthétase (RfbE) exprimée par *E. coli* O157. Les gènes *E. coli* O157 peuvent être détectés simultanément à l'aide de l'essai duplex contenant un contrôle d'inhibition (IC DNA).

Composants du kit

1. Culots LAMP *E. coli* O157 (PEL2) x 2 culots. Bouchon violet.
2. Mélanges de sondes et amorces *E. coli* O157 mélangé avec Inhibition Control DNA (PP2) x 2 tubes. Bouchon bleu.
3. Positive Control DNA (O157). Bouchon marron.
4. Reconstitution Buffer (RB) x 1 tube. Bouchon jaune.
5. Water, molecular grade (WTR) x 1 tube. Bouchon noir.

Conservation

Avant ouverture, conserver le kit entre 2°C et 8°C à l'abri de la lumière directe du soleil jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Une fois reconstitués, tous les réactifs doivent être aliquotés et se conservent à moins 20°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du tube. Conserver tous les autres composants entre 2°C et 8°C à l'abri de la lumière directe du soleil.

Précautions d'emploi

Prendre les précautions nécessaires pour prévenir la contamination des réactifs du kit et des échantillons. Le kit est conçu pour une utilisation uniquement par du personnel qualifié.

Les tubes utilisés pour la réaction doivent être maintenus fermés pendant toutes les étapes après ajout des réactifs. Les tubes usagés doivent être éliminés sans être ouverts après usage, selon les réglementations de santé et de sécurité locales en vigueur. Ne jamais ouvrir les tubes après amplification pour éviter toute contamination par le produit amplifié. Ne pas mélanger au vortex les tubes de réaction. S'assurer que tous les tubes ne sont pas éraflés ou fissurés avant utilisation.

Matériels nécessaires et non fournis

ADN extrait d'un échantillon de selles humain apporté par l'utilisateur.

Pour s'assurer une sensibilité optimale du test, il est recommandé d'utiliser des ADN extraits provenant de cultures.

Echantillon d'ADN à tester obtenu selon les procédures de laboratoire standards.

Dispositifs standards sans DNase : tubes de réaction, pipettes et embouts.

Instrument pouvant effectuer une incubation isotherme des tubes de la réaction à une température donnée tel que

le système Applied Biosystems (ABI) 7500 FAST REAL-TIME PCR, ou un thermocycleur interne équivalent. L'instrument doit être équipé d'un lecteur de fluorescence avec des canaux de détection FAM et TAMRA pour la reconnaissance des produits amplifiés.

Préparation des réactifs

Reconstitution des composants lyophilisés :

Faire tourner le tube brièvement dans une micro-centrifugeuse et s'assurer que les culots de réactifs lyophilisés sont dans le fond du tube.

Reconstituer les réactifs comme décrit dans la table 1 ci-dessous. Mélanger doucement les composants en pipétant plusieurs fois les réactifs de haut en bas. Chaque tube de réactifs est suffisant pour 10 réactions.

Table 1 : Reconstitution des composants lyophilisés

| Composant | Diluant | Volume |
|-----------|------------------|--------|
| PEL2 | RB | 20µL |
| PP2 | H ₂ O | 10µL |
| O157 DNA | H ₂ O | 20µL |

Configuration de l'analyse O157

Utiliser les culots PEL2 pour les tests O157.

Chaque PEL2 reconstitué peut être utilisé pour 10 analyses (10µL par test).

Mettre en place la réaction comme décrit dans la table 2.

Table 2 : Configuration de l'analyse O157

| Configuration de l'analyse O157 | Par échantillon |
|--|--|
| PEL2 reconstitué avec RB | 2µL |
| PP2 reconstitué | 1µL |
| Echantillon d'ADN ou O157 DNA (positive control) | 1-7µL d'échantillon d'ADN ou 1µL de O157 PCDNA |
| WTR | 0-6µL |
| Volume réactionnel total | 10µL |

Pour un contrôle négatif (NTC ; no-template control), remplacer l'échantillon d'ADN par de la molecular grade water (WTR).

Informations de programmation pour le thermocycleur en temps réel utilisé

Sélection des couleurs :

TAMRA pour la détection du contrôle d'inhibition IC
FAM pour la détection de O157

Température : 63°C

Volume d'échantillon : 10µL

ROX (si disponible) : non sélectionné

Durée limite de l'analyse : 40 minutes.

Analyse des résultats :

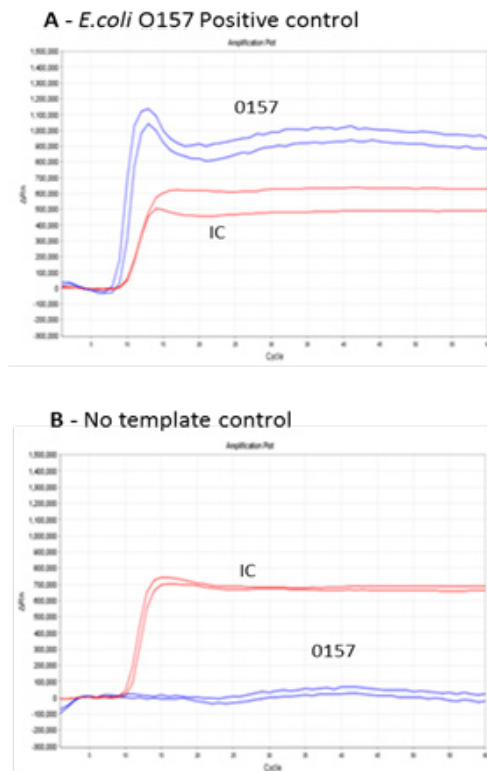
Ligne de base : 3 à 5 cycles

Réglage du seuil : au-dessus de la courbe générée par le contrôle négatif.

Interprétation des résultats

Résultats sur le thermocycleur : Un résultat positif est indiqué par la présence d'une courbe d'amplification et un résultat négatif est indiqué par une fluorescence sans amplification comme montré sur un système ABI 7500 FAST REAL-TIME PCR.

Figure 1 : Exemple de courbes d'amplification pour l'analyse duplex



A – Contrôle positif pour *E. coli* O157
B – Contrôle négatif

Table 3 : Critères de validation de l'interprétation du test multiplexe LAMP avec un contrôle d'inhibition (IC)

| Contrôles | Gènes cibles (O157 FAM) | Contrôle d'inhibition IC TAMRA | Interprétation |
|------------------|-------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Contrôle négatif | - | + | Valide |
| Contrôle positif | + | + | Valide |
| Echantillon | - | + | Négatif pour les gènes cibles |
| Echantillon | - | - | Invalide |
| Echantillon | + | +/- * | Positif for le gène cible |

* Le contrôle d'inhibition IC TAMRA peut parfois ne pas s'amplifier si l'ADN cible est présent en très grande quantité, surpassant la capacité des amorces et sondes.

Contrôle de qualité

Il est recommandé de réaliser le contrôle de qualité sur le kit MAST ISOPLEX® *E. coli* O157 en utilisant le culot LAMP (PEL2), le Positive Control DNA (O157), le mélange d'amorces, probes et IC DNA (PP2), le Reconstitution Buffer (RB) et la molecular grade water (WTR) du kit pour chaque série de tests. Ces tests permettent de vérifier le bon fonctionnement des réactifs selon les spécifications ainsi que l'absence de contamination des réactifs du kit. Si les résultats des réactions de contrôle sont incorrects, vérifier l'absence de signes de détérioration ou de contamination des réactifs du kit et effectuer un nouveau test. Si le nouveau test échoue également, contactez le service d'assistance technique de Mast pour obtenir des conseils.

Limites d'utilisation

Ces produits sont destinés à l'amplification d'échantillons d'ADN utilisant des méthodes d'extraction d'ADN internes et un ensemble d'amorces de fabrication interne défini. Le contrôle qualité détermine si les réactifs du kit et les contrôles fonctionnent et ne sont pas contaminés mais ne peut déterminer les problèmes potentiels que l'utilisateur peut rencontrer avec les échantillons pour l'extraction d'ADN. L'étape d'extraction des échantillons sont de la seule responsabilité de l'utilisateur. Les résultats obtenus avec ce kit doivent être évalués conjointement avec les autres données cliniques pertinentes lors du diagnostic d'une infection.

Spécificité/Sensibilité/Limite de Détection (LOD)

Les données obtenues à partir d'ADN extraits d'échantillons fécaux à *E. coli* O157 présumé et de cultures négatives (n=23).

Sensibilité – 100%

Spécificité – 100%

LOD (nombre de copies de génome): O157: 1166