

Instructions for use

MRSA/SA ELITe MGB® Kit

réactifs de PCR en temps réel de l'ADN



REF M800351

UDI 08033891486556



HISTORIQUE DES MODIFICATIONS

Rév.	Avis de modification	Date (jj/mm/aa)
10	Extension de l'utilisation du produit en association avec l'instrument « ELITe BeGenius® » (RÉF INT040) et les matrices d'écouvillons nasaux et d'hémoculture. Suppression du protocole de sonication pendant l'étape d'extraction Mise à jour du paragraphe « Symboles » avec le symbole « Consulter le mode d'emploi » Nouveaux graphiques et contenu du mode d'emploi	27/03/25
09	Introduction de la nouvelle référence produit « ELITe InGenius Sonication tubes » (réf. INT032SON) à utiliser en association avec le produit pour la sonication des échantillons.	13/10/20
08	Corrections formelles.	06/02/19
00–07	Développement de nouveaux produits et modifications ultérieures	

NOTE!

La révision du présent mode d'emploi est également compatible avec les versions précédentes du kit

SOMMAIRE

1 APPLICATION	4
2 EXPLICATION DU TEST.....	4
3 PRINCIPE DU TEST	4
4 DESCRIPTION DU PRODUIT	5
5 MATÉRIEL FOURNI.....	5
6 MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI	5
7 AUTRES PRODUITS REQUIS.....	6
8 AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS.....	7
9 ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES pour les ELITe InGenius et ELITe BeGenius	9
10 PROCÉDURE ELITe InGenius.....	11
11 PROCÉDURE ELITe BeGenius	16
12 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC LES ELITe InGenius et ELITe BeGenius.....	21
13 ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES POUR D'AUTRES SYSTÈMES.....	26
14 PROCÉDURES POUR D'AUTRES SYSTÈMES	29
15 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC D'AUTRES SYSTÈMES	34
16 BIBLIOGRAPHIE	39
17 LIMITES DE LA PROCÉDURE.....	40
18 PROBLÈMES ET SOLUTIONS	41
19 LÉGENDE DES SYMBOLES	45
20 NOTE POUR L'ACQUÉREUR : LICENCE LIMITÉE	45
Appendix A QUICK START GUIDE.....	47

1 APPLICATION

Le **MRSA/SA 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 de PCR en temps réel des acides nucléiques pour la détection de l'ADN, extrait d'échantillons cliniques, de *Staphylococcus aureus* (SA) et de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM, incluant la souche *mecC*).

Le test est validé en association avec les instruments **ELITe InGenius®** et **ELITe BeGenius®**, des systèmes intégrés et automatisés d'extraction, de PCR en temps réel et d'interprétation des résultats, en utilisant des échantillons humains d'écouvillons nasaux et d'hémoculture.

Le test est également validé en association avec le **7500 Real-Time PCR Instrument** en utilisant des échantillons humains d'écouvillons nasaux et d'hémoculture.

Le produit est destiné à être utilisé en tant qu'aide à la prévention et au contrôle des infections à SARM dans les établissements de soins de santé. Il est conçu pour aider au diagnostic des infections à SARM, et non pour orienter ou surveiller le traitement des infections à SARM. Un résultat négatif n'exclut pas une colonisation nasale par le SARM/SA. Des cultures concomitantes sont nécessaires pour récupérer les organismes en vue de réaliser un typage épidémiologique ou des tests de sensibilité supplémentaires.

Les résultats doivent être interprétés en association avec l'ensemble des observations cliniques pertinentes et des résultats du laboratoire.

2 EXPLICATION DU TEST

Staphylococcus aureus est un agent pathogène opportuniste et commensal. Il colonise la peau et les narines d'environ 30 % de la population normale et il peut être à l'origine d'un large éventail de maladies.

Le SA, et notamment le SARM, sont l'une des principales causes d'infections nosocomiales. Ces infections sont associées à des taux élevés de morbidité et de mortalité, ainsi qu'à des coûts importants. L'émergence d'infections communautaires à SARM exige une surveillance active des patients admis à l'hôpital ou dans d'autres établissements de soins de santé pour une infection à SA ou SARM afin d'identifier les patients pouvant potentiellement être un réservoir d'infection pour d'autres patients.

Le **MRSA/SA ELITe MGB Kit** est un test triplex d'amplification en temps réel qui cible les régions conservées dans un **gène spécifique à *Staphylococcus aureus***, responsable de l'identification des SA à coagulase positive.

Le test cible également le **gène *mecA***, y compris le variant ***mecC***, désigné **gène *mecC*** (Ito T. et al.), responsable de la résistance à la méticilline et à d'autres antibiotiques bêta-lactame, ainsi qu'un contrôle interne exogène, afin de vérifier l'inhibition de la réaction et l'intégrité des réactifs.

Le gène spécifique à *Staphylococcus aureus* identifiera sans ambiguïté les SA à coagulase positive, tandis que le gène *mecA* identifiera sans ambiguïté la résistance à la méticilline.

La présence des deux marqueurs avec la même quantité relative, mesurée par une différence de la valeur seuil du cycle, indique la présence du SARM ; des quantités relatives différentes ou la présence du seul gène marqueur spécifique à *Staphylococcus aureus* indique la présence du SA.

Les tests d'amplification en temps réel pour la détection des SARM/SA réduisent considérablement les temps de laboratoire par rapport aux tests de culture standard, en améliorant l'efficacité de la procédure. Les tests actuels de PCR en temps réel pour la détection des SARM ciblent le site d'insertion du *SCCmec* (élément génétique mobile portant *mecA*, appelé Staphylococcal Cassette Chromosome - Cassette Chromosomique Staphylococcique) et/ou le gène *mecA* et/ou le gène *spa*.

Le **MRSA/SA ELITe MGB Kit** cible des régions conservées dans les marqueurs génétiques des SARM et des SA, en minimisant ainsi les résultats faux négatifs dus à la variabilité naturelle du site d'insertion *SCCmec* et également les résultats faux positifs dus au problème de la « cassette vide ».

3 PRINCIPE DU TEST

Le test est une PCR qualitative en temps réel qui détecte l'ADN des SA et SARM isolé à partir d'échantillons et amplifié à l'aide du réactif du test, le MRSA/SA PCR Mix, qui contient des amorces et des sondes dotées de la technologie ELITe MGB Kit.

Les sondes ELITe MGB Kit sont activées lorsqu'elles s'hybrident aux produits de PCR associés. **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** surveillent l'augmentation de la fluorescence et calculent les cycles seuils (Ct) ainsi que les températures de fusion (Tm).

Dans les sondes ELITe MGB Kit les fluorophores sont désactivés lorsque la sonde est à l'état simple brin et enroulée de manière aléatoire. Les fluorophores sont actifs dans le duplex sonde/amplicon étant donné que le désactivateur est spatiallement séparé du fluorophore.

Noter que le fluorophore n'est pas clivé pendant la PCR et peut être utilisé pour l'analyse de dissociation et le calcul de la température de fusion.

4 DESCRIPTION DU PRODUIT

Le **MRSA/SA ELITe MGB Kit** fournit le réactif du test, le **MRSA/SA PCR Mix**, un PCR Mix optimisé et stabilisé qui contient les amorces et les sondes spécifiques pour :

- le gène spécifique à SA (spécifique à une région conservée des *Staphylococcus aureus* à coagulase positive), détecté dans le Canal **SA** ; la sonde est stabilisée par le groupe MGB, désactivée par le désactivateur Eclipse Dark Quencher® et marquée par le colorant AquaPhluor® 554 (AP554),

- les gènes *mecA* et *mecC* (spécifiques aux régions conservées dans les **gènes mecA** et **mecC** qui sont responsables de la résistance à la méticilline et à d'autres antibiotiques bêta-lactame) détectés dans le Canal **MecA** ; les sondes sont stabilisées par le groupe MGB, désactivées par le désactivateur Eclipse Dark Quencher® et marquées par le colorant FAM,

le Internal Control (**IC**), spécifique pour la séquence artificielle IC2, détecté dans le Canal **IC** ; la sonde est stabilisée par le groupe MGB, désactivée par le désactivateur Eclipse Dark Quencher® et marquée par le colorant AquaPhluor 642 (AP642).

Le **MRSA/SA PCR Mix** contient également un tampon, du chlorure de magnésium, des nucléotides triphosphates, le fluorophore AP593 (anologue de ROX ou Cy5) en tant que référence passive pour la normalisation de la fluorescence, l'enzyme uracile N-glycosidase (UNG) pour inactiver toute contamination par le produit d'amplification et l'enzyme ADN polymérase « hot start » (démarrage à chaud).

Le **MRSA/SA ELITe MGB Kit** contient suffisamment de réactifs pour effectuer **96 tests** sur les **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** (**24 tests avec chaque tube**) et **100 tests** sur les **autres systèmes** (**25 tests avec chaque tube**), en utilisant 20 µL par réaction.

Le **MRSA/SA ELITe MGB Kit** peut également être utilisé en association avec des instruments équivalents.

5 MATÉRIEL FOURNI

Tableau 1

Composant	Description	Quantité	Classification des risques
MRSA/SA PCR Mix réf. M800351	Mélange de réactifs pour la PCR en temps réel tube doté d'un capuchon BLANC	4 x 540 µL	-

6 MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI

- Hotte à flux laminaire.
- Gants non poudrés en nitrile jetables ou matériel similaire.
- Agitateur de type vortex.
- Centrifugeuse de paillasse (~5 000 tr/min).
- Microcentrifugeuse de paillasse (~13 000 tr/min).

- Micropipettes et cônes stériles avec filtre pour les aérosols ou cônes stériles à déplacement positif (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1 000 µL).
- Tubes stériles à capuchon vissant de 2,0 mL (Sarstedt, Allemagne, réf. 72.694.005).
- Eau de qualité biologie moléculaire.
- Bouillon trypticase soja

7 AUTRES PRODUITS REQUIS

Les réactifs pour l'extraction de l'ADN des échantillons, le Internal Control d'extraction et d'inhibition, les contrôles positif et négatif d'amplification et les consommables **ne sont pas** fournis avec ce produit.

Pour l'extraction automatisée des acides nucléiques, la PCR en temps réel et l'interprétation des résultats des échantillons, les produits suivants sont requis :

Tableau 2

Instruments et logiciel	Produits et réactifs
ELITe InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA réf. INT030) ELITe InGenius Software version 1.3.0.19 (ou versions ultérieures) MRSA-SA ELITE_PC_200_100 ou MRSA-SA ELITE_PC_200_50 , protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse du Positive Control MRSA-SA ELITE_NC_200_100 ou MRSA-SA ELITE_NC_200_50 , protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse du Negative Control MRSA-SA ELITE_NS_200_50 , protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des échantillons d'écouvillons nasaux MRSA-SA ELITE_BC_200_100 , protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des échantillons d'hémoculture ELITe BeGenius (EG SpA réf. INT040) ELITe BeGenius Software version 2.2.1. (ou versions ultérieures) MRSA-SA ELITE_Be_PC_200_100 ou MRSA-SA ELITE_Be_PC_200_50 , protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse du Positive Control MRSA-SA ELITE_Be_NC_200_100 ou MRSA-SA ELITE_Be_NC_200_50 , protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse du Negative Control MRSA-SA ELITE_Be_NS_200_50 , protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des échantillons d'écouvillons nasaux MRSA-SA ELITE_Be_BC_200_100 , protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des échantillons d'hémoculture	ELITe InGenius SP200 (EG SpA, réf. INT032SP200) ELITe InGenius SP 200 Consumable Set (EG SpA, réf. INT032CS) ELITe InGeniusPCR Cassette (EG SpA, réf. INT035PCR) ELITe InGenius Waste Box (EG SpA, réf. F2102-000) 300 µL Filter Tips Axygen (Corning Life Sciences Inc., réf. TF-350-L-R-S), avec le ELITe InGenius uniquement 1000 µL Filter Tips Tican (Tican, Suisse, réf. 30180118), avec le ELITe BeGenius uniquement CPE – Internal Control (EG SpA, réf. CTRCPE) MRSA-SA — ELITe Positive Control (EG SpA, réf. M800356) eNAT™ kit (Copan, réf. 608CS01R), eSwab Collection Kit (Copan, réf. 480CE),
7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (ThermoFisher Scientific, réf. 4406985) NucliSENS® easyMAG (bioMérieux SA, Réf. 200111)	MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL (Life Technologies, réf. 4346906) CPE – Internal Control (EG SpA, réf. CTRCPE) MRSA-SA — ELITe Positive Control (EG SpA, réf. M800356) NucliSENS easyMAG Reagents (bioMérieux SA, Réf. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135) NucliSENSeasyMAGStrip for Premix (bioMérieux SA, réf. 278303) bioHit Electronic Multichannel Pipettor (bioMérieux SA, réf. 280141) Filter tips for bioHit (bioMérieux SA, réf. 280146) BBL CultureSwab Plus Amies Gel without Charcoal swabs (Becton-Dickinson, réf. 220116)

8 AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Ce produit est exclusivement réservé à une utilisation *in vitro*.

8.1 Avertissements et précautions d'ordre général

Manipuler et éliminer tous les échantillons biologiques comme s'ils étaient infectieux. Éviter tout contact direct avec les échantillons biologiques. Éviter de provoquer des éclaboussures ou des pulvérisations. Les tubes, embouts et tout autre matériel qui a été en contact avec les échantillons biologiques doivent être traités pendant au moins 30 minutes avec de l'hypochlorite de sodium à 3 % (eau de Javel) ou autoclavés pendant une (1) heure à 121 °C avant d'être mis au rebut.

Manipuler et éliminer tous les réactifs et l'ensemble du matériel qui ont été utilisés pour réaliser le test comme s'ils étaient 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. Éviter tout contact des réactifs d'extraction avec l'hypochlorite de sodium (eau de Javel).

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 indiquées 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.

8.2 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 des échantillons ou à la contamination des échantillons par les produits de PCR.

Lorsque la session d'amplification est paramétrée manuellement, il est nécessaire de disposer de zones distinctes pour l'extraction/la préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification/la détection des produits d'amplification. Ne jamais introduire un produit d'amplification dans la zone réservée à l'extraction/la préparation des réactions d'amplification.

Lorsque la session d'amplification est paramétrée manuellement, il est nécessaire de disposer de blouses de laboratoire, de gants et d'outils utilisés exclusivement pour l'extraction/la préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification/la détection des produits d'amplification.

Ne jamais transférer de blouses, de gants ni d'outils de laboratoire de la zone désignée pour l'amplification/la détection des produits d'amplification vers la zone désignée pour l'extraction/la préparation des réactions 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 doivent 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.

Les réactifs doivent être manipulés sous une hotte à flux laminaire. Les pipettes utilisées pour la manipulation des réactifs doivent être utilisées exclusivement à cette fin. Les pipettes doivent être de type à déplacement positif ou doivent 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.

Les produits d'extraction doivent être manipulés de manière à réduire la dispersion dans l'environnement afin d'éviter tout risque de contamination.

Les PCR Cassettes (Cassettes de PCR) doivent être manipulées avec précaution et ne doivent jamais être ouvertes afin d'éviter la diffusion des produits de PCR dans l'environnement, et toute contamination des échantillons et des réactifs.

8.3 Avertissements et précautions spécifiques pour les composants

Tableau 3

Composant	Température de stockage	Utilisation après la première ouverture	Cycles de congélation/décongélation	Stabilité à bord de l'instrument (ELITe InGenius et ELITe BeGenius)
MRSA/SA PCR Mix	-20 °C ou température plus basse (à l'abri de la lumière)	un mois	jusqu'à cinq	jusqu'à 15 heures (5 sessions de travail de 3 heures chacune)

9 ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES pour les ELITe InGenius et ELITe BeGenius

9.1 Échantillons

Ce produit est destiné à être utilisé sur les **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** avec les échantillons cliniques suivants, identifiés et manipulés selon les directives du laboratoire, et prélevés, transportés et conservés dans les conditions suivantes :

Tableau 4

Échantillon	Exigences de prélèvement	Conditions de transport/conservation			
		+16/+26 °C (température ambiante)	+2°/+8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
écouvillon nasal	prélevé avec le eNAT™ kit		≤ 4 semaines	≤ 6 mois	-
écouvillon nasal	prélevé avec le eSwab Collection Kit	≤ 2 heures	≤ 48 heures	≤ 6 mois	-
hémoculture	-	≤ 24 heures	-	-	-

Avant l'analyse, diluer l'échantillon d'hémoculture à 1/1000 dans de l'eau ultrapure (au moins 10 µL d'échantillon dans 10 mL d'eau ultrapure), agiter au vortex et transférer 0,2 mL des échantillons dilués dans un tube d'extraction (pour l'instrument ELITe InGenius) ou dans un tube Sarstedt de 2 mL (pour l'instrument ELITe BeGenius).

Il est recommandé de diviser les échantillons en aliquotes avant la congélation afin d'éviter des cycles répétés de congélation/décongélation. En cas d'utilisation d'échantillons congelés, les décongeler juste avant l'extraction afin d'éviter une éventuelle dégradation des acides nucléiques.

Utiliser les protocoles de test (Assay Protocols) suivants pour procéder au test des échantillons sur les **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius**. Ces protocoles de DIV ont été spécifiquement validés avec les ELITe MGB Kits et le **ELITe InGenius** ou **ELITe BeGenius** avec les matrices indiquées.

Tableau 5 Protocoles de test pour le MRSA/SA ELITe MGB Kit

Échantillon	Instrument	Nom du protocole de test	Rapport	Caractéristiques
Écouvillon nasal	ELITe InGenius	MRSA-SA ELITe_NS_200_50	Positif/ Négatif	Volume d'extraction : 200 µL Volume d'élution de l'extraction : 50 µL Contrôle Interne : 10 µL Sonication : NON Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de PCR de l'échantillon : 10 µL
	ELITe BeGenius	MRSA-SA ELITe_Be_NS_200_50	Positif/ Négatif	
hémocultu-re	ELITe InGenius	MRSA-SA ELITe_BC_200_100	Positif/ Négatif	Volume d'extraction : 200 µL Volume d'élution de l'extraction : 100 µL Contrôle Interne : 10 µL Sonication : NON Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de PCR de l'échantillon : 10 µL
	ELITe BeGenius	MRSA-SA ELITe_Be_BC_200_100	Positif/ Négatif	

Pour tous les protocoles, 200 µL d'échantillon doivent être transférés dans un tube d'extraction (pour le ELITe InGenius) ou un tube Sarstedt de 2 mL (pour le ELITe BeGenius).

NOTE!

Le pipetage des échantillons dans le **tube d'extraction** ou le **tube Sarstedt de 2 mL** peut entraîner une **contamination**. Utiliser les pipettes appropriées et suivre toutes les recommandations indiquées à la section 8 AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS page 7.

Les acides nucléiques purifiés peuvent être laissés à température ambiante pendant 16 heures et conservés à -20 °C ou à une température plus basse pendant un mois maximum.

Se reporter au paragraphe « Substances potentiellement interférentes » de la section **12 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC LES ELITe InGenius et ELITe BeGenius** page 21 pour vérifier les informations concernant les substances interférentes.

La présence d'une grande quantité d'ADN génomique humain dans l'ADN extrait de l'échantillon peut inhiber la réaction d'amplification.

9.2 Contrôles de la PCR

Les résultats des contrôles de la PCR doivent être générés et approuvés pour chaque lot de réactifs de PCR.

- Pour le Contrôle positif, utiliser le produit **MRSA/SA - ELITe Positive Control** (non inclus dans ce kit) avec les protocoles de test (Assay Protocols) **MRSA-SA ELITe_PC_200_50** ou **MRSA-SA ELITe_PC_200_100** et **MRSA-SA ELITe_Be_PC_200_50** ou **MRSA-SA ELITe_Be_PC_200_100**.
- Pour le Contrôle négatif, utiliser de l'eau de qualité biologie moléculaire (non incluse dans ce kit) avec les protocoles de test (Assay Protocols) **MRSA-SA ELITe_NC_200_50** ou **MRSA-SA ELITe_NC_200_100** et **MRSA-SA ELITe_Be_NC_200_50** ou **MRSA-SA ELITe_Be_NC_200_100**.

NOTE!

Les **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** permettent de générer et de stocker la validation des contrôles de la PCR pour chaque lot de réactifs de PCR. Les résultats des contrôles de la PCR expirent au bout de **15 jours**, après quoi il est nécessaire de réanalyser les Positive et Negative Controls. Les contrôles de la PCR doivent être à nouveau analysés en cas de survenue de l'une des situations suivantes :

- un nouveau lot de réactifs est utilisé,
- les résultats de l'analyse du contrôle de qualité (se reporter au paragraphe suivant) sont en dehors des spécifications,
- le **ELITe InGenius** ou **ELITe BeGenius** subit une procédure de maintenance ou d'entretien majeure.

9.3 Contrôles de qualité

Il est recommandé de vérifier la procédure d'extraction et de PCR. Il est possible d'utiliser des échantillons archivés ou du matériel de référence certifié. Les contrôles externes doivent être utilisés conformément aux exigences des organismes d'accréditation locaux, régionaux et fédéraux, selon le cas.

10 PROCÉDURE ELITe InGenius

La procédure d'utilisation du **MRSA/SA ELITe MGB Kit** avec le **ELITe InGenius** comporte trois étapes :

Tableau 6

ÉTAPE 1	Vérification de la préparation du système	
ÉTAPE 2	Paramétrage de la session d'analyse	A) Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR])
		B) Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement])
		C) Analyse du Positive Control et du Negative Control (PCR Only [PCR seulement])
ÉTAPE 3	Examen et approbation des résultats	1) Validation des résultats du Positive Control et du Negative Control,
		1) Validation des résultats des échantillons
		3) Rapport des résultats de l'échantillon

10.1 ÉTAPE 1 - Vérification de la préparation du système

Avant de commencer la session d'analyse :

- mettre le **ELITe InGenius** en marche et se connecter en mode « **CLOSED** » (FERMÉ),
- dans le menu « **Controls** » (Contrôles) de la page Home (Accueil), vérifier que les contrôles de PCR (**MRSA/SA - Positive Control** et **LGA251/SA Positive Control**, **MRSA/SA Negative Control**) sont approuvés et valides (Status [Statut]) pour le lot de **MRSA/SAPCR Mix** à utiliser. Si aucun contrôle de PCR valide n'est disponible pour le lot de **MRSA/SA PCR Mix**, analyser les contrôles de PCR comme décrit dans les sections suivantes,
- choisir le type d'analyse, en suivant les instructions de l'interface graphique (GUI) pour le paramétrage de la session d'analyse et en utilisant les protocoles de test (Assay Protocols) fournis par EG SpA (se reporter à la section [9 ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES pour les ELITe InGenius et ELITe BeGenius page 9](#)).
- Si le protocole de test d'intérêt n'est pas chargé dans le système, contacter le service clientèle ELITechGroup S.p.A. local.

10.2 ÉTAPE 2 - Paramétrage de la session d'analyse

Le **MRSA/SA ELITe MGB Kit** peut être utilisé sur l'instrument **ELITe InGenius** pour effectuer les opérations suivantes :

- une analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR]),
- une analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement]),
- une analyse (PCR Only [PCR seulement]) Positive Control et Negative Control.

Tous les paramètres requis sont inclus dans les protocoles de test disponibles sur l'instrument et sont chargés automatiquement lorsque le protocole de test est sélectionné.

NOTE!

Le **ELITe InGenius** peut être connecté au « **Laboratory Information System** » (système de gestion des informations de laboratoire - LIS) qui permet de télécharger les informations relatives à la session d'analyse. Se reporter au manuel de l'instrument pour plus de détails.

Avant de paramétrer une analyse :

Décongeler les tubes de **PCR Mix** nécessaires à température ambiante pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer **24 tests** dans des conditions optimisées (2 tests ou plus par session d'analyse). Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré.

NOTE!

Conserver le **PCR Mix** à l'abri de la lumière lors de la décongélation, car ce réactif est photosensible.

Pour paramétrer l'un des trois types d'analyse, suivre les étapes ci-dessous tout en se reportant à la GUI

Tableau 7

	A. Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR])	B. Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement])	C. Analyse du Contrôle positif et du Negative Control (PCR Only [PCR seulement])
1	Identifier les échantillons et, si nécessaire, les décongeler à température ambiante. Transférer 200 µL d'échantillon dans un tube d'extraction préalablement étiqueté.	Décongeler les tubes d'élution contenant les acides nucléiques extraits à température ambiante. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré.	Décongeler les tubes de Positive Control (MRSA/SA Positive Control et LGA251/SA Positive Control) à température ambiante pendant 30 minutes. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré. (Chaque tube permet d'effectuer 4 réactions.)
2	Décongeler les tubes de CPE nécessaires à température ambiante pendant 30 minutes. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré. Chaque tube permet d'effectuer 12 extractions.	Non applicable	Préparer le Negative Control en transférant au minimum 50 µL d'eau de qualité biologie moléculaire dans un « Elution tube » (Tube d'élution) fourni avec le ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
3	Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil).	Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil).	Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil).
4	Si l'extraction est effectuée sur des échantillons d'écouvillon nasal, s'assurer que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élution de l'extraction) est de 50 µL. Si l'extraction est effectuée sur des échantillons d'hémoculture, s'assurer que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élution de l'extraction) est de 100 µL.	Si l'extraction est effectuée sur des échantillons d'écouvillon nasal, s'assurer que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élution de l'extraction) est de 50 µL. Si l'extraction est effectuée sur des échantillons d'hémoculture, s'assurer que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élution de l'extraction) est de 100 µL.	Même si aucune extraction ne sera réalisée, vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élution de l'extraction) est de « 50 µL » (avec un écouvillon nasal) ou de « 100 µL » (avec une hémoculture).
5	Pour chaque échantillon, attribuer une « Track » (Position) et renseigner le « SampleID » (ID échantillon - SID) en le saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.	Pour chaque échantillon, attribuer une « Track » (Position) et renseigner le « SampleID » (ID échantillon - SID) en le saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.	Non applicable

Tableau 7 (continued)

	A. Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR])	B. Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement])	C. Analyse du Contrôle positif et du Negative Control (PCR Only [PCR seulement])
6	Sélectionner le « Assay Protocol » (Protocole de test) dans la colonne « Assay » (Analyse) (se reporter à la section « Échantillons et contrôles »).	Sélectionner le « Assay Protocol » (Protocole de test) dans la colonne « Assay » (Analyse) (se reporter à la section « Échantillons et contrôles »).	Sélectionner le « Assay Protocol » (Protocole de test) dans la colonne « Assay » (Analyse) (se reporter à la section « Échantillons et contrôles »). Saisir le numéro de lot et la date de péremption du Positive Control et de l'eau de qualité biologique moléculaire.
7	Vérifier que le « Protocol » (Protocole) affiché est : « Extract + PCR » (Extraction + PCR).	Sélectionner « PCR Only » (PCR seulement) dans la colonne « Protocol » (Protocole).	Vérifier que « PCR Only » (PCR seulement) est sélectionné dans la colonne « Protocol » (Protocole).
8	Sélectionner la position de chargement de l'échantillon en tant que « Primary tube » (Tube primaire) ou « Extraction Tube » (Tube d'extraction) dans la colonne « Sample Position » (Position échantillons).	Vérifier que la position de chargement de l'échantillon dans la colonne « Sample Position » (Position échantillons) est « Elution Tube (bottom row) » (Tube d'élution [ligne du bas]).	Vérifier que la position de chargement de l'échantillon dans la colonne « Sample Position » (Position échantillons) est « Elution Tube (bottom row) » (Tube d'élution [ligne du bas]).
9	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
10	Charger le CPE et le PCR Mix sur le « Inventory Block » (Gestionnaire de stocks) en se reportant à la « Load List » (Liste) et saisir le numéro de lot, la date de péremption et le nombre de réactions pour chaque tube du PCR Mix.	Charger le PCR Mix sur le « Inventory Block » (Gestionnaire de stocks) en se reportant à la « Load List » (Liste) et saisir le numéro de lot, la date de péremption et le nombre de réactions pour chaque tube du PCR Mix.	Charger le PCR Mix sur le « Inventory Block » (Gestionnaire de stocks) en se reportant à la « Load List » (Liste) et saisir le numéro de lot, la date de péremption et le nombre de réactions pour chaque tube du PCR Mix.
11	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
12	Vérifier les embouts dans les « Tip Racks » (Compartiments à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer les « Tip Racks » si nécessaire.	Vérifier les embouts dans les « Tip Racks » (Compartiments à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer les « Tip Racks » si nécessaire.	Vérifier les embouts dans les « Tip Racks » (Compartiments à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer les « Tip Racks » si nécessaire.
13	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
14	Charger la PCR Cassette (Cassette de PCR), les cartouches d'extraction ELITe InGenius SP 200, et tous les consommables requis et échantillons à extraire.	Charger la PCR Cassette (Cassette de PCR) et les tubes d'élution avec les échantillons extraits.	Charger la PCR Cassette , le Positive Control et le Negative Control.
15	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
16	Fermer le tiroir de l'instrument.	Fermer le tiroir de l'instrument.	Fermer le tiroir de l'instrument.
17	Appuyer sur « Start » (Début).	Appuyer sur « Start » (Début).	Appuyer sur « Start » (Début).

Au terme de la session d'analyse, le **ELITe InGenius** permet aux utilisateurs de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

NOTE!

À la fin de l'analyse, l'échantillon extrait restant dans le **tube d'élution** doit être retiré de l'instrument, bouché, identifié et conservé à -20 ± 10 °C pendant un mois maximum. Éviter de renverser l'échantillon extrait.

NOTE!

À la fin de l'analyse, le **PCR Mix** peut être retiré de l'instrument, bouché et stocké à -20 °C ou à une température plus basse, ou peut être conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant un maximum de 5 sessions de travail de 3 heures chacune ; mélanger délicatement et centrifuger le contenu pendant 5 secondes avant de commencer la session d'analyse suivante.

NOTE!

À la fin de l'analyse, le **Positive Control** restant peut être retiré de l'instrument, bouché et conservé à -20 °C ou à une température plus basse. Éviter tout déversement du **Positive Control**. Le **Negative Control** restant doit être jeté.

NOTE!

Le **Positive Control** peut être utilisé pendant 4 sessions d'analyse distinctes de 3 heures chacune.

NOTE!

À la fin de l'analyse, la **PCR Cassette** (Cassette de PCR) et les autres consommables doivent être éliminés conformément à toutes les réglementations gouvernementales et environnementales. Éviter de renverser les produits de la réaction.

10.3 ÉTAPE 3 - Examen et approbation des résultats

L'instrument **ELITE InGenius** surveille les signaux de fluorescence de la cible et du Internal Control pour chaque réaction et applique automatiquement les paramètres du protocole de test (Assay Protocol) pour générer des courbes de PCR qui sont ensuite interprétées en résultats.

À la fin de l'analyse, l'écran « Results Display » (Affichage des résultats) s'affiche automatiquement. Cet écran présente les résultats et les informations de l'analyse. À partir de cet écran, les résultats peuvent être approuvés et les rapports imprimés ou enregistrés (« Sample Report » [Rapport échantillons] ou « Track Report » [Rapport des positions]). Se reporter au manuel de l'instrument pour plus de détails.

NOTE!

Le **ELITE InGenius** peut être connecté au « Laboratory Information System » (Système de gestion des informations de laboratoire - LIS) qui permet de charger les résultats de la session d'analyse pour les transmettre au centre de données du laboratoire. Se reporter au manuel de l'instrument pour plus de détails.

Le **ELITE InGenius** génère les résultats à l'aide du **MRSA/SA ELITE MGB Kit** en exécutant la procédure suivante :

1. validation des résultats de Positive Control et Negative Control,
2. validation des résultats des échantillons,
3. rapport des résultats de l'échantillon.

10.3.1 Validation des résultats d'amplification de Positive Control et Negative Control,

Le **ELITE InGenius Software** interprète les résultats de la PCR pour les cibles des réactions du Contrôle positif et du Contrôle négatif avec les paramètres des protocoles de test (Assay Protocols) **ELITE_PC** et **ELITE_NC**. Les valeurs Ct résultantes sont utilisées pour vérifier le système (lots de réactifs et instrument).

Les résultats du Positive Control et du Negative Control spécifiques au lot de réactifs de PCR, sont enregistrés dans la base de données (Controls [Contrôles]). Ils peuvent être visualisés et approuvés par des utilisateurs « Administrator » (Administrateur) ou « Analyst » (Analyste) en suivant les instructions de la GUI.

Les résultats du Positive Control et du Negative Control expirent **au bout de 15 jours**.

Les résultats de l'amplification du Positive Control et du Negative Control sont utilisés par le logiciel **ELITE InGenius** pour paramétriser les Control Charts (Graphiques de contrôle) surveillant l'exécution des étapes de l'amplification. Se reporter au manuel de l'instrument pour plus de détails.

NOTE!

Si le Positive Control ou Negative Control ne répond pas aux critères d'acceptation, le message « Failed » (Échec) s'affiche dans l'écran « Calibration » (calibrage). Dans ce cas, les résultats ne peuvent pas être approuvés et les analyses du Positive Control ou Negative Control doivent être répétées.

NOTE!

Si le résultat du Positive Control or Negative Control n'est pas valide et que des échantillons ont été inclus dans la même analyse, les échantillons peuvent être approuvés, mais leurs résultats ne sont pas validés. Dans ce cas, le(s) contrôle(s) en échec et les échantillons doivent tous être répétés.

10.3.2 Validation des résultats de l'échantillon

Le **ELITE InGenius Software** interprète les résultats de la PCR pour les cibles (canaux **mecA** et **SA**) et le Internal Control (canal **IC**) avec les paramètres des protocoles de test (Assay Protocols) **MRSA-SA ELITE_NS_200_50** et **MRSA-SA ELITE_BC_200_100**.

Les résultats sont présentés dans l'écran « Results Display » (Affichage des résultats).

Les résultats de l'échantillon peuvent être approuvés lorsque les deux conditions du tableau ci-dessous sont vraies.

Tableau 8

1) Positive Control	Statut
MRSA/SA Positive Control	APPROUVÉ
LGA251/SA Positive Control	APPROUVÉ
2) Negative Control	Statut
MRSA/SA - Negative Control	APPROUVÉ

Les résultats des échantillons sont automatiquement interprétés par le **ELITE InGenius software** en utilisant les paramètres du Assay Protocol (Protocole de test). Les messages des résultats possibles d'un échantillon sont répertoriés dans le tableau ci-dessous.

Pour chaque échantillon, le système rapporte une combinaison des messages suivants spécifiant si les ADN de l'agent pathogène sont détectés ou non détectés.

Tableau 9

Résultat de l'analyse de l'échantillon	Interprétation
MRSA:detected (SARM : détecté).	L'ADN de SARM a été détecté dans l'échantillon.
MRSA/SA:not detected or below the LoD (SARM/SA : non détecté ou inférieur à LoD).	L'ADN de SARM/SA n'a pas été détecté dans l'échantillon. L'échantillon est négatif et valide ou les concentrations des cibles sont inférieures à la limite de détection du test.
MRSA:not detected or below LoD, SA detected (SARM non détecté ou inférieur à LoD, SA détecté)	L'ADN de SARM n'a pas été détecté dans l'échantillon. L'échantillon est négatif pour cette cible ou sa concentration est inférieure à la limite de détection du test, le SA a été détecté .
Invalid-Retest Sample (Non valide - Tester à nouveau l'échantillon)	Résultat d'analyse non valide en raison d'un échec du contrôle interne (extraction incorrecte, contamination par des inhibiteurs). Le test doit être répété.

Les échantillons rapportés comme : « MRSA/SA:not detected or below the LoD » (SARM/SA : non détecté ou inférieur à LoD) sont appropriés pour l'analyse mais il n'a pas été possible de détecter l'ADN de SARM/SA. Dans ce cas, il n'est pas possible d'exclure le fait que de l'ADN de SARM/SA soit présent à une concentration inférieure à la limite de détection du test (se reporter à la section « [12 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC LES ELITe InGenius et ELITe BeGenius page 21](#) »).

Échantillons rapportés comme « Invalid-Retest Sample » (Non valide - Tester à nouveau l'échantillon) : dans ce cas, l'ADN du Internal Control n'a pas été efficacement détecté, ce qui peut être dû à des problèmes lors des étapes de prélèvement de l'échantillon, d'extraction ou de PCR (par ex. échantillonnage incorrect, dégradation ou perte d'ADN pendant l'extraction ou inhibiteurs dans l'éluat), ce qui peut générer des résultats incorrects. S'il reste un volume d'éluat suffisant, l'éluat peut être à nouveau testé par une analyse d'amplification en mode « PCR Only » (PCR seulement). Si le deuxième résultat est non valide, l'échantillon doit être à nouveau testé en procédant à l'extraction d'un nouvel échantillon en utilisant le mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR) (se reporter à la section « [18 PROBLÈMES ET SOLUTIONS page 41](#) »).

NOTE!

les résultats obtenus avec ce test doivent être interprétés en association avec l'ensemble des observations cliniques pertinentes et des résultats du laboratoire.

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

10.3.3 Rapport des résultats de l'échantillon

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

Le « Sample Report » (Rapport échantillons) présente les détails des résultats par échantillon sélectionné (SID).

Le « Track Report » (Rapport des positions) présente les détails des résultats par position sélectionnée.

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

11 PROCÉDURE ELITe BeGenius

La procédure d'utilisation du **MRSA/SA ELITe MGB Kit** avec le **ELITe BeGenius** comporte trois étapes :

Tableau 10

ÉTAPE 1	Vérification de la préparation du système	
ÉTAPE 2	Paramétrage de la session d'analyse	A) Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR])
		B) Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement]),
		C) Analyse du Positive Control et du Negative Control (PCR Only [PCR seulement]).
ÉTAPE 3	Examen et approbation des résultats	1) Validation des résultats du Positive Control et du Negative Control,
		2) Validation des résultats des échantillons
		3) Rapport des résultats de l'échantillon

11.1 ÉTAPE 1 - Vérification de la préparation du système

Avant de commencer la session d'analyse :

- mettre le ELITe BeGenius en marche et se connecter en mode « **CLOSED** » (FERMÉ),

- dans le menu « Controls » (Contrôles) de la page Home (Accueil), vérifier que les contrôles de PCR (**MRSA/SA - Positive Control** et **LGA251/SA Positive Control**, **MRSA/SA Negative Control**) sont approuvés et valides (Status [Statut]) pour le lot de **MRSA/SAPCR Mix** à utiliser. Si aucun contrôle de PCR valide n'est disponible pour le lot de **MRSA/SA PCR Mix**, analyser les contrôles de PCR comme décrit dans les sections suivantes,
- choisir le type d'analyse, en suivant les instructions de l'interface graphique (GUI) pour le paramétrage de la session d'analyse et en utilisant les protocoles de test (Assay Protocols) fournis par EG SpA (se reporter à la section « [9 ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES pour les ELITe InGenius et ELITe BeGenius page 9](#) »).

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

11.2 ÉTAPE 2 - Paramétrage de la session d'analyse

Le **MRSA/SA ELITe MGB Kit** peut être utilisé sur le **ELITe BeGenius** pour effectuer les opérations suivantes :

- une analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR]),
- une analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement]),
- une analyse (PCR Only [PCR seulement]) Positive Control et Negative Control.

Tous les paramètres requis sont inclus dans les protocoles de test disponibles sur l'instrument et sont chargés automatiquement lorsque le protocole de test est sélectionné.

NOTE!

Le **ELITe BeGenius** peut être connecté au « Laboratory Information System » (système de gestion des informations de laboratoire - LIS) qui permet de télécharger les informations relatives à la session d'analyse. Se reporter au manuel de l'instrument pour plus de détails.

Avant de paramétrier une analyse :

Décongeler les tubes de **PCR Mix** nécessaires à température ambiante pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer **24 tests** dans des conditions optimisées (2 tests ou plus par session d'analyse). Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré.

NOTE!

Conserver le **PCR Mix** à l'abri de la lumière lors de la décongélation, car ce réactif est photosensible.

Pour paramétrier l'un des trois types d'analyse, suivre les étapes ci-dessous tout en se reportant à la GUI :

Tableau 11

	A. Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR])	B. Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement])	C. Analyse du Contrôle positif et du Negative Control (PCR Only [PCR seulement])
1	Identifier les échantillons et, si nécessaire, les décongeler à température ambiante. Transférer 200 µL d'échantillon dans un tube Sarstedt de 2 mL préalablement étiqueté.	Si nécessaire, décongeler les tubes d'élation contenant les acides nucléiques extraits à température ambiante. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré.	Décongeler les tubes de Positive Control (MRSA/SA Positive Control et LGA251/SA Positive Control) à température ambiante pendant 30 minutes. Chaque tube permet d'effectuer 4 réactions. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré.
2	Décongeler les tubes de CPE nécessaires à température ambiante pendant 30 minutes. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré. Chaque tube permet d'effectuer 12 extractions.	Non applicable	Préparer le Negative Control en transférant au minimum 50 µL d'eau de qualité biologie moléculaire dans un « Elution Tube » (Tube d'élation) fourni avec le ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
3	Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil).	Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil)	Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil).
4	Retirer tous les « Racks » de la « Cooler Unit » et les placer sur la table de préparation.	Retirer les « Racks » des « Lane 1, 2 and 3 » (Lane 1, 2 et 3) (L1, L2, L3) de la « Cooler Unit » et les placer sur la table de préparation.	Retirer les « Racks » des « Lane 1, 2 and 3 » (Lane 1, 2 et 3) (L1, L2, L3) de la « Cooler Unit » et les placer sur la table de préparation.
5	Sélectionner le « Run mode » (run mode) : « Extract + PCR » (Extraction + PCR).	Sélectionner le « Run mode » (run mode) : « PCR Only » (PCR seulement).	Sélectionner le « Run mode » (run mode) : « PCR Only » (PCR seulement).
6	Charger les échantillons dans le « Sample Rack » (Compartiment des échantillons). Lorsque des tubes secondaires « 2 mL Tubes » (Tubes de 2 mL) sont chargés, utiliser les adaptateurs bleus pour le « Sample Rack » (Compartiment des échantillons).	Charger les échantillons dans le « Elution Rack » (Rack d'élation).	Charger les tubes de Positive Control et Negative Control dans le « Elution Rack » (Portoir d'élation).
7	Insérer le « Sample Rack » (Compartiment des échantillons) dans la « Cooler Unit », en commençant par la « Lane 5 » (L5). Si nécessaire, insérer le « Sample ID » (ID échantillon) (SID) pour chaque « Position » utilisée (si des tubes secondaires sont chargés, les marquer « 2 mL Tube » (Tube de 2 mL). Si les tubes secondaires ne comportent pas de code-barres, saisir manuellement le « Sample ID » [ID échantillon]).	Insérer le « Elution Rack » (Rack d'élation) dans la « Cooler Unit », en commençant par la « Lane 3 » (L3). Si nécessaire, pour chaque « Position », saisir le « Sample ID » (ID échantillon), la « Sample Matrix » (Matrice d'échantillon), le « Extraction kit » (Kit d'extraction) et le « Extracted eluate vol. » (Volume d'élation de l'extraction).	Insérer le « Elution Rack » (Rack d'élation) dans la « Cooler Unit », en commençant par la « Lane 3 » (L3). Si nécessaire, pour chaque « Position », saisir le « Reagent name » (Nom du réactif) et le « S/N » (numéro de série), le « Lot No. » (numéro de lot), la « Exp. Date » (date de péremption) et le « T/R » (nombre de réactions).
8	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.

Tableau 11 (continued)

	A. Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR])	B. Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement])	C. Analyse du Contrôle positif et du Negative Control (PCR Only [PCR seulement])
9	<p>Si l'extraction est effectuée sur des échantillons d'écouvillon nasal, s'assurer que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élution de l'extraction) est de 50 µL.</p> <p>Si l'extraction est effectuée sur des échantillons d'hémoculture, s'assurer que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élution de l'extraction) est de 100 µL.</p>	<p>Si l'extraction est effectuée sur des échantillons d'écouvillon nasal, s'assurer que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élution de l'extraction) est de 50 µL.</p> <p>Si l'extraction est effectuée sur des échantillons d'hémoculture, s'assurer que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élution de l'extraction) est de 100 µL.</p>	Même si aucune extraction ne sera réalisée, vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élution de l'extraction) est de « 50 µL » (avec un écouvillon nasal) ou de « 100 µL » (avec une hémoculture).
10	Sélectionner le « Assay Protocol » (Protocole de test) dans la colonne « Assay » (Analyse) (se reporter à la section « Échantillons et contrôles »).	Sélectionner le « Assay Protocol » (Protocole de test) dans la colonne « Assay » (Analyse) (se reporter à la section « Échantillons et contrôles »).	Sélectionner le « Assay Protocol » (Protocole de test) dans la colonne « Assay » (Analyse) (se reporter à la section « Échantillons et contrôles »).
11	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
<p style="text-align: center;">NOTE!</p> <p>Remarque : En cas de traitement de plus de 12 échantillons, répéter la procédure à partir du point 6.</p>			-
12	Charger les « Elution tubes » (Tubes d'élution) dans le « Elution Rack » (Rack d'élution) (les tubes d'élution peuvent être étiquetés avec un code-barres pour améliorer la traçabilité).	Non applicable	Non applicable
13	<p>Insérer le « Elution Rack » (Rack d'élution) dans la « Cooler Unit », en commençant par la « Lane 3 » (L3).</p> <p>En cas de traitement de plus de 12 échantillons, répéter la procédure en utilisant la « Lane 2 » (L2).</p>	Non applicable	Non applicable
14	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Non applicable	Non applicable
15	Charger le CPE et le PCR Mix dans le « Reagent/Elution Rack » (Rack de réactifs/d'élution).	Charger le PCR Mix dans le « Reagent/Elution Rack » (Rack de réactifs/d'élution).	Charger le PCR Mix dans le « Reagent/Elution Rack » (Rack de réactifs/d'élution).

Tableau 11 (continued)

	A. Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR])	B. Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement])	C. Analyse du Contrôle positif et du Negative Control (PCR Only [PCR seulement])
16	Insérer le « Reagent/Elution Rack » (Rack de réactifs/d'élution) dans la « Lane 2 » (L2) si disponible, ou dans la « Lane 1 » (L1) de la « Cooler Unit ». Si nécessaire, pour chaque réactif PCR Mix et/ou CPE, saisir le « S/N » (numéro de série), le « Lot No. » (numéro de lot), la « Exp. Date » (date de péremption) et le « T/R » (nombre de réactions).	Insérer le « Reagent/Elution Rack » (Rack de réactifs/d'élution) dans la « Lane 2 » (L2) si disponible, ou dans la « Lane 1 » (L1) de la « Cooler Unit ». Si nécessaire, pour chaque réactif PCR Mix, saisir le « S/N » (numéro de série), le « Lot No. » (numéro de lot), la « Exp. Date » (date de péremption) et le « T/R » (nombre de réactions).	Insérer le « Reagent/Elution Rack » (Rack de réactifs/d'élution) dans la « Lane 2 » (L2) si disponible, ou dans la « Lane 1 » (L1) de la « Cooler Unit ». Si nécessaire, pour chaque réactif PCR Mix, saisir le « S/N » (numéro de série), le « Lot No. » (numéro de lot), la « Exp. Date » (date de péremption) et le « T/R » (nombre de réactions).
17	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
18	Vérifier les embouts dans les « Tip Racks » (Compartiments à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer les « Tip Racks » si nécessaire.	Vérifier les embouts dans les « Tip Racks » (Compartiments à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer les « Tip Racks » si nécessaire.	Vérifier les embouts dans les « Tip Racks » (Compartiments à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer les « Tip Racks » si nécessaire.
19	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
20	Charger le « PCR Rack » avec la « PCR Cassette » dans la « Inventory Area » (Zone de Stockage).	Charger le « PCR Rack » avec la « PCR Cassette » dans la « Inventory Area » (Zone de stockage).	Charger le « PCR Rack » avec la « PCR Cassette » dans la « Inventory Area » (Zone de stockage).
21	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
22	Charger le « Extraction Rack » (Rack d'extraction) avec les cartouches d'extraction « ELITE InGenius SP 200 » et les consommables d'extraction requis.	Non applicable	Non applicable
23	Fermer le tiroir de l'instrument.	Fermer le tiroir de l'instrument.	Fermer le tiroir de l'instrument.
24	Appuyer sur « Start » (Début).	Appuyer sur « Start » (Début).	Appuyer sur « Start » (Début).

Au terme de la session d'analyse, le **ELITe BeGenius** permet aux utilisateurs de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

NOTE!

À la fin de l'analyse, l'échantillon extrait restant dans le **tube d'élution** doit être retiré de l'instrument, bouché, identifié et conservé à -20 ± 10 °C pendant un mois maximum. Éviter de renverser l'échantillon extrait.

NOTE!

À la fin de l'analyse, le **PCR Mix** peut être retiré de l'instrument, bouché et stocké à -20 °C ou à une température plus basse, ou peut être conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant un maximum de 5 sessions de travail de 3 heures chacune ; mélanger délicatement et centrifuger le contenu pendant 5 secondes avant de commencer la session d'analyse suivante.

NOTE!

À la fin de l'analyse, le **Positive Control** restant peut être retiré de l'instrument, bouché et conservé à -20 °C ou à une température plus basse. Éviter tout déversement du Positive Control. Le **Negative Control** restant doit être jeté.

NOTE!

Le **Positive Control** peut être utilisé pendant 4 sessions d'analyse distinctes de 3 heures chacune.

NOTE!

À la fin de l'analyse, la **PCR Cassette** (Cassette de PCR) et les autres consommables doivent être éliminés conformément à toutes les réglementations gouvernementales et environnementales. Éviter de renverser les produits de la réaction.

11.3 ÉTAPE 3 - Examen et approbation des résultats

L'instrument **ELITE BeGenius** surveille les signaux de fluorescence de la cible et du Internal Control pour chaque réaction et applique automatiquement les paramètres du protocole de test (Assay Protocol) pour générer des courbes de PCR qui sont ensuite interprétées en résultats.

À la fin de l'analyse, l'écran « Results Display » (Affichage des résultats) s'affiche automatiquement. Cet écran présente les résultats et les informations de l'analyse. À partir de cet écran, les résultats peuvent être approuvés et les rapports imprimés ou enregistrés (« Sample Report » [Rapport échantillons] ou « Track Report » [Rapport des positions]). Se reporter au manuel de l'instrument pour plus de détails.

NOTE!

Le **ELITE BeGenius** peut être connecté au « Laboratory Information System » (Système de gestion des informations de laboratoire - LIS) qui permet de charger les résultats de la session d'analyse pour les transmettre au centre de données du laboratoire. Se reporter au manuel de l'instrument pour plus de détails.

Le **ELITE BeGenius** génère les résultats à l'aide du **MRSA/SA ELITE MGB Kit** en exécutant la procédure suivante :

1. validation des résultats de Positive Control et Negative Control,
2. validation des résultats des échantillons,
3. rapport des résultats de l'échantillon.

NOTE!

Se reporter au paragraphe correspondant relatif à la procédure avec l'instrument **ELITE InGenius** pour connaître les détails.

12 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC LES ELITE InGenius et ELITE BeGenius

12.1 Sensibilité analytique : limite de détection

La sensibilité analytique de ce test, en tant que limite de détection (LoD) de l'amplification de l'ADN, permet de détecter la présence d'environ 20 copies dans 10 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La LoD de ce test a été testée en utilisant des ADN plasmidiques contenant les produits d'amplification dont les concentrations initiales ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre. Les ADN plasmidiques ont été dilués à un titre d'environ 20 copies/10 µL en présence de 40 000 copies de Internal Control (IC)/10 µL. Ces échantillons ont été testés sur le ELITE InGenius en 18 réplicats en réalisant l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A sur deux instruments différents.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 12

Échantillons	N	positif	négatif	MecA Ct moyen	SA Ct moyen
20 copies d'ADN plasmidique de SARM/SA + 40 000 copies d'IC	18	17	1	35,04	34,43
20 copies d'ADN plasmidique de LGA251/SA + 40 000 copies d'IC	18	18	0	34,75	34,12

La valeur théorique de la LoD a été confirmée sur le ELITE InGenius et sur le ELITE BeGenius en testant 20 réplicats d'ADN plasmidique de SARM/SA et 20 réplicats d'ADN plasmidique de LGA251/SA à la concentration revendiquée (20 copies/réaction).

La LoD de la méthode a été vérifiée sur le ELITE InGenius et sur le ELITE BeGenius en testant des échantillons d'écouvillons nasaux prélevés avec un kit eSwab, des échantillons d'écouvillons nasaux prélevés avec un kit eNat et des échantillons d'hémoculture, dopés avec le MRSA/SA - ELITE Positive Control (ADN plasmidique de SARM/SA et ADN plasmidique de LGA251/SA) à 1 000 copies/mL pour les échantillons d'écouvillons nasaux et à 2 000 copies/mL pour les échantillons d'hémoculture.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 13 Limite de détection (copies/mL) pour les échantillons d'écouvillons nasaux et d'hémoculture sur le ELITE InGenius et sur le ELITE BeGenius

Échantillon	LoD (copies/mL)
Écouvillon nasal	1000
Hémoculture	2000

Les résultats obtenus ont confirmé la concentration revendiquée pour la cible SARM/SA à la fois sur le ELITE InGenius et le ELITE BeGenius.

12.2 Sensibilité analytique : reproductibilité avec un matériel de référence certifié

La sensibilité analytique du test, en tant que reproductibilité des valeurs d'un matériel de référence étalonné, a été évaluée en utilisant, à titre de matériel de référence, le « QCMD 2014 Methicillin Resistant S. aureus EQA Panel » (Qnistics, Ltd, Royaume-Uni), un panel de dilutions de SARM/SA à des concentrations limites. Chaque échantillon du panel a été testé en 2 réplicats en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction, l'amplification, la détection et l'interprétation des résultats, à l'aide du **ELITE InGenius** et des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 14 Tests avec un matériel de référence étalonné et le ELITE InGenius

Échantillon	Contenu de l'échantillon	Résultat attendu	Résultat obtenu
MRSADNA14-01	MRSA N315	MRSA Detected (SARM détecté)	MRSA Detected (SARM détecté)
MRSADNA14-02	MSSA ATCC 29213	Négatif pour le SARM	Négatif pour le SARM
MRSADNA14-03	MSSA 29213 + MRCoNS 634	Négatif pour le SARM	Négatif pour le SARM
MRSADNA14-04	E. coli ATCC 35218	Négatif pour le SARM	Négatif pour le SARM
MRSADNA14-05	MRSA N315	SARM fréquemment détecté	MRSA Detected (SARM détecté)
MRSADNA14-06	MHB seulement	Négatif pour le SARM	Négatif pour le SARM

Tableau 14 Tests avec un matériel de référence étalonné et le ELITe InGenius (continued)

MRSADNA14-07	MRSA N315	SARM non fréquemment détecté	MRSA Detected (SARM détecté)
MRSADNA14-08	SARM mecC	SARM non fréquemment détecté	MRSA Detected (SARM détecté)
MRSADNA14-09	MRCoNS 634	Négatif pour le SARM	Négatif pour le SARM
MRSADNA14-10	MRSA ST398	MRSA Detected (SARM détecté)	MRSA Detected (SARM détecté)
MRSADNA14-11	MRSA N315	SARM fréquemment détecté	MRSA Detected (SARM détecté)
MRSADNA14-12	MRSA N315	MRSA Detected (SARM détecté)	MRSA Detected (SARM détecté)

Tous les échantillons ont été correctement détectés.

La sensibilité analytique du test, en tant que reproductibilité des valeurs d'un matériel de référence étalonné, a également été évaluée en utilisant, à titre de matériel de référence, le « NATtrol™ MRSA/SA Panel » (Zeptometrix, États-Unis), un panel de *S. aureus* ou *S. epidermidis*. Chaque échantillon du panel a été testé en 2 réplicats en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction, l'amplification, la détection et l'interprétation des résultats, à l'aide du **ELITe InGenius** et des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 15 Tests avec un matériel de référence étalonné et le ELITe InGenius

Échantillon	Résultat attendu	Résultat obtenu
<i>S. aureus</i> _MRSA Community Strain	Positif pour le SARM	MRSA Detected (SARM détecté)
<i>S. aureus</i> _MRSA Hospital Strain	Positif pour le SARM	MRSA Detected (SARM détecté)
<i>S. aureus</i> _MSSA	Positif pour le SASM	MSSA Detected (SARM détecté)
<i>S. aureus</i> _MSSA – empty cassette	Positif pour le SASM	MSSA Detected (SARM détecté)
<i>S. epidermidis</i> _MSSE HER 1292	Négatif	Négatif

Tous les échantillons ont été correctement détectés.

12.3 Répétabilité

La répétabilité du test a été évaluée sur les instruments **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** en analysant un panel d'échantillons d'écouvillons nasaux prélevés avec un kit eSwab, incluant un échantillon négatif et des échantillons positifs dopés avec le MRSA/SA - ELITe Positive Control.

Un exemple des résultats de la répétabilité intra-session (sur un seul jour) est présenté dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 16 Répétabilité intra-session avec le ELITe InGenius

Échantillon	N	Cible MecA			Cible SA			Concordance (%)
		Ct moyen	EC	% CV	Ct moyen	EC	% CV	
Négatif	8	-	-	-	-	-	-	100 %
3 x la LoD	8	33,10	0,24	0,73	32,89	0,31	0,93	100 %
10 x la LoD	8	31,14	0,09	0,28	30,96	0,17	0,54	100 %

Tableau 17 Répétabilité intra-session avec le ELITe BeGenius

Échantillon	N	Cible MecA			Cible SA			Concordance (%)
		Ct moyen	EC	% CV	Ct moyen	EC	% CV	
Négatif	8	-	-	-	-	-	-	100 %
3 x la LoD	8	32,55	0,29	0,90	31,73	0,29	0,90	100 %
10 x la LoD	8	31,01	0,23	0,75	30,17	0,31	1,03	100 %

Un exemple des résultats de la répétabilité inter-sessions (sur deux jours) est présenté dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 18 Répétabilité inter-sessions avec le ELITe InGenius

Échantillon	N	Cible MecA			Cible SA			Concordance (%)
		Ct moyen	EC	% CV	Ct moyen	EC	% CV	
Négatif	16	-	-	-	-	-	-	100 %
3 x la LoD	16	33,24	0,37	1,10	32,95	0,40	1,22	100 %
10 x la LoD	16	31,51	0,69	2,20	31,38	0,74	2,37	100 %

Tableau 19 Répétabilité inter-sessions avec le ELITe BeGenius

Échantillon	N	Cible MecA			Cible SA			Concordance (%)
		Ct moyen	EC	% CV	Ct moyen	EC	% CV	
Négatif	16	-	-	-	-	-	-	100 %
3 x la LoD	16	32,69	0,36	1,10	31,86	0,34	1,07	100 %
10 x la LoD	16	30,90	0,29	0,94	30,11	0,30	1,01	100 %

Dans le test de répétabilité, le MRSA/SA ELITe MGB Kit a détecté tous les échantillons comme attendu et a montré une variabilité maximale des valeurs Ct de la cible (en tant que % CV) de 5 %.

12.4 Reproductibilité

La reproductibilité du test a été évaluée sur les instruments **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** en analysant un panel d'échantillons d'écouvillons nasaux prélevés avec un kit eSwab, incluant un échantillon négatif et des échantillons positifs dopés avec le MRSA/SA - ELITe Positive Control.

Un exemple de la reproductibilité inter-lots (sur deux lots) est présenté dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 20 Reproductibilité inter-lots avec le ELITe InGenius

Échantillon	N	Cible MecA			Cible SA			Concordance (%)
		Ct moyen	EC	% CV	Ct moyen	EC	% CV	
Négatif	16	-	-	-	-	-	-	100 %
3 x la LoD	16	33,37	0,34	1,01	33,17	0,42	1,27	100 %
10 x la LoD	16	31,58	0,67	2,11	31,61	0,64	2,01	100 %

Tableau 21 Reproductibilité inter-lots avec le ELITe BeGenius

Échantil-lon	N	Cible MecA			Cible SA			Concor-dance (%)
		Ct moyen	EC	% CV	Ct moyen	EC	% CV	
Négatif	16	-	-	-	-	-	-	100 %
3 x la LoD	16	32,72	0,30	0,92	31,94	0,33	1,04	100 %
10 x la LoD	16	31,01	0,21	0,67	30,25	0,25	0,83	100 %

Un exemple de la reproductibilité inter-instruments (sur deux instruments) est présenté dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 22 Reproductibilité inter-instruments avec le ELITe InGenius

Échantil-lon	N	Cible MecA			Cible SA			Concor-dance (%)
		Ct moyen	EC	% CV	Ct moyen	EC	% CV	
Négatif	16	-	-	-	-	-	-	100 %
3 x la LoD	16	32,94	0,47	1,44	33,04	0,39	1,18	100 %
10 x la LoD	16	30,97	0,38	1,23	31,09	0,43	1,37	100 %

Tableau 23 Reproductibilité inter-instruments avec le ELITe BeGenius

Échantil-lon	N	Cible MecA			Cible SA			Concor-dance (%)
		Ct moyen	EC	% CV	Ct moyen	EC	% CV	
Négatif	16	-	-	-	-	-	-	100 %
3 x la LoD	16	32,83	0,21	0,65	32,18	0,26	0,82	100 %
10 x la LoD	16	30,92	0,25	0,81	30,32	0,20	0,68	100 %

Dans le test de reproductibilité, le MRSA/SA ELITe MGB Kit a détecté tous les échantillons comme attendu et a montré une variabilité maximale des valeurs Ct des cibles (en tant que % CV) inférieure à 5 %.

12.5 Spécificité diagnostique : confirmation des échantillons négatifs

La spécificité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons négatifs, a été évaluée en association avec le **ELITe InGenius** en analysant des échantillons cliniques d'écouvillons nasaux et d'hémoculture négatifs pour le SARM/SA.

Étant donné que les performances analytiques du **ELITe BeGenius** sont équivalentes à celles du **ELITe InGenius**, les performances diagnostiques du test effectué sur les deux instruments sont également considérées comme équivalentes. En conséquence, la spécificité diagnostique du test obtenue en association avec le **ELITe InGenius** s'applique également au **ELITe BeGenius**.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 24

Échantillons	N	positif	négatif	Spécificité diagnostique (%)
Échantillons d'écouvillons nasaux négatifs pour l'ADN de SARM/SA	48	0	48	100
Échantillons d'hémoculture négatifs pour l'ADN de SARM/SA	34	0	34	100

La valeur seuil Ct de l'IC a été définie à 29 pour les échantillons d'écouvillons nasaux et d'hémoculture lorsqu'ils ont été testés sur les ELITE InGenius et ELITE BeGenius.

12.6 Sensibilité diagnostique : confirmation des échantillons positifs

La sensibilité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons cliniques positifs, a été évaluée en association avec le **ELITE InGenius** en analysant des échantillons cliniques d'écouvillons nasaux, positifs pour le SARM ou le SASM, ou dopés pour l'ADN de SARM en ajoutant le MRSA BAA-1556 (ATCC) à un titre de 100 000 UFC/mL, et des échantillons d'hémoculture positifs pour le SARM et le SASM ou dopés avec des isolats de SARM, en raison de la difficulté à trouver un nombre significatif d'échantillons cliniques positifs pour certains gènes cibles du SARM.

Étant donné que les performances analytiques du **ELITE BeGenius** sont équivalentes à celles du **ELITE InGenius**, les performances diagnostiques du test effectué sur les deux instruments sont également considérées comme équivalentes. En conséquence, la sensibilité diagnostique du test obtenue en association avec le **ELITE InGenius** s'applique également au **ELITE BeGenius**.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 25

Échantillons	N	positif	négatif	Sensibilité diagnostique (%)
Échantillons d'écouvillons nasaux positifs pour l'ADN de SASM	60	56	4	93
Échantillons d'écouvillons nasaux positifs pour l'ADN de SARM	41	40	1	98
Échantillons d'hémoculture positifs pour l'ADN de SASM	39	39	0	100
Échantillons d'hémoculture positifs pour l'ADN de SARM	31	31	0	100

13 ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES POUR D'AUTRES SYSTÈMES

13.1 Échantillons

Ce produit doit être utilisé avec de l'**ADN extrait** des échantillons cliniques suivants : écouvillons nasaux.

Les échantillons d'écouvillons nasaux destinés à l'extraction de l'ADN doivent être prélevés à l'aide d'écouvillons « BBL Culture Swab Plus Amies Gel without Charcoal swabs » (Becton-Dickinson) et identifiés conformément aux directives du laboratoire.

Les échantillons d'écouvillons nasaux doivent être transportés et stockés à +18/+25 °C pendant un jour maximum ; sinon, ils doivent être stockés à +2/+8 °C pendant sept jours maximum. Avant de commencer la procédure d'extraction, les échantillons d'écouvillons nasaux doivent être ensemencés dans 1 mL de bouillon trypticase soja (TSB - Soy Broth Trypticase) et agités au vortex pendant 10 secondes.

NOTE!

Lors de l'extraction de l'ADN avec le système « **NucliSENS® easyMAG®** », utiliser la configuration suivante.

Définir les paramètres d'extraction de la manière suivante :

- Matrice = Autre
- Protocole = Generic 2.0.1
- Volume (mL) = 1,0 mL
- Éluat (µL) = 50 µL
- Type = Primaire

Transférer **1 mL** de chaque échantillon de TSB dans le récipient à échantillons jetable à 8 puits, comme établi dans la fiche de travail de l'instrument, et distribuer le tampon de lyse. Pendant les 10 minutes d'incubation, préparer la suspension de silice magnétique pour 8 échantillons, en mélangeant **550 µL** de **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica**, **545 µL** d'**eau de qualité biologie moléculaire** et **5 µL** de **CPE**. Pour chaque échantillon, utiliser le pipetteur BioHit pour distribuer 125 µL de suspension de silice magnétique dans la NucliSENS easyMAG Strip for Premix. Utiliser le pipetteur BioHit pour transférer 100 µL de la suspension de silice magnétique dans chaque échantillon contenu dans le récipient à échantillons jetable à 8 puits, bien mélanger en pipetant de haut en bas à trois reprises, puis lancer la procédure d'extraction.

13.2 Substances interférentes

Les substances susceptibles d'interférer avec la détection du SA et du SARM à l'aide du **MRSA/SA ELITe MGB Kit** et de potentiellement générer des résultats non valides sont le propylène glycol et des quantités excessives de sécrétions nasales/mucus.

Hormis le propylène glycol, il a été démontré que les substances exogènes répertoriées ci-dessous, qui sont présentes dans les médicaments décongestionnans ou sont utilisées pour soulager la sécheresse et/ou l'irritation nasale, n'interfèrent pas avec la détection SARM/SA à l'aide du **MRSA/SA ELITe MGB Kit**. Il a été démontré que la présence de sang humain dans les échantillons n'interfère pas avec la détection du SARM/SA à l'aide du **MRSA/SA ELITe MGB Kit** utilisé en association avec le système **NucliSENS® easyMAG®**.

Tableau 26

Substance potentiellement interférente (Type)	Ingrédient actif	Interférence ?
Mucine isolée de la glande sous-maxillaire bovine, type I-S	Protéine de mucine purifiée	Non
Sang (humain)	Hémoglobine	Non
Sprays ou gouttes nasales	Phénylephrine	Non
	Oxymétaزoline	Non
	Chlorure de sodium avec conservateurs	Non
	Chlorure de benzalkonium	Non
	Phosphate de sodium	Non
	Phénylcarbinol	Non
	Propylène glycol	Oui
	Sorbitol, alcool benzylique	Non
	Edéate disodique, hypromellose	Non
	Acide phosphorique	Non

Tableau 26 (continued)

Substance potentiellement interférente (Type)	Ingrédient actif	Interférence ?
Corticostéroïdes ou gouttes nasales	Dexaméthasone	Non
	Triamcinolone	Non
	Béclométasone	Non
	Flunisolide	Non
	Budésonide	Non
	Mométasone	Non
	Fluticasone	Non
Gel nasal	Luffa operculata, soufre	Non
Médicament homéopathique anti-allergique	Galphimia glauca	Non
	Histaminum hydrochloricum	Non
Vaccin	Vaccin vivant intranasal contre le virus de la grippe	Non
Pastilles pour la gorge, à action anesthésique ou analgésique par voie orale	Benzocaïne, Menthol	Non
Médicaments antiviraux	Zanamivir, Oseltamivir phosphate	Non
Antibiotique, pommade nasale	Mupirocine	Non
Antibactérien, systémique	Tobramycine	Non

Les données expérimentales d'interférence ont été obtenues à l'aide du système d'extraction NucliSENS® easyMAG® et de la plateforme de détection 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument avec une version précédente du produit, à savoir le **MRSA/SA ELITe MGB Kit**, qui est identique au test actuel mais ne contient pas d'oligonucléotides spécifiques à *mecC*.

Aucune donnée n'est disponible en ce qui concerne d'éventuelles inhibitions par d'autres médicaments antiviraux, antibiotiques, chimiothérapiques ou immunosuppresseurs.

La présence d'une grande quantité d'ADN génomique humain dans l'ADN extrait de l'échantillon peut inhiber la réaction d'amplification.

13.3 Contrôles d'amplification

Il est indispensable de valider chaque session d'amplification avec une réaction de Negative Control et une réaction de Positive Control.

Pour le Negative Control, utiliser de l'eau de qualité biologique moléculaire (non incluse dans ce kit).

Pour le Positive Control, utiliser le produit **MRSA/SA - ELITePositive Control** (non inclus dans ce kit).

13.4 Contrôles de qualité

Il est recommandé de valider la procédure d'analyse complète de chaque session d'extraction et d'amplification en analysant un échantillon testé négatif et un échantillon testé positif ou un matériel de référence étalonné.

14 PROCÉDURES POUR D'AUTRES SYSTÈMES

14.1 Paramétrage de la session d'amplification en temps réel

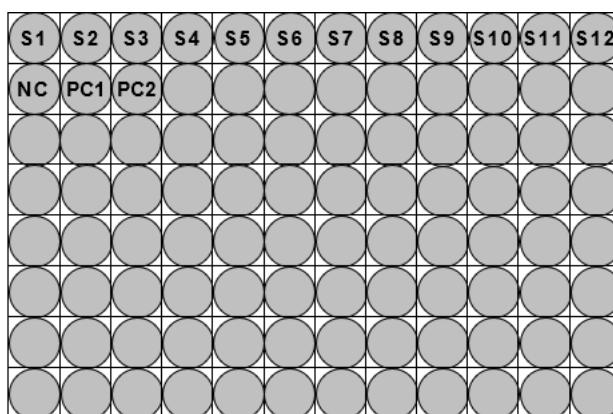
(À effectuer dans la zone dédiée à l'amplification/la détection des produits d'amplification)

Avec un instrument **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** :

Avant de commencer la session d'analyse, suivre les recommandations du fabricant fournies dans la documentation de l'instrument et :

- mettre l'ordinateur en marche, puis le thermocycleur en temps réel, exécuter le logiciel dédié et ouvrir une session de « absolute quantification » (quantification absolue) ;
- en cas d'utilisation du **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**, choisir le « Run mode: Fast 7500 » (run mode : Fast 7500) ;
- créer un nouvel ensemble de « detector » (détecteur) ou paramétrer le « detector » (détecteur) approprié dans le menu Tool (Outils) en sélectionnant le Detector Manager (Gestionnaire de détecteur) :
 1. paramétrer le « détecteur » (détecteur) pour la sonde du gène spécifique à SA, avec le « reporter » (rapporteur) = « TAMRA » (AP554 est similaire à TAMRA), le « quencher » (désactivateur) = « none » (aucun) (non fluorescent) et le nommer « SA » ;
 2. paramétrer le « détecteur » (détecteur) pour la sonde du gène spécifique à SA, avec le « reporter » (rapporteur) = « TAMRA » (AP554 est similaire à TAMRA), le « quencher » (désactivateur) = « none » (aucun) (non fluorescent) et le nommer « SA » ;
 3. paramétrer le « détecteur » (détecteur) pour les sondes des gènes *mecA* et *mecC*, avec le « reporter » (rapporteur) = « FAM », le « quencher » (désactivateur) = « none » (aucun) (non fluorescent) et le nommer « *mecA* » ;
 4. paramétrer le « détecteur » (détecteur) pour la sonde du Internal Control avec le « reporter » (rapporteur) = « Cy5 » (AP642 est similaire à Cy5), le « quencher » (désactivateur) = « none » (aucun) (non fluorescent) et le nommer « IC » ;
- accéder au menu « View » (Vue), sélectionner le « Well Inspector » (Inspecteur de puits) et, pour chaque puits utilisé dans la microplaque, paramétrer le « detector » (détecteur) (type de fluorescence à mesurer), la « passive reference » (référence passive) = « ROX » (AP593 est similaire à ROX) pour la normalisation de la fluorescence mesurée et le type de réaction (échantillon, contrôle négatif d'amplification, contrôle positif d'amplification). Ajouter ces informations à la Work Sheet (Fiche de travail) jointe à la fin du présent manuel ou imprimer la configuration de la microplaque. La **Work Sheet** (Fiche de travail) doit être scrupuleusement suivie pendant le transfert du mélange réactionnel complet et des échantillons dans les puits.

Un exemple de la manière dont l'analyse qualitative de 12 échantillons peut être organisée est présenté ci-dessous.



Légende : **S1 -S12** : échantillons à analyser ; **NC** : Negative Control d'amplification ;

PC1 : MRSA/SA Positive Control d'amplification ; **PC2** : LGA251/SA Positive Control d'amplification

En se reportant à la documentation de l'instrument, définir les paramètres du **cycle thermique** sur le logiciel dédié (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile [Instrument > Protocole du thermocycleur > Profil thermique]) :

- à l'étape d'amplification, ajouter (Add Step [Ajouter étape]) une **étape d'extension à 72 °C**,

NOTE!

L'acquisition de la fluorescence (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection [Instrument > Protocole du thermocycleur > Paramètres > Collecte de données]) doit être paramétrée pendant l'étape d'hybridation à 56 °C.

- modifier le temps comme indiqué dans le tableau « **Cycle thermique** » ci-dessous,
- paramétrier le nombre de cycles sur **45** ;
- paramétrier le volume de la réaction à **30 µL**.

Tableau 27

Cycle thermique		
Étape	Températures	Temps
Décontamination	50 °C	2 min.
Dénaturation initiale	93 °C	2 min.
Amplification et détection (45 cycles)	93 °C	10 s
	56 °C (collecte des données)	30 s
	72 °C	15 s

14.2 Paramétrage de l'amplification

(À effectuer dans la zone dédiée à l'extraction/la préparation de la réaction d'amplification)

Avant de commencer la session, il est nécessaire de :

- sortir et décongeler les tubes contenant les échantillons à analyser. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ;
 - sortir et décongeler les tubes de **MRSA/SA PCR Mix** requis pour la session d'analyse, en se rappelant que le contenu de chaque tube est suffisant pour préparer **25 réactions**. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ;
 - sortir et décongeler un tube de **MRSA/SA Positive Control** (contrôle positif d'amplification en temps réel pour le gène spécifique à SA et le gène *mecA*). Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver le tube sur de la glace pendant quatre heures maximum ;
 - Sortir et décongeler un tube de **LGA251/SA Positive Control** (contrôle positif d'amplification en temps réel pour le gène *mecC*). Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver le tube sur de la glace pendant quatre heures maximum ;
 - se munir de la **microplaqué d'amplification** qui sera utilisée pendant la session d'analyse, en veillant à la manipuler avec des gants non poudrés et à ne pas endommager les puits.
1. Distribuer avec précision **20 µL** de **MRSA/SA PCR Mix** au fond des puits de la **microplaqué d'amplification**, comme précédemment établi dans la **Work Sheet** (Fiche de travail). Éviter d'introduire des bulles.

NOTE!

Si le mélange réactionnel n'est pas utilisé en intégralité, conserver le volume restant dans l'obscurité à -20 °C pendant un mois au maximum. Congeler et décongeler le mélange réactionnel **cinq fois** au maximum.

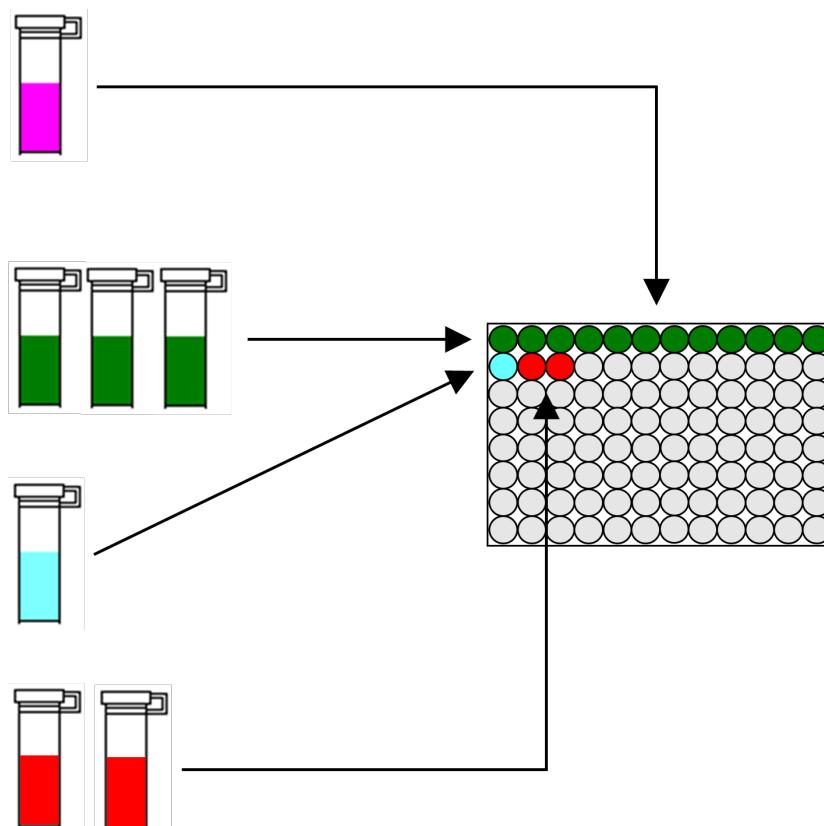
2. Ajouter au mélange réactionnel **10 µL** du premier échantillon traité dans le puits désigné, comme précédemment établi dans la **Work Sheet** (Fiche de travail). Bien mélanger l'échantillon en pipetant **l'ADN extrait** à trois reprises dans le mélange réactionnel. Éviter d'introduire des bulles. Procéder de la même manière avec les autres échantillons extraits.

3. Ajouter au mélange réactionnel **10 µL d'eau de qualité biologie moléculaire** (non fournie) dans le puits du Contrôle négatif, comme précédemment établi dans la **Work Sheet** (Fiche de travail). Bien mélanger le contrôle négatif en pipetant l'**eau de qualité biologie moléculaire** à trois reprises dans le mélange réactionnel. Éviter d'introduire des bulles.
4. Ajouter au mélange réactionnel **10 µL de MRSA/SA Positive Control** dans le puits désigné, comme précédemment établi dans la **Work Sheet** (Fiche de travail). Bien mélanger le contrôle positif en pipetant le **MRSA/SA Positive Control** à trois reprises dans le mélange réactionnel. Éviter d'introduire des bulles.
5. Ajouter au mélange réactionnel **10 µL de LGA251/SA Positive Control** dans le puits désigné, comme précédemment établi dans la **Work Sheet** (Fiche de travail). Bien mélanger le contrôle positif en pipetant le **LGA251/SA Positive Control** à trois reprises dans le mélange réactionnel. Éviter d'introduire des bulles.
6. Sceller avec précision la **microplaque d'amplification** à l'aide de la **feuille adhésive d'amplification**.
7. Transférer la **microplaque d'amplification** dans le thermocycleur en temps réel placé dans la zone d'amplification/de détection des produits d'amplification, et lancer le cycle thermique d'amplification. Enregistrer les paramètres de la session d'analyse avec un nom de fichier univoque et reconnaissable (p. ex., « année-mois-jour-MRSA/SA-EGSpA »).

NOTE!

À la fin du cycle thermique, la **microplaque d'amplification** contenant les produits de la réaction doit être retirée de l'instrument et mise au rebut en évitant toute contamination environnementale. Afin d'éviter de renverser les produits de la réaction, la **feuille de scellage d'amplification ne doit pas être retirée de la microplaque d'amplification**.

La figure suivante présente de manière synthétique la préparation de la réaction d'amplification.



1. Ajouter **20 µL de PCR Mix**
2. Ajouter **10 µL des ADN extraits**
3. Ajouter **10 µL de Contrôle négatif**
4. Ajouter **10 µL des Contrôles positifs**

14.3 Analyse qualitative des résultats

Les valeurs enregistrées de la fluorescence émise par la sonde du gène spécifique à SA (détecteur TAMRA « SA »), par les sondes des gènes *mecA* et *mecC* (détecteur FAM « *mecA* ») et par la sonde du Internal Control (détecteur Cy5 « IC ») pendant les réactions d'amplification doivent être analysées par le logiciel de l'instrument.

Avant de commencer l'analyse, suivre les recommandations du fabricant fournies dans la documentation de l'instrument et :

- configurer (Results > Amplification plot > delta Rn vs. Cycle [Résultats > Tracé d'amplification > delta Rn vs. Cycle]) les **Analysis Settings** (Paramètres d'analyse) pour tous les détecteurs sur **Auto Baseline** (Référence auto) et **Manual Ct** (Ct manuel), avec le **Threshold** (Seuil) paramétré sur **0,1**. Appuyer sur le bouton **Analyze** (Analyser) et **enregistrer** les résultats.

Les valeurs de la fluorescence émise par les sondes spécifiques pendant la réaction d'amplification et la valeur **Threshold** (Seuil) de la fluorescence permettent de déterminer le **Threshold Cycle (Ct)** (Cycle seuil [Ct]). Le Ct est le cycle pendant lequel la fluorescence a atteint la valeur **Threshold** (Seuil) et il est proportionnel à la quantité cible initiale.

Dans les réactions d'amplification du **MRSA/SA Positive Control** et du **LGA251/SA Positive Control**, les valeurs **Ct** des détecteurs SA et *mecA* (Results > Report [Résultats > Rapport]) sont utilisées pour valider l'amplification et la détection, comme décrit dans le tableau suivant :

Tableau 28

Réaction du Contrôle positif détecteur TAMRA « SA »	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct ≤ 35	POSITIF	CORRECTE

Tableau 29

Réaction du Contrôle positif détecteur FAM « <i>mecA</i> »	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct ≤ 35	POSITIF	CORRECTE

Si le résultat de l'amplification des **Positive Controls** (Contrôles positifs) est **Ct > 35** ou **Ct Undetermined** (Ct Indéterminé) pour les détecteurs SA et *mecA*, alors l'ADN des cibles n'a pas été correctement détecté. Cela signifie que des problèmes sont survenus pendant l'étape d'amplification ou de détection (distribution incorrecte du mélange réactionnel ou des contrôles positifs, dégradation du mélange réactionnel ou des contrôles positifs, paramétrage incorrect de la position du contrôle positif, paramétrage incorrect du cycle thermique), ce qui peut générer des résultats incorrects. La session d'analyse n'est pas valide et doit être répétée en commençant par l'étape d'amplification.

Dans la réaction d'amplification du **Contrôle négatif**, les valeurs **Ct** des détecteurs SA, *mecA* et IC (Results Report) (Résultats > Rapport) sont utilisées pour valider l'amplification et la détection, comme décrit dans le tableau suivant :

Tableau 30

Réaction du Contrôle négatif détecteur TAMRA « SA »	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct Indéterminé ou Ct > 35	NÉGATIF	CORRECTE

Tableau 31

Réaction du Contrôle négatif détecteur FAM « <i>mecA</i> »	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct Indéterminé ou Ct > 35	NÉGATIF	CORRECTE

Tableau 32

Réaction du Contrôle négatif détecteur Cy5 « IC »	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct Indéterminé ou Ct \geq 34	NÉGATIF	CORRECTE

Si le résultat de l'amplification du **Negative Control** (Contrôle négatif) est **Ct \leq 35** pour les détecteurs SA ou mecA, et **Ct < 34** pour le détecteur IC, alors l'ADN cible n'a pas été correctement détecté. Cela signifie que des problèmes sont survenus pendant l'étape d'amplification (contamination), ce qui peut générer des résultats incorrects et des faux positifs. La session d'analyse n'est pas valide et doit être répétée en commençant par l'étape d'amplification.

Dans la réaction d'amplification de chaque **échantillon**, les valeurs **Ct** des détecteurs mecA et SA sont utilisées pour détecter l'ADN des cibles alors que la valeur **Ct** du Internal Control est utilisée pour valider l'extraction, l'amplification et la détection.

NOTE!

À l'aide du logiciel de l'instrument (Results > Amplification plot > delta Rn vs. Cycle [Résultats > Tracé d'amplification > delta Rn vs. Cycle]), vérifier que le **Ct** a été déterminé par une augmentation rapide et régulière de la fluorescence, et non par des pics ou une augmentation du bruit de fond (bruit de fond irrégulier ou important).

Les valeurs **Ct** des réactions d'amplification de chaque **échantillon** (Results > Report [Résultats > Rapport]), sont utilisées comme indiqué dans le tableau suivant :

Tableau 33

Réaction de l'échantillon				Résultat du test	
détecteur TAMRA « SA » (Ct1)	détecteur FAM « mecA » (Ct2)	$\Delta Ct Ct1 - Ct2 $	détecteur Cy5 « IC »	Résultat SA	Résultat SARM
Indéterminé ou Ct > 35	Indéterminé ou Ct > 35	N.A.	Ct < 34	Négatif	Négatif
		N.A.	Indéterminé ou Ct ≥ 34	Non valide	Non valide
Déterminé, Ct ≤ 35	Indéterminé ou Ct > 35	N.A.	N.A.	Positif	Négatif
	Déterminé, Ct ≤ 35	$\Delta Ct \geq 2$	N.A.	Positif	Négatif
		$\Delta Ct < 2$	N.A.	Positif	Positif
Indéterminé ou Ct > 35	Déterminé, Ct ≤ 35	N.A.	N.A.	Négatif	Négatif

Tableau 34

Résultat du test		Interprétation du résultat
Résultat SA	Résultat SARM	
Négatif	Négatif	Pas d'ADN de SA, ni de SARM, détecté. L'échantillon est présumé négatif pour tous les SA, y compris les SARM, ou le nombre d'organismes est inférieur à la limite de détection.
Non valide	Non valide	Résultat non valide. Répéter l'analyse à partir de l'extraction de l'échantillon ou d'un nouvel échantillon.

Tableau 34 (continued)

Résultat du test		Interprétation du résultat
Résultat SA	Résultat SARM	
Positif	Négatif	Pas d'ADN de MRSA détecté. L'échantillon est présumé négatif pour le SARM, ou le nombre de SARM est inférieur à la limite de détection. ADN de SA détecté. L'échantillon est présumé positif pour le SA.
Positif	Positif	ADN de SARM détecté. L'échantillon est présumé positif pour le SARM.

NA = non applicable

La présence des deux marqueurs (gène SA et *mecA*) mesurée par une valeur Ct à la même quantité relative (une différence de Ct inférieure à 2) indique la présence du SARM (y compris la souche *mecC*). Des quantités relatives différentes (une différence de Ct supérieure ou égale à 2) ou la présence du seul gène marqueur spécifique à *Staphylococcus aureus* indiquent la présence du SA.

Si le résultat de la réaction d'amplification de l'échantillon est **Ct Undetermined** (Ct Indéterminé) ou **Ct > 35** pour les détecteurs SA et *mecA*, et **Ct Undetermined** (Ct Indéterminé) ou **Ct ≥ 34** pour le détecteur IC, cela signifie qu'il n'a pas été possible de détecter efficacement l'ADN du Internal Control. Dans ce cas, des problèmes sont survenus pendant l'étape d'amplification (amplification inefficace ou aucune amplification) ou pendant l'étape d'extraction (dégradation de l'ADN, perte d'ADN pendant l'extraction ou présence d'inhibiteurs dans l'ADN extrait), ce qui peut générer des résultats incorrects et des faux négatifs. L'échantillon n'est pas adéquat, le test n'est pas valide et doit être répété en commençant par l'extraction de l'échantillon ou d'un nouvel échantillon du même patient.

Si le résultat de l'amplification de l'échantillon est **Ct Undetermined** (Ct Indéterminé) ou **Ct ≥ 35** pour le détecteur SA, et **Ct < 34** pour le détecteur IC, cela signifie que l'ADN du SA (y compris SARM) n'a pas été détecté dans l'échantillon traité. L'échantillon est présumé négatif ou le nombre d'organismes dans l'échantillon est inférieur à la limite de détection du produit (se reporter à la section [15 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC D'AUTRES SYSTÈMES page 34](#)). Dans ce cas, le résultat pourrait être un faux négatif.

NOTE!

Lorsque l'ADN du SA ou du SARM est détecté dans un échantillon, le détecteur IC peut être **Ct Undetermined** (Ct indéterminé) ou **Ct ≥ 34**. En fait, l'amplification hautement efficace du SA ou du SARM peut entrer en compétition avec l'amplification faiblement efficace du Internal Control. Dans ce cas, l'échantillon est adéquat et le résultat positif du test est valide.

15 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC D'AUTRES SYSTÈMES

15.1 Performance clinique

Les caractéristiques de performance du test ont été déterminées en comparant le **MRSA/SA ELITE MGB Kit** utilisé en association avec le système **NucliSENS® easyMAG®** avec les tests Remel Spectra™ MRSA et/ou d'agglutination/sensibilité. Un échantillon en culture est défini comme un vrai positif pour le SARM lorsque le SARM a été identifié par l'une des techniques de culture utilisées. Un échantillon en culture est défini comme un vrai positif pour le SA sensible à la méticilline lorsqu'il a été identifié comme un échantillon négatif par toutes les techniques de cultures utilisées à l'exception du test d'agglutination au latex.

Un écouvillon nasal a été prélevé chez chaque patient et a été utilisé pour inoculer une plaque de gélose chromogénique sélective pour le dépistage du SARM (Remel Spectra™ MRSA). Le prélèvement a ensuite été inséré dans tube contenant un bouillon trypticase soja et a été soigneusement mélangé. L'intégralité du volume de la suspension cellulaire a été ensuite traité comme décrit ci-dessus. Par la suite, chaque prélèvement a été enrichi dans un bouillon trypticase soja contenant du NaCl à 6,5 %. Les cultures enrichies ont été inoculées sur des plaques de gélose trypticase soja au sang. Les colonies provenant des plaques de gélose trypticase soja au sang ont été utilisées pour le test d'agglutination au latex (Remel Staphaurex®). Conformément aux modes d'emploi respectifs, les échantillons positifs pour le test d'agglutination au latex ont été utilisés pour le test de sensibilité à la céfoxitine (BD BBL™ SensiDisc™ Susceptibility Test Disc Cefoxitin 20).

Les performances du **MRSA/SA ELITe MGB Kit** ont été calculées en combinant les résultats de la culture chromogénique directe et ceux de la culture en bouillon suivie des tests d'agglutination au latex et de sensibilité à la céfoxitine.

Des écouvillons nasaux, provenant d'un établissement de soins de santé ou de donneurs sains, ont été prélevés et testés par une combinaison de méthodes de culture comme décrit ci-dessus. 20 échantillons positifs en culture pour le SARM, 20 échantillons positifs en culture pour le SASM et 40 échantillons négatifs en culture pour le SA ont été identifiés. Parmi les 40 échantillons négatifs en culture pour le SA, 20 échantillons ont été dopés avec la souche MRSA BAA-2312 (porteuse du gène *mecC*) à une concentration proche de la LoD.

Par rapport à la méthode de culture de référence, le **MRSA/SA ELITe MGB Kit** a identifié 100 % des échantillons positifs pour le SARM et pour le SARM *mecC* (sensibilité diagnostique), et 97,5 % des échantillons négatifs (spécificité diagnostique). Pour les échantillons testés pour le SARM, la valeur prédictive positive (VPP) était de 97,6 % et la valeur prédictive négative (VPN) était de 100 %.

Tableau 35 Résultats pour le SARM obtenus avec le MRSA/SA ELITe MGB Kit par rapport à la méthode de référence.

	SARM <i>mecA</i> Sensibilité diagnostique	SARM <i>mecC</i> Sensibilité diagnostique	SARM Spécificité diagnostique
7500 Fast Dx Real Time PCR Instrument	100 %	100 %	97,5 %
7500 Real Time PCR System	100 %	100 %	97,5 %

Par rapport à la méthode de culture de référence, le **MRSA/SA ELITe MGB Kit** a identifié 95 % des échantillons positifs pour le SA (sensibilité diagnostique) et 100 % des échantillons négatifs (spécificité diagnostique). Pour les échantillons testés pour le SA, la valeur prédictive positive (VPP) était de 100 % et la valeur prédictive négative (VPN) était de 95 %.

Tableau 36 Résultats pour le SA obtenus avec le SA/SA ELITe MGB Kit par rapport à la méthode de référence.

	SA Sensibilité diagnostique	SA Spécificité diagnostique
7500 Fast Dx Real Time PCR Instrument	95 %	100 %
7500 Real Time PCR System	95 %	100 %

15.2 Limite de détection

La limite de détection (LoD) du **MRSA/SA ELITe MGB Kit** utilisé en association avec le système **NucliSENS® easyMAG®** a été déterminée en utilisant les souches indiquées ci-dessous. Les cultures de ces souches ont été quantifiées, diluées dans une matrice reproduisant un échantillon nasal, puis ensemencées sur un écouvillon. La dilution est approximative et est comprise entre 5 et 1500 unités formant colonie (UFC). Toutes les dilutions ont été testées et la limite de détection (LoD) a été déterminé par une analyse des probits. La LoD pour chaque souche représente le plus petit nombre d'UFC/prélèvement pour lequel un résultat positif sera obtenu avec une probabilité de 95 % et une confiance d'au moins 95 %. La LoD pour chaque souche a ensuite été vérifiée en testant au moins 20 répliques.

Tableau 37 Liste des souches bactériennes pour les études de détermination de la LoD

Souche	Désignation	Description	Résistance pharmacologique
ATCC 29213	Wichita	Souche du QC	SASM
ATCC BAA-1556	MRSA252	Infection nosocomiale, Royaume-Uni	SARM
ATCC BAA-2312	M10/0061	LGA251	SARM

Tableau 38 Résultat de la limite de détection (UFC/prélèvement)

	ATCC 29213	BAA-1556	BAA-2312
ABI 7500 Fast	210	159	237
ABI 7500 Standard	262	141	314

15.3 Efficacité de détection des génotypes (inclusivité)

Les performances du **MRSA/SA ELITE MGB Kit** utilisé en association avec le système **NucliSENS® easyMAG®** ont été testées avec le panel MRSA/SA QCMD. Toutes les souches ont été correctement identifiées. De plus, 1. Le test a été réalisé contre 75 isolats de SARM et de SA sensibles à la méticilline bien caractérisés, représentatifs de la diversité génétique mondiale, incluant des complexes clonaux et des types de séquences ainsi que divers types d'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) et valeurs de CMI (concentration minimale inhibitrice).

Les souches ont été obtenues à partir du Programme NARSA (Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus*) ou auprès de l'ATCC (American Tissue Culture Collection), ou elles ont été offertes par le Medical College of Wisconsin 2.

Toutes les souches ont été ensemencées sur des écouvillons à une concentration proche de la limite de détection, puis ont été testées. De plus, toutes les souches de SA sensibles à la méticilline ont été testées à une concentration de 1×10^6 UFC/prélèvement. Toutes les souches de SA sensibles à la méticilline testées étaient positives pour le SA et négatives pour le SARM. Toutes les souches de SARM testées étaient positives pour le SARM. Deux isolats de BORSA (*Staphylococcus aureus* présentant une résistance de bas niveau à l'oxacilline) dépourvus du gène *mecA* testés étaient positifs pour le SA et négatifs pour le SARM, ce qui a donné lieu à une efficacité globale de détection du génotype (inclusivité) de 97,3 %

L'analyse des régions choisies pour l'hybridation des amorces et des sondes fluorescentes dans l'alignement des séquences disponibles dans la base de données pour les éléments SSC *mecA*, incluant *mecC*, a montré leur conservation et une absence de mutations significatives.

15.4 Spécificité analytique (réactivité croisée)

L'analyse de l'alignement des séquences des amorces SA et de la sonde fluorescente avec les séquences d'espèces phylogénétiquement apparentées à *Staphylococcus aureus*, de micro-organismes pathogènes et de micro-organismes couramment présents dans la microflore nasale normale disponibles dans les bases de données d'organismes autres que la SA, a montré leur spécificité et l'absence d'homologie significative avec le **MRSA/SA ELITE MGB Kit**.

- les données expérimentales du test ont été obtenues à l'aide du système d'extraction NucliSENS® easyMAG® et du 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument avec une version antérieure du test, qui est identique à la version actuelle sauf qu'elle ne contient pas les oligonucléotides spécifiques à **mecALGA251**
- (Don du Dr. Nathan A. Ledeboer, Medical College of Wisconsin, WI ; les souches sont décrites dans : Buchan, B.W, Ledeboer, N.A. Identification of Two Borderline Oxacillin-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus* From Routine Nares Swab Specimens by One of Three Chromogenic Agars Evaluated for the Detection of MRSA, *Microbiology and Infectious Disease*.2010;134:921-927

Tableau 39 Espèces testées pour la réactivité croisée par l'analyse d'une base de données de séquences

Espèces de <i>Staphylococci</i>		Autres organismes	Virus
<i>Staphylococcus arlettae</i>	CoNS	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	<i>Adénovirus type 1,7</i>
<i>Staphylococcus capitis</i>	CoNS	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Coronavirus humain 229E, OC 43</i>
<i>Staphylococcus carnosus</i>	CoNS	<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Cytomégalovirus</i>
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	CoNS	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Coxsackievirus A21</i>
<i>Staphylococcus delphini</i>	MSCoPS	<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Virus d'Epstein-Barr</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MSCoNS	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	<i>Virus de la grippe A et B humaine</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MRCoNS	<i>Corynebacterium bovis</i>	<i>Virus parainfluenza humain de type 1, 2, 3, 4</i>
<i>Staphylococcus equorum</i>	CoNS	<i>Corynebacterium flavescens</i>	<i>Métapneumovirus humain</i>
<i>Staphylococcus felis</i>	CoNS	<i>Corynebacterium genitalium</i>	<i>Virus de la rougeole</i>
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	CoNS	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Virus des oreillons</i>
<i>Staphylococcus hyicus</i>	CoPS	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Virus respiratoire syncytial de type B</i>
<i>Staphylococcus intermedius</i>	CoPS	<i>Enterococcus flavescens</i>	<i>Rhinovirus</i>
<i>Staphylococcus kloosii</i>	CoNS	<i>Enterococcus gallinarum</i>	
<i>Staphylococcus lentus</i>	CoNS	<i>Enterococcus hirae</i>	
<i>Staphylococcus pulvereri</i>	CoNS	<i>Escherichia coli</i>	
<i>Staphylococcus simulans</i>	CoNS	<i>Klebsiella oxytoca</i>	
<i>Staphylococcus warneri</i>	CoNS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Staphylococcus xylosus</i>	MSCoNS	<i>Listeria monocytogenes</i>	
		<i>Micrococcus luteus</i>	
		<i>Moraxella catarrhalis</i>	
		<i>Pasteurella aerogenes</i>	
		<i>Proteus mirabilis</i>	
		<i>Proteus vulgaris</i>	
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
		<i>Salmonella typhimurium</i>	
		<i>Serratia marcescens</i>	
		<i>Shigella sonnei</i>	
		<i>Streptococcus mitis</i>	
		<i>Streptococcus salivarius</i>	

Tableau 39 Espèces testées pour la réactivité croisée par l'analyse d'une base de données de séquences (continued)

Espèces de <i>Staphylococci</i>		Autres organismes	Virus
		<i>Yersinia enterocolitica</i>	
		<i>Candida albicans</i>	
		<i>Candida glabrata</i>	
		<i>Cryptococcus neoformans</i>	
		<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
		<i>Legionella pneumophila</i>	
		<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
		<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
		<i>Neisseria meningitidis</i>	
		<i>Streptococcus mutans</i>	
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
		<i>Streptococcus pyogenes</i>	
		<i>Homo sapiens</i>	

CoNS = *Staphylococcus* à coagulase négative.

MSCoNS = *Staphylococcus* à coagulase négative et sensible à la méticilline.

MRCoNS = *Staphylococcus* à coagulase négative et résistant à la méticilline.

CoPS = *Staphylococcus* à coagulase positive.

15.5 Reproductibilité avec un matériel de référence certifié

La sensibilité analytique du test, en tant que reproductibilité des résultats par comparaison aux résultats obtenus avec d'autres tests dans différents laboratoires, a été vérifiée en testant un panel d'un matériel de référence certifié.

Les tests ont été réalisés en utilisant, à titre de matériel de référence certifié et étalonné, un panel de dilutions de SARM (QCMD 2010 Methicillin Resistant *S. aureus* EQA Panel). Le panel est composé de six échantillons contenant diverses concentrations de SARM, trois échantillons contenant *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline (SASM), un échantillon contenant des Staphylocoques à coagulase négative résistants à la méticilline (MRCoNS), un échantillon contenant *Escherichia coli* (*E. Coli*) et un échantillon vrai négatif. Chaque échantillon du panel a été testé en 2 réplicats en effectuant la procédure d'analyse complète : extraction avec le système NucliSENS® easyMAG® et amplification avec les produits de ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 40 Tests avec un matériel de référence certifié

ID de l'échantillon	Contenu	Conc. échantillon UFC/mL	Résultat attendu	Résultat obtenu
MRSADNA10-04	SARM	1×10^8	Fréquemment détecté	Détecté
MRSADNA10-03	SARM	5×10^7	Fréquemment détecté	Détecté
MRSADNA10-01	SARM	5×10^6	Fréquemment détecté	Détecté

Tableau 40 Tests avec un matériel de référence certifié (continued)

MRSADNA10-09	SARM	5×10^5	Fréquemment détecté	Détecté
MRSADNA10-08	SARM	5×10^5	Fréquemment détecté	Détecté
MRSADNA10-02	SARM	5×10^5	Détecté	Détecté
MRSADNA10-05	SASM	5×10^6	Négatif pour le SARM	Négatif pour le SARM, positif pour le SA
MRSADNA10-06	SASM	1×10^7	Négatif pour le SARM	Négatif pour le SARM, positif pour le SA
MRSADNA10-07	SASM	5×10^6	Négatif pour le SARM	Négatif pour le SARM, positif pour le SA
MRSADNA10-12	MRCoNS	1×10^7	Négatif	Négatif
MRSADNA10-10	E. coli	5×10^6	Négatif	Négatif
MRSADNA10-11	MHB seulement	-	Négatif	Négatif

Tous les échantillons ont été correctement détectés.

15.6 Effet de transfert/contamination croisée

Une étude analytique a été réalisée pour évaluer le potentiel de contamination croisée entre des échantillons contenant une forte concentration de SARM (1×10^7 UFC/mL) et des échantillons négatifs tout au long du flux de travail du **MRSA/SA ELITE MGB Kit**. Deux opérateurs ont effectué cinq séries d'extraction de 24 échantillons (11 échantillons à forte concentration en SARM, 11 échantillons négatifs, 1 échantillon de Contrôle positif et 1 échantillon de Contrôle négatif par série) selon un modèle en damier (échantillons à forte concentration en SARM en alternance avec des échantillons négatifs). Les échantillons traités ont ensuite été amplifiés en cinq séries distinctes en utilisant deux modèles en damier différents. Les tests de contamination croisée ont donné lieu à zéro faux négatif parmi cinquante-cinq échantillons fortement positifs pour le SARM et à un faux positif parmi cinquante-cinq échantillons négatifs.

Les données de l'effet de transfert/contamination croisée ont été obtenues à l'aide du système d'extraction NucliSENS® easyMAG® et du 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument en utilisant une version antérieure du test, le **MRSA/SA ELITE MGB Kit**, qui est identique à la version actuelle sauf qu'il ne contient pas d'oligonucléotides spécifiques à *mecC*.

NOTE!

Les données complètes et les résultats des tests effectués pour évaluer les caractéristiques de performance du produit avec les instruments sont présentés à la section 7 de la Fiche technique du produit « MRSA/SA ELITE MGB® Kit », FTP M800351.

16 BIBLIOGRAPHIE

Centers for Disease Control and Prevention. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1992 through June 2004. Am J Infect Control 32:470-485, October 2004.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Surveillance for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Principles, Practices, and Challenges; A Report. CLSI Document X07-R (ISBN 1-56238-719-7) Wayne, PA:CLSI, 2010.

Jernigan, J. A. et al. Prevalence of and risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at the time of hospital admission. Infect Control Hosp Epidemiol. 2003; 24:409-414.

Garcia-Alvarez, L. et al. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect Dis 2011, 11:595-603.

Stegger, M. et al. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecALGA251*. Clin Microbiol Infect 2012; 18:395-400.

Ito T. et al. Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. Antimicrob Agents Chemother. 2012 october; 56(10): 4997–4999.

17 LIMITES DE LA PROCÉDURE

Utiliser ce produit uniquement avec les échantillons cliniques suivants : écouvillons nasaux et hémoculture.

Il n'existe actuellement aucune donnée disponible concernant les performances du produit avec d'autres échantillons cliniques.

Ne pas utiliser d'ADN extrait contaminé par des mucoprotéïnes, du propylène glycol, de l'éthanol ou du 2-propanol. Ces substances inhibent l'amplification des acides nucléiques et peuvent générer des résultats non valides.

Ne pas utiliser d'ADN extrait contenant d'importantes quantités d'ADN génomique humain qui peut inhiber l'amplification des acides nucléiques.

Les résultats obtenus avec ce produit dépendent de l'identification, de la collecte, du transport, de la conservation et du traitement appropriés 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 le produit.

La méthode de PCR en temps réel utilisée dans ce produit présente une sensibilité analytique élevée qui la rend sensible à une contamination par les échantillons cliniques positifs, les Positive Controls et les produits de PCR. Une contamination croisée peut générer des résultats faux positifs. Le format du produit est conçu pour limiter la contamination croisée. Toutefois, une contamination croisée ne peut être évitée 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 un équipement de protection individuelle et de disposer de zones appropriées 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 équipements de protection individuelle et d'utiliser des instruments dédiés au paramétrage des sessions de travail afin d'éviter tout résultat faux positif.

Afin d'éviter des résultats incorrects, ce produit doit être manipulé par du personnel professionnel, qualifié et formé aux techniques de biologie moléculaire telles que l'extraction, la PCR et la détection des acides nucléiques.

Il est nécessaire de disposer de zones séparées pour la préparation du mélange réactionnel complet et l'extraction/la préparation des réactions d'amplification et l'amplification/la détection des produits d'amplification afin d'éviter d'obtenir des résultats « faux positifs ».

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 positif obtenu avec ce produit n'indique pas la présence d'un SA ou SARM viable mais permet de présumer de la présence du SA ou SARM. Par conséquent, un résultat positif n'indique pas nécessairement un échec de l'intervention d'éradication étant donné que de l'ADN non viable peut persister.

Un résultat négatif obtenu avec ce produit signifie que l'ADN du SA ou du SARM 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 du SA ou du SARM soit présent à un titre inférieur à la limite de détection du produit (se reporter à la section « Caractéristiques de performance » à la page 15). Dans ce cas, le résultat pourrait être un faux négatif.

Un résultat négatif obtenu après un résultat précédemment positif n'indique pas nécessairement le succès de l'éradication.

Les résultats obtenus avec ce produit peuvent parfois être « non valides » en raison d'une défaillance du contrôle interne et nécessitent d'effectuer un nouveau test, ce qui peut entraîner un retard d'obtention des résultats finaux.

Bien que rares, des polymorphismes au sein de la région du génome bactérien couverte par les amorces et les sondes du produit peuvent affecter la détection.

La détection du SARM en présence de quantités excessives de SA sensible à la méticilline ou de porteurs de *mecA* à coagulase négative pourrait être altérée.

Les BORSA (Borderline Oxacillin Resistant *Staphylococcus aureus*) qui ne portent pas le gène *mecA* ne sont pas détectés par le produit.

Comme avec tout autre dispositif médical de diagnostic, les résultats obtenus avec ce produit doivent être interprétés en association avec l'ensemble des observations cliniques et des résultats de laboratoire pertinents.

Comme avec tout autre dispositif médical de diagnostic, il existe un risque résiduel d'obtention de résultats non valides, ou de résultats erronés 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. Néanmoins, ce risque résiduel associé à l'utilisation prévue du produit a été évalué comme acceptable au regard des avantages potentiels pour le patient.

18 PROBLÈMES ET SOLUTIONS

ELITe InGenius et ELITe BeGenius

Tableau 41

Réaction Positive Control non valide	
Causes possibles	Solutions
Erreurs de paramétrage de l'instrument.	Vérifier la position du PCR Mix et du Contrôle positif. Vérifier les volumes du PCR Mix et du Positive Control.
Dégénération du PCR Mix.	Ne pas utiliser le PCR Mix pendant plus de 5 sessions d'analyse indépendantes (de 3 heures chacune dans le bloc réfrigéré de la « Inventory Area » [Zone de stockage] ou dans la Cooler Unit). Ne pas utiliser le PCR Mix pendant plus de 5 sessions d'analyse consécutives (dans le bloc réfrigéré de la « Inventory Area » [Zone de Stockage] ou dans la Cooler Unit). Ne pas laisser le PCR Mix à température ambiante pendant plus de 30 minutes. Utiliser une nouvelle aliquote du PCR Mix.
Dégénération du Positive Control.	Ne pas utiliser le Positive Control pendant plus de 4 sessions d'analyse indépendantes (de 3 heures chacune dans la « Extraction Area » [Zone d'extraction] ou dans la Cooler Unit [unité de refroidissement]). Utiliser une nouvelle aliquote du Positive Control.
Erreur de l'instrument.	Contacter le service technique d'ELITechGroup.

Tableau 42

Réaction du Contrôle négatif non valide	
Causes possibles	Solutions
Erreurs de paramétrage de l'instrument.	Vérifier la position du PCR Mix et du Contrôle négatif. Vérifier les volumes du PCR Mix et du Negative Control.
Contamination du Negative Control.	Ne pas utiliser le Negative Control pour plus d'une (1) session d'analyse. Utiliser une nouvelle aliquote d'eau de qualité biologie moléculaire.

Tableau 42 (continued)

Réaction du Contrôle négatif non valide	
Causes possibles	Solutions
Contamination du PCR Mix.	Utiliser une nouvelle aliquote du PCR Mix.
Contamination de la zone d'extraction, des racks, du « Inventory Block » (Gestionnaire de stocks) ou de la Cooler Unit.	Nettoyer les surfaces avec des détergents aqueux, laver les blouses de laboratoire, remplacer les tubes et les cônes utilisés.
Erreur de l'instrument.	Contacter le service technique d'ELITechGroup.

Tableau 43

Réaction de l'échantillon non valide	
Causes possibles	Solutions
Erreur de paramétrage de l'instrument.	Vérifier la position du PCR Mix, de l'Internal Control et de l'échantillon. Vérifier les volumes du PCR Mix, de l'Internal Control et de l'échantillon.
Dégradation du PCR Mix.	Ne pas utiliser le PCR Mix pendant plus de 5 sessions d'analyse indépendantes (de 3 heures chacune dans la « Inventory Area » [Zone de Stockage] ou dans la Cooler Unit). Ne pas utiliser le PCR Mix pendant plus de 5 sessions d'analyse consécutives (dans le bloc réfrigéré de la « Inventory Area » [Zone de Stockage] ou dans la Cooler Unit). Ne pas laisser le PCR Mix à température ambiante pendant plus de 30 minutes. Utiliser une nouvelle aliquote du PCR Mix.
Dégradation de la matrice du Contrôle interne.	Utiliser une nouvelle aliquote du Contrôle Interne
Inhibition due à des substances interférentes dans l'échantillon.	Répéter l'amplification avec une dilution à 1:2 de l'échantillon élué dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, lors d'une session d'analyse « PCR Only » (PCR seulement). Répéter l'extraction avec une dilution à 1:2 de l'échantillon dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, lors d'une session d'analyse « Extract + PCR » (Extraction + PCR).
Erreur de l'instrument.	Contacter le service technique d'ELITechGroup.

Tableau 44

Courbe de dissociation anormale	
Causes possibles	Solutions
Absence de pic défini. Pic défini, mais Tm différente de celles des autres échantillons et de celle du contrôle positif.	Vérifier que la valeur Ct de la cible est inférieure à 30. Une grande quantité de produit d'amplification à la fin de la réaction peut interférer avec l'analyse de la courbe de fusion. Répéter l'amplification de l'échantillon pour confirmer la présence d'une cible comportant une éventuelle mutation. La cible dans l'échantillon doit être séquencée pour confirmer la mutation.

Tableau 45

Erreur de calcul de la valeur Ct	
Causes possibles	Solutions
Concentration trop élevée de la cible dans l'échantillon ou échantillon montrant une anomalie du signal de fluorescence.	<p>Si une amplification significative est observée dans la courbe de PCR, sélectionner la position associée à l'échantillon et approuver manuellement le résultat comme positif.</p> <p>Si aucune amplification n'est observée dans la courbe de PCR, sélectionner la position associée à l'échantillon et approuver manuellement le résultat comme négatif ou le laisser non valide.</p> <p>Si une valeur Ct est requise :</p> <ul style="list-style-type: none"> - répéter l'amplification de l'échantillon élué avec une dilution à 1:10 dans de l'eau de qualité biologique moléculaire, lors d'une session d'analyse « PCR Only » (PCR seulement). - répéter l'extraction de l'échantillon avec une dilution à 1:10 dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, lors d'une session d'analyse « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

Tableau 46

Taux anormalement élevé de résultats positifs dans la même session d'analyse (réactions avec des valeurs Ct tardives similaires)	
Causes possibles	Solutions
Contamination inter-échantillons lors des étapes pré-analytiques.	<p>Nettoyer la micropipette à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 3 % (eau de Javel) fraîchement préparée ou d'un agent de nettoyage de l'ADN/ARN après le pipetage de chaque échantillon.</p> <p>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.</p> <p>Introduire les échantillons dans les dernières positions des instruments, comme indiqué par la GUI. Suivre la séquence de chargement indiquée par le logiciel.</p>
Contamination environnementale du laboratoire.	<p>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 (eau de Javel) à 3 % fraîchement préparée ou d'un agent de nettoyage de l'ADN/ARN.</p> <p>Effectuer un cycle de décontamination U.V.</p> <p>Utiliser un nouveau tube de PCR Mix et/ou de CPE.</p>

Plateforme ouverte :

Tableau 47

ADN cible non détecté dans la réaction du Positive Control	
Causes possibles	Solutions
Distribution incorrecte dans les puits de la microplaqué.	Faire attention lors de la distribution des réactions dans les puits de la microplaqué et respecter la fiche de travail. Vérifier les volumes de PCR Mix distribués. Vérifier les volumes de contrôle positif distribués.
Dégénération du PCR Mix.	Utiliser une nouvelle aliquote du PCR Mix.
Dégénération du Positive Control.	Utiliser une nouvelle aliquote du Positive Control.
Erreur de paramétrage de l'instrument.	Vérifier le paramétrage des positions pour la réaction du contrôle positif sur l'instrument. Vérifier le paramétrage du cycle thermique sur l'instrument.

Tableau 48

ADN cible détecté dans la réaction du Negative Control	
Causes possibles	Solutions
Distribution incorrecte dans les puits de la microplaqué.	Éviter de renverser le contenu des tubes à essai d'échantillon. Toujours changer de cônes entre les échantillons. Faire attention lors de la distribution des échantillons, des Negative Controls et des Positive Controls dans les puits de la microplaqué, et se conformer à la fiche de travail.
Erreur lors du paramétrage de l'instrument.	Vérifier les paramètres de position des échantillons, des Negative Controls, des Positive Controls sur l'instrument.
Microplaqué mal scellée.	Faire attention lors du scellage de la microplaqué.
Contamination de l'eau de qualité biologie moléculaire.	Utiliser une nouvelle aliquote d'eau stérile.
Contamination du PCR Mix.	Utiliser une nouvelle aliquote du PCR Mix.
Contamination de la zone d'extraction/de préparation des réactions d'amplification.	Nettoyer les surfaces et les instruments avec des détergents aqueux, laver les blouses de laboratoire, remplacer les tubes à essai et les cônes utilisés.

Tableau 49

Fluorescence de bruit de fond irrégulière ou élevée dans les réactions	
Causes possibles	Solutions
Distribution incorrecte ou mélange inadéquat de l'échantillon.	Veiller à bien mélanger les échantillons, les Negative Controls et les Positive Controls avec le mélange réactionnel en pipetant à trois reprises. Éviter d'introduire des bulles.
Erreur de paramétrage de la référence.	Paramétrier la plage de calcul de la référence dans les cycles au cours lesquels la fluorescence de bruit de fond s'est déjà stabilisée (vérifier les données « Results » [Résultats], « Component » [Composant]) et dans lesquels la fluorescence du signal n'a pas encore commencé à augmenter, par ex., du cycle 6 au cycle 15. Utiliser le calcul automatique de la référence en activant l'option « Auto Baseline » (Référence auto).

Tableau 50

Courbe de dissociation anormale	
Causes possibles	Solutions
Absence de pic défini. Pic défini mais différent de ceux des autres échantillons et de ceux du Positive Control.	Vérifier que la valeur Ct du détecteur FAM est inférieure à 30. Une grande quantité de produit d'amplification à la fin de la réaction peut interférer avec l'analyse de la courbe de fusion. Répéter l'amplification de l'échantillon pour confirmer la présence d'un ADN cible comportant une éventuelle mutation. L'ADN cible de l'échantillon doit être séquencé pour confirmer la mutation.

19 LÉGENDE DES SYMBOLES

REF	Numéro de référence.
	Limite supérieure de température.
LOT	Code de lot.
	Date de péremption (dernier jour du mois).
IVD	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> .
	Conforme aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic <i>in vitro</i> .
UDI	Identifiant unique de dispositif
	Contenu suffisant pour <> N >> tests.
	Consulter le mode d'emploi.
CONT	Contenu.
	Tenir à l'abri de la lumière du soleil.
	Fabricant.

20 NOTE POUR L'ACQUÉREUR : LICENCE LIMITÉE

Ce produit contient des réactifs fabriqués par Thermo Fisher Scientific et commercialisés selon des accords de licence entre ELITechGroup S.p.A. et ses filiales et Thermo Fisher Scientific. Le prix d'achat de ce produit inclut des droits, limités et non transférables, qui permettent d'utiliser uniquement cette quantité du produit dans le seul objectif de satisfaire aux activités de l'acheteur qui sont directement liées à la réalisation de tests diagnostiques chez l'homme. Pour obtenir des informations sur l'achat d'une licence relative à ce produit à des fins autres que celles mentionnées ci-dessus, contacter le Licensing Department, Thermo Fisher Scientific. E-mail : outlicensing@thermofisher.com.

Les réactifs de détection ELITe MGB® sont couverts par un ou plusieurs des brevets américains numéros 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7671218, 7723038, 7767834, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529 et par les brevets EP numéros 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161, ainsi que par des demandes de brevet actuellement en instance.

Les technologies ELITe InGenius® and ELITe BeGenius® sont couvertes par des brevets et des demandes en instance.

Cette licence limitée permet à la personne ou à l'entité à laquelle ce produit a été fourni d'utiliser le produit, ainsi que les données générées par son utilisation, uniquement à des fins de diagnostic humain. Ni ELITechGroup S.p.A. ni ses concédants n'accordent d'autres licences, explicites ou implicites, à d'autres fins.

MGB®, Eclipse Dark Quencher®, AquaPhluor®, ELITe MGB®, the ELITe MGB® logo, ELITe InGenius® and ELITe BeGenius® sont des marques déposées d'ELITechGroup au sein de l'Union européenne.
eSWAB® est une marque déposée de COPAN Italia S.p.A.

Appendix A MRSA/SA ELITe MGB Kit utilisé en association avec les plateformes Genius series ®



ATTENTION

Ce document est une version simplifiée du mode d'emploi officiel. Veuillez vous reporter au document complet avant toute utilisation : www.elitechgroup.com

APPLICATION

Le **MRSA/SA 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 de PCR en temps réel des acides nucléiques pour la détection de l'ADN, extrait d'échantillons cliniques, de *Staphylococcus aureus* (SA) et de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM, incluant la souche mecC).

Le test est validé en association avec les instruments **ELITe InGenius®** et **ELITe BeGenius®**, des systèmes intégrés et automatisés d'extraction, de PCR en temps réel et d'interprétation des résultats, en utilisant des échantillons humains d'écouvillons nasaux et d'hémoculture.

Le test est également validé en association avec le **7500 Real-Time PCR Instrument** en utilisant des échantillons humains d'écouvillons nasaux et d'hémoculture.

Le produit est destiné à être utilisé en tant qu'aide à la prévention et au contrôle des infections à SARM dans les établissements de soins de santé. Il est conçu pour aider au diagnostic des infections à SARM, et non pour orienter ou surveiller le traitement des infections à SARM. Un résultat négatif n'exclut pas une colonisation nasale par le SARM/SA. Des cultures concomitantes sont nécessaires pour récupérer les organismes en vue de réaliser un typage épidémiologique ou des tests de sensibilité supplémentaires.

Les résultats doivent être interprétés en association avec l'ensemble des observations cliniques pertinentes et des résultats du laboratoire.

Séquence amplifiée

Séquence	Gène	Fluorophore	Canal
Cible 1	région conservée dans le gène de <i>Staphylococcus aureus</i> à coagulase positive	AP554	SA
Cible 2	régions conservées dans les gènes mecA et mecC (responsables de la résistance à la méticilline et à d'autres antibiotiques bêta-lactame)	FAM	MecA
Contrôle interne	séquence artificielle IC2	AP642	IC

Matrice validée

- Écouvillon nasal prélevé avec le eNAT™ kit
- Écouvillon nasal prélevé avec le eSwab Collection Kit
- Hémoculture

Contenu du kit et produits associés

MRSA/SA ELITe MGB Kit (M800351)	MRSA/SA ELITe - Positive Control (M800356)
 X 4	 X 2  X 2
MRSA/SA PCR Mix 4 tubes de 540 µL 24 réactions par tube 96 réactions par kit 4 cycles de congélation/décongélation par tube	MRSA/SA - Positive Control et LGA251/SA Positive Control 2 tubes de 160 µL pour MRSA/SA 2 tubes de 160 µL pour LGA251/SA 5 réactions par tube 10 réactions par kit 12 cycles de congélation/décongélation
Durée de conservation maximale :	24 mois
Température de stockage	≤ -20 °C

Autres produits requis non inclus dans le kit

<ul style="list-style-type: none"> Instrument ELITe InGenius : INT030. Instrument ELITe BeGenius : INT040. ELITe InGenius SP 200 : INT032SP200. ELITe InGenius SP1000: INT033SP1000 ELITe InGenius SP 200 Consumable Set : INT032CS. 	<ul style="list-style-type: none"> ELITe InGenius PCR Cassette : INT035PCR. ELITe InGenius Waste Box : F2102-000. CPE – Internal Control : CTRCPE 300 µL Filter Tips Axygen : TF-350-L-R-S. 1000 µL Filter Tips Tecan : 30180118.
---	--

Protocole avec les ELITe InGenius et ELITe BeGenius

> Volume d'échantillon > Volume de CPE > Volume d'élution total	200 µL 10 µL 100 µL (avec une hémoculture) ou 50 µL (avec un écouvillon nasal)	> Input volume (volume initial) de PCR > Volume de Q-PCR Mix > Fréquence des contrôles	10 µL 20 µL 15 jours
---	---	--	----------------------------

Performances de ELITe InGenius et ELITe BeGenius

Matrice	Limite de détection	Sensibilité	Spécificité
Écouvillon nasal	1000 copies/mL	SASM : 93 % (56/60) SARM : 98 % (40/41)	100 % (48/48)
Hémoculture	2000 copies/mL	SASM : 100 % (39/39) SARM : 100 % (31/31)	100 % (34/34)

Préparation de l'échantillon

Ce produit est destiné à être utilisé sur les **ELITe InGenius** et **ELITe BeGenius** avec les échantillons cliniques suivants, identifiés selon les directives de laboratoire, et prélevés, transportés et conservés dans les conditions suivantes :

Tableau 51

Échantillon	Exigences de prélèvement	Conditions de transport/conservation			
		+16/+26 °C (température ambiante)	+2°/+8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
écouvillon nasal	prélevé avec le eNAT™ kit	-	≤ 4 semaines	≤ 6 mois	-
écouvillon nasal	prélevé avec le eSwab Collection Kit	≤ 2 heures	≤ 48 heures	≤ 6 mois	-
hémoculture	-	≤ 24 heures	-	-	-

Procédures ELITe InGenius

L'interface graphique du logiciel ELITe InGenius guide l'utilisateur, étape par étape, pour paramétriser l'analyse. Toutes les étapes, à savoir l'extraction, la PCR en temps réel et l'interprétation des résultats, sont effectuées automatiquement. Deux modes de fonctionnement sont disponibles : analyse complète « Extract + PCR » (Extraction + PCR) ou « PCR Only » (PCR seulement).

Avant l'analyse

1. Mettre le ELITe InGenius en marche. Se connecter avec le nom d'utilisateur et le mot de passe. Sélectionner le mode « CLOSED » (Fermé).	2. Vérifier les contrôles : Positive Control et le Negative Control dans le menu « Controls » (Contrôles). Remarque : les deux contrôles doivent avoir été analysés, approuvés et ne pas être expirés.	3. Décongeler les tubes de PCR Mix et de CTRCPE . Agiter délicatement au vortex. Centrifuger pendant 5 s.
--	---	---

Procédure 1 - Analyse complète : Extract + PCR (Extraction + PCR) (par ex. échantillons)

1. Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) sur l'écran tactile	2. Vérifier les volumes d'extraction : Initial : « 200 µL », élution : « 50 µL » (avec une hémoculture) ou « 100 µL » (avec un écouvillon nasal)	3. Scanner les code-barres des échantillons à l'aide du lecteur de code-barres portable ou saisir l'ID de l'échantillon
4. Sélectionner le « Assay Protocol » (Protocole de test) d'intérêt : MRSA-SA ELITe_NS_200_50 ou MRSA-SA ELITe_BC_200_100.	5. Sélectionner la méthode « Extract + PCR » (Extraction + PCR) et la position de l'échantillon : Extraction Tube (Tube d'extraction)	6. Charger le PCR Mix et le Contrôle interne dans le « Inventory Block » (Gestionnaire de stocks)
7. Charger : la PCR Cassette, la cartouche d'extraction, le tube d'élution, la cassette à embouts, les racks de tubes d'extraction	8. Fermer le tiroir. Démarrer le cycle	9. Visualiser, approuver et enregistrer les résultats

NOTE!

Si le mode « Extract Only » (Extraction seulement) est nécessaire, se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument pour prendre connaissance de la procédure.

Procédure 2 : PCR Only (PCR seulement) (p. ex. éluats, contrôles)

1. Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) sur l'écran tactile	2. Vérifier les volumes d'extraction : Initial : « 200 µL », élution : « 50 µL » (avec une hémoculture) ou « 100 µL » (avec un écouvillon nasal)	3. Scanner les code-barres des échantillons à l'aide du lecteur de code-barres portable ou saisir l'ID de l'échantillon
4. Sélectionner le « Assay Protocol » (Protocole de test) d'intérêt : MRSA-SA ELITE_NS_200_50 ou MRSA-SA ELITE_BC_200_100, MRSA-SA ELITE_PC_200_100 ou MRSA-SA ELITE_PC_200_50, MRSA-SA ELITE_NC_200_100 ou MRSA-SA ELITE_NC_200_50.	5. Sélectionner la méthode « PCR Only » (PCR seulement) et la position de l'échantillon « Elution Tube » (Tube d'élution)	6. Charger le PCR Mix dans le « Inventory Block » (Gestionnaire de stocks)
7. Charger : le rack de PCR Cassette (Cassette de PCR) et le rack de tubes d'élution avec l'acide nucléique extrait	8. Fermer le tiroir. Démarrer le cycle	9. Visualiser, approuver et enregistrer les résultats

Procédures ELITE BeGenius

L'interface graphique du logiciel ELITE BeGenius® guide l'utilisateur, étape par étape, pour paramétrier l'analyse. Toutes les étapes, à savoir l'extraction, la PCR en temps réel et l'interprétation des résultats, sont effectuées automatiquement. Deux modes de fonctionnement sont disponibles : analyse complète « Extract + PCR » (Extraction + PCR) ou « PCR Only » (PCR seulement).

Avant l'analyse

1. Allumer ELITE BeGenius. Se connecter avec le nom d'utilisateur et le mot de passe. Sélectionner le mode « CLOSED » (Fermé).	2. Vérifier les contrôles : Positive Control Negative Control dans le menu « Controls ». Remarque : les deux contrôles doivent avoir été analysés, approuvés et ne pas être expirés.	3. Décongeler les tubes de PCR Mix et de CTRCPE . Agiter délicatement au vortex. Centrifuger pendant 5 s.
--	--	---

Procédure 1 - Analyse complète : Extract + PCR (Extraction + PCR) (par ex. échantillons)

1. Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) sur l'écran tactile puis cliquer sur le mode d'analyse « Extract + PCR » (Extraction + PCR).	2. Insérer le « Sample Rack » (Compartiment des échantillons) avec les échantillons à code-barres dans la Cooler Unit. La lecture des code-barres est déjà active	3. Vérifier les volumes d'extraction : Initial : « 200 µL », Éluat : « 50 µL » (avec une hémoculture) ou « 100 µL » (avec un écouvillon nasal)
4. Sélectionner le « Assay Protocol » (Protocole de test) d'intérêt : MRSA-SA ELITE_Be_NS_200_50 ou MRSA-SA ELITE_Be_BC_200_100. Remarque : si une deuxième extraction est exécutée, répéter les étapes 2 à 4	5. Imprimer les étiquettes à code-barres pour les apposer sur les tubes d'élution vides. Charger les tubes dans le Elution Rack (Rack d'élution) et insérer ce dernier dans la Cooler Unit.	6. Charger le PCR Mix et le Internal Control dans le Reagent/Elution Rack (Rack de réactifs/d'élution), puis insérer ce dernier dans la Cooler Unit.
7. Charger le « PCR Rack » (Portoir de PCR) avec la « PCR Cassette » (Cassette de PCR) et le « Extraction Basket » (Panier d'extraction) avec les cartouches d'extraction « ELITE InGenius SP 200 » et les consommables d'extraction requis	8. Fermer le tiroir. Démarrer le cycle	9. Visualiser, approuver et enregistrer les résultats

NOTE!

Si le mode « Extract Only » (Extraction seulement) est nécessaire, se reporter au manuel d'utilisation de l'Instrument pour prendre connaissance de la procédure.

Procédure 2 : PCR Only (PCR seulement) (p. ex. éluats, contrôles)

1. Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) sur l'écran tactile, puis cliquer sur le mode d'analyse « PCR Only » (PCR seulement)	2. Charger les tubes à code-barres contenant les acides nucléiques extraits ou les contrôles dans le Elution Rack (Rack d'élution), puis insérer ce dernier dans la Cooler Unit.	3. Vérifier les volumes d'extraction : Initial : « 200 µL », Éluat : « 50 µL » (avec une hémoculture) ou « 100 µL » (avec un écouvillon nasal)
4. Sélectionner le « Assay Protocol » (Protocole de test) d'intérêt : MRSA-SA ELITe_Be_NS_200_50 ou MRSA-SA ELITe_Be_BC_200_100, MRSA-SA ELITe_Be_PC_200_100 ou MRSA-SA ELITe_Be_PC_200_50. MRSA-SA ELITe_Be_NC_200_100 ou MRSA-SA ELITe_Be_NC_200_50.	5. Charger le PCR Mix dans le Reagent/Elution Rack (Rack de réactifs/d'élution) et insérer ce dernier dans la Cooler Unit	6. Charger le « PCR Rack » avec la « PCR Cassette »
7. Fermer le tiroir. Démarrer le cycle	8. Visualiser, approuver et enregistrer les résultats	


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