

# STI CNM Real Time PCR Kit

Kit pour la détection de *Chlamydia trachomatis*, de  
*Neisseria gonorrhoeae* et de *Mycoplasma genitalium* par  
PCR en temps réel

**REF** Ref. MAD-003948M-W

 100 déterminations

**Pour le diagnostic in vitro uniquement\*.**  
Directive 98/79/CE

*\*L'organisme notifié 0318 n'intervient que dans l'évaluation de la conformité du test pour Chlamydia trachomatis dans l'urine et le sperme ; les écouillons urétraux, endocervicaux et anaux. Les autres pathogènes ont le marquage CE auto-certié.*



## TABLE DES MATIÈRES

<b>1</b>	<b>UTILISATION PRÉVUE</b> .....	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>PRINCIPE DE LA MÉTHODE</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>COMPOSANTS</b> .....	<b>4</b>
<b>4</b>	<b>MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE REQUIS NON FOURNI</b> .....	<b>4</b>
4.1	Réactifs et matériaux .....	4
4.2	Équipement .....	5
<b>5</b>	<b>CONDITIONS DE STOCKAGE ET DE STABILITÉ</b> .....	<b>5</b>
<b>6</b>	<b>AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS</b> .....	<b>5</b>
<b>7</b>	<b>PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON CLINIQUE POUR L'ANALYSE</b> .....	<b>7</b>
7.1	Collecte d'échantillons .....	7
<b>8</b>	<b>PROTOCOLE PCR</b> .....	<b>8</b>
8.1	Préparation du mélange réactionnel .....	8
8.2	Configuration de l'instrument pour la PCR en temps réel .....	9
<b>9</b>	<b>INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS</b> .....	<b>10</b>
<b>10</b>	<b>CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE</b> .....	<b>12</b>
10.1	Sensibilité analytique .....	12
10.2	Spécificité analytique .....	13
10.3	Répétabilité .....	14
10.4	Reproductibilité .....	15
10.5	Plage de mesure .....	15
10.6	Sensibilité et spécificité cliniques.....	16
<b>11</b>	<b>LIMITES DU TEST</b> .....	<b>17</b>
<b>12</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>18</b>
<b>13</b>	<b>SYMBOLES D'ÉTIQUETTE ET D'EMBALLAGE</b> .....	<b>18</b>
<b>14</b>	<b>SUIVI DES MODIFICATIONS</b> .....	<b>19</b>



## 1 UTILISATION PRÉVUE

**STI CNM Real Time PCR Kit** est un kit de diagnostic *in vitro* pour la détection qualitative de l'ADN des organismes pathogènes responsables des maladies sexuellement transmissibles (MST) chez l'homme, tels que *Chlamydia trachomatis*\*<sup>1</sup>, *Neisseria gonorrhoeae* et *Mycoplasma genitalium*, à partir de l'ADN extrait d'échantillons cliniques humains de différentes origines, tels que l'urine et le sperme, les écouvillons urétraux, endocervicaux, anaux et pharyngés. Elle est basée sur la technique de PCR multiplexe en temps réel, utilisant des amorces et des sondes fluorescentes pour les gènes cibles des plasmides cryptiques, Opal et MgPa de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Mycoplasma genitalium*, respectivement.

\*<sup>1</sup>L'organisme notifié 0318 intervient uniquement dans l'évaluation de la conformité du test pour *Chlamydia trachomatis*. Les autres pathogènes ont le marquage CE auto-certifié.

Des amorces spécifiques et une sonde fluorescente sont également incluses pour la détection simultanée du gène RNaseP humain comme contrôle de qualité interne du matériel de départ et d'amplification. Les canaux de détection des différentes cibles sont :

Cible	Fluorophore
<i>Chlamydia trachomatis</i>	ROX
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	FAM
<i>Mycoplasma genitalium</i>	JOE
RNaseP	Cy5

Tableau 1. Canaux de détection pour les différentes cibles du STI CNM Real Time PCR Kit.

Ce test doit être réalisé au niveau hospitalier dans les laboratoires de microbiologie clinique sur les patients qui présentent des symptômes compatibles avec une infection sexuellement transmissible. L'utilisation finale prévue est l'aide au diagnostic des maladies sexuellement transmissibles en combinaison avec le risque clinique et les facteurs épidémiologiques.

Statut microbiologique : Produit non stérile.

## 2 PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le **STI CNM Real Time PCR Kit** est un test multiplex basé sur la réaction en chaîne par polymérase en temps réel. Le Master Mix ou mélange réactionnel contient trois séries d'amorces et de sondes pour la détection de l'ADN bactérien de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Mycoplasma genitalium*. Il comprend également des amorces et des sondes pour la détection du gène humain de la RNaseP dans des échantillons cliniques ou de contrôle. Les oligonucléotides utilisés comme amorces et sondes ont été sélectionnés dans des régions conservées au cours de l'évolution.

En présence de l'une de ces bactéries dans des échantillons cliniques, l'ADN bactérien est amplifié par réaction en chaîne par polymérase (PCR). La détection des amplicons est basée sur l'utilisation de sondes doublement marquées avec une combinaison rapporteur/désactivateur (reporter)/(quencher) qui permet l'hybridation de la sonde avec les molécules d'ADN en double hélice produites dans chaque cycle d'amplification et l'hydrolyse de la sonde dans les cycles successifs. De cette façon, pendant que la phase d'élongation de la PCR se produit, l'activité nucléasique 5' de l'ADN polymérase dégrade les sondes liées spécifiquement à leurs cibles, provoquant la séparation entre le rapporteur et le désactivateur, et un signal



fluorescent sera généré. Les sondes spécifiques de chaque bactérie génèrent un signal fluorescent à des longueurs d'onde différentes, ce qui permet à l'instrument de PCR en temps réel de différencier les différents signaux. À chaque cycle de dénaturation-élongation, la division de nouvelles molécules de rapporteur se produit, et, par conséquent, l'intensité du signal fluorescent augmente. L'intensité de la fluorescence est contrôlée sur les instruments de PCR en temps réel dans chacun des cycles et les données sont analysées avec un logiciel d'analyse spécifique à chaque plateforme.

La détection de l'ADN bactérien est d'une grande utilité pour le diagnostic et le suivi des infections causées par ces micro-organismes.

### 3 COMPOSANTS

Le **STI CNM Real Time PCR Kit** est commercialisé sous la forme d'un Master Mix (mélange réactionnel) prêt à l'emploi qui comprend tous les réactifs nécessaires à la réalisation de la PCR en temps réel.

En outre, afin d'éviter toute contamination avec les produits de PCR précédents, le Mix contient l'enzyme Uracile-ADN Glycosylase (Cod-UNG), qui dégrade les produits de PCR contenant du dUTP.

Un contrôle positif (PC) et de l'eau traitée par DEPC exempte de DNase/RNase à inclure dans les contrôles négatifs (NTC) sont fournis avec le mélange PCR.

Composants du kit pour 100 tests :

RÉFÉRENCE (DESCRIPTION)		CONTENU	QUANTITÉ
MAD-003948M-100-W (STI CNM MMIX)	MAD-003948-MIX-W (STI CNM MMix)	Hot Start Polymerase (125 U/ml), Uracile ADN glycosylase (50 U/mL), 0.1-0.4 µM d'amorces, 0.05- 0,4 sondes fluorescentes, 2x tampon de réaction, 1 mM dUTP, 1,3 mM dNTPs (A, G, C, T)	2 flacons avec 50 tests/ flacon
	MAD-DDW (RNase/DNase-free water)	---	1 flacon (200 µL)
MAD-STI-CNM (STI CNM PC)		ADN synthétique non infectieux contenant une partie du génome de <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Nisseria gonorrhoeae</i> et <i>Mycoplasma genitalium</i> (12,5 copies/ml) et d'ADN humain (0,625 ng/µl)	1 flacon (100 µL)

Tableau 2. Réactifs et concentrations des substances actives fournies dans le STI CNM Real Time PCR Kit en format humide.

### 4 MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE NÉCESSAIRE NON FOURNI

#### 4.1 Réactifs et matériaux

- Gants jetables.
- Embouts de pipette filtrants sans DNase/RNase.
- Kit d'extraction d'ADN.
- Bandelettes de tubes/plaques/films adhésifs optiques spécifiques pour chaque équipement de PCR en temps réel.

Rev. : 2022-04-18

## 4.2 Équipement

- Armoire à flux laminaire.
- Microcentrifugeuse pour tubes de 1.5ml.
- Microcentrifugeuses de tubes PCR à barrettes ou de plaques à 96 puits.
- Vortex.
- Micropipettes automatiques : P1000, P200, P20 et P2.
- Instrument de PCR en temps réel.

## 5 CONDITIONS DE STOCKAGE ET DE STABILITÉ

Le **STI CNM Real Time PCR Kit** doit être transporté et conservé entre -10 et -30 °C<sup>\*2</sup>. Cependant, le transport à température réfrigérée (2 °C - 8 °C) est également possible à condition que le temps de transit n'excède pas un maximum de 10 jours et que le kit soit stocké à une température comprise entre -10 et -30°C dès réception.

Le STI CNM MMix mélange réactionnel :

- Est sensible aux changements d'état physique et il a été prouvé qu'il supporte jusqu'à sept cycles de congélation/décongélation. Si une série est effectuée avec un faible nombre d'échantillons, il est recommandé d'aliquoter le réactif à l'avance.
- Est stable pendant au moins 8 mois stocké entre -10 et -30 °C.
- Contient des molécules fluorescentes et doit être conservé à l'abri de la lumière directe.

Contrôle positif :

- Est sensible aux changements d'état physique et ne doit pas subir plus de 8 cycles de congélation/décongélation.
- Est stable pendant au moins 18 mois entre -10 et -30 °C.
- Il est conseillé de les manipuler séparément des échantillons cliniques afin d'éviter toute contamination potentielle qui pourrait donner de faux positifs.

S'ils sont stockés à la température recommandée, les réactifs PCR sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette du produit. Les réactifs PCR doivent être stockés dans des endroits exempts de contamination par l'ADN ou les produits de PCR.

<sup>\*2</sup>Un indicateur de température est inclus dans l'emballage pour contrôler les conditions pendant l'expédition. En cas d'interruption de la chaîne du froid, il est recommandé de contacter le fabricant avant d'utiliser les réactifs.

## 6 AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- Lisez le mode d'emploi avant d'utiliser ce produit.
- Le kit doit être manipulé par des techniciens qualifiés pour les techniques de biologie moléculaire appliquées au diagnostic.
- N'utilisez aucun des composants du kit après la date d'expiration.

Rev. : 2022-04-18



- Le STI-CNM MMix doit être décongelé avant utilisation et manipulé sur de la glace ou une plaque froide et à l'abri de la lumière. Mélanger les solutions en inversant les tubes plusieurs fois sans les agiter en vortex, et centrifuger brièvement.
- Le contrôle positif doit être décongelé à température ambiante, bien mélangé et brièvement centrifugé avant utilisation.
- Les précautions de sécurité et d'élimination sont décrites dans la fiche de données de sécurité de ce produit. Ce produit est uniquement destiné à un usage professionnel en laboratoire, et n'est pas destiné à un usage pharmacologique, domestique ou tout autre type d'usage. La version actuelle de la fiche de données de sécurité de ce produit peut être téléchargée sur la page web [www.vitro.bio](http://www.vitro.bio) ou demandée à [regulatory@vitro.bio](mailto:regulatory@vitro.bio).
- Le **STI CNM Real Time PCR Kit** utilise des acides nucléiques préalablement extraits et purifiés comme matériel de départ. Il est de la responsabilité du client d'inclure les contrôles nécessaires pour vérifier que le système d'extraction du matériel génétique utilisé fonctionne correctement.

- **Considérations générales pour éviter la contamination par le produit de PCR**

La source de contamination la plus importante est généralement le même produit de PCR amplifié. Il est donc recommandé d'effectuer l'amplification et la manipulation des produits amplifiés dans une zone différente de celle où l'extraction de l'ADN et la préparation de la PCR sont effectuées. Il est recommandé de travailler dans des zones pré et post-PCR différentes où la manipulation de l'ADN à tester et la préparation des tubes PCR (pré-PCR), et l'amplification et la manipulation des produits amplifiés (post-PCR) sont effectuées. Ces zones doivent être physiquement séparées et du matériel de laboratoire différent doit être utilisé (blouses de laboratoire, pipettes, embouts, etc.) pour éviter la contamination des échantillons par l'ADN amplifié, ce qui pourrait entraîner des diagnostics faussement positifs. Le flux de travail doit toujours aller dans une seule direction, de la zone pré-PCR à la zone post-PCR et jamais dans le sens inverse. Le flux de matériel et de personnel de la zone post-PCR vers la zone pré-PCR doit être évité. En outre, afin d'éviter la contamination avec les produits de PCR précédents, l'enzyme *Uracile-ADN Glycosylase (Cod-UNG)*, qui dégrade les produits de PCR contenant du dUTP, est incluse dans le kit.

**Il est recommandé d'inclure des contrôles d'amplification négatifs** remplaçant l'échantillon d'ADN par de l'eau exempte de RNase/DNase afin de détecter et de contrôler toute contamination éventuelle des réactifs par des échantillons de test ou des produits amplifiés.

- **L'élimination des déchets**

La manipulation des déchets générés par l'utilisation des produits commercialisés par Vitro S.A. doit être effectuée conformément à la loi applicable dans le pays dans lequel ces produits sont utilisés. À titre de référence, le tableau suivant indique la classification des déchets générés par ce kit selon la loi européenne, plus précisément selon la décision de la Commission européenne du 18 décembre 2014 modifiant la décision 2000/532/CE relative à la liste des déchets conformément à la directive 2008/98/CE du Parlement européen et du Conseil :

DÉCHETS POTENTIELS GÉNÉRÉS PAR L'UTILISATION DE CE PRODUIT	CODE ELW* <sup>3</sup>	TYPE DE DÉCHETS SELON L'ELW* <sup>3</sup>
1. Élimination des déchets liquides	161001	"Déchets liquides aqueux contenant des substances dangereuses" après ajout de 10% du volume total d'un agent désinfectant. Si la désinfection n'est pas effectuée, ces déchets doivent être considérés comme des "déchets dont le stockage et l'élimination sont soumis à des exigences particulières afin de prévenir les infections".
2. Matériel périssable (tubes, embouts, etc.) 3. Tout élément qui a été en contact avec le matériel génétique de départ.	180103	"Déchets dont la collecte et l'élimination sont soumises à des exigences particulières afin de prévenir les infections".
4. Récipient pour les réactifs utilisés classés comme dangereux (selon la fiche de données de sécurité)	150110	"Récipients contenant des déchets ou contaminés par des substances dangereuses".

Tableau 3. Classification des déchets générés par ce kit selon la législation européenne. \*<sup>3</sup>ELW : *European Legislation of Waste*

\*<sup>3</sup>Note : Cette classification est incluse comme une directive générale d'action, étant sous la responsabilité finale de l'utilisateur l'accomplissement de toutes les réglementations locales, régionales et nationales sur l'élimination de ce type de matériaux.

## 7 PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON CLINIQUE POUR L'ANALYSE

### 7.1 Collecte d'échantillons

Le **STI CNM Real Time PCR Kit** a été validé pour son utilisation à partir de matériel génétique purifié provenant de différents types d'échantillons cliniques, tels que l'urine, le sperme ; les écouvillons urétraux, endocervicaux, rectaux et pharyngés, et les cytologies endocervicales en milieu liquide.

Les conditions de prélèvement, de manipulation et de préparation des échantillons dépendent du type d'échantillon.

#### 7.1.1. Échantillons cytologiques

Les écouvillons sont réalisés avec un petit écouvillon ou une brosse stérile (cytobrosse). L'écouvillon avec les cellules recueillies doit être placé dans un récipient stérile avec un milieu de transport approprié (par exemple: PBS 1X, solution physiologique/isotonique).

Conserver l'échantillon entre +2 °C et +8 °C et extraire les acides nucléiques dans un délai d'une semaine. Si l'extraction n'est pas possible en une semaine, stockez les échantillons entre -30 °C et -20°C.

Dans le cas où le nombre de cellules dans un échantillon est trop faible, centrifuger à plusieurs reprises avant de commencer l'extraction. Après chaque étape de centrifugation, remettez en suspension dans du PBS stérile. Les cycles de centrifugation/remise en suspension peuvent également être utilisés pour éliminer le mucus, les globules rouges ou d'autres matières.

Rev. : 2022-04-18



### 7.1.2. Sperme

Le liquide séminal est recueilli dans un récipient stérile et peut être conservé entre +2 °C et +8 °C pendant plusieurs heures (au maximum une nuit). Il est également possible de congeler l'échantillon après avoir ajouté un milieu compatible avec la méthode d'extraction de l'ADN.

### 7.1.3. Urine

En général, les échantillons d'urine prélevés tôt le matin sont utilisés pour la détection de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Mycoplasma genitalium*. Lors de la collecte de l'échantillon, la première partie de l'urine doit être jetée et seule la deuxième partie doit être recueillie. Utilisez un récipient stérilisé.

Si les échantillons cliniques ne doivent pas être traités immédiatement après leur réception, il est recommandé de les conserver à +4°C pendant une période maximale d'une semaine.

Ce kit a été validé avec du matériel génétique de départ obtenu à partir des kits de purification et d'extraction d'ADN/ARN suivants\*<sup>4</sup> à partir de **200 µl** d'échantillon clinique et en éluant dans **100 µl** de tampon d'éluion (pour la purification avec **Opentrons**, commencez avec **92 µl** d'échantillon clinique et éluez dans **60 µl** de solution d'éluion) :

KITS D'EXTRACTION	ÉQUIPEMENT D'EXTRACTION
MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche Diagnostic's)	Instrument MagNA Pure Compact. Version 1.1.2 (Roche Diagnostic's)
Maxwell® 16 FFPE Tissue LEV ADN Purification Kit (Promega)	Maxwell® 16 (Promega)
NX48S - Urine/Swab DNA Kit (Genolution)	Nextractor NX-48S (Genolution)
RNA/DNA pathogen kit (Robot Opentrons) (Vitro, réf. MAD-003955M)	Opentrons OT-2

Tableau 4. Kits d'extraction et instruments utilisés pour la purification de l'ADN/ARN à partir d'échantillons cliniques.

\*<sup>4</sup>Note : Le système n'a pas été validé avec d'autres systèmes d'extraction d'ADN/ARN. Par conséquent, si un autre système de purification est utilisé, cela doit être vérifié au préalable.

## 8 PROTOCOLE PCR

### 8.1 Préparation du mélange réactionnel

La réaction PCR en temps réel est réalisée dans un volume final de **20 µl**. Préparer le Master Mix comme indiqué ci-dessous :

1. Décongeler et homogénéiser le STI CNM MMix (ne pas utiliser de vortex). Une fois qu'il est décongelé, centrifuger brièvement.
2. Mélangez dans chaque tube PCR les volumes suivants pour chaque échantillon :

Réactif	V/test
STI CNM MMix	12 µl
Echantillon	8 µl

- Inclure un contrôle négatif en ajoutant **8 µl** de l'eau incluse dans le kit.
- Inclure un contrôle positif en ajoutant **8 µl** du contrôle positif d'ADN : **STI CNM PC** inclus dans le kit.
- Centrifuger brièvement pour s'assurer qu'il n'y a pas de bulles d'air dans les puits.

**Il est recommandé de conserver le MMix sur une plaque froide pendant la préparation des échantillons et de ne pas décongeler le flacon plus de cinq fois.**

## 8.2 Configuration de l'instrument pour la PCR en temps réel

Dans le logiciel de l'instrument, entrez les différentes cibles et les canaux de détection pour chacune d'entre elles. Créez les échantillons, le contrôle positif (PC), les cibles PCR (NTC) et attribuez les positions des échantillons dans la plaque PCR.

Réglez l'instrument de PCR en temps réel en suivant les étapes ci-dessous :

PROGRAMME PCR		
25°C	5 min	1 cycle
95°C	5 min	1 cycle
95°C	15 secondes	45 cycles
56°C* <sup>5</sup>	40 secondes	

Tableau 5. Programme PCR du STI CNM Real Time PCR Kit.

\*<sup>5</sup>Les données de fluorescence doivent être recueillies pendant la phase d'extension (\*<sup>5</sup>) au moyen des canaux FAM (NG), ROX (CT), HEX, JOE ou VIC (MG) et Cy5 (Interne Control ou contrôle interne).

Ce kit a été validé avec les plateformes :

- **QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System** (Applied Biosystems)
- **CFX96™ Real-Time PCR Detection System** (Bio-Rad)
- **VitroCycler** (Vitro S.A.)

Pour son utilisation dans d'autres plateformes, il est recommandé de vérifier la compatibilité des fluorochromes avec les canaux de détection de chaque instrument. Bien que les fluorochromes inclus dans le kit soient compatibles avec la majorité des instruments en temps réel les plus utilisés disponibles sur le marché. Dans les thermocycleurs Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System, l'option de contrôle passif ROX doit être désactivée.

Dans les thermocycleurs Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System et Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, sélectionnez Ramp Speed Standard dans le menu "Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties".

## 9 L'INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Avant d'interpréter les résultats des échantillons cliniques, il est nécessaire de suivre le guide d'interprétation des contrôles positifs et négatifs comme dans le tableau ci-dessous :

	RÉSULTAT	INTERPRÉTATION
<b>Contrôle positif STI CNM :</b>	Signal pour les canaux FAM, ROX, Cy5 et JOE* <sup>6</sup> .	Le contrôle/la réaction est correct(e)
	Aucun signal pour FAM et/ou ROX et/ou Cy5 et/ou JOE	Problème dans l'amplification : analyse répétée
<b>Contrôle négatif :</b>	Signal pour les canaux FAM et/ou ROX et/ou Cy5 et/ou JOE	Contamination, répétition de l'analyse
	Pas de signal	Le contrôle/la réaction est correct(e)

\*<sup>6</sup>Le signal d'amplification doit être déterminé par une augmentation rapide et régulière des valeurs de fluorescence et non par des phénomènes de pic ou une augmentation progressive du signal de fond (fond irrégulier ou augmentation du bruit de fond) (Fig 1).

L'essai est considéré comme valide lorsque des résultats adéquats ont été obtenus pour tous les contrôles de réaction et que les valeurs de Cts obtenues dans le contrôle positif pour les différentes cibles se situent dans la fourchette des valeurs attendues, à savoir celles-ci :

- 24±2 pour NG (FAM)
- 21±2 pour le CT (ROX)
- 23±2 pour MG (JOE)
- 26±2 pour RNaseP (Cy5)

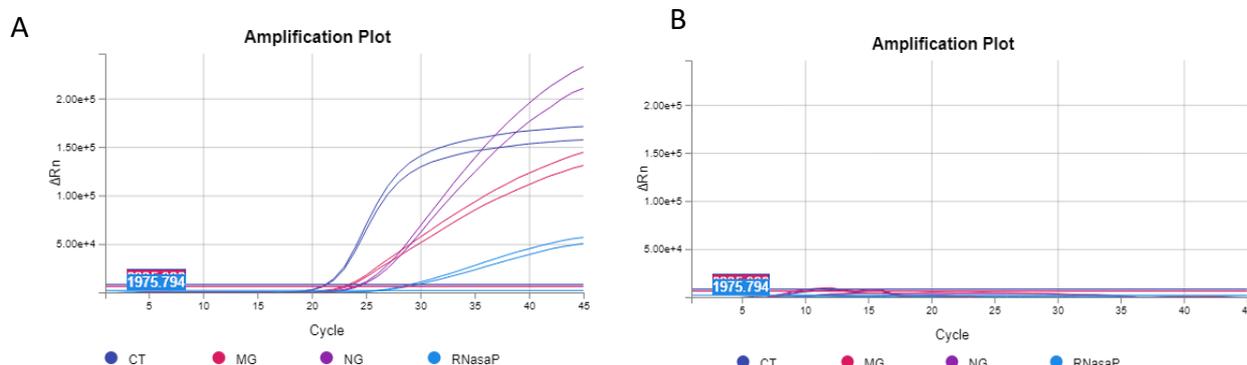


Figure 1 : Graphiques d'amplification du contrôle positif PC (A) et d'un contrôle négatif avec de l'eau NTC (B). (Valeurs attendues de Cts pour PC : NG (FAM) 24±2 ; CT (ROX) 21±2 ; MG (JOE) 23±2, RNaseP (Cy5) 26±2. Expérience réalisée sur l'Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System.

Si la série a été validée, interprétez les résultats des échantillons cliniques selon le tableau suivant :

STI CNM Real Time PCR Kit				INTERPRÉTATION
NG (FAM)	CT (ROX)	MG (JOE)	RNaseP (Cy5)	
Signal	Pas de signal	Pas de signal	Signal	Echantillon positif pour <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
			Pas de signal	
Pas de signal	Signal	Pas de signal	Signal	Echantillon positif pour <i>Chlamydia trachomatis</i>
			Pas de signal	
Pas de signal	Pas de signal	Signal	Signal	Echantillon positif pour <i>Mycoplasma genitalium</i>
			Pas de signal	
Pas de signal	Signal	Signal	Signal	Échantillon positif pour <i>Chlamydia trachomatis</i> et <i>Mycoplasma genitalium</i>
			Pas de signal	
Signal	Signal	Pas de signal	Signal	Echantillon positif pour <i>Neisseria gonorrhoeae</i> et <i>Chlamydia trachomatis</i>
			Pas de signal	
Signal	Pas de signal	Signal	Signal	Echantillon positif pour <i>Neisseria gonorrhoeae</i> et <i>Mycoplasma genitalium</i>
			Pas de signal	
Signal	Signal	Signal	Signal	Echantillon positif pour <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> et <i>Mycoplasma genitalium</i>
			Pas de signal	
Pas de signal	Pas de signal	Pas de signal	Signal	Résultat négatif <sup>(1)</sup>
			Pas de signal	Invalide <sup>(2)</sup> : Problèmes dans l'extraction ou l'amplification

- (1) Négatif ou inférieur à la limite de détection du kit.
- (2) Il est recommandé de répéter la PCR à partir d'une nouvelle extraction d'ADN.

Il est recommandé d'utiliser le réglage automatique du seuil effectué par le logiciel par défaut de chaque instrument. Si nécessaire, le seuil peut être réglé manuellement en veillant à ce qu'il se situe dans la phase exponentielle de la courbe de fluorescence et que le bruit de fond soit inférieur à la ligne de seuil.

Un échantillon est positif si la valeur Ct obtenue est  $\leq 38$ , bien que le contrôle interne ne présente pas de graphique d'amplification. Parfois, il peut arriver que le contrôle interne ne soit pas amplifié correctement en raison de la présence d'un nombre initial élevé de copies de l'acide nucléique bactérien cible, ce qui peut entraîner une amplification préférentielle de ce dernier.

Un échantillon est négatif si une courbe d'amplification n'est pas détectée au-dessus de la valeur seuil, et si le contrôle interne la montre. L'inhibition de la réaction PCR peut être exclue par l'amplification du contrôle interne.

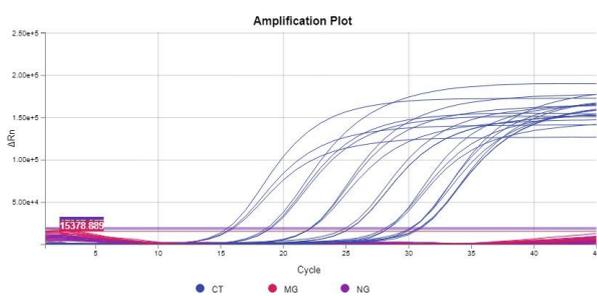
## 10 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

### 10.1 Sensibilité analytique

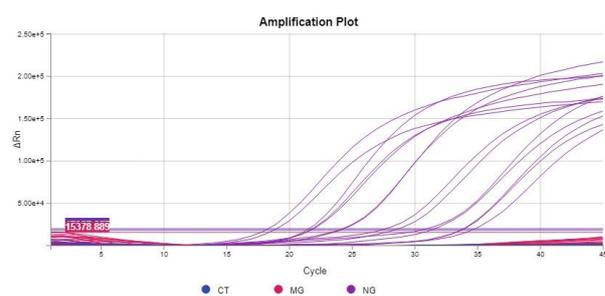
La sensibilité analytique du **STI CNM Real Time PCR Kit** a été déterminée en effectuant trois répétitions de dilutions en série de fragments synthétiques de chacune des cibles de  $10^7$  copies/rxn à  $10^1$  copies/rxn.

Il a été établi que le **STI CNM Real Time-PCR Kit** a une limite de détection de 10 copies/réaction pour *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Mycoplasma genitalium* (Figure 2).

A



B



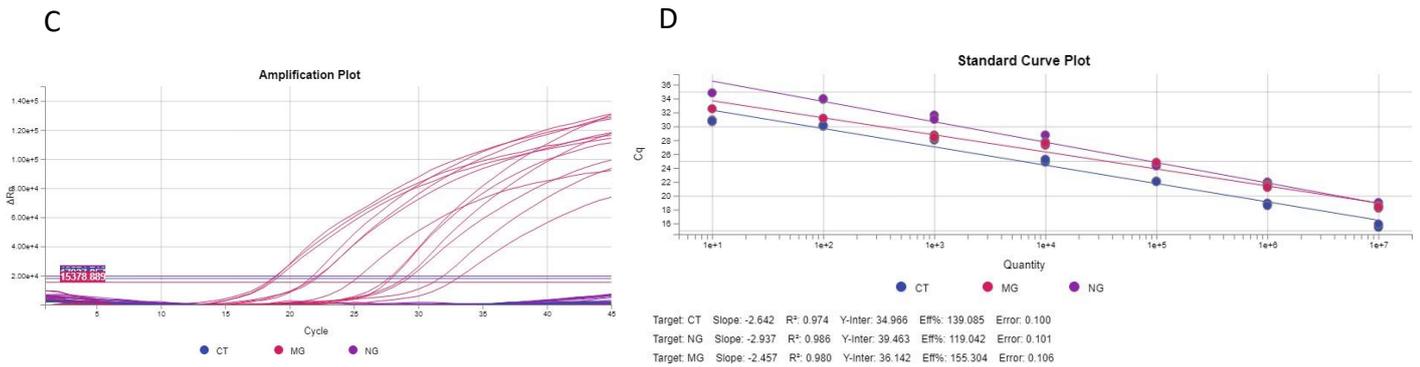


Figure 2 : Dilutions en série de 10<sup>7</sup> copies/réaction jusqu'à 10<sup>1</sup> copies/réaction de fragments synthétiques de *Chlamydia trachomatis* dans le canal ROX (A), de *Neisseria gonorrhoeae* dans le canal FAM (B) et de *Mycoplasma genitalium* dans le canal JOE (C). Lignes de calibration obtenues pour les trois cibles (D). Expérience réalisée sur l'Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System.

L'efficacité d'amplification pour chacune des cibles a été évaluée avec trois dilutions en série d'un standard de STI de 10<sup>7</sup> copies/rxn à 10<sup>1</sup> copies/rxn. En ajustant les données Cts à une ligne, l'efficacité d'amplification, R<sup>2</sup> et la pente ont été déterminés pour chacun des gènes.

Le plasmide cryptique de *Chlamydia trachomatis* a montré une efficacité de 139,08 %, un R2 de 0,974 et une pente de -2.64. Le gène Opal de *Neisseria gonorrhoeae* a montré une efficacité de 119,04%, un R2 de 0,986 et une pente de -2.93. Le gène MgPa de *Mycoplasma genitalium* a montré une efficacité de 155,30%, un R2 de 0,98 et une pente de -2,457.

## 10.2 Spécificité analytique

La spécificité du test STI CNM a été confirmée en testant des échantillons cliniques positifs pour d'autres agents pathogènes liés aux maladies sexuellement transmissibles qui sont inclus dans le STD Direct DNA Flow Chip Kit. En outre, des tests de spécificité ont également été réalisés contre les génotypes à haut risque et à faible risque du papillomavirus humain et contre d'autres bactéries qui partagent une niche écologique. La liste complète des organismes testés pour la réactivité croisée est présentée dans le tableau suivant.

Test de réactivité croisée	
Micro-organisme	Résultats
HSV-1	Négatif
HSV-2	Négatif
<i>T. pallidum</i>	Négatif
<i>H. ducreyi</i>	Négatif
<i>T. vaginalis</i>	Négatif
<i>M. hominis</i>	Négatif
<i>U. urealyticum</i>	Négatif
<i>Candida albicans</i>	Négatif
<i>Enterobacter cloacae</i>	Négatif
<i>Escherichia coli</i>	Négatif
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Négatif
<i>Proteus mirabilis</i>	Négatif

<i>Staphylococcus aureus</i>	Négatif
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Négatif
<i>Enterococcus faecium</i>	Négatif
<i>Staphylococcus aureus</i>	Négatif
<i>Enterococcus faecalis</i>	Négatif
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Négatif
<i>Staphylococcus epidermis</i>	Négatif
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Négatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif
HR Génotype HPV 16	Négatif
HR Génotype HPV 18	Négatif
HR Génotype HPV 26	Négatif
HR Génotype HPV 31	Négatif
HR Génotype HPV 35	Négatif
HR Génotype HPV 35	Négatif
HR Génotype HPV 51	Négatif
HR Génotype HPV 52	Négatif
HR Génotype HPV 53	Négatif
HR Génotype HPV 56	Négatif
HR Génotype HPV 59	Négatif
HR Génotype HPV 68	Négatif
HR Génotype HPV 73	Négatif
HR Génotype HPV 82	Négatif
LR Génotype HPV 6	Négatif
LR Génotype HPV 11	Négatif
LR Génotype HPV 42	Négatif
LR Génotype HPV 43	Négatif
LR Génotype HPV 54	Négatif
LR Génotype HPV 61	Négatif
LR Génotype HPV 62	Négatif
LR Génotype HPV 81	Négatif
LR Génotype HPV 67	Négatif
LR Génotype HPV 70	Négatif
LR Génotype HPV 71	Négatif
LR Génotype HPV 72	Négatif
LR Génotype HPV 84	Négatif

Aucune réaction croisée n'a été détectée avec l'un des agents pathogènes suivants testés.

### 10.3 Répétabilité

La répétabilité a été analysée en testant la méthode 5 fois pour chacune des cibles incluses dans le panel. Pour ce faire, une concentration connue de fragments d'ADN synthétique mimant chacune des cibles à amplifier a été utilisée. Le test a été réalisé par le même opérateur, dans un seul endroit et en utilisant le même lot de réactifs et la même plateforme. La plateforme utilisée était l'Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System et les résultats ont été analysés avec la version v. 2.4.3. La variabilité entre les tests a été déterminée à partir des valeurs de Cts obtenues à l'aide des répétitions.

Rev. : 2022-04-18



Le coefficient de variation (CV) a été calculé comme l'écart-type divisé par la moyenne des Cts, soit 1,03% pour *Chlamydia trachomatis*, 5,67% pour *Neisseria gonorrhoeae* et 4,31% pour *Mycoplasma genitalium*.

#### 10.4 Reproductibilité

La reproductibilité de la méthode a été analysée en simulant la variabilité inter-laboratoire, en changeant l'opérateur, l'équipement utilisé dans le processus et les lots de mélange réactionnel PCR. Trente-cinq échantillons d'ADN purifié ont été testés à l'aide du système d'extraction Maxwell (Maxwell® 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit), dont 25 étaient positifs pour CT, NG ou MG (présence de 4 coinfections) et 10 échantillons étaient négatifs.

La concordance a été calculée avec un coefficient Kappa de 0,815, une erreur standard de 0,1 et un IC à 95% de 0,6141,016 montrant une très bonne force de concordance pour le **STI CNM Real Time PCR Kit**.

		Laboratoire 1		
		positif	négatif	Total
Laboratoire 2	positif	26	1	27
	négatif	2	10	12
	Total	28	11	39

Tableau 6. Test de reproductibilité pour les cibles incluses dans le panel STI CNM Real Time PCR.

#### 10.5 Plage de mesure

L'intervalle de mesure du test a été déterminé en utilisant des fragments d'ADN synthétiques pour chacune des cibles qui sont incluses dans le STI CNM MMix.

Il a été démontré que le STI CNM Real Time PCR Kit fonctionne correctement en présence de fragments synthétiques de chacune des cibles de  $10^7$  copies/réaction à 10 copies/réaction. (Voir section 10.1 Sensibilité analytique).

Pour déterminer la limite supérieure, des dilutions en série de  $10^9$  copies/réaction à  $10^8$  copies/réaction de fragments synthétiques de chaque cible ont été testées, avec 5 ng d'ADN génomique humain. Trois répliques ont été testées à chaque niveau. Les valeurs de Cts obtenues sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Toutes les PCR ont été réalisées avec le système de PCR en temps réel QuantStudio™ 5 et ont été analysées avec le QuantStudio™ 2.4.3 Design and Analysis Software.

Modèle	Copies/tests	Ct ROX (CT)	Ct FAM (NG)	Ct VIC (MG)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	10 (9)	8.368906	Indéfini	Indéfini
		8.33922	Indéfini	Indéfini
		8.27948	Indéfini	Indéfini
	10 (8)	11.16678	Indéfini	Indéfini
		11.64812	Indéfini	Indéfini
		11.42841	Indéfini	Indéfini
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	10 (9)	Indéfini	8.393139	Indéfini
		Indéfini	8.27919	Indéfini
		Indéfini	8.100005	Indéfini
	10 (8)	Indéfini	11.85441	Indéfini
		Indéfini	11.97664	Indéfini
		Indéfini	11.86866	Indéfini
<i>Mycoplasma genitalium</i>	10 (9)	Indéfini	Indéfini	Indéterminé
		Indéfini	Indéfini	8.69793
		Indéfini	Indéfini	Indéterminé
	10 (8)	Indéfini	Indéfini	10.46096
		Indéfini	Indéfini	10.20658
		Indéfini	Indéfini	11.32994

Il a été établi que le STI CNM Real Time PCR Kit a une plage de mesure de  $10^9$  copies/réaction à 10 copies/réaction pour *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et de  $10^8$  copies/réaction à 10 copies/réaction pour *Mycoplasma genitalium* sans produire de réactions croisées.

## 10.6 Sensibilité et spécificité cliniques

Le **STI CNM Real Time PCR Kit** a été validé à partir d'ADN purifié par l'une des méthodes d'extraction susmentionnées. La capacité de diagnostic du **STI (CT-NG-MG) Real Time PCR Kit** a été évaluée en étudiant sa sensibilité et sa spécificité diagnostiques. Ces deux paramètres sont définis et calculés comme suit :

- La **spécificité diagnostique** est exprimée en pourcentage (fraction numérique multipliée par 100), calculée comme suit :  $100 \times \frac{\text{nombre de valeurs négatives vraies (TN)}}{\text{nombre de valeurs négatives vraies (TN)} + \text{nombre de valeurs faussement positives (FP)}}$ , ou  $100 \times \text{TN} / (\text{TN} + \text{FP})$ .
- La **sensibilité diagnostique** est exprimée en pourcentage (fraction numérique multipliée par 100), calculée comme suit :  $100 \times \frac{\text{nombre de valeurs positives vraies (TP)}}{\text{nombre de valeurs positives vraies (TP)} + \text{nombre de valeurs négatives fausses (FN)}}$ , ou  $100 \times \text{TP} / (\text{TP} + \text{FN})$ .

Un total de 163 échantillons cliniques de différentes origines provenant de différents hôpitaux ont été analysés dans une étude rétrospective : Hospital de La Princesa (Madrid), Hospital Clínico San Cecilio (Grenade), Hospital de Valme (Séville) et Hospital Universitario de Son Espases (Palma). Parmi ces échantillons, 152 étaient positifs et 11 étaient négatifs. L'étude comparative a été réalisée en utilisant le STD Direct DNA Flow Chip kit comme méthode de référence (Vitro. S.A.) avec marquage CE-IVD.

Organisme	TN	FP	TP	FN	Spécificité diagnostique	IC À 95	Sensibilité diagnostique	IC À 95
<i>N. gonorrhoeae</i>	117	0	45	1	100.00%	96.03-100%	97.82%	87.03-99.88%
<i>M. genitalium</i>	140	0	23	0	100.00%	96.67-100%	100%	82.19-100%
<i>C. trachomatis</i>	65	0	97	1	100.00%	93.04-100%	99%	93.63-100%

Tableau 7. Spécificité et sensibilité cliniques du STI CNM Real Time PCR Kit.

Organisme	TN	FP	TP	FN	PPV	IC À 95	NPV	IC À 95
<i>N. gonorrhoeae</i>	117	0	45	1	100.00%	90.2-100%	99.15%	94.67-100%
<i>M. genitalium</i>	140	0	23	0	100.00%	82.19-100%	100%	96.67-100%
<i>C. trachomatis</i>	65	0	97	1	100.00%	95.25-100%	98.5%	90.73-100%

Tableau 8. Valeur prédictive positive et valeur prédictive négative du STI CNM Real Time PCR Kit.

*Note : les résultats des spécifications (sensibilité et spécificité) déclarés correspondent au nombre total d'échantillons testés et la valeur peut varier en fonction du type d'échantillon.*

## 11 LIMITES DU TEST

1. Les résultats du test doivent être évalués par un professionnel de la santé dans le contexte des antécédents médicaux, des symptômes cliniques et des autres tests de diagnostic.
2. Utilisation d'échantillons inadéquats : la méthode a été validée sur la base de matériel génétique purifié à partir de ceux-ci. Les types d'échantillons cliniques qui ont été validés sont : l'urine, le sperme, les cytologies en milieu liquide ; et les écouvillons urétraux, endocervicaux, anaux et pharyngés. L'analyse de tout autre type de spécimen non indiqué peut conduire à des résultats erronés ou non concluants en raison de l'inhibition de la réaction PCR par des agents chimiques inhibiteurs.
3. La bonne exécution du test dépend de la qualité de l'échantillon ; l'acide nucléique doit être correctement extrait des échantillons cliniques. Un prélèvement, un stockage et/ou un transport inappropriés des échantillons peuvent entraîner des faux négatifs.
4. Un faible nombre de copies de la cible, inférieur à la limite de détection, peut être détecté, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
5. Un test positif pour les IST CNM n'exclut pas la possibilité que d'autres agents pathogènes soient présents dans l'échantillon clinique.
6. Un résultat négatif du test n'exclut pas l'existence d'une infection à IST CNM et il ne doit pas être utilisé comme seule méthode de diagnostic pour établir un traitement ou un programme de prise en charge du patient.
7. Un résultat négatif du test doit être analysé dans le contexte de l'historique médical du patient et de l'épidémiologie.

## 12 BIBLIOGRAPHIE

- Detection and Characterization of Human Ureaplasma Species and Serovars by Real-Time PCR. Li Xiao, John I. Glass, Vanya Paralanov, Shibu Yooseph, Gail H. Cassell, Lynn B. Duffy, and Ken B. Waites. Journal of Clinical Microbiology, Aug. 2010, p. 2715–2723 Vol. 48, No. 8.
- Guidelines for the Laboratory Diagnosis of Mycoplasma genitalium Infections in East European Countries. Elena Shipitsyna, Alevtina Savicheva, Evgenij Sokolovskiy, Ronald C. Ballard, Marius Domeika, Magnus Unemo, Jörgen S. Jensen and EE SRH Network. Acta Derm Venereol 2010; 90: 461–467.
- Evolution of Neisseria gonorrhoeae is a continuing challenge for molecular detection of gonorrhoea: false negative gonococcal porA mutants are spreading internationally. Catherine A Ison, Daniel Golparian, Pamela Saunders, Stephanie Chisholm, Magnus Unemo. Sex Transm Infect 2013; 89:197–201. doi: 10.1136/sextrans-2012-050829.
- Analytical Specificity and Sensitivity of the APTIMA Combo 2 and APTIMA GC Assays for Detection of Commensal Neisseria Species and Neisseria gonorrhoeae on the Gen-Probe Panther Instrument Daniel Golparian, Sepehr N. Tabrizi, and Magnus Unemo. Sexually Transmitted Diseases & Volume 40, Number 2, February 2013.
- Recommendations for the Laboratory-Based Detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports / Vol. 63 / No. 2 March 14, 2014.
- The Swedish new variant of Chlamydia trachomatis: genome sequence, morphology, cell tropism and phenotypic characterization. Magnus Unemo, Helena M. B. Seth-Smith, Lesley T. Cutcliffe, Rachel J. Skilton, David Barlow, David Goulding, Kenneth Persson, Simon R. Harris, Anne Kelly, Carina Bjartling, Hans Fredlund, Per Olcén, Nicholas R. Thomson and Ian N. Clarke. Microbiology (2010), 156, 1394–1404.
- Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. World Health Organization 2013. ISBN 978 92 4 150584 0.

## 13 SYMBOLES D'ÉTIQUETTES ET DE BOÎTES

	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>		Date d'expiration
	Référence catalogue		Limite de température
	Numéro de lot		Fabricant
	Se référer au mode d'emploi		Contenu suffisant pour <n>essais
	Fiche de données de sécurité		Tenir à l'écart de la lumière du soleil

## 14 SUIVI DES MODIFICATIONS

Date	Description
2022/04/18	• Création du document.

