MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD

Kit de PCR em tempo real para MRSA Multiplex, IVD

REF MD04931, 96 reações

Dispositivo médico para diagnóstico in vitro

CE IVD

PT

Instruções de utilização

IM-009pt

VERSÃO 01/2023, março 2023

NZYTech genes & enzymes
Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal
Tel.:+351.213643514 Fax: +351.217151168
www.nzytech.com

Índice

1. Introdução ... 3
2. Utilização prevista ... 4
3. Princípio do ensaio ... 4
4. Descrição do produto ... 5
5. Armazenamento, conservação e manuseamento ... 5
6. Materiais e instrumentos necessários mas não fornecidos ... 6
7. Colheita e preparação da amostra ... 6
8. Advertências e precauções ... 7
   8.1 Informação de segurança ... 7
   8.2 Manuseamento e Procedimentos adequados ... 7
9. Procedimentos de testagem ... 8
   9.1 Preparação das reações de qPCR ... 8
   9.2 Programação do equipamento de PCR em tempo real ... 9
10. Análise de dados ... 10
   10.1 Critérios de validação da corrida ... 10
   10.2 Interpretação dos resultados ... 10
11. Avaliação de desempenho do teste ... 12
   11.1 Resultados esperados ... 12
   11.2 Sensibilidade Analítica – Limite de Deteção (LoD) ... 13
   11.3 Especificidade Analítica ... 13
      11.3.1 Reatividade Cruzada (Exclusão) e Especificidade ... 13
      11.3.2 Substâncias Interferentes ... 13
   11.4 Precisão ... 15
      11.4.2 Repetibilidade ... 17
      11.4.3 Repetibilidade diária ... 17
      11.4.4 Reprodutibilidade entre lotes ... 17
      11.4.5 Reprodutibilidade entre operadores ... 17
      11.4.6 Reproducibilidade entre equipamentos ... 18
   11.5 Avaliação Clínica ... 18
12. Controlo de Qualidade ... 18
13. Apoio Técnico ... 19
14. Marcas registadas e direitos de propriedade ... 19
15. Tabela de símbolos ... 19
16. Declaração de Conformidade ... 20
17. Referências ... 21

1. Introdução

A bactéria *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) é um dos agentes patogénicos humanos mais frequentes de infeções nosocomiais e comunitárias. *S. aureus* tem uma capacidade notável para adquirir resistência aos antibióticos, o que compromete a eficácia das opções terapêuticas disponíveis. Foi nos anos 60 no Reino Unido, que foram detetadas as primeiras estirpes resistentes desta bactéria em meios hospitalares. Contudo, desde 1990 que as infeções por MRSA adquiridas na comunidade aumentaram consideravelmente, pelo que se tornou um tema de elevada importância. Deste modo, as infeções por MRSA são muitas vezes subcategorizadas em infeções de MRSA adquiridas na comunidade (CA-MRSA), em infeções de MRSA adquiridas em hospitais (HA-MRSA) e em infeções de MRSA associadas à pecuária (LA-MRSA). A resistência à meticilina e oxacilina, para além de outros antibióticos β-lactâmicos, é mediada pelo gene *mec*A (ou *mec*C) que está localizado num elemento genético móvel designado por cassete cromossómica estafilocócica *mec* (SCC*mec*). O gene *mec*A (ou *mec*C) codifica uma proteína de ligação à penicilina 2a (do inglês "penicillin binding protein 2" PBP2a), com afinidade reduzida na ligação normal de antibióticos β-lactâmicos à PBP na parede celular, o que leva à interrupção da síntese da camada de peptidoglicano, resultando na morte das células bacterianas. Até à data, foram descritos 14 tipos de cassetes SCC*mec* que diferem em tamanho e composição genética e dos quais, os tipos I a V ocorrem com maior frequência. A cassete SCC*mec* do tipo XI contém um homólogo ao gene *mec*A, também denominado por *mecC* ou por *mecALGA251*. O gene *mec*A/*mec*C confere aos *Staphylococcus* uma resistência intrínseca a todos antibióticos β-lactâmicos, nomeadamente à meticilina/oxacilina que se encontram nos isolados MRSA e nos isolados *Staphylococcus* coagulase negativos resistentes à meticilina (CoNS). Deste modo, uma vez que a deteção exclusiva de *mec*A/*mec*C é insuficiente para identificar MRSA, as amostras devem ser testadas em paralelo especificamente para *S. aureus*. Assim, para evitar a deteção de falsos positivos devido à presença de CoNS resistentes à meticilina ou de *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina (MSSA), deve ser detetada uma região específica *de S. aureus* localizada entre a fase de leitura aberta conservada *orfX* e SCC*mec* que contém o gene *mec*A/*mec*C. Adicionalmente, a bactéria *S. aureus* produz uma termonuclease extracelular, codificada pelo gene *nuc*, específico da espécie, que permite distinguir *S. aureus* de outros *Staphylococcus spp.*

O método de diagnóstico convencional de MRSA está baseado na cultura microbiológica e requer o isolamento de colónias seguido de teste de suscetibilidade a antibióticos e da deteção do gene *mec*A ou da proteína PBP2a. Este processo necessita de 24 a 72 horas para ser implementado. As infeções por MRSA em unidades de saúde e na comunidade resultam num nível de morbilidade e mortalidade significativas. O controlo do MRSA é um dos principais objetivos da maioria dos programas de prevenção de infeções em hospitais, sendo por isso imperativo tomar medidas preventivas e investir na área de investigação de novos agentes contra MRSA para reduzir a sua prevalência. A vigilância ativa utilizando testes moleculares para uma rápida deteção de MRSA é uma estratégia comprovada para reduzir a transmissão em ambiente hospitalar e para prevenir que os pacientes vulneráveis sejam infetados. Metodologias rápidas e sensíveis, nomeadamente a técnica de PCR em tempo real, permitem a deteção precoce de MRSA a partir de zaragatoas nasais e podem diminuir o tempo de resposta para 1 a 2 horas. A triagem rápida e precisa de MRSA representa uma clara vantagem para os programas de controlo de infeções.

2. Utilização prevista

O teste MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, é um teste molecular baseado na tecnologia de PCR em tempo real, destinado à rápida deteção e diagnóstico qualitativo de ácidos nucleicos de MRSA a partir de zaragatoas nasais colhidas com um kit de transporte em meio líquido Amies. Este teste destina-se a ser utilizado como auxiliar no diagnóstico de infeção por MRSA em combinação com sinais e sintomas clínicos do paciente e fatores de risco epidemiológicos. O teste não se destina à orientação ou à monitorização do tratamento de infeções por MRSA. A técnica de PCR em tempo real permite detetar o ADN alvos específicos da MRSA na amostra, se presente. Um resultado negativo não exclui a colonização nasal por MRSA. Não existem contraindicações para a utilização do kit de deteção de PCR em tempo real de MRSA. A testagem deve ser realizada por técnicos de laboratório especializados e qualificados, sobretudo nas metodologias de PCR em tempo real e diagnóstico molecular. O kit deverá ser usado apenas conforme indicado neste manual do utilizador.

3. Princípio do ensaio

O teste MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, da NZYTech fornece o conjunto de reagentes, enzimas e oligonucleótidos (*primers* e sondas) para a deteção qualitativa de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) através da técnica de PCR em tempo real (ver requisitos das especificações do equipamento na **Secção 6**). Os oligonucleótidos e as sondas presentes no MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, detetam sequências-alvo dos genes *mec*A, *mec*C, *nuc* e a junção SCC*mec-orfX*. Estas regiões genéticas foram previamente identificadas como marcadores genéticos específicos para a identificação de MRSA. A resistência de *S. aureus* à meticilina/oxacilina e a outros antibióticos beta-lactâmicos é conferida pelos genes *mec*A e *mec*C. O gene *mec*A está localizado na cassette cromossómica estafilocócica mec (SCC*mec*) conhecida por ser variável e instável. A cassete SCC*mec* tipo XI (SCC*mec* XI) contém um gene homólogo a *mec*A, também denominado por *mec*C. O gene *mec*C tem apenas 70% de homologia com o *mecA* convencional, tendo sido descrito em isolados de *S. aureus* em humanos e bovinos. A zona de junção *SCCmec-orfX* foi especificamente selecionada para identificar a região entre a fase de leitura aberta conservada *orfX* em *S. aureus* e o SCC*mec* que contém o gene *mec*A. Finalmente, o gene *nuc*, que codifica uma termonuclease extracelular, permite distinguir *S. aureus* de outros *Staphylococcus spp*.

O teste MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, da NZYTech foi constituído para ter um amplo perfil de deteção, mas permanecendo específico para a deteção de MRSA. Por outro lado, o conjunto de oligonucleótidos foi desenhado especificamente para deteção deste organismo, não apresentando homologia significativa com outros genomas não relacionados, o que traduz a elevada especificidade e sensibilidade de deteção do teste, já que evita a deteção cruzada de outros organismos causadores de infeções semelhantes. O controlo interno, incluído no kit, permite confirmar se a extração dos ácidos nucleicos a partir de amostras biológicas humanas foi eficiente, dando ainda indicações sobre a presença de inibidores de PCR que possam influenciar a reação de amplificação. A NZYTech revisita periodicamente as sequências dos genes alvo de MRSA e, caso seja necessário, pode disponibilizar uma nova versão deste kit. Adicionalmente, o kit inclui três controlos externos (dois controlos positivos e um controlo negativo), tal como descrito adiante. Os controlos positivos consistem em fragmentos de ácidos nucleicos que contêm as sequências alvo detetadas pelo kit.

Neste kit, a determinação qualitativa de ADN é baseada na técnica de PCR em tempo real, metodologia de referência no diagnóstico molecular laboratorial. É uma metodologia de elevada sensibilidade e especificidade para detetar com exatidão a presença de MRSA. O princípio deste teste MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, da NZYTech, consiste na pesquisa em ADN isolado e purificado através de um sistema de extração de ácidos nucleicos. Assim, após extração, o ADN é amplificado por PCR, numa única reação, através de um conjunto de oligonucleótidos altamente específicos para a deteção de MRSA e baseados no princípio TaqMan®. Na presença de ADN de MRSA as sondas TaqMan® ligam-se às regiões conservadas dos genes específicos (*mec*A & *mec*C, a junção SCC*mec*/*orfX* e o gene *nuc*), que se encontram flanqueadas por dois pares de oligonucleótidos igualmente específicos. Um quinto conjunto de oligonucleótidos (*primers* e sonda) funciona como controlo interno, detetando uma sequência de ácidos nucleicos do gene humano *RNAse P* (RP). A deteção do controlo interno permite confirmar a eficácia do processo de extração do material biológico recolhido, assim como demonstrar se ocorreu ou não inibição da reação de PCR pela presença/ausência de inibidores nas amostras clínicas. Para permitir a identificação da amplificação dos cinco alvos específicos em uma única reação, as sondas específicas para deteção de MRSA (quatro conjuntos de *primers* e sondas) e RP humano são marcadas com fluoróforos emissores diferentes, FAM™, HEX™, Texas Red® e Cy5™, respetivamente. Assim, este kit consiste num ensaio pentaplex em que nos canais óticos FAM, HEX/VIC/JOE e Texas Red/JUN são detetados os genes *mec*A & *mec*C, junção SCC*mec*/*orfX* e *nuc*, respetivamente, enquanto no canal ótico Cy5 é detetado o gene humano RP. Estes conjuntos de oligonucleótidos/sondas são fornecidos em concentrações otimizadas para garantir que a amplificação do ADN humano, mesmo quando presente em concentrações extremamente altas, não limita a eficiência dos oligonucleótidos/sonda específicos para os ADNs de MRSA.

4. Descrição do produto

O teste MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, da NZYTech providencia o conjunto de reagentes e controlos necessários para realizar a deteção qualitativa de MRSA num único passo.

Composição do kit		**Volume (por tubo)**	**Número de tubos**	**Cor da tampa**
MRSA MMix	NZYSupreme Multiplex qPCR Probe Master Mix (2x)	1050 µL	1	Neutro
MRSA PPMix	MRSA/RP Primer & Probe Mix (10x)	205 µL	1	Castanho
MRSA POS 1	MRSA/RP Positive Control 1	105 µL	1	Vermelho
MRSA POS 2	MRSA/RP Positive Control 2	105 µL	1	Vermelho
NTC	No-Template Control	105 µL	1	Neutro

5. Armazenamento, conservação e manuseamento

O teste MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, é enviado refrigerado. Após receção do kit, todos os componentes devem ser imediatamente armazenados de -85°C a -15°C. De forma a minimizar o tempo de exposição à temperatura ambiente, que pode degradar os componentes do kit, estes deverão ser colocados imediatamente no congelador após a sua utilização. Adicionalmente:

- É aconselhável reduzir o número dos ciclos de congelação/descongelação através do armazenamento de alíquotas de trabalho. Assim, os componentes do kit podem ser

aliquotados em volumes menores após descongelação. O kit é estável por um mínimo de 6 ciclos de congelamento e descongelamento.

- O componente MRSA PPMix deve ser armazenado num local protegido da luz. Em particular, não expor o componente NZYSupreme Multiplex qPCR Probe Master Mix (2x) diretamente à luz do sol depois de adicionar o componente MRSA PPMix.
- Se ao receber o kit, a embalagem estiver danificada, contactar imediatamente a NZYTech.
- Tenha em atenção a data de validade indicada na embalagem. A NZYTech não recomenda a utilização do kit após a data de validade. Nessa altura, o kit deve ser descartado seguindo as instruções descritas na **Secção 8.2.**

6. Materiais e instrumentos necessários mas não fornecidos

- Equipamento de PCR em tempo real que detete os canais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos FAM, HEX/VIC/JOE, Texas Red/JUN e Cy5 (canais de comprimento de onda de 520, 556, 615 e 670 nm, respetivamente). Ver na **Secção 11** os modelos dos equipamentos em que o kit foi validado.
- Equipamento e consumíveis para extração de ADN de amostras biológicas/clínicas.
- Consumíveis de plástico para qPCR, isentos de nucleases: tubos de PCR e tampas, placas de 96 poços, peliculas adesivas apropriadas.
- Pipetas e respetivas pontas com filtro hidrófobos, estéreis e livres de nucleases.
- Bloco frio.
- Luvas descartáveis.
- Agitador de vórtex e centrífuga de bancada.

7. Colheita e preparação da amostra

O teste foi projetado para detetar ADN extraído a partir de amostras de zaragatoa nasal. A amostra nasal deve ser recolhida nas duas narinas, uma de cada vez, com a mesma zaragatoa (ESwab®, Copan). Coloque a zaragatoa no tubo de transporte contendo o meio de transporte de Amies líquido. A recolha deve ser realizada em tubos estéreis. As amostras devem ser hermeticamente fechadas em tubos ou recipientes adequados, rotuladas corretamente e transportadas imediatamente para o laboratório. As amostras devem ser testadas o mais rapidamente possível. A colheita inadequada, o manuseamento e/ou o transporte inadequados das amostras poderão originar um resultado falso. Os ácidos nucleicos totais, constituem o material inicial para o ensaio usando o teste MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD. A NZYTech recomenda que a extração dos ácidos nucleicos seja realizada com o kit NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYTech), uma vez que este kit foi validado para a extração de amostras clínicas de MRSA. Por favor, assegure-se de que as amostras de ADN são adequadas em termos de pureza, concentração e integridade dos ácidos nucleicos. Sendo o etanol um forte inibidor do PCR em tempo real, é necessário eliminar completamente este componente antes da eluição dos ácidos nucleicos aquando de processo de extração. O kit da NZYTech contém um controlo interno que tem como alvo o ADN humano co-purificado com o ADN bacteriano. O ADN humano é amplificado com o conjunto de oligonucleótidos (oligonucleótidos e sonda) do gene da RNaseP humano. A introdução do controlo interno é útil na avaliação da eficiência da extração e isolamento do ADN e/ou na deteção da presença de potenciais inibidores da reação de PCR.

8. Advertências e precauções

Siga cuidadosamente os procedimentos e indicações fornecidas neste manual de forma a assegurar que o teste é realizado corretamente. Antes da primeira utilização verifique o produto e os seus componentes relativamente à sua integridade nomeadamente, totalidade e tipo de componentes do kit, etiquetagem correta e se congelado aquando entrega. Como em qualquer procedimento de testagem, as boas práticas de laboratório são essenciais. Qualquer alteração dos mesmos pode resultar na falha do ensaio ou causar resultados erróneos. Devido à elevada sensibilidade do kit, deve ser dada especial atenção aos reagentes e às misturas de amplificação da reação, de forma a mantê-los livres de contaminações.

8.1 Informação de segurança

Antes de utilizar o kit, por favor consulte a ficha de dados de segurança (SDS) que está disponível no *website* da NZYTech (www.nzytech.com). A deteção de MRSA deve ser realizada somente por profissionais especializados com formação nos procedimentos técnicos e nas normas de segurança, em laboratórios devidamente equipados. Os regulamentos internacionais e nacionais de biossegurança de laboratórios devem ser seguidos em todas as circunstâncias.

8.2 Manuseamento e Procedimentos adequados

- Apenas para uso profissional de diagnóstico *in vitro*.
- Não utilizar este kit após a data de validade.
- Não utilizar os componentes do kit se a embalagem estiver danificada.
- Não misturar reagentes/componentes de diferentes lotes de produção.
- Não utilizar reagentes/componentes de outros fabricantes juntamente com os reagentes/componentes deste kit.
- Devem ser usados consumíveis de plástico e pipetas livres de nucleases (sem DNase/RNase) em todos os procedimentos.
- Utilize áreas de trabalho separadas/diferentes e isoladas para: a preparação da amostra, a preparação da reação e as atividades de amplificação/deteção. A ordem das tarefas no laboratório deve ser unidirecional. Utilize sempre luvas descartáveis em cada área e troque-as antes de entrar numa área diferente. Se possível mude de bata.
- Selecione materiais e equipamentos específicos para cada área de trabalho individual e não os transfira de uma área para outra.
- Utilizar sempre o controlo negativo fornecido no kit (NTC).
- As amostras biológicas devem ser manuseadas como sendo infeciosas e seguindo as precauções de biossegurança adequadas.
- Os controlos positivos devem ser guardados e manuseados longe das amostras e dos todos os outros componentes do kit de forma a evitar contaminação cruzada.
- Manusear as placas após amplificação com cuidado e descartá-las imediatamente no final da testagem; as placas devem ser sempre descartadas no contentor de riscos biológicos. Não abra os tubos/placas de reação pós-amplificação para evitar a contaminação com amplicões.
- No final de cada testagem, limpar/desinfetar as superfícies das zonas de trabalho e equipamentos com solução desinfetante apropriada para remoção de quaisquer vestígios de ácidos nucleicos.
- Deitar fora os resíduos de amostras e ensaios respeitando as normas regulamentares de segurança em vigor. Resíduos de compostos químicos e outras preparações são geralmente

considerados resíduos perigosos. A rejeição deste tipo de resíduos está regulada por leis nacionais e regionais.

- Todos os resultados devem ser interpretados por um profissional de saúde no contexto do historial médico e sintomas do paciente.
- Este teste não pode excluir doenças causadas por outros patógenos.
- Um resultado negativo para qualquer teste de PCR não exclui a possibilidade de infeção.
- Seguir boas práticas de laboratório, vestir roupa de proteção, usar luvas permanentemente, óculos de proteção e máscara. Não comer, beber ou fumar na zona de trabalho.

9. Procedimentos de testagem

Por favor, leia cuidadosamente as instruções antes de realizar o ensaio. Tenha em atenção que todos os passos de pipetagem e preparação da placa devem ser efetuadas seguindo boas práticas de utilização de PCR em tempo real. Depois da placa estar selada, deve-se iniciar imediatamente o protocolo de PCR em tempo real. Durante a preparação das misturas de reação, a exposição prolongada à temperatura ambiente pode levar a artefactos que reduzem a sensibilidade da deteção. Antes do ensaio, deve misturar gentilmente os tubos de reação fornecidos, centrifugar por cinco segundos para recolher o conteúdo no fundo do tubo e colocar em gelo. **Recomenda-se vivamente pipetar sempre em último lugar os controlos positivos, MRSA POS 1 e MRSA POS 2 de forma a evitar eventuais contaminações cruzadas.**

9.1 Preparação das reações de qPCR

1. Preparar uma mistura de reação qPCR com o volume suficiente para o número de testes a realizar; adicionar 5% de volume extra para compensar perdas durante a pipetagem. Proceda de acordo com a tabela seguinte, onde estão especificados os volumes para 1 ou *n* testes (em que *n* corresponde ao número total de reações):

Componente	**Volume 1 teste (µL)**	**Volume *n* testes * + 5% (µL)**
MRSA MMix **	10	*n* x 10.5
MRSA PPMix	2	*n* x 2.10
Volume final	**12**	***n* x 12.6**

** Para calcular o número total de reações necessárias para cada ensaio, contabilize o número de amostras e mais duas para os controlos negativo e positivo, respetivamente.*
*** Um ligeiro precipitado pode surgir no tubo, em particular após vários ciclos de congelação/ descongelação. Para garantir o desempenho ideal, proceda a uma agitação vigorosa da mistura de enzimas antes de usar. Neste caso, não centrifugue a mistura de enzimas antes de pipetar.*

2. Pipete 12 µL da mistura reação qPCR para cada poço de acordo com a configuração de testagem da placa de qPCR.

3. Para o controlo negativo, adicione 8 µL de NTC no poço relativo ao controlo negativo, em substituição do ADN da amostra. O volume final deve ser de 20 µL.

4. Para as amostras biológicas, adicione 8 µL de cada amostra de ADN nos poços relativos ao ensaio, de acordo com a configuração de testagem da placa. O volume final deve ser de 20 µL.

5. Para os controlos positivos, adicionar 8 µL de MRSA POS 1 e adicionar 8 µL de MRSA POS 2 em substituição do ADN da amostra. O volume final deve ser de 20 µL.

6. Selar a placa contendo todas a reações com um revestimento adesivo apropriado antes de iniciar as etapas de qPCR em tempo real para deteção das sequências.

7. Colocar a placa no equipamento de PCR em tempo real e iniciar o protocolo de qPCR de acordo com a secção seguinte.

9.2 Programação do equipamento de PCR em tempo real

A tabela seguinte exemplifica o protocolo padronizado e otimizado num determinado número de plataformas de PCR em tempo real. Estas condições podem, contudo, ser adaptadas e validadas de forma a satisfazer protocolos específicos em alguns equipamentos.

Ciclos	Temperatura	Tempo	Fase
1	95 °C	5 min	*Ativação da polimerase*
45	95 °C	10 s	*Desnaturação*
	60 °C	30 s	*Emparelhamento/Extensão**

**Dependendo do instrumento de qPCR selecionar os canais de deteção adequados. Colheita de sinal de fluorescência nos canais FAM, HEX/VIC, Texas Red e Cy5.*

Os corantes fluorescentes usados neste kit e respetivos canais de deteção são:

Fluoróforos/Marcações

Genes Alvo /Detetor	Corante *Reporter* (Sondas)	Canal de deteção
*mec*A/*mec*C	FAM™	FAM
Junção SCC*mec*/*orfX*	HEX™	HEX/VIC/JOE
nuc	Texas Red®	Texas Red/JUN
RNaseP	Cy5™	Cy5
MRSA POS 1	FAM™ & HEX™& Texas Red® & Cy5™	FAM & HEX/VIC/JOE & Texas Red/JUN Cy5
MRSA POS 2	FAM™ & HEX™& Texas Red® & Cy5™	FAM & HEX/VIC/JOE & Texas Red/JUN Cy5

O teste MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, da NZYTech foi validado nos seguintes equipamentos de PCR em Tempo Real: Applied Biosystems™ 7500 FAST, Applied Biosystems™ QuantStudio 5, Roche Lightcycler® 96 Instrument, Bio-Rad® CFX Opus and Bio-Rad® CFX 96 Touch. Se pretender usar outro equipamento, o utilizador deve validar o kit usando amostras previamente caracterizadas (positivas e negativas).

10. Análise de dados

10.1 Critérios de validação da corrida

Previamente à análise dos resultados, recomendamos que consulte o manual do utilizador do respetivo aparelho. De seguida verifique se o teste de PCR em tempo real é válido. Assim, para cada placa, confirme se os resultados obtidos para os controlos positivos e negativo estão de acordo com os seguintes critérios:

- **Controlo negativo (reação sem ADN):** nenhum sinal de amplificação é detetado. Se o controlo negativo origina algumas das curvas de amplificação (FAM, HEX/VIC/JOE, Texas Red/JUN e Cy5) com forma sigmoide, poderá ter ocorrido contaminação. Repita o teste seguindo boas práticas de PCR em tempo real.
- **Controlo positivo (MRSA POS 1)**: as curvas de amplificação para FAM (*mecA*), HEX/VIC/JOE (junção SCC*mec*/*orfX*), Texas Red/JUN (*nuc*) e Cy5 (RP) são positivas. É expectável que o controlo positivo origine curvas de amplificação com Ct < 32, para qualquer um dos quatro canais. O não cumprimento deste critério de controlo de qualidade é uma forte indicação de que o ensaio foi comprometido.
- **Controlo positivo (MRSA POS 2)**: as curvas de amplificação para FAM (*mecC*), HEX/VIC/JOE (junção SCC*mec*/*orfX*), Texas Red/JUN (*nuc*) e Cy5 (RP) são positivas. É expectável que o controlo positivo origine curvas de amplificação com Ct < 32, para qualquer um dos quatro canais. O não cumprimento deste critério de controlo de qualidade é uma forte indicação de que o ensaio foi comprometido.

Se os controlos estão de acordo com o esperado, o teste é considerado **válido**.
Por favor, proceda com a interpretação dos resultados das amostras testadas.

Se em algum dos controlos não foi obtido o resultado esperado, isto significa que o ensaio foi comprometido ou executado incorretamente e deve ser considerado **inválido**.
Por favor, repita o teste. Se o problema persistir, contacte o fabricante.

10.2 Interpretação dos resultados

O kit MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD usa os seguintes valores de Ct *cut-off* para a interpretação de resultados:

Valor de Ct	Interpretação dos resultados
Ct ≤37	Detetado (+) → **POSITIVO**
Ct>37	Não Detetado (-) → **NEGATIVO**

MRSA é detetado se a curva de amplificação dos canais FAM (*mec*A/*mec*C), HEX/VIC/JOE (junção SCC*mec*/*orfX*), Texas Red/JUN (*nuc*) são sigmoides com Ct≤37, independentemente do resultado obtido para o gene RP (a presença ou ausência de um sinal no canal Cy5 não é significativa para validade da análise processada).

MRSA não é detetado se a curva dos canais FAM (*mec*A/*mec*C) e/ou HEX/VIC/JOE (junção SCC*mec*/*orfX*), e/ou Texas Red/JUN (*nuc*) não forem positivas (Ct>37), enquanto o gene RP (Cy5) apresenta uma curva positiva sigmoide (Ct≤45).

O **teste é inválido** se as três curvas de amplificação de MRSA e a curva de amplificação do RP forem negativas. O teste deve ser repetido, procedendo-se a nova extração de ácidos nucleicos a partir da amostra.

A tabela seguinte resume a interpretação dos resultados principais (deve avaliar a forma das curvas de amplificação; **apenas curvas de amplificação sigmoide são indicativas de uma amplificação real)**.

***mec*A/*mec*C** (FAM)	**SCC*mec*/*orfX*** (HEX/VIC/JOE)	***nuc*** (TexasRed/JUN)	**RP**[1] (Cy5)	**Controlo negativo**	**Controlos positivos**	**Interpretação dos resultados**
+	+	+	+/-	-	+	**MRSA → POSITIVO** [2]
+	-	+	+/-	-	+	**MRSA → NEGATIVO** [3]
-	+	+	+/-	-	+	**MRSA → NEGATIVO**
-	-	+	+/-	-	+	**MRSA → NEGATIVO**
+	-	-	+/-	-	+	**MRSA → NEGATIVO** [4]
-	+	-	+/-	-	+	**MRSA → NEGATIVO**
+	+	-	+/-	-	+	**MRSA → NEGATIVO**
-	-	-	+	-	+	**MRSA → NEGATIVO**
-	-	-	-	-	+	**TESTE INVÁLIDO** [5]

[1] *Na presença de quantidades elevadas de ADN alvo na amostra a deteção do Controlo interno no canal de deteção Cy5 pode ser inibida, originando uma redução ou ausência do sinal (+: curva de amplificação detectada; -:inexistência de curva de amplificação).*
[2] *MRSA: S. aureus resistente a metilicina.*
[3] *No caso de estarmos perante de uma nova ou desconhecida variante de MRSA, o canal HEX/VIC/JOE pode ser negativo.*
[4] *MRCoNs: Staphylococcus coagulase negativos resistentes à meticilina/oxicilina.*
[5] *Repetir a extração de ADN e realizar uma nova corrida de qPCR.*

Nota: A interpretação dos resultados deve ter em conta a possibilidade de resultados falsos negativos e falsos positivos.

• Resultados falsos negativos podem ser causados por:

- Recolha transporte, manuseamento e/ou armazenamento incorretos das amostras.
- Degradação da amostra.
- Presença de inibidores de qPCR.
- Mutações no genoma do agente patogénico; falha em detetar variantes novas ou desconhecidas.
- Falha no seguimento dos procedimentos deste manual.

- Utilização de kits de extração ou plataformas de PCR em tempo real não validadas.

• Resultados falsos positivos, podem ser causados por:

- Amostra contendo uma mistura de múltiplos agentes patogénicos comensais.
- Dada a evidência do gene de resistência, pode existir uma infeção mista de MSSA (*S. aureus* sensível à meticilina) e CoNS (estafilococos coagulados negativos).
- Contaminação cruzada com os controlos positivos devido ao seu manuseamento incorreto.
- Manuseamento inadequado de amostras contendo elevada concentração de ADN de MRSA. Devido à alta suscetibilidade do método qPCR para contaminações cruzadas, cuidados especiais devem ser tomados durante o isolamento do ADN.
- Manuseamento incorreto do produto amplificado (placa pós amplificação).

Um resultado negativo não impede a infeção por MRSA e não deve ser usado como único indicador para o tratamento médico ou outras decisões relativas ao paciente. Além disso, este teste não pode descartar doenças causadas por outros patógenos.

11. Avaliação de desempenho do teste

O desempenho do kit MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, da NZYTech foi validado nos equipamentos de PCR em tempo real especificados na **Secção 9.2**. Se outro equipamento for usado, o kit deverá ser validado pelo utilizador utilizando amostras positivas e negativas previamente caracterizadas.

11.1 Resultados esperados

Amplificações típicas observadas para uma amostra clínica nasal negativa para MRSA (Figura 1A) e de uma amostra clínica nasal de um paciente identificado como portador de MRSA (Figura 1B), são apresentados na figura seguinte:

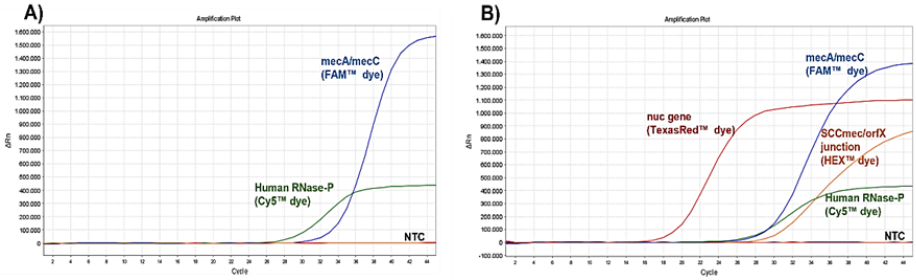

Figura 1. Deteção de ácidos nucleicos de MRSA (*mec*A/*mec*C, *nuc* e junção SCC*mec*/*orfX*) e RNaseP humana geradas pelo kit MRSA Multiplex Real-time PCR, IVD, para uma amostra clínica de uma zaragatoa nasal negativa para MRSA contendo os genes *mec*A e/ou *mec*C (Figura 1A) e para uma amostra clínica de uma zaragatoa nasal positiva para MRSA (Figura 1B). Curva azul: deteção de ADN contendo o gene-alvo *mec*A ou *mec*C através do canal FAM; Curva vermelha: deteção de ADN contendo o gene-alvo *nuc* através do canal TexasRed/JUN; Curva laranja: deteção de ADN contendo a região da junção SCC*mec*/*orfX* através do canal VIC/HEX/JOE; Curva verde: deteção do gene humano RNAse P através do canal Cy5.

11.2 Sensibilidade Analítica – Limite de Deteção (LoD)

A sensibilidade analítica foi definida como a menor concentração de analito que pode ser detetada de forma confiável com 95% de confiança. Este parâmetro foi avaliado testando ácidos nucleicos de MRSA em diferentes números de cópias, misturados com ADN extraído de amostras negativas de zaragatoas nasais, testados em 48 réplicas por concentração, por dois operadores diferentes, usando 3 lotes de kits diferentes e seguindo condições de reação de teste padrão. Os testes foram repetidos durante 4 dias. Os dados revelaram que o kit MRSA Multiplex Real-time PCR, IVD, deteta 0,15 cópias/µL de *mec*A*, mec*C, *nuc* e junção SCC*mec*/*orfX* com confiança ≥95%. Assim, o Limite de Deteção (LoD) experimental foi determinado em 150 cópias/mL para MRSA. Todos os ensaios foram realizados usando o equipamento Applied Biosystem® 7500 FAST Real Time PCR e a análise foi realizada usando o software do instrumento.

11.3 Especificidade Analítica

11.3.1 Reatividade Cruzada (Exclusão) e Especificidade

A reatividade cruzada e a inclusividade foram avaliadas *in silico* analisando todas as sondas oligonucleotídicas e primers incluídos no kit contra agentes patógenos filogeneticamente relacionados MRSA e contra patógenos que causam infeções com sintomas semelhantes, respetivamente. Os primers e as sondas do ensaio foram rastreados contra sequências genómicas publicadas. Após a análise *in silico*, verificou-se que o kit deteta especificamente MRSA e que não existe reatividade com espécies não relacionadas. A reatividade cruzada do kit foi ainda avaliada *in vitro* testando um painel composto por isolados bem caracterizados de *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA), *Staphylococcus* coagulase-negativa (CoNS), géneros bacterianos relacionados e outras floras patogénicas e comensais encontradas nas narinas. A reatividade cruzada *in vitro* do MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, foi assim avaliada para os seguintes patógenos: *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.* Os ensaios foram realizados usando uma matriz de exsudado nasal negativa à qual foram adicionados o ADN genómico dos organismos referidos acima. Além disso, foram ainda testadas seis amostras inativas que são representativas de espécimes humanos clínicos verdadeiros, incluindo *S. aureus* (estirpe hospitalar de MRSA)*, S. aureus* (estirpe comunitária de MRSA)*, S. aureus* (*mecC), S. aureus* (MSSA com cassete vazia)*, S. aureus* (MSSA*)* e *Staphylococcus epidermidis* (MSSE HER 1292*)* que é uma estirpe CoNS (Zeptometrix). Todos os testes foram realizados em triplicado usando três lotes de kits. As amostras foram extraídas em duplicado usando o sistema de extração da Thermo Scientific KingFisher Flex Purification System com o kit NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD04881) e avaliadas no equipamento Applied Biosystems® 7500 FAST. Nenhum dos patógenos testados produziu um sinal falso-positivo de qPCR.

11.3.2 Substâncias Interferentes

O impacto de 26 substâncias potencialmente interferentes ocasionalmente usadas nas narinas ou encontradas em espécimes de zaragatoas nasais foi avaliado quanto à possível interferência com o teste MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD. Os ensaios foram realizados usando espécimes nasais negativos misturados com espécimes positivos para MRSA em ~2-3x LoD. As

substâncias potencialmente interferentes foram adicionadas às amostras em concentrações que representam os níveis mais altos esperados em amostras de pacientes respiratórios humanos. A experiência foi realizada durante três dias. Todos os testes foram realizados em duplicado usando um lote de kit e comparados com os dados obtidos com um teste de controlo sem interferentes. Nas concentrações testadas, os resultados revelaram que nenhuma das moléculas em teste afetou a sensibilidade de deteção do kit. A tabela abaixo resume os dados obtidos. Os dados revelaram que nenhuma das substâncias testadas interferiu com a sensibilidade de deteção de MRSA pelo teste MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD.

Potencial interferente	Ingredientes ativos	Concentração final na amostra	Interferência Sim (S) ou Não (N)
Rhinomer® (Água do mar isotónica)	Água do mar	10% v/v	N
Strepfen® (Spray de garganta, anestésico oral e analgésico)	Flurbiprofeno	5% v/v	N
Vibrocil® (Solução de lavagem nasal; spray antialérgico)	Propionato de fluticasona	5% v/v	N
Nasomet® (Spray nasal de corticosteroides)	Furoato de mometasona	5% v/v	N
Pulmicort® (Spray nasal de corticosteroides)	Budesonida	5% v/v	N
Trobex® (Antimicrobiano, sistémico)	Trobamicina	10 µg/mL	N
Pyralvex® (Analgésico bucal, antiinflamatório e antisséptico)	Extrato de ruibardo, ácido salicílico	5% v/v	N
Eludril Gé (Antissépticos de solução para bochechos)	Gluconato de clorexidina, clorobutanol hemi-hidratado	5% v/v	N
Isophy® (Soro Fisiológico)	NaCl 0,9 %	10%	N
Saliva (humana)	-	25% v/v	N
Mucolsovan® (Mucolitico)	Cloridrato de ambroxol	5% v/v	N
Sangue Total (humano)	-	4% v/v	N
Bactroban® (Antibiótico, pomada nasal)	Mupirocina	5 mg/mL	N
Muco Nasal (mucina)	Muco (humano)	25% v/v	N
Allergodil® (Solução de spray nasal)	Cloridrato de Azelastina	5% v/v	N
Aeromax nasal® (Solução de lavagem nasal)	Budesonida	10% v/v	N
Avamys® (Solução de lavagem nasal)	Furoato de fluticasona	10% v/v	N
Bisolspray Nebulicina® (Solução de lavagem nasal)	Cloridrato de Oximetazolina	10% v/v	N
Mometasona Generis® (Solução de lavagem nasal)	Mometasona	5% v/v	N
Nasorhinathiol® (Solução de lavagem nasal)	Cloridrato de Oximetazolina	10% v/v	N
Rhinomer intense Eucalyptus® (Solução de lavagem nasal)	Água do mar hipertónica com óleo essencial de eucalipto	10% v/v	N
Vibrocil Actilong® (Solução de lavagem nasal)	Cloridrato de Xilometazolina	10% v/v	N
Tamiflu® (Medicamento antiviral)	Oseltamivir	5% v/v	N
Neo-Sinefrina® (Solução de lavagem nasal)	Cloridrato de fenilefrina	10% v/v	N
Neo-Sinefrina Alergo® (Solução de lavagem nasal)	Dipropionato de Beclometasona	10% v/v	N
Predniftalmina® (Pomada Oftálmica)	Prednisolona e Cloranfenicol	10% v/v	N
Controlo sem nenhuma substância interferente	H_2O	5% v/v	N

11.4 Precisão

A precisão do ensaio do kit MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD da NZYTech foi determinada pela testagem repetida de ácidos nucleicos positivos para MRSA representativos de duas cargas bacterianas, 3x LoD e 30x LoD por reação, combinadas com ADN extraído de amostras biológicas nasais negativas, utilizando-se 3 lotes de kit e seguindo as condições de reação específicas. A precisão foi expressa através da média de Cq, do coeficiente de variação Cq e da percentagem (%) de deteção dos replicados, conforme descrito de seguida para cada caso. Os dados são resumidos nas tabelas seguintes.

Precisão do kit MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, ao detetar o gene alvo *mec*A

Variável testada		***mecA* (Cópias/Reação)**	
		3x LoD	**30x LoD**
Repetibilidade	n	18	18
	Média Cq	35,77	32,88
	Coeficiente de Variação (%)	2,01	1,19
	% Réplicas detetadas	100	100
Reprodutibilidade diária	n	72	72
	Média Cq	36,05	33,04
	Coeficiente de Variação (%)	2,56	1,22
	% Réplicas detetadas	98,61	100
Reprodutibilidade entre lotes	n	126	126
	Média Cq	36,07	33,06
	Coeficiente de Variação (%)	2,14	1,10
	% Réplicas detetadas	99,21	100
Reprodutibilidade entre operadores	n	36	36
	Média Cq	36,35	33,18
	Coeficiente de Variação (%)	1,51	1,14
	% Réplicas detetadas	100	100
Reprodutibilidade entre equipamentos	n	90	90
	Média Cq	35,93	32,92
	Coeficiente de Variação (%)	2,19	1,23
	% Réplicas detetadas	100	100

Precisão do kit MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, ao detetar o gene alvo *mec*C

Variável testada		*mecC* (Cópias/Reação)	
		3x LoD	30x LoD
Repetibilidade	n	18	18
	Média Cq	35,56	33,02
	Coeficiente de Variação (%)	2,57	0,95
	% Réplicas detetadas	100	100
Reprodutibilidade diária	n	72	72
	Média Cq	35,68	33,07
	Coeficiente de Variação (%)	2,54	1,40
	% Réplicas detetadas	97,22	100
Reprodutibilidade entre lotes	n	126	126
	Média Cq	35,88	33,17
	Coeficiente de Variação (%)	2,53	1,40
	% Réplicas detetadas	97,62	100
Reprodutibilidade entre operadores	n	36	36
	Média Cq	36,25	33,33
	Coeficiente de Variação (%)	2,10	1,62
	% Réplicas detetadas	100	100
Reprodutibilidade entre equipamentos	n	90	90
	Média Cq	35,80	32,91
	Coeficiente de Variação (%)	2,41	1,24
	% Réplicas detetadas	98,89	100

Precisão do kit MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, ao detetar o gene alvo *nuc* específico para *S. aureus*

Variável testada		*nuc* (Cópias/Reação)	
		3x LoD	30x LoD
Repetibilidade	n	18	18
	Média Cq	35,63	32,76
	Coeficiente de Variação (%)	2,03	1,09
	% Réplicas detetadas	100	100
Reprodutibilidade diária	n	72	72
	Média Cq	35,68	32,88
	Coeficiente de Variação (%)	2,29	1,41
	% Réplicas detetadas	100	100
Reprodutibilidade entre lotes	n	126	126
	Média Cq	35,96	32,99
	Coeficiente de Variação (%)	2,48	1,44
	% Réplicas detetadas	100	100
Reprodutibilidade entre operadores	n	36	36
	Média Cq	36,28	33,22
	Coeficiente de Variação (%)	2,33	1,32
	% Réplicas detetadas	100	100
Reprodutibilidade entre equipamentos	n	90	90
	Média Cq	35,63	32,65
	Coeficiente de Variação (%)	2,36	1,23
	% Réplicas detetadas	100	100

Precisão do kit MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, ao detetar a junção SCC*mec*/*orfX*

Variável testada		Junção SCC*mec*/*orfX*	
		3x LoD	30x LoD
Repetibilidade	n	18	18
	Média Cq	36,09	33,27
	Coeficiente de Variação (%)	1,44	0,77
	% Réplicas detetadas	100	100
Reprodutibilidade diária	n	72	72
	Média Cq	36,25	33,33
	Coeficiente de Variação (%)	2,04	1,16
	% Réplicas detetadas	100	100
Reprodutibilidade entre lotes	n	126	126
	Média Cq	36,33	33,36
	Coeficiente de Variação (%)	1,96	1,18
	% Réplicas detetadas	100	100
Reprodutibilidade entre operadores	n	36	36
	Média Cq	36,54	3,39
	Coeficiente de Variação (%)	1,82	1,09
	% Réplicas detetadas	100	100
Reprodutibilidade entre equipamentos	n	90	90
	Média Cq	35,26	32,18
	Coeficiente de Variação (%)	4,03	3,89
	% Réplicas detetadas	100	100

11.4.2 Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada por um operador através da análise de 18 réplicas para cada amostra (3xLoD e 30xLoD por reação), contabilizando um total de 36 testes executados por gene-alvo.

11.4.3 Reprodutibilidade diária

A repetibilidade diária foi avaliada por um operador através da análise de 72 réplicas para cada amostra (3xLoD e 30xLoD por reação), durante 4 dias, com 18 réplicas por cada concentração por dia (num total de 144 reações por gene-alvo).

11.4.4 Reprodutibilidade entre lotes

A reprodutibilidade entre lotes foi avaliada por um operador através da análise de 126 réplicas para cada amostra (3xLoD e 30xLoD por reação), usando 3 lotes diferentes do kit com 84 réplicas por cada lote.

11.4.5 Reprodutibilidade entre operadores

A reprodutibilidade do operador foi avaliada pela testagem de 36 réplicas de cada amostra (3xLoD e 30xLoD por reação), por três operadores, com 12 réplicas por operador, num total de 36 testes por operador, usando 3 lotes diferentes do kit.

11.4.6 Reprodutibilidade entre equipamentos

A reprodutibilidade entre equipamentos foi avaliada por um operador, pela testagem de 90 réplicas por cada amostra (3xLoD e 30xLoD por reação), em cinco equipamentos de PCR em tempo real diferentes, num total de 36 testes por equipamento.

Fabricante de equipamentos de PCR em tempo real	Modelo do equipamento de PCR em tempo real
Applied Biosystem®	7500 Fast
	QuantStudio™ 5
Roche®	LightCycler 96™
Bio-Rad®	CFX Opus 96 Real-Time PCR
	CFX96™ Touch Real-Time PCR

11.5 Avaliação Clínica

O desempenho clínico do teste MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD foi avaliado usando 157 amostras de zaragatoas nasais previamente caracterizadas usando um método de cultura microbiológica de rotina. Os dados revelaram que 100% de sensibilidade clínica (PPA) e 72,7% de especificidade clínica (NPA) foram alcançados para todas as amostras positivas e negativas testadas. No geral, os resultados demonstram a elevada sensibilidade e especificidade do teste MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD para detetar MRSA.

		Ensaio comparador		
		MRSA Positivo	MRSA Negativo	Total
MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD	MRSA Positivo	58	27*	85
	MRSA Negativo	0	72	72
	Total	58	99	157

PPA (Concordância percentual positiva): 100,0 % para MRSA
NPA (Concordância percentual negativa): 72,7 % para MRSA

* Uma possível explicação para que estas amostras de cultura terem sido previamente classificadas como negativas é a perda de viabilidade bacteriana durante a colheita e/ou transporte da amostra, onde o ADN bacteriano inviável permaneceu disponível para amplificação. Além disso, essa diferença pode ser justificada pelo fato da técnica qPCR ser mais sensível que os métodos de cultura.

12. Controlo de Qualidade

Todos os componentes do kit MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, da NZYTech foram testados seguindo os protocolos descritos anteriormente. O sistema pentaplex de qPCR permite detetar as sequências alvo descritas para a identificação do ADN de MRSA e do ADN humano (gene Rnase P). Amplificações positivas foram observadas para o gene alvo, controlo positivo e controlo interno através dos canais FAM, HEX/VIC/JOE, Texas Red/JUN e Cy5, de acordo com os conjuntos de oligonucleótidos (*primers* e sonda).

13. Apoio Técnico

Para apoio técnico, por favor contactar por telefone a nossa equipa dedicada de apoio técnico: +351 213643514 ou através do correio eletrónico: info@nzytech.com.

14. Marcas registadas e direitos de propriedade

Todas as marcas registadas que surgem neste manual são propriedade dos seus respetivos representantes.

15. Tabela de símbolos

IVD	Dispositivo de diagnóstico médico *in vitro*		Consultar instruções para utilização
REF	Número de catálogo		Fabricante
LOT	Código do lote		Usado por
	Limite de temperatura		Suficiente para
CONTROL +	Controlo positivo		Manter fora do alcance da luz solar (primer/probe mix)
CONTROL −	Controlo negativo		

16. Declaração de Conformidade

Nome do produto: MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD

Número de catálogo: MD04931

Utilização: Deteção qualitativa de MRSA.

Fabricante: NZYTech - Genes & Enzymes,
Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar
Edifício E, R/C,
1649-038, Lisboa
Portugal

Nós, NZYTech, Lda – Genes & Enzymes, declaramos que este produto, a que esta declaração de conformidade diz respeito, está em conformidade com as normas padrão e outras normativas da ISO 9001:2015, seguindo as disposições da diretiva 98/79/EC sobre dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*, transposta para as leis nacionais dos Estados Membros da União Europeia.

A ficha técnica do produto é mantida na NZYTech, Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal.

Joana Brás, PhD

Diretora Técnica

17. Referências

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.

World Health Organization. (2009) WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care. World Alliance for Patient Safety (WHO Press, Geneva).

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.

International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements (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.

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal
Tel.:+351.213643514 Fax: +351.217151168
www.nzytech.com