

MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD

Kit de PCR en temps réel Multiplex pour MRSA, IVD

REF MD04931, 96 réactions

À usage professionnel de diagnostic in vitro uniquement



FR

Mode d'emploi

MD0493_IM_fr

VERSION 2401, janvier 2024



Table des Matières

1. Introduction	3
2. Utilisation prévue.....	3
3. Principes du test.....	3
4. Composition du kit.....	4
5. Conditions de stockage, de stabilité et de manipulation.....	4
6. Matériel et instrumentation requis mais non fournis	4
7. Prélèvement et préparation des échantillons	4
8. Précautions et avertissements.....	5
8.1. Information de sécurité	5
8.2. Exigences de manipulation et de procédure	5
9. Procédure de test.....	5
9.1. Configuration de la réaction	5
9.2. Programmation de l'équipement de PCR en temps réel	6
10. Analyse des données.....	6
10.1. Critères de validation du test.....	6
10.2. Interprétation des résultats des tests.....	7
11. Évaluation des performances	8
11.1. Résultats attendus	8
11.2. Limite de détection (LoD) - Sensibilité analytique	8
11.3. Spécificité analytique	8
11.3.1. Réactivité croisée (exclusion) et spécificité	8
11.3.2. Substances interférentes	9
11.4. Précision	9
11.4.1. Répétabilité.....	11
11.4.2. Reproductibilité quotidienne	11
11.4.3. Reproductibilité lot à lot	11
11.4.4. Reproductibilité par opérateur	11
11.4.5. Reproductibilité entre des instruments.....	11
11.5. Évaluation clinique.....	11
12. Contrôle de qualité	12
13. Assistance technique	12
14. Marques de commerce et clauses de non-responsabilité	12
15. Explication des symboles	13
16. Déclaration de conformité.....	14
17. Références	15

1. Introduction

Dans le monde entier, le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA, par l'acronyme en anglais) est l'un des agents pathogènes humains les plus fréquents des infections nosocomiales et communautaires. *S. aureus* a une capacité remarquable à acquérir une résistance aux antibiotiques, ce qui a des implications majeures pour les options thérapeutiques de cette bactérie pathogène. Dans les années 1960, le MRSA a été observé pour la première fois parmi des isolats cliniques de patients hospitalisés au Royaume-Uni, mais depuis les années 1990, il s'est propagé rapidement au sein de la communauté. Au cours de la dernière décennie, les infections à MRSA ont considérablement augmenté, ce qui en fait un sujet de grande importance. Les infections à MRSA sont généralement subdivisées en MRSA d'origine communautaire (CA-MRSA), MRSA associé aux soins de santé (HA-MRSA) et MRSA associé au bétail (LA-MRSA). *S. aureus* évolue en MRSA par captation, par transfert horizontal de gènes, de la cassette chromosomique staphylococcique *mec* (SCC*mec*), un élément génétique mobile qui code pour les gènes *mecA* ou *mecC* qui confèrent une résistance à l'oxacilline et à la méthicilline et, par conséquent, à la plupart des antibiotiques β -lactamines. La résistance staphylococcique à l'oxacilline/méthicilline se produit lorsqu'un isolat porte une protéine de liaison à la pénicilline altérée, PBP2a, qui est codée par le gène *mecA* (ou *mecC*). La nouvelle protéine de liaison à la pénicilline lie les β -lactamines avec une avidité plus faible, ce qui entraîne une résistance à cette classe d'agents antimicrobiens. À ce jour, 14 types de cassettes SCC*mec* ont été décrits, parmi lesquels les types I à V sont les plus fréquents. La cassette SCC*mec* du type XI contient un autre homologue de *mecA*, également appelé *mecC* ou *mecALGA*₂₅₁. Les échantillons cliniques contiennent souvent à la fois des *staphylocoques* à coagulase négative (CoNS) et *S. aureus*, qui peuvent tous porter le gène *mecA*. Par conséquent, étant donné que la détection de *mecA/mecC* seule est insuffisante pour identifier spécifiquement le MRSA, les échantillons doivent être spécifiquement testés pour *S. aureus* parallèlement à la détection du gène *mecA/mecC*. Ainsi, pour éviter la détection de faux positifs dus à la présence de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline ou de *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline (SASM), et pour détecter avec précision le MRSA précédemment décrit dans un échantillon clinique, une région spécifique du *S. aureus* située entre le cadre de lecture ouvert conservé *orfX* et SCC*mec* contenant le gène *mecA/mecC* doivent être ciblés. De plus, *S. aureus* produit une thermonucléase extracellulaire, codée par le gène *nuc* spécifique à l'espèce, qui est couramment utilisé pour distinguer *S. aureus* des autres *Staphylococcus spp.*

La détection de MRSA basée sur la culture nécessite l'isolement de colonies pures suivi d'un test de sensibilité aux antibiotiques, la détection du gène *mecA* ou la détection de la protéine PBP2a. Ce processus prend entre 24 et 72 heures à mettre en œuvre. Étant donnée la rapidité avec laquelle les infections à MRSA peuvent se propager, en particulier dans les milieux de soins où les porteurs sont courants, la capacité de fournir des résultats de portage nasal de MRSA le jour de l'hospitalisation représente un avantage certain pour les programmes de prévention des infections. L'application de tests basés sur la PCR en temps réel pour le dépistage du MRSA à partir d'écouvillons nasaux peut réduire le délai d'exécution à 1 à 2 heures. Un dépistage rapide et précis du MRSA permet de traiter spécifiquement les patients infectés et d'introduire des méthodes d'hygiène appropriées pour prévenir la transmission et la propagation du MRSA.

2. Utilisation prévue

Le MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech est un test moléculaire basé sur la technologie PCR en temps réel, destiné à la détection rapide et au diagnostic qualitatif des acides nucléiques du MRSA à partir d'écouvillons nasaux collectés dans un kit de transport contenant du milieu Liquid Amies. Ce test est destiné à être utilisé comme aide au diagnostic de l'infection à MRSA en combinaison avec les signes et symptômes cliniques du patient et les facteurs de risque épidémiologiques. Le test n'est pas destiné à guider ou à surveiller le traitement des infections à MRSA. La technique de PCR en temps réel permet la détection de cibles spécifiques d'ADN de MRSA dans l'échantillon, le cas échéant. Un résultat négatif n'exclut pas une colonisation nasale par le MRSA et ne doit pas être utilisé comme seul instrument pour la décision de traitement du patient. Il n'existe aucune contre-indication à l'utilisation du MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD. Les tests doivent être effectués par des techniciens de laboratoire spécialisés et qualifiés, notamment en technique de PCR en temps réel et en Diagnostic moléculaire *in vitro*. Le kit doit être utilisé uniquement comme indiqué dans ce manuel d'utilisation.

3. Principes du test

Le MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, fournit l'ensemble de réactifs, d'enzymes et d'oligonucléotides (amorces et sondes), pour la détection qualitative du *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA), en utilisant la technique de PCR en temps réel (voir les exigences de spécification de l'équipement à la **section 6**). Le kit détecte les séquences cibles des gènes *mecA*, *mecC* et *nuc*, ainsi que la jonction du SCC*mec-orfX*. Ces régions génomiques étaient précédemment décrites comme des marqueurs génétiques spécifiques pour l'identification du MRSA. La résistance du *S. aureus* à la méthicilline/oxacilline et à d'autres antibiotiques β -lactamines est conférée par les gènes *mecA* et *mecC*. Le gène *mecA* est localisé sur la cassette variable et instable du gène SCC*mec* (*mec* chromosomique de cassette staphylococcique). La cassette SCC*mec* du type XI (SCC*mec* XI) contient un homologue de *mecA*, également appelé *mecC*. Le gène *mecC*, qui n'a que 70% d'homologie nucléotidique avec le *mecA* conventionnel, a été décrit dans des isolats de *S. aureus* d'humains et de bovins. La région de jonction du SCC*mec-orfX* a été spécifiquement sélectionnée pour cibler la région entre un cadre de lecture ouvert conservé *orfX* dans *S. aureus* et le SCC*mec* contenant le gène *mecA*. Enfin, le gène *nuc* code pour une nucléase thermostable de *S. aureus* qui permet de distinguer *S. aureus* d'un autre *Staphylococcus spp.* La détection de ces cibles spécifiques garantit que seul le MRSA est présent dans l'échantillon.

Le MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, a été conçu pour avoir un large profil de détection tout en restant spécifique pour la détection du MRSA. De plus, l'ensemble d'oligonucléotides a été particulièrement conçu pour la détection de cet organisme et ne présente pas d'homologie significative avec d'autres génomes, ce qui reflète la grande spécificité et sensibilité de détection du test. En tant que tel, le kit a été conçu pour être spécifique au MRSA et pour éviter la détection d'autres organismes qui provoquent des infections similaires. Le contrôle interne, inclus dans le kit, valide l'efficacité du procédé d'extraction des acides nucléiques ainsi que l'absence d'inhibiteurs de PCR potentiellement présents dans les échantillons biologiques humains. Périodiquement, NZYtech revisite les séquences cibles du MRSA et, si nécessaire, publiera une nouvelle version de ce kit. De plus, le kit comprend trois contrôles externes (deux contrôles positifs et un contrôle négatif) comme décrit ci-dessous. Les contrôles positifs sont constitués de fragments d'acide nucléique contenant toutes les séquences cibles détectées par le kit.

Dans ce kit, la détection qualitative de l'ADN est basée sur la technologie PCR en temps réel, qui est une méthodologie de référence pour le diagnostic moléculaire en laboratoire. Il s'agit d'une méthodologie à haute sensibilité et spécificité pour détecter avec précision la présence de cet organisme. Le MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, est basé sur le principe de la recherche de la présence d'ADN de MRSA,

isolé et purifié avec un système d'extraction. L'ADN extrait est soumis à une amplification PCR, en une seule réaction, à l'aide de cinq jeux d'amorces/sondes hautement spécifiques exploitant le principe TaqMan®. En présence de l'ADN de MRSA, les sondes TaqMan® se lient aux régions conservées des gènes *mecA*, *mecC* et *nuc*, ainsi qu'à une région spécifique de la jonction *SCCmec-orfX*. Chacune de ces quatre cibles est flanquée de deux paires d'amorces spécifiques. Un cinquième jeu d'amorces/sonde agit comme un contrôle interne, détectant le gène *RNaseP* (RP) humain. La détection du contrôle interne valide l'efficacité du processus d'extraction et permet également de confirmer si la réaction PCR a été compromise par la présence/l'absence d'inhibiteurs dans les échantillons cliniques. Pour permettre l'identification de l'amplification des cinq cibles spécifiques en une seule réaction, le MRSA (quatre ensembles d'amorces/de sondes) et le RNase P humaine, les sondes spécifiques sont marquées différemment, notamment avec les colorants rapporteurs FAM™, HEX™, Texas Red™ et Cy5™, respectivement. Ainsi, ce kit consiste en un test pentaplex où les cibles *mecA* et *mecC*, jonction *SCCmec/orfX* et *nuc* sont détectées dans les canaux optiques FAM, HEX/VIC/JOE et Texas Red/JUN, respectivement, tandis que le gène RP humain est détecté dans le canal optique Cy5. Ces ensembles d'oligonucléotides/sondes sont fournis à des concentrations optimisées pour garantir que l'ADN humain, même lorsqu'il est présent à des concentrations extrêmement élevées, ne limite pas l'efficacité des ensembles d'amorces/de sondes de MRSA.

4. Composition du kit

Le MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, fournit un ensemble complet de réactifs suffisants pour effectuer 96 réactions qPCR en une seule étape.

COMPOSANTS DU KIT		VOLUME (PAR FLACON)	NOMBRE DE TUBES	COULEUR DU COUVERCLE
MRSA MMix	NZYSupreme Multiplex qPCR Probe Master Mix (2x)	1050 µL	1	Neutre
MRSA PPMix	Mélange d'amorce et de sonde MRSA/RP (10x)	205 µL	1	Brun
MRSA POS 1	Contrôle positif MRSA/RP 1	105 µL	1	Rouge
MRSA POS 2	Contrôle positif MRSA/RP 2	105 µL	1	Rouge
NTC	Contrôle sans modèle	105 µL	1	Neutre

5. Conditions de stockage, de stabilité et de manipulation

Le MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, est expédié réfrigéré. Dès la réception du kit, tous les composants doivent être immédiatement stockés entre -85 °C et -15 °C. Lors de l'utilisation, les composants du kit doivent être rapidement placés dans le congélateur après utilisation afin de minimiser le temps d'exposition à la température ambiante. En outre:

- Minimiser le nombre de cycles de congélation-décongélation en stockant des aliquotes de travail. Le cas échéant, les composants du kit peuvent être aliquotés en plus petits volumes après décongélation. Le kit est stable pendant un minimum de 6 cycles de congélation-décongélation.
- Le composant MRSA PPMix doit être conservé à l'abri de la lumière. En particulier, ne pas exposer MRSA MMix à la lumière directe du soleil après l'avoir combiné avec MRSA PPMix.
- Si l'emballage qui protège le kit arrive endommagé, veuillez contacter NZYtech.
- Attention à la date de péremption indiquée sur l'emballage. NZYtech ne recommande pas d'utiliser le kit après la date de péremption. À cette date, le kit doit être jeté conformément aux instructions d'élimination de la **section 8.2**.

6. Matériel et instrumentation requis mais non fournis

- Un équipement PCR en temps réel qui détecte les colorants fluorescents FAM™, HEX™/VIC™/JOE™, Texas Red®/JUN™ et Cy5™ (à des longueurs d'onde d'émission de 520, 556, 615 et 670 nm, respectivement). Voir à la **section 11** les modèles d'équipements pour lesquels le kit a été validé.
- Équipement et consommables pour isoler l'ADN d'échantillons biologiques/cliniques.
- Matériel en plastique pour qPCR sans RNase/DNase : Tubes PCR, barrettes, bouchons, plaques de 96 puits, films adhésifs.
- Pipettes et pointes à filtre (sans RNase/DNase).
- Bloc de refroidissement.
- Gants jetables.
- Vortex et centrifugeuse.

7. Prélèvement et préparation des échantillons

Le MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, est conçu pour détecter l'ADN extrait d'échantillons d'écouvillons nasaux. Les échantillons nasaux doivent être prélevés dans les deux narines, une à la fois, à l'aide d'un écouvillon unique (ESwab®, Copan). Placer l'écouvillon dans le tube de transport contenant le milieu de transport Liquid Amies. Le prélèvement doit être effectué dans des tubes stériles. Les échantillons doivent être hermétiquement scellés dans des tubes ou des récipients appropriés, correctement étiquetés, puis transportés rapidement au laboratoire. Les échantillons collectés doivent être testés dès que possible. Le prélèvement, la manipulation et/ou le transport inappropriés des échantillons peuvent entraîner un résultat erroné. Les acides nucléiques extraits constituent le matériel de départ pour le test avec le MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech. NZYtech recommande l'utilisation de l'un des kits de purification d'acide nucléique basés sur la technologie des billes magnétiques suivants : NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech) ou chemagic Pathogenic NA gDNA Kit H96 (PerkinElmer), car ces kits ont été validés pour l'extraction d'échantillons cliniques de MRSA et la détection ultérieure à l'aide du MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD. Veuillez-vous assurer que les échantillons d'ADN sont appropriés en termes de pureté, de concentration et d'intégrité des acides nucléiques. L'éthanol étant un puissant inhibiteur de la PCR en temps réel, il est nécessaire d'éliminer ce composant avant l'éluion des acides nucléiques lors du processus d'extraction. Le kit de NZYtech contient un contrôle interne qui cible l'ADN humain co-purifié avec l'ADN bactérien de MRSA. L'ADN humain est amplifié avec l'ensemble d'oligonucléotides (amorces et sonde) du gène RP humain. L'introduction d'un

contrôle interne est utile pour évaluer l'efficacité de l'extraction et de l'isolement de l'ADN et/ou pour détecter la présence d'inhibiteurs potentiels pendant le traitement des échantillons.

8. Précautions et avertissements

Suivez attentivement les procédures et les directives fournies dans ce manuel pour vous assurer que le test est effectué correctement. Avant d'utiliser le test, vérifiez l'intégrité du produit, à savoir la quantité et le type de composants du kit et leur étiquetage correct. Comme lors de toute procédure de test analytique, de bonnes pratiques de laboratoire sont essentielles. Tout écart par rapport aux bonnes pratiques de laboratoire peut entraîner un échec du test ou entraîner des résultats erronés. En raison de la sensibilité élevée du kit, des précautions particulières doivent être prises pour maintenir les réactifs et les mélanges d'amplification PCR exempts de contamination.

8.1. Information de sécurité

Avant d'utiliser le kit, veuillez consulter la fiche de données de sécurité (FDS) disponible sur le site Web de NZYtech (www.nzytech.com). Cette détection du kit doit être effectuée uniquement par du personnel formé aux procédures techniques et de sécurité pertinentes dans des laboratoires équipés d'une manière appropriée. Les directives internationales et nationales sur la sécurité biologique en laboratoire doivent être suivies en toutes circonstances.

8.2. Exigences de manipulation et de procédure

- Uniquement pour un usage professionnel de diagnostic *in vitro*.
- Ne pas utiliser ce kit après la date de péremption.
- Ne pas utiliser les composants de test si le scellage du kit est endommagé.
- Ne pas intervertir les réactifs de différents lots de production.
- Aucun réactif d'autres fabricants ne doit être utilisé avec les réactifs de ce kit.
- Des ustensiles en plastique jetables et des pipettes sans DNase/RNase doivent être utilisés lors de toutes les procédures.
- La préparation des échantillons, la mise en place de la réaction et l'amplification doivent être effectuées dans différentes zones de travail. L'ordre des tâches dans le laboratoire doit être unidirectionnel. Portez toujours des gants jetables dans chaque zone et changez-les avant d'entrer dans une zone différente. S'il est possible, changez de manteau.
- Sélectionnez des matériaux et des équipements spécifiques pour chaque zone de travail individuelle et ne les transférez pas d'une zone à une autre.
- Utilisez toujours le NTC – Contrôle sans modèle fourni avec le kit.
- Les échantillons biologiques doivent être manipulés comme s'ils étaient infectieux et en suivant les précautions de biosécurité appropriées.
- Les contrôles positifs contiennent des modèles à grand nombre de copies; ils doivent être ouverts et traités à l'écart des échantillons de test et des composants du kit pour éviter toute contamination croisée.
- Manipulez les plaques post-amplification avec soin et jetez-les immédiatement après la fin du test ; les plaques doivent toujours être jetées dans un récipient approprié pour les risques biologiques après utilisation. Ne pas ouvrir les tubes/plaques de réaction post-amplification pour éviter la contamination des amplicons.
- À la fin de chaque test, nettoyez les surfaces de travail et l'équipement avec un dissolvant d'ADN/ARN.
- Les résidus de produits chimiques et de préparations sont généralement considérés comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchets est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales.
- Tous les résultats doivent être interprétés par un professionnel de la santé dans le contexte des antécédents médicaux et des symptômes cliniques du patient.
- Ce test ne peut pas exclure les maladies causées par d'autres agents pathogènes.
- Un résultat négatif pour tout test PCR n'exclut pas de manière concluante la possibilité d'une infection.
- Suivez les bonnes pratiques de laboratoire, portez des vêtements de protection, portez en permanence des gants jetables non poudrés et utilisez des lunettes et un masque. Ne pas manger, boire ou fumer dans la zone de travail.

9. Procédure de test

Veuillez lire attentivement les instructions d'utilisation avant d'effectuer le test. Attention, toutes les étapes de pipetage et la configuration de la plaque expérimentale doivent être effectuées conformément aux bonnes pratiques de qPCR. Une fois que la plaque est coulée, commencez immédiatement le protocole qPCR. L'incubation prolongée des mélanges réactionnels à température ambiante peut entraîner des artefacts de PCR qui réduisent la sensibilité de détection. Avant l'expérience, commencer par mélanger délicatement avec le doigt les tubes réactionnels fournis et centrifuger pendant cinq secondes pour recueillir le contenu au fond du tube. Placer les tubes sur de la glace. **Nous recommandons fortement de pipeter MRSA POS 1 et MRSA POS 2 en dernier pour éviter les contaminations croisées.**

9.1. Configuration de la réaction

1. Préparez un mélange qPCR suffisant pour le nombre de tests à effectuer avec un volume supplémentaire de 5% pour les pertes de pipetage. Procéder selon le tableau ci-dessous qui précise les volumes pour les tests 1 et n (où n correspond au nombre total de réactions):

COMPOSANT	1 VOLUME DE TEST (µL)	n TESTS * VOLUME + 5% (µL)
MRSA MMix **	10	$n \times 10,5$
MRSA PPMix	2	$n \times 2,1$
Volume final	12	$n \times 12,6$

* Pour calculer le nombre total de réactions nécessaires pour chaque test, comptez le nombre d'échantillons et ajoutez-en trois de plus, pour inclure le contrôle négatif et les deux contrôles positifs.

** Veuillez noter qu'un précipité au fond du tube de mélange maître peut être observé, en particulier après plusieurs cycles de congélation/décongélation. Pour garantir des performances idéales, veuillez vous assurer que tous les composants sont décongelés et remis en suspension avant utilisation. Dans ce cas, ne faites pas tourner le master mix avant le pipetage.

2. Pipettez 12 µL du mélange qPCR dans des puits individuels en fonction de la configuration de votre plaque expérimentale PCR en temps réel.
3. Pour le **contrôle négatif**, ajoutez 8 µL de NTC au lieu de la matrice d'ADN dans le puits de contrôle négatif. Le volume final doit être de 20 µL.
4. Pour les **échantillons biologiques**, ajoutez 8 µL de chaque échantillon d'ADN dans les puits d'échantillon, selon la configuration de votre plaque expérimentale. Le volume final dans chaque puits doit être de 20 µL.
5. Pour les **deux contrôles positifs**, ajoutez 8 µL de MRSA POS 1 et ajoutez 8 µL de MRSA POS 2 au lieu de la matrice d'ADN dans les puits de contrôle positif. Le volume final doit être de 20 µL.
6. Couvrir et sceller la plaque avec un film adhésif optique ou des bouchons appropriés avant de procéder aux étapes de qPCR et de détection.
7. Placez la plaque de réaction dans l'équipement PCR en temps réel et exécutez le protocole qPCR selon la section ci-dessous.

9.2. Programmation de l'équipement de PCR en temps réel

Le tableau ci-dessous affiche un protocole standard optimisé sur quelques plates-formes. Cependant, ces conditions peuvent être adaptées et validées pour s'adapter à différents protocoles spécifiques à la machine.

CYCLES	TEMPERATURE	TEMPS	ÉTAPE
1	95 °C	5 min	Activation de la polymérase
45	95 °C	10 s	Dénaturation
	60 °C	30 s	Recuit/Extension*

* En fonction de l'équipement qPCR, sélectionnez les canaux de détection appropriés. Les données fluorogènes doivent être collectées au cours de cette étape via les canaux FAM, HEX/VIC/JOE, Texas Red/JUN et Cy5.

Les colorants fluorescents utilisés dans ce kit et leurs canaux de détection correspondants sont les suivants:

Colorants fluorescents et canaux de détection

CIBLES	COLORANT FLUORESCENT	CANAL DE DETECTION
<i>mecA/mecC</i>	FAM™	FAM
Jonction <i>SCCmec/orfX</i>	HEX™	HEX/VIC/JOE
<i>nuc</i>	Texas Red®	Texas Red/JUN
<i>RNaseP</i>	Cy5™	Cy5
MRSA POS 1	FAM™ et HEX™ et Texas Red® et Cy5™	FAM & HEX/VIC/JOE et Texas Red/JUN Cy5
MRSA POS 2	FAM™ et HEX™ et Texas Red® et Cy5™	FAM & HEX/VIC/JOE et Texas Red/JUN et Cy5

Le MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, a été validé pour les systèmes de PCR en temps réel suivants : Applied Biosystems™ 7500 FAST, Applied Biosystems™ QuantStudio 5, Roche Lightcycler® 96 Instrument, Bio-Rad® CFX 96 et Bio-Rad® CFX Opus. Si un autre équipement est utilisé, l'utilisateur doit valider le kit à l'aide d'échantillons préalablement caractérisés (positifs et négatifs).

10. Analyse des données

10.1. Critères de validation du test

Avant d'analyser les résultats, nous vous recommandons de consulter le manuel d'utilisation de l'appareil qPCR respectif. Vérifiez ensuite que le test PCR en temps réel est valide. Ainsi, pour chaque plaque, veuillez confirmer si les résultats des contrôles positifs et négatifs se sont déroulés comme prévu, selon les critères suivants:

Contrôle négatif (pas de réaction matrice): aucune amplification n'est détectée. Une contamination de l'échantillon peut s'être produite si le contrôle négatif a des courbes d'amplification (FAM, HEX, Texas Red et Cy5) avec une forme sigmoïdale. Répétez le test en suivant les bonnes pratiques de qPCR.

Contrôle positif 1 (MRSA POS 1): les courbes d'amplification de FAM (*mecA*), HEX (jonction *SCCmec/orfX*), Texas Red (*nuc*) et Cy5 (RP) sont positives. Le contrôle positif devrait s'amplifier à Ct < 32, dans les quatre canaux. Le non-respect de ce critère de contrôle de la qualité est une forte indication que l'expérience a été compromise.

Contrôle positif 2 (MRSA POS 2): les courbes d'amplification de FAM (*mecC*), HEX (jonction *SCCmec/orfX*), Texas Red (*nuc*) et Cy5 (RP) sont positives. Le contrôle positif devrait s'amplifier à Ct < 32, dans les quatre canaux. Le non-respect de ce critère de contrôle de la qualité est une forte indication que l'expérience a été compromise.

Si les contrôles sont conformes aux attentes, le test est **valide**. Veuillez procéder à l'interprétation des résultats pour les échantillons testés.

Si l'un des contrôles ne présente pas les performances attendues, le test a été compromis ou exécuté de manière incorrecte et doit être considéré comme **non valide**.

Veuillez répéter le test. Si le problème persiste, contactez le fabricant.

10.2. Interprétation des résultats des tests

Le MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech utilise les valeurs seuils Ct suivantes pour l'interprétation des résultats:

VALEUR CT	INTERPRETATION DES RESULTATS
Ct ≤37	Déecté (+) → POSITIF
Ct >37	Non-déecté (-) → NÉGATIF

Le MRSA est déecté si les courbes d'amplification FAM (*mecA/mecC*), HEX (jonction *SCCmec/orfX*) et Texas Red (*nuc*) présentent une forme sigmoïdale avec un Ct≤37, quel que soit le résultat obtenu pour le test RP (Cy5) (dans ce cas, la présence ou l'absence d'un signal dans le canal Cy5 n'est pas significative pour la validité de l'analyse traitée).

Le MRSA n'est pas déecté si les courbes FAM (*mecA/mecC*) et/ou les courbes HEX (jonction *SCCmec/orfX*) et/ou Texas Red (*nuc*) ne s'amplifient pas ou s'amplifient à Ct>37, alors que le test RP (Cy5) affiche une courbe sigmoïdale positive (Ct≤45)

Le test est invalide si les trois courbes d'amplification MRSA ainsi que la courbe d'amplification RP sont négatives. Le test doit être répété avec des acides nucléiques re-purifiés à partir de l'échantillon.

Le tableau suivant résume l'interprétation des principaux résultats (évaluer la forme globale des courbes d'amplification; **seules les courbes d'amplification sigmoïdales sont indicatives d'une véritable amplification**).

<i>mecA/mecC</i> (FAM)	<i>SCCmec/orfX</i> (HEX)	<i>nuc</i> (TexasRed)	RP ¹ (Cy5)	CONTROLE NEGATIF	CONTROLES POSITIFS	INTERPRETATION DES RESULTATS
+	+	+	+/-	-	+	MRSA → POSITIF ²
+	-	+	+/-	-	+	MRSA → NÉGATIF ³
-	+	+	+/-	-	+	MRSA → NÉGATIF
-	-	+	+/-	-	+	MRSA → NÉGATIF
+	-	-	+/-	-	+	MRSA → NÉGATIF ⁴
-	+	-	+/-	-	+	MRSA → NÉGATIF
+	+	-	+/-	-	+	MRSA → NÉGATIF
-	-	-	+	-	+	MRSA → NÉGATIF
-	-	-	-	-	+	TEST INVALIDE ⁵

¹ Une forte concentration/charge d'ADN de MRSA déectable dans l'échantillon peut conduire à un signal de contrôle interne réduit ou absent sur le canal Cy5 (+: courbe d'amplification déectée; -: pas de courbe d'amplification).

² MRSA: *S. aureus* résistant à la méthylcine.

³ En présence d'un variant nouveau ou inconnu de MRSA, le canal HEX/VIC/JOE peut être négatif.

⁴ MRCoNs: *Staphylocoque* à coagulase négative résistant à la méthicilline/oxacilline.

⁵ Répétez l'extraction d'ADN et relancez le test qPCR.

Note : L'interprétation des résultats doit tenir compte de la possibilité de résultats faux négatifs et faux positifs.

- Des résultats faussement négatifs peuvent être causés par:
 - Collecte, manipulation et/ou stockage inappropriés des échantillons.
 - Dégradation de l'échantillon.
 - Présence d'inhibiteurs de qPCR.
 - Mutations dans le génome de l'agent pathogène; incapacité à détecter des variants nouveaux ou inconnus.
 - Non-respect des procédures de ce manuel.
 - Utilisation de kits d'extraction non validés ou de plateformes de PCR en temps réel.
- Des résultats faussement positifs peuvent être causés par :
 - Un échantillon contenant un mélange de plusieurs agents pathogènes commensaux.
 - Compte tenu de la présence du gène de résistance, une infection mixte à SASM (*S. aureus* sensible à la méthicilline) et à CoNs (staphylocoques à coagulation négative) peut exister.
 - Contamination croisée avec les contrôles positifs en raison de sa manipulation inadaptée.
 - Manipulation inappropriée d'échantillons contenant de fortes concentrations d'ADN de MRSA. En raison de la forte sensibilité de la méthode qPCR aux contaminations croisées, des précautions particulières doivent être prises lors de l'isolement de l'ADN.
 - Manipulation inadaptée du produit amplifié (plaque qPCR post-amplification).

- Le MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, peut produire des résultats faussement positifs avec des souches de *Staphylococcus argenteus*, une espèce à coagulase positive du genre *Staphylococcus* qui peut contenir les gènes de résistance *mecA* ou *mecC* et la cassette chromosomique staphylococcique *SCCmec*.

Des résultats négatifs n'excluent pas une infection à MRSA et le résultat du test ne doit pas être utilisé comme seule base pour le traitement ou d'autres décisions de gestion du patient. De plus, ce test ne peut pas exclure les maladies causées par d'autres agents pathogènes.

11. Évaluation des performances

Les performances de ce kit ont été validées pour les équipements spécifiés dans la **section 9.2** (voir ci-dessus). Si un autre équipement est utilisé, l'utilisateur doit valider le kit à l'aide d'échantillons préalablement caractérisés (positifs et négatifs).

11.1. Résultats attendus

Des graphiques d'amplification typiques, observées pour un échantillon d'écouvillon nasal clinique négatif au MRSA (figure 1A) et d'un échantillon d'écouvillon nasal d'un patient identifié comme porteur de MRSA (figure 1B), sont présentées ci-dessous :

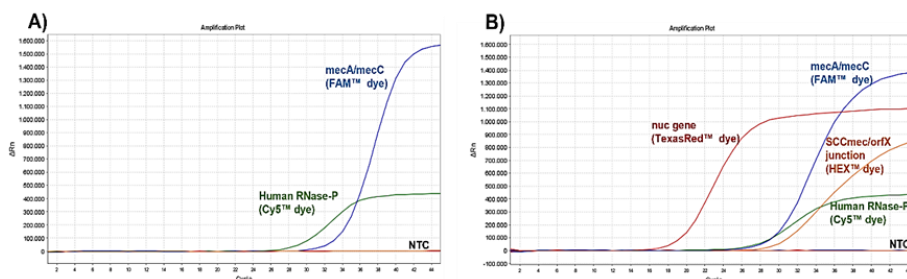


Figure 1. Détection des courbes de fluorescence de *mecA/mecC*, *nuc*, jonction *SCCmec/orfX* générées par le MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, dans un échantillon clinique d'écouvillon nasal négatif au MRSA contenant les gènes *mecA* et/ou *mecC* (Figure 1A) et un échantillon d'écouvillon nasal d'un patient identifié comme porteur de MRSA (figure 1B). Courbe bleu: détection d'ADN hébergeant des cibles *mecA/mecC* via le canal FAM; Courbe rouge: détection de l'ADN hébergeant la cible *nuc* via le canal TexasRed; Courbe orange: détection d'un ADN hébergeant la cible de jonction *SCCmec/orfX* à travers le canal HEX; Courbe verte : détection d'un ADN hébergeant la cible RP humaine par le canal Cy5.

11.2. Limite de détection (LoD) - Sensibilité analytique

La sensibilité analytique a été définie comme la plus faible concentration d'analyte pouvant être détectée de manière fiable avec une confiance de 95%. Cela a été évalué en testant les acides nucléiques de MRSA à différents nombres de copies, ajoutés à l'ADN extrait d'échantillons d'écouvillon nasal négatifs, testés en 48 répétitions par concentration, par deux opérateurs différents, en utilisant 3 lots de kits différents selon les conditions de réaction de test standard. Les tests ont été répétés sur 4 jours. Ensemble, les données ont révélé que le MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, détecte 0,15 copies/ μ L de *mecA*, *mecC*, *nuc* et jonction *SCCmec/orfX* avec une confiance \geq 95%. Ainsi, la limite de détection (LoD) provisoire a été déterminée à 150 copies/mL pour le MRSA. Tous les tests ont été effectués à l'aide de l'équipement de PCR en temps réel Applied Biosystems® 7500 FAST et l'analyse a été effectuée à l'aide du logiciel de l'équipement.

La LoD du kit a été réévaluée par deux opérateurs différents, à l'aide de trois lots de kits et de deux méthodes alternatives d'isolement des acides nucléiques, à savoir le kit d'isolement NZY Mag Viral RNA/DNA, IVD (MD0488, NZYtech) et le kit chemagic Pathogenic NA gDNA H96 (PerkinElmer), dans deux expériences indépendantes avec un total de 48 tests pour chaque kit d'isolement. Les données montrent que lorsque les acides nucléiques sont extraits à l'aide du kit d'isolement NZY Mag Viral RNA/DNA, IVD (MD0488, NZYtech), la LoD est de 150 copies/mL et que lorsque l'extraction des acides nucléiques est effectuée à l'aide du kit chemagic Pathogenic NA gDNA H96 (PerkinElmer), la LoD est de 750 copies/mL.

11.3. Spécificité analytique

11.3.1. Réactivité croisée (exclusion) et spécificité

La réactivité croisée et l'inclusivité ont été évaluées *in silico* en analysant toutes les sondes et amorces oligonucléotidiques incluses dans le kit contre les agents pathogènes liés au MRSA et les agents pathogènes normaux qui provoquent des infections avec des symptômes similaires, respectivement. Les amorces et les sondes du test ont été criblées par rapport aux séquences génomiques publiées. Lors d'une analyse *in silico*, la conception du test s'est avérée détecter spécifiquement le MRSA et ne présentait aucune réactivité avec des espèces non apparentées.

La réactivité croisée du MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, a été évalué *in vitro* en testant un panel composé d'isolats bien caractérisés de *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline (SASM), de *staphylocoques* à coagulase négative (CoNS), de genres étroitement apparentés et d'autres flores pathogènes et commensales présent dans les narines. La réactivité croisée *in vitro* du MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, a été évaluée à l'aide des agents pathogènes suivants: *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Dickeya dadantii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium mageritense*, *Mycobacterium smegmatis*, *Nocardia nova*, *Pseudomonas mendocina*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptomyces avermitilis* e *Streptomyces albidoflavus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus dysgalactiae subs equisimilis*, *Streptococcus mitis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa (strain PAO1)* and *Staphylococcus argenteus*. Les tests ont été effectués à l'aide d'échantillons nasaux négatifs additionnés d'ADN génomique des organismes mentionnés ci-dessus. De plus, des tests humides ont été effectués à l'aide de six échantillons inactifs qui sont représentatifs de véritables échantillons humains cliniques, y compris *S. aureus* (MRSA souche hospitalière), *S. aureus* (MRSA souche communautaire), *S. aureus (mecC)*, *S. aureus* (MSSA Cassette vide), *S. aureus* (SASM) et *Staphylococcus epidermidis* (MSSE HER 1292) qui est un CoNS (Zeptomatrix). Tous les tests ont été réalisés en triple

en utilisant trois lots de kit. Les échantillons ont été extraits en double à l'aide du système de purification Thermo Scientific KingFisher Flex avec le kit d'isolement d'ARN/ADN viral NZY Mag de NZYtech, IVD (MD04881), et évalués sur l'Applied Biosystems® 7500 FAST. Aucun des agents pathogènes testés n'a donné de signal qPCR faussement positif.

11.3.2. Substances interférentes

L'impact de 26 substances potentiellement interférentes utilisées occasionnellement dans les narines ou trouvées dans des échantillons d'écouvillonnage nasal a été évalué pour l'interférence potentielle avec le MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD. Les tests ont été effectués à l'aide d'échantillons nasaux négatifs additionnés d'échantillons positifs au MRSA à ~2-3x LoD. Des substances interférentes potentielles ont été ajoutées aux échantillons artificiels à des concentrations représentant les niveaux les plus élevés attendus dans les échantillons respiratoires de patients humains sur la base des données de la littérature. L'expérience s'est déroulée sur trois jours. Tous les tests ont été effectués en double en utilisant un lot de kits et comparés aux données obtenues avec un test contrôle ne contenant pas d'interférents. Aux concentrations testées, les résultats ont révélé qu'aucune des molécules testées n'affectait la sensibilité de la détection. Le tableau ci-dessous résume les données recueillies dans le cadre de ces expérimentations. Les données ont révélé qu'aucune des substances testées n'interférait avec la sensibilité de détection du MRSA par le MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD.

INTERFERANT POTENTIEL	INGREDIENTS ACTIFS	CONCENTRATION FINALE DANS L'ECHANTILLON	INTERFÉRENCE OUI (O) OU NON (N)
Rhinomer® (eau de mer isotonique)	Eau de mer	10% v/v	N
Streptfen® (pulvérisateur pour la gorge, anesthésique oral et analgésique)	Flurbiprofène	5% v/v	N
Vibrocil® (solution de lavage nasal; pulvérisateur contre les allergies)	Propionate de fluticasone	5% v/v	N
Nasomet® (pulvérisateur nasal à corticostéroïdes)	Furoate de mométasone	5% v/v	N
Pulmicort® (pulvérisateur nasal à corticostéroïdes)	Budésonide	5% v/v	N
Trobex® (antimicrobien, systémique)	Trobamycine	10 µg/mL	N
Pyralvex® (Antalgique buccal, anti-inflammatoire et antiseptique)	Extrait de rhubarbe, acide salicylique	5% v/v	N
Eludril Gé (solution pour bain de bouche, antiseptiques)	Gluconate de chlorhexidine, hémihydrate de chlorobutanol	5% v/v	N
Isophy® (solution saline)	NaCl 0,9%	10%	N
Salive (humaine)	-	25% v/v	N
Mucosolvan® (mucolytique)	Chlorhydrate d'ambroxol	5% v/v	N
Sang total (humain)	-	4% v/v	N
Bactroban® (Antibiotique, pommade nasale)	Mupirocine	5 mg/mL	N
Mucus nasal (mucine)	Mucus (humain)	25% v/v	N
Allergodil® (solution pour pulvérisation nasale)	Chlorhydrate d'azélastine	5% v/v	N
Aeromax nasal® (solution de lavage nasal)	Budésonide	10% v/v	N
Avamys® (solution de lavage nasal)	Furoate de fluticasone	10% v/v	N
Bisolspray Nebulicina® (Solution de lavage nasal)	Chlorhydrate d'oxymétazoline	10% v/v	N
Mométasone Generis® (solution de lavage nasal)	Mométasone	5% v/v	N
Nasorhinathiol® (solution de lavage nasal)	Chlorhydrate d'oxymétazoline	10% v/v	N
Rhinomer intense Eucalyptus® (Solution de lavage nasal)	eau de mer hypertonique à l'huile essentielle d'eucalyptus	10% v/v	N
Vibrocil Actilong® (Solution de lavage nasal)	Chlorhydrate de xylométazoline	10% v/v	N
Tamiflu® (médicament antiviral)	Oseltamivir	5% v/v	N
Neo-Sinefrina® (Solution de lavage nasal)	Chlorhydrate de phényléphrine	10% v/v	N
Neo-Sinefrina Alergo® (Solution de lavage nasal)	Dipropionate de béclométhasone	10% v/v	N
Prednifalmina® (pommade ophtalmique)	Prednisolone et Chloramphénicol	10% v/v	N
Contrôle sans aucune substance interférente	H ₂ O	5% v/v	N

11.4. Précision

La précision du test pour le MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech a été déterminée par des tests répétés d'échantillons positifs représentant deux niveaux de charge bactérienne, 3x LoD et 30x copies de LoD par réaction, ajoutés à l'ADN extrait d'échantillons négatifs d'écouvillons nasaux, en utilisant 3 lots de kits différents et suivant les conditions de réaction typiques des tests. La précision a été évaluée en mesurant la moyenne Cq, le coefficient de variation Cq et le % de détection répétée, comme décrit ci-dessous pour chaque cas. Les données sont reprises dans les tableaux affichés ci-dessous.

Précision du MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, tout en détectant le gène cible *mecA*

VARIABLE TESTEE		<i>mecA</i> (COPIES/REACTION)	
		3x LoD	30x LoD
Répétabilité	n	18	18
	Cq moyen	35,77	32,88
	Coefficient de variation (%)	2,01	1,19
	% de détection de répliation	100	100
Reproductibilité quotidienne	n	72	72
	Cq moyen	36,05	33,04
	Coefficient de variation (%)	2,56	1,22
	% de détection de répliation	98,61	100
Lot à lot Reproductibilité	n	126	126
	Cq moyen	36,07	33,06
	Coefficient de variation (%)	2,14	1,10
	% de détection de répliation	99,21	100
Opérateur Reproductibilité	n	36	36
	Cq moyen	36,35	33,18
	Coefficient de variation (%)	1,51	1,14
	% de détection de répliation	100	100
Entre instruments Reproductibilité	n	90	90
	Cq moyen	35,93	32,92
	Coefficient de variation (%)	2,19	1,23
	% de détection de répliation	100	100

Précision du MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, tout en détectant le gène cible *mecC*

VARIABLE TESTEE		<i>mecC</i> (COPIES/REACTION)	
		3x LoD	30x LoD
Répétabilité	n	18	18
	Cq moyen	35,56	33,02
	Coefficient de variation (%)	2,57	0,95
	% de détection de répliation	100	100
Reproductibilité quotidienne	n	72	72
	Cq moyen	35,68	33,07
	Coefficient de variation (%)	2,54	1,40
	% de détection de répliation	97,22	100
Lot à lot Reproductibilité	n	126	126
	Cq moyen	35,88	33,17
	Coefficient de variation (%)	2,53	1,40
	% de détection de répliation	97,62	100
Opérateur Reproductibilité	n	36	36
	Cq moyen	36,25	33,33
	Coefficient de variation (%)	2,10	1,62
	% de détection de répliation	100	100
Entre instruments Reproductibilité	n	90	90
	Cq moyen	35,80	32,91
	Coefficient de variation (%)	2,41	1,24
	% de détection de répliation	98,89	100

Précision du MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, tout en détectant le gène cible *nuc S. aureus*

VARIABLE TESTEE		<i>nuc</i> (COPIES/REACTION)	
		3x LoD	30x LoD
Répétabilité	n	18	18
	Cq moyen	35,63	32,76
	Coefficient de variation (%)	2,03	1,09
	% de détection de répliation	100	100
Reproductibilité quotidienne	n	72	72
	Cq moyen	35,68	32,88
	Coefficient de variation (%)	2,29	1,41
	% de détection de répliation	100	100
Lot à lot Reproductibilité	n	126	126
	Cq moyen	35,96	32,99
	Coefficient de variation (%)	2,48	1,44
	% de détection de répliation	100	100
Opérateur Reproductibilité	n	36	36
	Cq moyen	36,28	33,22
	Coefficient de variation (%)	2,33	1,32
	% de détection de répliation	100	100

Entre instruments	n	90	90
Reproductibilité	Cq moyen	35,63	32,65
	Coefficient de variation (%)	2,36	1,23
	% de détection de réplification	100	100

Précision du MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, tout en détectant la jonction SCCmec/orfX cible

VARIABLE TESTEE		JONCTION SCCmec/orfX	
		3x LoD	30x LoD
Répétabilité	n	18	18
	Cq moyen	36,09	33,27
	Coefficient de variation (%)	1,44	0,77
	% de détection de réplification	100	100
Reproductibilité quotidienne	n	72	72
	Cq moyen	36,25	33,33
	Coefficient de variation (%)	2,04	1,16
	% de détection de réplification	100	100
Lot à lot	n	126	126
	Cq moyen	36,33	33,36
	Coefficient de variation (%)	1,96	1,18
	% de détection de réplification	100	100
Opérateur	n	36	36
	Cq moyen	36,54	3,39
	Coefficient de variation (%)	1,82	1,09
	% de détection de réplification	100	100
Entre instruments	n	90	90
	Cq moyen	35,26	32,18
	Coefficient de variation (%)	4,03	3,89
	% de détection de réplification	100	100

11.4.1. Répétabilité

La répétabilité a été évaluée par un opérateur en analysant 18 répétitions de chaque échantillon (copies 3x LoD et 30x LoD par réaction), représentant un nombre final de 36 tests effectués par cible.

11.4.2. Reproductibilité quotidienne

La reproductibilité quotidienne a été évaluée par un opérateur en analysant 72 répliques de chaque échantillon (copies 3x LoD et 30x LoD par réaction), pendant 4 jours, avec 18 répliques de chaque concentration par jour (un total de 144 tests par cible ont été effectués).

11.4.3. Reproductibilité lot à lot

La reproductibilité entre les lots a été évaluée par un opérateur grâce à l'analyse de 126 répliques de chaque échantillon (copies 3x LoD et 30x LoD par réaction) en utilisant 3 lots de kits différents avec 84 répliques par lot.

11.4.4. Reproductibilité par opérateur

La reproductibilité par opérateur a été évaluée en testant 36 répliques de chaque échantillon (copies 3x LoD et 30x LoD par réaction), par trois opérateurs différents avec 12 répliques par opérateur, soit un total de 24 répliques par opérateur, en utilisant 3 lots de kits différents.

11.4.5. Reproductibilité entre des instruments

La reproductibilité entre des instruments a été mesurée par un opérateur en testant 90 répétitions de chaque échantillon (copies 3x LoD et 30x LoD par réaction), dans cinq équipements qPCR différents, pour un total de 36 tests par équipement.

FABRICANT D'EQUIPEMENTS DE PCR EN TEMPS REEL	MODELE DE PLATE-FORME PCR EN TEMPS REEL
Applied Biosystems®	7500 Fast
	QuantStudio™ 5
Roche®	LightCycler™ 96 instrument
Bio-Rad®	CFX Opus 96 Real-Time PCR
	CFX96 Touch Real-Time PCR

11.5. Évaluation clinique

Les performances cliniques du MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, ont été évaluées à l'aide de 157 échantillons d'écouvillons nasaux préalablement caractérisés à l'aide d'une culture microbiologique de routine. Les acides nucléiques ont été extraits à l'aide du kit d'isolement d'ARN/ADN viral NZY Mag, IVD (MD0488, NZYtech), puis amplifiés à l'aide du MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech. Les données ont révélé que 98,28% des accords de sensibilité clinique (PPA) et 74,75% de spécificité clinique (NPA) ont été obtenus pour tous les échantillons positifs et négatifs testés.

		TEST DE COMPARAISON CULTURE MICROBIOLOGIQUE		
		Positif pour MRSA	Négatif pour MRSA	Total
MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD	Positif pour MRSA	57	25*	82
	Négatif pour MRSA	1	74	75
	Total	58	99	157

PPA (accord de pourcentage positif): 98,28% pour MRSA

NPA (accord de pourcentage négatif): 74,75% pour MRSA

* Une explication possible de ces échantillons de culture négatifs est la perte de viabilité bactérienne pendant le prélèvement et/ou le transport de l'échantillon, où l'ADN bactérien non viable est resté disponible pour l'amplification. De plus, cette différence peut être justifiée par le fait que la technique qPCR est plus sensible que les méthodes de culture.

De plus, les performances cliniques du MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech ont été comparées à un test PCR en temps réel. Les données ont révélé que 97,22% de sensibilité clinique (PPA) et 92,12% de spécificité clinique (NPA) ont été atteints pour tous les échantillons positifs et négatifs testés, respectivement.

		TEST DE COMPARAISON - KIT PCR EN TEMPS REEL		
		Positif pour MRSA	Négatif pour MRSA	Total
MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD	Positif pour MRSA	35	23	58
	Négatif pour MRSA	1	269	270
	Total	36	292	328

PPA (Concordance positive en pourcentage) : 97,22% pour le MRSA

NPA (Concordance négative en pourcentage) : 92,12% pour le MRSA

De plus, les performances cliniques du kit ont été évaluées lors de l'utilisation d'une autre méthode d'extraction des acides nucléiques, à savoir le kit chemagic Pathogenic NA gDNA H96 (PerkinElmer). Les données ont révélé un PPA de 91,1% et un NPA de 98,0% par rapport à la détection des acides nucléiques extraits à l'aide du kit d'isolement d'ARN/ADN viral NZY Mag, IVD (MD0488, NZYtech). Dans l'ensemble, les résultats montrent une sensibilité et une spécificité élevées pour détecter le MRSA à l'aide du MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD.

12. Contrôle de qualité

Tous les composants du MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, sont testés selon les protocoles décrits ci-dessus. Le système de PCR en temps réel pentaplex permet la détection des cibles décrites pour l'identification de l'ADN de MRSA et de l'ADN de la RNase P humaine. Des amplifications positives sont observées pour les gènes cibles, le contrôle positif et les contrôles internes via les canaux Texas Red/JUN, FAM, HEX/VIC/JOE et Cy5, selon les amorces/sondes correspondantes.












13. Assistance technique

Pour tout besoin d'assistance technique, veuillez contacter notre équipe d'assistance technique dédiée par téléphone: +351 (0) 21 364 35 14 ou Courriel: info@nzytech.com.

14. Marques de commerce et clauses de non-responsabilité

Toutes les marques de commerce qui apparaissent dans ce manuel sont la propriété de leurs propriétaires respectifs.

15. Explication des symboles

	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>		Consultez le mode d'emploi
	Numéro de catalogue		Fabricant
	Code du lot		Utiliser jusqu'à
	Limitation de température		Suffisant pour
	Contrôle positif		Tenir à l'écart de la lumière du soleil (mélange amorce/sonde)
	Contrôle négatif		

16. Déclaration de conformité

Nom du produit: MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD

Numéro de catalogue: MD04931

Utilisation prévue: Détection qualitative du MRSA.

Classification: Autre (qui ne sont pas couverts par l'annexe II ou non destiné à autodiagnostic) selon la Directive 98/79/CE.

Fabricant: NZYtech - Genes & Enzymes,

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar

Edifício E, R/C,

1649-038, Lisboa

Portugal

Nous, NZYtech, Lda – Genes & Enzymes, déclarons que ce produit, auquel se réfère cette déclaration de conformité, est conforme aux normes standard ISO 9001:2015 et ISO 13485:2016, conformément aux dispositions de la directive 98/79/CE et le règlement (UE) 2017/746 appliqué aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*, transposé dans les législations nationales des États membres de l'Union européenne.

Le dossier technique du produit est conservé chez NZYtech, Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal.



Joana Brás, Ph.D.

Directrice technique

17. Références

- Wertheim, H. F. et al. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* 5, 751–762.
- Van Belkum A, Rochas O (2018) Laboratory based and point-of-care testing for MSSA/MRSA detection in the age of whole genome sequencing. *Front Microbiol* 9:1437. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01437>
- Faoagali, J. L. et al. (1992). Ten years' experience with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a large Australian hospital. *J. Hosp. Infect.* 20, 113-119.
- Voss, A. et al. (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1965-1966.
- Organisation Mondiale de la Santé. (2009) Directives de l'OMS sur l'hygiène des mains dans le cadre des soins de santé. Alliance mondiale pour la sécurité des patients (WHO Press, Genève).
- Lee, A. et al. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers* 4, 18033. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
- Jonas D, et al. (2002). Rapid PCR-based identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from screening swabs. *J Clin Microbiol.* 40(5):1821-3.
- Groupe de travail international sur les éléments chromosomiques des cassettes staphylococciques (2011). http://www.sccmec.org/Pages/SCC_HomeEN.html.
- Meng, X et al. (2020). Rapid Detection of *mecA* and *femA* Genes by Loop-Mediated Isothermal Amplification in a Microfluidic System for Discrimination of Different Staphylococcal Species and Prediction of Methicillin Resistance. *Frontiers in microbiology.* 11. Jg.
- Dupieux C., et al. (2017). Detection of *mecC* -positive *Staphylococcus aureus*: what to expect from immunological tests targeting PBP2a? *J Clin Microbiol* 55(6):1961–1963.
- Padmanabhan RA, Fraser TG. (2005). The emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community. *Cleveland Clinic J Med.* 72(3):235-241.

