



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



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

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



## MAST ISOPLEX® VTEC kit

### DNA/LYO3 20 tests

Pour une utilisation sur thermocycleurs en temps réel avec capacité de détection FAM, TAMRA et CY5.

### Utilisation

Le kit MAST ISOPLEX® VTEC est optimisé pour le typage d'*E. coli* productrice de vérotoxines (VTEC) dans les échantillons de selles humains à l'aide de la technique LAMP (loop-mediated isothermal amplification) en utilisant la technologie de sondes MAST ISOPLEX®. Le kit contient les réactifs pour la détection des gènes d'*E. coli* associés à la virulence : les variants VTEC 1 et 2 (VT1 and VT2). Les gènes VT1 et VT2 peuvent être détectés simultanément à l'aide de l'essai triplex contenant un contrôle d'inhibition (IC DNA).

### Composants du kit

1. Culots LAMP VTEC (PEL1) x 2 culots. Bouchon rouge.
2. Mélanges de sondes et amorces VTEC mélangé avec Inhibition Control DNA (PP1) x 2 tubes. Bouchon blanc.
3. Positive Control DNA (VT1VT2). Bouchon vert.
4. Reconstitution Buffer (RB) x 1 tube. Bouchon jaune.
5. Water, molecular grade (WTR) x 1 tube. Bouchon noir.

### Conservation

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

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

### Précautions d'emploi

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

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

### Matériels nécessaires et non fournis

1. ADN extrait d'un échantillon de selles humain apporté par l'utilisateur.
2. Pour s'assurer une sensibilité optimale du test, il est recommandé d'utiliser des ADN extraits provenant de cultures.
3. Echantillon d'ADN à tester obtenu selon les procédures de laboratoire standards.
4. Dispositifs standards sans DNase : tubes de réaction, pipettes et embouts.
5. Instrument pouvant effectuer une incubation isotherme des tubes de la réaction à une température donnée tel que le système Applied Biosystems (ABI) 7500 FAST

REAL-TIME PCR, ou un thermocycleur interne équivalent. L'instrument doit être équipé d'un lecteur de fluorescence avec des canaux de détection FAM, TAMRA, et CY5 pour la reconnaissance des produits amplifiés.

### Préparation des réactifs

Reconstitution des composants lyophilisés :

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

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

**Table 1 : Reconstitution des composants lyophilisés**

Composant	Diluant	Volume
PEL1	RB	20µL
PP1	H <sub>2</sub> O	10µL
VT1VT2 DNA	H <sub>2</sub> O	20µL

### Configuration de l'analyse VTEC

Chaque PEL1 reconstitué peut être utilisé pour 10 analyses (10µL par test).

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

**Table 2 : Configuration de l'analyse VTEC**

Configuration de l'analyse VTEC	Par échantillon
PEL1 reconstitué avec RB	2µL
PP1 reconstitué	1µL
Echantillon d'ADN ou VT1VT2 DNA (positive control)	1-7µL d'échantillon d'ADN ou 1µL de VT1VT2 PCDNA
WTR	0-6µL
Volume réactionnel total	10µL

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

### Informations de programmation pour le thermocycleur en temps réel utilisé

#### Sélection des couleurs :

TAMRA pour la détection du contrôle d'inhibition IC

CY5 pour la détection de VT1

FAM pour la détection de VT2

Température : 63°C

Volume d'échantillon : 10µL

ROX (si disponible) : non sélectionné

Durée limite de l'analyse : 40 minutes.

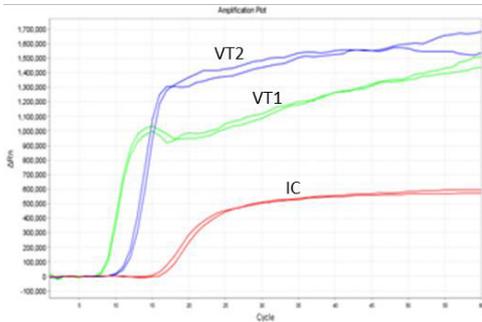
#### Analyse des résultats :

Ligne de base : 3 à 5 cycles

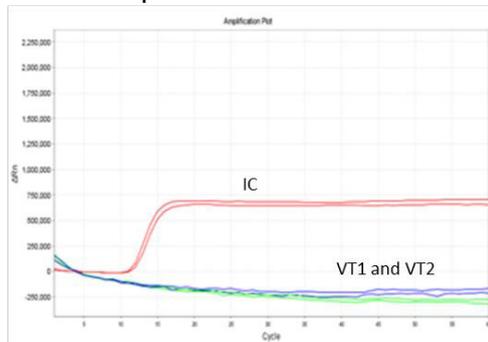
Réglage du seuil : au-dessus de la courbe générée par le contrôle négatif.

## Interprétation des résultats

### A – E. coli VT1 and VT2 Positive Control



### B – No template control



A – Contrôle positif pour E.coli VT1 et VT2  
B – Contrôle négatif

**Table 3 : Critères de validation de l'interprétation du test VTEC multiplex assay avec un contrôle d'inhibition (IC)**

Contrôles	Gènes cibles (VT1 CY5, VT2 FAM)	Contrôle d'inhibition IC TAMRA	Interprétation
Contrôle négatif	-	+	Valide
Contrôle positif	+	+	Valide
Echantillon	-	+	Négatif pour les gènes cibles
Echantillon	-	-	Invalide
Echantillon	+	+/- *	Positif for le gène cible

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

## Contrôle de qualité

Il est recommandé de réaliser le contrôle de qualité sur le kit MAST ISOPLEX® VTEC en utilisant le culot VTEC (PEL1), le Positive Control DNA (VT1VT2), le mélange d'amorces, probes et IC DNA (PP1), le Reconstitution Buffer (RB) et la molecular grade water (WTR) du kit pour chaque série de tests. Ces tests permettent de vérifier le bon fonctionnement des réactifs selon les spécifications ainsi que l'absence de contamination des réactifs du kit. Si les résultats des réactions de contrôle sont incorrects, vérifier l'absence de signes de détérioration ou de

contamination des réactifs du kit et effectuer un nouveau test. Si le nouveau test échoue également, contactez le service d'assistance technique de Mast pour obtenir des conseils.

## Limites d'utilisation

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

## Spécificité/Sensibilité/Limite de Détection (LOD)

Les données obtenues à partir d'ADN extraits d'échantillons fécaux à VTEC présumé et de cultures négatives pour VTEC (n=23).

Sensibilité – 90%

Spécificité – 100%

LOD (nombre de copies de génome): VT1: 29  
VT2: 24