Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD

Kit de PCR en temps réel pour le streptocoque du Groupe B, IVD

REF MD04941, 96 réactions

***Réservé à un usage professionnel de diagnostic* in vitro**

CE IVD

FR

Mode d'Emploi

IM-010en

VERSION 01/2023, Mars 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

Table des Matières

1. Introduction 3
2. Usage Prévu 3
3. Principes de l'Essai 3
4. Composition du Kit 4
5. Conditions de Stockage, de Stabilité et de Manipulation 5
6. Matériels et Instrumentation Requis mais NonFournis 5
7. Prélèvement et Préparation des Échantillons 6
8. Précautions et Avertissements 6
   8.1. Informations relatives à la Sécurité 6
   8.2. Exigences en matière de Manutention et de Procédure 7
9. Procédure de Test 7
   9.1. Configuration de la Réaction 8
   9.2. Programmation de l'instrument de PCR en temps réel 8
10. Analyse des Données 9
   10.1. Critères de Validation de l'Exécution 9
   10.2. Interprétation des Résultats du Test 10
11. Évaluation de Performance 11
   11.1. Résultats Attendus 11
   11.2. Limite de détection (LoD) - Sensibilité Analytique 12
   11.3. Spécificité Analytique 13
   11.3.1 Réactivité Croisée (exclusivité) et Spécificité 13
   11.3.2 Études sur les Interférences Microbiennes 13
   11.3.3 Substances interférentes 14
   11.4 Précision 16
      11.4.1. Répétitivité 16
      11.4.2. Reproductibilité quotidienne 16
      11.4.3. Reproductibilité d'un lot à l'autre 17
      11.4.4. Reproductibilité de l'opérateur 17
      11.4.5. Reproductibilité inter-instruments 17
   11.5 Évaluation Clinique 17
12. Contrôle de Qualité 18
13. Support Technique 18
14. Marques Déposées et Clauses de Non-Responsabilité 18
15. Explication des Symboles 19
16. Déclaration de Conformité 20
17. Références 21

1. Introduction

Streptococcus agalactiae, également connu sous le nom de *Streptocoque* du Groupe B (SGB), est l'agent pathogène à l'origine des infections bactériennes les plus graves chez les nouveau-nés. Cette bactérie colonise le tractus gastro-intestinal et génital inférieur chez 10 à 40 % des femmes enceintes et il existe un risque que le bébé soit infecté pendant l'accouchement. L'infection par SGB chez le nouveau-né peut entraîner une septicémie, une pneumonie et une méningite. Pour prévenir l'infection par SGB chez les nouveau-nés, les femmes enceintes sont soumises à un dépistage systématique du SGB en fin de grossesse (entre la 35e et la 37e semaine de gestation). Un test positif du SGB nécessitera l'administration d'antibiotiques pendant l'accouchement afin de réduire le risque d'infection pour le bébé. Toutefois, les femmes qui donnent naissance à des enfants prématurés n'ont généralement pas l'occasion de subir un dépistage du SGB, de sorte que la présence de cette bactérie pendant le travail n'est pas contrôlée. Dans ces cas, il y a donc un risque accru d'infections graves chez les nouveau-nés, ce qui conduit à l'administration d'antibiotiques pendant l'accouchement, qui a été associée à l'émergence de souches bactériennes résistantes. Des études récentes ont révélé que jusqu'à deux tiers des nouveau-nés ayant développé une septicémie précoce par SGB étaient nés de mères dont le dépistage prénatal effectué à l'aide de méthodes de culture microbiologique de routine indiquait qu'elles étaient séronégatives au SGB. Par conséquent, bien que la culture microbiologique soit considérée comme la méthode standard de détection du SGB, elle présente des limites liées à sa faible sensibilité et au délai d'obtention des résultats, qui peut aller jusqu'à 72 heures. Le test de PCR en temps réel est une méthode rapide, puissante et robuste qui peut être utilisée pour identifier la présence de *Streptocoques* du Groupe B.

2. Usage Prévu

Le Kit de PCR en temps réel pour le *Streptocoque* du Groupe B de NZYTech est un test moléculaire basé sur la technologie PCR en temps réel, destiné à la détection rapide et au diagnostic qualitatif d'acides nucléiques spécifiques du SGB, à partir d'écouvillons vaginaux et/ou périanaux prélevés dans un kit de transport contenant un milieu liquide Amies. Ce test est destiné à identifier la colonisation par le SGB chez les femmes en période antepartum. Il n'existe aucune contre-indication à l'utilisation du Kit de PCR en temps réel pour le *Streptocoque* du Groupe B de NZYTech. Les tests doivent être effectués par des techniciens de laboratoire spécialisés et qualifiés, notamment en ce qui concerne la technique de PCR en temps réel et l'expérience en matière de diagnostic moléculaire *in vitro*. Le kit ne doit être utilisé que de la manière indiquée dans ce manuel d'utilisation.

3. Principes de l'Essai

Le Kit de PCR en temps réel pour le *Streptocoque* du Groupe B de NZYTech, IVD, fournit un ensemble de réactifs, d'enzymes et d'oligonucléotides (amorces et sondes) pour la détection qualitative du génome du SGB (voir les exigences relatives aux spécifications de l'équipement à la section 6). La séquence cible du kit a été précédemment identifiée comme un bon marqueur génétique du SGB. Le Kit de PCR en temps réel pour le *Streptocoque* du Groupe B de NZYTech,

IVD, a été conçu pour avoir un large profil de détection tout en restant spécifique pour la détection du SGB. En outre, la série d'oligonucléotides a été spécifiquement conçue pour la détection de cet organisme et ne présente pas d'homologie significative avec d'autres génomes, ce qui reflète la spécificité et la sensibilité de détection élevées du test. Ainsi, le kit a été conçu pour être spécifique au SGB et pour éviter la détection d'autres organismes causant des infections similaires. Le contrôle interne, inclus dans le kit, valide l'efficacité du processus d'extraction ainsi que l'absence d'inhibiteurs de PCR potentiellement présents dans les échantillons biologiques humains. Périodiquement, NZYTech réexamine la séquence du gène cible du SGB et, si nécessaire, peut fournir une nouvelle version de ce kit. En outre, le kit comprend deux contrôles externes (un contrôle positif et un contrôle négatif) décrits ci-dessous. Le contrôle positif consiste en un fragment d'acide nucléique qui contient la séquence cible détectée par le kit.

Dans ce kit, la détermination qualitative de l'ADN est basée sur la technique de PCR en temps réel, une méthodologie de référence pour le diagnostic en laboratoire. Il s'agit d'une méthodologie très sensible et spécifique permettant de détecter avec précision la présence de cet organisme. Le principe du Kit de PCR en temps réel pour le *Streptocoque* du Groupe B de NZYTech, IVD, consiste à utiliser de l'ADN isolé et purifié grâce à un système d'extraction pour rechercher la présence d'ADN bactérien. L'ADN extrait est soumis à une amplification PCR, en une seule réaction, à l'aide d'un ensemble d'amorces/sondes hautement spécifiques exploitant le principe TaqMan®. En présence d'ADN SGB, la sonde TaqMan® se lie spécifiquement aux régions conservées du gène SGB spécifique qui est flanqué d'une paire d'amorces spécifiques. Un deuxième ensemble d'amorces/sondes sert de contrôle interne, détectant le gène de la β-actine humaine (ACTB). 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 ou l'absence d'inhibiteurs dans les échantillons cliniques. Pour permettre l'identification de l'amplification des deux cibles spécifiques dans une seule réaction, les sondes spécifiques du SGB et de la β-actine humaine sont marquées différemment avec des colorants rapporteurs FAM™ et HEX™, respectivement. Ainsi, ce kit consiste en un test duplex dans lequel la cible SGB est détectée dans le canal optique FAM et le gène cible humain est détecté dans le canal optique HEX. Ces oligonucléotides/ensembles de 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 amorces/ensembles de sondes SGB.

4. Composition du Kit

Le Kit de PCR en temps réel pour le *Streptocoque* du Groupe B de NZYTech, IVD, fournit un ensemble complet de réactifs permettant d'effectuer 96 réactions qPCR en une seule étape.

Composants du Kit		Volume (par flacon)	Nombre de tubes	Couleur du couvercle
SGB MMix	Mix de Sonde Master NZYSupreme qPCR (2x)	1050 µL	1	Neutre
SGB PPMix	Mix d'Amorces & Sonde SGB/ACTB Mix (10x)	205 µL	1	Marron
SGB POS	SGB/ACTB Positive Control	105 µL	1	Rouge
NTC	Contrôle sans matrice	105 µL	1	Neutre

5. Conditions de Stockage, de Stabilité et de Manipulation

le kit de PCR en temps réel pour le *Streptocoque* du Groupe B de NZYTech, IVD, est expédié réfrigéré. Dès réception du kit, tous les composants doivent être immédiatement stockés entre -85°C et -15°C. Lorsqu'ils sont utilisés, les composants du kit doivent être placés rapidement dans le congélateur après utilisation afin de minimiser le temps d'exposition à la température ambiante. De plus :

- Minimiser le nombre de cycles de congélation-décongélation en conservant 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 SGB PPMix doit être conservé à l'abri de la lumière. En particulier, ne pas exposer le SGB MMix à la lumière directe du soleil après l'avoir combiné avec le SGB 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 rejeté en suivant les instructions d'élimination de la **section 8.2**.

6. Matériels et Instrumentation Requis mais Non Fournis

- Instrument pour la PCR en temps réel qui détecte les FAM et HEX/VIC/JOE (à des longueurs d'onde d'émission de 520 et 556 nm, respectivement). Voir dans la section 11 les modèles d'équipements pour lesquels le kit a été validé.
- Équipement et consommables pour l'isolement de l'ADN des échantillons biologiques/cliniques.
- Matériel plastique pour qPCR exempt de RNase/DNase : Tubes PCR, barrettes, bouchons, plaques 96 puits et films adhésifs.
- Pipettes et embouts de filtre (sans RNase/DNase).
- Bloc de refroidissement.
- Gants jetables.
- Vortex et centrifugeuse.

7. Prélèvement et Préparation des Échantillons

Le kit est conçu pour détecter l'ADN extrait d'écouvillons vaginaux et/ou périanaux. Différents facteurs, tels que la procédure de collecte de l'échantillon biologique, le transport, le stockage et le temps de traitement de l'échantillon, sont essentiels pour garantir l'intégrité de l'échantillon et obtenir des résultats optimaux. Les échantillons vaginaux et/ou périanaux doivent être prélevés à l'aide d'un écouvillon unique (ESwab®, Copan). Les échantillons doivent être scellés hermétiquement dans des tubes ou des récipients appropriés, correctement étiquetés, puis rapidement transportés au laboratoire. Les échantillons prélevés doivent être testés dès que possible. Un prélèvement, une manipulation et/ou un transport inappropriés des échantillons peuvent entraîner un résultat erroné. Les acides nucléiques extraits constituent le matériel de départ pour l'essai avec le Kit de PCR en temps réel pour le *Streptocoque* du Groupe B de NZYTech, IVD. NZYTech recommande l'utilisation du kit NZY Mag Viral RNA/DNA Kit d'Isolation, IVD (MD0488, NZYTech) pour l'extraction des acides nucléiques, car ce kit a été validé pour l'extraction d'échantillons cliniques de SGB. 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'élution des acides nucléiques au cours du processus d'extraction. Le kit de NZYTech contient un contrôle interne qui cible l'ADN humain copurifié avec l'ADN bactérien SGB. L'ADN humain est amplifié à l'aide d'un ensemble d'oligonucléotides (amorces et sonde) provenant du gène de la β-actine humaine. 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 de l'échantillon.

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 pour toute procédure d'analyse, les bonnes pratiques de laboratoire sont essentielles. Tout écart par rapport aux bonnes pratiques de laboratoire peut entraîner un échec de l'essai ou des résultats erronés. En raison de la grande sensibilité du kit, il convient de veiller tout particulièrement à ce que les réactifs et les mélanges d'amplification PCR ne soient pas contaminés.

8.1. Informations relatives à la 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). La détection à l'aide de ce kit ne doit être effectuée que par du personnel formé aux procédures techniques et de sécurité, et dans des laboratoires équipés de manière appropriée. Les directives internationales et nationales en matière de biosécurité en laboratoire doivent être respectées en toutes circonstances.

8.2. Exigences en matière de Manutention 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 du test si la fermeture hermétique du kit est endommagée.
- Ne pas interchanger des réactifs de lots de production différents.
- Aucun réactif d'un autre fabricant ne doit être utilisé avec les réactifs de ce kit.
- Il convient d'utiliser des pipettes et du matériel en plastique jetable exempt de DNase/RNase pour toutes les procédures.
- La préparation de l'échantillon, la mise en place de la réaction et l'amplification doivent être effectuées dans des zones de travail différentes. 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 autre zone. Si possible, changez de blouse.
- Choisissez des matériaux et des équipements spécifiques pour chaque zone de travail et ne les transférez pas d'une zone à l'autre.
- Utilisez toujours le NTC (No-template Control) fourni dans le kit.
- Les échantillons biologiques doivent être manipulés comme s'ils étaient infectieux, en respectant les précautions de biosécurité appropriées.
- Le contrôle positif contient des matrices à nombre de copies élevé ; il doit être ouvert et traité à l'écart des échantillons de test et des composants du kit afin d'éviter toute contamination croisée.
- Manipuler les plaques de post-amplification avec précaution et les éliminer immédiatement après la fin du test ; les plaques doivent toujours être jetées dans un conteneur approprié pour les déchets 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, nettoyer les surfaces de travail et l'équipement avec un produit de nettoyage de l'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 régie par les lois et les 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 permet pas d'exclure les maladies causées par d'autres agents pathogènes.
- Un résultat négatif pour un test PCR n'exclut pas de manière concluante la possibilité d'une infection.
- Respectez 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 mangez pas, ne buvez pas et ne fumez pas dans la zone de travail.

9. Procédure de Test

Veuillez lire attentivement le mode d'emploi avant d'effectuer l'essai. Veillez à ce que toutes les étapes de pipetage et de mise en place de la plaque soient effectuées conformément aux bonnes pratiques de qPCR. Une fois la plaque versée, commencer immédiatement le protocole de PCR en temps réel. Une incubation prolongée des mélanges réactionnels à température ambiante peut entraîner des artefacts de PCR qui réduisent la sensibilité de la détection. Avant

l'expérience, commencer par mélanger délicatement, avec le doigt, les tubes de réaction fournis et centrifuger pendant cinq secondes pour recueillir le contenu au fond du tube. Placer les tubes sur de la glace. **Il est fortement recommandé de pipeter le SGB POS en dernier afin d'éviter les contaminations croisées.**

9.1. Configuration de la Réaction

1. Préparer 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 1 et n tests (où n correspond au nombre total de réactions) :

Composant	**1 volume de test (µL)**	***n* tests * volume + 5% (µL)**
SGB MMix **	10	*n* x 10.5
SGB PPMix	2	*n* x 2.1
Final Volume	**12**	***n* x 12.6**

** Pour calculer le nombre total de réactions nécessaires pour chaque essai, compter le nombre d'échantillons et en ajouter deux autres, pour inclure respectivement les contrôles négatif et positif.*
*** Veuillez noter qu'un précipité au fond du tube du master mix peut être observé, en particulier après plusieurs cycles de congélation/décongélation. Pour garantir une performance optimale, veuillez vous assurer que tous les composants sont décongelés et remis en suspension avant leur utilisation. Dans ce cas, ne pas faire tourner le master mix avant de le pipete.*

2. Pipettez 12 µL du mélange qPCR dans des puits individuels conformément à votre configuration de plaque expérimentale de PCR en temps réel.

3. Pour le contrôle négatif, ajoutez 8 µL de NTC à la place 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, conformément à votre configuration de plaque expérimentale. Le volume final dans chaque puits doit être de 20 µL.

5. Pour le contrôle positif, ajouter 8 µL de SGB POS à la place 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 approprié ou des bouchons avant de procéder aux étapes de qPCR et de détection.

7. Placer la plaque de réaction dans l'instrument de PCR en temps réel et exécuter le protocole de PCR en temps réel conformément à la section ci-dessous.

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

Le tableau ci-dessous présente un protocole standard optimisé sur quelques plateformes. Toutefois, ces conditions peuvent être adaptées et validées pour convenir à différents protocoles spécifiques à une machine.

Cycles	Température	Temps	Étape
1	95 °C	3 min	Activation de la polymérase
45	95 °C	5 s	Dénaturation
	60 °C	30 s	Recuit/Extension*

** En fonction de l'instrument qPCR, sélectionner les canaux de détection appropriés. Les données fluorogéniques doivent être collectées au cours de cette étape par les canaux FAM et HEX/VIC/JOE.*

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

Colorants fluorescents et canaux de détection

Cibles	Colorant fluorescent	Canaux de détection
Gène spécifique SGB	FAM™	FAM
Gène Humain β-actin (ACTB)	HEX™	HEX/VIC/JOE
SGB POS	FAM™ & HEX™	FAM & HEX/VIC/JOE

Le Kit de PCR en temps réel pour le Streptocoque du Groupe B de NZYTech, IVD, a été validée pour les systèmes de PCR en temps réel suivants : Applied Biosystems™ QuantStudio 5, Applied Biosystems™ 7500 FAST, Applied Biosystems™ StepOne Plus, instrument Roche Lightcycler® 96, Bio-Rad® CFX Opus Real-Time PCR et Bio-Rad® CFX96 Touch Real-Time PCR. Si d'autres équipements sont utilisés, l'utilisateur doit valider le kit en utilisant des échantillons préalablement caractérisés (positifs et négatifs).

10. Analyse des Données

10.1. Critères de Validation de l'Exécution

Avant d'analyser les résultats, il est recommandé de consulter le manuel d'utilisation du dispositif de PCR en temps réel concerné. Vérifiez ensuite que le test de PCR en temps réel est valide. Ainsi, pour chaque plaque, veuillez confirmer que les résultats des contrôles positifs et négatifs sont conformes aux attentes, selon les critères suivants :

- **Contrôle négatif (pas de réaction de la matrice)** : aucune amplification n'est détectée. Il peut y avoir eu une contamination de l'échantillon si le contrôle négatif présente des courbes d'amplification (FAM et HEX/VIC/JOE) de forme sigmoïdale. Répéter le test en suivant les bonnes pratiques de qPCR.
- **Contrôle positif :** les courbes d'amplification de FAM (SGB) et HEX/VIC/JOE (ACTB) sont positives. Le contrôle positif est censé s'amplifier à un Ct < 32, dans les deux canaux FAM et HEX/VIC/JOE. Le fait de ne pas satisfaire à ce critère de contrôle de la qualité indique clairement 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 la performance attendue, 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 du Test

Le Kit de PCR en temps réel pour le *Streptocoque* du Groupe B de NZYTech, IVD, utilise les valeurs limites Ct suivantes pour l'interprétation des résultats :

Ct value	Interprétation des Résultats
Ct ≤38	Detecté (+) → **POSITIVE**
Ct >38	Non Detecté (-) → **NÉGATIVE**

Le SGB est détecté si la courbe d'amplification du FAM présente une forme sigmoïdale avec un Ct≤38, quel que soit le résultat obtenu pour le test ACTB (HEX/VIC/JOE). La présence ou l'absence d'un signal dans le canal HEX/VIC/JOE n'est pas significative pour la validité du test.

Le SGB n'est pas détecté si la courbe FAM ne s'amplifie pas (Ct>38), alors que le test ACTB (HEX/VIC/JOE) affiche une courbe sigmoïdale positive avec Ct≤45.

Le test n'est pas valide si les tests SGB et ACTB sont négatifs. Le test doit être répété avec de l'acide nucléique purifié à nouveau à partir de l'échantillon.

Le tableau suivant résume l'interprétation des principaux résultats (évaluer la forme générale des courbes d'amplification ; **seules les courbes d'amplification sigmoïdales indiquent une véritable amplification** ; + : courbe d'amplification détectée ; - : pas de courbe d'amplification).

SGB (FAM)	ACTB (HEX/VIC/JOE)	Contrôle négatif	Contrôle positif	Interprétation des Résultats
+	+	-	+	**SGB → POSITIVE**
+	- [1]	-	+	**SGB → POSITIVE**
-	+	-	+	**SGB → NEGATIVE**
-	-	-	+	**TEST INVALIDE** [2]

[1] *Une concentration/charge élevée d'ADN SGB détectable dans l'échantillon peut conduire à un signal de contrôle interne réduit ou absent sur le canal HEX/VIC/JOE*
[2] *Répéter l'extraction de l'ADN et effectuer à nouveau le test qPCR.*

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

• Les résultats faussement négatifs peuvent être causés par :

- Collecte, manipulation et/ou stockage inappropriés des échantillons.
- Dégradation de l'échantillon.
- Présence d'inhibiteurs de la qPCR.
- Mutations dans le génome de l'organisme pathogène.
- Non-respect des procédures décrites dans le présent manuel.
- Utilisation de kits d'extraction ou de plates-formes de PCR en temps réel non validés.

• Les résultats faussement positifs peuvent être causés par :

- Une contamination croisée avec le contrôle positif en raison d'une manipulation inappropriée.
- Manipulation inappropriée d'échantillons contenant une forte concentration d'ADN de SGB. En raison de la grande sensibilité de la méthode qPCR aux contaminations croisées, des précautions particulières doivent être prises lors de l'isolement de l'ADN.
- Manipulation inappropriée du produit amplifié (plaque post-amplification).

Les résultats négatifs n'excluent pas une infection par le SGB et le résultat du test ne doit pas être utilisé comme seule base pour le traitement ou d'autres décisions relatives à la prise en charge du patient. En outre, ce test ne permet pas d'exclure les maladies causées par d'autres agents pathogènes.

11. Évaluation de Performance

La performance de ce kit a été validée pour l'équipement spécifié à 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

Un tracé d'amplification typique observé pour un échantillon clinique positif au SGB est présenté à la figure 1. Lorsque l'échantillon contient de grandes quantités d'ADN de SGB, la courbe du canal HEX/VIC/JOE, correspondant à la cible β-actine humaine, peut être absente ou présenter une forme atypique.

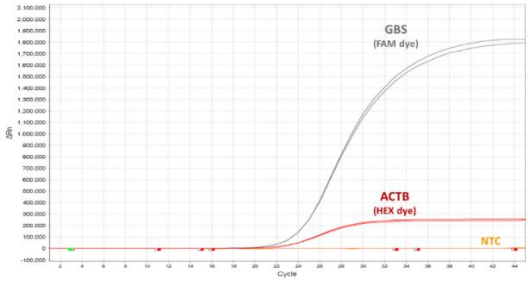

Figure 1. Détection des cibles SGB et β-actine humaine (ACTB) dans un échantillon clinique positif. Courbe grise : détection de la séquence cible SGB par le canal FAM. Courbe rouge : détection de la cible β-actine humaine (ACTB) par le canal HEX/VIC/JOE. Courbe orange : Contrôle sans matrice (NTC).

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 un taux de confiance de 95 %. Elle a été évaluée en testant des acides nucléiques SGB à différents nombres de copies, dopés dans de l'ADN extrait d'échantillons vaginaux/périanaux négatifs, à l'aide de trois lots de kits différents, dans des conditions de réaction typiques. Les tests ont été répétés deux fois par jour pendant deux jours, ce qui a permis d'obtenir 48 réplicats pour chaque concentration testée. L'ensemble des données a révélé que le kit de PCR en temps réel pour le *Streptocoque* du Groupe B de NZYTech détecte 5 copies/réaction ou 0,250 copies/µL d'ADN de *Streptocoque* du Groupe B avec un degré de confiance ≥95 %. Ainsi, la limite de détection provisoire a été fixée à 250 copies/mL pour le SGB. Tous les essais ont été réalisés à l'aide de l'instrument de PCR en temps réel Applied Biosystems™ QuantStudio 5 et l'analyse a été effectuée à l'aide du logiciel de l'instrument.

La LoD du kit a été revalidée par deux opérateurs différents, en utilisant trois lots de kit et la méthode d'isolement des acides nucléiques NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488), lors d'une expérience avec un total de 48 tests, garantissant que la sensibilité analytique du kit était maintenue dans différentes situations de test. La capacité du Kit de PCR en temps réel pour le *Streptocoque* du Groupe B, IVD, à détecter l'agent pathogène à différentes concentrations (de 5 x 10^5 à 5 copies par réaction) est présentée dans la figure 2.

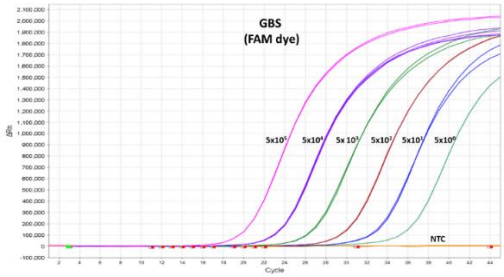

Figure 2. Sensibilité du Kit de PCR en temps réel pour le *Streptocoque* du Groupe B de NZYTech, IVD. Courbe d'amplification (nombre de cycles en fonction de la fluorescence - ΔRn) de dilutions en série 1:10 de l'ADN

du *Streptocoque* du Groupe B, de 5 x 10^5 copies à 5 copies par réaction via le canal FAM. NTC, contrôle sans matrice (contrôle négatif).

11.3. Spécificité Analytique

11.3.1 Réactivité Croisée (exclusivité) et Spécificité

L'exclusivité et la réactivité croisée ont été évaluées *in silico* en analysant toutes les sondes oligonucléotidiques et les amorces incluses dans le kit contre des agents pathogènes liés au SGB et des agents pathogènes normaux qui provoquent une infection avec des symptômes similaires, respectivement. Les amorces et les sondes ont été comparées aux séquences génomiques publiées. L'analyse *in silico* a montré que la conception du test détectait spécifiquement le SGB et ne présentait aucune réactivité avec des espèces non apparentées.

Des tests de réactivité croisée *in vitro* (exclusivité) ont été réalisés pour confirmer que le Kit de PCR en temps réel pour le *Streptocoque* du Groupe B, IVD, ne réagit pas avec d'autres micro-organismes colonisateurs et pathogènes couramment présents dans les échantillons vaginaux/périanaux humains. Cette étude a été réalisée à l'aide d'un panel commercial de pathogènes vaginaux (NATtrol™ Vaginal Panel®, ZeptoMetrix®) et de l'ADN génomique (DSMZ) des micro-organismes sélectionnés. Les tests ont été effectués à l'aide de l'ADN génomique des 29 micro-organismes suivants: *Atopobium vaginae Z242, Bacillus cereus ATCC 14579, Bifidobacterium breve ATCC 15700, BVAB2 recombinant, Candida albicans Z006, Candida glabrata 14/73657, Candida krusei Z009, Candida tropicalis ATCC 13803, Chlamydia trachomatis ATCC VR-902B, Clostridium perfringens VPI No.5, Enterobacter cloacae ATCC 13047, Enterococcus avium R 6566, Enterococcus faecium E980, Escherichia coli K-12, Fusobacterium nucleatum ATCC 25586, Gardnerella vaginalis CCUG 792, Klebsiella oxytoca 1028, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus crispatus Z246, Mesomycoplasma lagogenitalium ATCC 700289, Mycoplasma hominis ZK-CU2, Neisseria gonorrhoeae ATCC 19424, Proteus mirabilis ATCC 12453, Pseudomonas aeruginosa BWKH 8, Staphylococcus aureus BWKH 152, Staphylococcus epidermidis K2-4, Streptococcus pneumoniae ATCC 33400, Streptococcus pyogenes ATCC 12344 et Trichomonas vaginalis* souche Z070. Tous les tests ont été réalisés en trois exemplaires en utilisant trois lots de kits. Aucun des agents pathogènes testés n'a produit de signal qPCR faussement positif. La souche Z019 de *Streptococcus agalactiae* a également été testée et, comme prévu, elle a produit un signal qPCR réellement positif.

11.3.2 Études sur les Interférences Microbiennes

Des études d'interférence microbienne ont été réalisées pour déterminer si le Kit de PCR en temps réel pour le *Streptocoque* du Groupe B de NZYTech réagit avec d'autres pathogènes et/ou micro-organismes susceptibles d'être rencontrés dans les échantillons cliniques, générant ainsi un résultat de test faussement négatif. Les échantillons vaginaux/périanaux négatifs ont été dopés avec des acides nucléiques SGB à 3x la LoD, et avec une forte concentration d'ADN génomique de chaque organisme potentiellement inhibiteur. L'essai a été réalisé en utilisant trois lots de kits et en suivant les conditions de réaction typiques de l'essai. Les résultats ont montré qu'aucune interférence n'a été observée avec les 24 micro-organismes suivants : *Bacillus cereus ATCC 14579, Bifidobacterium breve ATCC 15700, Candida albicans Z006, Candida glabrata 14/73657, Candida tropicalis ATCC 13803, Chlamydia trachomatis ATCC VR-902B, Clostridium*

perfringens VPI No.5, Enterobacter cloacae ATCC 13047, Enterococcus avium R 6566 Enterococcus faecium E980, Escherichia coli K-12, Fusobacterium nucleatum ATCC 25586, Gardnerella vaginalis CCUG 792, Klebsiella oxytoca 1028, Lactobacillus acidophilus, Mesomycoplasma lagogenitalium ATCC 700289, Mycoplasma hominis ZK-CU2, Neisseria gonorrhoeae ATCC 19424, Proteus mirabilis ATCC 12453, Pseudomonas aeruginosa BWKH 8, Staphylococcus aureus BWKH 152, Staphylococcus epidermidis K2-4, Streptococcus pneumoniae ATCC 33400 et *Streptococcus pyogenes ATCC 12344.*

11.3.3 Substances interférentes

La performance du Kit de PCR en temps réel pour le *Streptocoque* du Groupe B de NZYTech a été évaluée avec 25 substances potentiellement interférentes pouvant être présentes dans les échantillons vaginaux/périanaux. Les tests ont été effectués à l'aide d'échantillons vaginaux/périanaux négatifs enrichis d'échantillons positifs au SGB à des doses de 3x la limite de détection et de 30x la limite de détection. Les substances potentiellement interférentes ont été testées à des concentrations représentant les niveaux les plus élevés attendus dans les échantillons vaginaux/périanaux artificiels sur la base de l'analyse de la littérature. Tous les tests ont été réalisés en trois exemplaires en utilisant trois lots de kits et comparés aux données obtenues avec un test de contrôle ne contenant pas d'interférents. Le tableau ci-dessous reprend les données recueillies dans le cadre de ces expériences. Les données ont révélé qu'aucune des substances testées n'interférait avec la sensibilité de la détection du SGB par le Kit de PCR en temps réel pour le *Streptocoque* du Groupe B, IVD.

Interférent Potentiel	Ingrédients Actifs	Concentration finale dans l'échantillon	Interférence Oui (O) ou Non (N)
Antacides (Gaviscon®)	Alginate de sodium (250 mg) + Bicarbonate de sodium (133,5 mg) + Carbonate de calcium (80 mg)	5 mg/mL	N
Médicaments antidiarrhéiques (Imodium®)	Chlorhydrate de lopéramide (2 mg)	10 mg/mL	N
Laxatifs (Bekunis®)	Séné (105 mg) + bisacodyl (5mg)	10 mg/mL	N
Crèmes et pommades anti-hémorroïdes (Scheriproct®)	Prednisolone (1,9mg/g) + Cinchocaïne (5 mg/g)	10% w/v	N
Antacides (Kompensan® Trieffect)	Carbonate de dihydroxyde d'aluminium sodique (340 mg) et diméthicone (30 mg)	5 mg/mL	N
Antimicrobiens (Gino-Canesten®)	Clotrimazole (10 mg/g)	10% w/v	N
Médicament antidiarrhéique (UL-250®)	Saccharomyces boulardii (250 mg)	10 mg/mL	N
Laxatifs (Microlax®)	citrate de sodium dihydraté (450 mg) + lauryl sulfoacetate de sodium (45 mg)	5% v/v	N
Antimicrobiens (Lomexin®)	Nitrate de fenticonazole	10% w/v	N
Médicament (Progeffik®)	Progestérone	5 mg/mL	N
Antifongique	Flucytosine	5 mg/mL	N
Antifongique	Amphotéricine B (20 µg/mL)	10% v/v	N
Fluide séminal	-	5% v/v	N*
Sang total	Glucose, hormones, enzymes, ions, fer, etc	10% v/v	N
Urine	-	10% v/v	N
Selles	-	1% w/v	N*
Produits de lavage	Graisse saponifiée + silicates	10 mg/mL	N
Produits Topiques (Lauroderme®)	Oxyde de zinc (23mg/g) + Acide salicylique (2mg/g)	10 mg/mL	N
Produits Topiques (Pommade Bepanthene®)	Dexpanténol (50 mg/g)	10% w/v	N
Produits Topiques (Halibut®)	Oxyde de zinc (150mg/g)	10% w/v	N
Produits Topiques (Gel Vaginal ClimaCare®)	Acide hyaluronique + acide lactique	10% v/v	N
Produits Topiques (Hydratante Vaginal WOMAN ISDIN®)	Glycérine (11%), polyacrylate de glycéryle, acide polyacrylique	10% v/v	N
Produits de nettoyage (BETADINE® Vaginal)	Povidone iodée	10% v/v	N*
Produits de nettoyage	Acide lactique	10% v/v	N
Éthanol absolu	Alcool	5% v/v	N

* Des concentrations plus élevées de cet interférent peuvent réduire la sensibilité du kit ou conduire à des résultats faussement négatifs.

11.4 Précision

La précision de l'essai pour le Kit de PCR en temps réel pour le *Streptocoque* du Groupe B de NZYTech, IVD, a été déterminée par l'essai répété d'échantillons positifs représentant deux niveaux de charge bactérienne, 3x LoD et 30x LoD copies par réaction, dopés dans l'ADN extrait d'échantillons vaginaux/périanaux négatifs, en utilisant 3 lots de kit différents et en suivant les conditions de réaction d'essai typiques. La précision a été évaluée en mesurant le Cq moyen, le Cq coefficient de variation et le % de détection répétée, comme décrit ci-dessous pour chaque cas. Les données sont reprises dans le tableau ci-dessous.

Précision du Kit de PCR en temps réel pour le *Streptocoque* du Groupe B de NZYTech, IVD

Variable		SGB (Copies/Réaction)	
		3x LoD	30x LoD
Répétabilité	n	12	12
	Cq moyen	35,23	31,26
	Coefficient de Variation (%)	2,01	0,95
	% Détection de Réplication	100	100
Reproductibilité journalière	n	48	48
	Cq moyen	34,85	31,25
	Coefficient de Variation (%)	2,40	1,10
	% Détection de Réplication	100	100
Reproductibilité lot à lot	n	72	72
	Cq moyen	35,03	31,45
	Coefficient de Variation (%)	2,42	1,34
	% Détection de Réplication	100	100
Reproductibilité par l'opérateur	n	36	36
	Cq moyen	35,35	31,64
	Coefficient de Variation (%)	2,09	1,25
	% Détection de Réplication	100	100
Reproductibilité Inter-instrument	n	60	60
	Cq moyen	35,20	31,69
	Coefficient de Variation (%)	2,18	1,02
	% Détection de Réplication	100	100

11.4.1. Répétitivité

La répétabilité a été évaluée par un opérateur en analysant 12 répliques de chaque échantillon (3x LoD et 30x LoD copies par réaction), ce qui représente un nombre final de 24 tests effectués par cible.

11.4.2. Reproductibilité quotidienne

La reproductibilité quotidienne a été évaluée par un opérateur en analysant 48 réplicats de chaque échantillon (3x LoD et 30x LoD copies par réaction), pendant 4 jours, avec 12 réplicats de chaque concentration par jour (un total de 96 essais a été réalisé).

11.4.3. Reproductibilité d'un lot à l'autre

La reproductibilité entre les lots a été évaluée par un opérateur grâce à l'analyse de 72 réplicats de chaque échantillon (3x LoD et 30x LoD copies par réaction) en utilisant 3 lots de kits différents avec 24 réplicats par lot.

11.4.4. Reproductibilité de l'opérateur

La reproductibilité des opérateurs a été évaluée en testant 36 réplicats de chaque échantillon (3x LoD et 30x LoD copies par réaction), par trois opérateurs différents avec 12 réplicats par opérateur.

11.4.5. Reproductibilité inter-instruments

La reproductibilité inter-instruments a été mesurée par un opérateur en testant 12 réplicats de chaque échantillon (3x LoD et 30x LoD copies par réaction), dans six instruments qPCR différents :

Fabricant du Matériel du de PCR en temps réel	Modèle de Plateforme de PCR en temps réel
Biosystem® Appliqué	7500 Fast
	StepOne Plus
	QuantStudio™ 5
Roche®	LightCycler 96™ instrument
Bio-Rad®	CFX Opus 96 Real-Time PCR
	CFX96 Touch Real-Time PCR

11.5 Évaluation Clinique

La performance clinique du Kit de PCR en temps réel pour le *Streptocoque* du Groupe B de NZYTech a été évaluée à l'aide de 186 échantillons d'écouvillons vaginaux et/ou périanaux prélevés sur des femmes enceintes et préalablement caractérisés par une culture microbiologique de routine. Les données ont révélé que 93,1 % de la sensibilité clinique (PPA) et 97,0 % de la spécificité clinique (NPA) ont été atteints pour tous les échantillons positifs et négatifs testés, respectivement.

		Essai de comparaison - Culture microbiologique		
		SGB Positive	**SGB Négative**	**Total**
Kit de PCR en temps réel pour le *Streptocoque* du Groupe B, IVD	**SGB Positive**	81	3*	84
	SGB Négative	6	96	102
	Total	87	99	186

PPA (Concordance positive en pourcentage) : 93,1 % *Streptocoque* du Groupe B
NPA (Concordance négative en pourcentage) : 97,0 % pour le *Streptocoque* du Groupe B

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

De plus, une comparaison des performances cliniques du Kit de PCR en temps réel pour le *Streptocoque* du Groupe B de NZYTech, IVD, et d'un autre test de PCR en temps réel a également été effectuée. Les données ont révélé que 98,8 % de la sensibilité clinique (PPA) et 98,1 % de la spécificité clinique (NPA) ont été atteints pour tous les échantillons positifs et négatifs testés, respectivement. Dans l'ensemble, les résultats montrent une sensibilité et une spécificité élevées pour la détection du SGB à l'aide du Kit de PCR en temps réel pour le *Streptocoque* du Groupe B de NZYTech, IVD.

		Essai de comparaison – PCR en temps réel		
		SGB Positive	**SGB Négative**	**Total**
Kit de PCR en temps réel pour le *Streptocoque* du Groupe B, IVD	**SGB Positive**	82	2	84
	SGB Négative	1	101	102
	Total	83	103	186

PPA (Concordance positive en pourcentage) : 98,8 % *Streptocoque* du Groupe B
NPA (Concordance négative en pourcentage) : 98,1 % pour le *Streptocoque* du Groupe B

12. Contrôle de Qualité

Tous les composants du Kit de PCR en temps réel pour le *Streptocoque* du Groupe B de NZYTech, IVD, sont testés conformément aux protocoles décrits ci-dessus. Le système qPCR duplex permet la détection des cibles décrites pour l'identification de l'ADN du *Streptocoque* du Groupe B ainsi que de l'ADN ACTB humain. Des amplifications positives sont observées pour les gènes cibles, les contrôles positifs et internes par les FAM et HEX/VIC/JOE, selon les colorants rapporteurs respectifs des amorces/ensembles de sondes.

13. Support Technique

Pour obtenir une assistance technique, veuillez contacter notre équipe d'assistance technique au téléphone : +351 (0) 21 364 35 14 ou par courriel : info@nzytech.com.

14. Marques Déposées et Clauses de Non-Responsabilité

Toutes les marques commerciales apparaissant dans ce manuel sont la propriété de leurs respectifs détenteurs.

15. Explication des Symboles

IVD	Dispositif médical de diagnostic *in vitro*		Consulter le mode d'emploi
REF	Numéro de catalogue		Fabricant
LOT	Code de lot		Utilisation par
	Limitation de température		Suffisant pour
CONTROL +	Contrôle positif		Maintenir à l'abri de la lumière du soleil (mélange primaire/sonde)
CONTROL –	Contrôle négatif		

16. Déclaration de Conformité

Nom du Produit : Kit de PCR en temps réel pour le *Streptocoque* du Groupe B, IVD

Numéro de Catalogue : MD04941

Utilisation prévue : Détection qualitative de *Streptococcus agalactia*e

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 par la présente que ce produit, auquel se rapporte cette déclaration de conformité, est conforme aux normes et autres documents normatifs suivants ISO 9001:2015, conformément aux dispositions de la directive 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*, telle que transposée 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, PhD

Directeur Technique

17. Références

Florindo C, Ferreira R, Borges V, Spellerberg B, Gomes JP, Borrego MJ. Selection of reference genes for real-time expression studies in Streptococcus agalactiae. J Microbiol Methods. 2012 Sep;90(3):220-7. doi: 10.1016/j.mimet.2012.05.011. Epub 2012 May 23. PMID: 22634000.

CDC. +() Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease, Revised Guidelines. Morbidity and Mortality Weekly Report, Vol.59.

ACOG, A.C. (2011). Prevention of Early-Onset Group B Streptococcal Disease in Newborns. Committee Opinion, 1

Paolucci M, Landini MP, Sambri V. How can the microbiologist help in diagnosing neonatal sepsis?. Int J Pediatr. 2012;2012:120139. doi:10.1155/2012/120139

Alfa MJ, Sepehri S, De Gagne P, Helawa M, Sandhu G, Harding GK. Real-time PCR assay provides reliable assessment of intrapartum carriage of group B Streptococcus. J Clin Microbiol. 2010;48(9):3095-3099. doi:10.1128/JCM.00594-10

Steer PJ, Russell AB, Kochhar S, Cox P, Plumb J, Gopal Rao G. Group B streptococcal disease in the mother and newborn-A review. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2020 Sep;252:526-533. doi: 10.1016/j.ejogrb.2020.06.024. Epub 2020 Jun 15. PMID: 32586597; PMCID: PMC7295463.

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