



Mycoplasma DNA Amplification Assay

DNA Amplification Assay for the Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in human throat and nasopharyngeal swab specimens

REF 280550

IVD In vitro diagnostic medical device

INTENDED USE

The *illumigene* Mycoplasma DNA amplification assay, performed on the *illumipro-10™*, is a qualitative in vitro diagnostic test for the direct detection of DNA from *Mycoplasma pneumoniae* in human throat and nasopharyngeal swabs obtained from patients suspected of having *Mycoplasma pneumoniae* infection.

The *illumigene* Mycoplasma assay utilizes loop-mediated isothermal DNA amplification (LAMP) technology to detect *Mycoplasma pneumoniae* by targeting a segment of the *Mycoplasma pneumoniae* genome.

Results from the *illumigene* Mycoplasma DNA amplification assay should be used in conjunction with clinical presentation, other laboratory findings, and epidemiological risk factors as an aid in the diagnosis of Mycoplasma infection and should not be used as the sole basis for treatment or other patient management. Positive results do not rule out co-infection with other organisms and negative results in persons with respiratory tract infections may be due to pathogens not detected by this assay. Lower respiratory tract infections due to *M. pneumoniae* may not be detected by this assay. If lower respiratory tract infection due to *M. pneumoniae* is suspected, additional laboratory testing using methods other than the *illumigene* Mycoplasma DNA Amplification Assay may be necessary.

illumigene Mycoplasma is intended for use in hospital, reference or state laboratory settings. The device is not intended for point-of-care use.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

The *illumigene* Mycoplasma DNA Amplification Assay is based on loop-mediated amplification (LAMP) technology.¹ The assay targets a 208 base pair (bp) sequence of the *Mycoplasma pneumoniae* genome. The target DNA sequence is found in the intracellular protease-like protein gene and is found in all sequences comprising three genomes of *Mycoplasma pneumoniae*.

Loop-mediated amplification uses specially designed primers to provide for specific and continuous isothermal DNA amplification. A by-product of amplification is the formation of magnesium pyrophosphate, which forms a white precipitate leading to a turbid reaction solution. Reaction solution absorbance characteristics are monitored by the Meridian *illumipro-10* Incubator/Reader. Changes in reaction solution absorbance characteristics created by precipitation of magnesium pyrophosphate indicate the presence of target DNA. The absence of target DNA results in no significant change in sample absorbance.

The *illumigene* Mycoplasma kit includes *illumigene* Assay Control II and *illumigene* Mycoplasma Test Devices. The *illumigene* Assay Control II, used for specimen dilution and preparation, is a buffered solution containing *Staphylococcus aureus* DNA. The *illumigene* Mycoplasma Test Device contains one lyophilized amplification reagent bead in each of two chambers: a TEST chamber with Mycoplasma-specific primers and a CONTROL chamber with *S. aureus*-specific primers. The *S. aureus* DNA from the Control Reagent and the *S. aureus*-specific primers in the CONTROL chamber function as the Internal Control for the assay. During specimen preparation, each patient specimen is diluted with the Control Reagent and combined with *S. aureus* DNA prior to amplification. Addition of *S. aureus* DNA to the patient specimen allows for parallel processing of target DNA and Control DNA through sample preparation, amplification and detection. The Internal Control monitors DNA extraction, amplification inhibition, assay reagent performance and sample processing effectiveness. The control *S. aureus* target must be amplified and detected in the final reaction or the test is considered invalid and patient results are not reported.

The *illumipro-10* monitors changes in absorbance characteristics by measuring transmission of light through the Test and Control reaction solutions. Light transmission is checked at the assay Run Start (Signal_{initial}, S_i) and at the assay Run End (Signal_{final}, S_f). The *illumipro-10* calculates the change in light transmission between Run End and Run Start (S_f:S_i) and compares the ratio to a fixed cut-off value.

Fixed cut-off values for the TEST chamber are used to report sample results. TEST chamber S_f:S_i ratios less than 82% are reported as 'POSITIVE'; TEST chamber S_f:S_i ratios greater than or equal to 82% are reported as 'NEGATIVE'. Numerical values are not reported.

Fixed cut-off values for the CONTROL chamber are used to determine validity. CONTROL chamber S_f:S_i ratios less than 90% are considered valid and allow for reporting of TEST chamber results (POSITIVE, NEGATIVE). CONTROL chamber S_f:S_i ratios greater than or equal to 90% are considered invalid and prevent reporting of TEST chamber results. Invalid CONTROL chamber reactions are reported as 'INVALID'. Numerical values are not reported.

More stringent cut-off criteria are applied to the CONTROL chamber reaction to ensure amplification is not inhibited, reagents are performing as intended and that sample processing was performed appropriately.

BIOLOGICAL PRINCIPLES

Mycoplasma pneumoniae is a common cause of human upper and lower respiratory infections, including pharyngitis, acute bronchitis and pneumonia.² Mycoplasmas became recognized as human pathogens in the 1960s, with *Mycoplasma pneumoniae* the best known and most studied.³ Characteristics of the organism include a small genome consisting of a single circular chromosome and a triple-layered cell membrane rather than a structured cell wall.³ The size and structure of *Mycoplasma pneumoniae* prevent positive identification by traditional gram stain methods and visualization by light microscopy.

M. pneumoniae has been associated with up to 40%^{2, 3} of community-acquired pneumonias. Infection occurs in both children and adults without geographical, gender or climate-related restrictions.^{3, 6} *M. pneumoniae* is most often associated with atypical pneumonia, presenting with symptoms that include headache, malaise, myalgias, fever, and sore throat accompanied by dry, paroxysmal cough.^{3, 4, 6} While the clinical course of mycoplasmal pneumonia is generally mild and self-limiting, it has been associated with a mortality rate of approximately 1.4%.⁴ An estimated 2 million cases of *M. pneumoniae* infection occur annually with approximately 100,000 pneumonia-related hospitalizations in the United States each year.⁵ It is estimated as many as 18% of children requiring hospitalization with community-acquired pneumonia are caused by *M. pneumoniae*.³

Transmission of *M. pneumoniae* is generally from person to person by aerosol with a reported incubation period of one to four weeks.⁵ As patients with active mycoplasmal infection carry Mycoplasma in the nose, throat, trachea, and sputum, the spread of the disease is facilitated by its accompanying cough.³ This mode of transmission lends itself to outbreaks in close personal contact settings such as schools, military barracks, businesses, summer camps, colleges or institutions. Similarly, the disease is commonly spread among family members within a household.^{3, 4, 5, 6}

Diagnosis of acute *M. pneumoniae* infection is difficult. Basic diagnostic strategies in clinical practice include culture and serology. *M. pneumoniae* culture is often impractical for patient management as the organism may take as many as six weeks to culture.¹ While serology products are widely available and offer practical diagnostic solutions, they may be limited in their ability to detect acute infection. Serological assays are often directed at specific immunoglobulin, IgM and IgG, antibodies in sera. IgM antibodies are generally not detectable with the first seven days of symptom onset and may persist for months after active infection.² Studies indicate that less than 50% of patients with acute infection demonstrate a positive IgG response.²

New diagnostic techniques, including DNA-amplification methods, may enable more rapid diagnosis enabling earlier identification of outbreaks and prevention of secondary cases through implementation of control measures.⁵

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

The maximum number of tests obtained from this test kit is listed on the outer box.

1. ***illumigene* Assay Control II:** Phosphate-buffered solution containing formalin-treated *E. coli* cells harboring plasmid containing a segment of the *S. aureus* genome with sodium azide (0.09%) as a preservative.
2. ***illumigene* Reaction Buffer II:** Tris-buffered solution containing sodium azide (0.09%) as a preservative.
3. ***illumigene* Mycoplasma Test Device:** Two-chambered device containing lyophilized amplification reagents (DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphates) and either Mycoplasma-specific primers (TEST Chamber) or control primers (CONTROL Chamber).
4. **Screw-top Microcentrifuge Tubes:** 1.5 mL RNase/DNase-free microcentrifuge tubes with screw-on caps.

MATERIALS PROVIDED SEPARATELY

1. ***illumigene* Mycoplasma External Control Kit,** Catalog Number: 279940

MATERIALS NOT PROVIDED

1. Qiagen QIAamp® DSP DNA Mini Kit, Catalog Number: 61304
2. Ethanol, 200 Proof
3. Disposable latex gloves, powder free
4. DNase/RNase-free, aerosol resistant pipette tips
5. Specimen collection and transport system
6. Swabs, Nasopharyngeal or Throat: Cotton, Foam, Flocked Nylon, Polyester or Rayon
7. Transport Medium: 0.85% Saline, M4, M4-RT, M5 or UTM-RT

EQUIPMENT NOT PROVIDED

1. Dry-bath with heat block capable of 56 C
2. Dry-bath with 12 mm heat block capable of 95 C
3. Digital thermometer with max/min temperature memory (e.g., Traceable® Lollipop™ waterproof/shockproof thermometer)
4. Vortex mixer
5. Interval timer
6. Microcentrifuge
7. Micropipette(s) capable of dispensing 20, 50, 75, 100, 150, 200 and 500 µL
8. *illumipro-10™*, Meridian Bioscience, Inc. Catalog Number: 610172

PRECAUTIONS

1. All reagents are for in vitro diagnostic use only.
2. Do not interchange Assay Control II Reagent or Test Devices between lots. Reaction Buffer II and Screw-top Microcentrifuge Tubes are interchangeable provided they are within assigned expiration dates when used.

- Follow Biosafety Level 2 and Good Laboratory practices during testing.⁶ Treat all specimens and used Test Devices as capable of transmitting infectious agents. Do not eat, drink or smoke in areas where specimens or kit reagents are handled.
- Wear disposable gloves while handling specimens and thoroughly wash hands afterwards. Change gloves often.
- Quality Control Programs for Molecular Testing Laboratories should be employed.⁷ To avoid risk of false positives due to organism/amplicon contamination, employ prevention measures (eg, clean work area with suitable cleaner that destroys nucleic acid, use only aerosol resistant pipette tips, handle one specimen at a time) as required by Good Molecular Practices.
- The *illumigene* Mycoplasma Test Device contains lyophilized reagents. The protective pouch should not be opened until ready to perform the assay.
- The *illumigene* Mycoplasma Test Device includes a latch feature that is designed to prevent contamination of the test area with amplification product. Do NOT use Test Devices with broken latches.
- Dispose of used *illumigene* Test Devices immediately after processing, leaving the device latch securely in place. Do NOT open the Test Device after processing. Opening the device after amplification may result in contamination of the test area with amplification product.

RISK AND SAFETY PHRASES

There are no known hazards associated with this product.

SHELF LIFE AND STORAGE

The expiration date is indicated on the kit label. Store the kit at 2-8 C.

REAGENT PREPARATION

Ensure kit reagents are at room temperature (19-29 C) before use. Incorrect results may be obtained if reagents are not brought to room temperature prior to use.

Refer to the Qiagen QIAamp® DSP DNA Mini Kit package insert for the proper Storage and Handling of Qiagen Mini columns and reagents.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Sample types: Throat and nasopharyngeal swab specimens.

Sample Collection: Sample collection should be performed in accordance with institutional guidelines for collection of clinical respiratory specimens. Swab sample(s) should be collected with suitable swab types (e.g., Cotton, Foam, Flocked Nylon, Polyester or Rayon).

Place swab(s) in suitable transport medium (e.g., 0.85% Saline, M4, M4-RT, M5 or UTM-RT) and transport to the laboratory. Samples should be held at 2-27 C during transport.

Samples may be held at 19-29 C for up to 48 hours prior to testing. When testing will not be initiated within this time, the sample may be stored at 2-8 C for up to five days.

SPECIMEN PREPARATION

NOTE: Ensure that the *illumipro-10* is powered on and required performance verifications have been completed prior to initiation of SPECIMEN PREPARATION. Refer to the *illumipro-10* Operator's Manual for further information regarding instrument set-up and operation.

Specimen Preparation:

- Mix Sample thoroughly.
- Add 50 µL of Assay Control II to an appropriately labeled QIAamp Lysis Tube (LT).
- Add 150 µL of Sample to the Lysis Tube containing Assay Control II.

Specimen Extraction using Qiagen QIAamp® DSP DNA Mini Kit:

NOTE: The steps listed below should be followed for specimen extraction.

- Add 20 µL of QIAamp Proteinase K (PK) to the Lysis Tube containing Assay Control II and Sample.
- Add 200 µL of QIAamp Lysis Buffer (AL) to the Lysis Tube containing Assay Control II, Sample and Proteinase K. Vortex for a minimum of 10 seconds.
- Heat the Lysis Tube at 56 ± 3 C for 10 minutes.
- Add 200 µL Ethanol, 200 Proof, to the Lysis Tube. Vortex for 10 seconds.
- Pipette the entire contents of the Lysis Tube to a QIAamp Mini Spin Column with Wash Tube (WT).
- Centrifuge the Mini Spin Column for 1 minute at ≥ 6000 x g OR 8000 rpm. Discard flow-through and Wash Tube.
- Place the QIAamp Mini Spin Column into a new Wash Tube (WT) and add 500 µL of reconstituted QIAamp Wash Buffer (AW1).
- Centrifuge the Spin Column for 1 minute at ≥ 6000 x g OR 8000 rpm. Discard flow-through and Wash Tube.
- Place the QIAamp Mini Spin Column into a new Wash Tube (WT) and add 500 µL of reconstituted QIAamp Wash Buffer (AW2).
- Centrifuge for 3 minutes at 20,000 x g OR 14,000 rpm.
- Carefully remove the Mini Spin Column from the Wash Tube, taking care to ensure that the column does not come into contact with the flow-through. Discard flow-through and Wash Tube.
- Place the QIAamp Mini Spin Column into an appropriately labeled QIAamp Elution Tube (ET) and pipette 100 µL of QIAamp Elution Buffer (AE) and add to the QIAamp Mini Spin Column without touching the column membrane.
- Hold the QIAamp Mini Spin Column at 19-29 C for 1 minute. Centrifuge for 1 minute at ≥ 6000 x g OR 8000 rpm to elute purified DNA.
- Carefully discard the QIAamp Mini Spin Column.
- Extracted samples may be held at 19-29 C for up to 60 minutes prior to Heat Treatment.

Heat Treatment:

- Heat each Elution Tube containing extracted Specimen/Control DNA in a dry-bath/heat block at 95 ± 5 C for 10 ± 2 minutes. Monitor heat-treatment step with digital thermometer and interval timer.
- Remove each Elution Tube from the dry-bath/heat block and centrifuge for 10 seconds at 2000 x g OR 500 rpm. Heat-treated samples may be held at 19-29 C for up to 15 minutes prior to testing.

TEST PROCEDURE

NOTE: A maximum of 10 samples can be processed in a single *illumipro-10* run. Refer to the *illumipro-10* Operator's Manual for further information regarding instrument set-up and operation.

- Transfer 75 µL of *illumigene* Reaction Buffer II to an appropriately labeled Screw-top Tube (ST Tube).
- Add 75 µL of heat-treated DNA to the Screw-top Tube containing Reaction Buffer II. Vortex for approximately 10 seconds.
- Repeat steps 1 and 2 for all the samples to be tested.
- Remove 1 *illumigene* Mycoplasma Test Device from its protective pouch per sample. Carefully open the device, holding the chambers such that the lyophilized reagent will not fall out upon opening. Place device on a flat surface or in a rack that can accommodate the device.
- Transfer 50 µL of the heat-treated sample to the TEST chamber (White Bead) of the *illumigene* Test Device. Take care to not introduce extraneous air to the reaction mixture. Using a new pipette tip, transfer 50 µL from the Screw-top Tube containing heat-treated sample to the CONTROL chamber (Yellow Bead) of the *illumigene* Test Device. Do not introduce air bubbles. Close the *illumigene* Test Device and fasten the latch securely.
- Tap device on the bench top or mix to remove air bubbles. Carefully examine the Test Device to ensure that there are no air bubbles left in the tube and no liquid remaining in the top of the device. Amplification and detection should be initiated within 15 minutes.
- Insert the *illumigene* Test Device into the *illumipro-10* and initiate amplification reaction and detection. Please refer to the *illumipro-10* Operator's Manual for detailed instructions. Results will be displayed at the conclusion of the run.

INTERPRETATION OF RESULTS

Sample ID	Reported Result	Interpretation
Patient Specimen	POSITIVE	Sample contains <i>Mycoplasma pneumoniae</i> target DNA.
	NEGATIVE	No <i>Mycoplasma pneumoniae</i> DNA detected.
	INVALID	No reportable result. Repeat the test using the original sample. Inhibitory patient specimen, improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure.
Positive Control	POSITIVE	Valid positive control result. Reagents active at time of use, <i>illumipro-10</i> performing correctly.
	NEGATIVE	Incorrect control result. Patient results not reportable. Repeat the control test as the first step in determining the root cause of the failure. If control failures are repeated please contact Meridian's Technical Services at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor.
	INVALID	No reportable result. Repeat entire assay run using original samples. Improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure.
Negative Control	POSITIVE	Incorrect control result. Patient results not reportable. Repeat the control test as the first step in determining the root cause of the failure. If control failures are repeated please contact Meridian's Technical Services at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor.
	NEGATIVE	Valid negative control result. Reagents active at time of use, <i>illumipro-10</i> performing correctly.
	INVALID	No reportable result. Repeat entire assay run using original samples. Improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure.
EMPTY WELL	NONE	No <i>illumigene</i> Test Device in the <i>illumipro-10</i> Well. OR The <i>illumigene</i> Test Device present is compromised due to sample preparation failure, dirty device or improperly seated device. Repeat the test using original sample.

QUALITY CONTROL

This test should be performed per applicable local, state, or federal regulations or accrediting agencies.

- Each device contains an internal control that controls for amplification inhibition, assay reagents and sample processing effectiveness. Internal control DNA is present in the Assay Control II Reagent and is processed through all steps of the procedure. Primers for amplification of internal control DNA are present in the Control Chamber of the *illumigene* Test Device.

- The heat-treatment step is monitored with an external thermometer and interval timer. Use the max/min temperature memory of the thermometer to ensure that a temperature of 95 ± 5 C is maintained. Use the interval timer to ensure that heat-treatment duration is 10 ± 2 minutes.
- Good laboratory practice recommends the use of control materials. Users should follow the appropriate federal, state and local guidelines concerning the running of external quality controls.
- illumigene* Mycoplasma External Control Reagents are supplied separately (Catalog 279940). It is recommended that the reactivity of each new lot and each new shipment of *illumigene* Mycoplasma be verified on receipt and before use. External control tests should be performed thereafter in accordance with appropriate federal, state and local guidelines. The *illumigene* Mycoplasma test kit should not be used in patient testing if the external controls do not produce the correct results.
- A separate Test Device must be used for each external control reagent. Refer to the *illumigene* Mycoplasma External Controls package insert for external quality control testing procedures.

EXPECTED VALUES

Overall incidence of *Mycoplasma pneumoniae* in prospectively collected and tested specimens during the 2012 clinical study was 11.7% (12/103).

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- This product can be used only with the *illumipro-10* instrument.
- The *illumigene* Mycoplasma DNA assay is a qualitative assay and does not provide quantitative values or information about organism load.
- This device has not been evaluated for monitoring treatment of *Mycoplasma pneumoniae* infections.
- Respiratory infections can be caused by *Mycoplasma pneumoniae* as well as other pathogens. Positive results do not preclude coinfection with other respiratory pathogens.
- Test performance has not been established for testing specimens other than human nasopharyngeal and throat swab specimens, for immunocompromised individuals or from patients not suspected of infection with *M. pneumoniae*.
- The detection of *M. pneumoniae* nucleic acid is dependent upon proper specimen collection, handling, transportation, storage and preparation, including extraction. Failure to observe proper procedure in any one of these steps can lead to incorrect results.
- Since there were a limited number of positive specimens in the prospective clinical study, performance characteristics were established with both prospective and retrospective clinical specimens.
- Prevalence of *M. pneumoniae* infection will affect the test's predictive value.
- Organism nucleic acids may persist *in vivo* independent of organism viability. Detection of analyte DNA target may not imply causative agents for clinical symptoms. The *illumigene* Mycoplasma assay does not differentiate between carriers and infected individuals.
- Results should be interpreted together with clinical history, epidemiological data, and other information available to the physician. As with all molecular based diagnostic tests, (A) False negative results may occur from the presence of inhibitors, technical error, sample mix-up or low numbers of organisms in the clinical specimen, (B) False positive results may occur from the presence of cross-contamination by target organisms, their nucleic acids or amplified product, and from non-specific signals.
- The effect of interfering substances was evaluated only for those substances listed in the labeling. Interference by substances other than those described in the "Tests for Interfering Substances" section below could lead to erroneous results.
- Blast analysis does not indicate that the primers react with any other organism except *M. pneumoniae*, however cross-reactivity with respiratory organisms other than those listed in the "Crossreactivity" section below could lead to erroneous results.
- There is potential for a false negative result in the presence of high concentrations of *Moraxella catarrhalis*, *Nocardia asteroides*, or Coronavirus. For these three organisms, a false negative result was observed in only one of seven replicates with samples tested near the Limit of Detection during initial testing that were not confirmed with further testing.
- Phenylephrine HCl found in nasal decongestants produced false negative results at concentrations above 0.595 mg/mL during *M. pneumoniae* strain M129 Limit of Detection replicate testing.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The *illumigene* Mycoplasma DNA Amplification Assay was evaluated in 2012 by independent clinical test sites representing geographically distinct regions throughout the United States. A total of 334 qualified throat and nasopharyngeal (NP) swab specimens, collected from patients suspected of *Mycoplasma pneumoniae* infection were evaluated with the test device to establish performance characteristics. Specimens were leftover deidentified specimens submitted to the testing laboratories for routine *M. pneumoniae* testing. Specimens included in performance evaluation were prospective (never frozen) and retrospective (frozen prior to *illumigene* testing). The performance of *illumigene* was compared to a Composite Reference Method that included *M. pneumoniae* bacterial culture with identification and a validated real-time PCR assay followed by bi-directional sequencing for positive specimens. Specimens producing positive *Mycoplasma pneumoniae* results from either the bacterial culture or real-time PCR and bi-directional sequencing were considered positive. Specimens negative for both culture and PCR were considered negative. A total of 12 specimens were excluded from the clinical sample population because culture results were inconclusive and PCR negative, making final disposition of patient status unavailable. A total of 103 (30.8%) prospective and 219 retrospective specimens (65.6%) were tested with one initial invalid result (0.30%).

Tables 1-2 summarize performance characteristics. Statistical analysis of Specimen Type performance data was performed with no significant difference between swab types identified.

Data indicates performance is optimal when specimens are collected and tested prospectively.

Table 1. *illumigene* Mycoplasma Assay Performance: Nasopharyngeal Swabs

Specimen Description	Positive Specimens			Negative Specimens			Invalid Results
	<i>illumigene</i> vs. Comparator	% Sensitivity or PPA	95% CI	<i>illumigene</i> vs. Comparator	% Specificity or NPA	95% CI	
Composite Method Comparator							
Prospective	4/4	% Sensitivity 100%	51.0 – 100.0%	48/48	% Specificity 100%	92.6 – 100.0%	0
Retrospective	34/36	PPA 94.4%	81.9 – 98.5%	86/90	NPA 95.6%	89.1 – 98.3%	0
Validated PCR Assay with Bi-directional Sequencing Comparator							
Prospective	4/4	% Sensitivity 100%	51.0 – 100.0%	48/48	% Specificity 100%	92.6 – 100.0%	0
Retrospective	34/36	PPA 94.4%	81.9 – 98.5%	86/90	NPA 95.6%	89.1 – 98.3%	0

Table 2. *illumigene* Mycoplasma Assay Performance: Throat Swabs

Specimen Description	Positive Specimens			Negative Specimens			Invalid Results
	<i>illumigene</i> vs. Comparator	% Sensitivity or PPA	95% CI	<i>illumigene</i> vs. Comparator	% Specificity or NPA	95% CI	
Composite Method Comparator							
Prospective	8/8	% Sensitivity 100%	67.6 – 100.0%	43/43	% Specificity 100%	91.8 – 100.0%	0
Retrospective	22/26 ^a	PPA 84.6%	66.5 – 93.9%	66/67	NPA 98.5%	92.0 – 99.7%	1
Validated PCR Assay with Bi-directional Sequencing Comparator							
Prospective	8/8	% Sensitivity 100%	67.6 – 100.0%	43/43	% Specificity 100%	91.8 – 100.0%	0
Retrospective	21/21 ^b	PPA 100%	84.5 – 100.0%	70/72	NPA 97.2%	90.4 – 99.2%	1

a. Four specimens originally identified by culture as positive were not confirmed by either the *illumigene* assay or the independent PCR method. Results suggest sample degradation during storage.

b. One specimen originally identified by the *illumigene* assay and culture as positive was negative by the independent PCR method. This specimen is classified as a false positive relative to PCR.

Age information was known for 83.5% (269/322) of the patients included in the performance analysis. Seven (2.6%) patients tested were between 0-28 days of age; 38 (14.1%) patients were between 29 days and up to 2 years of age; 139 (51.7%) patients were between 2 and up to 12 years of age; 61 (22.7%) patients were between 12 and up to 18 years of age; and 9 (3.3%) patients were between 18 and up to 21 years of age. The remaining 15 (5.6%) study patients were 21 years or older. No performance differences were noted based on chronological age.

The study population included 90 (27.9%) female patients and 91 (28.3%) male patients. Gender was unknown for 141 (43.8%) of the study participants. In the specimens for which patient gender was known, no performance differences were noted based on gender.

Clinical performance of the *illumigene* Mycoplasma DNA Amplification Assay was assessed by the testing of deidentified nasopharyngeal and throat swab specimens lacking clinical information; accordingly, the number of patients with *M. pneumoniae* pneumonia included in the clinical studies is unknown and performance for this group cannot be described separately.

ANALYTICAL SENSITIVITY

The analytical sensitivity or Limit of Detection for the *illumigene* Mycoplasma assay was determined for two *M. pneumoniae* strains.

Limit of Detect was determined using a minimum of 20 replicates for each measurand and a stated probability (e.g., 95% where 19/20 replicates are positive) of obtaining positive responses. Analytical sensitivity testing is summarized below:

<i>Mycoplasma pneumoniae</i> Strain Description	CFU/Test	CFU/mL
FH (ATCC 15531)	88	2350
M129	7.5	200

ASSAY REACTIVITY

The following *M. pneumoniae* strains were tested and produced positive reactions at or below stated assay limit of detect of 88 CFU/Test (2350 CFU/mL) with *illumigene* Mycoplasma:

PI 1428 (ATCC 29085), MAC (ATCC 15492), M52 (ATCC 15293), Bru (ATCC 15377), M129-B170 (ATCC 29343), Mutant 22 (ATCC 39505) UAB 55612, UAB 56317, UMTB-10G (ATCC 49899). Testing demonstrated that both Type 1 and Type 2 strains are detected with the assay.

REPRODUCIBILITY

Blind-coded panels of 10 samples were supplied to three independent laboratories for reproducibility studies. Samples were randomly sorted within each panel to mask sample identities. The panels included contrived samples manufactured as low positive samples (i.e., near the assay limit of detection, n=3) and high negative samples, (n=3). The panels also included contrived positive (n=3) samples and natural negative samples (n=1). Testing was performed by different operators at each site on the same day (intra-assay variability) for five days (inter-assay variability). Three lots of *illumigene* Mycoplasma and five *illumipro-10* instruments were used in this study. Positive and Negative Controls were tested each day of testing. The results are given in the table below:

Sample Type	Site 1		Site 2		Site 3		Total	
	Percent agreement	Percent agreement	Percent agreement	Percent agreement	Percent agreement	Percent agreement	Percent agreement	
Negative	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%	30/30	100%
High Negative	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%	90/90	100%
Low Positive	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%	90/90	100%
Positive	29/30	96.7%	30/30	100%	29/30	96.7%	88/90	97.8%
Negative Control	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%	30/30	100%
Positive Control	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%	30/30	100%

CROSSREACTIVITY / MICROBIAL INTERFERENCE STUDIES

Crossreactivity studies were performed with positive and negative specimens inoculated with potentially interfering bacterial or fungal organisms to minimum final concentrations of 1.0×10^6 CFU/mL. Viruses were tested at concentrations greater than 1.0×10^5 TCID₅₀/mL or 1.0×10^5 copies/mL. Human DNA was tested at 2.0 ng/test with no crossreactivity observed. Positive specimens contained *M. pneumoniae* concentrations near the limit of detection. None of the following organisms or materials were identified as crossreactive or interfering in the *illumigene* Mycoplasma assay:

Acinetobacter baumannii, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Actinomyces odontolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* (ESBL), *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* (KPC), *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella paratyphi* (Group A), *Salmonella typhimurium* (Group B), *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* (Group B), *Streptococcus anginosus* (Group F), *Streptococcus bovis* (Group D), *Streptococcus canis* (Group G), *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Ureaplasma urealyticum*, Adenovirus, Coxsackievirus, Cytomegalovirus, Epstein Barr virus, Herpes simplex virus 1, Herpes simplex virus 2, Human metapneumovirus, Influenza A, Influenza B, Parainfluenza virus 1, Parainfluenza virus 2, Parainfluenza virus 3, Respiratory syncytial virus A, Respiratory syncytial virus B, Rhinovirus, Human DNA.

Moraxella catarrhalis, *Nocardia asteroides* and Coronavirus produced unexpected results during initial testing that were not confirmed with further testing. For each organism, false-negative results occurred in one of seven replicates tested near the Limit of Detection.

TESTS FOR INTERFERING SUBSTANCES

Potentially interfering substances were tested with simulated negative and contrived positive (*M. pneumoniae* strains M129 and FH) samples. Potentially interfering substances were diluted in sterile saline and added to M4 medium with rayon swabs (Negative Sample) and to M4 medium with polyester swabs (Contrived Positive Sample and tested).

The following biological substances, at the saturated solvent/diluent concentrations indicated, do not interfere with *illumigene* Mycoplasma test results:
Mucus (5.0mg/mL), White Blood Cells (0.5% v/v) and Whole Blood (5% v/v).

The following chemical substances, at the saturated solvent/diluents concentrations indicated, do not interfere with *illumigene* Mycoplasma test results:

Acetaminophen (18.1 mg/mL), Albuterol Sulfate (20 mg/mL), Aspirin (9.1 mg/mL), Azithromycin dehydrate (2.0 mg/mL), Cepacol® Mouthwash [Ethanol, denatured (1.4% v/v), Cetylpyridinium chloride (0.005% v/v)], Contac® Cold + Flu Tablets [Acetaminophen (14.8 mg/mL), Chlorpheniramine maleate (0.06 mg/mL), Phenylephrine HCl (0.15 mg/mL)], Diphenhydramine HCl (2.6 mg/mL), Erythromycin (20.0 mg/mL), HALLS® Cough Drops [Menthol (0.06 mg/mL)], Ibuprofen (12.7 mg/mL), Phenylephrine HCl (0.595 mg/mL), Prednisone (20.0 mg/mL), Robitussin® Cough+Chest Congestion Syrup [Dextromethorphan HBr (0.20 mg/mL), Guaifenesin (2.0 mg/mL)], Saline Nasal Spray [Sodium chloride (0.65 mg/mL)].

Phenylephrine HCl found in nasal decongestants produced false negative results at concentrations above 0.595 mg/mL during *M. pneumoniae* strain M129 Limit of Detection replicate testing.

ITALIANO



Mycoplasma DNA Amplification Assay

Test di amplificazione del DNA per il rilevamento di *Mycoplasma pneumoniae* in campioni biologici umani prelevati con tamponi faringei e nasofaringei

REF 280550

IVD Dispositivo medico-diagnostico in vitro

FINALITÀ D'USO

Il test di amplificazione del DNA di *illumigene* Mycoplasma, eseguito su *illumipro-10™*, è un esame diagnostico in vitro per il rilevamento diretto del DNA di *Mycoplasma pneumoniae* in tamponi faringei e nasofaringei umani ottenuti da pazienti con sospetta infezione da *Mycoplasma pneumoniae*.

Il test *illumigene* Mycoplasma utilizza la tecnologia LAMP (loop-mediated isothermal DNA amplification, amplificazione isoterica del DNA mediata da loop) per il rilevamento del *Mycoplasma pneumoniae* utilizzando come bersaglio un segmento del genoma del batterio.

I risultati del test di amplificazione del DNA *illumigene* Mycoplasma vanno utilizzati congiuntamente al quadro clinico, ai risultati degli altri test di laboratorio e ai fattori di rischio epidemiologico come ausilio nella diagnosi dell'infezione da Mycoplasma e non come unica base di trattamento o per la gestione degli altri pazienti. I risultati positivi non escludono co-infezioni da parte di altri organismi e i risultati negativi in soggetti con infezioni del tratto respiratorio potrebbero essere dovuti a patogeni non rilevati con questo test. Le infezioni del tratto respiratorio inferiore dovute a *M. pneumoniae* potrebbero non essere rilevate con questo test. Se si sospetta un'infezione del tratto respiratorio inferiore dovuta a *M. pneumoniae*, potrebbe essere necessario ricorrere ad altri esami di laboratorio che utilizzano metodi diversi dal test di amplificazione del DNA *illumigene* Mycoplasma.

Il test *illumigene* Mycoplasma è destinato all'uso nei laboratori ospedalieri, statali o di riferimento. Il dispositivo non è destinato all'uso ambulatoriale.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Il test di amplificazione del DNA *illumigene* Mycoplasma si basa sulla tecnologia LAMP (Loop-mediated amplification, amplificazione mediata da loop).¹ Il test ha come bersaglio una sequenza di 208 paia di basi (bp) del genoma di *Mycoplasma pneumoniae*. La sequenza di DNA bersaglio si trova nel gene codificante per una proteina simile a una proteasi intracellulare e in tutte le sequenze che comprendono tre genomi di *Mycoplasma pneumoniae*.

L'amplificazione mediata da loop utilizza primer specificamente designati per fornire la specifica e continua amplificazione isoterica del DNA. Un sottoprodotto dell'amplificazione è il magnesio pirofosfato, che forma un precipitato bianco dando origine ad una soluzione di reazione torbida. Le caratteristiche di assorbanza della soluzione di reazione vengono monitorate dal Meridian *illumipro-10* Incubator/Reader. I cambiamenti nelle caratteristiche di assorbanza della soluzione di reazione creata dalla precipitazione del magnesio pirofosfato indicano la presenza del DNA target. L'assenza del DNA bersaglio non causa un cambiamento significativo nell'assorbanza del campione.

Il kit *illumigene* Mycoplasma contiene il controllo II per il test *illumigene* e il dispositivo di test per *illumigene* Mycoplasma. Il controllo II per il test *illumigene*, utilizzato per la diluizione e la preparazione dei campioni biologici, è una soluzione tampone contenente il DNA di *Staphylococcus aureus*. Il dispositivo di test di *illumigene* Mycoplasma contiene una microsfera di reagente di amplificazione liofilizzato in ognuna delle due camere: una camera di TEST con primer specifici per il Mycoplasma e una camera di CONTROLLO con primer specifici per lo *S. aureus*. Il DNA di *S. aureus* del reagente di controllo e i primer specifici per *S. aureus* nella camera di CONTROLLO funzionano come controllo interno per il test. Durante la preparazione del campione biologico, prima dell'amplificazione il campione biologico di ciascun paziente viene diluito con il reagente di controllo e combinato con il DNA di *S. aureus*. L'aggiunta del DNA di *S. aureus* al campione biologico del paziente consente di effettuare un trattamento parallelo del DNA bersaglio e del DNA di controllo attraverso la preparazione del campione, l'amplificazione e il rilevamento. Il controllo interno esegue un monitoraggio sull'estrazione del DNA, sull'inibizione dell'amplificazione, sulle prestazioni del reagente analitico e sull'efficacia di trattamento del campione. La sequenza bersaglio di *S. aureus* deve essere amplificata e rilevata nella reazione finale, altrimenti il test è considerato non valido e i risultati del paziente non vengono refertati.

L'*illumipro-10* monitorizza i cambiamenti delle caratteristiche di assorbanza misurando la trasmissione della luce attraverso le soluzioni di reazione di Test e di Controllo. La trasmissione della luce viene controllata all'inizio dell'esecuzione dell'analisi (Signal_{initial}, S_i) nonché alla fine (Signal_{final}, S_f). L'*illumipro-10* calcola il cambiamento nella trasmissione della luce fra la fine e l'inizio dell'esecuzione (S_f:S_i) e confronta il rapporto con un valore fisso di cut-off.

I valori di cut-off fissi della camera di TEST sono utilizzati per refertare il campione. I rapporti della camera di TEST S₂:S₁ inferiori all'82% sono refertati come "POSITIVI"; i rapporti della camera di TEST S₂:S₁ superiori o pari all'82% sono refertati come "NEGATIVI". I valori numerici non sono refertati.

I valori di cut-off fissi della camera di CONTROLLO sono utilizzati per determinare la validità del test. I rapporti S₂:S₁ della camera di CONTROLLO inferiori al 90% sono considerati validi e consentono la refertazione dei risultati della camera di TEST (POSITIVI, NEGATIVI). I rapporti S₂:S₁ della camera di CONTROLLO superiori o pari al 90% sono considerati non validi e impediscono la refertazione dei risultati della camera di TEST. Le reazioni della camera di CONTROLLO non valide sono refertate come 'NON VALIDE'. I valori numerici non sono refertati.

Per la reazione della camera di CONTROLLO valgono criteri di cut-off più rigorosi per garantire che l'amplificazione non sia inibita, i reagenti agiscono come previsto e il trattamento del campione avvenga correttamente.

PRINCIPI BIOLOGICI

Mycoplasma pneumoniae è un comune agente eziologico delle infezioni del tratto respiratorio umano superiore e inferiore, tra cui faringite, bronchite acuta e polmonite.² I micoplasmi sono stati riconosciuti come patogeni umani negli anni '60 e *Mycoplasma pneumoniae* è stato il patogeno più conosciuto e studiato.³ Tra le caratteristiche dell'organismo sono incluse un piccolo genoma costituito da un unico cromosoma circolare e una membrana cellulare a triplo strato anziché una parete cellulare strutturata.³ Le dimensioni e la struttura di *Mycoplasma pneumoniae* impediscono l'identificazione positiva con i tradizionali metodi di colorazione di Gram e la visualizzazione mediante microscopia ottica.

Fino al 40% delle polmoniti contratte nella comunità sono state associate a *M. pneumoniae*.^{2, 3} L'infezione si verifica sia nei bambini che negli adulti senza alcuna restrizione di tipo geografico, sessuale o climatico.^{3, 6} *M. pneumoniae* è più spesso associato alla polmonite atipica, i cui sintomi includono emicrania, malessere, mialgia, febbre e faringite accompagnati da tosse secca e convulsa.^{3, 4, 6} Mentre il decorso clinico della polmonite micoplasmica è generalmente lieve e autolimitante, il tasso di mortalità associato alla malattia è pari a circa l'1,4%.⁴ Secondo le stime, ogni anno negli Stati Uniti si verificano 2 milioni di casi di infezione da *M. pneumoniae* con circa 100.000 ricoveri annuali correlati a polmonite.⁵ Si stima che, nei bambini, fino al 18% dei ricoveri correlati alla polmonite contratta all'interno della comunità sono causati da *M. pneumoniae*.³

La trasmissione di *M. pneumoniae* avviene generalmente per via aerea tra un soggetto e l'altro, con un periodo di incubazione variabile da una a quattro settimane.⁵ Poiché i pazienti con infezione *Mycoplasma* attiva risultano portatori del *Mycoplasma* all'interno delle cavità nasali, della gola, della trachea e dell'espettorato, la diffusione della malattia viene facilitata dalla tosse ad essa associata.³ Questa modalità di trasmissione si presta alla comparsa di focolai epidemici negli ambienti in cui gli individui si trovano a stretto contatto tra loro, come le scuole, le caserme militari, le aziende, i campi estivi, i collegi o gli istituti. Allo stesso modo, in un ambiente domestico la malattia si diffonde comunemente tra i membri della famiglia.^{3, 4, 5, 6}

L'infezione acuta da *M. pneumoniae* è di difficile diagnosi. Le strategie diagnostiche di base nella pratica clinica includono tecniche culturali e sierologiche. La coltura di *M. pneumoniae* risulta spesso di scarsa praticità per la gestione dei pazienti in quanto l'organismo può richiedere fino a sei settimane per riprodursi in coltura.¹ Mentre i test commerciali per l'analisi sierologica sono ampiamente disponibili e offrono pratiche soluzioni diagnostiche, presentano tuttavia dei limiti per quanto riguarda la capacità di rilevamento dell'infezione acuta. I test sierologici hanno spesso come bersaglio specifiche immunoglobuline, le IgM e le IgG, anticorpi che si trovano nel siero. Generalmente, gli anticorpi IgM non sono rilevabili nei primi sette giorni di esordio dei sintomi e possono persistere per mesi dopo la fase attiva dell'infezione.² Gli studi indicano che meno del 50% dei pazienti con infezione acuta mostrano una risposta positiva alle IgG.²

Le nuove tecniche diagnostiche, inclusi i metodi di amplificazione del DNA, possono portare a una diagnosi più rapida consentendo l'identificazione precoce dei focolai di infezione nonché la prevenzione dei casi secondari attraverso l'implementazione delle misure di controllo.³

REAGENTI/MATERIALI FORNITI

Il numero massimo di analisi eseguibili con questo kit è indicato sulla confezione esterna.

- illumigene Controllo II:** soluzione tampone fosfato contenente cellule di *E. coli* trattate con formalina che ospitano all'interno un plasmide contenente un segmento del genoma di *S. aureus* con sodio azide (0,09%) come conservante.
- illumigene Tampone di reazione II:** soluzione tampone Tris contenente sodio azide (0,09%) come conservante.
- illumigene Mycoplasma Dispositivo di test:** dispositivo a due camere contenente i reagenti di amplificazione (DNA polimerasi, deossinucleotidi trifosfati) e i primer specifici per il *Mycoplasma* (camera di TEST) o i primer di controllo (camera di CONTROLLO).
- Provette per microcentrifuga con tappo a vite:** provette da 1,5 mL per microcentrifuga senza RNasi/DNasi con tappo a vite.

MATERIALI FORNITI SEPARATAMENTE

- Kit di controllo esterno per *illumigene Mycoplasma*, Numero di Catalogo: 279940

MATERIALI NON FORNITI

- Qiagen QIAamp[®] DSP DNA Mini Kit, Numero di Catalogo: 61304
- Etanolo assoluto, (Ethanol 200 proof)
- Guanti in lattice monouso, senza talco
- Puntali per pipetta con filtro, resistenti agli aerosol, privi di DNasi/RNasi
- Sistema di prelievo e trasporto dei campioni

- Tamponi faringei o nasofaringei: cotone, schiuma, flocculati in nylon, poliestere o rayon
- Terreno di trasporto: soluzione fisiologica allo 0,85%, M4, M4-RT, M5 o UTM-RT

STRUMENTI NON FORNITI

- Blocco termostatico a secco in grado di arrivare a 56 C
- Blocco termostatico a secco di 12 mm in grado di arrivare a 95 C
- Termometro digitale con memoria temperatura max/min (es. termometro impermeabile/a prova d'urto Traceable[®] Lollipop[™])
- Vortex mixer
- Timer
- Microcentrifuga
- Micropipette in grado di dispensare 20, 50, 75, 100, 150, 200 e 500 µL
- illumipro-10[™]*, Meridian Bioscience, Inc. Numero di catalogo: 610172

PRECAUZIONI

- Tutti i reagenti sono a esclusivo uso diagnostico in vitro.
- Non scambiare i lotti dei reagenti di controllo II per il test o dei dispositivi di test. Il tampone di reazione II e le provette per microcentrifuga con tappo a vite sono intercambiabili purché utilizzati entro le date di scadenza assegnate.
- Durante l'analisi seguire il livello di biosicurezza 2 e la buona pratica di laboratorio.⁶ Trattare tutti i campioni biologici e i dispositivi di test usati come potenziali veicoli di infezione. Non mangiare, bere o fumare in aree in cui vengono gestiti i campioni o i reagenti del kit.
- Durante la manipolazione dei campioni biologici indossare guanti monouso e subito dopo lavarsi accuratamente le mani. Cambiare spesso i guanti.
- È necessario adoperare i programmi di controllo qualità per i laboratori di analisi molecolari.⁷ Per evitare il rischio di falsi positivi dovuto alla contaminazione da parte di organismi o ampliconi, adottare misure di prevenzione (ad esempio, pulire l'area di lavoro con un detergente idoneo che distrugga gli acidi nucleici, usare solo puntali per pipetta resistenti agli aerosol, manipolare un campione biologico alla volta) come richiesto dalla buona pratica del laboratorio molecolare.
- Il dispositivo di test per *illumigene Mycoplasma* contiene reagenti liofilizzati. La busta protettiva non deve essere aperta fino a quando non si è pronti a eseguire l'analisi.
- Il dispositivo di test per *illumigene Mycoplasma* comprende un sistema di chiusura ideato per evitare la contaminazione dell'area di analisi con il prodotto di amplificazione. NON utilizzare dispositivi di test con sistemi di chiusura rotti.
- Smaltire i dispositivi di test *illumigene* subito dopo l'elaborazione, senza toccare la chiusura del dispositivo. NON aprire il dispositivo di test dopo l'elaborazione. L'apertura del dispositivo dopo l'amplificazione potrebbe comportare la contaminazione dell'area di analisi con il prodotto di amplificazione.

FRASI DI RISCHIO E CONSIGLI DI PRUDENZA

Per le nostre attuali conoscenze, non ci sono rischi associati a questo prodotto.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

La data di scadenza è riportata sull'etichetta del kit. Conservare il kit a 2 – 8 C.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Assicurarsi che i reagenti del kit siano a temperatura ambiente (19 C - 29 C) prima dell'uso. Si potrebbero ottenere risultati incorretti se i reagenti non vengono portati a temperatura ambiente prima dell'uso.

Per manipolare e conservare in modo adeguato i reagenti e le colonnine Qiagen, consultare il foglietto illustrativo del QIAamp[®] DSP DNA Mini Kit

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Tipi di campioni: campioni biologici prelevati mediante tamponi faringei e nasofaringei.

Raccolta campione: il prelievo dei campioni deve essere eseguito in conformità alle linee guida della struttura sanitaria in relazione al prelievo di campioni clinici del tratto respiratorio. I campioni devono essere prelevati con i tipi di tamponi adatti (es. cotone, schiuma, flocculati in nylon, poliestere o rayon).

Collocare i tamponi nell'apposito terreno di trasporto (es. soluzione fisiologica allo 0,85%, M4, M4-RT, M5 o UTM-RT) e trasportarli al laboratorio. I campioni devono essere tenuti a una temperatura compresa tra 2 e 27 C durante il trasporto.

I campioni possono essere conservati a 19 C - 29 C per un massimo di 48 ore prima dell'analisi. Se l'analisi non viene iniziata entro tale limite di tempo, il campione può essere conservato a 2 C - 8 C per un massimo di cinque giorni.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

NOTA: assicurarsi che l'*illumipro-10* sia acceso e che siano state completate le necessarie verifiche del funzionamento prima di dare inizio alla PREPARAZIONE DEI CAMPIONI. Consultare il Manuale d'uso dell'*illumipro-10* per ulteriori informazioni sulla configurazione e sul funzionamento dello strumento.

Preparazione dei campioni biologici:

- Miscelare accuratamente i campioni.
- Aggiungere 50 µL di controllo II per il test in una provetta di lisi (Lysis Tube, LT) QIAamp dotata di apposita etichetta.
- Aggiungere 150 µL di campione alla provetta di lisi contenente il controllo II per il test.

Estrazione del campione biologico con il QIAamp® DSP DNA Mini Kit:

NOTA: per l'estrazione del campione biologico è necessario seguire le indicazioni riportate di seguito.

1. Aggiungere 20 µL di proteinasi K (PK) QIAamp alla provetta di lisi contenente il campione e il controllo II per il test.
2. Aggiungere 200 µL di tampone di lisi QIAamp (AL) alla provetta di lisi contenente il controllo II per il test, il campione e la proteinasi K. Miscelare su vortex per almeno 10 secondi.
3. Riscaldare la provetta di lisi a 56 C ± 3 C per 10 minuti.
4. Aggiungere 200 µL di etanolo assoluto alla provetta di reazione. Miscelare su vortex per 10 secondi.
5. Trasferire con una pipetta l'intero contenuto della provetta di lisi in una colonnina di centrifugazione QIAamp alloggiata sulla provetta di raccolta del lavaggio (Wash Tube, WT).
6. Centrifugare la colonnina per 1 minuto a ≥ 6000 x g o 8000 rpm. Eliminare l'eluato e la provetta di raccolta del lavaggio.
7. Collocare la mini colonna di centrifuga QIAamp in una nuova provetta di raccolta del lavaggio (WT) e aggiungere 500 µL di tampone di lavaggio QIAamp ricostituito (AW1).
8. Centrifugare la colonnina per 1 minuto a ≥ 6000 x g o 8000 rpm. Eliminare l'eluato e la provetta di raccolta del lavaggio.
9. Collocare la colonnina QIAamp in una nuova provetta di raccolta di lavaggio (WT) e aggiungere 500 µL di tampone di lavaggio QIAamp ricostituito (AW2).
10. Centrifugare per 3 minuti a 20,000 x g o 14,000 rpm.
11. Rimuovere con cura la mini colonna di centrifuga dalla provetta di lavaggio, facendo attenzione a non far venire a contatto la colonna con l'eluato. Eliminare l'eluato e la provetta di lavaggio.
12. Collocare la colonnina QIAamp in una provetta di eluizione (Elution Tube, ET) QIAamp dotata di apposita etichetta e pipettare 100 µL di tampone di eluizione QIAamp (AE) alla colonnina QIAamp senza toccare la membrana della colonna stessa.
13. Tenere la colonnina di centrifuga QIAamp a 19 C - 29 C per 1 minuto. Centrifugare per 1 minuto a ≥ 6000 x g o 8000 rpm per eluire il DNA purificato.
14. Eliminare con cura la colonnina di centrifuga QIAamp.
15. I campioni estratti possono essere tenuti a 19 C - 29 C fino a 60 minuti prima del trattamento termico.

Trattamento termico

1. Riscaldare ciascuna provetta di eluizione contenente il campione biologico estratto o il DNA di controllo in un bagno a secco a 95 C ± 5 C per 10 ± 2 minuti. Monitorare la fase del trattamento termico con il termometro digitale e il timer.
2. Rimuovere ciascuna provetta di eluizione dal bagno a secco/blocco termico e centrifugare per 10 secondi a 2000 x g o 500 rpm. I campioni sottoposti a trattamento termico possono essere tenuti a 19 C - 29 C fino a 15 minuti prima dell'analisi.

PROCEDURA DEL TEST

NOTA: È possibile analizzare un massimo di 10 campioni in un singolo ciclo *illumipro-10*. Consultare il Manuale d'uso dell'*illumipro-10* per ulteriori informazioni sulla configurazione e sul funzionamento dello strumento.

1. Trasferire 75 µL di tampone di reazione II *illumigene* in una provetta con tappo a vite dotata di apposita etichetta (provetta ST, Screw-top.)
2. Aggiungere 75 µL di DNA sottoposto a trattamento termico alla provetta con tappo a vite contenente il tampone di reazione II. Miscelare su vortex per circa 10 secondi.
3. Ripetere la fase 1 e 2 per tutti i campioni da analizzare.
4. Per ogni campione rimuovere un dispositivo di test per *Mycoplasma illumigene* dalla busta protettiva. Aprire con attenzione il dispositivo, tenendo le camere in maniera tale che il reagente liofilizzato non fuoriesca all'apertura. Collocare il dispositivo su una superficie piana o su un vassoio in grado di contenere il dispositivo.
5. Trasferire 50 µL di campione sottoposto a trattamento termico nella camera di TEST (sferetta bianca) del dispositivo di test *illumigene*. Prestare attenzione a non introdurre bolle d'aria nella miscela di reazione. Usando un puntale per pipetta nuovo, trasferire 50 µL di campione sottoposto a trattamento termico nella camera di CONTROLLO (sferetta gialla) del dispositivo di test *illumigene*. Non introdurre bolle d'aria. Chiudere il dispositivo di test *illumigene* e chiudere saldamente la serratura.
6. Battere leggermente il dispositivo sul ripiano o agitare per rimuovere le bolle d'aria. Esaminare attentamente il dispositivo di test per assicurarsi che nella provetta non siano rimaste delle bolle d'aria e che nella parte superiore del dispositivo non sia rimasto del liquido. L'amplificazione e il rilevamento devono iniziare entro 15 minuti.
7. Inserire il dispositivo di test *illumigene* nell'*illumipro-10* e dare inizio alla procedura reazione di amplificazione e il rilevamento. Per istruzioni dettagliate consultare il Manuale d'uso dell'*illumipro-10*. I risultati saranno visualizzati alla conclusione del ciclo.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

ID campione	Risultato riportato	Interpretazione
Campione del paziente	POSITIVO	Il campione contiene il DNA bersaglio di <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .
	NEGATIVO	Nessun DNA di <i>Mycoplasma pneumoniae</i> rilevato.
	NON VALIDO	Nessun risultato riferibile. Ripetere il test utilizzando il campione originale. Campione del paziente contenente sostanze inibenti, preparazione del campione non corretta, insuccesso del reagente, insuccesso dello strumento o insuccesso del controllo interno.
Controllo positivo	POSITIVO	Risultato di controllo positivo valido. Reagenti attivi al momento dell'uso, corretto funzionamento dell' <i>illumipro-10</i> .
	NEGATIVO	Risultato del controllo errato. Risultati del paziente non riferibili. Come prima opzione per identificare la causa del fallimento ripetere i test di controllo. Se il fallimento dei test di controllo dovesse ripetersi, contattare il Servizio di Assistenza tecnica Meridian (negli USA 001-800-343-3858) o il Distributore Locale (Italia +390331433636).
	NON VALIDO	Nessun risultato riferibile. Ripetere l'intero ciclo di analisi usando i campioni originali. Preparazione del campione non corretta, fallimento del reagente, fallimento dello strumento o fallimento del controllo interno.
Controllo negativo	POSITIVO	Risultato del controllo errato. Risultati del paziente non riferibili. Come prima opzione per identificare la causa del fallimento ripetere i test di controllo. Se il fallimento dei test di controllo dovesse ripetersi, contattare il Servizio di Assistenza tecnica Meridian (negli USA 001-800-343-3858) o il Distributore Locale (Italia +390331433636).
	NEGATIVO	Risultato di controllo negativo valido. Reagenti attivi al momento dell'uso, corretto funzionamento dell' <i>illumipro-10</i> .
	NON VALIDO	Nessun risultato riferibile. Ripetere l'intero ciclo di analisi usando i campioni originali. Preparazione del campione non corretta, fallimento del reagente, fallimento dello strumento o fallimento del controllo interno.
POZZETTO VUOTO	NESSUNO	Nessun dispositivo di test <i>illumigene</i> nel pozzetto <i>illumipro-10</i> . OPPURE Il presente dispositivo di test <i>illumigene</i> è compromesso a causa di un errore nella preparazione del campione, sporcizia nel dispositivo o posizionamento non corretto del dispositivo. Ripetere il test utilizzando il campione originale.

CONTROLLO QUALITÀ

Il test va eseguito conformemente ai requisiti stabiliti dai competenti enti locali, regionali, nazionali o dagli enti di accreditamento.

1. Ogni dispositivo contiene un controllo interno che verifica l'inibizione dell'amplificazione, i reagenti di analisi e l'efficacia del trattamento del campione. Il DNA di controllo interno è presente nel reagente di controllo II per il test e viene trattato attraverso tutte le fasi della procedura. I primer per l'amplificazione del DNA di controllo interno sono presenti nella camera di controllo del dispositivo di test *illumigene*.
2. La fase di trattamento termico viene monitorata con un termometro esterno e con un timer a intervalli. Utilizzare la memoria di temperatura max/min del termometro per garantire il mantenimento di una temperatura di 95 ± 5 C. Usare il timer a intervalli per garantire che la durata del trattamento termico sia di 10 ± 2 minuti.
3. La buona pratica di laboratorio raccomanda l'uso di materiali di controllo. Gli operatori devono attenersi alle appropriate linee guida regionali, statali e locali riguardanti l'esercizio dei controlli di qualità esterni.
4. **I reagenti di controllo esterni del test illumigene** Mycoplasma vengono forniti separatamente (Catalogo 279940). Si raccomanda di verificare la reattività di ogni nuovo lotto e di ogni nuova spedizione del test per *illumigene* Mycoplasma al momento della ricezione e prima dell'uso. I test di controllo esterni vanno eseguiti successivamente, in conformità con le appropriate linee guida regionali, statali e locali. Il kit del test *illumigene* Mycoplasma non va utilizzato nell'analisi dei pazienti se i controlli esterni non producono i risultati corretti.
5. Occorre utilizzare un dispositivo di test separato per ciascun reagente di controllo esterno. Per le procedure di analisi del controllo qualità esterno, consultare il foglietto illustrativo dei controlli esterni del test per *illumigene* Mycoplasma.

VALORI ATTESI

L'incidenza complessiva di *Mycoplasma pneumoniae* nei campioni biologici prelevati e analizzati in modo prospettico durante lo studio clinico del 2012 è stata dell'11,7% (12 su 103).

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

1. Questo prodotto può essere usato solo con lo strumento *illumipro-10*.
2. Il test per il DNA di *illumigene* Mycoplasma è un test qualitativo e non fornisce valori quantitativi o informazioni relative alla carica dell'organismo.

- Questo test non è stato valutato per monitorare il trattamento delle infezioni da *Mycoplasma pneumoniae*.
- Le infezioni del tratto respiratorio possono essere causate da *Mycoplasma pneumoniae* come pure da altri patogeni. I risultati positivi non precludono co-infezioni da parte di altri patogeni del tratto respiratorio.
- Le prestazioni del test non sono state determinate per l'analisi di campioni biologici diversi dai campioni biologici umani prelevati con tamponi faringei e nasofaringei, per i soggetti immunocompromessi o per l'analisi di campioni biologici prelevati da pazienti per cui non si sospetti infezione da *M. pneumoniae*.
- Il rilevamento dell'acido nucleico di *M. pneumoniae* dipende dall'adeguatezza delle operazioni di prelievo, manipolazione, trasporto, conservazione e preparazione (inclusa l'estrazione) dei campioni biologici. Il mancato rispetto della procedura appropriata per ciascuna di queste fasi può portare a risultati errati.
- Poiché nello studio clinico prospettico il numero di campioni biologici positivi era limitato, le caratteristiche prestazionali sono state determinate su campioni biologici per uso clinico sia prospettici che retrospettivi.
- La prevalenza dell'infezione da *M. pneumoniae* influenzerà il valore predittivo del test.
- Gli acidi nucleici degli organismi possono persistere *in vivo* indipendentemente dalla vitalità degli organismi stessi. Il rilevamento della sequenza bersaglio del DNA dell'analisi potrebbe non implicare la presenza degli agenti causali dei sintomi clinici. Il test per *illumigene* Mycoplasma non è in grado di distinguere tra soggetti portatori e soggetti infetti.
- I risultati devono essere interpretati unitamente all'anamnesi, ai dati epidemiologici e alle altre informazioni a disposizione del medico. Come per tutti i test diagnostici molecolari, (A) i risultati falsi negativi possono verificarsi in presenza di inibitori, errori tecnici, scambio di campioni o basso numero di organismi nel campione clinico, (B) i risultati falsi positivi possono verificarsi in presenza di contaminazione crociata da parte degli organismi bersaglio, dei rispettivi acidi nucleici o del prodotto di amplificazione nonché derivare da segnali aspecifici.
- L'effetto delle sostanze interferenti è stato valutato solo per le sostanze riportate nella documentazione che accompagna il prodotto. Le interferenze da parte di sostanze diverse da quelle descritte nella sezione "Test per sostanze interferenti" riportata qui di seguito potrebbero portare a risultati errati.
- L'analisi BLAST indica che i primer non reagiscono con altro organismo eccetto *M. pneumoniae*, tuttavia la reattività crociata con gli organismi del tratto respiratorio diversi da quelli elencati nella sezione "Reattività crociata" riportata qui di seguito potrebbe portare a risultati errati.
- Esiste la possibilità di ottenere un risultato falso negativo in presenza di elevate concentrazioni di *Moraxella catarrhalis*, *Nocardia asteroides* o Coronavirus. Per questi tre organismi, un risultato falso negativo è stato osservato solo in uno dei sette replicati con campioni analizzati in prossimità del limite di rilevamento durante l'analisi iniziale. Tale risultato non è stato confermato con ulteriori analisi.
- La fenilefrina cloridrato che si trova nei decongestionanti nasali ha prodotto risultati falsi negativi a concentrazioni superiori a 0,595 mg/mL durante l'analisi dei replicati al limite di rilevazione per il ceppo M129 di *M. pneumoniae*.

PRESTAZIONALI SPECIFICHE

Il test di amplificazione del DNA *illumigene* Mycoplasma è stato valutato nel 2012 da laboratori di analisi cliniche indipendenti che rappresentano regioni geograficamente distinte in tutti gli Stati Uniti. Un totale di 334 campioni biologici prelevati con tamponi faringei e nasofaringei (NP), raccolti da pazienti con sospetto di infezione da *Mycoplasma pneumoniae* sono stati valutati con il dispositivo di test per determinare le caratteristiche prestazionali. I campioni biologici erano rimanenze di campioni deidentificati, inviati ai laboratori per le analisi di routine su *M. pneumoniae*. I campioni biologici inclusi nella valutazione delle prestazioni erano campioni prospettici (mai congelati) e retrospettivi (congelati prima dell'analisi con *illumigene*). Le prestazioni del test *illumigene* sono state confrontate con un metodo di riferimento composito che includeva la coltura batterica di *M. pneumoniae* con identificazione e un test di PCR Real Time convalidato seguito da sequenziamento bidirezionale per i campioni biologici positivi. I campioni biologici che hanno fornito risultati positivi per *Mycoplasma pneumoniae* dalla coltura batterica o da PCR Real time e sequenziamento bidirezionale sono stati considerati positivi. I campioni biologici negativi sia alla coltura che alla PCR sono stati considerati negativi. Un totale di 12 campioni biologici sono stati esclusi dalla popolazione di campioni clinici in quanto i risultati della coltura sono stati inconcludenti e negativi alla PCR, rendendo l'orientamento finale dello stato dei pazienti non disponibile. Sono stati analizzati un totale di 103 campioni biologici prospettici (30,8%) e 219 campioni biologici retrospettivi (65,6%) con un solo risultato iniziale non valido (0,30%).

Le tabelle 1-2 riassumono le caratteristiche prestazionali. Dall'analisi statistica dei dati prestazionali per tipo di campione biologico non sono emerse differenze significative tra i tipi di campione identificati.

I dati indicano che le prestazioni risultano ottimali quando i campioni biologici vengono prelevati e analizzati in modo prospettico.

Tabella 1. Prestazioni del test per *Mycoplasma illumigene* : Tamponi nasofaringei

Descrizione dei campioni biologici	Campioni positivi			Campioni negativi			Risultati non validi
	<i>illumigene</i> rispetto a test di confronto	% Sensibilità o PPA	95 % CI	<i>illumigene</i> rispetto a test di confronto	% Specificità o NPA	95 % CI	
Test di confronto metodo composito							
Prospettivo	4/4	% Sensibilità 100 %	51,0 – 100,0 %	48/48	% Specificità 100 %	92,6 – 100,0 %	0
Retrospettivo	34/36	PPA 94,4 %	81,9 – 98,5 %	86/90	NPA 95,6 %	89,1 – 98,3 %	0
Test di PCR convalidato con sequenziamento bidirezionale di confronto							
Prospettivo	4/4	% Sensibilità 100 %	51,0 – 100,0 %	48/48	% Specificità 100 %	92,6 – 100,0 %	0
Retrospettivo	34/36	PPA 94,4 %	81,9 – 98,5 %	86/90	NPA 95,6 %	89,1 – 98,3 %	0

Tabella 2. Prestazioni del test per *Mycoplasma illumigene* : Tamponi faringei

Descrizione dei campioni biologici	Campioni positivi			Campioni negativi			Risultati non validi
	<i>illumigene</i> rispetto a test di confronto	% Sensibilità o PPA	95 % CI	<i>illumigene</i> rispetto a test di confronto	% Specificità o NPA	95 % CI	
Test di confronto metodo composito							
Prospettivo	8/8	% Sensibilità 100 %	67,6 – 100,0 %	43/43	% Specificità 100 %	91,8 – 100,0 %	0
Retrospettivo	22/26 ^a	PPA 84,6 %	66,5 – 93,9 %	66/67	NPA 98,5 %	92,0 – 99,7 %	1
Test di PCR convalidato con sequenziamento bidirezionale di confronto							
Prospettivo	8/8	% Sensibilità 100 %	67,6 – 100,0 %	43/43	% Specificità 100 %	91,8 – 100,0 %	0
Retrospettivo	21/21 ^b	PPA 100 %	84,5 – 100,0 %	70/72	NPA 97,2 %	90,4 – 99,2 %	1

a. Quattro campioni biologici inizialmente identificati tramite coltura come positivi non sono stati confermati dal test *illumigene* o dal metodo di PCR indipendente. I risultati suggeriscono una degradazione dei campioni durante la conservazione.

b. Un campione biologico inizialmente identificato come positivo tramite il test *illumigene* e tramite coltura è risultato negativo con il metodo di PCR indipendente. Questo campione biologico è classificato come falso positivo rispetto alla PCR.

Le informazioni sull'età erano note per l'83,5% dei pazienti (269 su 322) inclusi nell'analisi delle prestazioni. L'età dei pazienti analizzati era ripartita nel modo seguente: sette pazienti (2,6%) tra 0 e 28 giorni; 38 pazienti (14,1%) tra 29 giorni e 2 anni; 139 pazienti (51,7%) tra 2 e 12 anni; 61 pazienti (22,7%) tra 12 e 18 anni e 9 pazienti (3,3%) tra 18 e 21 anni. I restanti 15 pazienti partecipanti allo studio (5,6%) avevano un'età pari o superiore a 21 anni. Non sono state notate differenze nelle prestazioni in base all'età cronologica.

La popolazione dello studio includeva 90 pazienti di sesso femminile (27,9%) e 91 pazienti di sesso maschile (28,3%). Per 141 partecipanti allo studio (43,8%) non era noto il sesso. Nei campioni biologici per i quali era noto il sesso del paziente, non sono emerse differenze prestazionali legate al sesso.

Le prestazioni cliniche del test di amplificazione del DNA *illumigene* Mycoplasma sono state valutate analizzando i campioni biologici prelevati con tamponi faringei e nasofaringei deidentificati, che risultavano carenti in informazioni cliniche; di conseguenza, il numero di pazienti con *M. pneumoniae* inclusi negli studi clinici non è noto e le prestazioni per questo gruppo non possono essere descritte separatamente.

SENSIBILITÀ ANALITICA

La sensibilità analitica o limite di rilevamento per il test per *illumigene* Mycoplasma è stata determinata per due ceppi di *M. pneumoniae*.

Il limite di rilevamento è stato determinato usando un minimo di 20 replicati per ciascuna quantità da misurare e una probabilità fissa di ottenere risposte positive (es. 95%, dove 19 su 20 replicati sono positivi). L'analisi della sensibilità analitica è sintetizzata sotto:

<i>Mycoplasma pneumoniae</i> Descrizione dei ceppi	CFU/Test	CFU/mL
FH (ATCC 15531)	88	2350
M129	7,5	200

REATTIVITÀ DEL TEST

I seguenti ceppi di *M. pneumoniae* sono stati analizzati e hanno prodotto reazioni positive pari o inferiori al limite di rilevamento stabilito di 88 CFU/Test (2350 CFU/mL) con il test per *illumigene* Mycoplasma:

PI 1428 (ATCC 29085), MAC (ATCC 15492), M52 (ATCC 15293), Bru (ATCC 15377), M129-B170 (ATCC 29343), Mutante 22 (ATCC 39505) UAB 55612, UAB 56317, UMTB-10G (ATCC 49899). L'analisi ha dimostrato che con il test vengono rilevati sia i ceppi di tipo 1 che i ceppi di tipo 2.

RIPRODUCIBILITÀ

Per gli studi di riproducibilità sono stati forniti a tre laboratori indipendenti pannelli di 10 campioni codificati in cieco. I campioni sono stati ordinati casualmente all'interno di ciascun pannello per mascherare le identità dei campioni. I pannelli includevano campioni falsi forzati prodotti come campioni positivi bassi (ossia, vicino al limite di rilevamento, n=3) e campioni negativi elevati, (n=3). I pannelli comprendevano anche campioni falsi forzati positivi (n=3) e campioni naturali negativi (n=1). L'analisi è stata condotta da diversi operatori in ciascun laboratorio lo stesso giorno (variabilità intra-analisi) per cinque giorni (variabilità inter-analisi). In questo studio sono stati utilizzati tre lotti di test per *Mycoplasma illumigene* e cinque strumenti *illumipro-10*. I controlli positivi e negativi sono stati testati ogni giorno di analisi. I risultati sono mostrati nella tabella sotto:

Tipo campione	Laboratorio 1		Laboratorio 2		Laboratorio 3		Totale	
	Accordo percentuale	100 %	Accordo percentuale	100 %	Accordo percentuale	100 %	Accordo percentuale	100 %
Negativo	10/10	100 %	10/10	100 %	10/10	100 %	30/30	100 %
Negativo elevato	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %	90/90	100 %
Positivo basso	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %	90/90	100 %
Positivo	29/30	96,7 %	30/30	100 %	29/30	96,7 %	88/90	97,8 %
Controllo negativo	10/10	100 %	10/10	100 %	10/10	100 %	30/30	100 %
Controllo positivo	10/10	100 %	10/10	100 %	10/10	100 %	30/30	100 %

CROSS-REATTIVITÀ / STUDI SULL'INTERFERENZA MICROBICA

Sono stati eseguiti studi di reattività crociata con campioni biologici positivi e negativi inoculati con organismi batterici o funghi potenzialmente interferenti a concentrazioni finali di $1,0 \times 10^5$ CFU/mL. I virus sono stati analizzati a concentrazioni superiori a $1,0 \times 10^5$ TCID₅₀/mL o $1,0 \times 10^6$ copie/mL. Il DNA umano è stato analizzato a 2,0 ng/test e non è stata osservata alcuna reattività crociata. I campioni biologici positivi contenevano concentrazioni di *M. pneumoniae* vicine al limite di rilevamento. Nessuno dei seguenti organismi o materiali è stato identificato come cross-reattivo o interferente con il test per *Mycoplasma illumigene*:

Acinetobacter baumannii, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Actinomyces odontolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* (ESBL), *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* (KPC), *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella paratyphi* (Gruppo A), *Salmonella typhimurium* (Gruppo B), *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* (Gruppo B), *Streptococcus anginosus* (Gruppo F), *Streptococcus bovis* (Gruppo D), *Streptococcus canis* (Gruppo G), *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Ureaplasma urealyticum*, Adenovirus, Coxsackievirus, Cytomegalovirus, Epstein Barr virus, Herpes simplex virus 1, Herpes simplex virus 2, Metapneumovirus umano, Influenza A, Influenza B, virus della parainfluenza 1, virus della parainfluenza 2, virus della parainfluenza 3, virus sinciziale respiratorio A, virus sinciziale respiratorio B, Rhinovirus, DNA umano.

Moraxella catarrhalis, *Nocardia asteroides* e Coronavirus hanno prodotto risultati inattesi durante l'analisi iniziale. Tali risultati non sono stati confermati con ulteriori analisi. Per ciascun organismo, risultati falsi negativi si sono verificati in uno dei sette replicati analizzati vicino al limite di rilevamento.

TEST PER SOSTANZE INTERFERENTI

Le sostanze potenzialmente interferenti sono state analizzate con campioni simulati negativi e falsi forzati positivi (ceppi M129 e FH di *M. pneumoniae*). Le sostanze potenzialmente interferenti sono state diluite in soluzione fisiologica sterile, aggiunte al terreno M4 con tamponi in rayon (campioni negativi) e al terreno M4 con tamponi in poliestere (campioni falsi forzati positivi) e analizzate.

Le seguenti sostanze biologiche, alle specifiche concentrazioni di solvente/diluyente saturate, non interferiscono con i risultati del test per *illumigene* Mycoplasma: Muco (5,0 mg/mL), globuli bianchi (0,5% v/v) e sangue intero (5% v/v).

Le seguenti sostanze chimiche, alle specifiche concentrazioni di solvente/diluyente saturate, non interferiscono con i risultati del test per *illumigene* Mycoplasma: Acetaminofen (18,1 mg/mL), Albuterolo solfato (20 mg/mL), Aspirina (9,1 mg/mL), Azitromicina diidrato (2,0 mg/mL), Cepacol® collutorio [etanolo denaturato (1,4% v/v), cloruro di cetilpiridinio (0,005% v/v)], Contac® Cold + compresse per sintomi influenzali [acetaminofene (14,8 mg/mL), clorfenamina maleato (0,06 mg/mL), fenilefrina cloridrato (0,15 mg/mL)], difenidramina cloridrato (2,6 mg/mL), eritromicina (20,0 mg/mL), HALLS® gocce per alleviare la tosse [mentolo (0,06 mg/mL)], ibuprofene (12,7 mg/mL), fenilefrina cloridrato (0,595 mg/mL), prednisone (20,0 mg/mL), Robitussin® sciroppo decongestionante per la tosse e le vie respiratorie [destrometofano bromidrato (0,20 mg/mL), guaifenesina (2,0 mg/mL)], Soluzione fisiologica spray nasale [cloruro di sodio (0,65 mg/mL)].

La fenilefrina cloridrato che si trova nei decongestionanti nasali ha prodotto risultati falsi negativi a concentrazioni superiori a 0,595 mg/mL durante l'analisi dei replicati al limite di rilevamento per il ceppo M129 di *M. pneumoniae*.

FRANÇAIS



Mycoplasma DNA Amplification Assay

Test d'amplification de l'ADN pour la détection de *Mycoplasma pneumoniae* dans des prélèvements humains de gorge et nasopharyngés sur écouvillon

REF 280550

IVD Dispositif médical de diagnostic in vitro

BUT DE LA METHODE

Le test d'amplification de l'ADN *illumigene* Mycoplasma, réalisé sur l'instrument *illumipro-10™*, est un test qualitatif de diagnostic in vitro pour la détection directe de l'ADN de *Mycoplasma pneumoniae* dans des écouvillonnages de gorge et nasopharyngés humains prélevés chez des patients suspectés de présenter une infection à *Mycoplasma pneumoniae*.

Le test *illumigene* Mycoplasma utilise la technologie d'amplification génique isotherme (LAMP, loop-mediated isothermal DNA amplification) pour détecter *Mycoplasma pneumoniae* en ciblant un segment du génome de *Mycoplasma pneumoniae*.

Les résultats du test d'amplification de l'ADN *illumigene* Mycoplasma doivent être utilisés conjointement avec le tableau clinique, les autres résultats de laboratoire et les facteurs de risque épidémiologique en tant qu'aide au diagnostic de l'infection à mycoplasme et ils ne doivent pas être utilisés seuls pour le traitement ou une autre prise en charge du patient. Les résultats positifs n'excluent pas une co-infection par d'autres organismes, et les résultats négatifs obtenus chez des personnes atteintes d'infections des voies respiratoires peuvent être dus à des pathogènes n'étant pas détectés par ce test. Les infections des voies respiratoires basses dues à *M. pneumoniae* peuvent ne pas être détectées par ce test. Si une infection des voies respiratoires basses due à *M. pneumoniae* est suspectée, des analyses de laboratoire supplémentaires utilisant des procédés autres que le test d'amplification de l'ADN *illumigene* Mycoplasma peuvent être nécessaires.

Le test *illumigene* Mycoplasma est destiné à une utilisation dans les hôpitaux, centre de référence, dans les laboratoires publics ou privés. Le dispositif n'est pas prévu pour une utilisation dans une unité de soins ou au chevet des patients.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Le test d'amplification de l'ADN *illumigene* Mycoplasma est basé sur la technologie d'amplification génique isotherme (LAMP).¹ Le test cible une séquence de 208 paires de base (pb) du génome du *Mycoplasma pneumoniae*. La séquence d'ADN cible se situe dans le gène de la protéine analogue à la protéase intracellulaire et elle se retrouve dans toutes les séquences comprenant trois génomes de *Mycoplasma pneumoniae*.

L'amplification génique isotherme (LAMP) utilise des amorces spécialement conçues pour obtenir une amplification de l'ADN spécifique, continue et isotherme. Le pyrophosphate de magnésium est un produit secondaire de cette amplification, et forme un précipité blanc qui trouble la solution de réaction. Les caractéristiques d'absorbance de la solution de réaction sont suivies par l'instrument *illumipro-10* Incubateur/Lecteur de Meridian. La présence de l'ADN cible est signalée par la modification des caractéristiques d'absorbance de la solution de réaction en raison de la précipitation du pyrophosphate de magnésium. En l'absence de l'ADN cible, aucune modification significative de l'absorbance de l'échantillon n'est observée.

Le kit *illumigene* Mycoplasma est composé du contrôle de dosage II *illumigene* et des dispositifs de test *illumigene* Mycoplasma. Le contrôle de dosage II *illumigene*, utilisé pour la dilution et la préparation du prélèvement, est une solution tamponnée contenant de l'ADN de *Staphylococcus aureus*. Le dispositif de test *illumigene* Mycoplasma contient une bille de réactif d'amplification lyophilisé dans chacune de ses deux chambres: une chambre de TEST comprenant des amorces spécifiques au Mycoplasma et une chambre de CONTROLE comprenant des amorces spécifiques à *S. aureus*. L'ADN de *S. aureus* du réactif de contrôle et les amorces spécifiques à *S. aureus* dans la chambre de CONTROLE jouent le rôle de contrôle interne du dosage. Pendant la préparation du prélèvement, chaque échantillon de patient est dilué avec le réactif de contrôle et mélangé avec l'ADN de *S. aureus* avant l'amplification. L'ajout d'ADN de *S. aureus* à l'échantillon du patient permet de traiter en parallèle l'ADN cible et l'ADN de contrôle par la préparation, de l'amplification et de la détection de l'échantillon. Le contrôle interne permet de surveiller l'extraction de l'ADN, l'inhibition de l'amplification, la performance des réactifs du test et l'efficacité du traitement des échantillons. La cible de contrôle de *S. aureus* doit être amplifiée et détectée dans la réaction finale. Dans le cas contraire, le test est considéré comme étant non valide et les résultats du patient ne sont pas présentés.

L'instrument *illumipro-10* suit les modifications des caractéristiques d'absorbance en mesurant la transmission de la lumière à travers les solutions de réaction de test et de contrôle. La transmission de la lumière est contrôlée au début (Signal_{initial}, S_i) et à la fin (Signal_{final}, S_f) de l'exécution du test. L'instrument *illumipro-10* calcule la variation de la transmission de la lumière entre le début et la fin de l'exécution du test (S_f:S_i) et il compare le rapport à une valeur seuil prédéfinie.

Des valeurs seuil prédéfinies pour la chambre de TEST sont utilisées pour présenter les résultats des échantillons. Les rapports S_i/S_i inférieurs à 82 % dans la chambre de TEST sont présentés en résultat « POSITIF »; les rapports S_i/S_i supérieurs ou égaux à 82 % dans la chambre de TEST sont présentés en résultat « NÉGATIF ». Les valeurs numériques ne sont pas présentées.

Des valeurs seuil prédéfinies pour la chambre de CONTROLE sont utilisées pour confirmer la validité du test. Les rapports S_i/S_i inférieurs à 90 % dans la chambre de CONTROLE sont considérés comme valides et conduisent à la présentation des résultats de la chambre de TEST (POSITIF, NEGATIF). Les rapports S_i/S_i supérieurs ou égaux à 90 % dans la chambre de CONTROLE sont considérés comme non valides et empêchent la présentation des résultats pour la chambre de TEST. Les réactions non valides de la chambre de CONTROLE sont présentées comme « NON VALIDES ». Les valeurs numériques ne sont pas présentées.

Des critères d'exclusion plus sévères sont appliqués à la réaction de la chambre de CONTROLE pour s'assurer que l'amplification n'est pas inhibée, que les réactifs fonctionnent comme prévu et que l'échantillon a été traité de manière appropriée.

PRINCIPE DU TEST

Mycoplasma pneumoniae est une cause fréquente d'infections des voies respiratoires hautes et basses chez l'homme, notamment la pharyngite, la bronchite aiguë et la pneumonie.² Les mycoplasmes ont été identifiés en tant que pathogènes humains dans les années 1960, *Mycoplasma pneumoniae* étant le mieux connu et le plus étudié.³ L'organisme comprend un petit génome composé d'un unique chromosome circulaire et présente une membrane cellulaire à trois couches plutôt qu'une paroi cellulaire structurée.³ La taille et la structure de *Mycoplasma pneumoniae* ne permettent pas l'identification positive par les procédés traditionnels de coloration de Gram et de visualisation au microscope optique.

M. pneumoniae a été associé à une proportion de pneumonies communautaires pouvant atteindre 40 %.^{2,3} L'infection se produit chez les enfants comme chez les adultes, sans restriction de localisation géographique, de sexe ou de climat.^{3,6} *M. pneumoniae* est généralement associé à une pneumonie atypique, présentant des symptômes qui comprennent notamment les céphalées, les malaises, les myalgies, la fièvre et le mal de gorge, accompagnés d'une toux sèche paroxystique.^{3,4,6} La pneumonie à mycoplasme présente généralement une évolution clinique bénigne et elle guérit spontanément, mais elle a été associée à un taux de mortalité d'environ 1,4 %.⁴ Le nombre annuel d'infections à *M. pneumoniae* est estimé à 2 millions de cas, avec environ 100,000 hospitalisations liées à la pneumonie aux Etats-Unis chaque année.⁵ On estime que 18 % des cas de pneumonie communautaire nécessitant une hospitalisation chez les enfants sont provoqués par *M. pneumoniae*.³

La transmission de *M. pneumoniae* se produit généralement de personne à personne par les aérosols avec une période d'incubation signalée comprise entre une et quatre semaines.⁵ Comme les patients atteints d'infection à mycoplasmes active sont porteurs de *Mycoplasma* dans le nez, la gorge, la trachée et les expectorations, la dissémination de la maladie est facilitée par la toux qui l'accompagne.³ Ce mode de transmission se prête à des épidémies dans des structures à contact personnel rapproché, telles que les écoles, les casernes militaires, les entreprises, les camps d'été, les universités ou les instituts. De la même manière, la maladie se dissémine fréquemment entre les membres d'une famille vivant dans le même foyer.^{3,4,5,6}

Le diagnostic de l'infection aiguë à *M. pneumoniae* est difficile. Les stratégies de base du diagnostic en pratique clinique comprennent la culture et la sérologie. La culture de *M. pneumoniae* est souvent inadaptée à la prise en charge du patient, car l'organisme peut nécessiter une durée pouvant atteindre six semaines pour être cultivé.¹ Les produits de sérologie sont largement répandus et offrent des solutions pratiques de diagnostic, mais leur capacité à détecter une infection aiguë peut être limitée. Les tests sérologiques ciblent souvent des immunoglobulines spécifiques, les anticorps sériques IgM et IgG. Les anticorps IgM ne sont généralement pas détectables pendant les sept premiers jours d'apparition des symptômes, et ils peuvent persister pendant des mois après une infection active.² Les études indiquent que moins de 50 % des patients atteints d'une infection aiguë présentent une réponse positive aux IgG.²

Les nouvelles techniques de diagnostic, notamment les procédés d'amplification de l'ADN, peuvent permettre un diagnostic plus rapide en identifiant plus précocement les épidémies et en prévenant les cas secondaires par la mise en œuvre de mesures de contrôle.⁵

MATERIEL FOURNI

Le nombre maximal de tests pouvant être réalisés à partir de ce coffret est indiqué sur la boîte.

- Contrôle de dosage II *illumigene*:** solution tampon phosphate contenant des cellules d'*E. coli* traitées à la formaline et abritant un plasmide contenant un segment du génome de *S. aureus* avec de l'azide de sodium (0,09 %) en tant que conservateur.
- Tampon de réaction II *illumigene*:** solution tampon Tris contenant de l'azide de sodium (0,09 %) en tant que conservateur.
- Dispositif de test *illumigene Mycoplasma*:** dispositif à deux compartiments contenant les réactifs d'amplification lyophilisés (ADN polymérase, désoxynucléotide triphosphates) et, soit des amorces spécifiques des mycoplasmes (chambre de TEST), soit des amorces de contrôle (chambre de CONTROLE).
- Tubes de microcentrifugation à vis:** tubes de microcentrifugation de 1,5 mL sans ARNase/ADNase avec capuchons à vis.

MATERIEL FOURNI SEPARÉMENT

- Kit de contrôle externe *illumigene Mycoplasma*, numéro de référence: 279940

MATERIEL NON FOURNI

- Kit Qiagen QIAamp[®] DSP DNA Mini, numéro de référence: 61304
- Ethanol absolu (Ethanol 200 proof)
- Gants jetables en latex, non poudrés
- Embouts de pipettes résistant aux aérosols, sans ADNase/ARNase
- Système de collection et de transport d'échantillon
- Ecouvillons, nasopharyngé ou gorge: coton, mousse, nylon floqué, polyester ou rayonne
- Milieu de transport: solution saline à 0,85 %, milieu M4, M4-RT, M5 ou UTM-RT

EQUIPEMENT NON FOURNI

- Bain à sec avec élément thermique pouvant atteindre 56 C
- Bain à sec pour microtube de 12 mm pouvant atteindre 95 C
- Thermomètre digital avec mémoire de température maximale/minimale (par ex., thermomètre étanche/antichoc Traceable[®] Lollipop[™])
- Agitateur-mélangeur Vortex
- Minuteur
- Microcentrifugeuse
- Micropipette(s) pouvant distribuer 20, 50, 75, 100, 150, 200 et 500 µL
- illumipro-10[™]*, Meridian Bioscience, Inc. Numéro de référence: 610172

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Tous les réactifs sont uniquement destinés à un usage diagnostique in vitro.
- Ne pas mélanger des réactifs de contrôle de dosage II ou des dispositifs de test appartenant à des lots différents. Le tampon de réaction II et les tubes de microcentrifugation à vis sont interchangeables, à condition de se trouver dans les limites de la date de péremption au moment de leur utilisation.
- Respecter les recommandations de biosécurité de niveau 2 et les bonnes pratiques de laboratoire pendant l'analyse.⁶ Traiter tous les échantillons et les dispositifs de test usagés comme s'ils pouvaient transmettre des agents infectieux. Ne pas manger, boire ou fumer dans les espaces où les échantillons ou les réactifs du kit sont manipulés.
- Porter des gants jetables lors de la manipulation des échantillons. Se laver minutieusement les mains après la manipulation. Changer souvent de gants.
- Des programmes de contrôle de qualité pour laboratoires d'analyse moléculaire doivent être utilisés.⁷ Pour éviter le risque de faux positifs dus à la contamination par un organisme ou un amplicon, prendre des mesures de prévention (par ex., nettoyer la zone de travail avec un nettoyant approprié qui détruit l'acide nucléique, utiliser uniquement des embouts de pipette ne créant pas d'aérosols, manipuler un seul échantillon à la fois) comme l'exigent les bonnes pratiques moléculaires.
- Le dispositif de test *illumigene Mycoplasma* contient des réactifs lyophilisés. Ne pas retirer la pochette de protection avant d'être prêt à effectuer le test.
- Le dispositif de test *illumigene Mycoplasma* est muni d'un loquet conçu pour éviter la contamination de la zone de test avec le produit d'amplification. NE PAS utiliser les dispositifs de test dont le loquet est endommagé.
- Jeter les dispositifs de test *illumigene* immédiatement après le traitement en laissant le loquet bien en place. NE PAS ouvrir le dispositif de test après le traitement. L'ouverture du dispositif après l'amplification peut contaminer la zone de test avec le produit d'amplification.

PHRASES DE RISQUE ET CONSEILS DE PRUDENCE

A notre connaissance, il n'y pas de risque connu associé à ce produit.

DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

La date de péremption figure sur l'étiquette du kit. Conserver le kit à une température comprise entre 2 et 8 C.

PREPARATION DES REACTIFS

S'assurer que les réactifs du kit sont à la température ambiante (19 à 29 C) avant leur emploi. On pourrait obtenir des résultats incorrects si les réactifs ne sont pas amenés à la température ambiante avant l'emploi.

Consulter la notice du kit Qiagen QIAamp[®] DSP DNA Mini pour conserver et manipuler de manière appropriée les colonnes et les réactifs Qiagen Mini.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES SPECIMENS

Types d'échantillon: Prélèvements sur écouvillon de gorge et nasopharyngés.

Prélèvement des échantillons: Le prélèvement des échantillons doit être effectué conformément aux directives de l'établissement pour le recueil des échantillons cliniques respiratoires. Le ou les échantillons sur écouvillon doivent être recueillis avec les types appropriés d'écouvillon (par ex., en coton, mousse, nylon floqué, polyester ou rayonne).

Placer le ou les écouvillons dans un milieu de transport adapté (par ex., une solution saline à 0,85 %, un milieu M4, M4-RT, M5 ou UTM-RT) et les transporter jusqu'au laboratoire. Les échantillons doivent être maintenus entre 2 et 27 C pendant le transport.

Les échantillons peuvent être conservés jusqu'à 48 heures entre 19 et 29 C avant d'être analysés. Si l'on ne commence pas l'analyse dans ce délai, on peut conserver l'échantillon à une température de 2 à 8 C pendant cinq jours maximum.

PREPARATION DES SPECIMENS

REMARQUE: s'assurer que l'appareil *illumipro-10* est sous tension et que la vérification de ses performances a été accomplie avant le commencement de la PREPARATION DES SPECIMENS. Consulter le manuel de l'utilisateur de l' *illumipro-10* pour obtenir de plus amples renseignements sur l'installation et le fonctionnement de l'appareil.

Préparation de l'échantillon:

1. Mélanger minutieusement l'échantillon.
2. Ajouter 50 µL de contrôle de dosage II à un tube de lyse (LT) QIAamp correctement étiqueté.
3. Ajouter 150 µL de l'échantillon au tube de lyse contenant le contrôle de dosage II.

Extraction de l'échantillon avec le kit Qiagen QIAamp® DSP DNA Mini:

REMARQUE: Suivre les étapes indiquées ci-dessous pour l'extraction de l'échantillon.

1. Ajouter 20 µL de protéinase K QIAamp (PK) au tube de lyse contenant le contrôle de dosage II et l'échantillon.
2. Ajouter 200 µL de tampon de lyse QIAamp (AL) au tube de lyse contenant le contrôle de dosage II, l'échantillon et la protéinase K. Passer au Vortex pendant 10 secondes au minimum.
3. Chauffer le tube de lyse à 56 ± 3 C pendant 10 minutes.
4. Ajouter 200 µL d'éthanol absolu au tube de lyse. Passer au Vortex pendant 10 secondes.
5. Pipeter la totalité du contenu du tube de lyse dans une colonne de centrifugation QIAamp Mini muni d'un tube de lavage (Wash Tubes, WT).
6. Centrifuger la colonne de centrifugation Mini pendant 1 minute à ≥ 6000 x g OU 8000 tr/min. Jeter le tube de lavage et son contenu.
7. Placer la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un nouveau tube de lavage (WT) et ajouter 500 µL de tampon de lavage QIAamp reconstitué (AW1).
8. Centrifuger la colonne de centrifugation pendant 1 minute à ≥ 6000 x g OU 8000 tr/min. Jeter le tube de lavage et son contenu.
9. Placer la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un nouveau tube de lavage (WT) et ajouter 500 µL de tampon de lavage QIAamp reconstitué (AW2).
10. Centrifuger pendant 3 minutes à 20,000 x g OU 14,000 tr/min.
11. Retirer soigneusement la colonne de centrifugation Mini du tube de lavage, en s'assurant que la colonne ne touche pas l'écoulement. Jeter le tube de lavage et son contenu.
12. Placer la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un tube d'élution QIAamp (ET) correctement étiqueté, pipeter 100 µL de tampon d'élution QIAamp (AE) et l'ajouter à la colonne de centrifugation QIAamp Mini sans toucher la membrane de la colonne.
13. Laisser la colonne de centrifugation QIAamp Mini entre 19 et 29 C pendant 1 minute. Centrifuger pendant 1 minute à ≥ 6000 x g OU 8000 tr/min pour éluer l'ADN purifié.
14. Retirer avec précautions la colonne de centrifugation QIAamp Mini et la jeter.
15. Les échantillons extraits peuvent être maintenus entre 19 et 29 C pendant un maximum de 60 minutes avant le traitement thermique.

Traitement thermique:

1. Chauffer chaque tube d'élution contenant l'ADN extrait de l'échantillon ou du contrôle dans un bain à sec ou un élément thermique à 95 ± 5 C pendant 10 ± 2 minutes. Surveiller l'étape de traitement thermique à l'aide d'un thermomètre digital et d'un minuteur.
2. Retirer chaque tube d'élution du bain à sec ou de l'élément thermique et le centrifuger pendant 10 secondes à 2 000 x g OU 500 tr/min. Les échantillons ayant été traités thermiquement peuvent être conservés entre 19 et 29 C pendant un maximum de 15 minutes avant d'être analysés.

PROCEDURE DE TEST

REMARQUE: Il est possible de traiter au maximum 10 échantillons lors d'un seul passage dans l'*illumipro-10*. Consulter le manuel de l'utilisateur de l'*illumipro-10* pour obtenir de plus amples renseignements sur l'installation et le fonctionnement de l'appareil.

1. Transférer 75 µL de tampon de réaction II *illumigene* dans un tube à bouchon à vis (tube ST) correctement étiqueté.
2. Ajouter 75 µL d'ADN traité thermiquement au tube à bouchon à vis contenant le tampon de réaction II. Passer au Vortex pendant environ 10 secondes.
3. Répéter les étapes 1 et 2 pour tous les échantillons à tester.
4. Retirer 1 dispositif de test *illumigene* Mycoplasma de sa pochette de protection pour chaque échantillon. Ouvrir le dispositif avec précaution en tenant les compartiments de sorte que le réactif lyophilisé ne tombe pas au moment de l'ouverture. Placer le dispositif sur une surface plane ou sur un support adapté.
5. Transférer 50 µL de chaque échantillon traité thermiquement dans la chambre de TEST (bille blanche) du dispositif de test *illumigene*. Veiller à ne pas introduire d'air supplémentaire dans le mélange réactif. À l'aide d'un embout de pipette neuf, transférer 50 µL du tube à bouchon à vis contenant l'échantillon traité thermiquement dans la chambre de CONTROLE (bille jaune) du dispositif de test *illumigene*. Ne pas introduire de bulles d'air. Fermer le dispositif de test *illumigene* et le verrouiller correctement en rabattant le loquet.
6. Tapoter le dispositif sur la paillasse ou mélanger pour éliminer les bulles d'air. Examiner le dispositif de test avec soin pour vérifier qu'il n'existe plus de bulles d'air dans le tube et qu'aucun liquide ne reste dans les bouchons du dispositif. L'amplification et la détection doivent commencer dans les 15 minutes.
7. Insérer chaque dispositif de test *illumigene* dans l'*illumipro-10* et lancer la réaction d'amplification et la détection. Consulter le manuel de l'opérateur du système *illumipro-10* pour obtenir des instructions détaillées. Les résultats seront affichés à la fin de l'exécution du test.

INTERPRETATION DES RESULTATS

ID échantillon	Résultats indiqués	Interprétation
Spécimen du patient	POSITIF	L'échantillon contient de l'ADN cible de <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .
	NEGATIF	Aucun ADN de <i>Mycoplasma pneumoniae</i> n'a été détecté.
	NON VALIDE	Résultat non exploitable. Recommencer le test à l'aide des échantillons originaux. Spécimen de patient inhibiteur, mauvaise préparation des échantillons, échec du réactif, panne de l'instrument ou échec du contrôle interne.
Contrôle positif	POSITIF	Résultat de contrôle positif valide. Réactifs actifs au moment de l'utilisation, fonctionnement correct de l' <i>illumipro-10</i> .
	NEGATIF	Résultat de contrôle incorrect. Résultats de patient non exploitables. La première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée.
	NON VALIDE	Résultat non exploitable. Recommencer l'intégralité de l'analyse à l'aide des échantillons originaux. Mauvaise préparation des échantillons, échec du réactif, panne de l'instrument ou échec du contrôle interne.
Contrôle négatif	POSITIF	Résultat de contrôle incorrect. Résultats de patient non exploitables. La première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée.
	NEGATIF	Résultat de contrôle négatif valide. Réactifs actifs au moment de l'utilisation, fonctionnement correct de l' <i>illumipro-10</i> .
	NON VALIDE	Résultat non exploitable. Recommencer l'intégralité de l'analyse à l'aide des échantillons originaux. Mauvaise préparation des échantillons, échec du réactif, panne de l'instrument ou échec du contrôle interne.
PUITS VIDE	AUCUN	Aucun dispositif de test <i>illumigene</i> dans le puits de l' <i>illumipro-10</i> . OU Le dispositif de test <i>illumigene</i> présent ne répond pas en raison d'une mauvaise préparation des échantillons, de saleté ou d'un mauvais positionnement du dispositif. Recommencer le test à l'aide des échantillons originaux.

CONTROLE DE QUALITE

Ce test doit être réalisé en fonction des exigences des réglementations locales, et / ou nationales ou des directives des organismes d'accréditation.

1. Chaque dispositif contient un contrôle interne qui vérifie l'absence d'inhibition de l'amplification, l'efficacité des réactifs de test et du traitement des échantillons. L'ADN du contrôle interne est présent dans le réactif de contrôle de dosage II et il subit toutes les étapes de la procédure. Les amorces d'amplification de l'ADN du contrôle interne sont présentes dans la chambre de contrôle du dispositif de test *illumigene*.
2. L'étape du traitement thermique est surveillée avec un thermomètre et un minuteur externes. Utiliser la mémoire des températures maximum/minimum du thermomètre pour vérifier qu'une température de 95 ± 5 C est maintenue. Utiliser le minuteur pour vérifier que la durée du traitement thermique est de 10 ± 2 minutes.
3. Les bonnes pratiques de laboratoire recommandent l'emploi de matériels de contrôle. Les utilisateurs doivent suivre les directives locales, nationales ou fédérales appropriées relatives à l'exécution de contrôles de qualité externes.
4. Les réactifs de contrôle externe *illumigene* Mycoplasma sont vendus séparément (référence 279940). Il est recommandé de vérifier la réactivité de chaque nouveau lot et chaque nouvel envoi de *illumigene* Mycoplasma dès leur réception et avant l'emploi. Les tests de contrôle externe doivent ensuite être effectués en fonction des exigences locales, nationales et fédérales. Le kit de test *illumigene* Mycoplasma ne doit pas être utilisé pour tester les patients si les contrôles externes ne fournissent pas de résultats corrects.
5. Utiliser un dispositif de test séparé pour chaque réactif de contrôle externe. Consulter la notice des contrôles externes *illumigene* Mycoplasma pour obtenir des informations sur les procédures d'analyse du contrôle de qualité externe.

VALEURS ATTENDUES

L'incidence globale de *Mycoplasma pneumoniae* dans les échantillons prélevés de manière prospective et analysés au cours de l'étude clinique de 2012 était de 11,7 % (12/103).

LIMITES DU TEST

- Ce produit peut uniquement être utilisé avec l'instrument *illumipro-10*.
- Le test de l'ADN *illumigene* Mycoplasma est un test qualitatif qui ne fournit pas de valeurs quantitatives ou d'informations sur la charge en organismes.
- Ce dispositif n'a pas été évalué pour surveiller le traitement des infections à *Mycoplasma pneumoniae*.
- Les infections respiratoires peuvent être provoquées par *Mycoplasma pneumoniae* ainsi que par d'autres pathogènes. Des résultats positifs n'excluent pas une co-infection par d'autres pathogènes respiratoires.
- La performance du test n'a pas été établie sur des échantillons autres que des écouvillonnages humains nasopharyngés ou de gorge, sur des échantillons prélevés chez les personnes immunodéprimées ou chez des patients n'étant pas suspects de présenter une infection à *M. pneumoniae*.
- La détection de l'acide nucléique de *M. pneumoniae* dépend de la réalisation correcte du recueil, de la manipulation, du transport, de la conservation et de la préparation, y compris l'extraction, de l'échantillon. Le non-respect de la procédure appropriée lors de l'une de ces étapes peut entraîner des résultats incorrects.
- Comme le nombre d'échantillons positifs dans l'étude clinique prospective était limité, les caractéristiques de performance ont été établies avec des échantillons cliniques prospectifs et rétrospectifs.
- La prévalence de l'infection à *M. pneumoniae* influence la valeur prédictive du test.
- Les acides nucléiques de l'organisme peuvent persister *in vivo* de manière indépendante de la viabilité de l'organisme. La détection de l'analyte cible d'ADN peut ne pas impliquer la présence d'agents responsables de symptômes cliniques. Le test *illumigene* Mycoplasma ne fait pas la distinction entre les porteurs et les personnes infectées.
- Les résultats doivent être interprétés conjointement avec les antécédents cliniques, les données épidémiologiques et les autres informations à disposition du médecin. Comme avec tous les tests de diagnostic moléculaire, (A) des résultats faussement négatifs peuvent se produire en raison de la présence d'inhibiteurs, d'une erreur technique, d'un mélange d'échantillons ou de quantités faibles d'organismes dans l'échantillon clinique, (B) des résultats faussement positifs peuvent se produire en raison de la présence d'une contamination croisée par des organismes cibles, leurs acides nucléiques ou du produit amplifié, et en raison de signaux non spécifiques.
- L'effet des substances interférentes a été évalué uniquement pour les substances listées. L'influence de substances autres que celles décrites dans la section « Tests de substances interférentes » ci-dessous pourrait conduire à des résultats erronés.
- L'analyse BLAST ne met pas en évidence une réaction des amorces avec un organisme autre que *M. pneumoniae*. Cependant une réactivité croisée avec des organismes respiratoires autres que ceux répertoriés dans la section « Réactions Croisées » ci-dessous pourrait entraîner des résultats erronés.
- La présence de concentrations élevées de *Moraxella catarrhalis*, *Nocardia asteroides* ou Coronavirus peut entraîner un résultat faussement négatif. Pour ces trois organismes, un résultat faussement négatif a été observé dans un seul des sept répliqués d'échantillons testés à une concentration proche de la limite de détection lors de l'analyse initiale, résultat qui n'a pas été confirmé lors d'analyses ultérieures.
- L'hydrochlorure de phényléphrine présent dans des décongestionnants nasaux a entraîné des résultats faussement négatifs à des concentrations supérieures à 0,595 mg/mL au cours de la détermination de la limite de détection sur des répliqués de la souche M129 de *M. pneumoniae*.

PERFORMANCES DU TEST

Le test d'amplification de l'ADN *illumigene* Mycoplasma a été évalué en 2012 par des centres de tests cliniques indépendants représentant des régions géographiquement distinctes à travers les Etats-Unis. Au total, 334 écouvillonnages de gorge et nasopharyngés (NP) qualifiés recueillis auprès de patients suspects d'une infection à *Mycoplasma pneumoniae* ont été évalués avec le dispositif de test pour établir les caractéristiques des performances. Les échantillons étudiés étaient des restants d'échantillons, sans identification, soumis aux laboratoires d'analyse pour des tests de routine de *M. pneumoniae*. Les échantillons inclus dans l'évaluation de la performance étaient prospectifs (jamais congelés) et rétrospectifs (congelés avant l'analyse *illumigene*). La performance du système *illumigene* a été comparée à celle d'une méthode composite de référence qui comprenait une culture bactérienne de *M. pneumoniae* avec une identification et une analyse PCR en temps réel validée suivies d'un séquençage bidirectionnel pour les échantillons positifs. Les échantillons fournissant des résultats positifs pour *Mycoplasma pneumoniae* soit par la culture bactérienne soit par la PCR en temps réel et le séquençage bidirectionnel étaient considérés positifs. Les échantillons négatifs à la fois en culture et en PCR étaient considérés négatifs. Un total de, 12 échantillons a été exclus de la population d'échantillons cliniques étudiée, car leurs résultats de culture ne permettaient pas de conclure et leur PCR était négative, ce qui ne permettait pas de disposer du statut définitif du patient. Au total, 103 (30,8 %) échantillons prospectifs et 219 (65,6 %) échantillons rétrospectifs ont été testés, parmi lesquels un résultat initial a été observé non valide (0,30 %).

Les tableaux 1 et 2 résument les caractéristiques des performances. L'analyse statistique des données de performance par type d'échantillon a été réalisée et n'a pas montré de différence significative entre les types d'écouvillon identifiés.

Les données indiquent que la performance est optimale quand les échantillons sont recueillis et testés de manière prospective.

Tableau 1 . Performances du test *illumigene* Mycoplasma Ecouvillons nasopharyngés

Description de l'échantillon	Echantillons positifs			Echantillons négatifs			Résultats non valides
	<i>illumigene</i> vs. comparateur	% sensibilité ou VPP	IC à 95 %	<i>illumigene</i> vs. comparateur	% spécificité ou VNP	IC à 95 %	
En comparaison à la méthode composite							
Prospectif	4/4	% sensibilité 100 %	51,0 – 100,0 %	48/48	% spécificité 100 %	92,6 – 100,0 %	0
Rétrospectif	34/36	VPP 94,4 %	81,9 – 98,5 %	86/90	VNP 95,6 %	89,1 – 98,3 %	0
En comparaison à la PCR validée avec séquençage bidirectionnel							
Prospectif	4/4	% sensibilité 100 %	51,0 – 100,0 %	48/48	% spécificité 100 %	92,6 – 100,0 %	0
Rétrospectif	34/36	VPP 94,4 %	81,9 – 98,5 %	86/90	VNP 95,6 %	89,1 – 98,3 %	0

Tableau 2. Performances du test *illumigene* Mycoplasma: Ecouvillons de gorge

Description de l'échantillon	Echantillons positifs			Echantillons négatifs			Résultats non valides
	<i>illumigene</i> vs. comparateur	% sensibilité ou VPP	IC à 95 %	<i>illumigene</i> vs. comparateur	% spécificité ou VNP	IC à 95 %	
En comparaison à la méthode composite							
Prospectif	8/8	% sensibilité 100 %	67,6 – 100,0 %	43/43	% spécificité 100 %	91,8 – 100,0 %	0
Rétrospectif	22/26 ^a	VPP 84,6 %	66,5 – 93,9 %	66/67	VNP 98,5 %	92,0 – 99,7 %	1
En comparaison à la PCR validée avec séquençage bidirectionnel							
Prospectif	8/8	% sensibilité 100 %	67,6 – 100,0 %	43/43	% spécificité 100 %	91,8 – 100,0 %	0
Rétrospectif	21/21 ^b	VPP 100 %	84,5 – 100,0 %	70/72	VNP 97,2 %	90,4 – 99,2 %	1

- Quatre échantillons identifiés à l'origine par culture comme étant positifs n'ont pas été confirmés, ni par le test *illumigene* ni par le procédé de PCR indépendant. Les résultats suggèrent une dégradation de l'échantillon au cours de sa conservation.
- Un prélèvement identifié à l'origine comme étant positif par le test *illumigene* et par la culture était négatif par le procédé PCR indépendant. Cet échantillon est classé comme étant faussement positif par rapport à la PCR.

L'âge de 83,5 % (269/322) des patients était connu et a été inclus dans l'analyse des performances. Sept (2,6 %) patients testés étaient âgés de 0 à 28 jours; 38 (14,1 %) patients étaient âgés de 29 jours à 2 ans; 139 (51,7 %) patients étaient âgés de 2 à 12 ans; 61 (22,7 %) patients étaient âgés de 12 à 18 ans; et 9 (3,3 %) patients étaient âgés de 18 à 21 ans. Les 15 (5,6 %) patients restants étaient âgés de plus de 21 ans. Aucune différence de performance n'a été constatée en fonction de l'âge des patients.

La population de l'étude a inclus 90 (27,9 %) patients de sexe féminin et 91 (28,3 %) patients de sexe masculin. Le sexe n'était pas connu pour 141 (43,8 %) participants de l'étude. Dans les échantillons pour lesquels le sexe du patient était connu, aucune différence de performance n'a été constatée en fonction du sexe.

La performance clinique du test d'amplification de l'ADN *illumigene* Mycoplasma a été évaluée par l'analyse d'écouvillonnages nasopharyngés et de gorge sans identification ni informations cliniques. Par conséquent, le nombre de patients atteints de pneumonie à *M. pneumoniae* inclus dans les études cliniques est inconnu et la performance dans ce groupe ne peut pas être décrite de manière distincte.

SENSIBILITE ANALYTIQUE

La sensibilité analytique ou Limite de détection du test *illumigene* Mycoplasma a été déterminée pour deux souches de *M. pneumoniae*.

La Limite de détection a été déterminée à l'aide d'un minimum de 20 répliqués pour chaque mesurande et une probabilité fixe (par ex., 95 % lorsque 19 répliqués sur 20 sont positifs) d'obtenir des réponses positives. Les tests de sensibilité analytique sont résumés ci-dessous:

<i>Mycoplasma pneumoniae</i> Description de la souche	UFC/Test	UFC/mL
FH (ATCC 15531)	88	2 350
M129	7,5	200

REACTIVITE DU TEST

Les souches suivantes de *M. pneumoniae* ont été testées et ont donné des réactions positives au niveau ou en dessous de la limite de détection établie du test, soit 88 UFC/Test (2 350 UFC/mL) avec le test *illumigene* Mycoplasma: PI 1428 (ATCC 29085), MAC (ATCC 15492), M52 (ATCC 15293), Bru (ATCC 15377), M129-B170 (ATCC 29343), Mutant 22 (ATCC 39505) UAB 55612, UAB 56317, UMTB-10G (ATCC 49899). L'analyse a démontré que le test détecte à la fois les souches de type 1 et de type 2.

REPRODUCTIBILITE

Des panels de 10 échantillons codés en aveugle ont été fournis à trois laboratoires indépendants pour des études de reproductibilité. Les échantillons ont été triés de façon aléatoire pour chaque panel afin de masquer l'identité de l'échantillon. Les panels comprenaient des échantillons artificiels fabriqués au voisinage de la limite de détection (c.-à-d., échantillon faiblement positif, n=3) et des échantillons fortement négatifs, (n=3). Les panels comprenaient aussi des échantillons rendus artificiellement positifs (n=3) et des échantillons naturellement négatifs (n=1). Les tests furent exécutés par des techniciens différents dans chaque centre, le même jour (variabilité intra-test), pendant cinq jours (variabilité inter-tests). Trois lots de test *illumigene* Mycoplasma et cinq instruments *illumipro-10* ont été utilisés dans cette étude. Les contrôles positifs et négatifs furent testés chaque jour de test. Les résultats sont indiqués dans le tableau ci-dessous:

Type d'échantillon	Centre 1		Centre 2		Centre 3		Total	
	Pourcentage de concordance	Pourcentage de concordance	Pourcentage de concordance	Pourcentage de concordance	Pourcentage de concordance	Pourcentage de concordance	Pourcentage de concordance	
Négatif	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%	30/30	100%
Fortement négatif	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%	90/90	100%
Faiblement positif	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%	90/90	100%
Positif	29/30	96,7%	30/30	100%	29/30	96,7%	88/90	97,8%
Contrôle négatif	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%	30/30	100%
Contrôle positif	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%	30/30	100%

REACTIONS CROISEES / ETUDES D'INTERFERENCES MICROBIENNES

Des études de réactivité croisée ont été effectuées sur des spécimens positifs et négatifs, inoculés avec des organismes bactériens ou fongiques susceptibles d'interférence, de manière à obtenir une concentration finale minimale de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL. Les virus ont été testés à des concentrations supérieures à $1,0 \times 10^5$ DICT₅₀/mL ou $1,0 \times 10^6$ copies/mL. L'ADN humain a été testé à 2,0 ng/test et aucune réactivité croisée n'a été constatée. Les échantillons positifs contenaient des concentrations de *M. pneumoniae* proches de la limite de détection. Aucun des organismes ou produits suivants n'a été identifié comme présentant une réaction croisée ou une interférence avec le test *illumigene* Mycoplasma:

Acinetobacter baumannii, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Actinomyces odontolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* (BLSE), *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* (KPC), *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella paratyphi* (Groupe A), *Salmonella typhimurium* (Groupe B), *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* (Groupe B), *Streptococcus anginosus* (Groupe F), *Streptococcus bovis* (Groupe D), *Streptococcus canis* (Groupe G), *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Ureaplasma urealyticum*, Adenovirus, Coxsackievirus, Cytomegalovirus, virus d'Epstein Barr, virus Herpès simplex 1, virus Herpès simplex 2, Metapneumovirus humain, Influenza A, Influenza B, virus Parainfluenza 1, virus Parainfluenza 2, virus Parainfluenza 3, virus respiratoire syncytial A, virus respiratoire syncytial B, Rhinovirus, ADN humain.

Moraxella catarrhalis, *Nocardia asteroides* et Coronavirus ont donné des résultats inattendus au cours de l'analyse initiale qui n'ont pas été confirmés lors d'une analyse ultérieure. Pour chaque organisme, des résultats faussement négatifs se sont produits dans un des sept réplicats testés à une concentration proche de la limite de détection.

TESTS POUR LES SUBSTANCES INTERFERENTES

Des substances interférentes ont été testées avec des échantillons simulés négatifs et artificiellement positifs (souches M129 et FH de *M. pneumoniae*). Les substances interférentes ont été diluées dans une solution saline stérile et ajoutées à un milieu M4 contenant des écouvillons en rayonne (échantillon négatif) et à un milieu M4 contenant des écouvillons en polyester (échantillon artificiellement positif) et elles ont été testées.

Les substances biologiques suivantes, aux concentrations solvants/diluants spécifiées, n'ont provoqué aucune interférence sur les résultats du test *illumigene* Mycoplasma: mucus (5,0 mg/mL), leucocytes (0,5 % v/v) et sang total (5 % v/v).

Les substances chimiques suivantes, aux concentrations solvants/diluants spécifiées, n'ont provoqué aucune interférence sur les résultats du test *illumigene* Mycoplasma: acétaminophène (18,1 mg/mL), sulfate d'albutérol (20 mg/mL), aspirine (9,1 mg/mL), azithromycine déshydratée (2,0 mg/mL), Cepaco® lavage buccal [éthanol dénaturé (1,4 % v/v), chlorure de cétylpyridinium (0,005 % v/v)], Contac® comprimés contre le rhume et la grippe [acétaminophène (14,8 mg/mL), maléate de chlorphéniramine (0,06 mg/mL), phényléphrine HCl (0,15 mg/mL)], diphenhydramine HCl (2,6 mg/mL), érythromycine (20,0 mg/mL), HALLS® gouttes contre la toux [menthol (0,06 mg/mL)], ibuprofène (12,7 mg/mL), phényléphrine HCl (0,595 mg/mL), prednisone (20,0 mg/mL), Robitussin® sirop contre la toux et la congestion bronchique [dextrométhorphan HBr (0,20 mg/mL), guaifénésine (2,0 mg/mL)], pulvérisation nasale saline [chlorure de sodium (0,65 mg/mL)].

L'hydrochlorure de phényléphrine présent dans les décongestionnants nasaux a produit des résultats faussement négatifs aux concentrations supérieures à 0,595 mg/mL pendant l'analyse sur des réplicats de la souche M129 de *M. pneumoniae* à la limite de détection.

ESPAÑOL



Mycoplasma DNA Amplification Assay

Ensayo de amplificación de ADN para la detección de *Mycoplasma pneumoniae* en muestras de exudados extraídos de la faringe y de la región nasofaríngea de seres humanos

REF 280550

IVD Dispositivo médico para diagnóstico in vitro

USO INDICADO

El ensayo *illumigene* Mycoplasma realizado en el sistema *illumipro-10™* es una prueba cualitativa de diagnóstico in vitro para la detección directa de ADN de *Mycoplasma pneumoniae* en exudados humanos faríngeos y nasofaríngeos obtenidos de pacientes que se sospecha que pueden estar infectados por *Mycoplasma pneumoniae*.

El ensayo *illumigene* Mycoplasma utiliza una tecnología de amplificación isotérmica del ADN mediada por bucle (LAMP, por sus siglas en inglés) para detectar *Mycoplasma pneumoniae* dirigiéndose a un segmento del genoma de *Mycoplasma pneumoniae*.

Los resultados del ensayo de amplificación de ADN de Mycoplasma obtenidos con *illumigene* deben utilizarse junto con los datos de presentación clínica, otros hallazgos de laboratorio y los factores de riesgo epidemiológico como ayuda para diagnosticar infecciones por Mycoplasma, y no deben emplearse como base exclusiva para el tratamiento o para otras medidas adoptadas con el paciente. La aparición de resultados positivos no permite descartar coinfecciones con otros microorganismos, y los resultados negativos obtenidos en personas con infecciones de las vías respiratorias pueden deberse a microbios patógenos que no detecte este ensayo. Este ensayo puede no detectar infecciones de las vías respiratorias bajas por *M. pneumoniae*. En caso de sospecha de infección de las vías respiratorias bajas por *M. pneumoniae*, tal vez sea necesario realizar otras pruebas de laboratorio por métodos ajenos al ensayo de *illumigene* Mycoplasma.

illumigene Mycoplasma está diseñado para su uso en laboratorios de hospital, de referencia o estatales. El dispositivo no es para uso en punto-de-cuido.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

El ensayo de *illumigene* Mycoplasma se basa en la tecnología de amplificación mediada por bucle (LAMP).¹ Este ensayo se dirige a una secuencia de 208 pares de bases (pb) del genoma de *Mycoplasma pneumoniae*. La secuencia de ADN objetivo se halla en el gen de la proteína homóloga de la endopeptidasa intracelular, y se encuentra en todas las secuencias de tres genomas de *Mycoplasma pneumoniae*.

La amplificación mediada por bucle utiliza cebadores especialmente diseñados para proporcionar amplificación de ADN isotérmica específica y continua. Un subproducto de esta amplificación es la formación de pirofosfato de magnesio, que crea un precipitado blanco que provoca turbidez en la solución de reacción. Las características de absorbancia de la solución de reacción se vigilan mediante el Lector/Incubadora Meridian *illumipro-10*. Los cambios en las características de absorbancia de la solución de reacción que se generan a partir de la precipitación del pirofosfato de magnesio indican la presencia del ADN objetivo. La ausencia del ADN objetivo no tiene como resultado un cambio significativo en la absorbancia de la muestra.

El equipo de *illumigene* Mycoplasma incluye el Control de Ensayos II de *illumigene* y los Dispositivos de Prueba *illumigene* Mycoplasma. El Control de Ensayos II de *illumigene*, utilizado para la dilución y preparación de muestras, es una solución tamponada que contiene ADN de *Staphylococcus aureus*. El dispositivo de prueba *illumigene* Mycoplasma contiene una microesfera de reactivo de amplificación liofilizado en cada una de las dos cámaras: una cámara de PRUEBA con cebadores específicos para Mycoplasma y una cámara de CONTROL con cebadores específicos para *S. aureus*. El ADN de *S. aureus* del reactivo de control y los cebadores específicos para *S. aureus* de la cámara de CONTROL funcionan como control interno para el ensayo. Durante la preparación de las muestras, se diluye cada muestra de paciente con el reactivo de control y se combina con ADN de *S. aureus* antes de la amplificación. La adición de ADN de *S. aureus* a la muestra del paciente permite el procesamiento paralelo del ADN objetivo y del ADN del control a través de la preparación, la amplificación y la detección de la muestra. El control interno monitoriza la extracción del ADN, la inhibición de la amplificación, el rendimiento de los reactivos del ensayo y la eficacia del procesamiento de la muestra. El objetivo de control del *S. aureus* debe amplificarse y detectarse en la reacción final, o la prueba se considerará no válida y no se darán a conocer los resultados del paciente.

El *illumipro-10* monitoriza los cambios en las características de absorción a través de la medición de la transmisión de luz por las soluciones de reacción de Prueba y Control. La transmisión de luz se comprueba al Inicio del proceso (Señal_{inicial}, S_i) y al Final del proceso (Señal_{final}, S_f) del ensayo. El *illumipro-10* calcula el cambio producido en la transmisión de luz entre el Final del proceso y el Inicio del proceso (S_f/S_i) y compara el porcentaje con un valor de corte fijo.

Los valores de corte fijos de la cámara de PRUEBA se utilizan para informar resultados de muestras. Los porcentajes de la cámara de PRUEBA S_f/S_i inferiores al 82 % se muestran como «POSITIVO»; los porcentajes de la cámara de PRUEBA S_f/S_i superiores o iguales al 82 % se muestran como «NEGATIVO». Los valores numéricos no se informan.

Los valores de corte fijos de la cámara de CONTROL se utilizan para determinar la validez. Los porcentajes S_f/S_i de la cámara de CONTROL inferiores al 90 % se consideran válidos y permiten mostrar los resultados de la cámara de PRUEBA (POSITIVO, NEGATIVO). Los porcentajes S_f/S_i de la cámara de CONTROL superiores o iguales al 90 % se consideran no válidos e impiden notificar los resultados de la cámara de PRUEBA. Las reacciones no válidas de la cámara de CONTROL se informan como «NO VÁLIDAS». Los valores numéricos no se informan.

Los criterios de corte más rigurosos se aplican a la reacción de la cámara de CONTROL para garantizar que no se inhiba la amplificación, que los reactivos tengan el rendimiento esperado y que el procesamiento de muestras se haya realizado adecuadamente.

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

Mycoplasma pneumoniae es un microorganismo que causa comúnmente en el ser humano infecciones de las vías respiratorias superiores e inferiores, como faringitis, bronquitis aguda y neumonía². Los *Mycoplasmas* empezaron a reconocerse como microbios patógenos para el ser humano en la década de 1960, siendo *Mycoplasma pneumoniae* la especie mejor conocida y más estudiada.³ Entre otras características de este microorganismo se encuentran un pequeño genoma formado por un único cromosoma circular y una membrana celular de tres capas en lugar de una pared celular estructurada.⁵ El tamaño y la estructura de *Mycoplasma pneumoniae* impiden su identificación positiva a través de los métodos tradicionales de tinción de Gram y de visualización por microscopía óptica.

M. pneumoniae se ha asociado hasta con un 40 %^{2,3} de las neumonías obtenidas fuera de hospitales. Esta infección se produce tanto en niños como en adultos, independientemente de la localización geográfica, del sexo y del clima.^{3,6} *M. pneumoniae* se asocia sobre todo a la neumonía atípica, cuyos síntomas incluyen dolor de cabeza, malestar general, mialgias, fiebre y faringitis, acompañados por una tos seca y convulsiva.^{3,4,6} Aunque la evolución clínica de la neumonía por *Mycoplasma* suele ser leve y remitir espontáneamente, se ha asociado a un índice de mortalidad de aproximadamente el 1,4 %.⁴ Se calcula que en Estados Unidos se producen cada año 2 millones de casos de infecciones por *M. pneumoniae*, con alrededor de 100,000 hospitalizaciones relacionadas con la neumonía.⁵ Se calcula que hasta un 18 % de los casos de niños que requieren hospitalización por neumonías obtenidas fuera de hospitales están provocados por *M. pneumoniae*³.

La transmisión del *M. pneumoniae* se produce generalmente de una persona a otra por inhalación, con un período de incubación descrito de una a cuatro semanas.⁵ Dado que los pacientes con infección activa por *Mycoplasma* son portadores de este microorganismo en la nariz, en la garganta, en la tráquea y en el esputo, la tos que la acompaña facilita la propagación de la enfermedad.⁵ Este modo de transmisión se presta a la aparición de brotes en entornos donde existe contacto personal estrecho, como colegios, cuarteles, empresas, campamentos de verano, universidades o instituciones. Asimismo, esta enfermedad se contagia habitualmente entre los miembros de una misma familia que conviven en el hogar.^{3,4,5,6}

El diagnóstico de la infección aguda por *M. pneumoniae* resulta difícil. Algunas de las estrategias básicas para su diagnóstico en la práctica clínica son los cultivos y las pruebas serológicas. El cultivo de *M. pneumoniae* suele ser poco práctico para tratar al paciente, ya que este microorganismo puede tardar hasta seis semanas en proliferar.¹ Aunque se comercializan numerosos productos para realizar pruebas serológicas que ofrecen soluciones prácticas de diagnóstico, estas pueden resultar limitadas en cuanto a su capacidad para detectar una infección aguda. Los ensayos serológicos suelen dirigirse a las inmunoglobulinas específicas, a la presencia de anticuerpos IgM e IgG en suero. Los anticuerpos IgM por lo general no son detectables durante los siete primeros días de aparición de los síntomas, y pueden persistir durante meses tras la infección activa.² Existen estudios que indican que menos del 50 % de los pacientes que padecen infección aguda muestran una respuesta IgG positiva.²

Las nuevas técnicas de diagnóstico, como los métodos de amplificación del ADN, pueden agilizar el diagnóstico al permitir una detección más rápida de los brotes y prevenir casos secundarios mediante la implantación de medidas de control.⁵

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

El número máximo de pruebas que se puede obtener con este equipo está indicado en el exterior de la caja.

1. **Control de Ensayos II *illumigene***: Solución tamponada con fosfato que contiene células de *E. coli* tratadas con formol que albergan plásmido que contiene un segmento del genoma de *S. aureus* con azida sódica (0,09 %) como conservante.
2. **Tampón de Reacción II *illumigene***: Solución tamponada con Tris que contiene azida sódica (0,09 %) como conservante.
3. **Dispositivo de Prueba *illumigene* Mycoplasma**: Dispositivo de dos cámaras que contiene reactivos de amplificación liofilizados (ADN polimerasa, trifosfatos de desoxirribonucleótidos) y, o bien cebadores específicos de *Mycoplasma* (cámara de PRUEBA) o cebadores de control (cámara de CONTROL).

4. **Tubos de microcentrifugación con tapa de rosca**: tubos de microcentrifugación de 1,5 mL con tapa de rosca sin RNasa ni DNasa.

MATERIALES PROPORCIONADOS POR SEPARADO

1. Equipo de Control Externo *illumigene* Mycoplasma, número de catálogo: 279940

MATERIALES NO PROPORCIONADOS

1. Qiagen QIAamp® DSP DNA Mini Kit, número de catálogo: 61304
2. Etanol puro (Ethanol 200 proof)
3. Guantes desechables de látex, sin polvo
4. Puntas de pipeta resistentes al aerosol, libres de ribonucleasa/desoxirribonucleasa
5. Sistema de recogida y transporte de muestras
6. Hisopos nasofaríngeos o faríngeos: algodón, espuma, nylon flocado, poliéster o rayón
7. Medio de transporte: solución salina al 0,85 %, M4, M4-RT, M5 o UTM-RT

EQUIPO NO PROPORCIONADO

1. Baño seco con bloqueo de calor que admita 56 C
2. Baño seco con 12 mm de bloqueo de calor capaz de 95 C
3. Termómetro digital con memoria de temperatura máx./mín. (p. ej., termómetro sumergible a prueba de golpes Traceable® Lollipop™)
4. Mezclador Vortex
5. Temporizador de intervalos
6. Microcentrifugadora
7. Micropipeta(s) capaces de dispensar 20, 50, 75, 100, 150, 200 y 500 µl
8. *illumipro-10™*, Meridian Bioscience, Inc. Número de catálogo: 610172

PRECAUCIONES:

1. Todos los reactivos son sólo para uso diagnóstico in vitro.
2. No intercambiar Reactivos de Control de Ensayo II o Dispositivos de Prueba entre lotes. El Tampón de Reacción II y los tubos de microcentrifugación con tapón de rosca son intercambiables, siempre y cuando en el momento de utilizarlos se encuentren dentro de las fechas de caducidad asignadas.
3. Siga las prácticas de bioseguridad de nivel 2 y de laboratorio correctas durante la realización de las pruebas.⁶ Trate todas las muestras y los dispositivos de prueba utilizados como si fueran capaces de transmitir microbios infecciosos. No coma, beba ni fume en las zonas donde se manejan los reactivos del kit o las muestras.
4. Use guantes desechables cuando maneje las muestras y lávese bien las manos después. Cámbiese los guantes a menudo.
5. Deben adoptarse los Programas de Control de Calidad para Laboratorios de Pruebas Moleculares.⁷ Para evitar el riesgo de falsos resultados positivos por contaminación con microorganismos/amplicones, adopte las medidas preventivas que exijan las prácticas moleculares correctas (p. ej., limpiar la zona de trabajo con un producto adecuado que destruya el ácido nucleico, utilizar únicamente puntas de pipeta resistentes a los aerosoles, manejar solo una muestra cada vez).
6. El Dispositivo de Prueba *illumigene* Mycoplasma contiene reactivos liofilizados. La bolsa de protección no debería abrirse hasta que esté listo para realizar el ensayo.
7. El Dispositivo de Prueba *illumigene* Mycoplasma incluye un sistema de cierre diseñado para evitar la contaminación de la zona de prueba con el producto de amplificación. NO use dispositivos de prueba con cierres rotos.
8. Deseche los dispositivos de prueba usados de *illumigene* inmediatamente después del proceso, poniendo el cierre del dispositivo en su lugar firmemente. NO abra el dispositivo de prueba después del procesamiento. Abrir el dispositivo después de la amplificación puede provocar una contaminación de la zona de prueba con el producto de amplificación.

FRASES DE RIESGO Y SEGURIDAD

No se conoce ningún riesgo asociado con este producto.

VIDA UTIL Y ALMACENAMIENTO

La fecha de caducidad se indica en la etiqueta del equipo. Almacene el equipo a una temperatura entre 2 y 8 C.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Asegúrese de que los reactivos del equipo estén a temperatura ambiente (19-29 C) antes de su uso. Se pueden obtener resultados incorrectos si los reactivos no están a temperatura ambiente antes del uso.

Consulte en el folleto del envase de Qiagen QIAamp® DSP DNA Mini Kit cómo guardar y manejar debidamente las columnas y los reactivos Qiagen Mini.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Tipos de muestras: Muestras de exudados faríngeos y nasofaríngeos.

Toma de muestras: La toma de muestras se debe realizar de acuerdo con las directrices institucionales para la toma de muestras clínicas respiratorias. Las muestras de exudados deben obtenerse empleando hisopos adecuados (p. ej., de algodón, espuma, nylon flocado, poliéster o rayón).

Deposite el/los hisopo(s) en un medio de transporte adecuado (p. ej., solución salina al 0,85 %, M4, M4-RT, M5 o UTM-RT) y trásídelos al laboratorio. Las muestras se deben mantener a una temperatura entre 2 y 27 C durante el transporte.

Las muestras se pueden mantener a una temperatura entre 19 y 29 C durante un máximo de 48 horas antes de la prueba. Si no se inicia la prueba en ese período, la muestra puede almacenarse a 2-8 C durante un máximo de cinco días.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

NOTA: Asegúrese de que el *illumipro-10* está encendido y que se hayan completado las verificaciones de rendimiento necesarias antes de iniciar la PREPARACIÓN DE LA MUESTRA. Consulte el Manual del operador de *illumipro-10* para obtener más información acerca de la instalación y el funcionamiento del instrumento.

Preparación de la muestra:

1. Mezcle bien la muestra.
2. Añada 50 µL de Control del Ensayo II a un tubo de lisis (LT) QIAamp debidamente marcado.
3. Añada 150 µL de muestra al tubo de lisis que contenga el Control del Ensayo II.

Extracción de muestras con Qiagen QIAamp® DSP DNA Mini Kit:

NOTA: Para extraer las muestras es preciso seguir los pasos que se indican a continuación.

1. Añada 20 µL de proteinasa K (PK) QIAamp al tubo de lisis que contenga el Control del Ensayo II y la muestra.
2. Añada 200 µL de Tampón de Lisis (AL) QIAamp al tubo de lisis que contenga el Control del Ensayo II, la muestra y la proteinasa K. Sométalo a vórtex durante al menos 10 segundos.
3. Caliente el tubo de lisis a 56 ± 3 C durante 10 minutos.
4. Añada 200 µL de etanol puro al tubo de lisis. Sométalo a vórtex durante 10 segundos.
5. Pipetee todo el contenido del tubo de lisis en una columna de centrifugación con tubo de lavado (WT) QIAamp Mini.
6. Centrifugue la columna de centrifugado Mini durante 1 minuto a $\geq 6000 \times g$ O a 8000 rpm. Deseche el contenido del recorrido y el tubo de lavado.
7. Coloque la columna de centrifugado QIAamp Mini en un tubo de lavado (WT) nuevo y añada 500 µL de tampón de lavado (AW1) QIAamp reconstituido.
8. Centrifugue la columna de centrifugado durante 1 minuto a $\geq 6000 \times g$ O a 8000 rpm. Deseche el contenido del recorrido y el tubo de lavado.
9. Coloque la columna de centrifugado QIAamp Mini en un Tubo de Lavado (WT) nuevo y añada 500 µL de Tampón de Lavado (AW2) QIAamp reconstituido.
10. Centrifúguelo durante 3 minutos a $20,000 \times g$ O a 14,000 rpm.
11. Extraiga con cuidado la columna de centrifugado Mini del tubo de lavado con cuidado para asegurarse de que la columna no entre en contacto con el contenido del recorrido. Deseche el contenido del recorrido y el tubo de lavado.
12. Coloque la columna de centrifugado QIAamp Mini en un Tubo de Elución (ET) QIAamp debidamente etiquetado, pipetee 100 µL de Tampón de Elución (AE) QIAamp y añádalo a la columna de centrifugado QIAamp Mini sin tocar la membrana de la columna.
13. Mantenga la columna de centrifugado QIAamp Mini a 19-29 C durante 1 minuto. Centrifúguelo durante 1 minuto a $\geq 6000 \times g$ O a 8000 rpm para eluir el ADN purificado.
14. Deseche con cuidado la columna de centrifugado QIAamp Mini.
15. Las muestras extraídas se pueden mantener a 19-29 C durante un máximo de 60 minutos antes de someterlas a tratamiento térmico.

Tratamiento térmico:

1. Caliente cada tubo de elución que contenga una muestra extraída/ADN de control en un baño seco/bloqueo de calor a 95 ± 5 C durante 10 ± 2 minutos. Monitoree el paso de tratamiento térmico con un termómetro digital y un temporizador de intervalos.
2. Retire los tubos de elución del baño seco/bloqueo de calor y centrifúguelos durante 10 segundos a $2000 \times g$ O a 500 rpm. Las muestras tratadas térmicamente pueden mantenerse a una temperatura entre 19 y 29 C durante un máximo de 15 minutos antes de la prueba.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

NOTA: Se pueden procesar un máximo de 10 muestras en cada proceso del *illumipro-10*. Consulte el Manual del operador de *illumipro-10* para obtener más información acerca de la instalación y el funcionamiento del instrumento.

1. Transfiera 75 µL de Tampón de Reacción II *illumigene* a un tubo con tapón de rosca (tubo ST) debidamente marcado.
2. Añada 75 µL de ADN tratado térmicamente al tubo con tapón de rosca que contenga el Tampón de Reacción II. Sométalo a vórtex durante unos 10 segundos.
3. Repita los pasos 1 y 2 con todas las muestras que vaya a analizar.
4. Extraiga 1 Dispositivo de Prueba *illumigene* Mycoplasma de su bolsa de protección por cada muestra. Abra el dispositivo cuidadosamente, sujetando las cámaras de tal modo que el reactivo liofilizado no se caiga al abrir el dispositivo. Coloque el dispositivo en una superficie plana o en un estante que pueda albergar el dispositivo.
5. Transfiera 50 µL de la muestra tratada térmicamente a la cámara TEST (microesfera blanca) del Dispositivo de Prueba *illumigene*. Tenga cuidado de no introducir aire extraño en la mezcla de reacción. Usando una punta de pipeta nueva, transfiera 50 µL del tubo con tapón de rosca que contenga la muestra tratada térmicamente a la cámara de CONTROL (microesfera amarilla) del Dispositivo de Prueba *illumigene*. No introduzca burbujas de aire. Cierre el Dispositivo de Prueba *illumigene* y asegure el cierre con firmeza.
6. Dé unos golpecitos en la parte superior del banco o mezcle para quitar las burbujas de aire. Examine cuidadosamente el Dispositivo de Prueba para asegurarse de que no hayan quedado burbujas de aire en el tubo y de que no quede ningún líquido en la parte superior del dispositivo. La amplificación y la detección deben comenzar en un plazo de 15 minutos.
7. Introduzca el Dispositivo de Prueba de *illumigene* en el *illumipro-10* e inicie la reacción de amplificación y detección. Consulte el Manual del operador de *illumipro-10*, donde encontrará instrucciones detalladas. Los resultados se mostrarán al final del proceso.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

ID de la muestra	Resultado notificado	Interpretación
Muestra de la paciente	POSITIVO	La muestra contiene el ADN objetivo de <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .
	NEGATIVO	No se ha detectado ADN de <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .
	NO VÁLIDO	Sin resultados notificables. Repita la prueba usando la muestra original. Muestra de la paciente inhibitoria, preparación de la muestra inadecuada, fallo del reactivo, fallo del instrumento o fallo de control interno.
Control positivo	POSITIVO	Resultado de Control Positivo válido. Reactivos activos en el momento del uso, el <i>illumipro-10</i> funciona correctamente.
	NEGATIVO	Resultado de control incorrecto. No se pueden notificar los resultados del paciente. Repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de la faya. Si se repite la faya luego de repetir el control contacte el Departamento de Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local.
	NO VÁLIDO	Sin resultados notificables. Repita todo el proceso de ensayo usando las muestras originales. Preparación de la muestra inadecuada, fallo del reactivo, fallo del instrumento o fallo de control interno.
Control negativo	POSITIVO	Resultado de control incorrecto. No se pueden notificar los resultados del paciente. Repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de la faya. Si se repite la faya luego de repetir el control contacte el Departamento de Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local.
	NEGATIVO	Resultado de Control Negativo válido. Reactivos activos en el momento del uso, el <i>illumipro-10</i> funciona correctamente.
	NO VÁLIDO	Sin resultados notificables. Repita todo el proceso de ensayo usando las muestras originales. Preparación de la muestra inadecuada, fallo del reactivo, fallo del instrumento o fallo de control interno.
POCILLO VACIO	NINGUNO	No hay ningún dispositivo de prueba de <i>illumigene</i> en el pocillo del <i>illumipro-10</i> . O El dispositivo de prueba del <i>illumigene</i> no funciona bien debido a un fallo en la preparación de la muestra o a que el dispositivo está sucio o mal colocado. Repita la prueba usando la muestra original.

CONTROL DE CALIDAD

Este ensayo debe ser realizado siguiendo las regulaciones de acreditación locales, estatales o federales.

1. Cada dispositivo contiene un control interno que controla la inhibición de la amplificación, la eficacia de los reactivos del ensayo y el procesamiento de la muestra. En el Reactivo de Control del Ensayo II existe ADN de control interno que se procesa durante todos los pasos del procedimiento. En la cámara de control del Dispositivo de Prueba *illumigene* existen cebadores para la amplificación del ADN de control interno.
2. El paso del tratamiento térmico se monitoriza con un termómetro externo y un temporizador de intervalos. Use la memoria de temperatura máx/mín del termómetro para asegurarse de que se mantiene una temperatura de 95 ± 5 C. Use el temporizador de intervalos para asegurarse de que la duración del tratamiento térmico es de 10 ± 2 minutos.
3. Las Buenas Prácticas de Laboratorio recomiendan el uso de materiales de control. Los usuarios deberían seguir las directrices federales, estatales y locales adecuadas relativas a la ejecución de controles de calidad externos.
4. Los reactivos de Control Externo *illumigene* Mycoplasma se suministran por separado (Catálogo 279940). Se recomienda verificar la reactividad de cada nuevo lote y de cada nuevo envío de *illumigene* Mycoplasma a la recepción y antes de su uso. Se deberían realizar pruebas de control externo a partir de ese momento, de conformidad con las directrices federales, estatales y locales adecuadas. El equipo de prueba *illumigene* Mycoplasma no debe usarse para pruebas de pacientes si los controles externos no obtienen los resultados correctos.
5. Se debe usar un dispositivo de prueba aparte para cada reactivo de control externo. Consulte el folleto del envase de los controles externos de *illumigene* Mycoplasma, donde encontrará los procedimientos de prueba del control de calidad externo.

VALORES ESPERADOS

El porcentaje total de casos de *Mycoplasma pneumoniae* en muestras recogidas y probadas de forma prospectiva durante el estudio clínico de 2012 fue del 11,7 % (12/103).

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Este producto solo se puede utilizar con el instrumento *illumipro-10*.
- El ensayo *illumigene* Mycoplasma es un ensayo cualitativo y no proporciona valores cuantitativos ni información sobre la carga del microorganismo.
- Este dispositivo no está evaluado para vigilar el tratamiento de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*.
- Las infecciones respiratorias las pueden causar tanto *Mycoplasma pneumoniae* como otros microbios patógenos. La obtención de resultados positivos no significa que no exista coinfección con otros microorganismos patógenos de las vías respiratorias.
- No se conoce el funcionamiento de la prueba para analizar muestras que no correspondan a exudados humanos nasofaríngeos y faríngeos, de individuos inmunodeprimidos o de pacientes de los que no se sospeche que estén infectados con *M. pneumoniae*.
- La detección de ácido nucleico de *M. pneumoniae* dependerá de una recogida adecuada, de la manipulación, del transporte, del almacenamiento y de la preparación de las muestras, incluida su obtención. El no seguir el procedimiento adecuado en cualquiera de estos pasos puede dar lugar a resultados incorrectos.
- Dada la existencia de un número limitado de muestras positivas en el estudio clínico prospectivo, se han establecido las características de funcionamiento con muestras clínicas prospectivas y retrospectivas.
- La prevalencia de infección por *M. pneumoniae* afectará al valor predictivo de la prueba.
- Los ácidos nucleicos de los microorganismos pueden persistir *in vivo* independientemente de la viabilidad del microorganismo. La detección de ADN del analito objetivo no tiene por qué implicar agentes causantes de los síntomas clínicos. El ensayo *illumigene* Mycoplasma no distingue entre individuos portadores e infectados.
- Los resultados deben interpretarse teniendo en cuenta el historial clínico, los datos epidemiológicos y otra información a la que pueda acceder el médico. Al igual que sucede con todas las pruebas de diagnóstico moleculares: (A) pueden producirse resultados falsos negativos debido a la presencia de inhibidores, a errores técnicos, a la mezcla de muestras o al escaso número de microorganismos presentes en la muestra clínica, y (B) pueden producirse falsos resultados positivos debido a la presencia de contaminación cruzada por microorganismos objetivo, por sus ácidos nucleicos o por producto amplificado, así como por señales no específicas.
- Solo se ha evaluado el efecto de las sustancias interferentes que figuran en el etiquetado. La interferencia de sustancias distintas de las descritas en la sección «Pruebas de sustancias interferentes» puede dar lugar a resultados erróneos.
- El análisis BLAST no indica que los cebadores reaccionen con cualquier otro microorganismo excepto con *M. pneumoniae*; sin embargo, la reactividad cruzada con microorganismos respiratorios distintos de los que aparecen más adelante en la sección «Reactividad cruzada» puede proporcionar resultados erróneos.
- Existe la posibilidad de que se produzcan falsos resultados negativos en la presencia de concentraciones elevadas de *Moraxella catarrhalis*, *Nocardia asteroides* o coronavirus. Con estos tres microorganismos se observaron falsos resultados negativos en solo una de cada siete réplicas con muestras analizadas cerca del límite de detección durante las pruebas iniciales, que no fueron confirmados con análisis posteriores.
- La presencia de HCl de fenilefrina que se encuentra en los descongestivos nasales produjo falsos resultados negativos a concentraciones superiores a 0,595 mg/mL durante las réplicas de las pruebas con la cepa M129 de *M. pneumoniae* al límite de detección.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

El ensayo de amplificación del ADN *illumigene* Mycoplasma fue evaluado en 2012 por centros de pruebas clínicas independientes que geográficamente representan distintas regiones por todos los Estados Unidos. Se evaluó un total de 334 muestras correctas de exudados faríngeos y nasofaríngeos (NF) tomados a pacientes con sospecha de infección por *Mycoplasma pneumoniae* con el dispositivo de prueba para conocer las características de funcionamiento. Las muestras consistían en restos a los que se había retirado la identificación remitidos a los laboratorios de análisis para realizar pruebas rutinarias de *M. pneumoniae*. Las muestras incluidas en la evaluación del funcionamiento fueron prospectivas (nunca congeladas) y retrospectivas (congeladas antes de someterlas a la prueba *illumigene*). La realización del proceso *illumigene* se comparó con un método de referencia combinado que incluía un cultivo bacteriano de *M. pneumoniae* con identificación y un ensayo de PCR validado en tiempo real, seguido por una secuenciación bidireccional en el caso de las muestras positivas. Las muestras que produjeron resultados positivos para *Mycoplasma pneumoniae* con el cultivo bacteriano o con la PCR en tiempo real y la secuenciación bidireccional se consideraron positivas. Las muestras negativas según el cultivo y la PCR se consideraron negativas. Se excluyó un total de 12 muestras de la población de muestras clínicas debido a que los resultados de los cultivos eran poco concluyentes y la prueba PCR negativa, con lo que al final no fue posible determinar el estado del paciente. Se examinó un total de 103 (30,8 %) muestras prospectivas y 219 retrospectivas (65,6 %), con un resultado inicial no válido (0,30 %).

Las tablas 1-2 resumen las características del funcionamiento. Se llevó a cabo un análisis estadístico de los datos del funcionamiento por tipos de muestras sin que se produjeran diferencias significativas entre los tipos de exudados identificados.

Los datos indican que el funcionamiento es óptimo cuando las muestras se recogen y analizan prospectivamente.

Tabla 1. Funcionamiento del ensayo *illumigene* Mycoplasma: Exudados nasofaríngeos

Descripción de las muestras	Muestras positivas			Muestras negativas			Resultados no válidos
	<i>illumigene</i> frente al comparador	% de sensibilidad o PPA	IC 95%	<i>illumigene</i> frente al comparador	% de especificidad o NPA	IC 95%	
Comparador del método combinado							
Prospectivo	4/4	% sensibilidad 100%	51,0 – 100,0%	48/48	% especificidad 100%	92,6 – 1000%	0
Retrospectivo	34/36	PPA 94,4%	81,9 – 98,5%	86/90	NPA 95,6%	89,1 – 98,3%	0
Ensayo PCR validado con comparador de secuenciación bidireccional							
Prospectivo	4/4	% sensibilidad 100%	51,0 – 100,0%	48/48	% especificidad 100%	92,6 – 100,0%	0
Retrospectivo	34/36	PPA 94,4%	81,9 – 98,5%	86/90	NPA 95,6%	89,1 – 98,3%	0

Tabla 2. Funcionamiento del ensayo *illumigene* Mycoplasma: Exudados faríngeos

Descripción de las muestras	Muestras positivas			Muestras negativas			Resultados no válidos
	<i>illumigene</i> frente al comparador	% de sensibilidad o PPA	IC 95%	<i>illumigene</i> frente al comparador	% de especificidad o NPA	IC 95%	
Comparador del método combinado							
Prospectivo	8/8	% sensibilidad 100%	67,6 – 100,0%	43/43	% especificidad 100%	91,8 – 100,0%	0
Retrospectivo	22/26 ^a	PPA 84,6%	66,5 – 93,9%	66/67	NPA 98,5%	92,0 – 99,7%	1
Ensayo PCR validado con comparador de secuenciación bidireccional							
Prospectivo	8/8	% sensibilidad 100%	67,6 – 100,0%	43/43	% especificidad 100%	91,8 – 100,0%	0
Retrospectivo	21/21 ^b	PPA 100%	84,5 – 100,0%	70/72	NPA 97,2%	90,4 – 99,2%	1

- Cuatro muestras identificadas originalmente mediante cultivo como positivas no fueron confirmadas mediante el ensayo *illumigene* ni el método de PCR independiente. Los resultados indican una degradación de las muestras durante el almacenamiento.
- Una muestra identificada originalmente como positiva mediante el ensayo *illumigene* y el cultivo fue negativa según el método independiente de PCR. Esta muestra se clasificó como un falso positivo con respecto a la PCR.

Se conocían los datos de edad del 83,5 % (269/322) de los pacientes incluidos en el análisis de funcionamiento. Siete de los pacientes examinados (2,6 %) tenían entre 0 y 28 días de edad; 38 (14,1 %) pacientes tenían entre 29 días y 2 años; 139 (51,7 %) pacientes tenían entre 2 y 12 años; 61 (22,7 %) pacientes tenían entre 12 y 18 años; y 9 (3,3 %) pacientes tenían entre 18 y 21 años de edad. Los 15 pacientes restantes (5,6 %) del estudio tenían 21 años o más. No se advirtieron diferencias de rendimiento basándose en la edad cronológica.

La población en estudio incluía 90 (27,9 %) mujeres y 91 (28,3 %) varones. No se conocía el género de 141 (43,8 %) de los participantes del estudio. En las muestras en las que se conocía el sexo del paciente no se observaron diferencias de funcionamiento en función del sexo.

El funcionamiento clínico del ensayo *illumigene* Mycoplasma se evaluó mediante el análisis de muestras de exudados nasofaríngeos y faríngeos a los que se había retirado la identificación y de los cuales no existía información clínica; por consiguiente, se desconoce el número de pacientes con neumonía por *M. pneumoniae* incluidos en los estudios clínicos y no se puede describir por separado el funcionamiento en este grupo.

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

Se determinó la sensibilidad analítica o el límite de detección del ensayo *illumigene* Mycoplasma de dos cepas de *M. pneumoniae*.

El límite de detección se determinó usando un mínimo de 20 réplicas para cada mensurando y una probabilidad establecida (p. ej., el 95 %, donde 19/20 réplicas son positivas) de obtención de respuestas positivas. La prueba de sensibilidad analítica se resume a continuación:

<i>Mycoplasma pneumoniae</i> Descripción de la cepa	CFU/Prueba	CFU/ml
FH (ATCC 15531)	88	2350
M129	7,5	200

REACTIVIDAD DEL ENSAYO

Se analizaron las siguientes cepas de *M. pneumoniae* y produjeron reacciones positivas en el límite de detección de 88 CFU/prueba (2350 CFU/mL) o por debajo de dicho límite establecido para el ensayo con *illumigene* Mycoplasma: PI 1428 (ATCC 29085), MAC (ATCC 15492), M52 (ATCC 15293), Bru (ATCC 15377), M129-B170 (ATCC 29343), Mutant 22 (ATCC 39505) UAB 55612, UAB 56317, UMTB-10G (ATCC 49899). Las pruebas demostraron que con el ensayo se detectaban cepas de los tipos 1 y 2.

REPRODUCIBILIDAD

Los paneles codificados ciegos de 10 muestras se enviaron a tres laboratorios independientes para estudios de reproducibilidad. Las muestras se eligieron aleatoriamente dentro de cada panel para enmascarar las identidades de las muestras. Los paneles incluyeron muestras ingenieradas fabricadas como muestras positivas bajas (es decir, próximas al límite de detección del ensayo, n=3) y muestras negativas altas (n=3). Los paneles también incluían muestras positivas ingenieradas (n=3) y muestras negativas naturales (n=1). La prueba fue realizada por diferentes operadores en cada centro el mismo día (variabilidad intraensayo) durante cinco días (variabilidad interensayo). En este estudio se usaron tres lotes de *illumigene* Mycoplasma y cinco instrumentos *illumipro-10*. Se probaron los controles negativos y positivos cada día de pruebas. Los resultados aparecen en la tabla que sigue:

Tipo de muestra	Centro 1		Centro 2		Centro 3		Total	
	Acuerdo en porcentaje	Acuerdo en porcentaje	Acuerdo en porcentaje	Acuerdo en porcentaje	Acuerdo en porcentaje	Acuerdo en porcentaje	Acuerdo en porcentaje	
Negativo	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%	30/30	100%
Negativo alto	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%	90/90	100%
Positivo bajo	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%	90/90	100%
Positivo	29/30	96,7%	30/30	100%	29/30	96,7%	88/90	97,8%
Control negativo	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%	30/30	100%
Control positivo	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%	30/30	100%

REACTIVIDAD CRUZADA / INTERFERENCIA MICROBIANA ESTUDIOS

Se realizaron estudios de reactividad cruzada con muestras positivas y negativas inoculadas con microorganismos micóticos o bacterianos que pudieran interferir a concentraciones finales mínimas de $1,0 \times 10^5$ CFU/mL. Se probaron virus a concentraciones superiores a $1,0 \times 10^5$ TCID₅₀/mL o a $1,0 \times 10^6$ copias/mL. Se probó ADN humano a 2,0 ng/prueba sin observarse reactividad cruzada. Las muestras positivas contenían concentraciones de *M. pneumoniae* próximas al límite de detección. Con ninguno de los microorganismos o de los materiales siguientes se detectó reactividad cruzada o interferencia en el ensayo *illumigene* Mycoplasma:

Acinetobacter baumannii, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Actinomyces odontolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* (ESBL), *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* (KPC), *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella paratyphi* (Grupo A), *Salmonella typhimurium* (Grupo B), *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* (Grupo B), *Streptococcus anginosus* (Grupo F), *Streptococcus bovis* (Grupo D), *Streptococcus canis* (Grupo G), *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Ureaplasma urealyticum*, adenovirus, virus de Coxsackie, citomegalovirus, virus de Epstein Barr, virus Herpes simplex 1, virus Herpes simplex 2, metanemovirus humano, gripe B, gripe A, gripe B, virus de paragripe 1, virus de paragripe 2, virus de paragripe 3, virus respiratorio sincitial A, virus respiratorio sincitial B, rinovirus, ADN humano.

Moraxella catarrhalis, *Nocardia asteroides* y el coronavirus produjeron resultados imprevistos durante las pruebas iniciales que no se confirmaron en análisis posteriores. En cada microorganismo se produjeron resultados falsos negativos en una de cada siete réplicas probadas cerca del límite de detección.

PRUEBAS PARA SUSTANCIAS INTERFERENTES

Se probaron sustancias potencialmente interferentes con muestras simuladas negativas e ingenieradas positivas (cepas de *M. pneumoniae* M129 y FH). Las sustancias potencialmente interferentes se diluyeron en solución salina estéril y se introdujeron en medio M4 con hisopos de rayón (muestra negativa) y en medio M4 con hisopos de poliéster (muestra positiva ingenierada y probada).

Las siguientes sustancias biológicas, en las concentraciones de solvente/diluyente saturadas indicadas, no interfirieron en los resultados de la prueba *illumigene* Mycoplasma:

Mucosidad (5,0 mg/mL), leucocitos (0,5 % v/v) y sangre completa (5 % v/v).

Las siguientes sustancias químicas, en las concentraciones de solvente/diluyente saturadas indicadas, no interfirieron en los resultados de la prueba *illumigene* Mycoplasma:

Paracetamol (18,1 mg/mL), sulfato de albuterol (20 mg/mL), aspirina (9,1 mg/mL), azitromicina dihidrato (2,0 mg/mL), Cepacol® enjuague bucal [etanol desnaturalizado (1,4 % v/v), cloruro de cetilpiridinio (0,005 % v/v)], comprimidos anticatarrales y antigripales Contac® [paracetamol (14,8 mg/mL), maleato de clorfeniramina (0,06 mg/mL), fenilefrina HCl (0,15 mg/mL)], difenhidramida HCl (2,6 mg/mL), eritromicina (2,0 mg/mL), gotas para la tos HALLS® [mentol (0,06 mg/mL)], ibuprofeno (12,7 mg/mL), fenilefrina HCl (0,595 mg/mL), prednisona (20,0 mg/mL), jarabe para la tos y la tos de pecho congestiva Robitussin® [dextrometofano HBr (0,20 mg/mL), guaifenesina (2,0 mg/mL)], nebulizador nasal de solución salina [cloruro sódico (0,65 mg/mL)].

La fenilefrina HCl que se encuentra en los descongestivos nasales produjo resultados falsos negativos a concentraciones superiores a 0,595 mg/mL durante las réplicas de las pruebas en el límite de detección de la cepa M129 de *M. pneumoniae*.

DEUTSCH



Mycoplasma DNA Amplification Assay

DNA-Amplifikationsassay für die Erfassung von *Mycoplasma pneumoniae* in Rachen- und Nasopharyngealabstrichproben beim Menschen

REF 280550

IVD In-vitro-Diagnostikum

VERWENDUNGSZWECK

Der *illumigene* Mycoplasma-DNA-Amplifikationsassay, durchgeführt mit dem *illumipro-10™*, ist ein qualitativer In-vitro-Diagnostest zur direkten Erfassung von DNA aus *Mycoplasma pneumoniae* in Rachen- und Nasopharyngealabstrichproben von Patienten, bei denen eine Infektion mit *Mycoplasma pneumoniae* vermutet wird.

Beim *illumigene* Mycoplasma-Assay kommt die Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification (LAMP)-Technologie zum Einsatz, bei der *Mycoplasma pneumoniae* durch gezielte Amplifikation eines bestimmten Segments des *Mycoplasma pneumoniae*-Genoms nachgewiesen werden.

Die mit dem *illumigene* Mycoplasma-DNA-Amplifikationsassay erzielten Ergebnisse sollten gemeinsam mit einer klinischen Präsentation, anderen Laborbefunden und epidemiologischen Risikofaktoren bei der Diagnose einer Infektion mit Mykoplasmen unterstützend eingesetzt und nicht als alleinige Grundlage für Therapieentscheidungen beim Patienten eingesetzt werden. Durch positive Ergebnisse lässt sich eine Koinfektion mit anderen Organismen nicht ausschließen, und negative Ergebnisse bei Personen mit Atemwegsinfektionen können auf Pathogene zurückzuführen sein, die mit diesem Assay nicht nachgewiesen werden. Infektionen der unteren Atemwege infolge von *M. pneumoniae* werden mit diesem Assay möglicherweise nicht nachgewiesen. Wenn eine Infektion der unteren Atemwege infolge von *M. pneumoniae* vermutet wird, sind unter Umständen zusätzliche Labortests mit anderen Verfahren als dem *illumigene* Mycoplasma-DNA-Amplifikationsassay erforderlich.

illumigene Mycoplasma ist für die Anwendung im Krankenhaus, staatlichen oder Referenz-Laboren vorgesehen. Der Test soll nicht für die „Point-of-Care-Diagnostik“ verwendet werden (am Krankenbett, in der Arztpraxis).

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Der *illumigene* Mycoplasma-DNA-Amplifikationsassay basiert auf der Loop-Mediated Amplification (LAMP)-Technologie.¹ Der Assay zielt auf eine 208-Basenpaarsequenz (bp) des *Mycoplasma pneumoniae*-Genoms ab. Die DNA-Zielsequenz ist im intrazellulären Protease-ähnlichen Proteingehäuse zu finden und befindet sich in allen Sequenzen, die aus drei Genomen von *Mycoplasma pneumoniae* bestehen.

Bei der „Loop-Mediated Amplification“ werden spezielle Primer verwendet, um eine spezifische und kontinuierliche isotherme DNA-Amplifizierung zu erzielen. Ein Nebenprodukt der Amplifikation ist Magnesiumpyrophosphat, das einen weißen Niederschlag bildet, wodurch eine trübe Reaktionslösung entsteht. Die Absorptionsmerkmale der Reaktionslösung werden vom Meridian-Inkubator/Lesegerät *illumipro-10 überwacht*. Die durch den Niederschlag von Magnesiumpyrophosphat erzeugten Änderungen der Absorptionsmerkmale der Reaktionslösung deuten auf die Anwesenheit der Ziel-DNA hin. Die Abwesenheit von Ziel-DNA bewirkt keine signifikante Änderung der Absorption des Probenmaterials.

Das *illumigene* Mycoplasma-Kit umfasst die *illumigene* Assay-Kontrolle II und *illumigene* Mycoplasma-Testgeräte. Bei der *illumigene* Assay-Kontrolle II, welche für die Verdünnung und Präparation des Probenmaterials verwendet wird, handelt es sich um eine gepufferte Lösung mit *Staphylococcus aureus*-DNA. Das *illumigene* Mycoplasma-Testgerät enthält ein lyophilisiertes Amplifikationsreagenz-Bead in jeder von zwei Kammern: einer TEST-Kammer mit Mycoplasma-spezifischen Primern und einer KONTROLL-Kammer mit *S. aureus*-spezifischen Primern. Zusammen funktionieren die *S. aureus*-DNA im Kontrollreagenz und die *S. aureus*-spezifischen Primer in der KONTROLL-Kammer als interne Kontrolle für den Assay. Bei der Präparation des Probenmaterials wird jede Patientenprobe vor der Amplifikation mit dem Kontrollreagenz verdünnt und mit *S. aureus*-DNA kombiniert. Die Zugabe von *S. aureus*-DNA zur Patientenprobe ermöglicht die parallele Verarbeitung von Ziel-DNA und Kontroll-DNA durch Präparation, Amplifikation und Detektion der Probe. Die DNA-Extraktion, die Amplifikationsinhibition, Assayreagenzleistung und die Effizienz der Probenverarbeitung werden von der internen Kontrolle überwacht. Das Kontroll-*S. aureus*-Ziel muss amplifiziert und in der endgültigen Reaktion erkannt werden, oder der Test wird als ungültig erachtet und die Patientenergebnisse werden nicht berichtet.

Zur Überwachung der Änderungen der Absorptionsmerkmale misst der *illumipro-10* den Lichtdurchlass durch die Test- und Kontroll-Reaktionslösungen. Der Lichtdurchlass wird zu Beginn des Testdurchlaufs (Signal_{initial}, S_i) und am Ende des Testdurchlaufs (Signal_{final}, S_f) des Assays kontrolliert. Die Änderung des Lichtdurchlasses zwischen Ende und Beginn des Durchlaufs (S_f:S_i) wird vom *illumipro-10* gemessen, und das Verhältnis wird mit einem festgelegten Cutoff-Wert verglichen.

Die Probenergebnisse werden anhand festgelegter Cutoff-Werte für die TEST-Kammer gemeldet: S_r:S_i-Verhältnisse der TEST-Kammer von weniger als 82% werden als „POSITIV“, S_r:S_i-Verhältnisse der TEST-Kammer größer als oder gleich wie 82% werden als „NEGATIV“ gemeldet. *Es werden keine numerischen Werte gemeldet.*

Die Gültigkeit wird anhand fester Cutoff-Werte für die KONTROLL-Kammer beurteilt. S_r:S_i-Verhältnisse der KONTROLL-Kammer von weniger als 90% werden für gültig erachtet und lassen die Meldung der Ergebnisse der TEST-Kammer zu (POSITIV, NEGATIV). S_r:S_i-Verhältnisse der KONTROLL-Kammer größer als oder gleich wie 90% werden für ungültig erachtet und verhindern die Meldung der Ergebnisse der TEST-Kammer. Ungültige Ergebnisse für die KONTROLL-Kammer werden als „UNGÜLTIG“ gemeldet. *Es werden keine numerischen Werte gemeldet.*

Die Cutoff-Kriterien für die KONTROLL-Kammer sind strenger, um zu gewährleisten, dass die Amplifikation nicht gehemmt wird, dass die Reagenzien bestimmungsgemäß funktionieren und dass die Probenverarbeitung sachgemäß durchgeführt wurde.

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

Mycoplasma pneumoniae ist eine häufige Ursache von Infektionen der oberen und unteren Atemwege beim Menschen, wie z.B. Pharyngitis, akuter Bronchitis und Pneumonie.² Mykoplasmen wurden in den sechziger Jahren als menschliche Pathogene erkannt, wobei *Mycoplasma pneumoniae* das bekannteste und am meisten untersuchte Bakterium der Gruppe der Mykoplasmen ist.³ Zu den Merkmalen des Organismus zählen ein kleines Genom, welches aus einem einzigen, kreisförmigen Chromosom und einer dreischichtigen Zellmembran anstelle einer strukturierten Zellwand besteht.³ Die Größe und Struktur des *Mycoplasma pneumoniae* verhindert eine positive Identifikation mithilfe herkömmlicher Gramfärbung und Visualisierung unter dem Lichtmikroskop.

M. pneumoniae wurde mit bis zu 40%^{2, 3} der ambulant erworbenen Pneumonie-Erkrankungen assoziiert. Zur Infektion kommt es bei Kindern und Erwachsenen ohne geografische, geschlechtsspezifische oder klimabezogene Einschränkungen.^{3, 6} *M. pneumoniae* wird in der Regel mit atypischer Pneumonie mit Symptomen wie Kopfschmerzen, Unwohlsein, Myalgien, Fieber und Rachenschmerzen nebst trockenem, paroxysmalem Husten assoziiert.^{3, 4, 6} Während der klinische Verlauf der Mykoplasmen-Pneumonie im Allgemeinen mild und selbstbegrenzend ist, wird ihr eine Mortalitätsrate von ca. 1,4% zugeschrieben.⁴ Jedes Jahr treten geschätzte 2 Millionen Fälle einer Infektion mit *M. pneumoniae* auf, wobei in den USA ca. 100.000 Krankenhauseinweisungen aufgrund von Pneumonie zu verzeichnen sind.⁵ Es wird davon ausgegangen, dass bis zu 18% der Krankenhauseinweisungen von Kindern mit ambulant erworbener Pneumonie auf *M. pneumoniae* zurückzuführen sind.³

Die Übertragung des *M. pneumoniae* erfolgt in der Regel durch Tröpfcheninfektion von einer Person zu anderen, und die Inkubationszeit beträgt eine bis vier Wochen.⁵ Da sich bei Patienten mit einer aktiven Mykoplasmen-Infektion Mykoplasmen in Nase, Rachen, Luftröhre und Sputum befinden, wird die Übertragung der Erkrankung durch den dabei auftretenden Husten beschleunigt.³ Durch diesen Übertragungsweg kommt es häufig zu Ausbrüchen in Umfeldern mit engem zwischenmenschlichem Kontakt, wie z.B. Schulen, Kasernen, Unternehmen, Ferienlagern, Universitäten oder anderen Einrichtungen. Gleichermaßen wird die Erkrankung häufig unter Familienmitgliedern übertragen, die im selben Haushalt leben.^{3, 4, 5, 6}

Die Diagnose der akuten Infektion mit *M. pneumoniae* gestaltet sich schwierig. Zu den grundlegenden diagnostischen Strategien in der klinischen Praxis gehören die Kultur und Serologie. Eine Kultur mit *M. pneumoniae* ist im Rahmen der Behandlung des Patienten oft nicht praktikabel, da eine Kultur mit dem Organismus bis zu sechs Wochen in Anspruch nehmen kann.¹ Obgleich serologische Produkte weitläufig erhältlich sind und praktische diagnostische Lösungen bieten, ist die Möglichkeit, eine akute Infektion zu erfassen, hier häufig beschränkt. Serologische Assays sind häufig auf spezifische Immunglobulin-, IgM- und IgG-Antikörper in den Seren gerichtet. IgM-Antikörper lassen sich im Allgemeinen in den ersten sieben Tagen nach Einsetzen der Symptome nicht erfassen und können noch Monate nach der aktiven Infektion weiterbestehen.² Studien haben gezeigt, dass weniger als 50% der Patienten mit einer akuten Infektion IgG-positiv sind.²

Neue diagnostische Verfahren wie beispielsweise Methoden zur DNA-Amplifikation, erlauben unter Umständen eine schnellere Diagnose und somit ein frühzeitigeres Erkennen von Ausbrüchen und die Vorbeugung gegen Sekundärfälle durch Kontrollmaßnahmen.⁵

REAGENZIEN/ENTHALTENE MATERIALIEN

Die Höchstzahl der mit diesem Testkit durchführbaren Tests ist auf der Aussenseite der Packung angegeben.

- illumigene Assay-Kontrolle II:** Phosphatgepufferte Lösung mit Formalin behandelten *E. coli*-Zellen, die Plasmid mit einem Segment des *S. aureus*-Genoms in sich tragen, mit Natriumazid (0,09%) als Konservierungsmittel.
- illumigene-Reaktionspuffer II:** Tris-gepufferte Lösung mit Natriumazid (0,09%) als Konservierungsmittel.
- illumigene Mycoplasma-Testgerät:** Gerät mit zwei Kammern, das lyophilisierte Amplifikationsreagenzien (DNA-Polymerase, Deoxynukleotidtriphosphate) und entweder Mykoplasma-spezifische Primer (TEST-Kammer) oder Kontroll-Primer (KONTROLL-Kammer) enthält.
- Mikrozentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss:** 1,5 mL RNase/DNase-freie Mikrozentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss.

SEPARAT GELIEFERTE MATERIALIEN

- illumigene** Externes Mycoplasma-Kontroll-Kit, Bestellnummer: 279940

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

- Qiagen QIAamp[®] DSP DNA Mini-Kit, Bestellnummer: 61304
- Ethanol, 200 Proof

- Einweg-Latexhandschuhe, ungepudert
- DNase/RNase-freie, aerosolbeständige Pipettenspitzen
- Probennahme und Transportsystem
- Tupfer, Nasopharyngeal oder Rachen: Baumwolle, Schaumstoff, beflocktes Nylon, Polyester oder Rayon
- Transportmittel: 0,85%-ige Kochsalzlösung, M4, M4-RT, M5 oder UTM-RT

NICHT MITGELIEFERTE AUSRÜSTUNG

- Trockenbad mit Heizblock zur Erhitzung auf 56 C
- Trockenbad mit 12-mm-Heizblock zur Erhitzung auf 95 C
- Digitalthermometer mit Max-/Min-Temperaturspeicher (z. B. wasserdichtes/stoßfestes Thermometer Traceable[®] Lollipop[™])
- Vortex-Mixer
- Intervall-Stoppuhr
- Mikrozentrifuge
- Mikropipette(n) für die Abgabe von 20, 50, 75, 100, 150, 200 und 500 µL
- illumipro-10[™]**, Bestellnummer von Meridian Bioscience, Inc.: 610172

VORSICHTSMASSNAHMEN

- Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.
- Das Assay-Kontrollreagenz II und die Testgeräte zwischen Chargen nicht austauschen. Der Reaktionspuffer II und die Mikrozentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss können ausgetauscht werden, solange zum Zeitpunkt des Gebrauchs das angegebene Haltbarkeitsdatum noch nicht abgelaufen ist.
- Während des Testverfahrens die Biosicherheitsstufe 2 und die bewährten Laborpraktiken anwenden.⁶ Sämtliche Proben und verwendeten Testgeräte als mögliche Überträger von Infektionserregern behandeln. In den Bereichen, in denen die Proben und Reagenzien der Kits bearbeitet werden, darf weder gegessen, noch getrunken oder geraucht werden.
- Bei der Handhabung der Proben sind Einweghandschuhe zu tragen. Nach dem Verfahren sind die Hände gründlich zu waschen. Die Handschuhe öfters wechseln.
- Es sollten Qualitätssicherungsprogramme für molekulare Testlabors angewendet werden.⁷ Um das Risiko eines falsch positiven Ergebnisses aufgrund einer Kontamination mit einem Organismus oder Amplikon zu vermeiden, sind entsprechende vorbeugende Maßnahmen gemäß bewährten molekularen Praktiken anzuwenden (z.B. sauberer Arbeitsbereich mit geeignetem Reinigungsmittel, welches Nukleinsäuren vernichtet, ausschließliche Verwendung von Aerosol-resistenten Pipettenspitzen, einzelne Handhabung der Proben).
- Das **illumigene** Mycoplasma-Testgerät enthält lyophilisierte Reagenzien. Der Schutzbeutel darf erst dann geöffnet werden, wenn der Assay durchgeführt wird.
- Das **illumigene** Mycoplasma-Testgerät ist mit einer Sperrvorrichtung ausgestattet, um eine Kontamination des Testbereichs mit dem Amplifikationsprodukt zu verhindern. Testgeräte mit defekter Sperrvorrichtung NICHT verwenden.
- Gebrauchte **illumigene**-Testgeräte sofort nach Gebrauch entsorgen und die Sperrvorrichtung sicher arretieren. Das Testgerät nach der Verarbeitung NICHT öffnen. Öffnen des Geräts nach der Amplifikation kann zur Kontamination des Testbereichs mit dem Amplifikationsprodukt führen.

GEFAHREN – UND SICHERHEITSAANGABEN

Es gibt keine bekannten Gefahren die mit diesem Produkt verbunden sind.

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Verfallsdatum ist auf dem Etikett des Kits angegeben. Kit bei 2 - 8 C aufbewahren.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Sicherstellen, dass Kitreagenzien vor Gebrauch Raumtemperatur (19 - 29 C) haben. Werden die Reagenzien vor Gebrauch nicht auf Raumtemperatur gebracht, kann es zu falschen Ergebnissen kommen.

In Bezug auf die korrekte Lagerung und Handhabung der Qiagen Mini-Säulen und -Reagenzien die Packungsbeilage des Qiagen QIAamp[®] DSP DNA-Mini-Kits beachten.

PROBENNAHME UND -VORBEREITUNG

Probentypen: Abstrichproben von Rachen und Nasopharynx.

Probennahme: Die Probennahme sollte im Einklang mit den Richtlinien der Einrichtung zur Sammlung von klinischen Atemwegsproben erfolgen. Die Abstrichprobe(n) sollte(n) mit geeigneten Tupfern (z.B. Baumwolle, Schaumstoff, beflocktes Nylon, Polyester oder Rayon) genommen werden.

Legen sie den/die Tupfer in ein geeignetes Transportmittel (z.B. 0,85%-ige Kochsalzlösung, M4, M4-RT, M5 oder UTM-RT) und bringen Sie ihn/sie zum Labor. Während des Transports der Proben sollte die Temperatur 2 - 27 C betragen.

Die Proben können bei 19 - 29 C bis zu 48 Stunden vor dem Test aufbewahrt werden. Wird der Test nicht während dieser Zeit begonnen, können die Proben bis zu fünf Tage bei 2 – 8 C aufbewahrt werden.

PROBENVORBEREITUNG

HINWEIS: Darauf achten, dass der **illumipro-10** eingeschaltet ist und die erforderlichen Leistungsüberprüfungen vor Beginn der PROBENVORBEREITUNG durchgeführt wurden. Weitere Informationen zur Einrichtung und zum Betrieb des Geräts finden Sie im **illumipro-10**-Bedienerhandbuch.

Probenvorbereitung:

- Mischen Sie die Probe gründlich.
- Geben Sie 50 µL der Assay-Kontrolle II in ein entsprechend gekennzeichnetes QIAamp-Lyseröhrchen (LT).
- 150 µL der Probe in das Lyseröhrchen mit der Assay-Kontrolle II geben.

Probenextraktion mit dem Qiagen QIAamp® DSP DNA-Mini-Kit:

HINWEIS: Bei der Probenextraktion sollten die unten aufgeführten Schritte beachtet werden.

- Überführen Sie 20 µL der QIAamp Proteinase K (PK) in das Lyserröhrchen mit der Assay-Kontrolle II und der Probe.
- Geben Sie 200 µL des QIAamp-Lysepuffers (AL) in das Lyserröhrchen mit der Assay-Kontrolle II, der Probe und der Proteinase K. Vortexen Sie das Röhrchen mindestens 10 Sekunden lang.
- Erhitzen Sie das Lyserröhrchen 10 Minuten lang bei 56 ± 3 C.
- Überführen Sie 200 µL Ethanol, 200 Proof, in das Lyserröhrchen. Vortexen Sie es 10 Sekunden lang.
- Pipettieren Sie den gesamten Inhalt des Lyserröhrchens in eine QIAamp-Mini-Spinsäule mit Waschröhrchen (WT).
- Zentrifugieren Sie die Mini-Spinsäule 1 Minute lang bei ≥ 6000 x g ODER 8000 U/min. Entsorgen Sie Durchfluss und Waschröhrchen.
- Setzen Sie die QIAamp Mini-Spinsäule in ein neues Waschröhrchen (WT) und geben Sie 500 µL an rekonstituiertem QIAamp-Waschpuffer (AW1) hinzu.
- Zentrifugieren Sie die Spinsäule 1 Minute lang bei ≥ 6000 x g ODER 8000 U/min. Entsorgen Sie Durchfluss und Waschröhrchen.
- Setzen Sie die QIAamp Mini-Spinsäule in ein neues Waschröhrchen (WT) und geben Sie 500 µL an rekonstituiertem QIAamp-Waschpuffer (AW2) hinzu.
- Zentrifugieren Sie es 3 Minuten lang bei 20.000 x g ODER 14.000 U/min.
- Nehmen Sie die Mini-Spinsäule behutsam aus dem Waschröhrchen und achten Sie dabei darauf, dass die Säule nicht mit dem Durchfluss in Berührung kommt. Entsorgen Sie Durchfluss und Waschröhrchen.
- Setzen Sie die QIAamp Mini-Spinsäule in ein entsprechend gekennzeichnetes QIAamp-Elutionsröhrchen (ET), pipettieren Sie 100 µL an QIAamp-Elutionspuffer (AE) und fügen Sie sie, ohne die Säulenmembran zu berühren, der QIAamp Mini-Spinsäule hinzu.
- Halten Sie die QIAamp Mini-Spinsäule 1 Minute lang bei 19 – 29 C. Zentrifugieren Sie sie 1 Minute lang bei ≥ 6000 x g ODER 8000 U/min, um die gereinigte DNA zu eluieren.
- Entsorgen Sie QIAamp Mini-Spinsäule behutsam.
- Extrahierte Proben können vor der Wärmebehandlung bis zu 60 Minuten lang bei 19 - 29 C aufbewahrt werden.

Wärmebehandlung:

- Erwärmen Sie jedes Elutionsröhrchen mit der DNA der extrahierten Probe bzw. der Kontrolle in einem Trockenbad/Heizblock 10 ± 2 Minuten lang bei 95 ± 5 C. Überwachen Sie den Hitzebehandlungsschritt mit dem Digitalthermometer und der Intervall-Stoppuhr.
- Entfernen Sie jedes Elutionsröhrchen vom Trockenbad/Heizblock und zentrifugieren Sie es 10 Sekunden lang bei 2000 x g ODER 500 U/min. Wärmebehandelte Proben können bis zu 15 Minuten vor dem Test bei 19 – 29 C aufbewahrt werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

HINWEIS: In einem Lauf auf dem *illumipro-10* können maximal 10 Proben verarbeitet werden. Weitere Informationen zur Einrichtung und zum Betrieb des Geräts finden Sie im *illumipro-10*-Bedienerhandbuch.

- 75 µL des *illumigene*-Reaktionspuffers II in ein entsprechend gekennzeichnetes Röhrchen mit Schraubverschluss geben (ST-Röhrchen).
- Geben Sie 75 µL der wärmebehandelten DNA in das Röhrchen mit Schraubverschluss mit dem Reaktionspuffer II. Vortexen Sie es ca. 10 Sekunden lang.
- Wiederholen Sie die Schritte 1 und 2 bei allen zu testenden Proben.
- Nehmen Sie für jede Probe ein *illumigene* Mycoplasma-Testgerät aus dem Schutzbeutel. Öffnen Sie vorsichtig das Gerät und halten Sie die Kammern so, dass das lyophilisierte Reagenz beim Öffnen nicht herausfällt. Setzen Sie das Gerät auf eine ebene Oberfläche oder in einen für das Gerät passenden Probenständer.
- Überführen Sie 50 µL der hitzebehandelten Probe in die TEST-Kammer (weißes Bead) des *illumigene*-Testgeräts. Achten Sie darauf, dass keine Luft von außen in das Reaktionsgemisch kommt. Nehmen Sie eine neue Pipettenspitze und überführen Sie 50 µL der wärmebehandelten Probe aus dem Röhrchen mit Schraubverschluss in die KONTROLL-Kammer (gelbes Bead) des *illumigene*-Testgeräts. Vermeiden Sie Luftblasen. Schließen Sie das *illumigene*-Testgerät und verschließen Sie die Sperrvorrichtung sicher.
- Klopfen Sie das Gerät leicht auf die Arbeitsfläche auf oder schwenken Sie es, um Luftblasen zu entfernen. Untersuchen Sie das Testgerät sorgfältig, um sicherzustellen, dass keine Luftblasen im Röhrchen und keine Flüssigkeit im oberen Teil des Geräts verblieben sind. Die Amplifikation und Detektion sollte innerhalb von 15 Minuten initiiert werden.
- Geben Sie das *illumigene*-Testgerät in den *illumipro-10* und starten Sie die Amplifikationsreaktion und -detektion. Ausführliche Anweisungen finden Sie im Bedienerhandbuch des *illumipro-10*. Die Ergebnisse werden am Ende des Laufs angezeigt.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Proben-ID	Ausgewiesenes Ergebnis	Auswertung
Patientenprobe	POSITIV	Die Probe enthält <i>Mycoplasma pneumoniae</i> -Ziel-DNA.
	NEGATIV	Es wurde keine <i>Mycoplasma pneumoniae</i> -DNA festgestellt.
	UNGÜLTIG	Kein meldefähiges Ergebnis. Wiederholen Sie den Test unter Verwendung der Originalprobe. Hemmende Patientenprobe, falsche Probenvorbereitung, fehlerhaftes Reagenz, Instrumentenversagen oder interner Kontrollfehler.
Positivkontrolle	POSITIV	Gültiges positives Kontrollergebnis. Reagenzien sind zum Zeitpunkt der Verwendung aktiv, <i>illumipro-10</i> funktioniert korrekt.
	NEGATIV	Falsches Kontrollergebnis. Die Patientenergebnisse können nicht ausgegeben werden. Die Kontrolltests wiederholen. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, bitte rufen Sie den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Auslieferer.
	UNGÜLTIG	Kein meldefähiges Ergebnis. Wiederholen Sie den gesamten Assay-Lauf unter Verwendung von Originalproben. Falsche Probenvorbereitung, fehlerhaftes Reagenz, Instrumentenversagen oder interner Kontrollfehler.
Negativkontrolle	POSITIV	Falsches Kontrollergebnis. Die Patientenergebnisse können nicht ausgegeben werden. Die Kontrolltests wiederholen. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, bitte rufen Sie den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Auslieferer.
	NEGATIV	Gültiges negatives Kontrollergebnis. Reagenzien sind zum Zeitpunkt der Verwendung aktiv, <i>illumipro-10</i> funktioniert korrekt.
	UNGÜLTIG	Kein meldefähiges Ergebnis. Wiederholen Sie den gesamten Assay-Lauf unter Verwendung von Originalproben. Falsche Probenvorbereitung, fehlerhaftes Reagenz, Instrumentenversagen oder interner Kontrollfehler.
LEERER SCHACHT	KEINE/R	Kein <i>illumigene</i> -Testgerät im <i>illumipro-10</i> -Schacht. ODER Das vorhandene <i>illumigene</i> -Testgerät ist aufgrund fehlerhafter Probenvorbereitung, eines verunreinigten Geräts oder falsch aufgestellten Geräts beeinträchtigt. Wiederholen Sie den Test unter Verwendung der Originalprobe.

QUALITÄTSKONTROLLE

Den Test gemäß der einschlägigen lokalen, bundesstaatlichen oder nationalen bzw. zulassungsbehördlichen Auflagen durchführen.

- Jedes Gerät enthält eine interne Kontrolle, die die Amplifikationsinhibition, Assay-Reagenzien und die Effizienz der Probenverarbeitung überwacht. Die DNA der internen Kontrolle ist im Reagenz der Assay-Kontrolle II vorhanden und wird in allen Verfahrensschritten verarbeitet. Die Primer für die Amplifikation der internen Kontroll-DNA sind in der Kontrollkammer des *illumigene*-Testgeräts vorhanden.
- Der Hitzebehandlungsschritt wird mit einem externen Thermometer und einer Intervall-Stoppuhr überwacht. Verwenden Sie den Max-/Min-Temperaturspeicher des Thermometers, um sicherzustellen, dass eine Temperatur von 95 ± 5 C aufrecht erhalten bleibt. Verwenden Sie die Intervall-Stoppuhr, um sicherzustellen, dass die Dauer der Hitzebehandlung 10 ± 2 Minuten beträgt.
- Gemäß Guter Laborpraxis ist die Anwendung von Kontrollmaterialien empfohlen. Anwender sollten die entsprechenden bundesstaatlichen, staatlichen und kommunalen Richtlinien zur Mitführung von externen Qualitätskontrollen befolgen.
- Externe Kontrollreagenzien für *illumigene* Mycoplasma werden separat geliefert (Bestellnr. 279940). Es wird empfohlen, die Reaktivität jeder neuen Charge und jeder neuen Lieferung von *illumigene* Mycoplasma beim Empfang und vor Gebrauch zu überprüfen. Externe Kontrolltests sind danach gemäß bundestaatlichen, staatlichen und kommunalen Richtlinien durchzuführen. Das *illumigene* Mycoplasma-Testkit sollte nicht für Tests an Patientenproben verwendet werden, wenn die externen Kontrollen nicht die richtigen Ergebnisse erzeugen.
- Für jedes externe Kontrollreagenz muss ein separates Testgerät verwendet werden. Die externen Kontrollverfahren zur Qualitätssicherung finden Sie in der Packungsbeilage der externen *illumigene* Mycoplasma-Kontrollen.

ERWARTETE WERTE

Die Gesamtinzidenz von *Mycoplasma pneumoniae* bei prospektiv entnommenen und getesteten Proben während der im Jahr 2012 durchgeführten klinischen Studie betrug 11,7% (12/103).

EINSCHRÄNKUNGEN

- Dieses Produkt kann nur mit dem *illumipro-10*-Instrument verwendet werden.
- Beim *illumigene* Mycoplasma-DNA-Assay handelt es sich um einen qualitativen Assay, der keine quantitativen Ergebnisse oder Informationen zur Belastung mit den Organismen liefert.
- Dieses Gerät wurde nicht für die Überwachung der Behandlung von Infektionen mit *Mycoplasma pneumoniae* geprüft.
- Atemwegsinfektionen können von *Mycoplasma pneumoniae* sowie anderen Pathogenen verursacht werden. Ein positives Ergebnis schließt eine Koinfektion mit anderen Pathogenen der Atemwege nicht aus.
- Die Testleistung bei anderen Proben als bei Nasopharyngeal- und Rachenabstrichproben beim Menschen, bei immungeschwächten Personen oder Patienten, bei denen nicht von einer Infektion mit *M. pneumoniae* ausgegangen wird, wurde nicht bestimmt.
- Die Detektion von Nukleinsäuren des *M. pneumoniae* hängt von der korrekten Probenahme sowie Handhabung, Transport, Lagerung und Vorbereitung inklusive Extraktion ab. Wird das ordnungsgemäße Verfahren bei einem dieser Schritte nicht eingehalten, kann dies zu falschen Ergebnissen führen.
- Da in der prospektiven klinischen Studie nur eine begrenzte Anzahl an positiven Proben vorhanden war, wurden die Leistungsmerkmale sowohl an prospektiven als auch retrospektiven klinischen Proben bestimmt.
- Die Prävalenz einer Infektion mit *M. pneumoniae* beeinflusst den prädiktiven Wert des Tests.
- Die Nukleinsäuren des Organismus können unabhängig von der Lebensfähigkeit des Organismus *in vivo* fortbestehen. Die Detektion eines Analyten-DNA-Ziels deutet nicht notwendigerweise auf Auslöser für klinische Symptome hin. Der *illumigene* Mycoplasma-Assay kann nicht zwischen Trägern und infizierten Personen unterscheiden.
- Die Ergebnisse sollten im Rahmen der klinischen Vorgeschichte, der epidemiologischen Daten und weiteren dem Arzt zur Verfügung stehenden Informationen ausgelegt werden. Wie bei allen anderen diagnostischen Tests auf molekularer Grundlage können (A) falsch negative Ergebnisse infolge der Präsenz von Inhibitoren, technischen Fehlern, Vertauschen der Proben und geringer Organismenanzahl in der klinischen Probe entstehen, (B) falsch positive Ergebnisse können infolge der Präsenz einer Kreuzkontamination mit Zielorganismen, deren Nukleinsäuren oder dem amplifizierten Produkt sowie von nicht-spezifischen Signalen entstehen.
- Die Wirkung störender Substanzen wurde nur bei den auf der Kennzeichnung ausgewiesenen Substanzen beurteilt. Die Beeinflussung durch andere Substanzen als die, die im Abschnitt „Tests auf störende Substanzen“ weiter unten aufgeführt sind, könnten zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Eine BLAST-Analyse deutet nicht darauf hin, dass die Primer mit einem anderen Organismus außer *M. pneumoniae* reagieren; jedoch könnte eine Kreuzreaktivität mit anderen Atemwegsorganismen als denen, die im Abschnitt „Kreuzreaktivität“ weiter unten aufgeführt sind, zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Bei Vorhandensein von *Moraxella catarrhalis*, *Nocardia asteroides* oder Coronaviren in hoher Konzentration besteht die Gefahr eines falsch negativen Ergebnisses. Bei diesen drei Organismen wurde ein falsch negatives Ergebnis nur bei einem von sieben Replikaten erhalten, wobei die Proben während dem ersten Test nahe der Nachweisgrenze getestet und nicht mit weiteren Tests geprüft wurden.
- Phenylephrin-HCl in abschwellenden Nasensprays führte in Konzentrationen über 0,595 mg/mL bei *M. pneumoniae*-Stamm M129 in Wiederholungstests zur Nachweisgrenze zu falsch negativen Ergebnissen.

LEISTUNGSMERKMALE

Der *illumigene* Mycoplasma-DNA-Amplifikationsassay wurde 2012 durch unabhängige klinische Untersuchungsstellen in geographisch unterschiedlichen Regionen der USA bewertet. Insgesamt 334 qualifizierte Rachen- und Nasopharyngeal (NP)-Abstrichproben von Patienten mit vermuteter *Mycoplasma pneumoniae*-Infektion wurden mit dem Testgerät geprüft, um Leistungsmerkmale zu bestimmen. Bei den Proben handelte es sich um übriggebliebene deidentifizierte Proben, die für routinemäßige Tests auf *M. pneumoniae* an die Prüflabors übermittelt wurden. Die bei der Leistungsbeurteilung untersuchten Proben waren prospektiv (nie eingefroren) und retrospektiv (vor dem *illumigene*-Test eingefroren). Die Leistung des *illumigene* wurde mit einer Komposit-Referenzmethode verglichen, die eine *M. pneumoniae*-Bakterienkultur mit Identifikation und einen validierten PCR-Assay in Echtzeit, gefolgt von bidirektionaler Sequenzierung der positiven Proben, umfasste. Proben, die positive *Mycoplasma pneumoniae*-Ergebnisse lieferten, entweder aus der Bakterienkultur oder PCR in Echtzeit und bidirektionaler Sequenzierung, wurden für positiv erachtet. Proben, die in Bezug auf Kultur und PCR negativ ausfielen, wurden als negativ eingestuft. Insgesamt 12 Proben wurden aus der klinischen Probenpopulation ausgeschlossen, da die Ergebnisse der Kultur unschlüssig und PCR-negativ waren, so dass eine endgültige Einteilung des Patientenstatus nicht möglich war. Insgesamt 103 (30,8%) prospektive und 219 retrospektive Proben (65,6%) wurden getestet, wobei ein anfänglich ungültiges Ergebnis auftrat (0,30%).

Die Leistungsmerkmale sind in den Tabellen 1-2 zusammengefasst. Eine statistische Analyse der Proben-Typ-Leistungsdaten wurde ohne wesentlichen Unterschied zwischen den verschiedenen Abstrichtypen durchgeführt.

Die Daten zeigen an, dass die Leistung dann optimal ist, wenn die Proben prospektiv gesammelt und getestet werden.

Tabelle 1. Leistung des *illumigene* Mycoplasma-Assays: Nasopharyngeale Abstriche

Beschreibung der Probe	Positive Proben			Negative Proben			Ungültige Ergebnisse
	<i>illumigene</i> vs. Vergleichspräparat	% Sensitivität oder PPA	95% CI	<i>illumigene</i> vs. Vergleichspräparat	% Spezifität oder NPA	95% CI	
Vergleichspräparat Kompositmethode							
Prospektiv	4/4	% Sensitivität 100%	51,0 – 100,0%	48/48	% Spezifität 100%	92,6 – 100,0%	0
Retrospektiv	34/36	PPA 94,4%	81,9 – 98,5%	86/90	NPA 95,6%	89,1 – 98,3%	0
Validierter PCR-Assay mit Vergleichspräparat für bidirektionale Sequenzierung							
Prospektiv	4/4	% Sensitivität 100%	51,0 – 100,0%	48/48	% Spezifität 100%	92,6 – 100,0%	0
Retrospektiv	34/36	PPA 94,4%	8,9 – 98,5%	86/90	NPA 95,6%	89,1 – 98,3%	0

Tabelle 2. Leistung des *illumigene* Mycoplasma-Assays: Rachenabstrichtupfer

Beschreibung der Probe	Positive Proben			Negative Proben			Ungültige Ergebnisse
	<i>illumigene</i> vs. Vergleichspräparat	% Sensitivität oder PPA	95% CI	<i>illumigene</i> vs. Vergleichspräparat	% Spezifität oder NPA	95% CI	
Vergleichspräparat Kompositmethode							
Prospektiv	8/8	% Sensitivität 100%	67,6 – 100,0%	43/43	% Spezifität 100%	91,8 – 100,0%	0
Retrospektiv	22/26 ^a	PPA 84,6%	66,5 – 93,9%	66/67	NPA 98,5%	92,0 – 99,7%	1
Validierter PCR-Assay mit Vergleichspräparat für bidirektionale Sequenzierung							
Prospektiv	8/8	% Sensitivität 100%	67,6 – 100,0%	43/43	% Spezifität 100%	91,8 – 100,0%	0
Retrospektiv	21/21 ^b	PPA 100%	84,5 – 100,0%	70/72	NPA 97,2%	90,4 – 99,2%	1

- Vier Proben, die ursprünglich anhand einer Kultur als positiv identifiziert wurden, wurden mittels *illumigene*-Assay oder unabhängiger PCR-Methode nicht bestätigt. Die Ergebnisse deuten auf eine Degradierung der Proben während der Lagerung hin.
- Eine Probe, die mittels *illumigene*-Assay und Kultur zunächst für positiv befunden wurde, war der unabhängigen PCR-Methode zufolge negativ. Diese Probe wird gemäß PCR als falsch positiv eingestuft.

Altersangaben waren bei 83,5% (269/322) der in die Leistungsbeurteilung eingeschlossenen Patienten bekannt. Sieben (2,6%) der getesteten Patienten waren zwischen 0 und 28 Tage alt; 38 (14,1%) der Patienten waren zwischen 29 Tage und 2 Jahre alt; 139 (51,7%) der Patienten waren zwischen 2 und 12 Jahre alt; 61 (22,7%) der Patienten waren zwischen 12 und 18 Jahre alt; und 9 (3,3%) der Patienten waren zwischen 18 und 21 Jahre alt. Die restlichen 15 (5,6%) Studienpatienten waren älter als 21 Jahre. Es wurden keine Leistungsunterschiede aufgrund des chronologischen Alters festgestellt.

Die Studienpopulation umfasste 90 (27,9%) weibliche und 91 (28,3%) männliche Patienten. Das Geschlecht war bei 141 (43,8%) Studienteilnehmern nicht bekannt. Bei den Proben, bei denen das Geschlecht des Patienten bekannt war, konnten basierend auf dem Geschlecht keine Leistungsunterschiede festgestellt werden.

Die klinische Leistung des *illumigene* Mycoplasma-DNA-Amplifikationsassays wurde durch Testen der deidentifizierten Nasopharyngeal- und Rachenabstrichproben ohne klinische Daten beurteilt; entsprechend war die Anzahl der in die Studie aufgenommenen Patienten mit *M. pneumoniae*-Pneumonie unbekannt, und die Leistung in Bezug auf diese Gruppe kann nicht separat beschrieben werden.

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Die analytische Sensitivität bzw. die Nachweisgrenze für den *illumigene* Mycoplasma-Assay wurde für zwei Stämme von *M. pneumoniae* bestimmt.

Die Nachweisgrenze wurde unter Verwendung von mindestens 20 Replikaten jeder Messgröße und anhand einer angegebenen Wahrscheinlichkeit (z.B. 95%, von denen 19/20 Replikate positiv sind) des Erhalts einer positiven Reaktion bestimmt. Die Tests zur analytischen Sensitivität sind nachstehend zusammengefasst:

<i>Mycoplasma pneumoniae</i> Beschreibung des Stammes	KBE/Test	KBE/mL
FH (ATCC 15531)	88	2 350
M129	7,5	200

ASSAY-REAKTIVITÄT

Die folgende Stämme von *M. pneumoniae* wurden getestet und erzeugten mit dem *illumigene* Mycoplasma bei oder unterhalb der angegebenen Nachweisgrenze des Assays von 88 KBE/Test (2350 KBE/mL) positive Reaktionen: PI 1428 (ATCC 29085), MAC (ATCC 15492), M52 (ATCC 15293), Bru (ATCC 15377), M129-B170 (ATCC 29343), Mutant 22 (ATCC 39505) UAB 55612, UAB 56317, UMTB-10G (ATCC 49899). In den Tests zeigte sich, dass sowohl Stämme des Typs 1 als auch Stämme des Typs 2 mit dem Assay nachgewiesen werden können.

REPRODUZIERBARKEIT

Verschlüsselte Panel von 10 Proben wurden drei unabhängigen Laboren für Reproduzierbarkeitsstudien übergeben. Die Proben waren innerhalb jedes Panel nach dem Zufallsprinzip gereiht, um die Probenidentität zu maskieren. Die Panel umfassten künstliche Proben in Form von leicht positiven Proben (d.h. nahe der Nachweisgrenze des Assays, n=3) und hoch negativen Proben (n=3). Die Panel enthielten auch künstliche positive (n=3) Proben und natürliche negative Proben (n=1). Die Tests wurden am selben Tag von verschiedenen Bedienern in jeder Einrichtung (Intra-Assay-Variabilität) fünf Tage lang (Inter-Assay-Variabilität) durchgeführt. In dieser Studie wurden drei Chargen von *illumigene* Mycoplasma und fünf *illumipro-10*-Instrumente eingesetzt. An jedem Testtag wurden die Positiv- und Negativkontrollen getestet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle unten angeführt:

Probenotyp	Einrichtung 1		Einrichtung 2		Einrichtung 3		Gesamt	
	Übereinstimmung in Prozent	100%	Übereinstimmung in Prozent	100%	Übereinstimmung in Prozent	100%	Übereinstimmung in Prozent	100%
Negativ	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%	30/30	100%
Stark negativ	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%	90/90	100%
Schwach positiv	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%	90/90	100%
Positiv	29/30	96,7%	30/30	100%	29/30	96,7%	88/90	97,8%
Negativkontrolle	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%	30/30	100%
Positivkontrolle	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%	30/30	100%

KREUZREAKTIVITÄT / STUDIEN ZU MIKROBIELLEN STÖRUNGEN

Kreuzreaktivitätsstudien wurden mit positiven und negativen Proben, die mit potentiell störenden bakteriellen oder mykotischen Organismen inokuliert waren (minimale Endkonzentration $1,0 \times 10^6$ KBE/mL), durchgeführt. Die Viren wurden bei Konzentrationen über $1,0 \times 10^5$ TCID₅₀/mL oder $1,0 \times 10^6$ Kopien/mL getestet. Humane DNA wurde bei 2,0 mg/Test getestet, und es wurde keine Kreuzreaktivität beobachtet. Die positiven Proben enthielten Konzentrationen an *M. pneumoniae*, die nahe der Nachweisgrenze lagen. Keiner der folgenden Organismen oder Materialien wurde als kreuzreaktiv oder im *illumigene* Mycoplasma-Assay als störend eingestuft:

Acinetobacter baumannii, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Actinomyces odontolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* (ESBL), *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* (KPC), *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella paratyphi* (Gruppe A), *Salmonella typhimurium* (Gruppe B), *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* (Gruppe B), *Streptococcus anginosus* (Gruppe F), *Streptococcus bovis* (Gruppe D), *Streptococcus canis* (Gruppe G), *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Ureaplasma urealyticum*, Adenovirus, Coxsackievirus, Cytomegalovirus, Epstein-Barr-Virus, Herpes simplex-Virus 1, Herpes simplex-Virus 2, humanes Metapneumovirus, Influenza A, Influenza B, Parainfluenza-Virus 1, Parainfluenza-Virus 2, Parainfluenza-Virus 3, Respiratory-Syncytial-Virus A, Respiratory-Syncytial-Virus B, Rhinovirus, menschliche DNA.

Moraxella catarrhalis, *Nocardia asteroides* und das Coronavirus sorgten bei anfänglichen Tests für unerwartete Ergebnisse, die nicht anhand weiterer Tests bestätigt wurden. Bei jedem Organismus kam es bei einem von sieben Replikaten, die nahe der Nachweisgrenze getestet wurden, zu falsch negativen Ergebnissen.

STÖRSUBSTANZEN-TESTS

Potenziell störende Substanzen wurden mit simulierten negativen und künstlichen positiven Proben (*M. pneumoniae*-Stämmen M129 und FH) getestet. Die potenziell störenden Substanzen wurden mit steriler Kochsalzlösung verdünnt und dem M4-Medium mit Rayon-Tupfern (negative Probe) und dem M4-Medium mit Polyester-Tupfern (künstliches positives Ergebnis) zugegeben und getestet.

Die folgenden biologischen Substanzen stören in den angegebenen Lösungsmittel-/Verdünnungsmittelkonzentrationen die Testergebnisse des *illumigene* Mycoplasma nicht:

Mucus (5,0 mg/mL), weiße Blutzellen (0,5% v/v) und Vollblut (5% v/v).

Die folgenden chemischen Substanzen stören in den angegebenen Lösungsmittel-/Verdünnungsmittelkonzentrationen die Testergebnisse des *illumigene* Mycoplasma nicht:

Acetaminophen (18,1 mg/mL), Albuterolsulfat (20 mg/mL), Aspirin (9,1 mg/mL), Azithromycindehydrat (2,0 mg/mL), Cepaco® Mundspülung [Ethanol, denaturiert (1,4% v/v), Cetylpyridiniumchlorid (0,005% v/v)], Contac® Erkältungs- und Grippe-Tabletten [Acetaminophen (14,8 mg/mL), Chlorpheniraminmaleat (0,06 mg/mL), Phenylephrin HCl (0,15 mg/mL)], Diphenhydramin HCl (2,6 mg/mL), Erythromycin (20,0 mg/mL), HALLS® Hustenbonbons [Menthol (0,06 mg/mL)], Ibuprofen (12,7 mg/mL), Phenylephrin HCl (0,595 mg/mL), Prednison (20,0 mg/mL), Robitussin® Husten+Brust Hustensaft [Dextromethorphan HBr (0,20 mg/mL), Guaifenesin (2,0 mg/mL)], Saline Nasenspray [Natriumchlorid (0,65 mg/mL)].

Phenylephrin HCl, welches in abschwellendes Nasensprays enthalten ist, führte in Konzentrationen über 0,595 mg/mL während Wiederholungstests zur Nachweisgrenze von *M. pneumoniae*-Stamm M129 zu falsch negativen Ergebnissen.

REFERENCES

1. Nagamine, K., Hase, T., Notoni, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplifications using loop primers. *Mol Cell Probes* 2002;16:223-29.
2. Waites, K.B., et al. New insights into the pathogenesis and detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Future Microbiol.* 2008 December; 3(6):635-648.
3. Waites, K.B., Talkington, D.F., *Mycoplasma pneumoniae* and Its Role as a Human Pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2004 October; 17(4):697-728.
4. Thibodeau, K.P., Viera, A.J. Atypical Pathogens and Challenges in Community-Acquired Pneumonia. *American Family Physician.* 2004 April; Vol 66, Number 7.
5. US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. *Mycoplasma pneumoniae*. 2005; http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/mycoplasmapneum_t.htm
6. American Academy of Pediatrics. *Red Book: 2012 Mycoplasma pneumoniae and Other Mycoplasma Species Infections*. Pickering LK, ed. 29th ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics; 2012.
7. US Department of Health and Human Services PHS/CDC/NIH. Biosafety in microbiology and biomedical laboratories, Washington DC: US Government Printing Office, 2007.



SN11183

REV. 05/13

Meridian Bioscience, Inc.
USA/Corporate Office
3471 River Hills Drive
Cincinnati, Ohio 45244
Telephone: (513) 271-3700
Orders/Customer Service:
(800) 543-1980
Technical Support Center:
(800) 343-3858
Information Fax:(513) 272-5432
Ordering Fax:(513) 271-0124

Manufactured By

Meridian Bioscience Europe
Via dell'Industria, 7
20020 Villa Cortese (MI)
Italy
Tel: +39 0331 433636
Fax: +39 0331 433616
e-mail: info@mdeur.com

Meridian Bioscience Europe s.a. / n.v.
Rue de l'Industrie 7
1400 Nivelles
Belgium
Tel.: +32 (0) 67 89 59 59
Fax: +32 (0) 67 89 59 58
e-mail: info@mdeur.be


















Meridian Bioscience Europe b.v.
Halderheiweg 6
5282 SN Boxtel
The Netherlands
Tel.: +31 (411) 621166
Fax: +31 (411) 624841
e-mail: meridian.info@planet.nl

Meridian Bioscience Europe France
34, rue de Ponthieu
75008 Paris
Tel: +33 (0) 1 42 56 04 40
Fax: +33 (0) 9 70 06 62 10
e-mail: info@meridianbioscience.fr

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE

You may see one or more of these symbols on the labeling/packaging of this product:

Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symbols, Guia de símbolos, Erläuterung der graphischen symbole)

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	CONTROL +	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
LOT	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung	CONTROL -	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
IVD	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo médico-diagnóstico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum	EC REP	Authorized Representative in the European Community / Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea / Mandataire dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunità Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
	This product fulfills the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical devices / Questo prodotto soddisfa i requisiti della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro / Ce produit répond aux exigences de la Directive 98/79 CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Dieses Produkt entspricht den Anforderungen der Richtlinie über In Vitro Diagnostica 98/79/EG.	SMP PREP DIL. SPE	Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Dispositivo per la preparazione del campione contenente il diluente del campione / Système pour la préparation de l'échantillon: diluant inclus / Aparato para Preparación de Muestra con Diluyente de Muestra / System zur Probenvorbereitung, in dem sich Probenverdüpfungspuffer befindet
REF	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Einfrieren
	Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten	RoHS	Restriction of Hazardous Substances / Restrizione di sostanze pericolose / Limitation de substances dangereuses / Restricción de Substancias Nocivas / Beschränkung der Verwendung bestimmter gefährlicher Stoffe
	Manufacturer / Fabricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller		Caution, consult accompanying documents / Attention, vedere le istruzioni per l'uso / Attention voir notice d'instructions / Atención, ver instrucciones de uso / Achtung, Begleitdokumente beachten
	Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per <n> saggi / Contenu suffisant pour <n> tests / Contenido suficiente para <n> ensayos / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen	BUF RXN	Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limite de température / Límites de temperatura / Temperaturbegrenzung		ETL Registered Mark Certified / Marchio di certificazione registrato a livello nazionale / Certifí Conforme ETL / Marca de Certificación Registrada Nacional / ETL Konform begabteigt
SN	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer		Recycle – do not dispose of as general waste / Riciclare – non eliminare come rifiuto generico / Recycler – ne pas jeter dans une poubelle / Recycle – no deseches como basura general / Recycling- dieses Produkt nicht über den Hausmüll entsorgen
TEST	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / Testgerät	HT TUBE	Heat Treatment Tube / Provetta per il trattamento termico / Tube pour le traitement thermique / Tubo de tratamiento de calor / Röhren zur Hitzebearbeitung
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum		For IVD Performance Evaluation Only / Solamente per valutazione delle prestazioni / Réactifs IVD réservés à l'évaluation des performances / Sólo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbeurteilung
	LASER RADIATION: Avoid Exposure to Beam / RADIAZIONE LASER: Evitare l'esposizione al raggio / RAYONNEMENT LASER: Eviter toute exposition au faisceau / Radiación Laser: Evite Exposición a los Rayos / LASERSTRAHLUNG: Direkten Kontakt mit dem Strahl vermeiden		HOT SURFACE: Keep hands away from Hot Surfaces / Superfici calde: tenere le mani lontane dalle superfici calde / SURFACES CHAUDES: Ne pas toucher les surfaces chaudes / Superficie Caliente: Mantenga las manos alejadas de la superficie caliente / Heiße Oberfläche: Kontakt mit heißen Oberflächen vermeiden
	CAUTION: Laser Radiation / ATTENZIONE: Radiazione Laser / AVERTISSEMENT: Rayonnement laser / Precaución: Radiación Laser / WARNUNG: Laserstrahlung	IPX-0	CAUTION: Protect from water / ATTENZIONE: Proteggere dall'acqua / AVERTISSEMENT: Protéger de l'humidité / Precaución: Proteja del agua / WARNUNG: Vor Feuchtigkeit schützen
	CAUTION: Risk of Danger / ATTENZIONE: Pericolo / AVERTISSEMENT: Risques de danger / Precaución: Peligroso / WARNUNG: Risikogefahr	CONTROL	Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
BUF	Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / Tampón / Puffer	REAG	Reagent / Reagente / Réactifs / Reactivos / Reagenzien
CONJ	Conjugate / Coniugato / Conjugué / Conjugado / Konjugat		Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
MIN OIL	Mineral Oil / Olio Minerale / Huile Minérale / Aceite Mineral / Mineralöl	DET REAG	Detection Reagent / Reagente Diretto / Réactif de Détection / Reactivo de Detección / Nachweis Reagent
ST TUBE	Screw Top Tube / Provetta con tappo a vite / Tube à bouchon vissé / Tubo con tapa de rosca / Röhren mit Schnappverschluss	COL	Sample Preparation Column / Colonna di preparazione del campione / Colonne pour la préparation de l'échantillon / Columna de preparación de muestra / Säule zur Probenaufarbeitung
BUF SMP	Sample Buffer / Soluzione tampone per il campione / Tampon de l'échantillon / Tampon de muestra / Probenpuffer	REAG 1	Reagent 1 / Reagente 1 / Réactifs 1 / Reactivos 1 / Reagenzien 1
REAG 2	Reagent 2 / Reagente 2 / Réactifs 2 / Reactivos 2 / Reagenzien 2	REAG 3	Reagent 3 / Reagente 3 / Réactifs 3 / Reactivos 3 / Reagenzien 3
REAG 4	Reagent 4 / Reagente 4 / Réactifs 4 / Reactivos 4 / Reagenzien 4	REAG A	Reagent A / Reagente A / Réactifs A / Reactivos A / Reagenzien A
REAG B	Reagent B / Reagente B / Réactifs B / Reactivos B / Reagenzien B	REAG C	Reagent C / Reagente C / Réactifs C / Reactivos C / Reagenzien C

For technical assistance, call Technical Support Services at 800-343-3858 between the hours of 8AM and 6PM, USA Eastern Standard Time. To place an order, call Customer Service Department at 800-543-1980.