




ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185
10149 Torino ITALY
Uffici: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11
E. mail: emd.support@elitechgroup.com
sito WEB: www.elitechgroup.com

NOTICE of CHANGE dated 09/10/2024

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«COLISTIN-R ELITE MGB Kit» Ref. RTS202ING-48

This new revision of the Instruction for Use (IFU) contains the following change:

- *Diagnostic sensitivity: increase of sample size (Rectal Swab mcr-2 spiked samples) by confirming the results already obtained.*

PLEASE NOTE

- *Composition, use and performance of the product remain unchanged.*
- *The product lots reported into the table below are still placed on the market as per IVDD (98/79/EC) until expiration dates, according to Article 110 of IVDR. If you're using these product lots, the related IFU revision, NOT available anymore on the website, can be requested by contacting ELITechGroup staff.*

PRODUCT REF	Lot Number	Expiry date
RTS202ING-48	U1222-035	December 2024
CTR202ING	U0123-014	January 2025



LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT



THE REVIEW OF THIS IFU IS COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT



CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET C'EST COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT



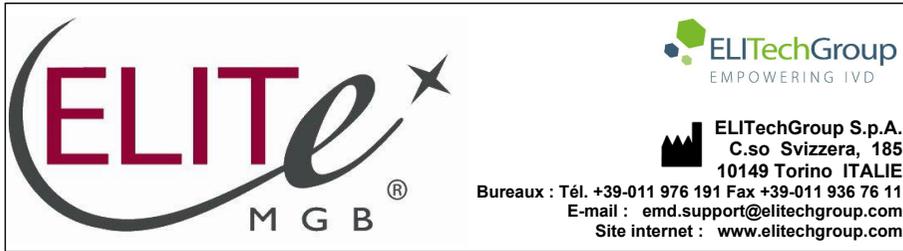
LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT



A REVISÃO DO ESTE IFU É COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT



DIE REVIEW VON DIESER IFU IST KOMPATIBILE MIT DER VORIGE VERSION VON DEM KIT



COLISTIN-R ELITE MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS202ING-48

PRINCIPE DU TEST

Le test consiste en une réaction d'amplification en temps réel multiplexe sur le système **ELITE InGenius®**, un système intégré et automatisé d'extraction, d'amplification et de détection des acides nucléiques, et d'interprétation des résultats.

À partir de l'ADN extrait de chaque échantillon testé, des réactions d'amplification spécifiques pour les gènes de résistance à la colistine suivants sont réalisées dans la cassette de PCR :

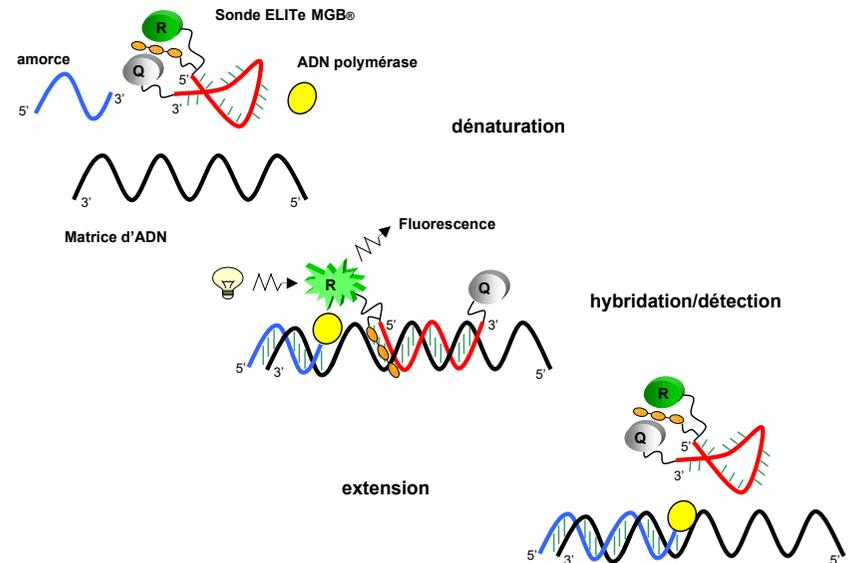
- gène *mcr-1*, détecté par une sonde spécifique dans le canal **mcr1** (Canal 5),
- gène *mcr-2*, détecté par une sonde spécifique dans le canal **mcr2** (Canal 1).

En outre, une réaction d'amplification spécifique pour l'extraction et l'inhibition du contrôle interne exogène reposant sur une séquence artificielle (IC2) est réalisée et détectée par une sonde spécifique dans le canal IC (Canal 2).

Les sondes dotées de la technologie **ELITE MGB®** sont activées lorsqu'elles s'hybrident au produit spécifique de la réaction d'amplification. Lorsque le produit spécifique de la réaction d'amplification augmente, l'émission de fluorescence augmente également et est mesurée et enregistrée par l'instrument. À la fin du cycle d'amplification, les courbes de fluorescence sont analysées pour identifier les cycles seuils (Ct). L'interprétation des résultats permet de détecter la présence des gènes *mcr-1* et *mcr-2* responsables de la résistance transmissible à la colistine dans l'échantillon de départ.

Le test a été validé en association avec l'instrument **ELITE InGenius®**.

Les images suivantes illustrent brièvement le mécanisme d'activation et l'émission de la fluorescence de la sonde dotée de la technologie **ELITE MGB®**. Noter que la sonde n'est pas hydrolysée pendant le cycle d'amplification si bien qu'elle peut être utilisée pour l'analyse de la courbe de dissociation.



COLISTIN-R ELITE MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS202ING-48



UDI 08033891486662

0344

TABLE DES MATIÈRES

APPLICATION	page 1
PRINCIPE DU TEST	page 2
DESCRIPTION DU PRODUIT	page 3
MATÉRIEL FOURNI	page 3
MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI	page 3
AUTRES PRODUITS REQUIS	page 3
AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS	page 4
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	page 5
PROCÉDURE	page 6
CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE	page 12
BIBLIOGRAPHIE	page 16
LIMITES DE LA PROCÉDURE	page 17
PROBLÈMES ET SOLUTIONS	page 18
LÉGENDE DES SYMBOLES	page 20
AVIS AUX UTILISATEURS	page 21
NOTE POUR L'ACQUÉREUR : LICENCE LIMITÉE	page 21
ANNEX	page A

APPLICATION

Le produit **COLISTIN-R ELITE MGB® Kit** est un dispositif médical de diagnostic *in vitro* destiné à être utilisé par les professionnels de santé en tant que test qualitatif d'amplification des acides nucléiques pour la détection et l'identification de l'ADN des gènes *mcr-1* et *mcr-2* responsables de la résistance à la colistine transférable des *Enterobacteriaceae* dans des échantillons cliniques.

Le test est validé en association avec l'instrument **ELITE InGenius®**, un système intégré automatisé pour l'extraction, la PCR en temps réel et l'interprétation des résultats, à partir d'écouvillons rectaux (issus de prélèvements rectaux à l'écouvillon).

Le produit est destiné à être utilisé en tant qu'aide au diagnostic d'infections par des *Enterobacteriaceae* positives pour des gènes de la résistance à la colistine transférable, en association avec les données cliniques et d'autres résultats d'analyse de laboratoire du patient.

DESCRIPTION DU PRODUIT

Le produit **COLISTIN-R ELITE MGB Kit** fournit le **COL PCR Mix**, un mélange complet prêt à l'emploi pour l'amplification en temps réel, aliquoté dans quatre tubes à essai. Chaque tube contient **280 µl** de solution, qui permet d'effectuer **12 tests** dans des conditions optimales de consommation de réactif (au moins 2 tests par session d'analyse) en association avec le système **ELITE InGenius**.

Le COL PCR Mix contient :

- la sonde et les amorces spécifiques au gène **mcr-1**. La sonde **mcr1** est marquée par le fluorophore AP639, stabilisée par le groupe MGB® et désactivée par un fragment non fluorescent. La sonde est détectée dans le canal **mcr-1** (Canal 5) du système **ELITE InGenius** ;
- la sonde et les amorces spécifiques au gène **mcr-2**. La sonde **mcr2** est marquée par le fluorophore FAM, stabilisée par le groupe MGB® et désactivée par un fragment non fluorescent, La sonde est détectée dans le canal **mcr-2** (Canal 1) du système **ELITE InGenius** ;
- la sonde et les amorces spécifiques pour la séquence artificielle **IC2** du contrôle interne exogène. La sonde **IC** est marquée par le fluorophore AP525, stabilisée par le groupe MGB® et désactivée par un fragment non fluorescent. La sonde est détectée dans le canal **IC** (Canal 2) du système **ELITE InGenius**®.

Le mélange COL PCR Mix contient également le tampon, le chlorure de magnésium, les nucléotides triphosphates, les stabilisateurs et l'enzyme Taq ADN polymérase avec activation thermique (Hot start).

Le produit permet d'effectuer **48 tests en association avec le système ELITE InGenius**, en incluant les contrôles.

MATÉRIEL FOURNI

Composant	Description	Quantité	Classification des risques
COL PCR Mix	Mélange réactionnel complet capuchon BLANC	4 x 280 µl	-

MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI

- Hotte à flux laminaire.
- Gants non poudrés en nitrile jetables ou matériel similaire.
- Agitateur de type vortex.
- Microcentrifugeuse de paillasse (12 000 - 14 000 tr/min).
- Micropipettes et cônes stériles avec filtre pour les aérosols ou à déplacement positif (2-20 µl, 5-50 µl, 50-200 µl, 200-1 000 µl).
- Eau de qualité biologie moléculaire.

AUTRES PRODUITS REQUIS

Les réactifs pour l'extraction de l'ADN des échantillons à analyser, le contrôle interne d'extraction, le contrôle positif d'amplification et les consommables ne sont **pas** inclus dans ce produit.

Pour l'analyse automatique des échantillons, l'instrument **ELITE InGenius** (ELITechGroup S.p.A., réf. INT030) et les protocoles de test spécifiques suivants (ELITechGroup S.p.A) sont requis :

- paramètres pour l'amplification du contrôle positif « **COL-R ELITE_PC** »,
- paramètres pour l'amplification du contrôle négatif « **COL-R ELITE_NC** »,
- paramètres pour les échantillons à analyser « **COL-R ELITE_RcS_200_100** ».

Les produits génériques suivants sont requis avec l'instrument « **ELITE InGenius** » :

- cartouches d'extraction **ELITE InGenius® SP 200** (ELITechGroup S.p.A., réf. INT032SP200),
- consommables pour l'extraction **ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set** (ELITechGroup S.p.A., réf. INT032CS),
- cartouches d'amplification **ELITE InGenius® PCR Cassette** (ELITechGroup S.p.A., réf. INT035PCR),

- cônes **300 µL Filter Tips Axygen** (Axygen BioScience Inc., CA, réf. TF-350-L-R-S),
- conteneurs **ELITE InGenius® Waste Box** (ELITechGroup S.p.A, réf. F2102-000).

À titre de matrice de contrôle interne d'extraction et d'inhibition, il est nécessaire d'utiliser le produit générique **CPE - Internal Control** (EG SpA, réf. CTRCPE). Il s'agit d'une solution stabilisée contenant des ADN plasmidiques et l'ARN génomique du phage MS2.

À titre de matrice de contrôle positif d'amplification, le produit spécifique **COLISTIN-R - ELITE Positive Control** (EG SpA, réf. CTR202ING) est requis, qui est une solution stabilisée d'ADN plasmidiques.

À titre de dispositif de prélèvement d'échantillons rectaux sur écouvillons, les produits génériques suivants sont requis :

- kit **eSWAB®** (COPAN Italia S.p.A., réf. 480CE), avec écouvillon et flacon contenant 1 ml de milieu de transport ou un dispositif équivalent.

Pour la dilution des échantillons d'écouvillons rectaux, le produit générique suivant est requis :

- kit **eNAT®** (COPAN Italia S.p.A., réf. 606CS01R), avec écouvillon et flacon contenant 2 ml de milieu dénaturant.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Ce produit est conçu pour une utilisation diagnostique *in vitro*.

Avertissements et précautions d'ordre général

Manipuler et mettre au rebut tous les échantillons biologiques comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des agents infectieux. Éviter tout contact direct avec les échantillons biologiques. Éviter de provoquer des éclaboussures ou des pulvérisations. Le matériel qui a été en contact avec les échantillons biologiques doit être traité pendant au moins 30 minutes avec de l'hypochlorite de sodium à 3 % ou autoclavé pendant une (1) heure à 121 °C avant d'être mis au rebut.

Manipuler et mettre au rebut tous les réactifs et l'ensemble du matériel qui ont été utilisés pour réaliser le test comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des agents infectieux. Éviter tout contact direct avec les réactifs. Éviter de provoquer des éclaboussures ou des pulvérisations. Les déchets doivent être manipulés et éliminés dans le respect des normes de sécurité adéquates. Le matériel combustible jetable doit être incinéré. Les déchets liquides contenant des acides ou des bases doivent être neutralisés avant d'être éliminés.

Porter des vêtements et des gants de protection appropriés et se protéger les yeux et le visage. Ne jamais pipeter les solutions avec la bouche.

Ne pas manger, boire, fumer ou appliquer de produits cosmétiques dans les zones de travail.

Se laver soigneusement les mains après toute manipulation des échantillons et des réactifs.

Éliminer les réactifs restants et les déchets conformément aux réglementations en vigueur.

Lire attentivement toutes les instructions fournies avec le produit avant d'exécuter le test.

Lors de l'exécution du test, suivre les instructions fournies avec le produit.

Ne pas utiliser le produit au-delà de la date de péremption indiquée.

Utiliser uniquement les réactifs fournis avec le produit et ceux recommandés par le fabricant.

Ne pas utiliser de réactifs provenant de lots différents.

Ne pas utiliser de réactifs commercialisés par d'autres fabricants.

Avertissements et précautions pour la biologie moléculaire

Les procédures de biologie moléculaire exigent du personnel qualifié et dûment formé pour éviter tout risque de résultats erronés, en particulier ceux dus à la dégradation des acides nucléiques contenus dans les échantillons ou à la contamination des échantillons par les produits d'amplification.

Il est nécessaire d'utiliser des blouses de laboratoire, des gants et des instruments dédiés à la session de travail.

Les échantillons doivent être adaptés et, si possible, dédiés à ce type d'analyse. Les échantillons doivent être manipulés sous une hotte à flux laminaire. Les pipettes utilisées pour manipuler les échantillons doivent être exclusivement utilisées à cette fin spécifique. Les pipettes doivent être de type à déplacement positif ou être utilisées avec des cônes dotés d'un filtre pour les aérosols. Les cônes utilisés doivent être stériles, exempts de DNases et de RNases, et exempts d'ADN et d'ARN.

COLISTIN-R ELITE MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS202ING-48

Les cassettes de PCR doivent être manipulées de sorte à éviter la diffusion des produits d'amplification dans l'environnement, et toute contamination des échantillons et des réactifs.

Avertissements et précautions spécifiques pour les composants

Le mélange **COL PCR Mix** doit être conservé à -20 °C dans l'obscurité.

Le mélange COL PCR doit être utilisé dans un délai d'un mois après la première ouverture du tube.

Le mélange **COL PCR Mix** peut être congelé et décongelé **sept fois** au maximum : des cycles de congélation/décongélation supplémentaires risqueraient d'entraîner une réduction des performances du produit.

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES

Échantillons

L'utilisation de ce produit a été validée avec les échantillons cliniques suivants :

Écouvillons rectaux collectés dans un milieu eSwab (COPAN Italia S.p.A., réf. 480CE)

Les écouvillons rectaux pour l'extraction de l'ADN doivent être collectés dans un milieu eSwab et identifiés conformément aux directives du laboratoire, et doivent être transportés et conservés à température ambiante (à environ +25 °C) pendant 24 heures au maximum ou entre +2 et +8 °C pendant 48 jours au maximum. Avant l'analyse avec ce produit, 0,25 ml d'échantillon dans le milieu eSwab doit être transféré dans un tube eNAT neuf avec 2,0 ml de milieu, et agités au vortex. Les échantillons dilués dans un milieu eNAT peuvent être congelés et conservés à -20 °C pendant six mois au maximum ou à -70 °C pour des périodes plus longues. eNat conserve les acides nucléiques pendant quatre semaines à température ambiante et pendant six mois à -20°C et à -70°C. Après ajout de 0,25 mL d'échantillon dans le milieu eSwab, le tube eNAT peut être directement chargé dans le système **ELITE InGenius** en tant que tube primaire.

Remarque : lorsque l'extraction de l'ADN à partir d'écouvillons rectaux est effectuée à l'aide du système **ELITE InGenius** et du **logiciel ELITE InGenius** version 1.3 (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole de test **COL-R ELITE_RcS_200_100**. Ce protocole traite 200 µL d'échantillon, ajoute le **CPE** (contrôle interne) à 10 µL/extraction et effectue l'éluion des acides nucléiques dans 100 µL.

L'ADN extrait peut être conservé à +2/+8 °C pendant 16 heures ou à -20 °C pendant un (1) mois.

Remarque : les échantillons présentant une turbidité élevée doivent être traités comme indiqué dans le chapitre «Problèmes et solutions».

Les données disponibles relatives à l'inhibition provoquée par les médicaments et d'autres substances sont indiquées au paragraphe « Substances interférentes » du chapitre « Caractéristiques de performance ».

Noter qu'une teneur élevée en matrice fécale collectée à l'aide de l'écouvillon rectal (c.-à-d. un échantillon à forte turbidité) peut inhiber l'analyse.

Matériels de référence certifiés

La traçabilité métrologique des étalons et du matériel de contrôle pour les valeurs mcr-1 n'est pas entièrement applicable pour le kit **COLISTIN-R ELITE MGB Kit**, car aucun matériel de référence de l'OMS n'est disponible.

La traçabilité métrologique des étalons et du matériel de contrôle pour les valeurs mcr-2 n'est pas entièrement applicable pour le kit **COLISTIN-R ELITE MGB Kit**, car aucun matériel de référence de l'OMS n'est disponible.

Contrôles d'amplification

Avant d'analyser tout échantillon à l'aide du système **ELITE InGenius**, il est absolument indispensable de générer et d'approuver les contrôles d'amplification pour le lot de réactifs d'amplification qui sera utilisé pendant le test :

à titre de contrôle positif d'amplification, utiliser le réactif **COLISTIN-R - ELITE Positive Control** (non inclus dans ce kit) en association avec le protocole de test **COL-R ELITE_PC**,

à titre de contrôle négatif d'amplification, utiliser de l'eau de qualité biologie moléculaire (non incluse dans ce kit) en association avec le protocole de test **COL-R ELITE_NC**.

COLISTIN-R ELITE MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS202ING-48

Remarque : le système **ELITE InGenius** exige que les résultats des contrôles d'amplification soient approuvés et valides pour chaque lot de réactif d'amplification stocké dans sa base de données. Les résultats des contrôles d'amplification, approuvés et stockés dans la base de données, expirent **au bout de 15 jours**. À la date d'expiration, il est nécessaire de réanalyser les contrôles positif et négatif en association avec le lot de réactifs d'amplification utilisés.

En outre, les contrôles d'amplification doivent être réanalysés lorsque :

- un nouveau lot de réactifs d'amplification est utilisé,
- les résultats des contrôles de qualité (voir le paragraphe suivant) sont en dehors des spécifications,
- l'instrument **ELITE InGenius®** subit une procédure de maintenance majeure.

Contrôles de qualité

Il est recommandé de planifier la validation de la procédure d'extraction et d'amplification. À cette fin, il est possible d'utiliser les échantillons testés ou un matériel de référence certifié.

PROCÉDURE

La procédure d'utilisation du **COLISTIN-R ELITE MGB Kit** avec le système **ELITE InGenius** se compose de trois étapes :

- Vérification de la préparation du système,
- Paramétrage de la session,
- Examen et exportation des résultats.

Vérification de la préparation du système

Avant de commencer la session d'analyse, en se reportant à la documentation de l'instrument, il est nécessaire de :

- mettre le système **ELITE InGenius®** en marche et sélectionner le mode de connexion « **FERMÉ** » (CLOSED) ;
- vérifier que les contrôles d'amplification (Controls, COL Positive Control, COL Negative Control) ont été analysés en association avec le lot du réactif d'amplification à utiliser, et que les résultats sont approuvés et valide (Statut [Status]). En l'absence de résultats des contrôles d'amplification approuvés ou valides, il est nécessaire de les générer tel que décrit aux paragraphes suivants.
- choisir le type d'analyse, en suivant les instructions de l'interface graphique (GUI) pour le paramétrage de la session d'analyse et l'utilisation des protocoles de test fournis par ELITechGroup S.p.A. Ces protocoles de DIV ont été spécifiquement validés avec le **COLISTIN-R ELITE MGB Kit**, l'instrument **ELITE InGenius®** et la matrice indiquée.

Le protocole de test disponible pour tester des échantillons à l'aide du produit **COLISTIN-R ELITE MGB Kit** est décrit dans le tableau ci-dessous.

Protocole de test pour le COLISTIN-R ELITE MGB® Kit			
Nom	Matrice	Rapport	Caractéristiques
COL-R ELITE_RcS_200_100	Écouvillon rectal	Positif/Négatif	Volume d'extraction initial : 200 µl Volume d'éluion extrait : 100 µl Contrôle interne : 10 µl Sonication : NON Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µl Volume initial de PCR de l'échantillon : 20 µl

Si le protocole de test d'intérêt n'est pas chargé dans le système, contacter le service clientèle ELITechGroup S.p.A. local.

Paramétrage de la session

Le produit **COLISTIN-R ELITE MGB Kit** peut être utilisé avec le système **ELITE InGenius** pour les opérations suivantes :

- A. Analyse intégrée (Extraction + PCR),
- B. Analyse d'amplification (PCR uniquement),
- C. Analyse d'amplification du contrôle positif et du contrôle négatif (PCR uniquement),

Tous les paramètres nécessaires pour la session d'analyse sont inclus dans le protocole de test disponible sur l'instrument et sont automatiquement rappelés lorsque le protocole de test est sélectionné.

Remarque : le système ELITe InGenius® peut être connecté au « serveur d'informations de localisation » (LIS) par lequel il est possible d'envoyer les informations relatives à la session de travail. Se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument pour plus de détails.

Les principales étapes du paramétrage des trois types d'analyse sont décrites ci-dessous.

A. Analyse intégrée

Pour paramétrer une analyse intégrée avec une extraction et une amplification d'échantillon, effectuer les étapes suivantes comme indiqué par la GUI :

1. Décongeler les tubes de COL PCR Mix pour la session d'analyse. Chaque tube permet d'effectuer 12 réactions dans des conditions optimales de consommation de réactif (au moins 2 tests par session d'analyse). Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.

Remarque : décongeler le COL PCR Mix dans l'obscurité car ce réactif est sensible à la lumière.

2. Décongeler les tubes de CPE pour la session d'analyse. Chaque tube permet d'effectuer 12 extractions. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
3. Sélectionner « Exécuter l'analyse » (Perform Run) dans l'écran « Accueil » (Home).
4. Vérifier que le « Volume d'extraction initial » (Extraction Input Volume) est de 200 µl et que le « Volume d'élution extrait » (Extracted Elute Volume) est de 100 µl.
5. Pour chaque « Position » (Track) d'intérêt, renseigner le « ID échantillon » (Sample ID - SID) en le saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.
6. Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Test » (Assay) (c'est-à-dire COL-R ELITe_RcS_200_100).
7. Vérifier que le « Protocole » (Protocol) affiché est : « Extraction + PCR » (Extract + PCR).
8. Sélectionner la position de chargement de l'échantillon dans la colonne « Position de l'échantillon » (Sample Position) :
 - si un tube primaire est utilisé, sélectionner « Tube primaire » (Primary Tube) ;
 - si un tube secondaire est utilisé, sélectionner « Tube de sonication » (Sonication Tube).Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
9. Charger le CPE et le COL PCR Mix sur le « Bloc inventaire » (Inventory Block) sélectionné en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur le bouton « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
10. Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la « Zone inventaire » (Inventory Area) sélectionnée en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur le bouton « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
11. Charger les « Cassettes de PCR » (PCR Cassettes), les cartouches d'extraction « ELITe InGenius SP 200 », tous les consommables requis et les échantillons à extraire aux positions spécifiées à l'étape 8 en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
12. Fermer le tiroir de l'instrument.
13. Appuyer sur « Démarrer » (Start) pour lancer l'analyse.

Au terme du processus, le système ELITe InGenius® permet aux utilisateurs de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, puis d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

Remarque : au terme de l'analyse, l'échantillon extrait restant dans le « Tube d'élution » (Elution tube) doit être retiré de l'instrument, bouché, identifié et conservé à -20 °C pendant un mois au maximum. Éviter tout déversement de l'échantillon extrait.

Remarque : au terme de l'analyse, les cassettes de PCR contenant les produits de réaction et les autres consommables doivent être retirés de l'instrument et mis au rebut en évitant toute contamination environnementale. Éviter tout déversement des produits de la réaction.

Remarque : le PCR Mix peut être conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant un maximum de 7 sessions de travail de 3 heures chacune.

B. Analyse d'amplification

Pour paramétrer l'analyse d'amplification à partir d'ADN extrait, effectuer les étapes suivantes comme indiqué par la GUI :

1. Décongeler les tubes de COL PCR Mix pour la session d'analyse. Chaque tube permet d'effectuer 12 réactions dans des conditions optimales de consommation de réactif (au moins 2 tests par session d'analyse). Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.

Remarque : décongeler le COL PCR Mix dans l'obscurité car ce réactif est sensible à la lumière.

2. Sélectionner « Exécuter l'analyse » (Perform Run) dans l'écran « Accueil » (Home).
3. Même si aucune extraction ne sera effectuée, vérifier que le « Volume d'extraction initial » (Extraction Input Volume) est de 200 µl et que le « Volume d'élution extrait » (Extracted Elute Volume) est de 100 µl.
4. Pour chaque « Piste » (Track) d'intérêt, renseigner le SID en le saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.
5. Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Test » (Assay) (c'est-à-dire COL-R ELITe_RcS_200_100).
6. Sélectionner « PCR uniquement » (PCR Only) dans la colonne « Protocole » (Protocol).
7. Vérifier que la position de chargement de l'échantillon dans la colonne « Position échantillons » (Sample Position) est « Tube d'élution (ligne inférieure) » [Elution Tube (bottom row)]. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
8. Charger le COL PCR Mix sur le « Bloc inventaire » (Inventory Block) sélectionné en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
9. Charger et vérifier les portoirs à embouts dans la « Zone inventaire » (Inventory Area) sélectionnée en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
10. Charger les « Cassettes de PCR » (PCR Cassettes) et les échantillons d'acide nucléique extraits en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
11. Fermer le tiroir de l'instrument.
12. Appuyer sur « Démarrer » (Start) pour lancer l'analyse.

Au terme du processus, le système ELITe InGenius® permet aux utilisateurs de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, puis d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

Remarque : au terme de l'analyse, l'échantillon extrait restant doit être retiré de l'instrument, bouché et conservé à -20 °C pendant un mois au maximum. Éviter tout déversement de l'échantillon extrait.

Remarque : au terme de l'analyse, les cassettes de PCR contenant les produits de réaction et les autres consommables doivent être retirés de l'instrument et mis au rebut en évitant toute contamination environnementale. Éviter tout déversement des produits de la réaction.

Remarque : le PCR Mix peut être conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant un maximum de 7 sessions de travail de 3 heures chacune.

C. Analyse d'amplification du contrôle positif et du contrôle négatif

Pour paramétrer l'analyse d'amplification du contrôle positif et du contrôle négatif, effectuer les étapes suivantes comme indiqué par la GUI :

1. Décongeler les tubes de COL PCR Mix pour la session d'analyse. Chaque tube permet de préparer 12 réactions dans des conditions optimales de consommation de réactif (au moins 2 tests par session d'analyse). Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.

Remarque : décongeler le COL PCR Mix dans l'obscurité car ce réactif est sensible à la lumière.

2. Décongeler le tube COL - Positive Control pour la session d'analyse. Chaque tube permet d'effectuer 4 sessions d'analyse. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
3. Transférer au minimum 50 µl d'eau de qualité biologie moléculaire dans un « Tube d'éluion » (Elution tube) inclus dans le « ELITe InGenius SP 200 Consumable Set ».
4. Sélectionner « Exécuter l'analyse » (Perform Run) dans l'écran « Accueil » (Home).
5. Dans la « Position » (Track) d'intérêt, sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Test » (Assay).
6. Même si aucune extraction ne sera réalisée, vérifier que le « Volume d'extraction initial » (Extraction Input Volume) est de 200 µl et que le « Volume d'éluion extrait » (Extracted Elute Volume) est de 100 µl.
7. Pour le contrôle positif, sélectionner le protocole de test « COL-R ELITe_PC » dans la colonne « Test » (Assay) et renseigner le numéro de lot et la date de péremption du COL - Positive Control ;
8. Pour le contrôle négatif, sélectionner le protocole de test « COL-R ELITe_NC » et renseigner le numéro de lot et la date de péremption de l'eau de qualité biologie moléculaire.
9. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
10. Charger le COL PCR Mix sur le « Bloc inventaire » (Inventory Block) sélectionné en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
11. Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la « Zone Inventaire » (Inventory Area) sélectionnée en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
12. Charger les « Cassettes de PCR » (PCR Cassettes), le tube COL - Positive Control et le tube de contrôle négatif en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
13. Fermer le tiroir de l'instrument.
14. Appuyer sur « Démarrer » (Start) pour lancer l'analyse.

Au terme du processus, le système ELITe InGenius® permet aux utilisateurs de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, puis d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

Remarque : en fin de cycle, le contrôle positif restant doit être retiré de l'instrument, bouché, et conservé à -20 °C. Éviter tout déversement de l'échantillon extrait. Le contrôle négatif restant doit être mis au rebut.

Remarque : au terme de l'analyse, les « Cassettes de PCR » (PCR Cassettes) contenant les produits de réaction et les autres consommables doivent être retirés de l'instrument et mis au rebut en évitant toute contamination environnementale. Éviter tout déversement des produits de la réaction.

Remarque : le PCR Mix peut être conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant un maximum de 7 sessions de travail de 3 heures chacune.

Examen et exportation des résultats

Au terme de l'analyse, l'écran « Affichage des résultats » (Results Display) s'affiche automatiquement. Dans cet écran, les résultats de l'échantillon/des contrôles et les informations concernant l'analyse sont affichés. À partir de cet écran, il est possible d'approuver le résultat, d'imprimer ou d'enregistrer les rapports (« Rapport échantillon » [Sample Report] ou « Rapport piste » [Track Report]). Se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument pour plus de détails.

Remarque : le système ELITe InGenius® peut être connecté au « serveur d'informations de localisation » (LIS) par lequel il est possible d'envoyer les résultats de la session de travail au centre de données du laboratoire. Se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument pour plus de détails.

Le système ELITe InGenius® génère les résultats à l'aide du produit COLISTIN-R ELITe MGB® Kit en exécutant la procédure suivante :

- A. Validation des résultats du contrôle positif et du contrôle négatif d'amplification,
- B. Validation des résultats de l'échantillon,
- C. Rapport des résultats de l'échantillon.

A. Validation des résultats du contrôle positif et du contrôle négatif d'amplification

Les signaux de fluorescence émis par les sondes des gènes de résistance (canaux **mcr1** et **mcr2**) dans la réaction d'amplification du contrôle positif et du contrôle négatif sont analysés automatiquement et interprétés par le logiciel de l'instrument avec les paramètres inclus dans les protocoles de test « COL-R ELITe_PC » et « COL-R ELITe_NC ».

Les résultats du contrôle positif et du contrôle négatif d'amplification, spécifiques au lot de réactifs d'amplification utilisé, sont enregistrés dans la base de données (Contrôles [Controls]). Ils peuvent être visualisés et approuvés par du personnel qualifié disposant des privilèges « Administrateur » (Administrator) ou « Analyste » (Analyst), en suivant les instructions de la GUI.

Les résultats du contrôle positif et du contrôle négatif d'amplification, spécifiques au lot de réactifs d'amplification, expirent **au bout de 15 jours**.

Les résultats des analyses de l'amplification du contrôle positif et du contrôle négatif sont utilisés par le logiciel de l'instrument pour paramétrer les « Graphiques de contrôle » (Control Charts) surveillant l'exécution des étapes de l'amplification. Se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument pour plus de détails.

Remarque : si les résultats du contrôle positif ou du contrôle négatif d'amplification ne satisfont pas les critères d'acceptation, le message « Échec » (Failed) s'affiche dans l'écran « Contrôles » (Controls) et il ne peuvent pas être approuvés. Dans ce cas, les réactions du contrôle positif ou du contrôle négatif d'amplification doivent être répétées.

Remarque : si le contrôle positif ou le contrôle négatif est analysé avec des échantillons à tester et que son résultat est non valide, l'intégralité de la session d'analyse est non valide. Dans ce cas, l'amplification de tous les échantillons doit être également répétée.

B. Validation des résultats de l'échantillon

Les signaux de fluorescence émis par les sondes des gènes de résistance (canaux **mcr1** et **mcr2**) et par la sonde du contrôle interne (canal **IC**) dans les réactions d'amplification de l'échantillon sont analysés automatiquement et interprétés par le logiciel de l'instrument avec les paramètres inclus dans le protocole de test COL-R ELITe_RcS_200_100.

Les résultats sont présentés dans les rapports générés par l'instrument (« Affichage des résultats » (Results Display)).

L'analyse de l'échantillon peut être approuvée lorsque les deux conditions indiquées dans le tableau ci-dessous sont satisfaites.

1) Contrôle positif	Statut
COL Positive Control	APPROUVÉ
2) Contrôle négatif	Statut
COL Negative Control	APPROUVÉ

Pour chaque échantillon, le résultat du test est automatiquement interprété par le système selon l'algorithme du logiciel ELITe InGenius® et les paramètres du protocole de test.

Les messages des résultats possibles sont répertoriés dans le tableau ci-dessous. Pour chaque échantillon, le système génère une combinaison de messages spécifiant si les gènes de résistance à la colistine sont détectés ou non détectés.

Résultat de l'analyse de l'échantillon	Interprétation
mcr1 : ADN détecté (mcr1: DNA detected).	L'ADN du gène mcr1 a été détecté dans l'échantillon. L'échantillon pourrait être résistant à la colistine .
mcr2 : ADN détecté (mcr2: DNA detected).	L'ADN du gène mcr2 a été détecté dans l'échantillon. L'échantillon pourrait être résistant à la colistine .
mcr1 : ADN non détecté ou inférieur à la LoD (mcr1: DNA not detected or below the LoD).	L'ADN du gène mcr1 n'a pas été détecté dans l'échantillon ou est inférieur à la limite de détection du test. L'échantillon est négatif pour ce gène ou sa concentration est inférieure à la limite de détection du test. Si le gène mcr-2 n'est également pas détecté, l'échantillon pourrait être sensible à la colistine .
mcr2 : ADN non détecté ou inférieur à la LoD (mcr2: DNA not detected or below the LoD).	L'ADN du gène mcr2 n'a pas été détecté dans l'échantillon ou est inférieur à la limite de détection du test. L'échantillon est négatif pour ces gènes, ou la concentration de ces derniers est inférieure à la limite de détection du test. Si le gène mcr-1 n'est également pas détecté, l'échantillon pourrait être sensible à la colistine .
Non valide - Tester à nouveau l'échantillon (Invalid - Retest Sample).	Résultat de test non valide en raison d'un échec du contrôle interne (extraction incorrecte, contamination par des inhibiteurs). Le Ct du contrôle interne était indéterminé ou supérieur à 34 (seuil IC = 34) Le test doit être répété.

Les échantillons rapportés comme « Non valide - Tester à nouveau l'échantillon » (Invalid - Retest Sample) par le logiciel **ELITe InGenius®** ne sont pas appropriés pour l'interprétation des résultats. Dans ce cas, l'ADN du contrôle interne n'a pas été efficacement détecté en raison de problèmes lors de l'étape d'amplification ou d'extraction (dégradation d'ADN, perte d'ADN pendant l'extraction ou contamination par des inhibiteurs dans l'éluat), ce qui peut générer des résultats incorrects.

Lorsque le volume d'éluat est suffisant, l'échantillon extrait peut être à nouveau testé, pur ou dilué, par une analyse d'amplification en mode « PCR uniquement » (PCR Only). Si le deuxième résultat est non valide, l'échantillon doit être à nouveau testé en procédant à l'extraction d'une nouvelle aliquote à l'aide du mode « Extraction + PCR » (Extract + PCR).

Les échantillons rapportés comme « mcr1 : ADN non détecté ou inférieur à la LoD (mcr1: DNA Not Detected or below LoD) ou « mcr2 : ADN non détecté ou inférieur à la LoD (mcr2: DNA Not Detected or below LoD) sont appropriés pour l'analyse, mais il n'a pas été possible de détecter l'ADN du gène de résistance. Dans ce cas, il n'est pas possible d'exclure le fait que de l'ADN du gène de résistance soit présent à une concentration inférieure à la limite de détection du test (se reporter à la section « Caractéristiques de performance »).

Remarque : les résultats obtenus avec ce test doivent être interprétés en tenant compte de l'ensemble des données cliniques et des autres résultats d'analyse de laboratoire du patient.

Les résultats de l'analyse des échantillons sont stockés dans la base de données et, s'ils sont valides, peuvent être approuvés [Affichage des résultats (Result Display)] par du personnel qualifié disposant des privilèges « Administrateur » (Administrator) ou « Analyste » (Analyst) en suivant les instructions de la GUI. Dans la fenêtre « Affichage des résultats » (Result Display), il est possible d'imprimer et d'enregistrer les résultats de l'analyse de l'échantillon sous forme de « Rapport échantillons » (Sample Report) et « Rapport des positions » (Track Report).

C. Exportation des résultats de l'échantillon

Les résultats de l'échantillon sont stockés dans la base de données et peuvent être exportés sous forme de « Rapport échantillon » (Sample Report) et « Rapport des positions » (Track Report).

Le « Rapport échantillons » (Sample Report) présente les détails d'une session de travail triés par échantillon sélectionné (SID).

Le « Rapport des positions » (Track Report) présente les détails d'une session de travail par position sélectionnée.

Les « Rapport échantillons » (Sample Report) et « Rapport des positions » (Track Report) peuvent être imprimés et signés par le personnel agréé.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Limite de détection (LoD)

La limite de détection (LoD) du test a été définie à l'aide d'échantillons d'écouvillons rectaux en association avec le système ELITe InGenius®.

Six niveaux de dilutions d'un matériel de référence *E. coli* positif pour le gène **mcr-1** (souche DSM 105182, équivalente à NCTC 13846, provenant de DSMZ, Allemagne) ont été préparés dans des écouvillons rectaux négatifs en commençant par la concentration supérieure à la LoD attendue. Douze réplicats de chaque niveau de dilution ont été traités sur le système ELITe InGenius® en mode « Extraction + PCR » (Extract + PCR). La LoD pour la cible **mcr-1** a été calculée comme la concentration correspondant à une probabilité de résultat positif de 95 % par une analyse de régression des probits des données. La LoD calculée a été vérifiée par une analyse de 30 réplicats d'une dilution de la cible **mcr-1** à la concentration correspondante.

Le résultat final est présenté dans le tableau suivant.

Limite de détection du gène mcr-1 avec des écouvillons rectaux et le système ELITe InGenius (CFU/ml)		
LoD	Intervalle de confiance à 95 %	
	limite inférieure	limite supérieure
32	19	472

En l'absence de souche ou d'isolat positif(ve) pour **mcr-2** disponible, la LoD pour la cible **mcr-2** a été estimée à 50 copies/ml (correspondant à 50 UFC/ml), similaire à la valeur de la LoD de la cible **mcr-1**. La LoD estimée a été vérifiée par une analyse de 30 réplicats d'une dilution de la cible **mcr-2** (ADN plasmidique) dans une matrice rectale négative à la concentration correspondante.

Efficacité de détection (inclusivité)

L'efficacité de détection du test pour les gènes **mcr-1** et **mcr-2** (inclusivité) a été évaluée en comparant des séquences avec une base de données de nucléotides.

Les régions choisies pour l'hybridation des amorces et des sondes fluorescentes ont été vérifiées sur l'alignement des séquences disponibles dans la base de données pour les gènes **mcr-1** et **mcr-2**. L'analyse a montré leur conservation et une absence de mutations significatives.

L'efficacité de détection du test pour le gène **mcr-1** a également été vérifiée pour un ensemble de 27 isolats en culture résistants à la colistine et caractérisés comme des *Enterobacteriaceae* positives pour le gène **mcr-1**.

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant.

Efficacité de détection (inclusivité) du produit COLISTIN-R ELITe MGB® Kit					
Échantillons	N	Positifs pour mcr-1	Positifs pour mcr-2	Négatifs	Non valides
Isolats de culture positifs pour mcr-1	27	27	0	0	0

Ce produit est capable de détecter la résistance à la colistine (à médiation plasmidique) transférable en détectant les gènes **mcr-1** et **mcr-2**, mais il n'est pas capable de détecter les types **mcr** de 3 à 5 et de 7 à 10. Le type **mcr-6** peut être détecté dans le détecteur de **mcr-2**.

Marqueurs potentiellement interférents

La réactivité croisée potentielle du test avec d'autres cibles non souhaitées a été évaluée par une analyse *in silico* des séquences dans la base de données de nucléotides.

Les régions choisies pour l'hybridation des amorces et des sondes fluorescentes ont été vérifiées sur l'alignement des séquences d'organismes raisonnablement « attendus » dans des échantillons d'écouvillons rectaux. L'analyse a montré une absence d'homologies significatives et n'a indiqué aucune interférence potentielle.

L'absence de réactivité croisée avec d'autres organismes potentiellement présents dans des écouvillons rectaux a également été vérifiée en testant un panel de souches certifiées à une concentration d'environ 10⁴ UFC/ml en association avec le système ELITe InGenius® en mode « Extraction + PCR » (Extract + PCR).

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant.

Réactivité croisée potentielle		
Organisme	Souche	Résultat
<i>K. pneumoniae</i>	NCTC 13439 (VIM)	Aucune réactivité croisée
<i>E. coli</i>	NCTC 13476 (IMP)	Aucune réactivité croisée
<i>S. marcescens</i>	UCLA 14-13-A11	Aucune réactivité croisée
<i>A. baumannii</i>	NCTC 13301	Aucune réactivité croisée
<i>A. lwoffii</i>	ATCC 15309	Aucune réactivité croisée
<i>B. adolescentis</i>	ATCC 15703	Aucune réactivité croisée
<i>B. longum</i>	ATCC 15707	Aucune réactivité croisée
<i>C. jejuni</i>	ATCC 33292	Aucune réactivité croisée
<i>C. albicans</i>	Zeptomatrix Z006	Aucune réactivité croisée
<i>C. freundii</i>	UCLA-14-13-A2 (KPC)	Aucune réactivité croisée
<i>C. difficile</i>	ATCC 43593	Aucune réactivité croisée
Réactivité croisée potentielle		
Organisme	Souche	Résultat
<i>C. perfringens</i>	ATCC 13124	Aucune réactivité croisée
<i>P. mirabilis</i>	ATCC 12453	Aucune réactivité croisée
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	Aucune réactivité croisée
<i>S. enterica</i>	ATCC 700720	Aucune réactivité croisée
<i>K. pneumoniae</i>	DICON-126	Aucune réactivité croisée
<i>E. coli</i>	DICON-055	Aucune réactivité croisée
<i>E. coli</i>	DICON-045	Aucune réactivité croisée
<i>E. coli</i>	NCTC13400	Aucune réactivité croisée

Toutes les souches se sont avérées être négatives avec ce test.

L'absence d'interférence par d'autres organismes potentiellement présents dans les échantillons d'écouvillons rectaux a également été vérifiée en testant un panel de souches certifiées à la concentration d'environ 10⁴ UFC/ml ou plus, dopées avec du matériel certifié positif pour mcr-1 à une concentration finale d'environ 3 x la LoD en association avec le système ELITE InGenius en mode « Extraction + PCR » (Extract + PCR).

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant.

Interférence potentielle		
Organisme	Souche	Résultat
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 700603	Aucune interférence
<i>E. coli</i>	ATCC BAA-201	Aucune interférence
<i>S. marcescens</i>	UCLA 14-13-A11	Aucune interférence
<i>A. baumannii</i>	NCTC 13301	Aucune interférence
<i>A. lwoffii</i>	ATCC 15309	Aucune interférence
<i>B. adolescentis</i>	ATCC 15703	Aucune interférence
<i>B. longum</i>	ATCC 15707	Aucune interférence
<i>C. jejuni</i>	ATCC 33292	Aucune interférence
<i>C. albicans</i>	Zeptomatrix Z006	Aucune interférence
<i>C. freundii</i>	ATCC 8090	Aucune interférence
<i>C. difficile</i>	ATCC 43593	Aucune interférence
<i>C. perfringens</i>	ATCC 13124	Aucune interférence
<i>P. mirabilis</i>	ATCC 12453	Aucune interférence
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	Aucune interférence
<i>S. enterica</i>	ATCC 700720	Aucune interférence
<i>K. pneumoniae</i>	DICON-126	Aucune interférence
<i>E. coli</i>	DICON-055	Aucune interférence
<i>E. coli</i>	DICON-045	Aucune interférence
<i>E. coli</i>	NCTC13400	Aucune interférence

Toutes les souches n'ont montré aucune interférence avec l'amplification des cibles lors du test.

Substances interférentes

Un panel de substances potentiellement interférentes à des concentrations pertinentes a été testé avec le produit. Les substances testées étaient les suivantes : sang total humain, mucine, solutions de lavement (huile de vaseline), antibiotique (vancomycine), antiacides (acide alginique/bicarbonate de sodium), médicament anti-diarrhéique (chlorhydrate de loperamide) et laxatifs (sennosides).

Les substances ont été individuellement ajoutées à une matrice rectale négative dopée avec des matériels de référence positifs pour mcr-1 à une concentration de 3 x la LoD. Les échantillons ont été traités en trois réplicats sur le système ELITE InGenius® en mode « Extraction + PCR » (Extract + PCR). Le coefficient de variation (% CV) de la valeur Ct avec les échantillons de référence a été calculé.

Les résultats sont présentés dans les tableaux suivants.

Substances interférentes			
Substances	Concentrations testées	Pos./Rep.	Résultat
Sang total	5% v/v	3 / 3	ADN Mcr-1 détecté
Mucina	10 mg/mL	3 / 3	ADN Mcr-1 détecté
Huile de vaseline	20 mg/mL	3 / 3	ADN Mcr-1 détecté
Vancomycine	12.5 mg/mL	3 / 3	ADN Mcr-1 détecté
Acide alginique/bicarbonate de sodium	0.1 mg/mL	3 / 3	ADN Mcr-1 détecté
Chlorhydrate de loperamide	7 µg/mL	3 / 3	ADN Mcr-1 détecté
Sennosides	0,1mg/mL	3 / 3	ADN Mcr-1 détecté
Ampicilline	18 µg / mL	3 / 3	ADN Mcr-1 détecté
Cefpodoxima	4.5 µg / mL	3 / 3	ADN Mcr-1 détecté
Ciprofloxacina	5 µg / mL	3 / 3	ADN Mcr-1 détecté
Azythromycine	10 µg / mL	3 / 3	ADN Mcr-1 détecté

Tous les échantillons se sont avérés positifs pour la cible. Le % CV des valeurs Ct était inférieur à 5 %. Aucune des substances testées aux concentrations indiquées n'a interféré avec la détection de la cible.

Répétabilité

La répétabilité des résultats obtenus par le test en association avec le système ELITE InGenius® a été testée en analysant un panel de matrices rectales avec un échantillon négatif et trois échantillons dopés avec le matériel de référence positif pour mcr-1 (DSMZ) à des concentrations d'environ 0,5 x la LoD, 1,5 x la LoD et 3 x la LoD.

La répétabilité a été calculée en analysant les échantillons du panel en trois réplicats, à raison de deux analyses par jour, en utilisant le même lot de produit. Trois lots de produit différents ont été testés sur trois jours différents, sur le même instrument et par le même opérateur. Les échantillons ont été traités sur le système ELITE InGenius® en mode « Extraction + PCR » (Extract + PCR).

Les valeurs Ct de chaque niveau de dilution ont été utilisées pour calculer le % CV afin d'évaluer la répétabilité en tant qu'imprécision.

Un résumé des résultats est présenté dans les tableaux ci-dessous.

Répétabilité				
Échantillon	Pos./Rép.	Ct moyen de mcr-1	Écart-type de mcr-1	% CV de mcr-1
3 x la LoD (96 UFC/ml)	18/18	36,23	0,44	1,23
1,5 x la LoD (48 UFC/ml)	18/18	36,82	0,59	1,61
0,5 x la LoD (16 UFC/ml)	10/18	37,97	0,47	1,25
Matrice rectale négative	0/18	N.A.	N.A.	N.A.

Dans le test de répétabilité, l'analyse a détecté la cible mcr-1 comme attendu et a montré un faible % CV de la valeur Ct cible qui n'excédait pas 5 %.

Reproductibilité

La reproductibilité des résultats obtenus par le test en association avec le système ELITE InGenius® a été testée en analysant un panel de matrices rectales avec un échantillon négatif et trois échantillons dopés avec les matériels de référence positifs pour mcr-1 (DSMZ) à des concentrations d'environ 0,5 x la LoD, 1,5 x la LoD et 3 x la LoD.

La reproductibilité a été calculée en analysant les échantillons du panel en trois réplicats, à raison de deux analyses par jour. Trois lots de produit différents ont été testés sur trois jours différents, sur trois instruments différents et par trois opérateurs différents. Les échantillons ont été traités sur le système ELITE InGenius® en mode « Extraction + PCR » (Extract + PCR).

Les valeurs Ct de chaque niveau de dilution ont été utilisées pour calculer le % CV afin d'évaluer la reproductibilité en tant qu'imprécision.

Un résumé des résultats est présenté dans les tableaux ci-dessous.

Reproductibilité				
Échantillon	Pos./Rép.	Ct moyen de mcr-1	Écart-type de mcr-1	% CV de mcr-1
3 x la LoD (96 UFC/ml)	18/18	36,07	0,60	1,66
1,5 x la LoD (48 UFC/ml)	18/18	36,86	0,53	1,44
0,5 x la LoD (16 UFC/ml)	9/18	37,91	0,71	1,88
Matrice rectale négative	0/18	N.A.	N.A.	N.A.

Dans le test de reproductibilité, l'analyse a détecté la cible mcr-1 comme attendu et a montré un faible % CV de la valeur Ct cible qui n'excédait pas 5 %.

Sensibilité diagnostique (Positive Percent Agreement) : confirmation des échantillons positifs

Étant donné la difficulté de trouver des échantillons cliniques positifs pour les gènes mcr-1 et mcr-2, en raison de la faible incidence des échantillons présentant une résistance transmissible à la colistine, les échantillons positifs ont été analysés pour évaluer la sensibilité diagnostique du produit.

La sensibilité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons positifs, a été évaluée en analysant 107 échantillons d'écouvillons rectaux dopés avec des isolats d'*E. coli* positifs pour mcr-1 ou mcr-2.

56 échantillons d'écouvillons rectaux ont été certifiés négatifs par la méthode de culture, puis ont été enrichis avec différents isolats d'*E. coli* positifs pour mcr-1.

51 échantillons d'écouvillons rectaux présumés négatifs pour les *Enterobacteriaceae* présentant une résistance à la colistine transférable ont été dopés avec la souche d'*E. Coli* positive pour mcr-2 NCTC 14378.

Tous les échantillons ont été analysés avec le kit COLISTIN-R ELITE MGB et le système ELITE InGenius en mode "Extract + PCR".

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	mcr-1 positifs	mcr-2 positifs	négatifs	non valides
Écouvillon rectal dopé avec mcr-1	56	55	0	0	1
Écouvillon rectal dopé avec mcr-2	51	0	51	0	0

55 sur 56 échantillons dopés avec mcr-1 ont été confirmés comme positifs pour mcr-1. Un (1) échantillon a généré un résultat non valide et a été exclu de l'analyse.

Tous les échantillons dopés avec mcr-2 (51 sur 51) ont été confirmés positifs pour mcr-2.

Dans ce test, la sensibilité diagnostique des échantillons d'écouvillons rectaux était égale à 100 % pour les cibles mcr-1 et mcr-2.

Spécificité diagnostique (Negative Percent Agreement) : confirmation des échantillons négatifs

La spécificité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons cliniques négatifs, a été évaluée en analysant 58 échantillons d'écouvillons rectaux négatifs pour mcr-1 et mcr-2.

Les 58 échantillons d'écouvillons rectaux ont été certifiés négatifs pour les *Enterobacteriaceae* présentant une résistance à la colistine transférable par une méthode de culture puis ont été testés à l'aide du COLISTIN-R ELITE MGB Kit et du système ELITE InGenius en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs	non valides
Écouvillon rectal négatif	58	1	54	3

Dans le test, 54 échantillons sur 58 ont été confirmés comme valides et négatifs, et un (1) échantillon a généré un résultat discordant faiblement positif pour mcr-1. Trois échantillons ont généré un résultat non valide et ont été exclus de l'analyse. Dans ce test, la spécificité de l'analyse était de 98 %.

Remarque : les données complètes et les résultats des tests effectués pour évaluer les caractéristiques de performance du produit avec les matrices et l'instrument sont présentés dans la Fiche technique du produit « COLISTIN-R ELITE MGB Kit », FTP 202ING.

BIBLIOGRAPHIE

Y. Y. Liu et al. (2016) *Lancet Infect Dis.* 16 (2): 161 – 168
 B. B. Xavier et al. (2016) *Euro Surveill.* 21(27): doi 10.2807/1560-7917
 H. Giamarellou (2016) *Int. J. Antimicrob. Agents.* 48 (6): 614 - 621
 E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Utiliser ce produit uniquement avec les échantillons cliniques suivants : écouvillons rectaux.

Ne pas utiliser ce produit avec des spécimens d'origine animale et alimentaire.

Ne pas utiliser ce produit avec des échantillons contenant une quantité excessive de matrice fécale – les échantillons présentant une turbidité élevée inhibent la réaction d'amplification des acides nucléiques et peuvent entraîner des résultats non valides.

Il n'existe actuellement aucune donnée disponible concernant les performances du produit avec l'ADN extrait des échantillons cliniques suivants : hémoculture, surnageant fécal, urine.

Les résultats obtenus avec ce produit dépendent de l'identification, du prélèvement, du transport, de la conservation et du traitement corrects des échantillons. Afin d'éviter tout résultat incorrect, il est par conséquent nécessaire de prendre des précautions particulières pendant ces étapes et de suivre scrupuleusement le mode d'emploi fourni avec les produits pour l'extraction des acides nucléiques.

La méthode d'amplification en temps réel utilisée dans ce produit présente une sensibilité analytique élevée qui la rend sensible aux contaminations croisées par les échantillons positifs, les contrôles positifs et les produits d'amplification eux-mêmes. Les contaminations croisées peuvent générer des résultats faux-positifs. Le format du produit est capable de limiter les contaminations croisées. Toutefois, les contaminations croisées ne peuvent être évitées qu'en respectant les bonnes pratiques de laboratoire et en suivant le présent mode d'emploi.

Ce produit doit être manipulé par du personnel qualifié et dûment formé au traitement des échantillons biologiques potentiellement infectieux et des préparations chimiques classifiées comme dangereuses, afin de prévenir les accidents pouvant avoir des conséquences potentiellement graves pour l'utilisateur et les autres personnes.

Ce produit exige de porter des vêtements de travail et de disposer de zones appropriés dédiées au traitement des échantillons biologiques potentiellement infectieux et des préparations chimiques classifiées comme dangereuses, afin de prévenir les accidents pouvant avoir des conséquences potentiellement graves pour l'utilisateur et les autres personnes.

Ce produit exige de porter des vêtements spéciaux et d'utiliser des instruments dédiés au paramétrage des sessions de travail afin d'éviter tout résultat faux-positif.

En raison de différences intrinsèques entre les technologies, il est recommandé aux utilisateurs d'effectuer des études de corrélation des méthodes afin d'évaluer les différences de technologie avant d'envisager d'en utiliser une nouvelle.

Un résultat négatif obtenu avec ce produit signifie que l'ADN cible n'a pas été détecté dans l'ADN extrait de l'échantillon ; toutefois, il n'est pas possible d'exclure le fait que de l'ADN cible soit présent à un titre inférieur à la limite de détection du produit (se reporter à la section « Caractéristiques de performance »). Dans ce cas, le résultat pourrait être un faux-négatif.

En cas de co-infections, la sensibilité d'une cible peut être affectée par l'amplification d'une seconde cible.

Les résultats obtenus avec ce produit peuvent parfois être non valides en raison d'un échec du contrôle interne. Dans ce cas, l'échantillon doit être testé à nouveau, en commençant par l'extraction, ce qui peut entraîner des retards d'obtention des résultats finaux.

D'éventuels polymorphismes au sein de la région de l'ADN cible couverte par les amorces et les sondes du produit peuvent affecter la détection de l'ADN cible.

Ce produit n'est pas en mesure de détecter les types mcr de 3 à 5 et de 7 à 10. Ce produit peut détecter le type mcr-6 dans le détecteur mcr-2.

Ce produit est capable de détecter la résistance à la colistine (à médiation plasmidique) transférable par les gènes mcr-1 et mcr-2, mais il n'est pas capable de détecter la résistance chromosomique.

Comme avec tout autre dispositif médical de diagnostic, les résultats obtenus avec ce produit doivent être interprétés en tenant compte de l'ensemble des données cliniques et des autres analyses de laboratoire effectuées chez le patient.

Comme avec tout autre dispositif médical de diagnostic, il existe un risque résiduel d'obtention de résultats non valides, faux-positifs et faux-négatifs avec ce produit. Ce risque résiduel ne peut pas être éliminé ni réduit par la suite. Dans certains cas, ce risque résiduel pourrait contribuer à prendre de mauvaises décisions, avec des effets potentiellement dangereux pour le patient.

PROBLÈMES ET SOLUTIONS

Réaction du contrôle positif non valide	
Causes possibles	Solutions
Erreur de paramétrage de la session.	Vérifier la position du PCR Mix et du contrôle positif. Vérifier le volume du PCR Mix et du contrôle positif.
Dégradation du contrôle positif.	Utiliser une nouvelle aliquote du contrôle positif.
Dégradation du PCR Mix.	Utiliser une nouvelle aliquote du PCR Mix.
Erreur de l'instrument.	Contactez le service technique de ELITechGroup.

Réaction du contrôle négatif non valide	
Causes possibles	Solutions
Erreur de paramétrage de la session.	Vérifier la position du PCR Mix et du contrôle négatif. Vérifier le volume du PCR Mix et du contrôle négatif.
Contamination du contrôle négatif.	Utiliser une nouvelle aliquote d'eau de qualité biologie moléculaire.
Contamination du PCR Mix.	Utiliser une nouvelle aliquote du PCR Mix.
Contamination de la zone d'extraction, des portoirs ou du « Bloc inventaire » (Inventory Block).	Nettoyer les surfaces avec des détergents aqueux, laver les blouses de laboratoire, remplacer les tubes à essai et les cônes utilisés.
Erreur de l'instrument.	Contactez le service technique de ELITechGroup.

Réaction de l'échantillon non valide	
Causes possibles	Solutions
Erreur de paramétrage de la session.	Vérifier la position du PCR Mix, contrôle interne et de l'échantillon. Vérifier le volume du PCR Mix, contrôle interne et de l'échantillon.
Dégradation de la matrice du contrôle interne.	Utiliser de nouvelles aliquotes du contrôle interne.
Inhibition due à des substances interférentes dans l'échantillon. (par exemple, la turbidité)	Répéter l'amplification avec une dilution à 1:2 ou à 1:5 de l'échantillon élué dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, lors d'une session d'analyse « PCR uniquement » (PCR Only). Répéter l'extraction avec une dilution à 1:2 supplémentaire de l'échantillon dans un milieu eNAT™, lors d'une session d'analyse « Extraction + PCR » (Extract + PCR).
Dégradation du PCR Mix.	Utiliser une nouvelle aliquote du PCR Mix.
Erreur de l'instrument.	Contactez le service technique de ELITechGroup.

Erreur 30103	
Causes possibles	Solutions
Concentration trop élevée de la cible dans l'échantillon.	En cas d'observation d'une amplification significative sur la courbe de PCR : - sélectionner la position associée à l'échantillon et approuver manuellement le résultat. Si une valeur Ct est requise : - répéter l'amplification avec une dilution à 1:10 de l'échantillon élué dans de l'eau de qualité biologique moléculaire, lors d'une session d'analyse « PCR uniquement » (PCR Only) ou - répéter l'extraction avec une dilution à 1:10 supplémentaire de l'échantillon dans un milieu eNAT™, lors d'une session d'analyse « Extraction + PCR » (Extract + PCR).

Taux anormalement élevé de résultats positifs dans la même session (réactions avec des valeurs Ct tardives similaires)	
Causes possibles	Solutions
Contamination inter-échantillons pendant les étapes pré-analytiques	Éviter tout contact entre la micropipette et la paroi des tubes. Nettoyer la micropipette à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 3 % fraîchement préparée ou d'un agent de nettoyage de l'ADN/ARN après le pipetage de chaque échantillon. Ne pas utiliser de pipettes Pasteur. Les pipettes doivent être de type à déplacement positif ou être utilisées avec des cônes dotés d'un filtre pour les aérosols. Introduire les échantillons dans les dernières positions des instruments, comme indiqué par la GUI du système ELITe InGenius®. Suivre la séquence de chargement indiquée par le logiciel.
Contamination environnementale du laboratoire	Nettoyer toutes les surfaces en contact avec l'opérateur et les échantillons (y compris les pipettes) à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 3 % fraîchement préparée ou d'un agent de nettoyage de l'ADN/ARN. Effectuer un cycle de décontamination U.V. Utiliser un nouveau tube de PCR Mix et/ou de CPE.

LÉGENDE DES SYMBOLES

-  Numéro de référence.
-  Limite supérieure de température.
-  Code de lot.
-  Date de péremption (dernier jour du mois).
-  *in vitro* diagnostic medical device.
-  Conforme aux exigences du règlement (UE) 2017/746 sur les dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*. Certification délivrée par DEKRA Certification B.V., Pays-Bas.
-  Identification unique du dispositif
-  Contenu suffisant pour « N » tests.
-  Attention, consulter le mode d'emploi.
-  Contenu.
-  Tenir à l'abri de la lumière du soleil.
-  Fabricant.

AVIS AUX UTILISATEURS

Tout incident grave lié au dispositif doit être signalé au fabricant ainsi qu'à l'autorité compétente de l'état membre dans lequel réside l'utilisateur et/ou le patient. Au moment de la révision actuelle de la notice d'utilisation (mode d'emploi), aucun incident grave ou rappel du dispositif n'a eu lieu.

Un « Résumé de la sécurité et des performances » sera mis à la disposition du public via la base de données européenne sur les dispositifs médicaux (Eudamed) lorsque ce système informatique sera fonctionnel.

NOTE POUR L'ACQUÉREUR : LICENCE LIMITÉE

Les réactifs de détection ELITe MGB® sont couverts par un ou plusieurs des brevets américains numéros 6,127,121, 6,485,906, 6,660,845, 6,699,975, 6,727,356, 6,790,945, 6,949,367, 6,972,328, 7,045,610, 7,319,022, 7,368,549, 7,381,818, 7,662,942, 7,671,218, 7,715,989, 7,723,038, 7,759,126, 7,767,834, 7,897,736, 8,008,522, 8,067,177, 8,163,910, 8,389,745, 8,969,003, 8,980,855, 9,056,887, 9,085,800, 9,169,256 et les brevets EP numéros 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939, ainsi que par des demandes de brevet actuellement en instance.

Cette licence limitée permet à la personne ou à l'entité légale à laquelle ce produit a été fourni de l'utiliser, ainsi que les données générées par son utilisation, uniquement à des fins de diagnostic chez l'homme. Ni ELITechGroup S.p.A. ni ses concédants de licence ne concèdent d'autres licences, expresses ou implicites, à toute autre fin.

COLISTIN_R ELITE MGB® Kit used with ELITE InGenius®

Ref: RTS202ING-48

 This document is a simplified version of the official instruction for use. Before use please refer to the complete instruction for use downloadable at: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The product **COLISTIN-R ELITE MGB® Kit** is an in vitro diagnostic medical device intended to be used by healthcare professionals as qualitative nucleic acids amplification assay for the detection and identification of the transmissible Colistin-resistance *mcr-1* and *mcr-2* gene DNA of *Enterobacteriaceae* in clinical samples.

The assay is validated in association with the **ELITE InGenius®** instrument, an automated integrated system for extraction, real time PCR and results interpretation, starting from rectal swabs.

The product is intended for use as an aid in the diagnosis of infections of *Enterobacteriaceae* positive for Colistin transmissible resistance genes, together with the patient's clinical data and other laboratory test results.

B. Amplified sequence

Target for Qualitative Application	Gene	Fluorophore
Target 1	<i>mcr-1</i> gene	AP639 (CH 5)
Target 2	<i>mcr-2</i> gene	FAM (CH 1)
Internal Control	IC2	AP525 (CH 2)

C. Validated Matrices

› Rectal Swabs

D. Tube type collection

Copan Ref.	Description
480CE	eSwab

E. Kit content

COL PCR Mix (Neutral)



X 4 (RTS202ING-48)

Maximum Shelf-life: 24 Months

Storage temp.: - 20 °C

tubes of 280 µL
48 reactions per kit (ref. RTS202ING-48)
7 freeze-thaw cycles

F. Material required not provided in the kit

- › ELITE InGenius instrument: INT030
- › ELITE InGenius SP200 Extraction Cartridge: INT032SP200
- › ELITE InGenius PCR Cassette: INT035PCR
- › ELITE InGenius Waste Box: F2102-000
- › 300 µL Filter Tips Axygen: TF-350-L-R-S
- › COLISTIN-R - ELITE Positive Control: CTR202ING
- › CPE - Internal Control: CTCRPE
- › eSWAB: 480CE
- › eNAT: 606CS01R

G. ELITE InGenius® Protocol

Protocol	Volume
Sample	200 µL
Total eluate	100 µL
PCR eluate input	20 µL
Complete PCR Mix	20 µL
Control Frequency	15 days
Calibration Frequency	60 days

H. Performance

Target	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
mcr-1	Rectal swab	32 CFU/mL	100% 55/55*	98% 54/55*
mcr-2	Rectal swab	50 CFU/mL	100% 51/51*	100% 55/55*

*confirmed samples / tested samples

I. Procedures

The user is guided step-by-step by the ELITE InGenius software to setup the run. All the steps, extraction, amplification, and result interpretation, are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, extraction only or PCR only.

Before analysis

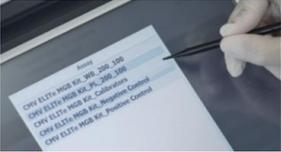
1. Switch on ELITE InGenius Login with username and password Select the mode "Closed"
2. Verify controls: COL pos. and neg. controls in the "Control menu" *NB:* Both must have been run, approved and not expired
3. Thaw COL PCR Mixes and the Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec

Procedure - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen

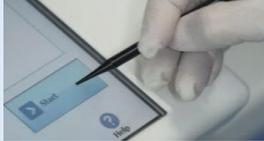
2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", eluate: "100 µL"

3. Scan the sample barcodes with hand-barcode reader or type the sample ID

4. Select the "Assay protocol" of interest

5. Select the sample position: "Extraction tube"

6. Load the PCR Mixes and the Internal Control in the inventory block

7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, Extraction tube racks

8. Close the door Start the run

9. View, approve and store the results
