

Instructions for use

***C. difficile* ELITe MGB® Kit**

réactifs de PCR en temps réel de l'ADN



REF M800358

UDI 08033891486563



HISTORIQUE DES MODIFICATIONS

Rév.	Avis de modification	Date (jj/mm/aa)
07	Extension de l'utilisation avec le ELITe BeGenius Nouveaux graphiques et contenu du mode d'emploi.	22/11/24
06	ELITe InGenius - CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE : Mise à jour des marqueurs potentiellement interférents pour inclure Clostridium Nexile.	09/09/24
05	Ajout de données analytiques (vérification de la LoD, équivalence de prétraitement des matrices, marqueurs et substances potentiellement interférents) et méthode alternative de prétraitement des échantillons.	15/03/24
00– 04	Développement de nouveaux produits et modifications ultérieures	-

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.....	5
8 AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS.....	6
9 ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES pour les ELITe InGenius et ELITe BeGenius.....	8
10 PROCÉDURE AVEC LE ELITe InGenius.....	10
11 PROCÉDURE AVEC LE ELITe BeGenius	15
12 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC LES ELITe InGenius et ELITe BeGenius.....	20
13 ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES POUR D'AUTRES SYSTÈMES.....	32
14 PROCÉDURES POUR D'AUTRES SYSTÈMES	35
15 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC D'AUTRES SYSTÈMES	41
16 BIBLIOGRAPHIE	53
17 LIMITES DE LA PROCÉDURE.....	53
18 PROBLÈMES ET SOLUTIONS	54
19 LÉGENDE DES SYMBOLES.....	58
20 NOTE POUR L'ACQUÉREUR : LICENCE LIMITÉE	59
Appendix A QUICK START GUIDE.....	60

1 APPLICATION

Le produit **C. difficile 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 multiplexe pour la **détection des gènes de la toxine A et la toxine B de *Clostridium difficile* toxigène (*C. difficile*)**, y compris la souche NAP1/BI/027 épidémique hypervirulente, dans des échantillons d'ADN extraits d'échantillons de selles liquides ou non formées.

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 de selles.

Le test est également validé en association avec le système **7500 Real-Time PCR System** en utilisant des échantillons humains de selles.

Le produit est destiné à être utilisé en tant qu'aide au diagnostic d'une infection à **C. difficile** toxigène dans les environnements de soins de santé en association avec d'autres résultats d'analyse de laboratoire et données cliniques.

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

2 EXPLICATION DU TEST

L'infection à *C. difficile* toxigène se manifeste généralement par une diarrhée légère à modérée, parfois accompagnée de crampes abdominales. Dans de rares cas, les patients infectés par *C. difficile* toxigène peuvent présenter un syndrome abdominal aigu et une colite fulminante potentiellement mortelle. Environ 20 % des individus hospitalisés contractent *C. difficile* toxigène pendant leur hospitalisation, et plus de 30 % de ces patients développent une diarrhée. En conséquence, la colite à **C. difficile** toxigène constitue actuellement l'une des infections nosocomiales les plus courantes. Le diagnostic de colite à *C. difficile* toxigène doit être suspecté chez les patients diarrhéiques qui ont reçu des antibiotiques au cours des 2 mois précédents et/ou lorsque la diarrhée survient 72 heures ou plus après l'hospitalisation. La colonisation se produit par voie féco-orale. Les souches pathogènes de *C. difficile* toxigène produisent 2 toxines distinctes : la toxine A, qui est une entérotoxine, et la toxine B, qui est une cytotoxine. La toxine A et la toxine B semblent toutes deux jouer un rôle dans la pathogenèse de la colite à *C. difficile* toxigène chez l'homme.

Le **C. difficile ELITE MGB Kit** est un test d'amplification en temps réel triplex qui cible les gènes de la toxine A et de la toxine B de *C. difficile* toxigène et un contrôle interne. Les tests basés sur une amplification en temps réel réduisent considérablement le temps de laboratoire par rapport aux tests de culture standard, en améliorant ainsi l'efficacité de la procédure.

Le **C. difficile ELITE MGB Kit** cible à la fois le gène de la toxine A (tcdA) et le gène de la toxine B (tcdB), en détectant ainsi tous les génotypes toxigènes possibles (A+/B+ ; A+/B- ; A-/B+).

3 PRINCIPE DU TEST

Le test est une PCR qualitative en temps réel qui détecte **les gènes de la toxine A et la toxine B de *Clostridium difficile* toxigène (*C. difficile*)**, y compris la souche NAP1/BI/027 épidémique hypervirulente, isolés à partir d'échantillons et amplifiés à l'aide du réactif du test, le **C. difficile PCR Mix**, qui contient des amorces et des sondes dotées de la technologie ELITE MGB.

Les sondes ELITE MGB 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, 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 spatialement 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 **C. difficile ELITE MGB Kit** fournit le réactif du test, le **C. difficile PCR Mix**, un mélange de PCR optimisé et stabilisé qui contient les amorces et les sondes spécifiques pour :

- le **gène spécifique de la toxine A de C. difficile**, détecté dans le **Canal Toxine A** ; la sonde est stabilisée par le groupe MGB, désactivée par le désactivateur Eclipse Dark Quencher, et marquée par le colorant AquaPhluor® 525 (AP525),
- le **gène spécifique de la toxine B de C. difficile**, détecté dans le **Canal Toxine B** ; la sonde est stabilisée par le groupe MGB, désactivée par le désactivateur Eclipse Dark Quencher et marquée par le colorant FAM,
- le **Contrôle interne (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 mélange réactionnel **C. difficile PCR Mix** contient également un tampon, du chlorure de magnésium, des nucléotides triphosphates et l'enzyme ADN polymérase avec activation thermique (Hot start).

Le produit **C. difficile ELITE MGB Kit** contient suffisamment de réactifs pour effectuer **96 tests** sur les **ELITE InGenius** et **ELITE BeGenius**, en utilisant 20 µL par réaction.

Le produit contient suffisamment de réactifs pour effectuer **100 tests sur d'autres systèmes**, en utilisant 20 µL par réaction.

5 MATÉRIEL FOURNI

Tableau 1

Composant	Description	Quantité	Classification des risques
C. difficile PCR Mix réf. M800358	Mélange de réactifs pour la PCR en temps réel tube doté d'un capuchon JAUNE	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).
- Thermomixer.
- 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.

7 AUTRES PRODUITS REQUIS

Les réactifs pour l'extraction de l'ADN des échantillons, le contrôle interne 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 logiciels	Produits et réactifs
ELITE InGenius (EG SpA, réf. INT030). ELITE InGenius Software version 1.3.0.17 (ou versions ultérieures). Cdiff ELITE_PC, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse du Contrôle positif. Cdiff ELITE_NC, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse du Contrôle négatif. Cdiff ELITE_ST_200_100, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des échantillons de selles.	ELITE InGenius SP200 (EG SpA, réf. INT032SP200) ELITE InGenius SP 200 Consumable Set (EG SpA, réf. INT032CS), ELITE InGenius PCR 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 Tecan (Tecan, Suisse, réf. 30180118), avec le ELITE BeGenius uniquement. CPE - Internal Control (EG SpA, réf. CTRCPE). C. difficile – ELITE Positive Control (EG SpA, réf. M800373). InhibitEX Buffer (QIAGEN GmbH, Allemagne, réf. 19593), ou S.T.A.R. Buffer (Roche Diagnostics GmbH, réf. 3 335 208), ou dispositif équivalent. Minitip Flocked Swab® (COPAN Italia S.p.A., Italie, réf. 518CS01) ou dispositif équivalent.
ELITE BeGenius (EG SpA, réf. INT040). ELITE BeGenius Software version 2.1.0 (ou versions ultérieures). Cdiff ELITE_Be_PC, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse du Contrôle positif. Cdiff ELITE_Be_NC, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse du Contrôle négatif. Cdiff ELITE_Be_ST_200_100, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des échantillons de selles.	
7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (ThermoFisher Scientific, réf. 4406985) NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux SA, réf. 200111) ELITE STAR (EG SpA, réf. INT010) ELITE GALAXY (EG SpA réf. INT020)	MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL (Life Technologies, réf. 4346906) NucliSENS® easyMAG® Reagents (bioMérieux SA, Réf. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135), InviMag Universal Kit/IG (INVITEK, réf. 2450120100). ELITE GALAXY 300 Extraction Kit (EG SpA, réf. INT021EX), CPE - Internal Control (EG SpA, réf. CTRCPE) C. difficile – ELITE Positive Control (EG SpA, réf. M800373). S.T.A.R. Buffer (Roche Diagnostics GmbH, réf. 3 335 208).

8 AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

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

Avvertissements 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.

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.

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)
Cdiff PCR Mix	-20 °C ou température plus basse (à l'abri de la lumière)	un mois	jusqu'à cinq	jusqu'à cinq sessions d'analyse distinctes* de trois heures chacune

* avec congélation intermédiaire

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
Selles natives	collectées sans conservateurs	≤ 24 heures	≤ 48 heures	≤ 1 mois	> 1 mois

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.

Suivre les instructions ci-dessous pour procéder au pré-traitement des échantillons à l'aide du tampon InhibitEX Buffer (QIAGEN, Allemagne. réf. 19593) :

Procédure de pré-traitement avec des selles natives collectées sans conservateurs :

- transférer 1 mL de tampon InhibitEX Buffer dans un tube Sarstedt de 2 mL,
- prélever l'échantillon de selles à l'aide d'un écouvillon Minitip Flocked Swab with 80mm Break (Copan) ; effectuer le prélèvement à différents endroits dans les selles et éliminer l'échantillon en excès en appuyant l'écouvillon contre la paroi du tube,
- insérer l'écouvillon dans le tube Sarstedt de 2 mL contenant le tampon InhibitEX Buffer et le faire tourner au moins 10 fois, en l'appuyant contre la paroi du tube,
- jeter l'écouvillon et fermer le capuchon du tube,
- agiter au vortex pendant environ 60 s,
- incuber dans un thermomixer à environ +80 °C et environ 800 tr/min pendant 10 minutes,
- centrifuger à 10 000 tr/min pendant 15 s,
- avec précaution, transférer 200 µL du surnageant de selles clarifié dans un tube d'extraction (pour l'instrument ELITE InGenius) ou dans un tube Sarstedt de 2 mL (pour l'instrument ELITE BeGenius) en veillant à ne pas perturber le culot de matière fécale.

Suivre les instructions ci-dessous pour procéder au pré-traitement des échantillons à l'aide du tampon S.T.A.R. Buffer (Roche Diagnostics GmbH, réf. 3 335 208) :

Procédure de pré-traitement avec des selles natives collectées sans conservateurs :

- préparer un tube de 1,5 mL étiqueté pour chaque échantillon de selles brutes et distribuer 0,8 mL de tampon S.T.A.R. Buffer dans un tube.
- agiter les échantillons de selles brutes au vortex puis utiliser une pipette dotée d'un cône résistant aux aérosols pour transférer approximativement 200 µL d'échantillon de selles brutes (si nécessaire, utiliser un cône à alésage large ou une spatule en plastique pour les échantillons de selles épaisses) dans le tube de 1,5 mL contenant le tampon S.T.A.R. Buffer.
- boucher fermement le tube puis agiter au vortex pour homogénéiser le mélange (20-30 s).
- centrifuger la solution homogénéisée à 13 000 × g (tr/min) pendant 1 minute afin de clarifier l'échantillon.
- avec précaution, transférer 200 µL du surnageant de selles clarifié dans un tube d'extraction (pour l'instrument ELITE InGenius) ou dans un tube Sarstedt de 2 mL (pour l'instrument ELITE BeGenius).
- conserver l'échantillon de selles clarifié à +2/+8 °C pendant 7 jours maximum avant de procéder à l'extraction.

NOTE!

Le tampon S.T.A.R. Buffer doit être conservé à température ambiante. Des précipités blancs peuvent se former si le tampon est conservé à une température inférieure à la température ambiante. Avant de commencer la procédure d'extraction, vérifier si des précipités se sont formés. Le cas échéant, réchauffer la solution à 30-40 °C dans un bain-marie ou un incubateur jusqu'à la dissolution des précipités.

Conserver les acides nucléiques purifiés à +2/+8 °C s'ils sont utilisés le jour même de leur extraction, ou à une température inférieure à -20 °C pour un stockage à long terme.

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 C. difficile ELITE MGB Kit

Échantillon	Instrument	Nom du protocole de test	Rapport	Caractéristiques
Selles natives collectées sans conservateurs	ELITE InGenius	Cdiff ELITE_ST_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 Analyse de fusion : facultative
	ELITE BeGenius	Cdiff ELITE_Be_ST_200_100		

Pour tous les protocoles, 200 µL d'échantillon prétraité 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 **Extraction tube** (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 6

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 20](#) pour vérifier les informations concernant les substances interférentes.

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 **C.difficile - ELITE Positive Control** (non inclus dans ce kit) avec les protocoles de test (Assay Protocols) **Cdiff ELITE_PC** ou **Cdiff ELITE_Be_PC**.
- Pour le Contrôle négatif, utiliser de l'eau de qualité biologie moléculaire (non incluse dans ce kit) avec les protocoles de test (Assay Protocols) **Cdiff ELITE_NC** ou **Cdiff ELITE_Be_NC**.

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 contrôles positif et négatif.

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.

Des contrôles externes pour les tests de *Clostridium difficile* sont fournis par plusieurs fabricants (par ex. Qnostics Ltd, Royaume-Uni, et ZeptoMetrix Corp., États-Unis).

10 PROCÉDURE AVEC LE ELITE InGenius

La procédure d'utilisation du **C. difficile 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 Contrôle positif et du Contrôle négatif (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

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 (**Positive Control**, **Negative Control**) sont approuvés et valides (Status [Statut]) pour le lot de **PCR Mix** à utiliser. Si aucun contrôle de PCR valide n'est disponible pour le lot de **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 « Échantillons et contrôles »).

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

ÉTAPE 2 - Paramétrage de la session d'analyse

Le **C. difficile ELiTe MGB Kit** peut être utilisé sur l'instrument **ELiTe InGenius** pour effectuer les opérations suivantes :

- A. une analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR]),
- B. une analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement]),
- C. 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 (au moins 5 tests 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. Pré-traiter les échantillons conformément à la procédure décrite à la section « Échantillons et contrôles ». Pour ce test, 200 µL d'échantillon prétraité doivent être transférés 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 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).

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])
4	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 100 µL.	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 100 µL.	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 100 µL.
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
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 biologie 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 « 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 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 , les tubes de Positive Control et Negative Control.
15	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.

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])
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.

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]). Voir le 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 **C. difficile 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.

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 et de Tm résultantes sont utilisées pour vérifier le système (lot 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 paramétrer 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.

Validation des résultats de l'échantillon

Le **ELITE InGenius Software** interprète les résultats de la PCR pour la cible (canaux **Toxine A** et **Toxine B**) et le Contrôle interne (canal **IC**) avec les paramètres de protocole de test (Assay Protocol) **Cdiff ELITE_ST_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) Contrôle positif	Statut
C. difficile Positive Control	APPROUVÉ
2) Contrôle négatif	Statut
C. difficile Negative Control	APPROUVÉ

Les résultats de l'échantillon sont automatiquement interprétés par le logiciel **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
Cdiff: DNA Detected (Cdiff : ADN détecté)	L'ADN du gène de la toxine A ou du gène de la toxine B de C. difficile a été détecté dans l'échantillon. L'échantillon est positif pour <i>C. difficile</i> , qui pourrait être toxigène.
Cdiff: DNA Not Detected or below LoD (Cdiff : ADN non détecté ou inférieur à LoD)	L'ADN du gène de la toxine A et du gène de la toxine B de C. difficile n'a pas été détecté dans l'échantillon. L'échantillon est valide et négatif pour <i>C. difficile</i> toxigène ou sa concentration est inférieure à la limite de détection de l'analyse.
Invalid - Retest Sample (Non valide - Tester à nouveau l'échantillon).	Résultat de test 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 « Invalid - Retest Sample » (Non valide - Tester à nouveau l'échantillon) par le **ELITE InGenius Software** ne sont pas appropriés pour l'interprétation des résultats. Dans ce cas, l'ADN du contrôle interne n'a pas été efficacement détecté en raison de problèmes lors de l'étape d'amplification ou d'extraction (dégradation d'ADN, perte d'ADN pendant l'extraction ou contamination par un inhibiteur dans l'éluat), ce qui peut générer des résultats incorrects.

Lorsque le volume d'éluat est suffisant, l'échantillon extrait peut être à nouveau testé 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'une nouvelle aliquote à l'aide du mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR). (se reporter à [18 PROBLÈMES ET SOLUTIONS page 54](#))

Les échantillons rapportés comme « Cdiff: DNA Not Detected or below LoD » (Cdiff : ADN non détecté ou inférieur à LoD) sont appropriés pour l'analyse mais il n'a pas été possible de détecter l'ADN de *C. difficile* pour les gènes de la toxine A et la toxine B. Dans ce cas, il n'est pas possible d'exclure le fait que l'ADN de *C. difficile* pour les gènes de la toxine A et la toxine B soit présent à une concentration inférieure à la limite de détection de l'analyse (se reporter à la section [12 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE AVEC LES ELITE InGenius et ELITE BeGenius page 20](#)). Sinon, une espèce *C. difficile* non toxigène pourrait être présente dans l'échantillon.

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).

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 AVEC LE ELITE BeGenius

La procédure d'utilisation du **C. difficile 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 Contrôle positif et du Contrôle négatif (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

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 (**Positive Control, Negative Control**) sont approuvés et valides (Status [Statut]) pour le lot de **PCR Mix** à utiliser. Si aucun contrôle de PCR valide n'est disponible pour le lot de **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 l'utilisation des protocoles de test fournis par EG SpA (se reporter à la section « Échantillons et contrôles »).

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

ÉTAPE 2 - Paramétrage de la session d'analyse

Le **C. difficile 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 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 (au moins 5 tests 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 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. Pré-traiter les échantillons conformément à la procédure décrite à la section « Échantillons et contrôles ». Pour ce test, 200 µL d'échantillon prétraité doivent être transférés dans un tube Sarstedt de 2 mL préalablement étiqueté.	Si nécessaire, décongeler les « Elution tubes » (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 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 Tube d'élution (Elution Tube) 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 » sont chargés, utiliser les adaptateurs bleus pour le « Sample Rack » (Compartiment des échantillons).	Charger les échantillons dans le « Elution Rack » (Rack d'élution).	Charger les tubes Positive Control et Negative Control dans le « Elution Rack » (Rack d'élution).
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 « 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'élution) 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'élution de l'extraction).	Insérer le « Elution Rack » (Rack d'élution) 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	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 100 µL.	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 100 µL.	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 100 µL.
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.
	NOTE! En cas de traitement de plus de 12 échantillons, répéter la procédure à partir du point 6.		-
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	Insérer le « Elution Rack » (Rack d'élution) dans la « Cooler Unit », en commençant par la « Lane 3 » (L3). En cas de traitement de plus de 12 échantillons, répéter la procédure en utilisant la « Lane 2 » (L2).	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).
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.

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])
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.

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 **C. difficile 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 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 10 copies dans 10 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La LoD de ce test a été testée en utilisant un ADN plasmidique contenant les produits d'amplification dont la concentration initiale a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. L'ADN plasmidique a été dilué à un titre d'environ 10 copies/10 µL en présence de 20 000 copies de Contrôle interne (IC)/10 µL. Cet échantillon a été testé en 18 réplicats en effectuant l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. en association avec deux instruments **ELITE InGenius** différents.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 12

Échantillons	N	positif	négatif	Ct moyen Toxine A	Ct moyen Toxine B
10 copies d'ADN plasmidique + 20 000 copies d'IC	18	18	0	35,80	36,62

La LoD a été vérifiée sur le **ELITE InGenius** en testant des échantillons de selles cliniques négatifs dopés avec un matériel de référence (ZeptoMetrix) à 500 UFC/mL. Le test a été réalisé en utilisant les deux procédures de prétraitement, à savoir avec le tampon **InhibitEX Buffer** (QIAGEN) et le tampon **S. T. A. R. Buffer** (Roche Diagnostics GmbH).

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 13

Échantillon de selles	Ti-tre (U-F-C/mL)	N	Toxine B		Toxine A		Taux de positivité (%)
			Positif	Négatif	Positif	Négatif	
Prétraitement avec le tampon S.T.A.R Buffer	50-0	30	30	0	29	1	100 %
Prétraitement avec le tampon InhibitEX Buffer	50-0	30	30	0	30	0	100 %

La valeur de LoD de 500 UFC/mL a été vérifiée sur le ELITE BeGenius en testant des échantillons de selles natives dopés avec un matériel de référence et les résultats obtenus ont confirmé la concentration revendiquée.

12.2 Équivalence de pré-traitement de la matrice

L'équivalence de pré-traitement de la matrice entre le tampon **InhibitEX Buffer** (QIAGEN) et **S.T.A.R. Buffer** (Roche Diagnostics GmbH) a été vérifiée en utilisant des échantillons de selles natives présumés négatifs collectés chez différents sujets et les mêmes échantillons dopés avec un matériel de référence (ZeptoMetrix) à 3 x la LoD.

Les résultats du pourcentage de concordance négative sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 14

Échantillon de selles négatif	N	Toxine B		Toxine A		% de concordance négative
		Positif	Négatif	Positif	Négatif	
Prétraitement avec le tampon STAR Buffer	26	1	25	0	26	96,2 %
Prétraitement avec le tampon InhibitEX Buffer	26	1	25	0	26	96,2 %

Les résultats du pourcentage de concordance positive sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 15

Échantillon de selles dopé	N	Toxine B		Toxine A		% de concordance positive
		Positif	Négatif	Positif	Négatif	
Prétraitement avec le tampon STAR Buffer	25	25	0	25	0	100 %
Prétraitement avec le tampon InhibitEX Buffer	25	25	0	25	0	100 %

12.3 Test avec un matériel de référence certifié

Les performances du produit ont été évaluées en utilisant le matériel de référence étalonné « Clostridium difficile 017 Evaluation Panel » (Qnostics, Ltd, Royaume-Uni). 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 des produits ELITechGroup S.p.A. en association avec l'instrument **ELITE InGenius**.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 16 Tests avec le panel « Clostridium difficile 017 Evaluation Panel »

Échantillon	Contenu de l'échantillon	Titre nominal (UFC/mL)	Positifs/Réplicats
CD1421749	<i>C. difficile</i> A-B+	$8,0 \times 10^4$	2/2
CD1421759	<i>C. difficile</i> A-B+	$8,0 \times 10^5$	2/2
CD1421769	<i>C. difficile</i> A-B+	$8,0 \times 10^6$	2/2
CD142CS53	<i>C. sordellii</i> A-B-	$2,1 \times 10^5$	0/2

Tous les échantillons ont été correctement détectés.

Un test supplémentaire a été réalisé en utilisant le matériel de référence étalonné « Clostridium difficile 027 Evaluation Panel » (Qnostics, Ltd, Royaume-Uni). 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 des produits ELITechGroup S.p.A. en association avec l'instrument **ELITE InGenius**. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 17 Tests avec le panel « Clostridium difficile 027 Evaluation Panel »

Échantillon	Contenu de l'échantillon	Titre nominal (UFC/mL)	Positifs/Réplicats
CD1422737	<i>C. difficile</i> A+B+	$5,0 \times 10^3$	2/2
CD1422747	<i>C. difficile</i> A+B+	$5,0 \times 10^4$	2/2
CD1422757	<i>C. difficile</i> A+B+	$5,0 \times 10^5$	2/2
CD1422767	<i>C. difficile</i> A+B+	$5,0 \times 10^6$	2/2

Tous les échantillons ont été correctement détectés.

Les performances du produit ont également été évaluées en utilisant le matériel de référence « QCMD 2013 Clostridium difficile EQA Panel » (Qnostics Ltd, Royaume-Uni), un panel de dilutions de *C. difficile* dans la limite de concentration. 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 des produits ELITechGroup S.p.A. en association avec l'instrument **ELITE InGenius**.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 18 Tests avec le panel « QCMD 2013 Clostridium difficile EQA Panel »

Échantillon	Contenu de l'échantillon	Titre nominal (UFC/mL)	Statut de l'échantillon	Pos./rép.
CD13-01	<i>C. difficile</i> 027	$4,6 \times 10^5$	Fréquemment détecté	2/2
CD13-02	<i>C. difficile</i> 017	$8,0 \times 10^6$	Fréquemment détecté	2/2
CD13-03	Négatif pour Cd	-	Négatif	0/2
CD13-04	<i>C. difficile</i> 027	$4,6 \times 10^6$	Détecté	2/2

Tableau 18 Tests avec le panel « QCMD 2013 Clostridium difficile EQA Panel » (continued)

Échantillon	Contenu de l'échantillon	Titre nominal (UFC/mL)	Statut de l'échantillon	Pos./rép.
CD13-05	<i>C. difficile</i> 027	$4,6 \times 10^6$	Fréquemment détecté	2/2
CD13-06	<i>C. difficile</i> 017	$8,0 \times 10^5$	Fréquemment détecté	2/2
CD13-07	<i>C. difficile</i> 027	$4,6 \times 10^3$	Détecté	2/2
CD13-08	<i>C. sordellii</i>	$2,1 \times 10^5$	Négatif	0/2
CD13-09	<i>C. difficile</i> 027	$4,6 \times 10^5$	Fréquemment détecté	2/2
CD13-10	<i>C. difficile</i> 017	$8,0 \times 10^4$	Détecté	2/2

Tous les échantillons ont été correctement détectés.

12.4 Reproductibilité avec un matériel de référence

La reproductibilité des valeurs Ct obtenues à l'aide du C. difficile ELITE MGB Kit en association avec le ELITE InGenius a été testée en analysant le matériel de référence « NATrol™ C. difficile Verification Panel » (ZeptoMetrix, États-Unis) contenant les ribotypes 002, 017, 078 et 027.

La reproductibilité a été obtenue en analysant les échantillons du panel en duplicats, à raison de deux analyses par jour. Trois lots de produit différents ont été testés sur trois jours différents, sur trois instruments différents et par trois opérateurs différents.

Les valeurs Ct des gènes de la toxine A et la toxine B ont été utilisées pour calculer le pourcentage de coefficient de variation (% CV) afin d'évaluer la reproductibilité en termes d'imprécision.

Un résumé des résultats est présenté dans le tableau ci-dessous.

Tableau 19

Échantillon	Gène de la toxine A				Gène de la toxine B			
	Pos./Rép.	Ct moyen	EC	% CV	Pos./Rép.	Ct moyen	EC	% CV
<i>C. difficile</i> 002	12/12	20,70	0,31	1,50	12/12	21,78	0,23	1,05
<i>C. difficile</i> 017	12/12	24,39	0,20	0,84	12/12	25,48	0,11	0,43
<i>C. difficile</i> 078	12/12	24,32	0,24	0,98	12/12	25,30	0,09	0,34
<i>C. difficile</i> 027-1	12/12	22,42	0,25	1,12	12/12	23,13	0,16	0,71
<i>C. difficile</i> 027-2	12/12	24,10	0,32	1,32	12/12	24,82	0,25	1,01
<i>C. sordelli</i>	0/12	-	-	-	0/12	-	-	-

La reproductibilité des valeurs Ct pour les deux cibles montrait un faible % CV qui n'excédait pas 2 %.

En outre, la reproductibilité des valeurs de température de fusion (Tm) obtenues à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. en association avec l'instrument ELITE InGenius a été testée en analysant le matériel de référence « NATrol™ C. difficile Verification Panel » (ZeptoMetrix, États-Unis).

La reproductibilité a été obtenue en analysant les échantillons du panel en duplicats, à raison de deux analyses par jour. Trois lots de produit différents ont été testés sur trois jours différents, sur trois instruments différents et par trois opérateurs différents.

Les valeurs de Tm des gènes de la toxine A et la toxine B ont été utilisées pour calculer le % CV afin d'évaluer la reproductibilité en termes d'imprécision.

Un résumé des résultats est présenté dans le tableau ci-dessous.

Tableau 20

Échantillon	Gène de la toxine A				Gène de la toxine B			
	N	Tm moyenne	EC	% CV	N	Tm moyenne	EC	% CV
<i>C. difficile</i> 002	12	64,78	0,16	0,25	12	60,73	0,22	0,37
<i>C. difficile</i> 017	12	64,59	0,10	0,15	12	60,58	0,29	0,48
<i>C. difficile</i> 078	12	64,55	0,09	0,14	12	60,57	0,28	0,47
<i>C. difficile</i> 027-1	12	64,73	0,17	0,26	12	62,98	0,22	0,35
<i>C. difficile</i> 027-2	12	64,68	0,12	0,19	12	63,12	0,23	0,37

La reproductibilité des valeurs de Tm des deux cibles montrait un faible % CV qui n'excédait pas 0,5 %.

De manière intéressante, alors que la Tm du gène de la toxine A était très similaire pour tous les ribotypes de *C. difficile* analysés, la Tm du gène de la toxine B pouvait être regroupée en deux groupes : un groupe comprenait les ribotypes 002, 017 et 078 de *C. difficile* et l'autre groupe comprenait le ribotype 027 hypervirulent de *C. difficile*.

L'analyse par groupe est présentée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 21

Échantillon	Gène de la toxine A				Gène de la toxine B			
	N	Tm moyenne	EC	% CV	N	Tm moyenne	EC	% CV
<i>C. difficile</i> 002, 017, 078	60	64,67	0,15	0,24	36	60,63	0,27	0,45
<i>C. difficile</i> 027 hypervirulent					24	63,05	0,23	0,37

Ce regroupement est dû à deux polymorphismes de nucléotides dans la région d'hybridation de la sonde du gène de la toxine B, qui sont partagés par le ribotype 027 hypervirulent de *C. difficile* (par ex. souche R 12087, SEQID HM062510 ; souche UK1, SEQID KC292158 ; souche CD196, SEQID FN538970) et d'autres souches de *C. difficile* positives pour une toxine binaire de clade 2 (par ex. souche R9385, ribotype 122, SEQID HM062502 ; souche R10870, ribotype 111, SEQID HM062497 ; souche CH6230, ribotype 251, SEQID HM062509 ; souche J9965, SEQID HM062500).

D'après les résultats, une valeur seuil de Tm de 62,0 °C peut être définie pour identifier la présence présumée du ribotype 027 hypervirulent de *C. difficile* dans l'échantillon, comme montré dans le tableau ci-dessous.

Tableau 22

Valeurs de Tm du gène de la toxine B				
Autres <i>C. difficile</i>		Valeur seuil de Tm	<i>C. difficile</i> 027 hypervirulent présumé	
Tm moyenne	Tm moyenne + 4 EC		Tm moyenne - 4 EC	Tm moyenne
60,63	61,71	62,00	62,12	63,05

12.5 Marqueurs potentiellement interférents : interférence

L'inhibition exercée par des marqueurs potentiellement interférents a été évaluée par l'analyse d'un panel d'acides nucléiques purifiés à une concentration élevée (au moins 10^5 copies/réaction), incluant les organismes suivants : *Aeromonas hydrophilia* (AH), *Bacteroides fragilis* (BF), *Vibrio cholera* (VC), *Helicobacter pylori* (HP), *Saccharomyces cerevisiae* (SC), *Plesiomonas shigelloides* (PS), *Klebsiella pneumoniae* (KC), *Escherichia coli* (Ecoli), *Serratia marcescens* (SM), *Acinetobacter baumannii* (AB), espèce *Bifidobacterium* (Bifido), *Candida albicans* (CA), *Citrobacter freundii* (CF), *Clostridium nexile* (Cnex), *Proteus mirabilis* (PM), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Enterobacter cloacae* (EC), *Giardia lamblia* (GL), espèce *Cryptosporidium* (CP), *Entamoeba histolytica* (EH), *Entérovirus*, *Adénovirus*, *Astrovirus*, *Norovirus*, *Rotavirus*, *Sapovirus*.

Les ADN génomiques de chaque organisme à une concentration élevée (au moins 10^5 copies/réaction) ont été dopés avec l'ADN génomique de *Clostridioides difficile* (Vircell Microbiologists, Espagne, code MBC043), à titre de matériel de référence à une concentration d'environ 3 x la LoD (1500 UFC/mL), auxquels ont été ajoutées 20 000 copies/réaction de matrice de Contrôle interne (CPE - Internal Control) afin d'imiter les échantillons cliniques extraits.

Des échantillons de référence contenant les cibles d'intérêt mais pas les organismes potentiellement interférents ont également été analysés.

Chaque organisme a été testé en 6 réplicats à des positions aléatoires sur le ELITE InGenius en mode « *PCR Only* » (PCR seulement).

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

Tableau 23

Échantillon	N		Ct moyen			% de concordance positive	Résultat
	Toxine B	Toxine A	Toxine B	Toxine A	IC		
Référence (Cdif)	6/6	6/6	37,29	37,08	24,41	100 %	Aucune inhibition
Cdiff + AH-BF-VC	6/6	6/6	36,97	36,57	24,27	100 %	Aucune inhibition
Cdiff + HP-SC-PS	6/6	6/6	37,33	37,42	23,92	100 %	Aucune inhibition
Cdiff + KP-Ecoli-SM	6/6	6/6	37,56	37,64	23,67	100 %	Aucune inhibition
Cdiff + AB-Bifido-CA	6/6	6/6	37,93	38,37	24,26	100 %	Aucune inhibition
Cdiff + CF-Cnex-PM	6/6	6/6	38,55	38,00	24,26	100 %	Aucune inhibition
Cdiff + PA-EC-GL	6/6	6/6	38,66	38,11	24,16	100 %	Aucune inhibition
Cdiff+EH	6/6	6/6	38,26	37,90	23,94	100 %	Aucune inhibition
Cdiff+CP	6/6	6/6	38,03	38,29	23,97	100 %	Aucune inhibition
Cdiff-Adéno	6/6	6/6	37,81	37,49	23,64	100 %	Aucune inhibition
Cdiff-Entéro	6/6	6/6	37,62	37,86	23,03	100 %	Aucune inhibition
Cdiff-Astro	6/6	6/6	37,58	37,34	24,11	100 %	Aucune inhibition
Cdiff-Noro	6/6	6/6	37,75	37,90	24,22	100 %	Aucune inhibition

Tableau 23 (continued)

Échantillon	N		Ct moyen			% de concordance positive	Résultat
	Toxine B	Toxine A	Toxine B	Toxine A	IC		
Cdiff-Sapo	6/6	6/6	37,21	36,92	23,92	100 %	Aucune inhibition
Cdiff-Rota	6/6	6/6	37,74	37,45	22,90	100 %	Aucune inhibition
Cdiff-Cnex	6/6	6/6	37,59	36,77	24,03	100 %	Aucune inhibition

Tous les organismes potentiellement interférents testés n'ont montré aucune inhibition de l'amplification de la cible *C. difficile* à l'aide du *C. difficile* ELITE MGB Kit.

12.6 Marqueurs potentiellement interférents : réactivité croisée

L'absence de réactivité croisée avec des organismes potentiellement interférents a également été vérifiée par l'analyse d'un panel d'acides nucléiques purifiés issus de différents organismes, comme indiqué dans les marqueurs potentiellement interférents : test d'interférence ci-dessus.

20 000 copies/réaction de matrice de Contrôle interne (CPE - Internal Control) ont été ajoutées aux ADN génomiques de chaque organisme à une concentration élevée (au moins 10^5 copies/réaction) afin d'imiter les échantillons cliniques extraits.

Des échantillons de référence contenant les cibles d'intérêt mais pas les organismes potentiellement interférents ont également été analysés.

Chaque organisme a été testé en 6 réplicats à des positions aléatoires sur le ELITE InGenius en mode « PCR Only » (PCR seulement).

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

Tableau 24

Échantillon	Positifs/Réplicats		IC Ct moyen	% de concordance négative	Résultat
	Toxine A	Toxine B			
Référence	0/6	0/6	24,55	100 %	Aucune réactivité croisée
AH-BF-VC	0/6	0/6	23,77	100 %	Aucune réactivité croisée
HP-SC-PS	0/6	0/6	23,72	100 %	Aucune réactivité croisée
KP-Ecoli-SM	0/6	0/6	23,85	100 %	Aucune réactivité croisée
AB-Bifido-CA	0/6	0/6	25,58	100 %	Aucune réactivité croisée
CF-Cnex-PM	0/6	0/6	25,50	100 %	Aucune réactivité croisée
PA-EC-GL	0/6	0/6	23,90	100 %	Aucune réactivité croisée
CP-EH-Entéro	0/6	0/6	23,77	100 %	Aucune réactivité croisée
Adéno-Astro-Noro	0/6	0/6	23,87	100 %	Aucune réactivité croisée

Tableau 24 (continued)

Échantillon	Positifs/Réplicats		IC Ct moyen	% de concordance négative	Résultat
	Toxine A	Toxine B			
Rota-Sapo	0/6	0/6	23,84	100 %	Aucune réactivité croisée
C. nexile	0/6	6/6	23,74	0 %	Réactivité croisée

Tous les marqueurs potentiellement interférents testés n'ont montré aucune réactivité croisée pour la cible *C. difficile* en utilisant le C. difficile ELITE MGB Kit, à l'exception de *Clostridium Nexile* souche VPI C48-37 qui a exercé une réaction croisée avec la réaction d'amplification du gène de la toxine B.

12.7 Substances potentiellement interférentes

L'effet de substances potentiellement interférentes a été évalué en analysant des substances endogènes ou exogènes qui peuvent être présentes dans des échantillons de selles natives (matrice la plus difficile), dans des limites cliniquement pertinentes. En particulier, les substances exogènes et endogènes suivantes indiquées dans le tableau ci-dessous ont été testées comme indiqué dans le document EP37 Ed1E du CLSI :

Tableau 25

Substance interférente	Principe actif/produit	ID	Concentration
Lavements	Huile de vaseline	VAS	20 mg/mL
Lubrifiant spermicide	Nonoxynol-9	NON	1,2 % v/v
Antidiarrhéiques	Sous-salicylate de bismuth	BISM	0,87 mg/mL
	Chlorhydrate de lopéramide	LOP	0,005 mg/mL
Laxatifs	Bisacodyl	BISA	0,25 mg/mL
Antibiotiques	Azithromycine	AZI	10 µg/mL
	Vancomycine	VAN	0,12 mg/mL
	Métronidazole	MET	0,12 mg/mL
	Ampicilline	AMP	0,08 mg/mL
	Céfpodoxime	CEF	4,5 µg/mL
	Ciprofloxacine	CIP	5 µg/mL
Anti-inflammatoires	Hydrocortisone	HYD	3 mg/mL
Antiacides	Carbonate de calcium	CAL	0,5 mg/mL
	Acide alginique	ALG	0,01 mg/mL
	Hydroxyde d'aluminium	ALU	0,03 mg/mL
	Trisilicate de magnésium	MAG	0,01 mg/mL
Sang total	Hémoglobine, immunoglobulines, acides nucléiques, etc.	Sang total	5 % v/v

Tableau 25 (continued)

Substance interférente	Principe actif/produit	ID	Concentration
Composants fécaux	Mucine	MUC	3 mg/mL
	Acide palmitique	PAL	0,85 mg/mL
	Acide stéarique	STE	0,85 mg/mL

Les substances potentiellement interférentes ont été testées en 6 groupes de 3 substances. La mucine, la céfpodoxime, la ciprofloxacine, l'hydrocortisone et le sang total ont été testés seuls.

Un matériel de référence de Clostridioides difficile NAP1 (ZeptoMetrix) a été dopé dans des échantillons de selles natives à une concentration d'environ 3 x la LoD.

Des échantillons de référence contenant les cibles d'intérêt mais pas les substances potentiellement interférentes ont également été analysés.

Chaque organisme a été testé en 6 réplicats à des positions aléatoires sur le ELITE InGenius en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

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

Tableau 26

Échantillon	Positifs/Réplicats		Ct moyen			% de concordance positive		Résultat
	Toxine B	Toxine A	Toxine B	Toxine A	IC	Toxine B	Toxine A	
Référence (Cdiff)	6/6	6/6	34,68	34,53	25,35	100 %	100 %	Aucune inhibition
Cdiff+VAN+MET+AMP	6/6	6/6	36,43	36,53	25,54	100 %	100 %	Aucune inhibition
Cdiff+LOP+BISA+AZI	6/6	6/6	36,31	36,27	25,46	100 %	100 %	Aucune inhibition
Cdiff+ ALG+ALU+MAG	6/6	6/6	36,41	36,48	25,72	100 %	100 %	Aucune inhibition
Cdiff+WB	6/6	6/6	35,64	35,41	25,72	100 %	100 %	Aucune inhibition
Cdiff+VAS+NON+BISM	6/6	6/6	34,75	34,31	25,36	100 %	100 %	Aucune inhibition
Cdiff+CAL+PAL+STE	6/6	6/6	35,95	36,20	25,70	100 %	100 %	Aucune inhibition
Cdiff+MUC	6/6	6/6	36,96	37,24	25,70	100 %	100 %	Aucune inhibition
Cdiff+CEF	6/6	6/6	35,14	34,93	25,69	100 %	100 %	Aucune inhibition
Cdiff+CIP	6/6	6/6	34,96	34,54	25,79	100 %	100 %	Aucune inhibition
Cdiff+HYD	6/6	6/6	34,85	34,26	25,86	100 %	100 %	Aucune inhibition

Toutes les substances potentiellement interférentes testées n'ont montré aucune inhibition de l'amplification de la cible *C. difficile* à l'aide du *C. difficile* ELITE MGB Kit.

12.8 Substances potentiellement interférentes : réactivité croisée

L'absence de réactivité croisée avec des substances potentiellement interférentes a également été vérifiée par l'analyse de substances endogènes ou exogènes qui peuvent être présentes dans des échantillons de selles natives (matrice la plus difficile), dans des limites cliniquement pertinentes, comme indiqué dans le test des substances potentiellement interférentes ci-dessus.

Les substances potentiellement interférentes ont été testées en 6 groupes de 3 substances. La mucine et le sang total ont été testés seuls.

20 000 copies/réaction de matrice de Contrôle interne (CPE - Internal Control) ont été ajoutées à chaque échantillon afin d'imiter les échantillons cliniques extraits.

Un échantillon de référence sans les substances potentiellement interférentes a également été analysé.

Chaque échantillon a été extrait et amplifié en 6 réplicats à des positions aléatoires sur le système ELITE InGenius en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

Chaque organisme a été testé en 6 réplicats à des positions aléatoires sur le ELITE InGenius en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

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

Tableau 27

Échantillon	Positifs/Réplicats		IC Ct moyen	% de concordance négative	Résultat
	Toxine A	Toxine B			
Référence	0/6	0/6	25,91	100 %	Aucune réactivité croisée
LOP+BISA+AZI	0/6	0/6	25,69	100 %	Aucune réactivité croisée
VAN+MET+AMP	0/6	0/6	25,58	100 %	Aucune réactivité croisée
ALG+ALU+MAG	0/6	0/6	25,79	100 %	Aucune réactivité croisée
CEF+CIP+HYD	0/6	0/6	25,77	100 %	Aucune réactivité croisée
Sang total	0/6	0/6	25,50	100 %	Aucune réactivité croisée
VAS+NON+BISM	0/6	0/6	25,88	100 %	Aucune réactivité croisée
CAL+PAL+STE	0/6	0/6	25,64	100 %	Aucune réactivité croisée
MUC	0/6	0/6	25,63	100 %	Aucune réactivité croisée

Toutes les substances potentiellement interférentes testées n'ont montré aucune réactivité croisée pour la cible *C. difficile* à l'aide du *C. difficile* ELITE MGB Kit.

12.9 Répétabilité

La répétabilité du test a été évaluée sur les ELITE InGenius et ELITE BeGenius en analysant un panel d'échantillons de selles natives négatifs ou dopés avec un matériel de référence de *C. difficile* (Zeptomatrix).

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

Tableau 28 Répétabilité intra-session avec le ELITE InGenius (Jour 1)

Échantillon	N	Toxine B			Toxine A			Concordance (%)
		Ct moyen	EC	% CV	Ct moyen	EC	% CV	
Nég	8	-	-	-	-	-	-	100 %
3 x la LoD	8	36,14	0,35	0,96	35,74	0,57	1,59	100 %
10 x la LoD	8	33,68	0,33	0,99	33,05	0,39	1,19	100 %

Tableau 29 Répétabilité intra-session avec le ELITE BeGenius (Jour 1)

Échantillon	N	Toxine B			Toxine A			Concordance (%)
		Ct moyen	EC	% CV	Ct moyen	EC	% CV	
Nég	8	-	-	-	-	-	-	100 %
3 x la LoD	8	36,84	0,37	1,01	36,31	0,51	1,41	100 %
10 x la LoD	8	34,12	0,44	1,29	33,17	0,45	1,35	100 %

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

Tableau 30 Répétabilité inter-sessions avec le ELITE InGenius

Échantillon	N	Toxine B			Toxine A			Concordance (%)
		Ct moyen	EC	% CV	Ct moyen	EC	% CV	
Nég	16	-	-	-	-	-	-	100 %
3 x la LoD	16	36,11	0,35	0,96	35,75	0,44	1,22	100 %
10 x la LoD	16	33,51	0,31	0,93	32,88	0,41	1,24	100 %

Tableau 31 Répétabilité inter-sessions avec le ELITE BeGenius

Échantillon	N	Toxine B			Toxine A			Concordance (%)
		Ct moyen	EC	% CV	Ct moyen	EC	% CV	
Nég	16	-	-	-	-	-	-	100 %
3 x la LoD	16	36,73	0,39	1,06	36,03	0,61	1,70	100 %
10 x la LoD	16	33,97	0,39	1,16	33,02	0,47	1,44	100 %

Dans le test de répétabilité, le C. difficile 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 %.

12.10 Reproductibilité

La reproductibilité du test a été évaluée sur les ELITE InGenius et ELITE BeGenius en analysant un panel d'échantillons de selles natives négatifs ou dopés avec un matériel de référence de *C. difficile* (Zeptomatrix).

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

Tableau 32 Reproductibilité inter-lots avec le ELITE InGenius

Échantillon	N	Toxine B			Toxine A			Concordance (%)
		Ct moyen	EC	% CV	Ct moyen	EC	% CV	
Nég	8	-	-	-	-	-	-	100 %
3 x la LoD	8	36,22	0,67	1,85	35,24	0,28	0,78	100 %
10 x la LoD	8	33,86	0,27	0,81	32,72	0,34	1,05	100 %

Tableau 33 Reproductibilité inter-lots avec le ELITE BeGenius

Échantillon	N	Toxine B			Toxine A			Concordance (%)
		Ct moyen	EC	% CV	Ct moyen	EC	% CV	
Nég	8	-	-	-	-	-	-	100 %
3 x la LoD	8	36,47	0,61	1,69	34,63	0,44	1,28	100 %
10 x la LoD	8	33,92	0,24	0,72	32,20	0,23	0,72	100 %

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

Tableau 34 Reproductibilité inter-instruments avec le ELITE InGenius

Échantillon	N	Toxine B			Toxine A			Concordance (%)
		Ct moyen	EC	% CV	Ct moyen	EC	% CV	
Nég	16	-	-	-	-	-	-	100 %
3 x la LoD	16	35,74	0,27	0,75	34,92	0,34	0,96	100 %
10 x la LoD	16	33,41	0,69	2,05	32,47	0,59	1,82	100 %

Tableau 35 Reproductibilité inter-instruments avec le ELITE BeGenius

Échantillon	N	Toxine B			Toxine A			Concordance (%)
		Ct moyen	EC	% CV	Ct moyen	EC	% CV	
Nég	16	-	-	-	-	-	-	100 %
3 x la LoD	16	36,26	0,46	1,27	34,74	0,63	1,81	100 %
10 x la LoD	16	33,55	0,35	1,03	32,04	0,36	1,13	100 %

Dans le test de reproductibilité, le C. difficile 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 %.

12.11 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 de selles certifiés négatifs pour l'ADN de *C. difficile*.

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 36

Selles négatives	N	Positif	Négatif	Spécificité diagnostique (%)
<i>C. difficile</i>	45	1	44	97,8 %

La valeur seuil Ct de l'IC est définie à 32 pour les ELITE InGenius et ELITE BeGenius.

12.12 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 de selles certifiés positifs pour l'ADN de *C. difficile*.

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 37

Échantillons de selles positifs	N	Positif	Négatif	Sensibilité diagnostique (%)
<i>C. difficile</i>	30	30	0	100 %

NOTE!

Les données complètes et les résultats des tests effectués pour évaluer les caractéristiques de performance du produit avec les matrices et les instruments sont présentés dans la Fiche technique du produit « C. difficile ELITE MGB Kit », FTP M800358.

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 : selles liquides ou non formées.

Les échantillons de selles destinés à l'extraction de l'ADN doivent être prélevés conformément aux procédures standard de prélèvement et de manipulation des selles et identifiés conformément aux directives du laboratoire. Les selles brutes doivent être placées dans un récipient stérile doté d'un capuchon vissant qui doit être hermétiquement fermé de manière adéquate afin d'éviter toute fuite accidentelle du contenu, et doivent être transportées conformément à l'ensemble des réglementations applicables relatives au transport d'agents étiologiques. Conserver les échantillons au réfrigérateur (+2/+8 °C) jusqu'à 48 heures avant le traitement. Si la clarification des selles ne peut pas être effectuée dans les 48 heures suivant le prélèvement, conserver les échantillons à une température ≤ -70 °C.

Préparer un tube de 1,5 mL étiqueté pour chaque échantillon de selles brutes et distribuer 0,8 mL de tampon S.T.A.R. Buffer dans le tube. Agiter les échantillons de selles brutes au vortex puis utiliser une pipette dotée d'un cône résistant aux aérosols pour transférer approximativement 200 µL d'échantillon de selles brutes (si nécessaire, utiliser un cône à alésage large ou une spatule en plastique pour les échantillons de selles épaisses) dans le

tube de 1,5 mL contenant le tampon S.T.A.R. Buffer. Boucher fermement le tube puis agiter au vortex pour homogénéiser le mélange (20-30 s). Centrifuger la solution homogénéisée à 13 000 × g (tr/min) pendant 1 minute afin de clarifier l'échantillon. Avec précaution, transférer 400-650 µL du surnageant de selles clarifié dans un tube secondaire étiqueté, en veillant à ne pas perturber le culot de matière fécale. Se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction pour identifier les volumes et les tubes secondaires compatibles avec les systèmes d'extraction. Conserver l'échantillon de selles clarifié à +2/+8 °C pendant 7 jours maximum avant de procéder à l'extraction.

NOTE!

Le tampon S.T.A.R. Buffer doit être conservé à température ambiante. Des précipités blancs peuvent se former si le tampon est conservé à une température inférieure à la température ambiante. Avant de commencer la procédure d'extraction, vérifier si des précipités se sont formés. Le cas échéant, réchauffer la solution à 30-40 °C dans un bain-marie ou un incubateur jusqu'à la dissolution des précipités.

NOTE!

Pour traiter les échantillons de selles clarifiés avec le système **ELITE STAR System** et la **version logicielle 3.4.13** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **UUNI_E100_S200_EL1**, qui utilise 200 µL d'échantillon et effectue l'élution de l'extrait dans 100 µL (l'élution est en fait effectuée dans 115 µL, parmi lesquels 100 µL sont récupérés). Après le transfert dans le tube secondaire, charger les échantillons clarifiés sur le système **ELITE STAR**. Un volume minimum de 400-600 µL est toujours requis pour chaque échantillon. Ajouter **50 µL de CPE - Internal Control** et **750 µL d'eau de qualité biologie moléculaire** dans un **tube de protéinase-véhicule** comme indiqué dans le manuel du kit d'extraction. Pour la procédure d'extraction, se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction.

Conserver les acides nucléiques purifiés à +2/+8 °C s'ils sont utilisés le jour même de leur extraction, ou à une température inférieure à -20 °C pour un stockage à long terme.

NOTE!

Pour traiter les échantillons de selles clarifiés avec le système **ELITE GALAXY System** et la **version logicielle 1.3.1** (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **xNA Extraction (Universal)**, qui utilise 300 µL d'échantillon et effectue l'élution de l'extrait dans 100 µL (l'élution est en fait effectuée dans 110 µL, parmi lesquels 100 µL sont récupérés). Après le transfert dans le tube secondaire, charger les échantillons clarifiés sur le système **ELITE GALAXY**. Un volume minimum de 400-650 µL, selon la classe de tube utilisée, est toujours requis pour chaque échantillon. Ajouter **2,5 µL d'échantillon de CPE - Internal Control** et **7,5 µL d'échantillon d'eau de qualité biologie moléculaire** dans une **solution IC + véhicule** comme indiqué dans le manuel du kit d'extraction. Pour la procédure d'extraction, se reporter au mode d'emploi du kit d'extraction.

Conserver les acides nucléiques purifiés à +2/+8 °C s'ils sont utilisés le jour même de leur extraction, ou à une température inférieure à -20 °C pour un stockage à long terme.

NOTE!

Pour traiter les échantillons de selles clarifiés avec le système **NucliSENS® easyMAG®**, transférer 20 µL de chaque échantillon de selles clarifié dans le récipient à échantillons jetable **NucliSENS easyMAG** (8 échantillons par récipient, et jusqu'à trois récipients par analyse) comme établi dans la liste de travail de l'instrument.

Paramétrer une requête d'extraction sur le système « **NucliSENS easyMAG** » de la manière suivante :

- Matrice = Selles ;
- Protocole = Generic 2.0.1 ;
- Volume (mL) = 0,02 mL ;
- Éluat (µL) = 110 µL ;
- Type = Primaire.

Créer un nouveau cycle d'extraction qui possède un nom de fichier univoque et reconnaissable (par ex. « année-mois-jour-Extrait01 ») puis, avec précaution, ajouter les requêtes d'extraction au cycle dans l'ordre dans lequel elles ont été placées dans le récipient jetable, et démarrer le processus de lyse de 10 minutes.

Pendant le processus de lyse de 10 minutes, 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 **C. difficile Internal Control**. Pour chaque échantillon, utiliser le pipeteur BioHit ou un pipeteur manuel pour distribuer 125 µL de la suspension de silice magnétique dans la barrette NucliSENS easyMAG Strip for Premix. Utiliser le pipeteur 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 automatisée. Une fois le processus terminé, retirer les acides nucléiques du récipient jetable dans les 30 minutes qui suivent la fin de l'extraction pour éviter toute contamination des échantillons par la silice magnétique.

13.2 Substances interférentes

Il a été démontré que la présence de sang humain, de mucine, de graisses fécales, de médicaments sans ordonnance et de prescription dans les échantillons n'interférerait pas avec la détection de **C. difficile** toxigène à l'aide du **C. difficile ELITE MGB® Kit** utilisé en association avec le système **NucliSENS® easyMAG®**.

Tableau 38

Substance potentiellement interférente	Ingrédient actif	Interférence ?
Anti-fongique/Anti-démangeaisons (vaginal)	Nystatine	Non
Crèmes/pommades/suppositoires	Hydrocortisone, 1 %	Non
Crèmes/pommades anti-hémorroïdes	Phényléphrine, 0,25 %	Non
Antiacides	Carbonate de calcium	Non
Lavement	Huile minérale	Non
Lubrifiant spermicide	Nonoxynol 9	Non
Antidiarrhéiques	Chlorhydrate de lopéramide	Non
Antidiarrhéiques	Sous-salicylate de bismuth	Non
Laxatifs	Sennosides	Non

Tableau 38 (continued)

Substance potentiellement interférente	Ingrédient actif	Interférence ?
Antibiotiques (oraux ou injectables)	Métronidazole (oral)	Non
	Ciprofloxacine (orale)	Non
	Azithromycine (orale)	Non
	Vancomycine (orale)	Non
	Zosyn (injectable)	Non
Anti-inflammatoire non stéroïdien	Naproxène sodique	Non
Anti-inflammatoire stéroïdien	Prednisone	Non
Lingette humide	Chlorure de benzalkonium à 0,40 %	Non
Lingette humide	Alcool isopropylique à 70 %	Non
Graisses fécales (acide palmitique)	Acide palmitique	Non
Graisses fécales (acide stéarique)	Acide stéarique	Non
Hémoculture	Glucose, hormones, enzymes, ions, fer, etc.	Non
Mucus	Immunoglobulines, lysozyme, polymères, etc.	Non

Il n'existe actuellement aucune donnée disponible en ce qui concerne l'inhibition provoquée par d'autres médicaments antiviraux, antibiotiques, de chimiothérapie 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 contrôle négatif et une réaction de contrôle positif.

Pour le contrôle négatif, utiliser de l'eau de qualité biologie moléculaire (non fournie).

Pour le contrôle positif, utiliser le « **C. difficile - ELITE Positive Control** » réf M800373 (non fourni).

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

Paramétrage de la session d'amplification en temps réel

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

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) ;
- lorsque le Applied Biosystem® **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** ou Applied Biosystem® **7500 Fast Real-Time PCR System** est utilisé, choisir le « Run mode: Fast 7500 » (Mode d'exécution : Fast 7500) ;

- lorsque le Applied Biosystem® **7500 Real-Time PCR System** est utilisé, le « Run mode: Standard 7500 » est automatiquement sélectionné ;
- créer un nouveau « detector » (détecteur) ou paramétrer le « detector » (détecteur) approprié dans le menu Tool (Outils) en sélectionnant le Detector Manager (Gestionnaire de détecteur) :
 - paramétrer le « detector » (détecteur) pour la sonde du gène de la toxine A avec le « reporter » (rapporteur) = « VIC » (AP525 est similaire à VIC), le « quencher » (désactivateur) = « none » (aucun) (non fluorescent) et le nommer « Toxine A » ;
 - paramétrer le « détecteur » (détecteur) pour la sonde du gène de la toxine B avec le « reporter » (rapporteur) = « FAM », le « quencher » (désactivateur) = « none » (aucun) (non fluorescent) et le nommer « Toxine B » ;
 - paramétrer le « detector » (détecteur) pour la sonde du Contrôle interne 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.

S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
NC	PC										

Légende : S1 - S12 : échantillons à analyser ; NC : contrôle négatif d'amplification ; PC : contrôle positif 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 définie pendant l'étape d'hybridation à 56 °C.

- modifier le temps comme indiqué dans le tableau « **Cycle thermique** » ci-dessous,
- paramétrer le nombre de cycles sur **45**,
- paramétrer le volume de la réaction à **30 µL**,
- facultatif : ajouter une étape de dissociation (Add Dissociation Stage [Ajouter étape de dissociation]) et paramétrer la température entre 40 °C et 80 °C.

Tableau 39

Paramètres du 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
Dissociation (facultatif)	95 °C	15 s
	40 °C	1 min.
	80 °C	15 s
	60 °C	15 s

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 :

- décongeler les tubes contenant les échantillons traités à analyser. Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace,
 - décongeler les tubes de **C. difficile 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 pendant quatre heures maximum,
 - décongeler un tube de **C. difficile Positive Control** (non inclus). Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver le tube sur de la glace pendant quatre heures maximum,
 - se munir de la **microplaque 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 **C. difficile PCR Mix** au fond des puits de la **microplaque d'amplification**, comme précédemment établi dans la **Work Sheet** (Fiche de travail). Éviter d'introduire des bulles.

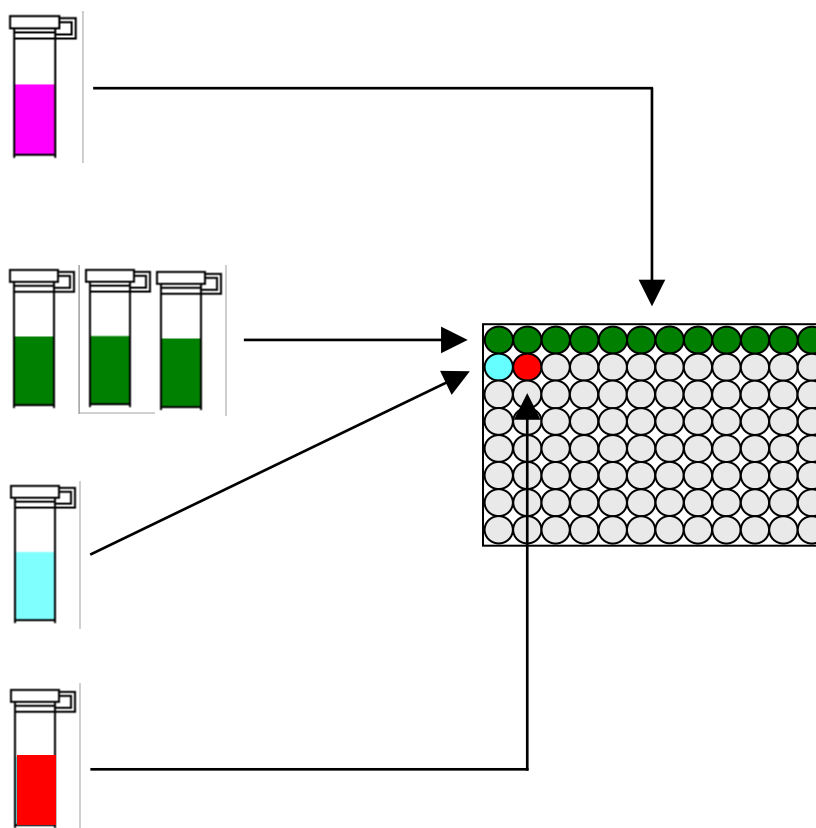
NOTE!

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). 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).
4. Ajouter au mélange réactionnel **10 µL** de **C. difficile Positive Control** dans le puits désigné, comme précédemment établi dans la **Work Sheet** (Fiche de travail).
5. Sceller avec précision la **microplaque d'amplification** à l'aide de la **feuille adhésive d'amplification**.
6. Si une centrifugeuse avec un adaptateur de plaque est disponible, centrifuger la **microplaque d'amplification** pour collecter le mélange réactionnel au fond des puits.
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 (par ex. « année-mois-jour-C. difficile-EGSpA »).

La figure suivante illustre le paramétrage de la réaction d'amplification.



1. Ajouter 20 µL de PCR Mix à chaque puits
2. Ajouter 10 µL des ADN extraits
3. Ajouter 10 µL de Contrôle négatif
4. Ajouter 10 µL de Contrôle positif

NOTE!

si la préparation de la réaction d'amplification est effectuée avec l'instrument **ELITE GALAXY**, charger la microplaque d'élution, le Q-PCR Mix et la microplaque d'amplification comme indiqué dans le manuel d'utilisation de l'instrument et suivre les étapes requises par la GUI.

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 adhésive optique ne doit pas être retirée de la microplaque d'amplification**.

Analyse qualitative des résultats

Les valeurs enregistrées de la fluorescence émise pendant les réactions d'amplification par la sonde du gène de la toxine A (détecteur VIC « Toxine A »), par la sonde du gène de la toxine B (détecteur FAM « Toxine B ») et par la sonde du Contrôle interne (détecteur CY5 « IC ») 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 **0,05**. Appuyer sur le bouton **Analyze** (Analyser) et **enregistrer** les résultats.

Les valeurs de la fluorescence émise par les sondes spécifiques dans 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 la réaction d'amplification du **Contrôle positif**, les valeurs **Ct** des détecteurs Toxine A et Toxine B (Results > Report [Résultats > Rapport]) sont utilisées pour valider l'amplification et la détection, comme décrit dans le tableau suivant :

Tableau 40

Réaction du Contrôle positif Détecteur VIC « Toxine A »	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct < 35	POSITIF	CORRECTE

Tableau 41

Réaction du Contrôle positif Détecteur FAM « Toxine B »	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct < 35	POSITIF	CORRECTE

Si le résultat de l'amplification du Contrôle positif est Ct ≥ 35 ou Ct Undetermined (Ct Indéterminé) pour les détecteurs Toxine A et Toxine B, alors l'ADN cible n'a pas été 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. L'intégralité de 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 Toxine A, Toxine B et IC (Results > Report [Résultats > Rapport]) sont utilisées pour valider l'amplification et la détection, comme décrit dans le tableau suivant :

Tableau 42

Réaction du Contrôle négatif Détecteur VIC « Toxine A »	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct Indéterminé ou Ct ≥ 40	NÉGATIF	CORRECTE

Tableau 43

Réaction du Contrôle négatif Détecteur FAM « Toxine B »	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct Indéterminé ou Ct ≥ 40	NÉGATIF	CORRECTE

Tableau 44

Réaction du Contrôle négatif Détecteur Cy5 « IC »	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct Indéterminé ou Ct ≥ 34	NÉGATIF	CORRECTE

Si le résultat de l'amplification du **Contrôle négatif** est Ct < 40 pour les détecteurs Toxine A ou Toxine B, ou Ct < 34 pour le détecteur IC, alors l'ADN cible a été incorrectement détecté. Cela signifie que des problèmes sont survenus pendant l'étape d'amplification (contamination), ce qui peut générer des résultats 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 Toxine A ou Toxine B sont utilisées pour détecter l'ADN cible alors que la valeur **Ct** du Contrôle interne 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 45

Réaction de l'échantillon			Résultat du test
Détecteur VIC « Toxine A »	Détecteur FAM « Toxine B »	Détecteur Cy5 « IC »	
Indéterminé ou Ct ≥ 40	Indéterminé ou Ct ≥ 40	Ct < 34	Négatif
		Indéterminé ou Ct ≥ 34	Non valide
Déterminé, Ct < 40	Indéterminé ou Ct ≥ 40	Non applicable	Positif
Indéterminé ou Ct ≥ 40	Déterminé, Ct < 40	Non applicable	Positif
Déterminé, Ct < 40	Déterminé, Ct < 40	Non applicable	Positif

Tableau 46

Résultat du test	Interprétation du résultat
Négatif	L'ADN du gène de la toxine A ou du gène de la toxine B de C. difficile n'a pas été détecté dans l'échantillon. L'échantillon est négatif pour <i>C. difficile</i> toxinogène ou sa concentration est inférieure à la limite de détection de l'analyse.
Non valide	Résultat de test non valide. Répéter l'analyse à partir de l'extraction du même échantillon ou procéder à une nouvelle extraction à partir d'un nouvel échantillon.
Positif	L'ADN du gène de la toxine A ou du gène de la toxine B de C. difficile a été détecté dans l'échantillon. L'échantillon est positif pour <i>C. difficile</i> , qui pourrait être toxinogène .

La présence d'un des marqueurs (gène de la toxine A ou gène de la toxine B) ou des deux marqueurs indique la présence de *C. difficile* toxinogène.

Si le résultat de la réaction d'amplification de l'échantillon est **Ct Undetermined** (Ct Indéterminé) ou **Ct ≥ 40** pour les détecteurs Toxine A et Toxine B, 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 des cibles et du Contrôle interne. 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 contamination par des inhibiteurs dans l'ADN extrait), ce qui peut générer des résultats incorrects et des faux négatifs. Dans ce cas, l'échantillon n'est pas adéquat, l'analyse n'est pas valide et doit être répétée 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 ≥ 40** pour les détecteurs Toxine A et Toxine B, et **Ct < 34** pour le détecteur IC, cela signifie que l'ADN de *C. difficile* toxinogène n'a pas été détecté dans l'échantillon traité. L'échantillon est présumé négatif. Cependant, le nombre d'organismes dans l'échantillon peut être inférieur à la limite de détection du produit (se reporter à la section « Caractéristiques de performance »). Dans ce cas, le résultat pourrait être un faux négatif.

NOTE!

Lorsque l'ADN de la toxine A et/ou la toxine B est détecté dans un échantillon, le détecteur IC peut être **Ct Indéterminé** (Ct Indéterminé) ou **Ct ≥ 34**. En fait, l'amplification hautement efficace de l'ADN des gènes de la toxine A et la toxine B peut entrer en compétition avec l'amplification faiblement efficace du Contrôle interne. 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 Performances cliniques

Les caractéristiques de performance du **C. difficile ELITe MGB Kit** utilisé en association avec des échantillons de selles et le système **ELITe STAR** ont été déterminées par l'analyse d'un panel d'échantillons cliniques préalablement testés par un test de cytotoxicité en culture de *C. difficile* à titre de méthode de référence. Au total, 82 échantillons de selles, dont 30 échantillons positifs et 52 échantillons négatifs, ont été testés. Chaque échantillon a été utilisé pour effectuer la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction et l'amplification, à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Tableau 47

C. difficile ELITe MGB Kit	Méthode de référence		
	Positif pour <i>C. difficile</i> toxigène	Négatif pour <i>C. difficile</i> toxigène	Total
Positif pour <i>C. difficile</i> toxigène	29	4	33
Négatif pour <i>C. difficile</i> toxigène	1	48	49
Nombre total d'échantillons valides pour l'analyse	30	52	82
Sensibilité diagnostique (pourcentage de concordance positive)	97 %	-	
Spécificité diagnostique (pourcentage de concordance négative)	-	92 %	

Par comparaison à la méthode de référence, le **C. difficile ELITe MGB Kit** a identifié 97 % des échantillons positifs pour *C. difficile* toxigène et 92 % des échantillons négatifs. L'analyse n'a pas pu confirmer un échantillon positif qui était positif dans le test en culture. L'analyse a identifié 4 échantillons positifs qui étaient négatifs dans le test en culture. L'analyse des courbes de fusion a confirmé que les 4 échantillons étaient de véritables échantillons positifs pour *C. difficile* toxigène.

Une résolution des échantillons discordants a été réalisée à l'aide d'un test moléculaire indépendant (système Xpert® C. difficile, Cepheid). Le résultat final est présenté dans le tableau ci-dessous.

Tableau 48

C. difficile ELITe MGB Kit	Méthodes de référence		
	Positif pour <i>C. difficile</i> toxigène	Négatif pour <i>C. difficile</i> toxigène	Total
Positif pour <i>C. difficile</i> toxigène	33	0	33
Négatif pour <i>C. difficile</i> toxigène	0	49	49
Nombre total d'échantillons valides pour l'analyse	33	49	82

Tableau 48 (continued)

C. difficile ELITE MGB Kit	Méthodes de référence		
	Positif pour C. difficile toxigène	Négatif pour C. difficile toxigène	Total
Sensibilité diagnostique (pourcentage de concordance positive)	100 %	-	
Spécificité diagnostique (pourcentage de concordance négative)	-	100 %	

Les caractéristiques de performance du **C. difficile ELITE MGB Kit** utilisé en association avec des échantillons de selles et le système **ELITE GALAXY** ont été déterminées par l'analyse d'un panel d'échantillons cliniques préalablement testés par un test de cytotoxicité en culture à titre de méthode de référence. Au total, 82 échantillons de selles de *C. difficile*, dont 30 échantillons positifs et 52 échantillons négatifs, ont été testés. Chaque échantillon a été utilisé pour effectuer la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction et l'amplification, à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Tableau 49

C. difficile ELITE MGB Kit	Méthode de référence		
	Positif pour C. difficile toxigène	Négatif pour C. difficile toxigène	Total
Positif pour <i>C. difficile</i> toxigène	28	4	32
Négatif pour <i>C. difficile</i> toxigène	2	48	50
Nombre total d'échantillons valides pour l'analyse	30	52	82
Sensibilité diagnostique (pourcentage de concordance positive)	93 %	-	
Spécificité diagnostique (pourcentage de concordance négative)	-	92 %	

Par comparaison à la méthode de référence, le **C. difficile ELITE MGB Kit** a identifié 93 % des échantillons positifs pour *C. difficile* toxigène et 92 % des échantillons négatifs. L'analyse n'a pas pu confirmer 2 échantillons positifs qui était positifs dans le test en culture. L'analyse a identifié 4 échantillons positifs qui étaient négatifs dans le test en culture. L'analyse des courbes de fusion a confirmé que les 4 échantillons étaient de véritables échantillons positifs pour *C. difficile* toxigène.

Une résolution des échantillons discordants a été réalisée à l'aide d'un test moléculaire indépendant (système Xpert® C. difficile, Cepheid). Les résultats finaux sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 50

C. difficile ELITE MGB Kit	Méthodes de référence		
	Positif pour C. difficile toxigène	Négatif pour C. difficile toxigène	Total
Positif pour <i>C. difficile</i> toxigène	32	0	32
Négatif pour <i>C. difficile</i> toxigène	1	49	50
Nombre total d'échantillons valides pour l'analyse	33	49	82
Sensibilité diagnostique (pourcentage de concordance positive)	100 %	-	
Spécificité diagnostique (pourcentage de concordance négative)	-	100 %	

Les caractéristiques de performance du **C. difficile ELITE MGB Kit** ont été déterminées par une étude expérimentale prospective qui a comparé les résultats obtenus à l'aide du **C. difficile ELITE MGB Kit**, utilisé en association avec le système NucliSENS® easyMAG® (BioMérieux) et l'instrument 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems), avec un test de cytotoxicité en culture à titre de méthode de référence.

Au total, 100 échantillons de selles positifs et négatifs pour *C. difficile*, qui ont été évalués par un test en culture, ont ensuite été testés à l'aide du **C. difficile ELITE MGB Kit**. Par comparaison à la méthode de référence, le **C. difficile ELITE MGB Kit** a identifié 100 % des échantillons positifs pour *C. difficile* toxigène et 86 % des échantillons négatifs.

Tableau 51

C. difficile ELITE MGB Kit	Méthode de référence		
	Positif pour <i>C. difficile</i> toxigène	Négatif pour <i>C. difficile</i> toxigène	Total
Positif pour <i>C. difficile</i> toxigène	50	7	57
Négatif pour <i>C. difficile</i> toxigène	0	43	43
Nombre total d'échantillons valides pour l'analyse	50	50	100
Sensibilité diagnostique (pourcentage de concordance positive)	100 %	-	
Spécificité diagnostique (pourcentage de concordance négative)	-	86 %	

Par comparaison à la méthode de référence, le **C. difficile ELITE MGB Kit** a identifié 100 % des échantillons positifs pour *C. difficile* toxigène et 86 % des échantillons négatifs. L'analyse a identifié 7 échantillons positifs qui étaient négatifs dans le test en culture.

Une analyse des échantillons discordants a été réalisée par PCR en utilisant des amorces spécifiques pour le gène de la toxine B mais non apparentées à celles contenues dans le **C. difficile ELITE MGB Kit**. Les résultats finaux sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 52

C. difficile ELITE MGB Kit	Méthodes de référence		
	Positif pour <i>C. difficile</i> toxigène	Négatif pour <i>C. difficile</i> toxigène	Total
Positif pour <i>C. difficile</i> toxigène	50	5	55
Négatif pour <i>C. difficile</i> toxigène	0	45	45
Nombre total d'échantillons valides pour l'analyse	50	50	100
Sensibilité diagnostique (pourcentage de concordance positive)	100 %	-	
Spécificité diagnostique (pourcentage de concordance négative)	-	90 %	

15.2 Performances non cliniques

15.2.1 Limite de détection

La LoD du **C. difficile ELITE MGB Kit** a été calculée par une analyse statistique de régression des probits. La LoD pour chaque souche a été calculée comme les concentrations auxquelles la probabilité d'obtention d'un résultat positif était de 95 %.

La LoD du **C. difficile ELITE MGB Kit** utilisé en association avec des échantillons de selles clarifiés et le système **ELITE STAR** a été déterminée en utilisant deux souches de *C. difficile* toxigène.

Des matériels de référence contenant *C. difficile* 027 ou *C. difficile* 017 (Qnostics Ltd, Royaume-Uni) ont été dilués dans des selles clarifiées négatives. Des dilutions multiples dans une plage de 1 000 UFC/ mL à 1 UFC/mL ont été testées en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction et l'amplification, à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Les valeurs de la LoD en UFC/mL sont présentées ci-dessous.

Tableau 53 Limite de détection pour des échantillons de selles clarifiés avec le système ELITE STAR

Souche	UFC/mL
<i>C. difficile</i> 027, toxine A+B+, toxinotype III	187
<i>C. difficile</i> 017, toxine A-B+, toxinotype VIII	278

La LoD du **C. difficile ELITE MGB Kit** utilisé en association avec des échantillons de selles clarifiés et le système **ELITE GALAXY** a été déterminée en utilisant deux souches de *C. difficile* toxinogène.

Des matériels de référence contenant *C. difficile* 027 ou *C. difficile* 017 (Qnostics Ltd, Royaume-Uni) ont été dilués dans des selles clarifiées négatives. Des dilutions multiples dans une plage de 178 UFC/ mL à 1,78 UFC/ mL ont été testées en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction, le paramétrage de la PCR et l'amplification, à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Les valeurs de la LoD en UFC/mL sont présentées ci-dessous.

Tableau 54 Limite de détection pour des échantillons de selles clarifiés avec le système ELITE GALAXY

Souche	UFC/mL
<i>C. difficile</i> 027, toxine A+B+, toxinotype III	88
<i>C. difficile</i> 017, toxine A-B+, toxinotype VIII	84

La LoD du **C. difficile ELITE MGB Kit** utilisé en association avec des échantillons de selles clarifiés et le système **NucliSENS® easyMAG®** a été déterminée en utilisant deux souches de *C. difficile* toxinogène.

Des cultures fraîches de *C. difficile* souche VPI 10463 et souche 4118 ont été quantifiées et diluées dans des selles négatives clarifiées. Des dilutions multiples ont été testées en effectuant la procédure d'analyse complète, à savoir l'extraction et l'amplification, à l'aide des produits bioMérieux et ELITechGroup S.p.A.

Après la détermination, la LoD pour chaque souche a ensuite été vérifiée en testant 20 réplicats à la concentration revendiquée. Les valeurs de la LoD en UFC/mL sont présentées ci-dessous.

Tableau 55 Limite de détection pour des échantillons de selles clarifiés avec le système NucliSENS® easyMAG®

Souche	UFC/mL
ATCC 43255, Souche VPI 10463, Toxinotype 0	1,121
ATCC BAA-1870, Souche 4118, Toxinotype III	3,750

15.2.2 Sensibilité analytique : reproductibilité avec un matériel de référence étalonné

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

Un test a été réalisé en utilisant, à titre de matériel de référence, le panel « QCMD 2012 *C. difficile* DNA EQA Panel » (Qnostics Ltd, Royaume-Uni). Chaque échantillon a été testé en effectuant l'extraction à l'aide du système ELITE STAR et l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 56 Tests avec un panel de référence et le système ELITE STAR

Échantillon	Type	UFC/mL	Résultat
CD12-01	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁴	POS
CD12-02	<i>C. sordellii</i>	-	NÉG
CD12-03	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ³	POS
CD12-04	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁵	POS
CD12-05	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁵	POS
CD12-06	Négatif	-	NÉG
CD12-07	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁶	POS
CD12-08	<i>C. difficile</i> 017	8 x 10 ⁶	POS
CD12-09	<i>C. difficile</i> 017	8 x 10 ⁴	POS
CD12-10	<i>C. difficile</i> 017	8 x 10 ⁵	POS

Tous les échantillons ont été correctement détectés.

Un test supplémentaire a été réalisé en utilisant, à titre de matériel de référence, le panel « QCMD 2012 C. difficile DNA EQA Panel » (Qnostics Ltd, Royaume-Uni). Chaque échantillon a été testé en effectuant l'extraction et le paramétrage de la PCR à l'aide du système **ELITE GALAXY** et l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 57 Tests avec un panel de référence et le système ELITE GALAXY

Échantillon	Type	UFC/mL	Résultat
CD12-01	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁴	POS
CD12-02	<i>C. sordellii</i>	-	NÉG
CD12-03	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ³	POS
CD12-04	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁵	POS
CD12-05	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁵	POS
CD12-06	Négatif	-	NÉG
CD12-07	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁶	POS
CD12-08	<i>C. difficile</i> 017	8 x 10 ⁶	POS
CD12-09	<i>C. difficile</i> 017	8 x 10 ⁴	POS
CD12-10	<i>C. difficile</i> 017	8 x 10 ⁵	POS

Tous les échantillons ont été correctement détectés.

Le dernier test a été réalisé en utilisant, à titre de matériel de référence, le panel « QCMD 2013 C. difficile DNA EQA Panel » (Qnostics Ltd, Royaume-Uni). Chaque échantillon a été testé en effectuant l'extraction à l'aide du système NucliSENS® easyMAG® et l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 58 Tests avec des matériels de référence étalonnés et le système NucliSENS® easyMAG®

Échantillon	Type	UFC/mL	Pos./Rép.	Résultat
CD13-01	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁵	2/2	POS
CD13-02	<i>C. difficile</i> 017	8 x 10 ⁶	2/2	POS
CD13-03	Négatif	-	0/2	NÉG
CD13-04	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁴	2/2	POS
CD13-05	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁶	2/2	POS
CD13-06	<i>C. difficile</i> 017	8 x 10 ⁵	2/2	POS
CD13-07	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ³	2/2	POS
CD13-08	<i>C. sordellii</i>	2,1 x 10 ⁵	0/2	NÉG
CD13-09	<i>C. difficile</i> 027	4,6 x 10 ⁵	2/2	POS
CD13-10	<i>C. difficile</i> 017	8 x 10 ⁴	2/2	POS

Tous les échantillons ont été correctement détectés.

15.2.3 Efficacité de détection des génotypes (inclusivité)

Les performances du **C. difficile ELITE MGB Kit** ont correctement identifié 30 isolats de *C. difficile* toxigène représentatifs de la diversité génétique globale, incluant sept toxinotypes différents (0, III, V, VIII, X, XII et XXII), et treize ribotypes de PCR différents (001, 002, 010, 012, 014, 017, 020, 027, 036, 056, 087, 110 et 154). Toutes les souches ont été obtenues auprès de et quantifiées par l'ATCC, États-Unis, à l'exception de *C. difficile* souche CCUG 8864 (toxinotype X, A-/B+, aimablement fournie par Thermo-Fisher Diagnostics). Toutes les souches testées ont été ajoutées aux selles clarifiées négatives à une concentration proche de la limite de détection et ont été testées à l'aide du **C. difficile ELITE MGB Kit** en association avec le système NucliSENS® easyMAG®. Toutes les souches se sont révélées positives.

Tableau 59

ATCC	Souche	Origine de l'isolat	Toxine A/B	Toxinotype	Ribotype de PCR
9689	90556-M6S	(souche type)	A+B+	0	001
17857	870, N4	Inconnue	A+B+	0	001
43255	VPI 10463	Plaie abdominale	A+B+	0	087
43594	W1194	Selles humaines, Belgique	A+B+	0	005
43596	545	Selles humaines, Belgique	A+B+	0	012
43597	Inconnue	Selles humaines, Belgique	A+B+	0	014
43598	1470 (F)	Selles humaines, Belgique	A-B+	VIII	017
43599	2022	Selles humaines, Belgique	A+B+	0	001
43600	2149	Selles humaines, Belgique	A+B+	0	014
51695	BDMS 18 AN	Inconnue	A+B+	0	001
700792	14797-2	Michigan, selles féminines, 1977	A+B+	0	005
BAA-1382	630	Isolat clinique, Suisse, 1982	A+B+	0	012

Tableau 59 (continued)

ATCC	Souche	Origine de l'isolat	Toxine A/B	Toxinotype	Ribotype de PCR
BAA-1803	Inconnue	Isolat de Quest Clinical	A+B+	IIIc	027
BAA-1804	Inconnue	Isolat de Quest Clinical	A+B+	0	053
BAA-1805	Inconnue	Isolat de Quest Clinical	A+B+	IIIb	027
BAA-1806	Inconnue	Isolat de Quest Clinical	A+B+	0	220
BAA-1808	Inconnue	Isolat de Quest Clinical	A+B+	0	020
BAA-1811	Inconnue	Isolat de Quest Clinical	A+B+	0	057
BAA-1812	Inconnue	Isolat de Quest Clinical	A+B+	XII	024
BAA-1813	Inconnue	Isolat de Quest Clinical	A+B+	0	002
BAA-1814	Inconnue	Isolat de Quest Clinical	A+B+	XXII	251
BAA-1870	4118	Humaine, Maine, 2004 (souche hypervirulente NAP1/BI/027)	A+B+	IIIb	027
BAA-1871	4111	Humaine, New Jersey	A+B+	0	001
BAA-1872	4206	Humaine, Maine	A+B+	0	207
BAA-1873	5283	Humaine, New York	A+B+	0	053
BAA-1874	4205	Humaine, Oregon	A+B+	0	002
BAA-1875	5325	Humaine, Géorgie	A+B+	V	078
BAA-2155	LBM 0801058	Selles humaines, Albuquerque, NM, États-Unis	A+B+	XXII	251
BAA-2156	LBM 0801040	Selles humaines, Cambridge, Royaume-Uni 2007	A+B+	0	118
-	CCUG 8864	Prof. M. Delmee, C. U. Louvain, Bruxelles	A-B+	X	036

15.2.4 Réactivité croisée et interférence

La spécificité analytique du **C. difficile ELITE MGB Kit** a été évaluée pour la réactivité croisée en testant une *C. difficile* non toxigène, des espèces phylogénétiquement apparentées à *C. difficile* et d'autres microorganismes pathogènes couramment présents dans la microflore gastro-intestinale normale. Les espèces testées étaient des microorganismes bactériens et fongiques (testés à des concentrations de 1×10^6 UFC lorsque possible), des parasites viraux et intracellulaires (testés à des concentrations de 1×10^5 UFP ou UFI). De l'ADN génomique humain a été également testé (à 1×10^6 cellules). Tous les organismes testés (130) en utilisant le **C. difficile ELITE MGB Kit** en association avec le système NucliSENS® easyMAG® n'ont entraîné aucune réactivité croisée, à l'exception de *Clostridium nexile* qui a exercé une réaction croisée avec la réaction d'amplification du gène de la toxine B.

C. nexile a été observé dans approximativement 3 % des échantillons cliniques testés. *C. nexile* n'exprime pas la toxine B mais l'homologie de séquence est suffisante pour produire un signal dans l'analyse. La spécificité analytique globale était de 99 % (129/130).

La spécificité analytique du **C. difficile ELITE MGB Kit** a également été évaluée pour l'interférence microbienne en testant les mêmes espèces que celles utilisées pour la réactivité croisée. Les microorganismes ont été testés comme décrit ci-dessus dans les tests de la réactivité croisée, mais ont également été dopés individuellement avec chacune de deux souches de *C. difficile* toxigène différentes (ATCC 43255, souche VPI 10463, Toxinotype 0 ou ATCC BAA-1870, souche 4118, Toxinotype III) à une concentration proche de la limite de détection. Tous les organismes testés à l'aide du **C. difficile ELITE MGB Kit** en association avec le système NucliSENS® easyMAG® n'ont exercé aucune interférence microbienne.

Tableau 60

Genres et espèces	Réf.	Fournisseur	Quantité	Interférence ?
<i>Abiotrophia defectiva</i>	49176	ATCC	1×10^6	Non
<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606	ATCC	1×10^6	Non
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	15309	ATCC	1×10^6	Non
<i>Aeromonas hydrophila</i>	7966	ATCC	1×10^6	Non
<i>Alcaligenes faecalis</i> sous-espèce <i>faecalis</i>	15554	ATCC	1×10^6	Non
<i>Anaerococcus tetradius</i>	35098	ATCC	1×10^6	Non
<i>Bacillus cereus</i>	13472	ATCC	1×10^6	Non
<i>Bacteroides caccae</i>	43185	ATCC	1×10^6	Non
<i>Bacteroides merdae</i>	43184	ATCC	1×10^6	Non
<i>Bacteroides stercoris</i>	43183	ATCC	1×10^6	Non
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	15703	ATCC	1×10^6	Non
<i>Bifidobacterium longum</i>	15707	ATCC	1×10^6	Non
<i>Campylobacter coli</i>	BAA-370	ATCC	1×10^6	Non
<i>Campylobacter jejuni</i> sous-espèce <i>jejuni</i>	33292	ATCC	1×10^6	Non
<i>Candida albicans</i>	10231	ATCC	1×10^6	Non
<i>Cedecea davisae</i>	33431	ATCC	1×10^6	Non
<i>Chlamydia trachomatis</i>	8017775	Zeptomatrix	1×10^5	Non
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	25405	ATCC	1×10^6	Non
<i>Citrobacter freundii</i>	8090	ATCC	1×10^6	Non
<i>Citrobacter koseri</i>	27028	ATCC	1×10^6	Non
<i>Citrobacter sedlakii</i>	51115	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium beijerinckii</i>	8260	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium bifermentans</i>	638	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium bolteae</i>	BAA-613	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium butyricum</i>	19398	ATCC	$1,5 \times 10^5$	Non
<i>Clostridium chauvoei</i>	11957	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium difficile</i> (non toxigène)	43593	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium difficile</i> (non toxigène)	43601	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium difficile</i> (non toxigène)	43602	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium difficile</i> (non toxigène)	43603	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium difficile</i> (non toxigène)	700057	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium difficile</i> (non toxigène)	BAA-1801	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium difficile</i> (non toxigène)	BAA-1807	ATCC	1×10^6	Non

Tableau 60 (continued)

Genres et espèces	Réf.	Fournisseur	Quantité	Interférence ?
<i>Clostridium difficile</i> (non toxigène)	BAA-1809	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium difficile</i> (non toxigène)	BAA-1810	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium difficile</i> toxinotype Xla, A-/B-	R11402	Thermo-Fisher Diagnostics	1×10^6	Non
<i>Clostridium difficile</i> toxinotype Xlb, A-/B-	IS58	Thermo-Fisher Diagnostics	1×10^6	Non
<i>Clostridium fallax</i>	19400	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium haemolyticum</i>	9650	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium histolyticum</i>	19401	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium innocuum</i>	14501	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium methylpentosum</i>	43829	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium nexile</i>	27757	ATCC	1×10^6	Oui
<i>Clostridium novyi</i>	19402	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium paraputrificum</i>	25780	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium perfringens</i>	13124	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium ramosum</i>	25582	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium scindens</i>	35704	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium septicum</i>	12464	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium sordellii</i>	9714	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium sphenoides</i>	19403	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium spiroforme</i>	29899	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium sporogenes</i>	15579	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium symbiosum</i>	14940	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium tertium</i>	14573	ATCC	1×10^6	Non
<i>Clostridium tetani</i>	19406	ATCC	1×10^6	Non
<i>Collinsella aerofaciens</i>	25986	ATCC	1×10^6	Non
<i>Corynebacterium genitalium</i>	33798	ATCC	1×10^6	Non
<i>Desulfovibrio piger</i>	29098	ATCC	1×10^6	Non
<i>Edwardsiella tarda</i>	15947	ATCC	1×10^6	Non
<i>Eggerthella lenta</i>	25559	ATCC	1×10^6	Non
<i>Enterobacter aerogenes</i>	51697	ATCC	1×10^6	Non
<i>Enterobacter cloacae</i>	13047	ATCC	1×10^6	Non
<i>Enterococcus casseliflavus</i> (vanC2)	25788	ATCC	1×10^6	Non

Tableau 60 (continued)

Genres et espèces	Réf.	Fournisseur	Quantité	Interférence ?
<i>Enterococcus cecorum</i>	43198	ATCC	1×10^6	Non
<i>Enterococcus dispar</i>	51266	ATCC	1×10^6	Non
<i>Enterococcus faecalis</i> (vanB)	51299	ATCC	1×10^6	Non
<i>Enterococcus faecium</i> (vanA)	700221	ATCC	1×10^6	Non
<i>Enterococcus gallinarum</i> (vanC)	700425	ATCC	1×10^6	Non
<i>Enterococcus hirae</i>	10541	ATCC	1×10^6	Non
<i>Enterococcus raffinosus</i>	49427	ATCC	1×10^6	Non
<i>Escherichia coli</i>	35218	ATCC	1×10^6	Non
<i>Escherichia fergusonii</i>	35469	ATCC	1×10^6	Non
<i>Escherichia hermannii</i>	33650	ATCC	1×10^6	Non
<i>Flavonifractor plautii</i>	49531	ATCC	1×10^6	Non
<i>Fusobacterium varium</i>	8501	ATCC	1×10^6	Non
<i>Gardnerella vaginalis</i>	14019	ATCC	1×10^6	Non
<i>Gemella morbillorum</i>	27824	ATCC	1×10^6	Non
<i>Hafnia alvei</i>	13337	ATCC	1×10^6	Non
<i>Helicobacter fennelliae</i>	35683	ATCC	1×10^6	Non
<i>Helicobacter pylori</i>	43504	ATCC	1×10^6	Non
Homo sapiens, cellules humaines	-	Institut de recherche de l'hôpital pour enfants de Seattle	1×10^6	Non
<i>Klebsiella oxytoca</i>	8724	ATCC	1×10^6	Non
<i>Klebsiella pneumoniae</i> sous-espèce pneumoniae	13883	ATCC	1×10^6	Non
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4356	ATCC	1×10^6	Non
<i>Lactobacillus reuteri</i>	23272	ATCC	1×10^6	Non
<i>Lactococcus lactis</i>	11454	ATCC	1×10^6	Non
<i>Leminorela grimontii</i>	33999	ATCC	1×10^6	Non
<i>Listeria grayi</i>	19120	ATCC	1×10^6	Non
<i>Listeria innocua</i>	33090	ATCC	1×10^6	Non
<i>Listeria monocytogenes</i>	13932	ATCC	1×10^6	Non
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	27337	ATCC	1×10^6	Non
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	14029	ATCC	1×10^6	Non
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	25260	ATCC	1×10^6	Non
<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845	ATCC	1×10^6	Non

Tableau 60 (continued)

Genres et espèces	Réf.	Fournisseur	Quantité	Interférence ?
<i>Proteus mirabilis</i>	12453	ATCC	1×10^6	Non
<i>Proteus penneri</i>	35198	ATCC	1×10^6	Non
<i>Providencia alcalifaciens</i>	9886	ATCC	1×10^6	Non
<i>Providencia rettgeri</i>	9250	ATCC	1×10^6	Non
<i>Providencia stuartii</i>	33672	ATCC	1×10^6	Non
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	ATCC	1×10^6	Non
<i>Ruminococcus bromii</i>	27255	ATCC	$1,75 \times 10^5$	Non
<i>Salmonella choleraesuis</i> (typhimurium)	14028	ATCC	1×10^6	Non
<i>Salmonella enterica</i> sous-espèce Arizonae	13314	ATCC	1×10^6	Non
<i>Salmonella enterica</i> sous-espèce Enterica	700720	ATCC	1×10^6	Non
<i>Serratia liquefaciens</i>	27592	ATCC	1×10^6	Non
<i>Serratia marcescens</i>	274	ATCC	1×10^6	Non
<i>Shigella boydii</i>	9207	ATCC	1×10^6	Non
<i>Shigella dysenteriae</i>	11835	ATCC	1×10^6	Non
<i>Shigella sonnei</i>	25931	ATCC	1×10^6	Non
<i>Staphylococcus aureus</i>	BAA-1556	ATCC	1×10^6	Non
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	ATCC	1×10^6	Non
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	13637	ATCC	1×10^6	Non
<i>Streptococcus agalactiae</i>	12973	ATCC	1×10^6	Non
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	43078	ATCC	1×10^6	Non
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335	ATCC	1×10^6	Non
<i>Streptococcus uberis</i>	19436	ATCC	1×10^6	Non
<i>Trabulsiella guamensis</i>	49490	ATCC	1×10^6	Non
<i>Veillonella parvula</i>	10790	ATCC	1×10^6	Non
<i>Vibrio cholerae</i>	25870	ATCC	1×10^6	Non
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	17802	ATCC	1×10^6	Non
<i>Yersinia bercovieri</i>	43970	ATCC	1×10^6	Non
<i>Yersinia rohdei</i>	43380	ATCC	1×10^6	Non
Adénovirus	VR-1516	ATCC	1×10^5	Non
Coxsackievirus	VR-28	ATCC	1×10^5	Non
Cytomégalo virus	VR-1590	ATCC	1×10^5	Non

Tableau 60 (continued)

Genres et espèces	Réf.	Fournisseur	Quantité	Interférence ?
Échovirus	VR-41	ATCC	1×10^5	Non
Entérovirus	VR-836	ATCC	1×10^5	Non
Norovirus Type I	0810086CF	ZeptoMetrix	1×10^5	Non
Rotavirus	VR-2018	ATCC	1×10^5	Non

15.2.5 Reproductibilité

Un panel composé de 7 membres et constitué d'un échantillon de selles clarifié négatif et de diverses concentrations de deux souches de *C. difficile* toxigène (ATCC 43255 et BAA-1870) a été testé en trois réplicats par deux opérateurs. Pour chaque souche de *C. difficile*, le panel incluait un échantillon présentant une concentration inférieure à la LoD (censé entraîner un taux de positivité compris entre 20 et 80 %), un échantillon faiblement positif (à la LoD, censé entraîner un taux de positivité de 95 %) et un échantillon modérément positif (trois fois la LoD, censé entraîner un taux de positivité de 100 %). Chacun des deux opérateurs a effectué une série par jour pendant 12 jours avec trois lots de réactifs et sur un seul site (7 échantillons $\times$ 3 réplicats $\times$ 12 jours $\times$ 2 séries). Chaque échantillon a été testé en réalisant l'extraction à l'aide du système NucliSENS® easyMAG® et l'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Le membre négatif du panel a généré 100 % de résultats négatifs, le taux de positivité de l'échantillon présentant une concentration inférieure à la LoD était de 78 %, le taux de positivité de l'échantillon faiblement positif était de 98 % et le taux de positivité du membre du panel modérément positif était de 100 %.

Tableau 61 Reproductibilité inter-jours

Type d'échantillon	Jou-r 1	Jou-r 2	Jou-r 3	Jou-r 4	Jou-r 5	Jou-r 6	Jou-r 7	Jou-r 8	Jou-r 9	Jou-r 10	Jou-r 11	Jou-r 12	Concor-dance totale (%)
Négatif	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	72/72 (100 %)
Conc. inférieure à la LoD	6/12	12/12	8/12	10/12	7/12	7/12	11/12	10/12	12/12	9/12	11/12	10/12	113/144 (78 %)
Faiblement positif	10/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	11/12	12/12	12/12	141/144 (98 %)
Modérément positif	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	144/144 (100 %)

Tableau 62 Reproductibilité inter-lots

Type d'échantillon	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Concordance totale (%)
Négatif	30/30	27/27	15/15	72/72 (100 %)
Conc. inférieure à la LoD	50/60	38/54	25/30	113/144 (78 %)
Faiblement positif	57/60	54/54	30/30	141/144 (98 %)
Modérément positif	60/60	54/54	30/30	144/144 (100 %)

15.2.6 Effet de transfert/contamination croisée

Une étude analytique a été réalisée pour évaluer le potentiel de contamination croisée entre les échantillons de *C. difficile* à forte concentration (5×10^8 UFC/mL) et les échantillons négatifs à l'aide du **C. difficile ELITE MGB® Kit** utilisé en association avec le système NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux) et le 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems). Deux opérateurs ont effectué cinq séries d'extraction de 24 échantillons (11 échantillons de *C. difficile* à titre élevé, 11 échantillons négatifs, 1 échantillon de Contrôle positif et 1 échantillon de Contrôle négatif par série) selon un modèle en damier (échantillons de *C. difficile* à titre élevé en alternance avec des échantillons complètement négatifs). Les échantillons traités ont ensuite été amplifiés en cinq séries distinctes en utilisant deux modèles en damier différents. Les tests de contamination croisée n'ont entraîné aucun résultat faux positif à partir de 55 échantillons de *C. difficile* négatifs.

NOTE!

Les données complètes et les résultats des tests effectués pour évaluer les caractéristiques de performance du produit sont présentés à la Section 7 de la Fiche technique du produit « *C. difficile* ELITE MGB® Kit », FTP M800358.

16 BIBLIOGRAPHIE

Cloud J. and Kelly C. P. (2007) Cur. Opin. Gastroenterology 23: 4 - 9.

Cohen, S. H. et al. (1998) Clin. Infect. Diseases 26: 410 - 412.

Kuijper, E. J. et al. (2006) Clin. Microb. and Infection 12: 2 - 18.

Article about LoB and LoD statistics: K. Linnet and M. Kondratovich (2004) Clin. Chem. 50: 732 - 740.

CLSI EP37, Ed1E: "Supplemental Tables for interference Testing in Clinical Chemistry"

17 LIMITES DE LA PROCÉDURE

Utiliser ce produit uniquement avec les échantillons cliniques suivants : selles humaines liquides ou non formées.

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 contrôles positifs 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 ».

Ce produit nécessite l'utilisation de vêtements et d'instruments spéciaux pour l'extraction/la préparation des réactions d'amplification et pour 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'une espèce *C. difficile* toxigène viable mais permet de présumer de la présence de *C. difficile* toxigène. 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 indique que l'ADN du gène de la toxine A ou la toxine B n'a pas été détecté dans l'ADN extrait de l'échantillon ; toutefois, il n'est pas possible d'exclure le fait que l'ADN de *C. difficile* toxigène soit présent à un titre inférieur à la limite de détection du produit (se reporter à la section « Caractéristiques de performance »). Dans ce cas, le résultat pourrait être un faux négatif.

En cas de co-infections, la sensibilité d'une cible peut être affectée par l'amplification d'une seconde cible (se reporter à la section « Caractéristiques de performance »).

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

D'éventuels polymorphismes, insertions ou délétions au sein de la région de l'ADN ciblé par les amorces et les sondes du produit peuvent affecter la détection de l'ADN cible.

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 63

Réaction Positive Control non valide	
Causes possibles	Solutions
Erreur 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.
Dégradation 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.
Dégradation 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.	Contactez le service technique d'ELITechGroup.

Tableau 64

Réaction du Contrôle négatif non valide	
Causes possibles	Solutions
Erreur 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.
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.	Contactez le service technique d'ELITechGroup.

Tableau 65

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.	Contactez le service technique d'ELITechGroup.

Tableau 66

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 67

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.	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. 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. Si une valeur Ct est requise : - 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 biologique moléculaire, lors d'une session d'analyse « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

Tableau 68

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.	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. Ne pas utiliser de pipettes Pasteur. Les pipettes doivent être de type à déplacement positif ou être utilisées avec des cônes dotés d'un filtre pour les aérosols. Introduire les échantillons dans les dernières positions des instruments, comme indiqué par la GUI. Suivre la séquence de chargement indiquée par le logiciel.
Contamination environnementale du laboratoire.	Nettoyer toutes les surfaces en contact avec l'opérateur et les échantillons (y compris les pipettes) à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium (eau de Javel) à 3 % fraîchement préparée ou d'un agent de nettoyage de l'ADN/ARN. Effectuer un cycle de décontamination U.V. Utiliser un nouveau tube de PCR Mix et/ou de CPE.

Plateforme ouverte :

Tableau 69

ADN cible non détecté dans la réaction du Positive Control	
Causes possibles	Solutions
Distribution incorrecte dans les puits de la microplaque.	Faire attention lors de la distribution des réactions dans les puits de la microplaque et respecter la fiche de travail. Vérifier les volumes de PCR Mix distribués. Vérifier les volumes de contrôle positif distribués.
Dégradation du PCR Mix.	Utiliser une nouvelle aliquote du PCR Mix.
Dégradation 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 70

ADN cible détecté dans la réaction du Negative Control	
Causes possibles	Solutions
Distribution incorrecte dans les puits de la microplaque.	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 microplaque, 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 ou des étalons sur l'instrument.
Microplaque mal scellée.	Faire attention lors du scellage de la microplaque.
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 71

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.	Paramétrer la plage de calcul de la référence dans les cycles au cours desquels 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 72

Courbe de dissociation anormale	
Causes possibles	Solutions
Absence de pic défini. Pic défini mais différent de ceux des autres échantillons et de ceux des étalons ou 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



Numéro de référence.



Limite supérieure de température.



Code de lot.



Date de péremption (dernier jour du mois).



Dispositif médical de diagnostic *in vitro*.



Conforme aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*.



Identifiant unique de dispositif



Contenu suffisant pour « N » tests.



Attention, consulter le mode d'emploi.



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.

ELITE MGB ® detection reagents are covered by one or more of U. S. Patent numbers 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7671218, 7718374, 7723038, 7759126, 7767834, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529, and EP patent numbers 1687609, 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 as well as applications that are currently pending.

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.

Appendix A C. difficile 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 produit **C. difficile 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 multiplexe pour la **détection des gènes de la toxine A et la toxine B de *Clostridium difficile* toxigène (*C. difficile*)**, y compris la souche NAP1/BI/027 épidémique hypervirulente, dans des échantillons d'ADN extraits d'échantillons de selles liquides ou non formées.

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 de selles.

Le test est également validé en association avec le système **7500 Real-Time PCR System** en utilisant des échantillons humains de selles.

Le produit est destiné à être utilisé en tant qu'aide au diagnostic d'une infection à **C. difficile** toxigène dans les environnements de soins de santé en association avec d'autres résultats d'analyse de laboratoire et données cliniques.

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	Gène spécifique de la toxine A de <i>C. difficile</i>	AP525	Toxine A
Cible 2	Gène spécifique de la toxine B de <i>C. difficile</i>	FAM	Toxine B
Cible 3	IC2	AP642	IC

Matrice validée

- Selles natives collectées sans conservateurs

Contenu du kit et produits associés

C. difficile ELITE MGB Kit (M800358)		C. difficile - ELITE Positive Control (M800373)	
 X 4		 X 2	
C. difficile PCR Mix 4 tubes de 540 µL 24 réactions par tube 96 réactions par kit 5 cycles de congélation/décongélation par tube		C. difficile Positive Control 2 tubes de 160 µL 4 réactions par tube 8 réactions par kit 4 cycles de congélation/décongélation par tube	
Durée de conservation maximale :	24 mois	Durée de conservation maximale :	24 mois
Température de stockage	≤ -20 °C	Température de stockage	≤ -20 °C

Autres produits requis non inclus dans le kit

- Instrument ELITE InGenius : INT030. - Instrument ELITE BeGenius : INT040. - ELITE InGenius SP 200 : INT032SP200. - ELITE InGenius SP200 Consumable Set : INT032CS. - ELITE InGenius PCR Cassette : INT035PCR. - ELITE InGenius Waste Box : F2102-000. 300 µL Filter Tips Axygen : TF-350-L-R-S. 1000 µL Filter Tips Tecan : 30180118.	- CPE – Internal Control : CTCPE - InhibitEX Buffer (QIAGEN GmbH, Allemagne, réf. 19593), ou S. T. A. R. Buffer (Roche Diagnostics GmbH, réf. 3 335 208) ou dispositif équivalent. - Minitip Flocked Swab® (COPAN Italia S.p.A., Italie, réf. 518CS01) ou dispositif équivalent.
--	--

Protocole ELITE InGenius et ELITE BeGenius

- Volume d'échantillon - Volume de CPE - Volume d'élution total	200 µL 10 µL 100 µL	- Volume initial d'éluat de PCR - Volume de PCR Mix - Fréquence des contrôles	10 µL 20 µL 15 jours
---	---------------------------	---	----------------------------

Performances de ELITE InGenius et ELITE BeGenius

Matrice	Limite de détection	Sensibilité	Spécificité
Selles natives	500 UFC/mL	100 % (30/30)	97,8 % (44/45)

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 73

Échantillon	Exigences de prélèvement	Conditions de transport/conservation			
		+16/+26 °C (température ambiante)	+2°/+8 °C*	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Selles natives	collectées sans conservateurs	≤ 24 heures	≤ 48 heures	≤ 1 mois	> 1 mois

Procédures ELiTe InGenius

L'interface graphique (GUI) du logiciel ELiTe InGenius guide l'utilisateur, étape par étape, pour paramétrer 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 : « 100 µL »	3. Scanner les codes-barres des échantillons à l'aide du lecteur de codes-barres portable ou saisir l'ID de l'échantillon
4. Sélectionner le « Assay Protocol » (Protocole de test) d'intérêt : C.diff ELiTe_ST_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) (par ex. éluats, contrôles)

1. Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) sur l'écran tactile	2. Vérifier les volumes d'extraction : Initial : « 200 µL », élution : « 100 µL »	3. Scanner les codes-barres des échantillons à l'aide du lecteur de codes-barres portable ou saisir l'ID de l'échantillon
4. Sélectionner le « Assay Protocol » (Protocole de test) d'intérêt : C. diff ELITE_ST_200_100 ou C. diff ELITE_PC ou C. diff ELITE_NC	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 (GUI) du logiciel ELITE BeGenius guide l'utilisateur, étape par étape, pour paramétrer 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 : « 100 µL »
4. Sélectionner le « Assay Protocol » (Protocole de test) d'intérêt : C.diff ELITE_Be_ST_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 Contrôle interne dans le Reagent Rack/Elution Rack (Rack de réactifs/Rack 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) (par 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 : « 100 µL »
4. Sélectionner le « Assay Protocol » (Protocole de test) d'intérêt : C.diff ELITE_Be_ST_200_100 ou C.diff ELITE_Be_PC ou C.diff ELITE_Be_NC	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 » (Portoir de PCR) 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

